UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

RENATA TAKEARA

**Estudo químico e avaliação da atividade citotóxica das ascídias
Didemnum psammatores (Sluiter, 1895) e *Eudistoma vannamei*
Millar, 1977 (Tunicata: Ascidiacea)**

Ribeirão Preto
2006

RENATA TAKEARA

**Estudo químico e avaliação da atividade citotóxica das ascídias
Didemnum psammatores (Sluiter, 1895) e *Eudistoma vannamei*
Miller, 1977 (Tunicata: Ascidiacea)**

**Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em
Ciências Farmacêuticas.**

**Área de concentração: Produtos
Naturais e Sintéticos.
Orientador: Prof. Dr. João Luis Callegari
Lopes**

**Ribeirão Preto
2006**

FICHA CATALOGRÁFICA

Takeara, Renata

Estudo químico e avaliação da atividade citotóxica das ascídias
Didemnum psammatores (Sluiter, 1895) e *Eudistoma vancouveri*
Millar, 1977 (Tunicata: Ascidiacea). Ribeirão Preto, 2006.
186 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração:
Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Lopes, João Luis Callegari.

1. *Didemnum psammatores*. 2. *Eudistoma vancouveri*. 3.
Ascídias. 4. Atividade citotóxica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Renata Takeara

Estudo químico e avaliação da atividade citotóxica das ascídias *Didemnum psammotodes* (Sluiter, 1895) e *Eudistoma vannamei* Millar, 1977 (Tunicata: Ascidiacea)

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor
Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais, Paulo e Neusa,
pelo amor, apoio e incentivo
incondicionais.

Ao Gustavo,
pelo amor, compreensão e
apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Luis Callegari Lopes, pela orientação, oportunidade, confiança e amizade.

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes, pelas dicas, sugestões, amizade e oportunidade de trabalhar com os produtos naturais marinhos.

A todos os docentes do Laboratório de Química Orgânica da FCFRP - USP pelas dicas e sugestões.

Ao funcionário José Carlos Tomaz, do Laboratório de Química Orgânica da FCFRP - USP, pela obtenção dos espectros de massas e ajuda em diversas situações.

A todos os funcionários do Laboratório de Química Orgânica da FCFRP - USP, pelo auxílio e colaboração em diversas situações.

A todos os alunos de iniciação científica e pós-graduandos do Laboratório de Química Orgânica da FCFRP - USP, pelo auxílio, companheirismo e agradável convivência.

À funcionária Virgínia Helena Betarello, do Departamento de Química – FFCLRP - USP, pela obtenção dos espectros de RMN.

A todos os docentes do Laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina - UFC, pela colaboração na realização dos ensaios de atividade citotóxica, pelo aprendizado, atenção dispensada e oportunidade de trabalhar com as ascídias.

Ao Prof. Dr. Tito Monteiro da Cruz Lotufo, do Departamento de Engenharia de Pesca – UFC, pelas fotos e identificação das espécies utilizadas nesse trabalho.

À amiga Paula Christine Jimenez, do Laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina - UFC, pelas coletas, obtenção dos extratos brutos, realização dos ensaios de atividade citotóxica, atenção dispensada e amizade.

Ao amigo Diego Veras Wilke, do Laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina - UFC, pelas coletas, obtenção dos extratos brutos, auxílio nos ensaios de atividade citotóxica e amizade.

A todos os colegas do Laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina - UFC, pelos ensinamentos, ajuda e agradável convivência.

Ao Gustavo, pelo incentivo, apoio e companheirismo de sempre.

À minha irmã Paula e minha tia Luciane, pelo companheirismo e amizade.

À FAPESP, pela bolsa de doutorado concedida e ao CNPq/Projeto Milênio Proc. 420015/05-1.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

*“O caminho da virtude não admite
pausas: quem não progride, retrocede.”*

Mary Ward

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas	i
Lista de tabelas	ii
Lista de figuras	v
Resumo	x
Summary	xii
Substâncias isoladas e identificadas de <i>Didemnum psammatores</i> e <i>Eudistoma vannahmei</i>	xiv
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1. Considerações gerais	2
1.2. Ascídias	4
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Especificação dos materiais e instrumentos utilizados	14
3.2. Coleta dos animais	16
3.3. Obtenção dos extratos	16
3.4. Fracionamento do extrato metanólico de <i>D. psammatores</i> proveniente de Icapuí (CE)	17
3.4.1. Fracionamento da fração solúvel em MeOH do extrato metanólico de <i>D. psammatores</i> (DPI-1)	20
3.4.2. Fracionamento da fração insolúvel em MeOH do extrato metanólico de <i>D. psammatores</i> (DPI-2) e obtenção das substâncias 9 + 10 + 11	22
3.5. Primeiro fracionamento do extrato metanólico de <i>D. psammatores</i> coletado em Trairi (CE)	25
3.5.1. Fracionamento da fase hexânica (DPT-1) do extrato metanólico de <i>D. psammatores</i> e obtenção das substâncias 13 + 14 + 15 e 9 + 10	27
3.5.2. Fracionamento da fase butanólica (DPT-3) do extrato metanólico de <i>D. psammatores</i> e isolamento da substância 2	33
3.6. Segundo fracionamento do extrato metanólico de <i>D. psammatores</i> coletado em Trairi (CE)	36
3.6.1. Fracionamento da fase aquosa (DPTFA) do extrato metanólico de <i>D. psammatores</i>	38
3.6.2. Fracionamento da fase clorofórmica (DPTFC) do extrato metanólico de <i>D. psammatores</i>	41
3.7. Fracionamento do extrato metanólico de <i>E. vannahmei</i>	45

3.7.1. Fracionamento da fase hexânica (EV-1) do extrato metanólico de <i>E. vannamei</i> e obtenção das substâncias 13 + 14 + 15 + 16 + 17 e 19 + 20 + 21 + 22 + 23	47
3.7.2. Fracionamento da fase metanol/água (EV-2) do extrato metanólico de <i>E. vannamei</i>	51
3.8. Ensaio de citotoxicidade.....	55
3.8.1. Potencial antimitótico em ovos de ouriço do mar <i>Lytechinus variegatus</i> ..	55
3.8.2. Estudos em células tumorais <i>in vitro</i> (Lamarck, 1816).....	57
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1. Determinação estrutural dos constituintes químicos de <i>D. psammotodes</i> e <i>E. vannamei</i>	66
4.1.1. Identificação dos nucleosídeos.....	66
4.1.2. Identificação dos esteróides (9, 10, 11 e 12).....	113
4.1.3. Identificação dos ácidos graxos metilados (13, 14, 15, 16 e 17).....	120
4.1.4. Identificação dos ácidos graxos (18, 19, 20, 21, 22 e 23).....	126
4.1.5. Identificação dos monoalquil glicerol éteres (24, 25 e 26).....	140
4.2. Ensaio de citotoxicidade.....	149
4.2.1. Potencial antimitótico em ovos de ouriço do mar <i>Lytechinus variegatus</i> ..	149
4.2.2. Estudos em células tumorais <i>in vitro</i>	155
5. CONCLUSÕES	169
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	173

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

CC: cromatografia em coluna

CCC: cromatografia em coluna clássica

CCDC: cromatografia em camada delgada comparativa

CG: cromatografia com fase gasosa

CG/EM: cromatografia com fase gasosa acoplada a espectrometria de massas

CI₅₀: concentração inibitória que provoca 50% do efeito máximo

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

COSY ¹H-¹H: *correlated spectroscopy* (RMN bidimensional, correlação homonuclear, ¹H)

d: dubleto

dd: duplo dubleto

ddd: duplo duplo dubleto

DEPT-135°: *distortionless enhancement by polarization transfer* (técnica de RMN-¹³C, com pulso em relação ao hidrogênio em 135°)

DMSO-d₆: dimetilsulfóxido deuterado

EM-IES: espectrometria de massas com ionização por *electrospray*

HMBC: *heteronuclear multiple bond correlation* (RMN bidimensional, correlação heteronuclear, ¹H e ¹³C)

HMQC: *heteronuclear multiple-quantum coherence* (RMN bidimensional, correlação heteronuclear, ¹H e ¹³C)

IC: intervalo de confiança

IV: infravermelho

J: constante de acoplamento

m: multipletto

RMN ¹³C: ressonância magnética nuclear de carbono 13

RMN ¹H: ressonância magnética nuclear de hidrogênio

s: singleto

sl: singleto largo

t: tripleto

UV/Vis: ultravioleta/visível

δ: deslocamento químico

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Espécies de <i>Didemnum</i> investigadas, principais classes de substâncias isoladas e atividades biológicas.....	6
Tabela 2 -	Espécies de <i>Eudistoma</i> investigadas, principais classes de substâncias isoladas e atividades biológicas.....	8
Tabela 3 -	Produtos naturais marinhos em triagens clínicas ou pré-clínicas.....	10
Tabela 4 -	Fracionamento do extrato metanólico de <i>D. psammatores</i> em coluna de Sephadex LH-20.....	20
Tabela 5 -	Fracionamento da fração DPI-1.8 do extrato metanólico de <i>D. psammatores</i>	21
Tabela 6 -	Fracionamento do extrato metanólico de <i>D. psammatores</i> em coluna de sílica gel.....	23
Tabela 7 -	Frações reunidas e respectivas massas obtidas no fracionamento do extrato metanólico de <i>D. psammatores</i> em sílica gel.....	23
Tabela 8 -	Purificação da fração DPI-2.4 em coluna de sílica gel.....	25
Tabela 9 -	Frações reunidas e respectivas massas obtidas na purificação da fração DPI-2.4 em coluna de sílica gel.....	25
Tabela 10 -	Fases resultantes da primeira partição do extrato metanólico de <i>D. psammatores</i>	27
Tabela 11 -	Fracionamento da fase hexânica (DPT-1) do extrato metanólico de <i>D. psammatores</i> em coluna de sílica gel.....	28
Tabela 12 -	Frações reunidas e respectivas massas obtidas no fracionamento da fase hexânica (DPT-1) do extrato metanólico de <i>D. psammatores</i> em coluna de sílica gel.....	29
Tabela 13 -	Purificação da fração DPT-1.7 em coluna de sílica gel.....	31
Tabela 14 -	Frações reunidas e respectivas massas obtidas na purificação da fração DPT-1.7 em coluna de sílica gel.....	32
Tabela 15 -	Purificação da fração DPT-1.10 em coluna de sílica gel.....	33
Tabela 16 -	Frações reunidas e respectivas massas obtidas na purificação da fração DPT-1.10 em coluna de sílica gel.....	33
Tabela 17 -	Fracionamento da fase butanólica (DPT-3) do extrato metanólico de <i>D. psammatores</i> em coluna de Sephadex LH-20.....	35
Tabela 18 -	Fracionamento da fração DPT-3.6 do extrato metanólico de <i>D. psammatores</i>	36
Tabela 19 -	Fases resultantes da segunda partição do extrato metanólico de <i>D. psammatores</i>	38
Tabela 20 -	Fracionamento da fase aquosa do extrato metanólico de <i>D. psammatores</i> em coluna de Sephadex LH-20.....	40
Tabela 21 -	Fracionamento da fase clorofórmica (DPTFC) do extrato metanólico de <i>D. psammatores</i> em coluna de sílica gel.....	42

Tabela 22 - Frações reunidas e respectivas massas obtidas no fracionamento da fase clorofórmica (DPTFC) do extrato metanólico de <i>D. psammatores</i> em coluna de sílica gel.....	43
Tabela 23 - Purificação da fração DPTFC-3 em coluna de sílica gel.....	44
Tabela 24 - Frações reunidas e respectivas massas obtidas na purificação da fração DPTFC-3 em coluna de sílica gel.....	45
Tabela 25 - Fases resultantes da partição do extrato metanólico de <i>E. vannamei</i>	46
Tabela 26 - Fracionamento da fase hexânica do extrato metanólico de <i>E. vannamei</i> em coluna de sílica gel.....	49
Tabela 27 - Frações reunidas e respectivas massas obtidas no fracionamento da fase hexânica do extrato metanólico de <i>E. vannamei</i> em coluna de sílica gel.....	50
Tabela 28 - Fracionamento da fase metanol/água do extrato metanólico de <i>E. vannamei</i> em coluna de sílica gel C ₁₈	52
Tabela 29 - Fracionamento da fração EV-2.1 do extrato metanólico de <i>E. vannamei</i>	53
Tabela 30 - Fracionamento da fração EV-2.2 do extrato metanólico de <i>E. vannamei</i>	55
Tabela 31 - Linhagens tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	57
Tabela 32 - Dados de RMN ¹ H (400 MHz) e ¹³ C (obtidos dos espectros de HMQC e HMBC) e HMBC da substância 1 (2'- deoxiuridina) em DMSO-d ₆ e comparação com dados da literatura.....	69
Tabela 33 - Dados de RMN ¹ H (400 MHz) e ¹³ C (obtidos dos espectros de HMQC e HMBC) e HMBC da substância 2 (timidina) em DMSO-d ₆ e comparação com dados da literatura.....	70
Tabela 34 - Dados de RMN ¹ H (400 MHz) da substância 3 (uridina) em DMSO-d ₆ e comparação com dados da literatura.....	71
Tabela 35 - Dados de RMN ¹ H (400 MHz) e ¹³ C (obtidos dos espectros de HMQC e HMBC) e HMBC da substância 5 (2'- deoxiinosina) em DMSO-d ₆ e comparação com dados da literatura.....	86
Tabela 36 - Dados de RMN ¹ H (400 MHz), RMN ¹³ C (100 MHz) COSY ¹ H- ¹ H e HMBC da substância 6 (2'- deoxiguanosina) em D ₂ O e comparação com dados da literatura.....	87
Tabela 37 - Dados de RMN ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (obtidos dos espectros de HMQC e HMBC) e HMBC da substância 7 (guanosina) em DMSO-d ₆ e comparação com dados da literatura.....	88
Tabela 38 - Dados de RMN ¹ H (400 MHz), ¹³ C e HMBC da substância 8 (adenosina) em DMSO-d ₆ e comparação com dados da literatura.....	89
Tabela 39 - Identificação dos constituintes químicos de DPI-2.3.....	115
Tabela 40 - Identificação dos constituintes químicos de DPT-1.5.....	115
Tabela 41 - Identificação dos constituintes químicos de EV-1.9.....	116
Tabela 42 - Identificação dos constituintes químicos de DPT-1.2 por CG.....	121
Tabela 43 - Identificação dos constituintes químicos de EV-1.3 por CG.....	121
Tabela 44 - Identificação dos constituintes químicos de DPTFC-3.4.....	131
Tabela 45 - Identificação dos constituintes químicos de EV-1.12.....	131

Tabela 46 - Dados de RMN ^1H (400 MHz), ^{13}C (100 MHz) e HMBC da amostra DPT-1.10.7 em CDCl_3 e comparação com dados da literatura.....	142
Tabela 47 - Atividade antiproliferativa das frações de <i>D. psammatores</i> , coletado em Trairi (CE), sobre ovos de ouriço do mar.....	150
Tabela 48 - Atividade antiproliferativa das substâncias de <i>D. psammatores</i> sobre ovos de ouriço do mar.....	152
Tabela 49 - Atividade antiproliferativa das frações do extrato metanólico de <i>E. vannahae</i> sobre a 1ª divisão de ovos de ouriço do mar.....	154
Tabela 50 - CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) da atividade antiproliferativa em linhagens celulares tumorais das frações obtidas de <i>D. psammatores</i> avaliadas pelo método colorimétrico do MTT.....	157
Tabela 51 - CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) e respectivos intervalos de confiança (IC 95%) da atividade antiproliferativa em linhagens celulares tumorais das substâncias de <i>D. psammatores</i> e <i>E. vannahae</i> , avaliadas pelo método colorimétrico do MTT.....	158
Tabela 52 - CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) da atividade antiproliferativa em linhagens celulares tumorais das frações obtidas do extrato metanólico de <i>E. vannahae</i> avaliadas pelo método colorimétrico do MTT.....	159

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	<i>Didemnum psammatores</i>	5
Figura 2 -	<i>Eudistoma vannahmei</i>	7
Figura 3 -	Fluxograma representativo do fracionamento da fração solúvel em MeOH do extrato metanólico de <i>D. psammatores</i> e isolamento de suas substâncias.....	18
Figura 4 -	Fluxograma representativo do fracionamento da fração insolúvel em MeOH do extrato metanólico de <i>D. psammatores</i> e isolamento de suas substâncias.....	19
Figura 5 -	Fluxograma representativo do primeiro fracionamento do extrato metanólico de <i>D. psammatores</i>	26
Figura 6 -	Fluxograma representativo da purificação das frações da fase hexânica do extrato metanólico de <i>D. psammatores</i>	30
Figura 7 -	Fluxograma representativo do fracionamento da fase butanólica do extrato metanólico de <i>D. psammatores</i>	34
Figura 8 -	Fluxograma representativo do segundo fracionamento do extrato metanólico de <i>D. psammatores</i>	37
Figura 9 -	Fluxograma representativo do fracionamento da fração aquosa do extrato metanólico de <i>D. psammatores</i>	39
Figura 10 -	Fluxograma representativo da purificação das frações da fase clorofórmica do extrato metanólico de <i>D. psammatores</i>	41
Figura 11 -	Fluxograma representativo do fracionamento do extrato metanólico de <i>E. vannahmei</i>	46
Figura 12 -	Fluxograma representativo do fracionamento e purificação da fase hexânica do extrato metanólico de <i>E. vannahmei</i>	47
Figura 13 -	Fluxograma representativo do fracionamento da fase metanol/água do extrato metanólico de <i>E. vannahmei</i>	51
Figura 14 -	Espectro de RMN ¹ H da substância 1 – 400 MHz, DMSO-d ₆	72
Figura 15 -	Espectro de RMN ¹ H da substância 2 – 400 MHz, DMSO-d ₆	73
Figura 16 -	Espectro de RMN ¹ H da substância 3 – 400 MHz, DMSO-d ₆	74
Figura 17 -	Espectro bidimensional (HMQC) da substância 1 – 500 MHz, DMSO-d ₆	75
Figura 18 -	Espectro bidimensional (HMQC) da substância 2 – 500 MHz, DMSO-d ₆	76
Figura 19 -	Espectro bidimensional (HMBC) da substância 1 – 500 MHz, DMSO-d ₆	77
Figura 20 -	Espectro bidimensional (HMBC) da substância 2 – 500 MHz, DMSO-d ₆	78
Figura 21 -	Espectro de massas, por <i>electrospray</i> , da substância 1 – cone 20, modo negativo.....	79
Figura 22 -	Espectro de massas, por <i>electrospray</i> , EM/EM da substância 1 – colisão 16, modo negativo.....	80
Figura 23 -	Espectro de massas, por <i>electrospray</i> , da substância 2 – cone 30, modo negativo.....	81

Figura 24 -	Espectro de massas, por <i>electrospray</i> , da substância 3 – cone 30, modo negativo.....	82
Figura 25 -	Espectro de RMN ^1H da substância 4 – 400 MHz, DMSO- d_6	90
Figura 26 -	Espectro de RMN ^1H da substância 5 – 400 MHz, DMSO- d_6	91
Figura 27 -	Espectro de RMN ^1H da substância 6 – 400 MHz, D_2O	92
Figura 28 -	Espectro de RMN ^1H da substância 7 – 500 MHz, DMSO- d_6	93
Figura 29 -	Espectro de RMN ^1H da substância 8 – 400 MHz, DMSO- d_6	94
Figura 30 -	Espectro de RMN ^{13}C da substância 6 – 100 MHz, D_2O	95
Figura 31 -	Espectro de RMN ^{13}C da substância 8 – 125 MHz, DMSO- d_6	96
Figura 32 -	Espectro de RMN ^{13}C (DEPT-135°) da substância 6 – 100 MHz, D_2O	97
Figura 33 -	Espectro bidimensional (COSY ^1H - ^1H) da substância 5 – 500 MHz, D_2O	98
Figura 34 -	Espectro bidimensional (HMQC) da substância 5 – 500 MHz, DMSO- d_6	99
Figura 35 -	Espectro bidimensional (HMQC) da substância 6 – 500 MHz, D_2O	100
Figura 36 -	Espectro bidimensional (HMQC) da substância 7 – 500 MHz, DMSO- d_6	101
Figura 37 -	Espectro bidimensional (HMQC) da substância 8 – 500 MHz, DMSO- d_6	102
Figura 38 -	Espectro bidimensional (HMBC) da substância 5 – 500 MHz, DMSO- d_6	103
Figura 39 -	Espectro bidimensional (HMBC) da substância 6 – 500 MHz, D_2O	104
Figura 40 -	Espectro bidimensional (HMBC) da substância 7 – 500 MHz, DMSO- d_6	105
Figura 41 -	Espectro bidimensional (HMBC) da substância 8 – 500 MHz, DMSO- d_6	106
Figura 42 -	Espectro de massas, por <i>electrospray</i> , da substância 4 – cone 30, modo negativo.....	107
Figura 43 -	Espectro de massas, por <i>electrospray</i> , da substância 5 – cone 30, modo negativo.....	108
Figura 44 -	Espectro de massas, por <i>electrospray</i> , EM/EM da substância 5 – colisão 20, modo negativo.....	109
Figura 45 -	Espectro de massas, por <i>electrospray</i> , da substância 6 – cone 30, modo negativo.....	110
Figura 46 -	Espectro de massas, por <i>electrospray</i> , da substância 7 , modo positivo.	111
Figura 47 -	Espectro de massas, por <i>electrospray</i> , da substância 8 – cone 20, modo positivo.....	112
Figura 48 -	Cromatograma (CG) da amostra DPI-2.3.....	116
Figura 49 -	Espectro de massas do componente de tempo de retenção 22,437 min. (colestanol) da amostra DPI-2.3.....	116
Figura 50 -	Espectro de massas do componente de tempo de retenção 22,938 min. (colestanona) da amostra DPI-2.3.....	116
Figura 51 -	Espectro de massas do componente de tempo de retenção 24,708 min. (estigmasterol) da amostra DPI-2.3.....	117
Figura 52 -	Cromatograma (CG) da amostra DPT-1.5.....	117
Figura 53 -	Espectro de massas do componente de tempo de retenção 22,439 min. (colestanol) da amostra DPT-1.5.....	117

Figura 54 -	Espectro de massas do componente de tempo de retenção 22,939 min. (colestanona) da amostra DPT-1.5.....	118
Figura 55 -	Cromatograma (CG) da amostra EV-1.9.....	118
Figura 56 -	Espectro de massas do componente de tempo de retenção 22,303 min. (colesterol) da amostra EV-1.9.....	118
Figura 57 -	Espectro de massas do componente de tempo de retenção 22,449 min. (colestanol) da amostra EV-1.9.....	119
Figura 58 -	Espectro de RMN ^1H da amostra DPT-1.2 – 400 MHz, CDCl_3	122
Figura 59 -	Espectro de RMN ^{13}C da amostra DPT-1.2 – 100 MHz, CDCl_3	123
Figura 60a -	Cromatograma dos padrões de ácidos graxos metilados.....	124
Figura 60b -	Cromatograma da amostra DPT-1.2.....	124
Figura 61a -	Cromatograma dos padrões de ácidos graxos metilados.....	125
Figura 61b -	Cromatograma da amostra EV-1.3.....	125
Figura 62 -	Mecanismo de fragmentação de ácidos graxos (perda de 43).....	129
Figura 63 -	Rearranjo de Mc Lafferty.....	129
Figura 64 -	Mecanismo de fragmentação de ácidos graxos (formação dos íons m/z 87 e m/z 143).....	130
Figura 65 -	Espectro de absorção na região do IV da amostra DPT-1.7.3.....	132
Figura 66 -	Espectro de RMN ^1H da amostra DPT-1.7.3 – 400 MHz, CDCl_3	133
Figura 67 -	Espectro de RMN ^{13}C da amostra DPT-1.7.3 – 100 MHz, CDCl_3	134
Figura 68 -	Espectro de massas, por <i>electrospray</i> , da amostra DPT-1.7.3 – cone 30, modo negativo.....	135
Figura 69 -	Cromatograma (CG) da amostra DPTFC-3.4.....	136
Figura 70 -	Espectro de massas do componente de tempo de retenção 9,350 min. (ácido láurico) da amostra DPTFC-3.4.....	136
Figura 71 -	Espectro de massas do componente de tempo de retenção 12,175 min. (ácido mirístico) da amostra DPTFC-3.4.....	136
Figura 72 -	Espectro de massas do componente de tempo de retenção 13,697 min. (ácido pentadecanóico) da amostra DPTFC-3.4.....	137
Figura 73 -	Espectro de massas do componente de tempo de retenção 15,701 min. (ácido palmítico) da amostra DPTFC-3.4.....	137
Figura 74 -	Espectro de massas do componente de tempo de retenção 18,411 min. (ácido margárico) da amostra DPTFC-3.4.....	137
Figura 75 -	Espectro de massas do componente de tempo de retenção 22,239 min. (ácido esteárico) da amostra DPTFC-3.4.....	137
Figura 76 -	Cromatograma (CG) da amostra EV-1.12.....	138
Figura 77 -	Espectro de massas do componente de tempo de retenção 12,182 min. (ácido mirístico) da amostra EV-1.12.....	138
Figura 78 -	Espectro de massas do componente de tempo de retenção 13,705 min. (ácido pentadecanóico) da amostra EV-1.12.....	138
Figura 79 -	Espectro de massas do componente de tempo de retenção 15,701 min. (ácido palmítico) da amostra EV-1.12.....	139

Figura 80 -	Espectro de massas do componente de tempo de retenção 18,428 min. (ácido margárico) da amostra EV-1.12.....	139
Figura 81 -	Espectro de massas do componente de tempo de retenção 22,253 min. (ácido esteárico) da amostra EV-1.12.....	139
Figura 82 -	Espectro de RMN ^1H da amostra DPT-1.10.7 – 400 MHz, CDCl_3	143
Figura 83 -	Espectro de RMN ^{13}C da amostra DPT-1.0.7 – 100 MHz, CDCl_3	144
Figura 84 -	Espectro de RMN ^{13}C (DEPT-135°) da amostra DPT-1.10.7 – 100 MHz, CDCl_3	145
Figura 85 -	Espectro bidimensional (HMQC) da amostra DPT-1.10.7 – 500 MHz, CDCl_3	146
Figura 86 -	Espectro bidimensional (HMBC) da amostra DPT-1.10.7 – 500 MHz, CDCl_3	147
Figura 87 -	Espectro de massas, por <i>electrospray</i> , da amostra DPT-1.10.7 – cone 30, modo negativo.....	148
Figura 88 -	Atividade antiproliferativa das frações de <i>D. psammátodes</i> , coletado em Trairi (CE), sobre a 1ª divisão de ovos de ouriço do mar.....	151
Figura 89 -	Atividade antiproliferativa das frações de <i>D. psammátodes</i> , coletado em Trairi (CE), sobre a fase de blástula de ovos de ouriço do mar.....	151
Figura 90 -	Atividade antiproliferativa das substâncias de <i>D. psammátodes</i> , coletado em Trairi (CE), sobre a 1ª divisão de ovos de ouriço do mar....	152
Figura 91 -	Atividade antiproliferativa das substâncias de <i>D. psammátodes</i> , coletado em Icapuí (CE), sobre a 1ª divisão de ovos de ouriço do mar..	153
Figura 92 -	Atividade antiproliferativa das substâncias de <i>D. psammátodes</i> , coletado em Icapuí (CE), sobre a fase blástula de ovos de ouriço do mar.....	153
Figura 93 -	Atividade antiproliferativa das frações de <i>E. vannamei</i> sobre a 1ª divisão de ovos de ouriço do mar.....	154
Figura 94 -	Curva de crescimento de células de leucemia humana HL-60 tratadas com DPT-1.2 e EV-1.3. A viabilidade celular foi determinada por exclusão de azul de tripan nos tempos de 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas após a incubação. As amostras foram testadas nas concentrações de 1, 3 e 10 $\mu\text{g/mL}$. Os dados correspondem a media $\pm$ E.P.M. de dois experimentos independentes.....	161
Figura 95 -	Efeito de DPT-1.2 e EV-1.3 na viabilidade de células leucêmicas HL-60 determinado por exclusão de azul de tripan depois de 24 horas de incubação. O controle negativo foi realizado na ausência (C) e na presença do veículo usado para diluir a droga (V). Doxorubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) foi usada como controle positivo (D). Os dados correspondem a media $\pm$ E.P.M. de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste Student Newman Keuls	162

- Figura 96 - Efeito de DPT-1.2 e EV-1.3 na inibição da incorporação da 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) em células leucêmicas HL-60 depois de 24 horas de incubação. O controle negativo foi realizado na ausência (C) e na presença do veículo usado para diluir a droga (V). Doxorubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo (D). Os dados correspondem a média ± E.P.M. de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste Student Newman Keuls 164
- Figura 97 - Microfotografias das células HL-60 coradas com Hematoxilina/Eosina. A: controle; B: veículo; C: células tratadas por 24h com doxorubicina (0,3 µg/mL); D: células tratadas por 24h com DPT-1.2 (3 µg/mL); E: células tratadas por 24h com DPT-1.2 (10 µg/mL); F: células tratadas por 24h com EV-1.3 (3 µg/mL); G: células tratadas por 24h com EV-1.3 (10 µg/mL). Aumento x 400..... 166
- Figura 98 - Efeito de DPT-1.2 e EV-1.3 em células leucêmicas HL-60, analisado pela coloração por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina depois de 24 horas de incubação. O controle negativo foi realizado na ausência (C) e na presença do veículo usado para diluir a droga (V). Doxorubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo (D). Os dados correspondem a média ± E.P.M. de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste Student Newman Keuls 168

RESUMO

TAKEARA, R. **Estudo químico e avaliação da atividade citotóxica das ascídias *Didemnum psammatores* (Sluiter, 1895) e *Eudistoma vannamei* Millar, 1977 (Tunicata: Ascidiacea).** 2006. 186 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Amostras de *Didemnum psammatores* foram coletadas em Icapuí (CE) e Trairi (CE). O extrato metanólico de *D. psammatores*, proveniente de Icapuí, foi submetido a processo de fracionamento e purificação por diversas técnicas cromatográficas, obtendo-se quatro nucleosídeos (2'-deoxiuridina, 2'-deoxiinosina, timidina e 2'-deoxiguanosina), três esteróides em mistura (colestanol, colestanona e estigmasterol) e três derivados do glicerol éter em mistura (2,3-propanodiol, 1-heptadeciloxi; álcool batílico e 2,3-propanodiol, 1-nonadeciloxi). O extrato metanólico de *D. psammatores*, proveniente de Trairi, foi inicialmente particionado, originando as fases aquosa, hexânica, clorofórmica, butanólica e hidroalcoólica. A fase hexânica inibiu o ciclo celular de ovos de ouriço do mar e exibiu toxicidade em células tumorais. Ela foi fracionada por técnicas cromatográficas e obtiveram-se três ácidos graxos metilados em mistura (miristato de metila, palmitato de metila e estearato de metila), dois esteróides em mistura (colestanol e colestanona), dois ácidos graxos em mistura (ácido palmítico e ácido esteárico) e três derivados do glicerol éter em mistura (2,3-propanodiol, 1-heptadeciloxi; álcool batílico e 2,3-propanodiol, 1-nonadeciloxi). A fase clorofórmica também inibiu o ciclo celular de ovos de ouriço do mar e exibiu toxicidade em células tumorais. Ela foi fracionada por técnicas cromatográficas e obtiveram-se seis ácidos graxos em mistura (ácido láurico, ácido mirístico, ácido pentadecanóico, ácido palmítico, ácido margárico e ácido esteárico). A fase aquosa foi submetida ao processo de fracionamento e purificação por diversas técnicas cromatográficas, obtendo-se dois nucleosídeos (uridina e timidina) e um núcleo purínico (hipoxantina). A fase butanólica resultou no isolamento e identificação de dois nucleosídeos (2'-deoxiguanosina e timidina). Amostras de *Eudistoma vannamei* foram coletadas em São Gonçalo do Amarante (CE). O extrato metanólico de *E. vannamei* foi particionado, originando as fases hexânica e hidroalcoólica. A fase hexânica inibiu o ciclo celular de ovos de ouriço do

mar e exibiu toxicidade em células de linhagem B-16. Ela foi fracionada por técnicas cromatográficas e obtiveram-se cinco ácidos graxos metilados (miristato de metila, palmitato de metila, estearato de metila, palmitoleato de metila e oleato de metila), dois esteróides (colestano e colesterol) e cinco ácidos graxos (ácido mirístico, ácido pentadecanóico, ácido palmítico, ácido margárico e ácido esteárico). A fase hidroalcoólica resultou no isolamento e identificação de dois nucleosídeos (guanosina e adenosina). As substâncias foram identificadas por métodos espectroscópicos e cromatográficos, comparando-se os valores obtidos com aqueles da literatura e padrões. Os nucleosídeos 2'-deoxiuridina e 2'-deoxiguanosina inibiram o ciclo celular de ovos de ouriço do mar em ambas fases examinadas. Os ácidos graxos metilados de *D. psammatores*, o ácido palmítico junto com ácido esteárico e os derivados do glicerol éter inibiram o ciclo celular de ovos de ouriço do mar durante a primeira divisão. Os ácidos graxos metilados de *D. psammatores* apresentaram maior toxicidade nas linhagens tumorais analisadas, sendo que a mistura de ácidos graxos metilados de *E. vannamei* também mostrou toxicidade em células tumorais leucêmicas. Ambas amostras de ácidos graxos metilados mostraram efeitos antiproliferativos e citotóxicos e estas atividades envolveram a inibição da síntese de DNA e indução de apoptose e necrose.

Palavras-chave: *Didemnum psammatores*, *Eudistoma vannamei*, ascídias, atividade citotóxica

SUMMARY

TAKEARA, R. **Chemical study and evaluation of cytotoxic activity from ascidians *Didemnum psammatores* (Sluiter, 1895) and *Eudistoma vannamei* Millar, 1977 (Tunicata: Ascidiacea).** 2006. 186 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Samples of *Didemnum psammatores* were collected in Icapui (Ceara State) and Trairi (Ceara State). The methanolic extract from *D. psammatores*, acquired from Icapui, was submitted to fractionation and purification through several chromatographic techniques and were obtained four nucleosides (2'-deoxyuridine, 2'-deoxyinosine, thymidine, and 2'-deoxyguanosine), three steroids in mixture (cholesterol, cholesterol, and stigmasterol) and three glyceryl ethers in mixture (2,3-propanediol, 1-(heptadecyloxy), batyl alcohol, and 2,3-propanediol, 1-(nonadecyloxy)). The methanolic extract from *D. psammatores*, acquired from Trairi, was initially partitioned, giving rise to aqueous, hexane, chloroform, and butanol phases. The hexane phase inhibited the sea urchin egg cell cycle and exhibited toxicity in tumor cell lines. It was fractionated by several chromatographic techniques and obtained three fatty acid methyl esters in mixture (methyl myristate, methyl palmitate, and methyl stearate), four steroids in mixture (cholesterol and cholesterol), two fatty acids in mixture (palmitic acid and stearic acid) and three glyceryl ethers in mixture (2,3-propanediol, 1-(heptadecyloxy), batyl alcohol, and 2,3-propanediol, 3-(nonadecyloxy)). The chloroform phase also inhibited the sea urchin egg cell cycle and exhibited toxicity in tumor cell lines. It was fractionated through several chromatographic techniques and obtained six fatty acids in mixture (lauric acid, myristic acid, pentadecanoic acid, palmitic acid, margaric acid, and stearic acid). The aqueous phase was submitted to fractionation and purification by several chromatographic techniques and obtained two nucleosides (uridine and thymidine) and one purinic nucleus (hypoxanthine). The butanol phase resulted in the isolation and identification of two nucleosides (2'-deoxyguanosine and thymidine). Samples of *Eudistoma vannamei* were collected in São Gonçalo do Amarante (Ceara State). The methanolic extract from *E. vannamei* was partitioned, giving rise to hexane and hydroalcoholic phases. The hexane phase inhibited the sea urchin egg cell cycle and

exhibited toxicity in cell line B-16. It was fractionated by chromatographic techniques and obtained five fatty acid methyl esters in mixture (methyl myristate, methyl palmitate, methyl stearate, methyl palmitoleate, and methyl oleate), two steroids (cholestanol and cholesterol), and five fatty acids (myristic acid, pentadecanoic acid, palmitic acid, margaric acid, and stearic acid). The hydroalcoholic phase resulted in the isolation and identification of two nucleosides (guanosine and adenosine). The substances were identified by spectroscopic and chromatographic methods comparing the obtained values with those of the literature and standards. The nucleosides 2'-deoxyuridine and 2'-deoxyguanosine inhibited the sea urchin egg cell cycle in both stages. The fatty acid methyl esters from *D. psammotodes*, the palmitic acid plus stearic acid and the glyceryl ethers inhibited the sea urchin egg cell during first cleavage. The fatty acid methyl esters from *D. psammotodes* presented the highest toxicity in the cell lines tested and the mixture of fatty acid methyl esters from *E. vannamei* showed toxicity to leukemia cell lines too. Both samples of fatty acid methyl esters showed antiproliferative and cytotoxic effects and these activities involved the inhibition of DNA synthesis and induction of both necrosis and apoptosis.

Keywords: *Didemnum psammotodes*, *Eudistoma vannamei*, ascidians, citotoxic activity

**SUBSTÂNCIAS ISOLADAS E IDENTIFICADAS DE *DIDEMNUM PSAMMATODES*
E *EUDISTOMA VANNAMEI***

Nucleosídeos

1 (2'-deoxiuridina)

2 (timidina)

3 (uridina)

5 (2'-deoxiinosina)

6 (2'-deoxiguanosina)

7 (guanosina)

8 (adenosina)

Núcleo purínico

4 (hipoxantina)

Esteróides

9 (colestanol)

10 (colestanonol)

Ácidos graxos metilados

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOCH}_3$ – miristato de metila (**13**)

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOCH}_3$ – palmitato de metila (**14**)

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOCH}_3$ – estearato de metila (**15**)

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOCH}_3$ – palmitoleato de metila (**16**)

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOCH}_3$ – oleato de metila (**17**)

Ácidos graxos

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$ – ácido láurico (**18**)

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$ – ácido mirístico (**19**)

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$ – ácido pentadecanóico (**20**)

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$ – ácido palmítico (**21**)

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{COOH}$ – ácido margárico (**22**)

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$ – ácido esteárico (**23**)

Monoalquil glicerol éteres

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Considerações gerais

Os oceanos cobrem 70% da superfície terrestre e são habitados por cerca de 200.000 espécies de plantas e invertebrados marinhos e milhões de microorganismos. Além das plantas, esponjas, octocorais, ascídias e briozoários são organismos sésseis quando adultos e se desenvolvem em condições adversas se comparados aos terrestres. A evolução e sobrevivência destas espécies resultaram em organismos que produzem substâncias observadas apenas neste ambiente e com funções ecológicas diversas (PINTO *et al.*, 2002).

O ambiente marinho oferece uma fonte rica de biodiversidade, onde uma série de drogas potenciais, particularmente na área de quimioterapia do câncer, já foi descoberta (MUNRO *et al.*, 1999). A primeira descoberta notável de compostos biologicamente ativos de fontes marinhas foi o isolamento dos nucleosídeos espongouridina (I) e espongotimidina (II) da esponja *Cryptotethya crypta* no início da década de 50 (BERGMANN; BURKE, 1955). Estes compostos possuem atividade antiviral e o estudo de análogos sintéticos levou ao desenvolvimento da ARA-A (III) e ARA-C (IV), agentes antivirais e anticâncer (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000).

A investigação sistemática de ambientes marinhos como fontes de novos agentes biologicamente ativos começou, de fato, somente em meados da década de 70. Durante a década de 1977-1987, aproximadamente 2.500 novos metabólitos foram relatados a partir de uma variedade de organismos marinhos. Estes estudos têm demonstrado claramente que o ambiente marinho é uma fonte rica de compostos bioativos, muitos dos quais pertencentes a classes químicas totalmente novas e não encontradas em fontes terrestres (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000).

Metabólitos secundários, incluindo terpenos, acetogeninas, alcalóides e polifenóis, são produzidos por uma ampla variedade de organismos marinhos, sendo que alguns destes compostos diferem fundamentalmente dos metabólitos secundários terrestres (HAY, 1996).

A função natural da maioria dos metabólitos secundários ainda é pouco investigada, porém muitos deles mostraram participar de defesas contra consumidores, competidores, organismos coloniais e patógenos ou têm função reprodutiva (HAY, 1996; PAWLIK, 1993). As suas atividades biológicas relacionadas a ação antibiótica, antiviral, supressora da dor, antiinflamatória, para cuidados da pele e anticâncer estão sendo investigadas (BLUNT *et al.*, 2006; HAY, 1996; de VRIES; BEART, 1995). Segundo Blunt *et al.* (2006), até 2004 testes visando efeito anticâncer estão entre os ensaios mais utilizados, mas estão aumentando os resultados na literatura para ensaios contra malária, antituberculose e anti-infecciosos contra microrganismos resistentes a drogas. Substâncias isoladas de ascídias coletadas no Brasil também apresentaram atividade anticâncer significativa, tais como os depsipeptídeos tamandarina A (**V**) e tamandarina B (**VI**) e os alcalóides granulatinina (**VII**) e isogranulatinina (**VIII**) (BERLINCK *et al.*, 1998; VERVOORT; FENICAL; EPIFANIO, 2000).

1.2. Ascídias

As ascídias pertencem ao filo Chordata, subfilo Tunicata e classe Ascidiacea, sendo chamados de tunicados porque têm o corpo coberto por uma túnica composta de quantidades variáveis de proteínas, carboidratos, água e um tipo de celulose chamado tunicina (CARTÉ, 1996; RUPPERT; BARNES, 1996). Elas representam o grupo de animais mais altamente evoluído investigado pelos químicos de produtos naturais marinhos (DAVIDSON, 1993). As ascídias são invertebrados marinhos sésseis comuns em todo o mundo. A maioria é encontrada em águas rasas, onde se prendem a rochas, conchas e fundos de navio ou, algumas vezes, se fixam na lama e na areia por meio de filamentos ou de uma haste (RUPPERT; BARNES, 1996). Elas vivem solitárias ou em colônias, e preferencialmente em regiões que são livres de extensivos choques de onda, mas recebendo considerável fluxo de água (DAVIDSON, 1993).

Embora o início de investigações de produtos naturais marinhos seja geralmente creditado a Bergmann e Feeney (1950), que isolaram os nucleosídeos de uma esponja, foi em 1974 que se isolou o primeiro metabólito de ascídia de *Aplidium* sp., uma hidroquinona (IX), que exibiu atividade quimiopreventiva contra algumas formas de leucemia e carcinoma mamário em testes animais (DAVIDSON, 1993).

A química de produtos naturais de ascídias tem sido dirigida pela freqüente descoberta de metabólitos biologicamente ativos, a maioria deles derivados de aminoácidos (BLUNT *et al.*, 2006). Mesmo considerando que a pesquisa com ascídias foi iniciada mais recentemente que aquela realizada com outros invertebrados marinhos, é importante ressaltar que o primeiro produto natural deste ambiente a entrar em triagem clínica, a didemnina B (X), isolada de *Trididemnum solidum*, é um metabólito de ascídia (DAVIDSON, 1993). Apesar de uma variedade de protocolos e testes contra muitos tipos diferentes de câncer, o composto foi muito

tóxico para uso, levando ao término das triagens pelo Instituto Nacional do Câncer em 1990 (SIMMONS *et al.*, 2005). Conseqüentemente, estas triagens conduziram à síntese de moléculas relacionadas com potencial citotóxico.

Várias espécies do gênero *Didemnum* já foram objeto de investigação química, encontrando-se predominância de alcalóides sendo que vários deles exibiram atividade citotóxica (Tab. 1), porém *D. psammátodes* (Fig. 1) ainda não foi avaliada quanto à sua composição química, mas já demonstrou possuir atividade antimitótica em ovos de ouriço do mar (JIMENEZ *et al.*, 2003). *D. psammátodes* tem uma ampla distribuição geográfica, com ocorrência em quase toda costa brasileira, Caribe e em muitas localidades do Oceano Pacífico.

Figura 1 – *Didemnum psammátodes*

Tabela 1 - Espécies de *Didemnum* investigadas, principais classes de substâncias isoladas e atividades biológicas

ESPÉCIE	CLASSE QUÍMICA	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIA
<i>Didemnum</i> sp.	derivados iodados da tiramina, alcalóides, terpenóides, aminoálcool, derivados do antibiótico enterocina, serinolípídeos	antimicrobiana, citotóxica, antineoplásica, inibidora da protease HIV-1	Sesin & Ireland, 1984; Kobayashi <i>et al.</i> , 1988a; Potts <i>et al.</i> , 1991; Carroll <i>et al.</i> , 1993; Searle & Molinski, 1993; Kearns <i>et al.</i> , 1995; Schumacher & Davidson, 1995; Urban & Capon, 1996; Kang <i>et al.</i> , 1996; Smith <i>et al.</i> , 1997; Kang & Fenical, 1997; Foderaro <i>et al.</i> , 1997; González <i>et al.</i> , 1999; Ham & Kang, 2002; Wright <i>et al.</i> , 2002; Segraves <i>et al.</i> , 2003
<i>D. candidum</i>	Eicosanóides, alcalóides	-	Lindquist & Fenical, 1989; Fahy <i>et al.</i> , 1991
<i>D. chartaceum</i>	alcalóides	-	Lindquist <i>et al.</i> , 1988b; Davis <i>et al.</i> , 1999
<i>D. conchyliatum</i>	alcalóides	deterrente	Vervoort <i>et al.</i> , 1997; Vervoort <i>et al.</i> , 1999
<i>D. granulatum</i>	ácido carboxílico, alcalóides	antitumoral	Isaacs <i>et al.</i> , 1994; Berlinck <i>et al.</i> , 1998; Britton <i>et al.</i> , 2001
<i>D. gutatum</i>	serinolípídeo	inibidora da HIV-1 integrase	Mitchell <i>et al.</i> , 2000
<i>D. molle</i>	peptídeos	citotóxica	Carroll <i>et al.</i> , 1994; Toske & Fenical, 1995; Rudi <i>et al.</i> , 1998; Arrault <i>et al.</i> , 2002; Rudi <i>et al.</i> , 2003
<i>D. moseleyi</i>	metabólitos do ácido graxo	-	Niwa <i>et al.</i> , 1991; Niwa <i>et al.</i> , 1994
<i>D. obscurum</i>	alcalólídes	antioxidante, citotóxica	Krishnaiah <i>et al.</i> , 2004; Reddy, <i>et al.</i> , 2005
<i>D. proliferum</i>	antibióticos enediinos	citotóxica	Oku <i>et al.</i> , 2003
<i>D. rodriguesi</i>	peptídeos	-	Vázquez <i>et al.</i> , 1995; Expósito <i>et al.</i> , 1998
<i>D. rubeum</i>	alcalóides	citotóxica	Smith <i>et al.</i> , 1997; Ford & Davidson, 1997
<i>D. ternatanum</i>	metabólito da fenilalanina	-	Ireland <i>et al.</i> , 1981
<i>D. voeltzkowi</i>	ciclopentenonas, nucleosídeos	citotóxica	Lindquist <i>et al.</i> , 1988a; Mitchell <i>et al.</i> , 1996

Várias espécies de *Eudistoma* também já foram investigadas, encontrando-se predominância de alcalóides, sendo que muitos deles exibiram atividade citotóxica

(Tab. 2). Até o momento ainda não foi encontrado na literatura estudo químico de *E. vannamei* (Fig. 2), a qual também demonstrou possuir atividade antimitótica em ovos de ouriço do mar e citotóxica em células tumorais *in vitro* (JIMENEZ *et al.*, 2003). Vale ressaltar que esta é uma espécie endêmica do litoral nordestino brasileiro, ocorrendo apenas na costa da Bahia ao Ceará (LOTUFO, 2002).

Figura 2 – *Eudistoma vannamei*

Tabela 2 - Espécies de *Eudistoma* investigadas, principais classes de substâncias isoladas e atividades biológicas

ESPÉCIE	CLASSE QUÍMICA	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIA
<i>Eudistoma</i> sp.	alcalóides, pentatíepinas, tritianos, aminoácidos, pteridina	citotóxica, inibidora da proteína kinase C, antimicrobiana	Rudi <i>et al.</i> , 1988a; Rudi <i>et al.</i> , 1988b; Rudi & Kashman, 1989; He & Faulkner, 1991; Kinnel & Scheuer, 1992; Shochet <i>et al.</i> , 1993; Horton <i>et al.</i> , 1994; Compagnone <i>et al.</i> , 1994; Einat <i>et al.</i> , 1995; Van Wagoner <i>et al.</i> , 1999; Makarieva <i>et al.</i> , 1999; Van Wagoner <i>et al.</i> , 2001; Makarieva <i>et al.</i> , 2001; Schupp <i>et al.</i> , 2003; Davis <i>et al.</i> , 2003
<i>E. album</i>	alcalóides	citotóxica	Adesanya <i>et al.</i> , 1992
<i>E. bituminis</i>	alcalóides	-	Viracaoundin <i>et al.</i> , 2001
<i>E. gilboverde</i>	alcalóides	citotóxica	Rashid <i>et al.</i> , 2001
<i>E. glaucus</i>	alcalóides	citotóxica	Kobayashi <i>et al.</i> , 1986; Kobayashi <i>et al.</i> , 1990a; Murata <i>et al.</i> , 1991
<i>E. olivaceum</i>	derivados oxatiazepino, derivados β -carbolina	antiviral, antimicrobiana	Rinehart <i>et al.</i> , 1984; Kobayashi <i>et al.</i> , 1984; Rinehart <i>et al.</i> , 1987; Kinzer & Cardellina II, 1987
<i>E. cf. rigida</i>	lactonas macrocíclicas, alcalóide, sulfatos macrolidos	citotóxica	Kobayashi <i>et al.</i> , 1988b; Kobayashi <i>et al.</i> , 1990b; Kikuchi <i>et al.</i> , 1991
<i>E. toalensis</i>	alcalóides	-	Schupp <i>et al.</i> , 1999; Schupp <i>et al.</i> , 2002

O estudo químico de ascídias justifica-se pelo fato de ainda serem poucas as informações, documentadas em artigos científicos, sobre as substâncias isoladas e atividade biológica de produtos naturais destes organismos marinhos coletados ao longo dos 7.500 km de litoral brasileiro. As poucas informações existentes sobre a química desses organismos, muitos dos quais são espécies endêmicas, indicam um grande potencial de pesquisa para a área no Brasil. Isto torna evidente a importância

dos estudos com as ascídias pela busca de novas moléculas com potencial biológico e terapêutico.

Segundo Haefner (2003), estes compostos têm futuro promissor no desenvolvimento de drogas, pois a bioprospecção de produtos naturais marinhos começou recentemente e já forneceu milhares de moléculas novas. É provável que a diversidade bioquímica nos oceanos seja maior que na parte terrestre e assim há boas razões para acreditar que a aprovação dos produtos naturais marinhos e derivados em desenvolvimento clínico seja apenas o início da chegada nas farmácias de um grande número de substâncias originadas desta fonte.

Atualmente há um grande número de moléculas interessantes provenientes de fontes marinhas, ou sintetizadas a partir de um composto protótipo, que estão em fases II/III de triagens clínicas para câncer (Tab. 3), analgesia e alergia. É provável que dentro dos próximos anos um novo composto marinho entre no comércio como uma droga analgésica ou anticâncer (NEWMAN; CRAGG, 2004). Há também alguns compostos que possuem eficácia *in vivo* ou potente atividade *in vitro* como agentes anti-infecciosos. Donia e Hamann (2003) afirmaram que vários fatores como resistência a drogas, doenças infecciosas emergentes e bioterrorismo contribuíram para o interesse em avaliar produtos naturais dos oceanos no tratamento de doenças parasitárias e infecciosas, incluindo malária, toxoplasmose, doença de Chagas e infecções virais, bacterianas e fúngicas.

Tabela 3 – Produtos naturais marinhos em triagens clínicas ou pré-clínicas

Composto	Espécie	Classe Química	Situação Experimental
Ecteinaascidina 743	<i>Ecteinaascidia turbinata</i> (tunicado, possível fonte bacteriana)	alcalóide tetrahydroisoquinolínico	fase II
Dolastatina 10	<i>Dolabella auricularia</i> / <i>Symploca</i> sp. (molusco / cianobactéria)	peptídeo linear	fase II
Briostatina 1	<i>Bugula neritina</i> (briozoário)	lactona macrocíclica	fase II
Kahalalida F	<i>Elysia rufescens</i> / <i>Bryopsis</i> sp. (molusco / alga verde)	depsipeptídeo cíclico	fase II
Esqualamina	<i>Squalus acanthias</i> (tubarão)	aminoesteróide	fase II
Didemnina B	<i>Trididemnum solidum</i> (tunicado)	depsipeptídeo cíclico	fase II (suspensa)
Discodermolida	<i>Discodermia dissolute</i> (esponja)	lactona	fase I
Curacina A	<i>Lyngbya majuscula</i> (cianobactéria)	lipídeo tiazol	pré-clínica
DMCC	<i>Lyngbya majuscula</i> (cianobactéria)	depsipeptídeo cíclico	pré-clínica
Salinosporamida A	<i>Salinospora</i> sp. (bactéria)	γ -lactama- β -lactona bicíclico	pré-clínica
Laulimalida	<i>Cacospongia mycofijiensis</i> (esponja)	macrolido	pré-clínica
Vitilevuamida	<i>Didemnum cuciferum</i> / <i>Polysyncrator lythostrotum</i> (tunicados)	peptídeo cíclico	pré-clínica
Diazonamida	<i>Diazona angulata</i> (tunicado)	peptídeo cíclico	pré-clínica
Eleuterobina	<i>Eleutherobia</i> sp. / <i>Erythropodium caribaeorum</i> (corais)	diterpeno glicosilado	pré-clínica
Sarcodictina	<i>Sarcodictyon roseum</i> (esponja)	diterpeno	pré-clínica
Pelorusida A	<i>Mycale hentscheli</i> (esponja)	lactona macrocíclica	pré-clínica
Salicilihalimidas A e B	<i>Haliclona</i> sp. (esponja)	policetídeo	pré-clínica
Thiocoralina	<i>Micromonospora marina</i> (bactéria)	depsipeptídeo	pré-clínica
Ascididemina	<i>Didemnum</i> sp. (tunicado)	alcalóide aromático	pré-clínica
Variolinas	<i>Kirkpatrickia variolosa</i> (esponja)	alcalóide heterocíclico	pré-clínica
Lamellarina D	<i>Lamellaria</i> sp. (molusco e vários corais)	alcalóide pirrol	pré-clínica
Dictiodendrinas	<i>Dictyodendrilla verongiformis</i> (esponja)	derivados pirrolocarbazóis	pré-clínica
ES-285 (Espisulosina)	<i>Mactromeris polynyma</i> (molusco)	alquilaminoalcool	pré-clínica
Dolastatina 15	<i>Dolabella auricularia</i> (molusco)	peptídeo linear	pré-clínica (suspensa)
Halicondrina B	<i>Halichondria okadae</i> (esponja)	poliéter macrocíclico	pré-clínica (suspensa)

Simmons *et al.*, 2005

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho são:

- isolamento e identificação de componentes químicos micromoleculares de *Didemnum psammatoedes* e *Eudistoma vannamei*,
- avaliação da atividade citotóxica em ovos de ouriço do mar e em diferentes linhagens tumorais *in vitro* dos extratos brutos, frações e substâncias isoladas destas espécies,
- avaliação de possíveis mecanismos de ação envolvidos na atividade citotóxica das substâncias mais ativas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Especificação dos materiais e instrumentos utilizados

Os espectros de RMN ^1H foram obtidos em aparelhos de RMN Bruker DRX-400, operando em 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C , respectivamente, com as amostras solubilizadas em solvente deuterado. Os espectros bidimensionais de HMQC e HMBC foram obtidos em aparelho DRX-500.

Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos em aparelho da Micromass, modelo Micromass Quattro LC com ionização por *electrospray* a 45 eV.

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em aparelho da Bruker, modelo UltrOTOFG com ionização por *electrospray*.

As amostras foram concentradas em rotaevaporadores Tecnal TE-120, sob pressão reduzida, evitando-se temperaturas superiores a 50°C.

Nas análises por CCDC as placas foram preparadas aplicando-se uma suspensão de sílica gel GF₂₅₄ (Merck) em água destilada, na proporção de 1:2 (p/v), sobre placas de vidro de 5x20, 10x20 ou 20x20 cm, através da utilização de espalhador, obtendo-se camada de 0,25 mm de espessura de adsorvente. Após a preparação, as placas foram deixadas em repouso por cerca de 6 horas à temperatura ambiente e depois ativadas em estufa a 150°C por uma hora.

Como reveladores para CCDC foram utilizados luz UV com comprimentos de onda de 254 e 366 nm (lâmpada UVGL-25) e nebulização com ácido sulfúrico seguida de aquecimento da cromatoplaça em chapa aquecedora a 100°C por cerca de cinco minutos.

Nas separações por CC foram utilizados, como fase estacionária, sílica gel 60 (70-230 mesh ASTM, Sigma) e sílica gel C₁₈ (Aldrich) e Sephadex LH-20 (25-100 μ , Pharmacia) como suporte. A proporção média entre amostra/adsorvente foi de 1:100 para sílica e Sephadex LH-20 e 1:10 para sílica gel C₁₈.

Nos processos de fracionamento e purificação foram empregados solventes orgânicos de grau comercial, sendo purificados por destilação fracionada antes de serem utilizados.

Para identificação dos esteróides foi utilizado cromatógrafo com fase gasosa acoplado a espectrômetro de massas, marca Shimadzu, modelo GC MS-QP2010, Auto Injector AOC-20i, com coluna capilar DB-1-MS e ionização por impacto eletrônico, utilizando-se as seguintes condições:

- medidas da coluna: 30 m de comprimento por 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de fase estacionária;
- temperatura da coluna: 200°C por 5 minutos, aumentando 5°C/min até atingir 280°C, permanecendo por 30 minutos;
- temperatura do injetor: 260°C;
- temperatura da fonte: 250°C;
- “split”: 1:50;
- gás de arraste: hélio;
- fluxo: 1,5 mL/min;
- pressão: 159,4 KPa;
- temperatura da interface: 250°C;
- temperatura da fonte: 250°C.

Para identificação dos ácidos graxos foram utilizados o mesmo cromatógrafo e coluna citados anteriormente na identificação dos esteróides, com as seguintes condições:

- temperatura da coluna: 100°C por 1 minuto, aumentando 8°C/min até atingir 190°C, permanecendo por 10 minutos, aumentando 8°C/min até atingir 250°C, permanecendo por 1 minuto, aumentando 10°C/min até atingir 280°C;
- temperatura do injetor: 250°C;
- temperatura da fonte: 250°C;
- “split”: 1:70 medido a 250°C;
- gás de arraste: hélio;
- fluxo: 1,5 mL/min;
- pressão: 159,4 KPa;
- temperatura da interface: 250°C
- temperatura da fonte 250°C.

Para identificação dos ácidos graxos metilados foi utilizado cromatógrafo com fase gasosa Hewlett Packard, modelo 5890, com coluna capilar (HP-inowax) e detector de ionização de chama, com as seguintes condições:

- medidas da coluna: 30 m de comprimento por 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de fase estacionária;

- temperatura da coluna: 50°C, aumentando 20°C/min até atingir 200°C, permanecendo por 5 minutos, aumentando 5°C/min até atingir 230°C, permanecendo por 15 minutos;
- temperatura do injetor: 220°C;
- temperatura do detector FID: 300°C;
- “split”: 25:1;
- gás de arraste: hidrogênio (46 cm/s) a 200°C;
- padrão interno: heptadecanoato de metila.

Para análise e separação de algumas substâncias foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu LC-6A, com detector de UV-visível modelo SPD-6A, colunas Shim-pack ODS-C₁₈ 4,6x250 mm (analítica) e 20x250 mm (preparativa).

3.2. Coleta dos animais

Exemplares de *D. psammátodes* foram coletados na Praia de Ponta Grossa, Icapuí (CE) e Praia de Flexeiras, Trairi (CE). *E. vannamei* foi coletada na Praia da Taíba, São Gonçalo do Amarante (CE). A identificação foi feita pelo Prof. Dr. Tito Monteiro da Cruz Lotufo, da Universidade Federal do Ceará. Após a coleta, os animais foram lavados para remoção de contaminantes, colocados em metanol e mantidos em freezer até o momento da preparação dos extratos.

3.3. Obtenção dos extratos

As amostras foram homogeneizadas em um volume de metanol 3 vezes superior ao peso úmido das mesmas e o material foi, então, filtrado. O filtrado foi seco em evaporador rotativo, sob pressão reduzida (temperatura máxima de 60°C) para remoção do metanol. Foram obtidos os seguintes extratos:

- *D. psammátodes* (Icapuí): 606 g (peso úmido) de ascídia → 12,15 g de extrato bruto
- *D. psammátodes* (Trairi): 1613 g (peso úmido) de ascídia → 30,5 g de extrato bruto

- *E. vannamei*: 1460 g (peso úmido) de ascídia → 46,148 g de extrato bruto

3.4. Fracionamento do extrato metanólico de *D. psammátodes* proveniente de Icapuí (CE)

Os esquemas de fracionamento e purificação do extrato metanólico de *D. psammátodes* encontram-se representado nas Figs. 3 e 4.

Foram suspensos 8,41 g deste extrato em metanol, sendo que 2,70 g foram solubilizados neste solvente e o restante permaneceu insolúvel. A parte solúvel em metanol foi fracionada em coluna de Sephadex LH-20. Uma parte do precipitado insolúvel em metanol (2,0 g) foi suspensa em diclorometano, sendo que 0,116 g foi solúvel e submetido a fracionamento em coluna de sílica gel.

Figura 3 – Fluxograma representativo do fracionamento da fração solúvel em MeOH do extrato metanólico de *D. psammatus* e isolamento de suas substâncias

Figura 4 – Fluxograma representativo do fracionamento da fração insolúvel em MeOH do extrato metanólico de *D. psammatodes* e isolamento de suas substâncias

3.4.1. Fracionamento da fração solúvel em MeOH do extrato metanólico de *D. psammatores* (DPI-1)

O fracionamento dessa amostra, por apresentar característica polar, foi realizado em Sephadex LH-20 (cromatografia por exclusão), cujas dimensões da coluna eram: 800 mm de comprimento por 45 mm de diâmetro interno, sendo 720 mm a altura da fase estacionária.

Foram suspensos 8,41 g do extrato bruto em metanol. A parte solúvel foi separada e posteriormente centrifugada. O sobrenadante (2,70 g) foi separado e o solvente evaporado. A amostra foi dissolvida novamente em metanol e centrifugada. O sobrenadante foi aplicado no topo da coluna de Sephadex LH-20.

Foram coletadas 147 frações de 10 mL, utilizando-se metanol como fase móvel, e em seguida as frações semelhantes foram reunidas através de análise por CCDC. Na Tab. 4 estão indicadas as frações coletadas e massas obtidas.

Tabela 4 - Fracionamento do extrato metanólico de *D. psammatores* em coluna de Sephadex LH-20

Frações reunidas	Frações coletadas	Massa obtida (g)
DPI-1.1	1-7	0,020
DPI-1.2	8-27	0,056
DPI-1.3	28-32	0,130
DPI-1.4	33-46	0,769
DPI-1.5	47-63	0,194
DPI-1.6	64-73	0,219
DPI-1.7	74-81	0,043
DPI-1.8	82-107	0,116
DPI-1.9	108-113	0,024
DPI-1.10	114-123	0,010
DPI-1.11	124-136	0,018
DPI-1.12	137-143	0,006
DPI-1.13	144-147	0,004

3.4.1.1. Fracionamento da fração DPI-1.8

Esta fração (0,116 g) foi solubilizada em metanol, centrifugada e o sobrenadante foi aplicado na coluna de Sephadex LH-20 em tubo de vidro de 330 mm de comprimento por 15 mm de diâmetro interno, sendo 200 mm a altura de Sephadex LH-20.

Foram coletadas 10 frações de 10 mL, utilizando-se metanol como fase móvel e reunindo-se as frações semelhantes mediante análise por CCDC. Na Tab. 5 estão indicadas as frações coletadas e massas obtidas no fracionamento da fração DPI-1.8.

Tabela 5 - Fracionamento da fração DPI-1.8 do extrato metanólico de *D. psammatores*

Frações reunidas	Frações coletadas	Massas obtidas (g)
DPI-1.8.1	1-2	0,019
DPI-1.8.2	3-4	0,037
DPI-1.8.3	5	0,014
DPI-1.8.4	6	0,007
DPI-1.8.5	7-10	0,026

3.4.1.1.1. Purificação da fração DPI-1.8.2 e isolamento das substâncias 1, 2 e 5

Esta fração (0,037 g) foi purificada através de CLAE preparativa. A amostra foi solubilizada em metanol, filtrada e aplicada no cromatógrafo, utilizando-se uma coluna ODS preparativa (20x250 mm), comprimento de onda de 250 nm, com fluxo de 9 mL/min e como fase móvel MeOH/H₂O (10:90), obtendo-se 18 frações, das quais, aquelas codificadas como DPI-1.8.2.11 (1 mg), DPI-1.8.2.13 (2 mg) e DPI-1.8.2.16 (1 mg) foram submetidas à análise espectroscópica de RMN ¹H, além de técnicas bidimensionais de HMQC e HMBC e espectrometria de massas, identificando-se três nucleosídeos, codificados como substâncias **1** (2'- deoxiuridina), **5** (2'- deoxiinosina) e **2** (timidina), respectivamente.

3.4.1.1.2. Isolamento da substância 6 a partir da fração DPI-1.8.3

Na fração DPI-1.8.3 formou-se precipitado branco, o qual foi separado do sobrenadante por filtração. O sólido (7 mg) foi submetido à análise espectroscópica de RMN ^1H , ^{13}C , além de técnicas bidimensionais de HMQC, HMBC e COSY ^1H - ^1H e espectrometria de massas, identificando-se o nucleosídeo **6** (2'- deoxiguanosina).

3.4.1.2. Isolamento da substância 6 a partir da fração DPI-1.9

Na fração DPI-1.9 formou-se precipitado branco, o qual foi separado do sobrenadante por filtração. O sólido (4 mg) foi submetido à análise espectroscópica de RMN ^1H , identificando-se o nucleosídeo **6** (2'- deoxiguanosina), já isolado anteriormente da fração DPI-1.8.3.

3.4.2. Fracionamento da fração insolúvel em MeOH do extrato metanólico de *D. psammatores* (DPI-2) e obtenção das substâncias 9 + 10 + 11

O fracionamento dessa amostra foi realizado em CCC (cromatografia por adsorção), de acordo com Vichnewski (1995). A coluna foi empacotada com 80 g de sílica gel 60, em um tubo de vidro com 700 mm de comprimento por 30 mm de diâmetro interno, sendo que a altura do adsorvente foi de 350 mm.

Foram suspensos em diclorometano 2,00 g do precipitado insolúvel em metanol, sendo que 0,116 g foi solúvel e utilizado no fracionamento a seguir. Essa fração solúvel foi adsorvida em sílica para formar a pastilha e aplicar no topo da coluna.

Os eluentes utilizados para o fracionamento foram diclorometano e metanol e misturas dos mesmos em gradiente crescente de polaridade.

Foram coletadas 34 frações de 100 mL, concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida, e em seguida, as frações semelhantes foram reunidas mediante análise por CCDC.

Na Tab. 6 estão indicadas as frações coletadas, os eluentes utilizados, bem como os volumes eluídos e na Tab. 7 estão mostradas as frações agrupadas e as massas obtidas neste fracionamento.

A fração DPI-2.3 continha os esteróides colestanol, colestanona e estigmasterol (**9** + **10** + **11**), identificados em mistura por CG/EM.

Tabela 6 - Fracionamento do extrato metanólico de *D. psammatores* em coluna de sílica gel

Eluentes	Volumes eluídos (mL)	Frações obtidas
CH ₂ Cl ₂	600	1-6
CH ₂ Cl ₂ /MeOH 10%	500	7-11
CH ₂ Cl ₂ /MeOH 20%	500	12-16
CH ₂ Cl ₂ /MeOH 50%	500	17-21
CH ₂ Cl ₂ /MeOH 75%	500	22-26
CH ₂ Cl ₂ /MeOH 90%	500	27-31
MeOH 100%	300	32-34

Tabela 7 - Frações reunidas e respectivas massas obtidas no fracionamento do extrato metanólico de *D. psammatores* em sílica gel

Frações reunidas	Frações coletadas	Massas obtidas (g)
DPI-2.1	1-4	0,005
DPI-2.2	5	0,001
DPI-2.3	6-8	0,025
DPI-2.4	9	0,044
DPI-2.5	10-11	0,004
DPI-2.6	12-16	0,009
DPI-2.7	17-18	0,009
DPI-2.8	19-22	0,007
DPI-2.9	23-34	0,011

3.4.2.1. Purificação da fração DPI-2.4 e obtenção da mistura de substâncias **24 + 25 + 26**

A purificação da fração DPI-2.4 (0,047 g) foi realizada em CCC (cromatografia por adsorção), de acordo com Vichnewski (1995). A coluna foi empacotada com 20 g de sílica gel 60, em um tubo de vidro com 330 mm de comprimento por 15 mm de diâmetro interno, sendo que a altura do adsorvente foi de 200 mm.

A amostra foi solubilizada em clorofórmio e adsorvida em sílica para formar a pastilha e aplicar no topo da coluna.

Os eluentes utilizados para o fracionamento dessa amostra foram hexano, acetato de etila, MeOH e misturas dos mesmos em gradiente crescente de polaridade.

Foram coletadas 70 frações de 10 mL e em seguida as frações semelhantes foram reunidas mediante análise por CCDC.

Na Tab. 8 estão indicadas as frações coletadas, os eluentes utilizados, bem como os volumes eluídos e na Tab. 9 estão mostradas as frações agrupadas e as massas obtidas neste fracionamento.

A fração DPI-2.4.5 continha as substâncias 2,3-propanodiol, 1-heptadeciloxi; 2,3-propanodiol, 1-octadeciloxi (álcool batílico) e 2,3-propanodiol, 1-nonadeciloxi (**24 + 25 + 26**), as quais foram identificadas através de análise espectroscópica de RMN ^1H , ^{13}C além de técnicas bidimensionais de HMQC e HMBC e espectrometria de massas.

Tabela 8 - Purificação da fração DPI-2.4 em coluna de sílica gel

Eluentes	Volumes eluídos (mL)	Frações obtidas
Hexano/ AcOEt 20%	120	1-12
Hexano/ AcOEt 30%	100	13-22
Hexano/ AcOEt 50%	110	23-33
Hexano/ AcOEt 70%	60	34-39
Hexano/ AcOEt 90%	50	40-44
AcOEt	50	45-49
AcOEt/ MeOH 20%	60	50-55
AcOEt/ MeOH 30%	50	56-60
AcOEt/ MeOH 50%	60	61-66
MeOH	40	67-70

Tabela 9 - Frações reunidas e respectivas massas obtidas na purificação da fração DPI-2.4 em coluna de sílica gel

Frações reunidas	Frações coletadas	Massas obtidas (g)
DPI-2.4.1	1-7	0,005
DPI-2.4.2	8-15	0,006
DPI-2.4.3	16-21	0,004
DPI-2.4.4	22-27	0,003
DPI-2.4.5	28	0,005
DPI-2.4.6	29-41	0,007
DPI-2.4.7	42-51	0,001
DPI-2.4.8	52-57	0,004
DPI-2.4.9	58-61	0,002
DPI-2.4.10	62-70	0,004

3.5. Primeiro fracionamento do extrato metanólico de *D. psammatores* coletado em Trairi (CE)

Foram fracionados 20,0 g do extrato metanólico de *D. psammatores* através do processo de partição líquido-líquido com a finalidade de separar os constituintes

apolares dos demais componentes polares. O procedimento utilizado encontra-se representado na Fig. 5.

Figura 5 – Fluxograma representativo do primeiro fracionamento do extrato metanólico de *D. psammatores*

As fases obtidas através do processo de partição líquido-líquido foram submetidas a ensaio biológico e analisadas através de CCDC e RMN ^1H . De acordo com a atividade biológica, o perfil de eluição nas placas cromatográficas e o espectro de RMN ^1H , a fase hexânica foi escolhida para ser fracionada através de CCC. A quantidade obtida de cada fração na partição líquido-líquido encontra-se na Tab. 10.

Tabela 10 – Fases resultantes da primeira partição do extrato metanólico de *D. psammatores*

Fases obtidas	Massas obtidas (g)
Hexânica (DPT-1)	0,33 g
Clorofórmica (DPT-2)	0,68 g
Butanólica (DPT-3)	4,44 g
Metanol/Água (DPT-4)	4,26 g
Resíduo	10,26 g

3.5.1. Fracionamento da fase hexânica (DPT-1) do extrato metanólico de *D. psammatores* e obtenção das substâncias 13 + 14 + 15 e 9 + 10

O fracionamento da fase hexânica foi realizado em CCC (cromatografia por adsorção), de acordo com Vichnewski (1995). A coluna foi empacotada com 75 g de sílica gel 60, em um tubo de vidro com 480 mm de comprimento por 20 mm de diâmetro interno.

A fase hexânica (0,304 g) foi solubilizada em acetato de etila e a fração solúvel (0,251 g) foi adsorvida em sílica para formar a pastilha e aplicar no topo da coluna.

Os eluentes utilizados para o fracionamento da fase hexânica foram hexano, acetato de etila e metanol e misturas dos mesmos em gradiente crescente de polaridade.

Foram coletadas 200 frações de 10 mL, com exceção daquelas iniciais eluídas com hexano (50 ml cada) e em seguida, as frações semelhantes foram reunidas mediante análise por CCDC.

Na Tab. 11 estão indicadas as frações coletadas, os eluentes utilizados, bem como os volumes eluídos e na Tab. 12 estão mostradas as frações agrupadas e as massas obtidas neste fracionamento.

A fração DPT-1.2 continha os ácidos graxos metilados miristato de metila, palmitato de metila e estearato de metila (**13** + **14** + **15**), os quais foram identificados através de análise espectroscópica de RMN ^1H e ^{13}C e análise por CG.

A fração DPT-1.5 possuía os esteróides colestanol e colestanona (**9** + **10**), identificados em mistura por CG/EM.

Tabela 11 - Fracionamento da fase hexânica (DPT-1) do extrato metanólico de *D. psammatores* em coluna de sílica gel

Eluentes	Volumes eluídos (mL)	Frações obtidas
Hexano	350	1-7
Hexano/AcOEt 10%	180	8-25
Hexano/ AcOEt 20%	210	26-46
Hexano/ AcOEt 30%	210	47-67
Hexano/ AcOEt 50%	220	68-89
Hexano/ AcOEt 70%	210	90-110
Hexano/ AcOEt 90%	210	111-131
AcOEt	210	132-152
AcOEt/MeOH 20%	140	153-166
AcOEt/MeOH 30%	120	167-178
AcOEt/MeOH 50%	120	179-190
MeOH	100	191-200

Tabela 12 - Frações reunidas e respectivas massas obtidas no fracionamento da fase hexânica (DPT-1) do extrato metanólico de *D. psammatoles* em coluna de sílica gel

Frações reunidas	Frações coletadas	Massas obtidas (g)
DPT-1.1	1-12	0,002
DPT-1.2	13-35	0,032
DPT-1.3	36-51	0,012
DPT-1.4	52-54	0,008
DPT-1.5	55	0,005
DPT-1.6	56-60	0,020
DPT-1.7	61-79	0,088
DPT-1.8	80-84	0,009
DPT-1.9	85-87	0,002
DPT-1.10	88-104	0,030
DPT-1.11	105-146	0,009
DPT-1.12	147-172	0,012
DPT-1.13	173-200	0,016

3.5.1.1. Purificação das frações da fase hexânica (DPT-1) do extrato metanólico de *D. psammatoles*

O procedimento de purificação das frações da fase hexânica (DPT-1) obtida da partição do extrato metanólico de *D. psammatoles* encontra-se representado na Fig. 6.

Figura 6 – Fluxograma representativo da purificação das frações da fase hexânica do extrato metanólico de *D. psammatores*

3.5.1.1.1. Purificação da fração DPT-1.7 e obtenção da mistura de substâncias 21 + 23

A purificação da fração DPT-1.7 (0,088 g) foi realizada em CCC (cromatografia por adsorção), de acordo com Vichnewski (1995). A coluna foi empacotada com 20 g de sílica gel 60, em um tubo de vidro com 330 mm de comprimento por 15 mm de diâmetro interno, sendo que a altura do adsorvente foi de 200 mm.

A amostra foi solubilizada em clorofórmio e adsorvida em sílica para formar a pastilha e aplicar no topo da coluna.

Os eluentes utilizados para o fracionamento dessa amostra foram hexano e acetato de etila e misturas dos mesmos em gradiente crescente de polaridade.

Foram coletadas 37 frações de 10 mL e em seguida as frações semelhantes foram reunidas mediante análise por CCDC.

Na Tab. 13 estão indicadas as frações coletadas, os eluentes utilizados, bem como os volumes eluídos e na Tab. 14 estão mostradas as frações agrupadas e as massas obtidas neste fracionamento.

A fração DPT-1.7.3 continha os ácidos graxos ácido palmítico e ácido esteárico (**21 + 23**), identificados através de análise espectroscópica de RMN ^1H e ^{13}C e espectrometria de massas.

Tabela 13 - Purificação da fração DPT-1.7 em coluna de sílica gel

Eluentes	Volumes eluídos (mL)	Frações obtidas
Hexano	30	1-3
Hexano/AcOEt 10%	50	4-8
Hexano/ AcOEt 20%	50	9-13
Hexano/ AcOEt 30%	50	14-18
Hexano/ AcOEt 50%	50	19-23
Hexano/ AcOEt 70%	40	24-27
Hexano/ AcOEt 90%	60	28-33
AcOEt	40	34-37

Tabela 14 - Frações reunidas e respectivas massas obtidas na purificação da fração DPT-1.7 em coluna de sílica gel

Frações reunidas	Frações coletadas	Massas obtidas (g)
DPT-1.7.1	1-12	0,004
DPT-1.7.2	13-14	0,007
DPT-1.7.3	15-18	0,029
DPT-1.7.4	19-20	0,009
DPT-1.7.5	21-37	0,016

3.5.1.1.2. Purificação da fração DPT-1.10 e obtenção da mistura de substâncias 24 + 25 + 26

A purificação da fração DPT-1.10 (0,030 g) foi realizada em CCC (cromatografia por adsorção), de acordo com Vichnewski (1995). A coluna foi empacotada com 20 g de sílica gel 60, em um tubo de vidro com 330 mm de comprimento por 15 mm de diâmetro interno, sendo que a altura do adsorvente foi de 200 mm.

A amostra foi solubilizada em clorofórmio e adsorvida em sílica para formar a pastilha e aplicar no topo da coluna.

Os eluentes utilizados para o fracionamento dessa amostra foram hexano e acetato de etila e misturas dos mesmos em gradiente crescente de polaridade.

Foram coletadas 37 frações de 10 mL e em seguida as frações semelhantes foram reunidas mediante análise por CCDC.

Na Tab. 15 estão indicadas as frações coletadas, os eluentes utilizados, bem como os volumes eluídos e na Tab. 16 estão mostradas as frações agrupadas e as massas obtidas neste fracionamento.

A fração DPT-1.10.7 continha as substâncias 2,3-propanodiol, 1-heptadeciloxi; 2,3-propanodiol, 1-octadeciloxi (álcool batílico) e 2,3-propanodiol, 1-nonadeciloxi (**24 + 25 + 26**), as quais foram identificadas através de análise espectroscópica de RMN ^1H , ^{13}C além de técnicas bidimensionais de HMQC e HMBC e espectrometria de massas.

Tabela 15 - Purificação da fração DPT-1.10 em coluna de sílica gel

Eluentes	Volumes eluídos (mL)	Frações obtidas
Hexano	20	1-2
Hexano/AcOEt 10%	50	3-7
Hexano/AcOEt 20%	50	8-12
Hexano/AcOEt 30%	50	13-17
Hexano/AcOEt 50%	50	18-22
Hexano/AcOEt 70%	50	23-27
Hexano/AcOEt 90%	60	28-33
AcOEt	40	34-37

Tabela 16 - Frações reunidas e respectivas massas obtidas na purificação da fração DPT-1.10 em coluna de sílica gel

Frações reunidas	Frações coletadas	Massas obtidas (g)
DPT-1.10.1	1-9	0,001
DPT-1.10.2	10-12	0,001
DPT-1.10.3	13-15	0,004
DPT-1.10.4	16-18	0,002
DPT-1.10.5	19-20	0,002
DPT-1.10.6	21-23	0,003
DPT-1.10.7	24	0,004
DPT-1.10.8	25-26	0,008
DPT-1.10.9	27-29	0,002
DPT-10.10	30-37	0,002

3.5.2. Fracionamento da fase butanólica (DPT-3) do extrato metanólico de *D. psammatores* e isolamento da substância 2

O processo de fracionamento e purificação da fase butanólica encontra-se descrito na Fig. 7.

Figura 7 – Fluxograma representativo do fracionamento da fase butanólica do extrato metanólico de *D. psammatores*

A amostra continha cristais brancos misturados com uma goma marrom. Os cristais foram lavados com metanol e a goma marrom solúvel (3,202 g) foi separada e aplicada no topo da coluna de Sephadex LH-20 (cromatografia por exclusão), cujas dimensões eram: 800 mm de comprimento por 45 mm de diâmetro interno, sendo 720 mm a altura de Sephadex LH-20.

Foram coletadas 94 frações de 15 mL, utilizando-se metanol como fase móvel, e em seguida as frações semelhantes foram reunidas através de análise por CCDC. Na Tab. 17 estão indicadas as frações coletadas e massas obtidas.

A fração DPT-3.5 foi submetida à análise espectroscópica de RMN ^1H e espectrometria de massas, identificando-se o nucleosídeo **2** (timidina).

Tabela 17 – Fracionamento da fase butanólica (DPT-3) do extrato metanólico de *D. psammatoles* em coluna de Sephadex LH-20

Frações reunidas	Frações coletadas	Massas obtidas (g)
DPT-3.1	1-14	0,0409
DPT-3.2	15-20	0,5654
DPT-3.3	21-30	1,7240
DPT-3.4	31-43	0,2045
DPT-3.5	44-48	0,0138
DPT-3.6	49-62	0,0521
DPT-3.7	63-65	0,0223
DPT-3.8	66-70	0,0225
DPT-3.9	71-86	0,0189
DPT-3.10	87-94	0,0065

3.5.2.1. Purificação da fração DPT-3.6 e isolamento da substância 2

Esta fração (0,0521 g) foi solubilizada em metanol, centrifugada e o sobrenadante foi aplicado na coluna de Sephadex LH-20 em tubo de vidro de 390 mm de comprimento por 20 mm de diâmetro interno, sendo 250 mm a altura de Sephadex LH-20.

Foram coletadas 18 frações de 10 mL, utilizando-se metanol como fase móvel e reunindo-se as frações semelhantes mediante análise por CCDC. Na Tab. 18 estão indicadas as frações coletadas e massas obtidas no fracionamento da fração DPT-3.6.

A fração DPT-3.6.2 foi submetida à análise espectroscópica de RMN ^1H e espectrometria de massas, identificando-se o nucleosídeo **2** (timidina).

Tabela 18 - Fracionamento da fração DPT-3.6 do extrato metanólico de *D. psammátodes*

Frações reunidas	Frações coletadas	Massas obtidas (g)
DPT-3.6.1	1-7	0,0042
DPT-3.6.2	8	0,0025
DPT-3.6.3	9-11	0,0342
DPT-3.6.4	12	0,0038
DPT-3.6.5	13	0,0014
DPT-3.6.6	14-15	0,0021
DPT-3.6.7	16-18	0,0011

3.5.2.2. Isolamento da substância 6 a partir da fração DPT-3.7

Na fração DPT-3.7 formou-se precipitado branco, o qual foi separado do sobrenadante por filtração. O sólido (11 mg) foi submetido à análise espectroscópica de RMN ^1H e espectrometria de massas, identificando-se o nucleosídeo **6** (2'-deoxiguanosina).

3.6. Segundo fracionamento do extrato metanólico de *D. psammátodes* coletado em Trairi (CE)

Foram fracionados novamente 9,0 g do extrato metanólico de *D. psammátodes* através do processo de partição líquido-líquido com a finalidade de separar os constituintes apolares dos demais componentes polares. Esse fracionamento teve a finalidade de se isolar os constituintes polares do extrato, pois não foi possível durante o primeiro fracionamento devido à grande quantidade de sal presente nas fases butanólica e hidroalcoólica, bem como identificar os constituintes presentes na fase clorofórmica, realizado sem sucesso durante o primeiro fracionamento. Com este intuito, o extrato foi inicialmente suspenso em água quente para solubilização do sal presente na amostra. Assim, a partição foi realizada com o precipitado resultante deste procedimento. O esquema de fracionamento utilizado

encontra-se representado na Fig. 8 e a quantidade obtida de cada fração na partição líquido-líquido encontra-se na Tab. 19.

Figura 8 – Fluxograma representativo do segundo fracionamento do extrato metanólico de *D. psammatus*

Tabela 19 – Fases resultantes da segunda partição do extrato metanólico de *D. psammátodes*

Fases obtidas	Massas obtidas (g)
Aquosa	4,93 g
Hexânica	0,14 g
Clorofórmica	0,23 g
Metanol/Água	2,98 g
Resíduo	0,66 g

3.6.1. Fracionamento da fase aquosa (DPTFA) do extrato metanólico de *D. psammátodes*

Com o intuito de se isolar substâncias polares deste extrato, a fase aquosa foi selecionada para o processo de fracionamento e purificação, conforme descrito na Fig. 9.

Figura 9 – Fluxograma representativo do fracionamento da fração aquosa do extrato metanólico de *D. psammatores*

A amostra formou uma massa sólida, a qual foi lavada com metanol. A fração solúvel neste solvente (1,656 g) foi aplicada no topo da coluna de Sephadex LH-20 (cromatografia por exclusão), cujas dimensões eram: 800 mm de comprimento por 45 mm de diâmetro interno, sendo 720 mm a altura de Sephadex LH-20.

Foram coletadas 26 frações de 15 mL, utilizando-se metanol como fase móvel, e em seguida as frações semelhantes foram reunidas através de análise por CCDC. Na Tab. 20 estão indicadas as frações coletadas e massas obtidas.

Tabela 20 – Fracionamento da fase aquosa do extrato metanólico de *D. psammatores* em coluna de Sephadex LH-20

Frações reunidas	Frações coletadas	Massa obtida (g)
DPTFA-1	1-6	0,006
DPTFA-2	7-12	0,005
DPTFA-3	13-15	0,013
DPTFA-4	16-20	0,460
DPTFA-5	21-23	0,673
DPTFA-6	24	0,341
DPTFA-7	25-26	0,046

3.6.1.1. Purificação da fração DPTFA-7 e isolamento das substâncias 4, 3 e 2

Esta fração (0,046 g) foi purificada através de CLAE preparativa. Após obtenção do espectro na região do UV/Vis para saber o comprimento de onda no qual a absorção era máxima, a amostra foi solubilizada em metanol, filtrada e aplicada no cromatógrafo, utilizando-se coluna ODS preparativa (20x250 mm), comprimento de onda de 256 nm, com fluxo de 9 mL/min, com o seguinte gradiente de fase móvel:

- 0,01 a 30 min: MeOH/H₂O (2:98)
- 30 a 70 min: MeOH/H₂O (30:70)
- 70 a 80 min: MeOH/H₂O (30:70)
- 80 a 90 min: MeOH/H₂O (2:98)
- 90 a 100 min: MeOH/H₂O (2:98)

Foram obtidas 27 frações, das quais, aquelas codificadas como DPTFA-7.10 (2 mg), DPTFA-7.11 (1 mg) e DPTFA-7.19 (1 mg) foram submetidas à análise espectroscópica de RMN ¹H e espectrometria de massas, identificando-se três nucleosídeos, codificados, respectivamente, como substâncias **4** (hipoxantina), **3**

(uridina) e **2** (timidina), sendo que a última foi isolada anteriormente do extrato metanólico de *D. psammátodes* coletado em Icapuí (CE).

3.6.2. Fracionamento da fase clorofórmica (DPTFC) do extrato metanólico de *D. psammátodes*

Com o intuito de se identificar as substâncias presentes na fase clorofórmica, esta foi submetida ao processo de fracionamento e purificação, conforme descrito na Fig. 10.

Figura 10 – Fluxograma representativo da purificação das frações da fase clorofórmica do extrato metanólico de *D. psammátodes*

O fracionamento da fase clorofórmica foi realizado em CCC (cromatografia por adsorção), de acordo com Vichnewski (1995). A coluna foi empacotada com 10 g de sílica gel 60, em um tubo de vidro com 470 mm de comprimento por 10 mm de diâmetro interno.

A fase clorofórmica (0,203 g) foi solubilizada em clorofórmio e adsorvida em sílica para formar a pastilha e aplicar no topo da coluna.

Os eluentes utilizados para o fracionamento da fase clorofórmica foram clorofórmio, metanol e misturas dos mesmos em gradiente crescente de polaridade.

Foram coletadas 145 frações de 10 mL e em seguida as frações semelhantes foram reunidas mediante análise por CCDC.

Na Tab. 21 estão indicadas as frações coletadas, os eluentes utilizados, bem como os volumes eluídos e na Tab. 22 estão mostradas as frações agrupadas e as massas obtidas neste fracionamento.

Tabela 21 - Fracionamento da fase clorofórmica (DPTFC) do extrato metanólico de *D. psammotodes* em coluna de sílica gel

Eluentes	Volumes eluídos (mL)	Frações obtidas
CHCl ₃	100	1-10
CHCl ₃ /MeOH 5%	120	11-22
CHCl ₃ /MeOH 10%	110	23-33
CHCl ₃ /MeOH 15%	120	34-45
CHCl ₃ /MeOH 20%	120	46-57
CHCl ₃ /MeOH 25%	100	58-67
CHCl ₃ /MeOH 30%	110	68-78
CHCl ₃ /MeOH 40%	100	79-88
CHCl ₃ /MeOH 50%	90	89-97
CHCl ₃ /MeOH 60%	100	98-107
CHCl ₃ /MeOH 70%	90	108-116
CHCl ₃ /MeOH 80%	100	117-126
CHCl ₃ /MeOH 90%	90	127-135
MeOH	100	136-145

Tabela 22 - Frações reunidas e respectivas massas obtidas no fracionamento da fase clorofórmica (DPTFC) do extrato metanólico de *D. psammatores* em coluna de sílica gel

Frações reunidas	Frações coletadas	Massas obtidas (g)
DPTFC-1	1-5	0,001
DPTFC-2	6-14	0,001
DPTFC-3	15-16	0,083
DPTFC-4	17	0,002
DPTFC-5	18-24	0,011
DPTFC-6	25-28	0,006
DPTFC-7	29-31	0,002
DPTFC-8	32-34	0,003
DPTFC-9	35-45	0,025
DPTFC-10	46-58	0,017
DPTFC-11	59-73	0,012
DPTFC-12	74-86	0,009
DPTFC-13	87-111	0,016
DPTFC-14	112-145	0,011

3.6.2.1. Purificação da fração DPTFC-3 e obtenção da mistura de substâncias 18 + 19 + 20 + 21 + 22 + 23

A purificação da fração DPTFC-3 (0,083 g) foi realizada em CCC (cromatografia por adsorção), de acordo com Vichnewski (1995). A coluna foi empacotada com 8,5 g de sílica gel 60, em um tubo de vidro com 470 mm de comprimento por 10 mm de diâmetro interno, sendo que a altura do adsorvente foi de 255 mm.

A amostra foi solubilizada em clorofórmio e adsorvida em sílica para formar a pastilha e aplicar no topo da coluna.

Os eluentes utilizados para o fracionamento dessa amostra foram hexano, acetato de etila, metanol e misturas dos mesmos em gradiente crescente de polaridade.

Foram coletadas 58 frações de 10 mL e em seguida as frações semelhantes foram reunidas mediante análise por CCDC.

Na Tab. 23 estão indicadas as frações coletadas, os eluentes utilizados, bem como os volumes eluídos e na Tab. 24 estão mostradas as frações agrupadas e as massas obtidas neste fracionamento.

A fração DPTFC-3.4 continha os ácidos graxos ácido láurico, ácido mirístico, ácido pentadecanóico, ácido palmítico, ácido margárico e ácido esteárico (**18** + **19** + **20** + **21** + **22** + **23**), identificados através de análise espectroscópica de RMN ^1H e CG/EM após reação de metilação.

Tabela 23 - Purificação da fração DPTFC-3 em coluna de sílica gel

Eluentes	Volumes eluídos (mL)	Frações obtidas
Hexano/ AcOEt 20%	80	1-8
Hexano/AcOEt 30%	50	9-13
Hexano/ AcOEt 50%	50	14-18
Hexano/ AcOEt 70%	50	19-23
Hexano/ AcOEt 90%	50	24-28
AcOEt	80	29-36
AcOEt/ MeOH 20%	50	37-41
AcOEt/ MeOH 30%	50	42-46
AcOEt/ MeOH 50%	50	47-51
MeOH	70	52-58

Tabela 24 - Frações reunidas e respectivas massas obtidas na purificação da fração DPTFC-3 em coluna de sílica gel

Frações reunidas	Frações coletadas	Massas obtidas (g)
DPTFC-3.1	1-2	0,0006
DPTFC-3.2	3	0,0027
DPTFC-3.3	4	0,0074
DPTFC-3.4	5-6	0,0078
DPTFC-3.5	7-8	0,0084
DPTFC-3.6	9-12	0,0113
DPTFC-3.7	13-14	0,0037
DPTFC-3.8	15-16	0,0046
DPTFC-3.9	17-19	0,0057
DPTFC-3.10	20-25	0,0028
DPTFC-3.11	26-32	0,0008
DPTFC-3.12	33-36	0,0002
DPTFC-3.13	37	0,0016
DPTFC-3.14	38-43	0,0022
DPTFC-3.15	44-58	0,0043

3.6.2.1.1. Reação de metilação para identificação dos ácidos graxos por CG/EM

7 mg da fração DPTFC-3.4 foram transferidos para tubo de ensaio, onde adicionou-se 1 mL do reagente BF_3 -metanol. O tubo foi colocado em banho de água fervente por 2 minutos e após resfriamento foi adicionado 2 mL de H_2O e 1,5 mL de hexano. A mistura foi agitada vigorosamente e a fase hexânica, superior, foi retirada. Esse processo de extração com hexano foi repetido por mais duas vezes e a fase hexânica contendo os ácidos graxos metilados foi analisada por CG/EM.

3.7. Fracionamento do extrato metanólico de *E. vannamei*

Foram fracionados 30,0 g do extrato metanólico de *E. vannamei* através do processo de partição líquido-líquido com a finalidade de separar os constituintes

apolares dos demais componentes polares. O procedimento utilizado encontra-se representado na Fig. 11.

Figura 11 – Fluxograma representativo do fracionamento do extrato metanólico de *E. vannamei*

As fases obtidas através do processo de partição líquido-líquido foram submetidas a ensaio biológico e analisadas através de CCDC e RMN ^1H . De acordo com a atividade biológica, o perfil de eluição nas placas cromatográficas e o espectro de RMN ^1H , as fases hidroalcoólica e hexânica foram fracionadas através de diversas técnicas cromatográficas. A quantidade obtida de cada fração na partição líquido-líquido encontra-se na Tab. 25.

Tabela 25 – Fases resultantes da partição do extrato metanólico de *E. vannamei*

Fases obtidas	Massas obtidas (g)
Hexânica	0,32 g
Metanol/Água	13,17 g
Resíduo	15,84 g

3.7.1. Fracionamento da fase hexânica (EV-1) do extrato metanólico de *E. vannamei* e obtenção das substâncias 13 + 14 + 15 + 16 + 17 e 19 + 20 + 21 + 22 + 23

O procedimento de fracionamento e purificação da fase hexânica obtida da partição do extrato metanólico de *E. vannamei* encontra-se representado na Fig. 12.

Figura 12 – Fluxograma representativo do fracionamento e purificação da fase hexânica do extrato metanólico de *E. vannamei*

O fracionamento da fase hexânica foi realizado em CCC. A coluna foi empacotada com 30 g de sílica gel 60, em um tubo de vidro com 500 mm de comprimento por 15 mm de diâmetro interno.

A fase hexânica (0,299 g) foi solubilizada em acetato de etila e adsorvida em sílica para formar a pastilha e aplicar no topo da coluna.

Os eluentes utilizados para o fracionamento da fase hexânica foram hexano, acetato de etila e metanol em gradiente crescente de polaridade e misturas dos mesmos.

Foram coletadas 189 frações de 10 mL e em seguida, as frações semelhantes foram reunidas mediante análise por CCDC.

Na Tab. 26 estão indicadas as frações coletadas, os eluentes utilizados, bem como os volumes eluídos e na Tab. 27 estão mostradas as frações agrupadas e as massas obtidas neste fracionamento.

A fração EV-1.3 continha os ácidos graxos metilados miristato de metila, palmitato de metila, estearato de metila, palmitoleato de metila e oleato de metila (**13 + 14 + 15 + 16 + 17**), os quais foram identificados através de análise espectroscópica de RMN ^1H e análise por CG.

A fração EV-1.12 continha os ácidos graxos ácido mirístico, ácido pentadecanóico, ácido palmítico, ácido margárico e ácido esteárico (**19 + 20 + 21 + 22 + 23**), identificados através de análise espectroscópica de RMN ^1H e CG/EM após reação de metilação.

Tabela 26 - Fracionamento da fase hexânica do extrato metanólico de *E. vannamei* em coluna de sílica gel

Eluentes	Volumes eluídos (mL)	Frações obtidas
Hexano	170	1-17
Hexano/AcOEt 5%	100	18-27
Hexano/AcOEt 10%	100	28-37
Hexano/AcOEt 20%	150	38-52
Hexano/AcOEt 30%	150	53-67
Hexano/AcOEt 50%	150	68-82
Hexano/AcOEt 70%	150	83-97
Hexano/AcOEt 90%	150	98-112
AcOEt	190	113-131
AcOEt/MeOH 20%	170	132-148
AcOEt/MeOH 30%	140	149-162
AcOEt/MeOH 50%	140	163-176
MeOH	130	177-189

Tabela 27 - Frações reunidas e respectivas massas obtidas no fracionamento da fase hexânica do extrato metanólico de *E. vannamei* em coluna de sílica gel

Frações reunidas	Frações coletadas	Massas obtidas (g)
EV-1.1	1-3	0,0148
EV-1.2	4-29	0,0016
EV-1.3	30-31	0,0333
EV-1.4	32-37	0,0039
EV-1.5	38	0,0020
EV-1.6	39	0,0023
EV-1.7	40-46	0,0111
EV-1.8	47	0,0072
EV-1.9	48-50	0,0229
EV-1.10	51-54	0,0031
EV-1.11	55-61	0,0076
EV-1.12	62-63	0,0158
EV-1.13	64-65	0,0139
EV-1.14	66-72	0,0172
EV-1.15	73-76	0,0085
EV-1.16	77	0,0038
EV-1.17	78-84	0,0135
EV-1.18	85-96	0,0072
EV-1.19	97-111	0,0033
EV-1.20	112-115	0,0015
EV-1.21	116-121	0,0011
EV-1.22	122-134	0,0019
EV-1.23	135-167	0,0410
EV-1.24	168-190	0,0327

3.7.1.1. Obtenção das substâncias 9 + 12 a partir da fração EV-1.9

A fração EV-1.9 formou um precipitado, o qual foi separado do sobrenadante por filtração. O precipitado possuía os esteróides colestanol e colesterol (**9 + 12**), identificados em mistura por CG/EM.

3.7.2. Fracionamento da fase metanol/água (EV-2) do extrato metanólico de *E. vannamei*

O procedimento de fracionamento de parte da fase metanol/água obtida da partição do extrato metanólico de *E. vannamei* encontra-se representado na Fig. 13.

Figura 13 – Fluxograma representativo do fracionamento da fase metanol/água do extrato metanólico de *E. vannamei*

O fracionamento dessa amostra foi realizado em sílica gel C₁₈ (cromatografia de fase reversa), utilizando-se coluna com membrana sinterizada com pressão, cujas dimensões eram 70 mm de altura por 85 mm de diâmetro interno.

A amostra foi solubilizada em metanol e adsorvida em sílica gel C₁₈ para formar a pastilha e aplicar no topo da coluna.

Os eluentes utilizados para o fracionamento da fase metanol/água foram água, metanol e acetato de etila em gradiente crescente de polaridade e misturas dos mesmos. Foram coletadas 9 frações de 150 mL cada.

Na Tab. 28 estão indicadas as frações coletadas e as massas obtidas neste fracionamento.

Tabela 28 – Fracionamento da fase metanol/água do extrato metanólico de *E. vannamei* em coluna de sílica gel C₁₈

Frações	Eluentes	Massas obtidas (g)
EV-2.1	H ₂ O	7,063
EV-2.2	H ₂ O/MeOH 20%	2,684
EV-2.3	H ₂ O/MeOH 40%	0,180
EV-2.4	H ₂ O/MeOH 60%	0,219
EV-2.5	H ₂ O/MeOH 80%	0,111
EV-2.6	MeOH	0,130
EV-2.7	MeOH/AcOEt 50%	0,164
EV-2.8	AcOEt	0,106
EV-2.9	MeOH	0,123

3.7.2.1. Fracionamento da fração EV-2.1

Esta fração (4,128 g) foi solubilizada em metanol, centrifugada e o sobrenadante foi aplicado na coluna de Sephadex LH-20 em tubo de vidro de 800 mm de comprimento por 45 mm de diâmetro interno, sendo 720 mm a altura de Sephadex LH-20.

Foram coletadas 107 frações de 15 mL, utilizando-se metanol como fase móvel e reunindo-se as frações semelhantes mediante análise por CCDC. Na Tab.

29 estão indicadas as frações coletadas e massas obtidas no fracionamento da fração EV-2.1.

Tabela 29 - Fracionamento da fração EV-2.1 do extrato metanólico de *E. vannamei*

Frações reunidas	Frações coletadas	Massas obtidas (g)
EV-2.1.1	1-11	0,0292
EV-2.1.2	12-14	0,0785
EV-2.1.3	15-23	2,0603
EV-2.1.4	24-27	0,8537
EV-2.1.5	28-30	0,2699
EV-2.1.6	31-38	0,4051
EV-2.1.7	39-40	0,1036
EV-2.1.8	41-48	0,1514
EV-2.1.9	49-52	0,0218
EV-2.1.10	53-63	0,0648
EV-2.1.11	64-71	0,0436
EV-2.1.12	72-87	0,0329
EV-2.1.13	88	0,0015
EV-2.1.14	89-107	0,0088

3.7.2.1.1. Purificação da fração EV-2.1.11 e isolamento da substância 7

Esta fração (0,0436 g) foi purificada através de CLAE preparativa. Após obtenção do espectro na região do UV/Vis para saber o comprimento de onda no qual a absorção era máxima, a amostra foi solubilizada em metanol, filtrada e aplicada no cromatógrafo, utilizando-se coluna ODS preparativa (20x250 mm), comprimento de onda de 250 nm, com fluxo de 8 mL/min, com o seguinte gradiente de fase móvel: 0,01 a 80 min: MeOH/H₂O (2:98 a 10:90)

Foram obtidas 10 frações, sendo que aquela codificada como EV-2.1.11.6 (1 mg) foi submetida à análise espectroscópica de RMN ¹H, além de técnicas bidimensionais de HMQC e HMBC e espectrometria de massas, identificando-se o nucleosídeo codificado como substância **7** (guanosina).

3.7.2.1.2. Isolamento da substância 8 a partir da fração EV-2.1.12

Na fração EV-2.1.12 formou-se um precipitado amarelo, o qual foi separado do sobrenadante por centrifugação. O sólido (30 mg) foi submetido à análise espectroscópica de RMN ^1H , ^{13}C , além de técnicas bidimensionais de HMQC e HMBC e espectrometria de massas, identificando-se o nucleosídeo **8** (adenosina).

3.7.2.2. Fracionamento da fração EV-2.2 e isolamento da substância 8

Esta fração (1,954 g) foi solubilizada em metanol, centrifugada e o sobrenadante foi aplicado na coluna de Sephadex LH-20 em tubo de vidro de 800 mm de comprimento por 45 mm de diâmetro interno, sendo 720 mm a altura de Sephadex LH-20.

Foram coletadas 104 frações de 15 mL, utilizando-se metanol como fase móvel e reunindo-se as frações semelhantes mediante análise por CCDC. Na Tab. 30 estão indicadas as frações coletadas e massas obtidas no fracionamento da fração EV-2.2.

A fração EV-2.2.9 foi submetida à análise espectroscópica de RMN ^1H e espectrometria de massas, identificando-se o nucleosídeo **8** (adenosina).

Tabela 30 - Fracionamento da fração EV-2.2 do extrato metanólico de *E. vannamei*

Frações reunidas	Frações coletadas	Massas obtidas (g)
EV-2.2.1	1-18	1,1835
EV-2.2.2	19-26	0,1361
EV-2.2.3	27-29	0,0625
EV-2.2.4	30-37	0,1393
EV-2.2.5	38-44	0,0367
EV-2.2.6	45-47	0,0056
EV-2.2.7	48-59	0,0406
EV-2.2.8	60-69	0,0236
EV-2.2.9	70-83	0,0177
EV-2.2.10	84-94	0,0121
EV-2.2.11	95-104	0,0013

3.8. Ensaios de citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Oncologia Experimental do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, sob supervisão da Profa. Dra. Letícia Veras Costa Lotufo.

3.8.1. Potencial antimitótico em ovos de ouriço do mar *Lytechinus variegatus* (Lamarck, 1816)

O ouriço do mar pertence ao Filo Echinodermata, Classe Echinoidea, Subclasse Euechionoidea (RUPPERT; BARNES, 1996). A espécie *L. variegatus* é facilmente mantida em laboratório e foi selecionada para utilização em ensaios de toxicidade por apresentar-se fértil o ano todo e possuir ovos pouco pigmentados, viabilizando, assim, a execução dos ensaios com seus gametas. Os óvulos apresentam uma coloração alaranjada enquanto que os espermatozóides apresentam-se esbranquiçados. A membrana de fecundação dos ovos é facilmente visualizada assim como as várias fases da embriogênese. O uso deste modelo permite avaliar o efeito inibitório em diferentes níveis do processo mitótico.

3.8.1.1. Procedimento experimental

A eliminação dos gametas foi induzida pela injeção de 3 mL de KCl 0,5 M na cavidade celômica (perivisceral) dos animais. Após o término da eliminação dos gametas, os óvulos foram lavados em uma proveta com água do mar filtrada. Esse processo foi repetido por mais duas vezes, para remoção da camada gelatinosa que envolve o óvulo. Os espermatozóides concentrados foram coletados e mantidos em baixa temperatura ($4 \pm 1^\circ\text{C}$) até o momento do uso.

A fecundação foi realizada pela adição de 1 mL da suspensão de espermatozóides (0,05 mL de suspensão concentrada dos espermatozóides/ 2,45 mL de água do mar filtrada) à suspensão de óvulos (50 mL). Após cerca de dois minutos, a fecundação foi confirmada pela presença da membrana da fecundação, através da observação de uma amostra das células em microscópio óptico. Os ovos (1 mL) foram distribuídos numa multiplaca com 24 cavidades, contendo a amostra analisada. Os ovos foram incubados num volume final de 2 mL, mantidos à temperatura ambiente ($26 \pm 2^\circ\text{C}$) sob agitação constante. Foram fixadas alíquotas de 0,2 mL em formalina 10%, aproximadamente 1 h e 3h30min após a fecundação, intervalos correspondentes às fases da primeira divisão e blástula, respectivamente. Cem ovos foram contados em cada amostra para obtenção da porcentagem de células normais.

3.8.1.2. Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de n experimentos. O cálculo da CI_{50} e seu respectivo IC 95% foi realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prism versão 3.0 (GraphPad Software).

3.8.2. Estudos em células tumorais *in vitro*

3.8.2.1. Linhagens celulares utilizadas

As linhagens celulares utilizadas para análise das amostras foram cedidas pelo National Cancer Institute (NCI-EUA) e Missouri University (EUA) e estão listadas quanto à origem e tipo histológico na Tab. 31.

Tabela 31 - Linhagens tumorais utilizadas no ensaio de citotoxicidade *in vitro*

Linhagem	Tipo Histológico	Origem
B-16	melanoma	murino
HCT-8	carcinoma de cólon	humano
MCF-7	carcinoma de mama	humano
CEM	leucemia linfocítica	humano
HL-60	leucemia promielocítica	humano
K-562	leucemia mielocítica crônica	humano
MOLT-4	leucemia de células T	humano

3.8.2.2. Manutenção das células

As linhagens celulares foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 25 cm², volume de 50 mL para células aderidas e 75 cm², volume de 250 mL para células em suspensão); utilizando-se meio de cultura RPMI 1640 complementando com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂, seguido de observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão a cada 24 horas, quando necessário as células foram repicadas em meio de cultura novo, em uma concentração de 0,5-1,0 x 10⁶ células/mL (BUTLER; DAWSON, 1992).

3.8.2.3. Ensaio do MTT

A atividade citotóxica dos extratos brutos, frações e substâncias das ascídias foi avaliada através do ensaio do MTT, utilizando as linhagens tumorais citadas acima. Este ensaio, que pode ser utilizado para determinar citotoxicidade, proliferação e ativação celular, baseia-se na redução do sal de coloração amarela, o 3-(4',5'-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) à formazan, de coloração púrpura, pela atividade da enzima succinil-desidrogenase, presente nas mitocôndrias de células metabolicamente ativas, permitindo dessa maneira quantificar a porcentagem de células viáveis (MOSMANN, 1983).

3.8.2.3.1. Procedimento experimental

As células em suspensão ou monocamadas foram distribuídas em multiplacas de 96 cavidades numa densidade celular de $0,3 \times 10^6$ células/mL para células suspensas e 1×10^6 células/mL para células aderidas. As amostras analisadas foram incubadas juntamente com as células durante 72 horas, antes da realização do ensaio do MTT. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (1500 rpm/15 min), e o sobrenadante foi descartado. Cada cavidade recebeu 200 μ L da solução de MTT a 0,5 mg/mL (10% em meio RPMI 1640), e a placa foi reincubada durante 3 horas em estufa a 37°C e a 5% de CO₂. Após esse intervalo, as placas foram novamente centrifugadas (3000 rpm/10 min), o sobrenadante foi desprezado, e o precipitado foi ressuspensionado em 150 μ L de DMSO. Para quantificação do sal reduzido nas células vivas, as absorbâncias foram lidas com o auxílio do espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 550 nm. Essa técnica tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula, sendo assim, bastante útil para avaliar a citotoxicidade.

3.8.2.3.2. Análise dos dados

As amostras foram analisadas em diluição seriada, em duplicata ou triplicata. Foi registrado o gráfico absorbância x concentração e determinadas suas CI_{50} e seus respectivos IC 95% realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prism versão 3.0 (GraphPad Software).

3.8.2.4. Estudo do mecanismo de ação em células HL-60 para as misturas de ácidos graxos metilados

3.8.2.4.1. Curva de crescimento celular

A construção da curva de crescimento celular pode fornecer informações importantes sobre a cinética da cultura de células em questão. A observação, em curtos intervalos, dessas culturas tratadas permite avaliar a ação citotóxica temporal da droga assim como o acompanhamento das alterações morfológicas das células a medida que vão acontecendo.

3.8.2.4.1.1. Procedimento experimental

Inicialmente, as células HL-60 foram plaqueadas e incubadas com a amostra nas concentrações de 1, 3 e 10 $\mu\text{g/mL}$. Nos intervalos programados de 12h, 24h, 36h, 48h, 60h e 72h após o plaqueamento, uma alíquota de cada amostra foi retirada e as células coradas com azul de tripan para contagem na câmara de Neubauer. O veículo de diluição das amostras foi utilizado como controle negativo.

3.8.2.4.1.2. Análise dos dados

O valor obtido para cada contagem foi plotado em um gráfico e construída uma curva com as variáveis: número de células viáveis x tempo de incubação, para cada concentração analisada, visando a observação da cinética de crescimento das células tratadas. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3.8.2.4.2. Viabilidade celular - Exclusão por Azul de Tripán

O teste de exclusão por azul de tripan permite quantificar separadamente as células viáveis das células mortas pela substância analisada. O corante penetra em todas as células, porém somente as células viáveis conseguem bombear o tripan para fora, sendo possível dessa maneira observar uma coloração azulada nas células mortas.

3.8.2.4.2.1. Procedimento experimental

Células da linhagem HL-60, na concentração de $0,3 \times 10^6$ células/mL, foram incubadas por 24 h com as drogas e examinadas ao microscópio de inversão. As concentrações utilizadas (3 e 10 $\mu\text{g/mL}$) foram estimadas a partir do valor da CI_{50} encontrada no método do MTT para esta mesma linhagem celular. Foram retirados 90 μL da suspensão de células e adicionado a 10 μL do azul de tripan. As células viáveis e as não viáveis foram diferenciadas e contadas em câmara de Neubauer. O controle negativo foi realizado na ausência e na presença do veículo usado para diluir a droga. A Doxorrubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) foi usada como controle positivo (VERAS *et al.*, 2004).

3.8.2.4.2.2. Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de n experimentos. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida de Student Newman Keuls, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3.8.2.4.3. Inibição da síntese de DNA – BrdU

A bromodeoxiuridina (BrdU) é uma base nitrogenada análoga a timidina. Quando as células estão sintetizando DNA o BrdU é incorporado no lugar da timidina. A detecção do BrdU incorporado nas células é feita por técnicas imuno-histoquímicas. O BrdU é adicionado 3h antes do término do período de incubação, para que esse seja incorporado ao DNA das células em mitose. Em seguida são adicionados os anticorpos e um cromógeno específico, a diaminobenzidina (DAB). Para corar as células não marcadas pelo cromógeno, utiliza-se hematoxilina (0,1%). São contadas as 200 (duzentas) primeiras células observadas em microscópio óptico. Consideram-se positivas para proliferação, as células de núcleo corado pelo DAB (cor marrom) e, negativas, as células de núcleo corado com hematoxilina (cor azul).

3.8.2.4.3.1. Procedimento experimental

Três horas após a adição do BrdU na cultura de células HL-60 ($0,3 \times 10^6$), lâminas para cada amostra foram preparadas e postas para secar por 2 h. Após o período de secagem foram fixadas em metanol: ácido acético (7:1,5) por 5 minutos. As células foram lavadas com tampão Tris (TBS) e incubadas em solução desnaturante por 90 minutos a 70°C e pH 7,4. Após uma segunda lavagem com TBS, as células foram circundadas com caneta hidrofóbica e incubadas com anticorpo primário e deixadas na geladeira durante a noite em câmara úmida. As células foram incubadas com anticorpo secundário biotinado por 20 minutos e, em seguida, com a solução de estreptavidina-fluoresceína por mais 20 minutos. Foi

adicionado o cromógeno DAB por 1-5 minutos e, em seguida, removido com água destilada. A contracoloração das células foi realizada com hematoxilina da Hanks a 0,1% (VERAS *et al.*, 2004). As concentrações utilizadas (3 e 10 $\mu\text{g/mL}$) foram estimadas a partir do valor da CI_{50} encontrada no método do MTT para esta mesma linhagem celular. O controle negativo foi realizado na ausência e na presença do veículo usado para diluir a droga. A doxorubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) foi usada como controle positivo.

3.8.2.4.3.2. Análise dos dados

Duzentas células foram contadas diferenciando-as entre núcleo marrom (incorporaram o BrdU) e não-marrom. A proporção de células marcadas em marrom e não-marcadas entre os diferentes grupos foi comparada pelo teste χ^2 com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3.8.2.4.4. Análise morfológica – Coloração diferencial por hematoxilina/eosina

A coloração utilizada nesse experimento permite distinguir o citoplasma e o núcleo, sendo possível analisar a célula quanto a sua integridade nuclear, bem como alterações no citoplasma. A hematoxilina é um corante alcalino que tem afinidade pelas proteínas nucleares, dando ao núcleo uma cor azul. A eosina, ao contrário, liga-se ao citoplasma conferindo-lhe uma coloração rósea.

3.8.2.4.4.1. Procedimento experimental

Células da linhagem HL-60, plaqueadas na concentração de $0,3 \times 10^6$ cél/mL, foram incubadas por 24h com as amostras e examinadas ao microscópio de inversão. As concentrações utilizadas (3 e 10 $\mu\text{g/mL}$) foram estimadas a partir do valor da CI_{50} encontrada no método do MTT para esta mesma linhagem celular. O controle negativo foi realizado na ausência e na presença do veículo usado para

diluir a droga. A doxorubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo. Para observar a morfologia, 50µL da suspensão de células foram adicionadas a centrífuga de lâmina (*cytospin*). Após a adesão das células na lâmina a fixação foi feita com etanol 96% por 5 minutos e a coloração primeiramente utilizada foi a hematoxilina, seguida pela eosina (VERAS *et al.*, 2004).

3.8.2.4.4.2. Análise dos dados

As lâminas contendo as células coradas foram levadas ao microscópio para avaliação das suas características morfológicas e comparadas ao controle (não-tratadas). O registro das alterações celulares foi feito por fotografia.

3.8.2.4.5. Análise morfológica – coloração diferencial por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina

O método de coloração pelo brometo de etídio / laranja de acridina (MCGAHON *et al.*, 1995) permite diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose ou necrose através da coloração diferencial por fluorescência e baseia-se na revelação das células (controle e tratadas) com a concentração de brometo de etídio (BE) e laranja de acridina (LA) ao nível do núcleo. A laranja de acridina intercala-se ao DNA, conferindo aparência verde ao núcleo celular, sendo capaz de atravessar membranas intactas. O brometo de etídio é incorporado majoritariamente por células não viáveis (com instabilidade de membrana), intercalando-se ao DNA corando-o de laranja; ligando-se fracamente ao RNA, que se mostrará com uma coloração vermelha. As células viáveis com membrana intacta apresentaram núcleo uniformemente corado de verde pela LA; O BE marca muito fracamente ou muitas vezes não marca, pois não atravessa à membrana não lisadas. As células em apoptose inicial (membrana ainda intacta) apresentaram manchas verdes brilhantes no núcleo (condensação da cromatina) e não são marcadas por BE; morfológicamente observam-se alterações da membrana em decorrência da formação de corpúsculos apoptóticos. As células em necrose (lesão de membrana) apresentam um padrão de coloração uniforme, laranja-avermelhada e

não há formação de corpos apoptóticos. Possivelmente, as membranas plasmáticas permaneçam intactas durante o fenômeno apoptótico até os últimos estágios quando se tornam permeáveis aos solutos normalmente retidos (KUMMAR *et al.*, 2004).

3.8.2.4.5.1. Procedimento experimental

As concentrações utilizadas (3 e 10 $\mu\text{g/mL}$) foram estimadas a partir do valor da CI_{50} encontrada no método do MTT para esta mesma linhagem celular. O controle negativo foi realizado na ausência e na presença do veículo usado para diluir a amostra. A doxorubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) foi usada como controle positivo. Após a incubação, a suspensão de células foi transferida para um tubo tipo Eppendorf e centrifugada por 3 min em baixa rotação. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 20 μL de solução de PBS. Em seguida, 1 μL da solução de BE:LA foi adicionado a cada tubo e uma alíquota dessas células transferido para uma lâmina e montado com lamínula e em seguida levadas ao microscópio de fluorescência para observação dos eventos celulares (GENG *et al.*, 2003).

3.8.2.4.5.2. Análise dos dados

Foram contadas 300 células, em duplicata, cada amostra para a quantificação percentual de cada evento celular (viáveis, necróticas e apoptóticas) e montadas lâminas que foram fotografadas para o registro visual dos efeitos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação estrutural dos constituintes químicos de *D. psammátodes* e *E. vannamei*

Com o objetivo de facilitar a discussão, a determinação estrutural será apresentada reunindo-se as substâncias estruturalmente semelhantes em grupos, independente de sua origem.

4.1.1. Identificação dos nucleosídeos

A partir do extrato metanólico de *D. psammátodes*, coletado em Icapuí (CE), foram isolados e identificados quatro nucleosídeos: 2'-deoxiuridina, 2'- deoxiinosina, timidina e 2'- deoxiguanosina. Do extrato metanólico de *D. psammátodes*, coletado em Trairi (CE), foram isolados e identificados três nucleosídeos e um núcleo purínico, destituído de açúcar: 2'-deoxiguanosina, timidina, uridina e hipoxantina, respectivamente.

A determinação estrutural destas substâncias foi realizada através de métodos espectroscópicos como RMN ^1H , ^{13}C e técnicas bidimensionais como HMQC, HMBC e COSY ^1H - ^1H e espectrometria de massas, confrontando-se os dados obtidos com aqueles existentes na literatura.

4.1.1.1. Identificação dos nucleosídeos pirimidínicos 1, 2 e 3 (2'- deoxiuridina, timidina e uridina)

Analisando-se os espectros de RMN ^1H das substâncias **1** e **3** (Figs. 14 e 16, pp. 72 e 74), nota-se inicialmente dois dubletos centrados em δ 5,63 e δ 7,85 para **1**, e em δ 5,64 e δ 7,88 para **3**, característicos dos hidrogênios aromáticos pirimidínicos, e que foram atribuídos aos hidrogênios H-5 e H-6, respectivamente, enquanto para a substância **2** observa-se um singlete em δ 7,70 (Fig. 15, p. 73) atribuído ao hidrogênio H-6.

Nota-se também nestes espectros a presença de um tripleto centrado em δ 6,15, e em δ 6,16 para as substâncias **1** e **2**, respectivamente, que foram atribuídos aos hidrogênios anoméricos (H-1') de uma unidade de deoxi-ribose. No espectro da substância **3** observa-se um dubleto centrado em δ 5,77, atribuído ao hidrogênio H-1' ao invés de um tripleto, devido à presença de uma unidade de ribose e não deoxi-ribose.

Através do experimento HMQC (Fig. 17, p. 75), que mostra a correlação ^{13}C - ^1H , foi possível atribuir os deslocamentos químicos de todos os carbonos da deoxi-ribose e dos carbonos C-5 e C-6 da porção aglicona da substância **1**. Para a substância **2** também foi possível atribuir os deslocamentos químicos de todos os carbonos da deoxi-ribose, bem como do carbono C-6 a partir do experimento HMQC (Fig. 18, p. 76). Enquanto que o espectro de HMBC da substância **1** (Fig. 19, p. 77), mostrou a correlação dos hidrogênios com os carbonos quaternários, sendo possível atribuir os deslocamentos químicos de C-2 e C-4. Para a substância **2** também foi possível atribuir os deslocamentos químicos de C-2, C-4 e também C-5 a partir desse mesmo experimento (Fig. 20, p. 78).

Nos espectros de massas da substância **1** (Fig. 21, p. 79) foram observados os íons m/z 227 $[\text{M}-\text{H}]^-$ e m/z 263 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$. Além disso, o espectro de massas EM/EM do íon m/z 263 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$ (Fig. 22, p. 80) apresentou o íon m/z 111, indicando a perda da deoxi-ribose da molécula. Sendo 228 o peso molecular da 2'-deoxiuridina, estes dados estão condizentes com o esperado para esta substância. No espectro de massas da substância **2** (Fig. 23, p. 81) foi observado o íon m/z 241 $[\text{M}-\text{H}]^-$. Sendo 242 o peso molecular da timidina, estes dados estão condizentes com o esperado para esta substância. No espectro de massas da substância **3** (Fig. 24, p. 82) foi observado o íon m/z 243 $[\text{M}-\text{H}]^-$. Sendo 244 o peso molecular da uridina, este dado está condizente com o esperado para esta substância.

A análise dos dados espectroscópicos em conjunto (Tabs. 32 a 34, pp. 69 a 71) e sua comparação com dados da literatura (DEMATTE *et al.*, 1985; POUCHERT; BEHNKE, 1993; CHANG; GOMES; BYRN, 1983; MIYAMOTO *et al.*, 1988; KITAJIMA *et al.*, 1999) permitiram concluir que a substância **1** trata-se do nucleosídeo 2'-deoxiuridina, a substância **2**, timidina e a substância **3**, uridina.

Estas substâncias já foram isoladas anteriormente de outros organismos marinhos: Demattè *et al.* (1985) encontraram 2'-deoxiuridina e timidina na ascídia *Trididemnum cereum*; Anthoni *et al.* (1987) também isolaram 2'-deoxiuridina e timidina da alga verde *Chara globularis*; Kim *et al.* (1993) também isolaram 2'-deoxiuridina, timidina, bem como uridina da ascídia *Aplidium pantherinum*; Berlinck (1994) encontrou timidina na esponja *Crambe crambe*; Mitchell *et al.* (1996) identificaram timidina na ascídia *Didemnum voeltzkowi*; Pettit *et al.* (1997) isolaram 2'-deoxiuridina e timidina da esponja *Phakellia mauritiana*; Moon, Baker e McClintock (1998) encontraram uridina na esponja *Isodictya erinacea*; König e Wright (1999) isolaram 2'-deoxiuridina e timidina da esponja *Carteriospongia* sp; Venkatesham, Rao e Venkateswarlu (2000) encontraram timidina na esponja *Mycale tenuispiculata*; De Rosa *et al.* (2001) identificaram uridina na alga *Polysiphonia denudata*; Usov *et al.* (2002) encontraram uridina no tunicado *Botryllus schlosseri*; Rao *et al.* (2003) isolaram 2'-deoxiuridina e timidina de uma esponja da Indonésia; De Rosa *et al.* (2003a) também encontraram uridina nas algas *Corallina mediterranea* e *C. granifera*; Schupp *et al.* (2003) isolaram timidina da ascídia *Eudistoma* sp.; Cao *et al.* (2004) encontraram 2'-deoxiuridina na esponja *Spongia* sp.; Kehraus *et al.* (2004) isolaram timidina e uridina da ascídia *Atriolum robustum* e Nechev *et al.* (2004) encontraram uridina na esponja *Hymeniacidon sanguinea*.

Tabela 32 – Dados de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (obtidos dos espectros de HMQC e HMBC) e HMBC da substância **1** (2'- deoxiuridina) em DMSO- d_6 e comparação com dados da literatura

Posição	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}	HMBC	literatura	
				δ_{H} (J em Hz)*	$\delta_{\text{C}}^{\dagger}$
2	-	150	-	-	150,28
4	-	163	-	-	162,99
5	5,63 d ($J=8,1$; 1H)	101	C-4 e C-6	5,59 d ($J=8,1$; 1H)	101,61
6	7,85 d ($J=7,9$; 1H)	139	C-2, C-4, C-5 e C-1'	7,98 d ($J=8,1$; 1H)	140,36
1'	6,15 t ($J=7,0$; 1H)	83	C-2 e C-6	6,26 dd ($J=6,8, 6,8$; 1H)	83,99
2'	2,07 m (2H)	39	C-1' e C-3'	2,24 m (2H)	39,56
3'	4,22 m (1H)	70	-	4,36 m (1H)	70,29
4'	3,77 m (1H)	86	-	3,6 – 4,0 m (3H)	87,25
5'	3,55 m (2H)	61	-	3,6 – 4,0 m (3H)	61,15

* Demattè *et al.*, 1985 (80 MHz, CD_3OD)

† Pouchert e Behnke, 1993 (75 MHz, DMSO- d_6)

Tabela 33 – Dados de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (obtidos dos espectros de HMQC e HMBC) e HMBC da substância **2** (timidina) em DMSO- d_6 e comparação com dados da literatura

Posição	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}	HMBC	literatura	
				δ_{H} (J em Hz)*	$\delta_{\text{C}}^{\dagger}$
2	-	151,2	-	-	150,32
4	-	164,0	-	-	163,60
5	-	109,5	-	-	109,24
6	7,70 s (1H)	136,4	C-2, C-4, C-5, C-1' e CH_3	8,17 d ($J=1,0$; 1H)	135,98
1'	6,16 t ($J=6,8$; 1H)	84,4	C-2 e C-6	7,05 d ($J=6,5$; 1H)	83,62
2'	2,07 m (2H)	40,0	C-1'	2,66 m (2H)	39,33
3'	4,23 sl (1H)	71,3	-	5,05 m (1H)	70,33
4'	3,76 m (1H)	88,5	-	4,48 ddd ($J=3,0, 3,0, 3,0$; 1H)	87,12
5'A	3,56 m (2H)	62,1	-	4,15 dd ($J=3,0, 12,0$; 1H)	61,22
5'B	3,56 m (2H)	62,1	-	4,24 dd ($J=3,0, 12,0$; 1H)	61,22
CH_3	1,77 s (3H)	12,4	C-4, C-5 e C-6	1,88 d ($J=1,0$; 3H)	12,19

* Kitajima *et al.*, 1999 (67,5 MHz, piridina- d_5)

$\dagger$ Pouchert e Behnke, 1993 (75 MHz, DMSO- d_6)

Tabela 34 – Dados de RMN ^1H (400 MHz) da substância **3** (uridina) em DMSO- d_6 e comparação com dados da literatura

Posição	δ_{H} (J em Hz)	δ_{H} (J em Hz) – literatura*
5	5,64 d (J=8,1; 1H)	5,81 d (J=8,0; 1H)
6	7,88 d (J=8,1; 1H)	8,55 d (J=8,0; 1H)
1'	5,77 d (J=5,2; 1H)	6,83 d (J=4,0; 1H)
2'	4,02 sl (1H)	4,92 dd (J=4,0, 9,0; 1H)
3'	3,96 sl (1H)	4,91 dd (J=4,5, 9,0; 1H)
4'	3,84 sl (1H)	4,67 ddd (J=2,5, 2,5, 4,5; 1H)
5'A	3,58 m (1H)	4,21 dd (J=2,5, 12,0, 1H)
5'B	3,58 m (1H)	4,32 dd (J=2,5, 12,0; 1H)

* Kitajima *et al.*, 1999 (500 MHz, piridina- d_5)

Figura 14 - Espectro de RMN ^1H da substância **1** – 400 MHz, DMSO-d_6

Figura 15 - Espectro de RMN ¹H da substância 2 – 400 MHz, DMSO-d₆

Figura 16 - Espectro de RMN ^1H da substância 3 – 400 MHz, DMSO-d_6

Figura 17 - Espectro bidimensional (HMQC) da substância **1** – 500 MHz, DMSO-d₆

Figura 18 - Espectro bidimensional (HMQC) da substância 2 – 500 MHz, DMSO-d₆

Figura 19 - Espectro bidimensional (HMBC) da substância **1** – 500 MHz, DMSO-d₆

Figura 20 - Espectro bidimensional (HMBC) da substância **2** – 500 MHz, DMSO-d₆

Figura 21 - Espectro de massas, por *electrospray*, da substância 1 – cone 20, modo negativo

Figura 22 - Espectro de massas EM/EM, por *electrospray*, da substância **1** – colisão 16, modo negativo

Figura 23 - Espectro de massas, por *electrospray*, da substância **2** – cone 30, modo negativo

Figura 24 - Espectro de massas, por *electrospray*, da substância **3** – cone 30, modo negativo

4.1.1.2. Identificação do núcleo purínico 4 (hipoxantina) e dos nucleosídeos purínicos 5, 6, 7 e 8 (2'- deoxiinosina, 2'-deoxiguanosina, guanosina e adenosina)

Analisando-se os espectros de RMN ^1H das substâncias **4**, **5** e **8** (Figs. 25, 26 e 29, pp. 90, 91 e 94), nota-se inicialmente dois singletos, em δ 7,97 e δ 8,11 para **4**, em δ 8,06 e δ 8,30 para **5** e em δ 8,14 e δ 8,36 para **8**, característicos dos hidrogênios aromáticos de nucleosídeos purínicos, e que foram atribuídos aos hidrogênios H-2 e H-8, respectivamente. Para as substâncias **6** e **7**, foram observados um singlete em δ 7,87 para **6** e em δ 7,93 para **7** (Figs. 27 e 28, pp. 92 e 93) atribuídos aos hidrogênios H-8.

Observa-se também nestes espectros a presença de um tripleto centrado em δ 6,31 e δ 6,19 para as substâncias **5** e **6**, respectivamente, que foram atribuídos aos hidrogênios anoméricos (H-1') de uma unidade de deoxi-ribose. Para as substâncias **7** e **8**, devido à presença da hidroxila em C-2', foram observados um dubleto centrado em δ 5,68 para **7** e em δ 5,88 para **8** atribuídos ao hidrogênios H-1'.

No espectro de DEPT 135° da substância **6** (Fig. 32, p. 97) foram observados os sinais relativos aos carbonos da unidade de açúcar, notando-se a presença de

dois sinais de carbonos metilênicos, em δ 39,1 e δ 62,1, correspondentes aos carbonos C-2' e C-5' e três sinais de carbonos metínicos, em δ 71,6, δ 84,4 e δ 87,6, atribuídos aos carbonos C-3', C-1' e C-4', respectivamente, mostrando coerência com a estrutura proposta.

Por meio do experimento COSY ^1H - ^1H (Fig. 33, p. 98), foi possível atribuir os sinais relativos aos hidrogênios da deoxi-ribose da substância **6**. Partindo-se do sinal referente ao hidrogênio anomérico (H-1'), pode-se ver sua correlação com o hidrogênio H-2'; partindo-se de H-2', observa-se sua correlação com H-1' e H-3'; este correlaciona-se com H-2' e H-4' e assim por diante.

Através do experimento HMQC (Fig. 34, p. 99), que mostra a correlação ^{13}C - ^1H , foi possível atribuir os deslocamentos químicos de todos os carbonos da deoxi-ribose e dos carbonos C-2 e C-8 da porção aglicona da substância **5**. Para a substância **6** foi possível atribuir os deslocamentos químicos dos carbonos C-1', C-2', C-3' e C-5' da deoxi-ribose a partir do experimento HMQC (Fig. 35, p. 100). Para a substância **7**, através do experimento HMQC (Fig. 36, p. 101), foi possível atribuir os deslocamentos químicos de todos os carbonos da ribose e do carbono C-8 da porção aglicona. Finalmente para a substância **8**, o experimento HMQC (Fig. 37, p. 102), possibilitou a atribuição dos deslocamentos químicos de todos os carbonos da ribose e dos carbonos C-2 e C-8 da porção aglicona.

Através do espectro de HMBC da substância **5** (Fig. 38, p. 103), que mostra a correlação ^{13}C - ^1H a longa distância, foi possível atribuir os deslocamentos químicos dos carbonos C-4, C-5 e C-6 da porção aglicona. Para a substância **6** também foi possível atribuir os deslocamentos químicos de C-4, C-5 e também C-8 a partir desse mesmo experimento (Fig. 39, p. 104). Enquanto que através do espectro de HMBC da substância **7** (Fig. 40, p. 105) foi possível atribuir os deslocamentos químicos dos carbonos C-4 e C-5 da porção aglicona. Para a substância **8**, através do espectro de HMBC (Fig. 41, p. 106), foi possível atribuir os deslocamentos químicos dos carbonos C-4, C-5 e C-6 da porção aglicona.

No espectro de massas da substância **4** (Fig. 42, p. 107) foi observado o íon m/z 135 $[\text{M}-\text{H}]^-$. Sendo 136 o peso molecular da hipoxantina, este dado está condizente com o esperado para esta substância. No espectro de massas da substância **5** (Fig. 43, p. 108) foram observados os íons m/z 251 $[\text{M}-\text{H}]^-$ e m/z 287 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$. Além disso, o espectro de massas EM/EM do íon m/z 251 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (Fig. 44, p. 109) apresentou o íon m/z 135, indicando a perda da deoxi-ribose da molécula.

Sendo 252 o peso molecular da 2'-deoxiinosina, estes dados estão condizentes com o esperado para esta substância. No espectro de massas da substância **6** (Fig. 45, p. 110) foram observados os íons m/z 266 $[M-H]^-$ e m/z 302 $[M+Cl]^-$. Sendo 267 o peso molecular da 2'-deoxiguanosina, estes dados estão condizentes com o esperado para esta substância. No espectro de massas da substância **7** (Fig. 46, p. 111) foram observados os íons m/z 284 $[M+H]^+$, m/z 306 $[M+Na]^+$ e m/z 322 $[M+K]^+$. Sendo 283 o peso molecular da guanosina, estes dados estão condizentes com o esperado para esta substância. No espectro de massas da substância **8** (Fig. 47, p. 112) foram observados os íons m/z 268 $[M+H]^+$ e m/z 306 $[M+K]^+$. Sendo 267 o peso molecular da adenosina, estes dados estão condizentes com o esperado para esta substância.

A análise dos dados espectroscópicos em conjunto (Tabs. 35 a 38, pp. 86 a 89) e sua comparação com dados da literatura (DEMATTE *et al.*, 1985; POUCHERT; BEHNKE, 1993; CHANG; GOMES; BYRN, 1983) confirmaram que a substância **4** trata-se do núcleo purínico hipoxantina, a substância **5** trata-se do nucleosídeo 2'-deoxiinosina, a substância **6**, 2'-deoxiguanosina, a substância **7**, guanosina e a substância **8**, adenosina.

Estas substâncias já foram isoladas anteriormente de outros organismos marinhos: Demattè *et al.* (1985) encontraram 2'-deoxiinosina e hipoxantina na ascídia *Trididemnum cereum*; Lidgren, Bohlin e Christophersen (1988) isolaram adenosina da esponja *Geodia baretii*; Anthoni *et al.* (1989) encontraram 2'-deoxiguanosina nos briozoários marinhos *Cellaria* spp.; Kim *et al.* (1993) isolaram 2'-deoxiinosina da ascídia *Aplidium pantherinum*; König e Wright (1999) também encontraram 2'-deoxiinosina na esponja *Carteriospongia* sp; Hayat *et al.* (2002) identificaram 2'-deoxiinosina na alga marrom *Spatoglossum variabile*; Nechev *et al.* (2002a) encontraram hipoxantina na esponja *Verongia aerophoba*; Schupp *et al.* (2003) isolaram adenosina da ascídia *Eudistoma* sp. e Nechev *et al.* (2004) identificaram hipoxantina e adenosina na esponja *Hymeniacidon sanguinea*.

Tabela 35 – Dados de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (obtidos dos espectros de HMQC e HMBC) e HMBC da substância **5** (2'- deoxiinosina) em DMSO- d_6 e comparação com dados da literatura

Posição	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}	HMBC	literatura	
				δ_{H} (J em Hz)*	$\delta_{\text{C}}^{\dagger}$
2	8,06 s (1H)	145	C-4 e C-6	8,30 s (1H) ‡	145,65
4	-	147	-	-	147,71
5	-	124	-	-	124,24
6	-	156	-	-	156,44
8	8,30 s (1H)	138	C-4 e C-5	8,06 s (1H) ‡	138,38
1'	6,31 t (J=6,8; 1H)	83	C-4, C-8, C-3' e C-4'	6,31 dd (J=6,9, 6,9; 1H)	83,44
2'A	2,63 m (1H)	39	C-1', C-3' e C-4'	2,20 m (2H)	39,67
2'B	2,29 m (1H)	39	C-3' e C-4'	2,20 m (2H)	39,67
3'	4,38 m (1H)	70	C-1'	4,35 m (1H)	70,53
4'	3,86 m (1H)	87	C-3'	3,3 - 4,2 m (3H)	87,81
5'A	3,59 dd ($J_{5'A-4'}=4,6$; $J_{5'A-5'B}=11,7$; 1H)	61	C-3' e C-4'	3,3 - 4,2 m (3H)	61,48
5'B	3,51 dd ($J_{5'B-4'}=4,4$; $J_{5'B-5'A}=11,6$; 1H)	61	C-3' e C-4'	3,3 - 4,2 m (3H)	61,48

* Demattè *et al.*, 1985 (80 MHz, DMSO- d_6)

† Pouchert e Behnke, 1993 (75 MHz, DMSO- d_6)

‡ podem estar trocados

Tabela 36 – Dados de RMN ^1H (400 MHz), RMN ^{13}C (100 MHz) COSY ^1H - ^1H e HMBC da substância **6** (2'- deoxiguanosina) em D_2O e comparação com dados da literatura

Posição	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}	COSY ^1H - ^1H	HMBC	δ_{C} (literatura*)
4	-	151,9	-	-	150,69
5	-	116,4	-	-	116,47
8	7,87 s (1H)	137,8	-	C-4 e C-5	135,10
1'	6,19 t ($J=6,8$; 1H)	84,4	H-2'A e H-2'B	C-4 e C-8	82,41
2'A	2,68 m (1H)	39,1	H-1', H-2'B e H-3'	C-1' e C-3'	39,44
2'B	2,40 m (1H)	39,1	H-1', H-2'A e H-3'	-	39,44
3'	4,51 m (1H)	71,6	H-2'A, H-2'B e H-4'	-	70,59
4'	4,02 m (1H)	87,6	H-3' e H-5'	-	87,41
5'A	3,71 dd ($J_{5'A-4'}=3,8$; $J_{5'A-5'B}=12,5$; 1H)	62,1	H-4'	-	61,56
5'B	3,65 dd ($J_{5'B-4'}=4,6$; $J_{5'B-5'A}=12,5$; 1H)	62,1	H-4'	-	61,56

* Pouchert e Behnke, 1993 (dados em DMSO-d_6)

Tabela 37 – Dados de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (obtidos dos espectros de HMQC e HMBC) e HMBC da substância **7** (guanosina) em DMSO- d_6 e comparação com dados da literatura

Posição	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}	HMBC	δ_{C} (literatura*)
4	-	151,8	-	151,14
5	-	117,1	-	116,44
8	7,93 s (1H)	135,7	C-4 e C-5	135,48
1'	5,68 d ($J=5,8$; 1H)	86,2	C-8 e C-2'	86,17
2'	4,39 sl (1H)	73,7	-	73,54
3'	4,08 sl (1H)	70,1	-	70,23
4'	3,87 d ($J=3,7$; 1H)	85,1	-	85,05
5'	3,59 m (2H)	61,0	-	61,24
NH ₂	6,54 sl (2H)	-	-	-

*Pouchert e Behnke, 1993 (dados em DMSO- d_6)

Tabela 38 – Dados de RMN ^1H (400 MHz), ^{13}C e HMBC da substância **8** (adenosina) em DMSO- d_6 e comparação com dados da literatura

Posição	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}	HMBC	δ_{C} (literatura*)
2	8,14 s (1H)	152,4	C-4, C-5 e C-6	150,96
4	-	149,1	-	1470,43
5	-	119,3	-	121,70
6	-	156,1	-	152,71
8	8,36 s (1H)	139,9	C-1', C-2, C-4, C-5 e C-6	145,76
1'	5,88 d ($J=6,3$; 1H)	87,9	C-4, C-8, C-2', C-3' e C-4'	91,53
2'	4,61 sl (1H)	73,5	C-1' e C-4'	77,15
3'	4,15 sl (1H)	70,6	C-1'	73,05
4'	3,97 m (1H)	85,9	C-3'	88,42
5'A	3,67 d ($J=12,3$; 1H)	61,7	C-3' e C-4'	64,03
5'B	3,55 d ($J=12,3$; 1H)	61,7	C-3'	64,03
NH ₂	7,36 s (2H)	-	-	-

* Pouchert & Behnke, 1993 (75 MHz, D₂O + DCI)

Figura 25 - Espectro de RMN ^1H da substância 4 – 400 MHz, DMSO-d_6

Figura 26 - Espectro de RMN ^1H da substância **5** – 400 MHz, DMSO-d_6

Figura 27 - Espectro de RMN ^1H da substância **6** – 400 MHz, D_2O

Figura 28 - Espectro de RMN ^1H da substância **7** – 500 MHz, DMSO- d_6

Figura 29 - Espectro de RMN ^1H da substância **8** – 400 MHz, DMSO-d_6

Figura 30 - Espectro de RMN ^{13}C da substância **6** – 100 MHz, D_2O

Figura 31 - Espectro de RMN ^{13}C da substância 8 – 125 MHz, DMSO-d_6

Figura 32 - Espectro de RMN ^{13}C (DEPT-135°) da substância **6** – 100 MHz, D_2O

Figura 33 - Espectro bidimensional ($\text{COSY } ^1\text{H}-^1\text{H}$) da substância 6 – 500 MHz, D_2O

Figura 34 - Espectro bidimensional (HMQC) da substância **5** – 500 MHz, DMSO-d₆

Figura 35 - Espectro bidimensional (HMQC) da substância **6** – 500 MHz, D_2O

Figura 36 - Espectro bidimensional (HMQC) da substância **7** – 500 MHz, DMSO- d_6

Figura 37 - Espectro bidimensional (HMQC) da substância **8** – 500 MHz, DMSO-d₆

Figura 38 - Espectro bidimensional (HMBC) da substância **5** – 500 MHz, DMSO-d₆

Figura 39 - Espectro bidimensional (HMBC) da substância **6** – 500 MHz, D₂O

Figura 40 - Espectro bidimensional (HMBC) da substância **7** – 500 MHz, DMSO-d_6

Figura 41 - Espectro bidimensional (HMBC) da substância **8** – 500 MHz, DMSO-d₆

Figura 42 - Espectro de massas, por *electrospray*, da substância **4** – cone 30, modo negativo

Figura 43 - Espectro de massas, por *electrospray*, da substância **5** – cone 30, modo negativo

Figura 44 - Espectro de massas EM/EM, por *electrospray*, da substância **5** – colisão 20, modo negativo

Figura 45 - Espectro de massas, por *electrospray*, da substância **6** – cone 30, modo negativo

Figura 46 - Espectro de massas, por *electrospray*, da substância **7**, modo positivo

Figura 47 - Espectro de massas, por *electrospray*, da substância **8** – cone 20, modo positivo

4.1.2. Identificação dos esteróides (9, 10, 11 e 12)

A partir do extrato metanólico de *D. psammátodes*, coletado em Icapuí (CE), foram identificados três esteróides em mistura: colestanol, colestanona e estigmasterol. Do extrato metanólico de *D. psammátodes*, coletado em Trairi (CE), foram encontrados colestanol e colestanona. Do extrato metanólico de *E. vannamei* foram identificados colestanol, colestanona e colesterol.

As amostras DPI-2.3 (**9** + **10** + **11**), proveniente do extrato metanólico de *D. psammátodes*, coletado em Icapuí (CE), DPT-1.5 (**9** + **10**), proveniente do extrato metanólico de *D. psammátodes*, coletado em Trairi (CE), e EV-1.9 (**9** + **10** + **12**), proveniente do extrato metanólico de *E. vannamei* foram analisadas através de CG/EM (Figs. 48 a 57, pp. 116 a 119).

Através da análise dos espectros de massas (Figs. 49 a 51, pp. 116 a 117) obtidos a partir dos componentes apresentados no cromatograma da amostra DPI-2.3 (Fig. 48, p. 116) foram identificados os esteróides colestanol, colestanona e estigmasterol. Isto foi possível após a comparação dos espectros de massas da amostra com espectros do banco de padrões existente no programa do cromatógrafo. Foi observado que o componente majoritário na mistura foi o

colestanol, seguido pela colestanona, sendo que o estigmasterol foi encontrado em pequena quantidade nesta amostra.

No espectro de massas correspondente ao componente com tempo de retenção 22,437 min. foi observado íon molecular m/z 388, sendo o peso molecular do colestanol 388, pode-se concluir pela presença deste na amostra.

O espectro de massas correspondente ao componente com tempo de retenção 22,938 min. apresentou íon molecular m/z 386, como o peso molecular da colestanona é 386, pode-se concluir também pela presença desta na amostra.

No espectro de massas correspondente ao componente com tempo de retenção 24,708 min. observou-se íon molecular 412, sendo o peso molecular do estigmasterol 412, pode-se concluir pela presença dele na amostra.

Na Tab. 39 (p. 115) estão indicados os tempos de retenção, o peso molecular e os percentuais encontrados de cada componente na amostra DPI-2.3.

A comparação dos espectros de massas (Figs. 53 e 54, pp. 117 e 118) obtidos a partir dos componentes majoritários presentes no cromatograma (Fig. 52, p. 117) da amostra DPT-1.5 com o banco de padrões do programa permitiu a identificação dos esteróides colestanol e colestanona, presentes também na amostra DPI-2.3. Novamente observou-se que o colestanol foi o componente majoritário na mistura.

No espectro de massas correspondente ao componente de tempo de retenção 22,439 min. foi observado íon molecular m/z 388, sendo o peso molecular do colestanol 388, pode-se concluir pela presença deste na amostra.

O espectro de massas correspondente ao componente de tempo de retenção 22,939 min. apresentou íon molecular m/z 386, como o peso molecular da colestanona é 386, pode-se concluir também, pela presença desta na amostra.

Na Tab. 40 (p. 115) estão indicados os tempos de retenção, o peso molecular e os percentuais encontrados de cada componente na amostra DPT-1.5.

Através da análise dos espectros de massas (Figs. 56 e 57, pp. 118 e 119) obtidos a partir dos componentes principais observados no cromatograma da amostra EV-1.9 (Fig. 55, p. 118) foram identificados os esteróides colesterol e colestanol. Isto foi possível após a comparação dos espectros da amostra com espectros do banco de padrões. Foi observado que o componente majoritário na mistura foi novamente o colestanol, presente também nas amostras DPI-2.3 e DPT-1.5.

No espectro de massas correspondente ao componente de tempo de retenção 22,303 min. foi observado íon molecular m/z 386, sendo o peso molecular do colesterol 386, pode-se concluir pela presença deste na amostra.

O espectro de massas correspondente ao componente de tempo de retenção 22,449 min. apresentou íon molecular m/z 388, como o peso molecular do colestanol é 388, pode-se concluir também pela presença desta na amostra.

Na Tab. 41 estão indicados os tempos de retenção, o peso molecular e as quantidades encontradas de cada componente na amostra EV-1.9.

Diversas espécies de ascídias já foram analisadas quanto ao conteúdo de esteróides e mostraram conter misturas com colesterol como componente majoritário (KLJAJIC; DOGOVIC; GASIC, 1983; D' AURIA; MINALE; RICCIO, 1993; PALERMO *et al.*; 1996). O colestanol também já foi encontrado em ascídias, sendo que Zelnik *et al.* (1981) identificou na túnica da ascídia *Ascidia nigra*; Kljajic, Dogovic e Gasic (1983) encontraram na ascídia *Microcosmus sulcatus*; Palermo *et al.* (1996) identificaram na ascídia *Polizoa opuntia* e Slantchev *et al.* (2002) encontraram nas ascídias *Styela* sp. e *Phallusia* sp. A colestanona foi identificada por Slantchev *et al.* (2002) na ascídia *Styela* sp. Já a presença de esteróides vegetais, como estigmasterol, em ascídias pode ser proveniente de fontes dietéticas planctônicas por serem animais filtradores (ZELNIK *et al.*, 1981; PALERMO *et al.*, 1996) ou podem ser provenientes de simbioses (PALERMO *et al.*, 1996).

Tabela 39 - Identificação dos constituintes químicos de DPI-2.3

Esteróides	Tempo de retenção (min)	M ⁺	%
colestanol	22,437	388	43,51
colestanona	22,938	386	18,81
estigmasterol	24,708	412	2,15

Tabela 40 - Identificação dos constituintes químicos de DPT-1.5

Esteróides	Tempo de retenção (min)	M ⁺	%
colestanol	22,439	388	69,68
colestanona	22,939	386	30,32

Tabela 41 - Identificação dos constituintes químicos de EV-1.9

Esteróides	Tempo de retenção (min)	M ⁺	%
colesterol	22,303	386	33,91
colestanol	22,449	388	66,09

Figura 48 - Cromatograma (CG) da amostra DPI-2.3 **Figura 49** - Espectro de massas do componente de tempo de retenção 22,437 min. (colestanol) da amostra DPI-2.3 **Figura 50** - Espectro de massas do componente de tempo de retenção 22,938 min. (colestano) da amostra DPI-2.3

Figura 51 - Espectro de massas do componente de tempo de retenção 24,708 min. (estigmasterol) da amostra DPI-2.3

Figura 52 - Cromatograma (CG) da amostra DPT-1.5

Figura 53 - Espectro de massas do componente de tempo de retenção 22,439 min. (colesterol) da amostra DPT-1.5

Figura 54 - Espectro de massas do componente de tempo de retenção 22,939 min. (colestanona) da amostra DPT-1.5

Figura 55 - Cromatograma (CG) da amostra EV-1.9

Figura 56 - Espectro de massas do componente de tempo de retenção 22,303 min. (colesterol) da amostra EV-1.9

Figura 57 - Espectro de massas do componente de tempo de retenção 22,449 min. (colestanol) da amostra EV-1.9

4.1.3. Identificação dos ácidos graxos metilados (13, 14, 15, 16 e 17)

A partir do extrato metanólico de *D. psammatoedes*, coletado em Trairi (CE), foram identificados três ácidos graxos metilados em mistura: miristato de metila (14:0), palmitato de metila (16:0) e estearato de metila (18:0). Do extrato metanólico de *E. vannamei* foram encontrados além desses três ácidos graxos metilados, também o palmitoleato de metila e oleato de metila.

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOMe}$ – miristato de metila (**13**)

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOMe}$ – palmitato de metila (**14**)

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOMe}$ – estearato de metila (**15**)

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOMe}$ – palmitoleato de metila (**16**)

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOMe}$ – oleato de metila (**17**)

As amostras DPT-1.2 (**13** + **14** + **15**), proveniente da fase hexânica do extrato metanólico de *D. psammatoedes* e EV-1.3 (**13** + **14** + **15** + **16** + **17**), proveniente da fase hexânica do extrato metanólico de *E. vannamei* foram analisadas através de métodos espectroscópicos de RMN ^1H (Fig. 58, p. 122) e ^{13}C (Fig. 59, p. 123) e CG (Figs. 60 e 61, pp. 124 e 125).

Analisando-se o espectro de RMN ^1H , nota-se um singlete largo em δ 1,25, o qual foi atribuído aos grupos metilênicos. Observa-se também neste espectro a presença de um tripleto centrado em δ 0,88, correspondente à uma metila terminal. O tripleto desblindado em δ 2,30 foi atribuído ao CH_2 ligado diretamente à carbonila e o multipeto em δ 1,61 a CH_2 ligado ao grupo metileno vizinho à carbonila. Finalmente, o singlete em δ 3,66 corresponde à metila do grupamento éster.

No espectro de RMN ^{13}C , foi possível observar a presença de apenas 13 sinais, sendo o sinal em δ 174,4 atribuído à carbonila do éster, em δ 51,4 à metila do éster, em δ 14,1 à metila terminal e os demais sinais pertencentes aos grupos metilênicos, mostrando coerência com os dados observados na literatura (POUCHERT; BEHNKE, 1993).

Através da análise da amostra DPT-1.2 com a coluna HP-inowax foram identificados os ácidos graxos metilados: miristato de metila, palmitato de metila e estearato de metila. Na amostra EV-1.3, foram identificados além dessas três

substâncias, o palmitoleato de metila e oleato de metila, utilizando-se a mesma coluna. Isto foi possível após a comparação dos tempos de retenção relativos obtidos para a amostra com os tempos de retenção relativos obtidos para os padrões de ácidos graxos metilados (Tabs. 42 e 43).

Essas substâncias já foram encontradas anteriormente em outros organismos marinhos: De Rosa *et al.* (2001) identificaram miristato de metila, palmitato de metila, palmitoleato de metila, estearato de metila e oleato de metila na alga *Polysiphonia denudata f. fragilis*; Nechev *et al.* (2002b) encontraram miristato de metila, palmitato de metila e estearato de metila na esponja *Chondrosia reniformis*; De Rosa *et al.* (2003a) também identificaram miristato de metila, palmitato de metila, estearato de metila e oleato de metila na alga *Corallina granifera* e Nechev *et al.* (2004) encontraram palmitato de metila na esponja *Hymeniacidon sanguinea*.

Tabela 42 - Identificação dos constituintes químicos de DPT-1.2 por CG

	tempo de retenção (min)		(tempo de retenção relativo)*	
	padrões	amostra	Padrões	amostra
miristato de metila	7,830	7,835	0,761	0,760
palmitato de metila	9,286	9,304	0,903	0,903
estearato de metila	11,593	11,608	1,127	1,127

* tempo de retenção da amostra/tempo de retenção do padrão (heptadecanoato de metila: tempo de retenção = 10,285 min → padrões, heptadecanoato de metila: tempo de retenção = 10,302 min → amostra)

Tabela 43 - Identificação dos constituintes químicos de EV-1.3 por CG

	tempo de retenção (min)		(tempo de retenção relativo)*	
	padrões	amostra	Padrões	amostra
miristato de metila	7,831	7,831	0,760	0,761
palmitato de metila	9,285	9,297	0,902	0,903
palmitoleato de metila	9,553	9,560	0,928	0,928
estearato de metila	11,610	11,612	1,128	1,128
oleato de metila	11,952	11,954	1,161	1,161

* tempo de retenção da amostra/tempo de retenção do padrão (heptadecanoato de metila: tempo de retenção = 10,294 min → padrões, heptadecanoato de metila: tempo de retenção = 10,295 min → amostra)

Figura 58 - Espectro de RMN ^1H da amostra DPT-1.2 – 400 MHz, CDCl_3

Figura 59 - Espectro de RMN ^{13}C da amostra DPT-1.2 – 100 MHz, CDCl_3

Figura 60 - a.) Cromatograma dos padrões de ácidos graxos metilados
b.) Cromatograma da amostra DPT-1.2

Figura 61 - a.) Cromatograma dos padrões de ácidos graxos metilados
b.) Cromatograma da amostra EV-1.3

4.1.4. Identificação dos ácidos graxos (18, 19, 20, 21, 22 e 23)

A partir da fase hexânica do extrato metanólico de *D. psammatores*, coletado em Trairi (CE) (DPT-1.7.3), foram identificados dois ácidos graxos em mistura: ácido palmítico (16:0) e ácido esteárico (18:0). Da fase clorofórmica do extrato metanólico de *D. psammatores*, coletado em Trairi (CE) (DPTFC-3.4), foram encontrados ácido láurico (12:0), ácido mirístico (14:0), ácido pentadecanóico (15:0), ácido palmítico (16:0), ácido margárico (17:0) e ácido esteárico (18:0). Da fase hexânica do extrato metanólico de *E. vannamei* (EV-1.2) foram identificados ácido mirístico (14:0), ácido pentadecanóico (15:0), ácido palmítico (16:0), ácido margárico (17:0) e ácido esteárico (18:0).

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$ – ácido láurico (**18**)

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$ – ácido mirístico (**19**)

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$ – ácido pentadecanóico (**20**)

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$ – ácido palmítico (**21**)

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{COOH}$ – ácido margárico (**22**)

$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$ – ácido esteárico (**23**)

A amostra DPT-1.7.3 (**21** + **23**), proveniente da fase hexânica do extrato metanólico de *D. psammatores*, foi analisada através de espectroscopia de absorção na região do IV (Fig. 65, p. 132), métodos espectroscópicos de RMN ^1H (Fig. 66, p. 133) e ^{13}C (Fig. 67, p. 134) e espectrometria de massas (Fig. 68, p. 135).

Observando-se o espectro de absorção na região do IV, notam-se as deformações características de ácidos carboxílicos: deformação axial de ligação O-H associado, larga, de 3300 a 2500 cm^{-1} ; sobrepondo-se à banda de absorção de ligação C-H; deformação axial de C-H em 2917 e 2849 cm^{-1} ; deformação axial de C=O associado em 1705 cm^{-1} e a deformação angular fora do plano de O-H em 940 cm^{-1} .

Analisando-se o espectro de RMN ^1H , nota-se um singleto largo em δ 1,25, o qual foi atribuído aos grupos metilênicos. Observa-se também neste espectro a presença de um tripleto em δ 0,87, correspondente à metila terminal. O tripleto

desblindado em δ 2,34 foi atribuído ao CH_2 ligado diretamente à carbonila e o quinteto em δ 1,62 ao CH_2 ligado ao grupo metileno vizinho à carbonila.

No espectro de RMN ^{13}C , foi possível observar a presença de apenas 12 sinais, sendo o sinal em δ 179,4 atribuído à carbonila do ácido, em δ 14,13 à metila terminal e os demais sinais pertencentes aos grupos metilênicos, mostrando coerência com os dados observados na literatura (POUCHERT; BEHNKE, 1993).

No espectro de massas foram observados os íons m/z 255 $[\text{M}-\text{H}]^-$ para o ácido palmítico e o íon m/z 283 $[\text{M}-\text{H}]^-$ para o ácido esteárico. Sendo 256 o peso molecular do ácido palmítico e 284 do ácido esteárico, estes dados estão condizentes com o esperado para estas substâncias.

Através da análise dos espectros de massas (Figs. 70 a 75, pp. 136 a 137) obtidos a partir dos componentes majoritários observados no cromatograma (Fig. 69, p. 136) da amostra DPTFC-3.4, proveniente da fase clorofórmica do extrato metanólico de *D. psammatores*, após reação de metilação, foram identificados os ácidos graxos ácido láurico, ácido mirístico, ácido pentadecanóico, ácido palmítico, ácido margárico e ácido esteárico, todos na forma esterificada. Isto foi possível após a comparação dos espectros da amostra com espectros do banco de padrões existente no programa do cromatógrafo. Foi observado que o componente majoritário na mistura foi o ácido palmítico.

No espectro de massas correspondente ao componente com tempo de retenção 9,350 min. foi observado íon molecular m/z 214, sendo o peso molecular do ácido láurico 214, pode-se confirmar a presença deste na amostra.

O espectro de massas correspondente ao componente com tempo de retenção 12,175 min. apresentou íon molecular m/z 242, como o peso molecular do ácido mirístico é 242, pode-se afirmar também a presença deste na amostra.

No espectro de massas referente ao componente com tempo de retenção 13,697 min. observou-se íon molecular 256, sendo o peso molecular do ácido pentadecanóico 256, pode-se confirmar a presença dele na amostra.

O espectro de massas referente ao componente com tempo de retenção 15,701 min. apresentou íon molecular m/z 270, como o peso molecular do ácido palmítico é 256, pode-se afirmar também a presença deste na amostra.

No espectro de massas correspondente ao componente com tempo de retenção 18,411 min. observou-se íon molecular 284, sendo o peso molecular do ácido margárico 284, pode-se confirmar a presença dele na amostra.

O espectro de massas correspondente ao componente com tempo de retenção 22,239 min. apresentou íon molecular m/z 298, como o peso molecular do ácido esteárico é 298, pode-se afirmar também a presença deste na amostra.

As substâncias referentes aos componentes com tempo de retenção 13,107 e 15,149 min., provavelmente, são ácidos graxos ramificados com tamanho de cadeia carbônica próximo àqueles lineares que foram identificados na amostra. Devido à semelhança entre os espectros de massas de vários ácidos graxos ramificados, sua identificação não pode ser concluída.

Na Tab. 44 (p. 131) estão indicados os tempos de retenção, o peso molecular e as percentagens relativas encontradas de cada componente na amostra DPTFC-3.4.

A comparação dos espectros de massas (Figs. 77 a 81, pp. 138 a 139) obtidos a partir dos componentes majoritários do cromatograma (Fig. 76, p. 138) da amostra EV-1.12, proveniente da fase hexânica do extrato metanólico de *E. vannamei*, com o banco de padrões do programa permitiu a identificação dos seguintes ácidos graxos ácido mirístico, ácido pentadecanóico, ácido palmítico, ácido margárico e ácido esteárico, todos na forma esterificada, após reação de metilação. Novamente o ácido palmítico foi o componente majoritário na mistura.

O espectro de massas correspondente ao componente de tempo de retenção 12,182 min. apresentou íon molecular m/z 242, como o peso molecular do ácido mirístico é 242, pode-se concluir também pela presença deste na amostra.

No espectro de massas correspondente ao componente de tempo de retenção 13,705 min. observou-se íon molecular 256, sendo o peso molecular do ácido pentadecanóico 256, pode-se concluir pela presença dele na amostra.

O espectro de massas referente ao componente de tempo de retenção 15,701 min. apresentou íon molecular m/z 270, como o peso molecular do ácido palmítico é 256, pode-se concluir também pela presença deste na amostra.

No espectro de massas referente ao componente de tempo de retenção 18,428 min. observou-se íon molecular 284, sendo o peso molecular do ácido margárico 284, pode-se concluir pela presença dele na amostra.

O espectro de massas correspondente ao componente de tempo de retenção 22,253 min. apresentou íon molecular m/z 298, como o peso molecular do ácido esteárico é 298, pode-se concluir também pela presença deste na amostra.

As substâncias referentes aos picos de tempo de retenção 13,116, 14,917 e 17,347 min., provavelmente, são ácidos graxos ramificados com tamanho de cadeia carbônica próximo àqueles lineares que foram identificados na amostra. Devido à semelhança entre os espectros de massas de vários ácidos graxos ramificados, não foi possível concluir suas identificações.

Além do íon molecular, também foram observados nos espectros de ambas amostras os íons $[M-31]^+$ e $[M-43]^+$, correspondentes às perdas $[M-OCH_3]$ e $[M-C_3H_7]$, respectivamente. Nota-se ainda a presença dos picos intensos m/z 74, m/z 87 e m/z 143, característicos de ácidos graxos metilados saturados, sendo que o pico mais intenso, m/z 74 é referente ao rearranjo de McLafferty (Figs. 62 - 64) (BUDZIKIEWICZ; DJERASSI; WILLIAMS, 1967).

Figura 62 – Mecanismo de fragmentação de ácidos graxos (perda de 43)

Figura 63 – Rearranjo de Mc Lafferty

Figura 64 – Mecanismo de fragmentação de ácidos graxos (formação dos íons m/z 87 e m/z 143)

Na Tab. 45 estão indicados os tempos de retenção, o peso molecular e as percentagens relativas encontradas de cada componente na amostra EV-1.12.

Essas substâncias já foram encontradas anteriormente em outras fontes marinhas: Parameswaran, Das e Kamat (1994) encontraram ácido palmítico e ácido esteárico na esponja *Haliclona* sp.; De Rosa *et al.* (2001) identificaram ácido mirístico e ácido palmítico nas algas *Polysiphonia denudata* e *Polysiphonia denudata f. fragilis*; Nechev *et al.* (2002a) encontraram ácido pentadecanóico e ácido palmítico na esponja *Verongia aerophoba*; Nechev *et al.* (2002b) também identificaram ácido mirístico, ácido pentadecanóico, ácido palmítico e ácido esteárico na esponja *Chondrosia reniformis*; De Rosa *et al.* (2002) encontraram ácido mirístico, ácido palmítico e ácido esteárico na esponja *Ircinia muscarum*; De Rosa *et al.* (2003a) também identificaram ácido láurico, ácido pentadecanóico e ácido margárico na alga *Corallina mediterranea* e ácido mirístico, ácido palmítico e ácido esteárico nas algas *Corallina mediterranea* e *Corallina granifera*; De Rosa *et al.* (2003b) também encontraram ácido palmítico e ácido esteárico na esponja *Suberites domuncula* e Nechev *et al.* (2004) identificaram ácido pentadecanóico, ácido palmítico e ácido esteárico na esponja *Hymeniacidon sanguinea*.

Tabela 44 - Identificação dos constituintes químicos de DPTFC-3.4

Ácidos graxos	Tempo de retenção (min)	M⁺	%
Ácido láurico	9,350	214	0,81
Ácido mirístico	12,175	242	16,30
Ácido pentadecanóico	13,697	256	4,13
Ácido palmítico	15,701	270	66,33
Ácido margárico	18,411	284	2,71
Ácido esteárico	22,239	298	6,06

Tabela 45 - Identificação dos constituintes químicos de EV-1.12

Ácidos graxos	Tempo de retenção (min)	M⁺	%
Ácido mirístico	12,182	242	3,70
Ácido pentadecanóico	13,705	256	2,73
Ácido palmítico	15,701	270	59,78
Ácido margárico	18,428	284	7,23
Ácido esteárico	22,253	298	14,72

Figura 65 - Espectro de absorção na região do IV da amostra DPT-1.7.3

Figura 66 - Espectro de RMN ^1H da amostra DPT-1.7.3 – 400 MHz, CDCl_3

Figura 67 - Espectro de RMN ^{13}C da amostra DPT-1.7.3 – 100 MHz, CDCl_3

Figura 68 - Espectro de massas, por *electrospray*, da amostra DPT-1.7.3 – cone 30, modo negativo

Figura 69 - Cromatograma (CG) da amostra DPTFC-3.4

Figura 70 - Espectro de massas do componente de tempo de retenção 9,350 min. (ácido láurico) da amostra DPTFC-3.4

Figura 71 - Espectro de massas do componente de tempo de retenção 12,175 min. (ácido mirístico) da amostra DPTFC-3.4

Figura 72 - Espectro de massas do componente de tempo de retenção 13,697 min. (ácido pentadecanóico) da amostra DPTFC-3.4

Figura 73 - Espectro de massas do componente de tempo de retenção 15,701 min. (ácido palmítico) da amostra DPTFC-3.4

Figura 74 - Espectro de massas do componente de tempo de retenção 18,411 min. (ácido margárico) da amostra DPTFC-3.4

Figura 75 - Espectro de massas do componente de tempo de retenção 22,239 min. (ácido esteárico) da amostra DPTFC-3.4

Figura 76 - Cromatograma (CG) da amostra EV-1.12

Figura 77 - Espectro de massas do componente de tempo de retenção 12,182 min. (ácido mirístico) da amostra EV-1.12

Figura 78 - Espectro de massas do componente de tempo de retenção 13,705 min. (ácido pentadecanóico) da amostra EV-1.12

Figura 79 - Espectro de massas do componente de tempo de retenção 15,701 min. (ácido palmítico) da amostra EV-1.12

Figura 80 - Espectro de massas do componente de tempo de retenção 18,428 min. (ácido margárico) da amostra EV-1.12

Figura 81 - Espectro de massas do componente de tempo de retenção 22,253 min. (ácido esteárico) da amostra EV-1.12

4.1.5. Identificação dos monoalquil glicerol éteres (24, 25 e 26)

A partir do extrato metanólico de *D. psammátodes* foram identificados três monoalquil glicerol éteres em mistura: 2,3-propanodiol, 1-heptadeciloxi; 2,3-propanodiol, 1-octadeciloxi (álcool batílico) e 2,3-propanodiol, 1-nonadeciloxi.

As amostras DPI-2.4.5 e DPT-1.10.7 (**24** + **25** + **26**), foram analisadas através de métodos espectroscópicos de RMN ^1H (Fig. 82, p. 143), ^{13}C (Fig. 83, p. 144) e DEPT 135° (Fig. 84, p. 145), técnicas bidimensionais como HMQC (Fig. 85, p. 146) e HMBC (Fig. 86, p. 147) e espectrometria de massas (Fig. 87, p. 148).

Analisando-se o espectro de RMN ^1H , nota-se inicialmente um singleto largo em δ 1,25, característico de grupos metilênicos e um tripleto em δ 0,88, de grupo metila terminal, sinais típicos de cadeia alifática longa. No espectro de RMN ^{13}C foi possível observar a presença de sinais metilênicos em torno de δ 29 e o sinal de CH_3 em δ 14,1, característicos de cadeia alifática longa.

Analisando-se os espectros de RMN ^1H e ^{13}C do álcool batílico e seus análogos 2,3-propanodiol, 1-heptadeciloxi e 2,3-propanodiol, 1-nonadeciloxi, nota-se inicialmente os sinais característicos do glicerol éter, como a presença de um multiplete em δ_{H} 3,86/ δ_{C} 70,5, atribuído ao grupo CH, o duplo dubleto em δ_{H} 3,72 e em δ_{H} 3,65/ δ_{C} 64,3, correspondente aos dois hidrogênios do grupo metilênico ligado à hidroxila e os multipletos em δ_{H} 3,52/ δ_{C} 72,5 e em δ_{H} 3,46/ δ_{C} 71,9, integrados, cada um para dois hidrogênios, foram atribuídos aos grupos metilênicos ligados ao oxigênio e aos grupos CH e CH_2 , respectivamente. As correlações do espectro de HMBC de H-1/C-1', C-2 e C-3 e H-1'/C-1 e C-2 mostraram evidências que a cadeia alifática saturada está ligada ao glicerol através da ligação éter.

Através do experimento HMQC, que mostra a correlação ^{13}C - ^1H , e HMBC, que mostra a correlação ^{13}C - ^1H a longa distância, foi possível atribuir os deslocamentos químicos dos carbonos mais desblindados, ligados ao oxigênio ou hidroxila.

No espectro de massas foram observados os íons m/z 311 $[M-H_2O]^-$ para o 2,3-propanodiol, 1-heptadeciloxi, m/z 325 $[M-H_2O]^-$ para o 2,3-propanodiol, 1-octadeciloxi (álcool batílico) e m/z 339 $[M-H_2O]^-$ para o 2,3-propanodiol, 1-nonadeciloxi. Sendo 330 o peso molecular do 2,3-propanodiol, 1-heptadeciloxi, 344 do 2,3-propanodiol, 1-octadeciloxi (álcool batílico) e 358 do 2,3-propanodiol, 1-nonadeciloxi, estes dados estão condizentes com o esperado para estas substâncias.

Vale ressaltar que no espectro de massas ainda foram observados indícios dos íons m/z 297 $[M-H_2O]^-$ do derivado $n=14$, m/z 353 $[M-H_2O]^-$ do derivado $n=18$ e m/z 395 $[M-H_2O]^-$ do derivado $n=20$ da mesma classe de substâncias, indicando a presença destes em menor quantidade na amostra.

A análise dos dados espectroscópicos em conjunto (Tab. 46, p. 142) e sua comparação com dados da literatura (CARDELINA II; GRADEN; GREER, 1983; POUCHERT; BEHNKE, 1993; HAN *et al.*, 2005) confirmaram que as amostras DPI-2.4.5 e DPT-1.10.7 continham as substâncias 2,3-propanodiol, 1-heptadeciloxi, 2,3-propanodiol, 1-octadeciloxi (álcool batílico) e 2,3-propanodiol, 1-nonadeciloxi.

O 2,3-propanodiol, 1-heptadeciloxi já foi encontrado anteriormente por Parameswaran, Das e Kamat (1994) na esponja *Haliclona* sp. O álcool batílico também já foi isolado anteriormente de outras fontes marinhas: Cardellina II, Graden e Greer (1983) encontraram esta substância na esponja *Ulosa ruetzleri*; Schmitz *et al.* (1983) isolaram da esponja *Tedania ignis*; Findlay *et al.* (1984) identificaram no pepino do mar *Cucumaria frondosa*; Raju *et al.* (1992) encontraram álcool batílico no coral *Sarcophyton subviride*; Subrahmanyam *et al.* (1992) isolaram do coral *Lobophytum* sp.; Parameswaran, Das e Kamat (1994) identificaram na esponja *Haliclona* sp; Anjaneyulu *et al.* (1997) também isolaram dos corais *Sinularia* spp; Mishra *et al.* (1997) identificaram na esponja *Suberites vestigium*; Anjaneyulu *et al.* (1999) encontraram álcool batílico no coral *Sinularia intacta*; Anjaneyulu *et al.* (2000) também isolaram do coral *Sarcophyton crassocaule*; Dong *et al.* (2000) encontraram no coral *Sarcophyton trocheliophorum* e Reddy e Dhananjaya (2000) isolaram da esponja *Mycale mytilorum*. O 2,3-propanodiol, 1-nonadeciloxi foi encontrado anteriormente por Mishra *et al.* (1997) na esponja *Suberites vestigium* e Han *et al.* (2005) isolaram do coral *Dendronephthya gigantea*.

Tabela 46 – Dados de RMN ^1H (400 MHz), ^{13}C (100 MHz) e HMBC da amostra DPT-1.10.7 em CDCl_3 e comparação com dados da literatura

Posição	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}	HMBC	literatura	
				δ_{H} (J em Hz)*	$\delta_{\text{C}}^\dagger$
1A	3,52 m (2H)	72,5	C-2, C-3A, C-3B e C-1'	3,54 dd ($J_{1\text{A}-2}=9,6$, $J_{1\text{A}-1\text{B}}=3,8$; 1H)	72,39
1B	3,52 m (2H)	72,5	C-2, C-3A, C-3B e C-1'	3,50 dd ($J_{1\text{B}-2}=9,6$, $J_{1\text{B}-1\text{A}}=5,6$; 1H)	72,39
2	3,86 m (1H)	70,5	C-3A e C-3B	3,86 m (1H)	70,59
3A	3,72 dd ($J_{3\text{A}-2}=3,8$; $J_{3\text{A}-3\text{B}}=11,4$; 1H)	64,3	C-1	3,73 dd ($J_{3\text{A}-2}=3,8$; $J_{3\text{A}-3\text{B}}=11,4$; 1H)	64,20
3B	3,65 dd ($J_{3\text{B}-2}=5,0$; $J_{3\text{B}-3\text{A}}=11,4$; 1H)	64,3	C-1	3,65 ($J_{3\text{B}-2}=5,6$; $J_{3\text{B}-3\text{A}}=11,4$; 1H)	64,20
1'	3,47 m (2H)	71,9	C-1, C-2 e C-3'	3,46 dt ($J=6,7$, 2,9; 2H)	71,83
2'	1,57 m	29,7	C-1' e C-3'	1,57 q ($J=6,8$; 2H)	29,71
3'	1,25 sl	26,1	-	1,26 sl (32 H)	26,09
4'-14' (24)	1,25 sl	29,3-29,7	-	-	-
4'-15' (25)	1,25 sl	29,3-29,7	-	-	29,38; 29,49; 29,64; 29,71
4'-16' (26)	1,25 sl	29,3-29,7	-	1,26 sl (32 H)	-
15' (24)	1,25 sl	31,9	-	-	-
16' (25)	1,25 sl	31,9	-	-	31,94
17' (26)	1,25 sl	31,9	-	1,26 sl (32 H)	-
16' (24)	1,25 sl	22,7	-	-	-
17' (25)	1,25 sl	22,7	-	-	22,70
18' (26)	1,25 sl	22,7	-	1,23 sl (30 H)	-
17' (24)	0,88 t ($J=6,8$)	14,1	C-15' e C-16'	-	-
18' (25)	0,88 t ($J=6,8$)	14,1	C-16' e C-17'	-	14,11
19' (26)	0,88 t ($J=6,8$)	14,1	C-17' e C-18'	0,88 m (3H)	-

* Han *et al.*, 2005 (2,3-propanodiol, 1-nonadeciloxi em CDCl_3 , 400 MHz)† Pouchert e Behnke, 1993 (álcool batílico em CDCl_3)

Figura 82 - Espectro de RMN ^1H da amostra DPT-1.10.7 – 400 MHz, CDCl_3

Figura 83 - Espectro de RMN ¹³C da amostra DPT-1.0.7 – 100 MHz, CDCl₃

Figura 84 - Espectro de RMN ^{13}C (DEPT-135°) da amostra DPT-1.10.7 – 100 MHz, CDCl_3

Figura 85 - Espectro bidimensional (HMQC) da amostra DPT-1.10.7 – 500 MHz, CDCl_3

Figura 86 - Espectro bidimensional (HMBC) da amostra DPT-1.10.7 – 500 MHz, CDCl₃

Figura 87 - Espectro de massas, por *electrospray*, da amostra DPT-1.10.7 – cone 30, modo negativo

4.2. Ensaios de citotoxicidade

Foram realizados ensaios em ovos de ouriço do mar e em células tumorais *in vitro*, com algumas frações e substâncias isoladas, quando encontravam-se em quantidade suficiente.

4.2.1. Potencial antimitótico em ovos de ouriço do mar *Lytechinus variegatus*

De acordo com ensaios realizados previamente (JIMENEZ *et al*, 2003), o extrato de *D. psammátodes* inibiu o desenvolvimento dos ovos de ouriço do mar a partir da primeira divisão, sendo observado valor de CI_{50} de 120,1 $\mu\text{g/mL}$. A observação dos embriões tratados, sob microscopia, revelou células não divididas com dois, quatro ou mais regiões nucleares, sugerindo a ocorrência de duplicação do núcleo sem divisão celular.

As frações provenientes da primeira partição realizada com o extrato metanólico de *D. psammátodes*, coletado em Trairi (CE), as substâncias isoladas destas frações e as substâncias isoladas do extrato metanólico de *D. psammátodes* coletado em Icapuí (CE), foram avaliadas quanto à atividade antiproliferativa (Tabs. 47 e 48, pp. 150 e 152 e Figs. 88 a 92, pp. 151 a 153). Devido a quantidade insuficiente de amostra para a realização do ensaio completo, foram utilizadas apenas duas concentrações, em triplicata, para análise, não sendo possível construir uma curva concentração-efeito e dela se extrair a CI_{50} para quantificação do efeito das amostras. O teste foi apenas qualitativo para verificar a ocorrência ou não da atividade.

As frações mais ativas do extrato metanólico de *D. psammátodes*, coletado em Trairi (CE), foram a hexânica na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$, que inibiu 84,82% de ovos normais na 1ª divisão e a clorofórmica na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$, inibindo 100% (efeito máximo) de ovos normais na 1ª divisão (Tab. 47, p. 150 e Fig. 88, p. 151). Quanto à fase blástula, as frações mais ativas foram a hexânica, na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$, inibindo 98,93% de ovos normais e a fase clorofórmica na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$, inibindo 100% (efeito máximo) de ovos normais, (Tab. 47, p. 150 e Fig. 89, p. 151).

Os ácidos graxos metilados (**13 + 14 + 15**), ácidos graxos (**21 + 23**) e monoalquil glicerol éteres (**24 + 25 + 26**) obtidos da fase hexânica do extrato metanólico de *D. psammátodes*, coletado em Trairi (CE), foram submetidos à avaliação da atividade citotóxica sobre ovos de ouriço do mar durante a fase da 1ª divisão. Os ácidos graxos metilados (**13 + 14 + 15**) mostraram ser mais ativos na concentração de 100 µg/mL, inibindo 99,59% das células. Os ácidos graxos (**21 + 23**) e monoalquil glicerol éteres (**24 + 25 + 26**) foram ativos apenas na concentração de 100 µg/mL, inibindo 96,30% e 99,38% das células na 1ª divisão (Tab. 48 e Fig. 90, p. 152). Com esses resultados, pode-se supor que a atividade citotóxica em ovos de ouriço do mar, observada na fase hexânica seja devido à presença dos ácidos graxos metilados (**13 + 14 + 15**).

Quanto às substâncias isoladas do extrato metanólico de *D. psammátodes*, coletado em Icapuí (CE), foi observada atividade apenas para **1** (2'-deoxiuridina) e **6** (2'-deoxiguanosina) na concentração de 100 µg/mL para ambas, inibindo 36,09% e 59,39% dos ovos normais na 1ª divisão, respectivamente (Tab. 48, p. 152 e Fig. 91, p. 153). Quanto à fase blástula, a substância **1** inibiu 30,70% e a substância **6**, 61,62% de ovos normais na concentração de 100 µg/mL (Tab. 48, p. 152 e Fig. 92, p. 153).

Tabela 47 – Atividade antiproliferativa das frações de *D. psammátodes*, coletado em Trairi (CE), sobre ovos de ouriço do mar

Frações	% de inibição			
	1ª divisão		blástula	
	100 µg/mL	500 µg/mL	100 µg/mL	500 µg/mL
hexânica	-3,10	84,82*	15,42*	98,93*
clorofórmica	18,08*	100,0*	35,32*	100,0*
butanólica	2,54	3,60	-2,34	-0,21
hidroalcoólica	10,66*	n.a.	0,14	n.a.

* p < 0,05; n.a. – não avaliado

Figura 88 - Atividade antiproliferativa das frações de *D. psammátodes*, coletado em Trairi (CE), sobre a 1ª divisão de ovos de ouriço do mar

Figura 89 - Atividade antiproliferativa das frações de *D. psammátodes*, coletado em Trairi (CE), sobre a fase de blástula de ovos de ouriço do mar

Tabela 48 – Atividade antiproliferativa das substâncias de *D. psammátodes*, coletado em Trairi (CE), sobre ovos de ouriço do mar

Substâncias	% de inibição			
	1ª divisão		blástula	
	10 µg/mL	100 µg/mL	10 µg/mL	100 µg/mL
1	-0,28	36,09*	4,40	30,70*
5	-0,28	-0,63	-0,21	2,98
6	2,18	59,39*	4,05	61,62*
9 + 10 + 11	-2,75	0,42	-1,27	2,63
13 + 14 + 15	12,76*	99,59*	n.a.	n.a.
21 + 23	-6,58	96,30*	n.a.	n.a.
24 + 25 + 26	10,49	99,38*	n.a.	n.a.

* $p < 0,05$; n.a. – não avaliado

Figura 90 - Atividade antiproliferativa das substâncias de *D. psammátodes*, coletado em Trairi (CE), sobre a 1ª divisão de ovos de ouriço do mar

Figura 91 – Atividade antiproliferativa das substâncias de *D. psammatores*, coletado em Icapuí (CE), sobre a 1ª divisão de ovos de ouriço do mar

Figura 92 – Atividade antiproliferativa das substâncias de *D. psammatores*, coletado em Icapuí (CE), sobre a fase blástula de ovos de ouriço do mar

De acordo com ensaios realizados previamente (JIMENEZ *et al*, 2003), o extrato de *E. vannamei* também exibiu forte efeito sobre ovos de ouriço do mar, principalmente após a fase blástula, apresentando valor de CI_{50} de 74,8 $\mu\text{g/mL}$. A observação microscópica destas células revelou a presença de anormalidades, sugerindo possível efeito teratogênico.

As fases hexânica e hidroalcoólica do extrato metanólico de *E. vannamei* foram avaliadas quanto à atividade citotóxica em ovos de ouriço do mar durante a fase de 1ª divisão (Tab. 49 e Fig. 93). Ambas as fases foram ativas apenas na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$, sendo que a fase hexânica inibiu 97,58% das células e a hidroalcoólica, 99,60%.

Tabela 49 – Atividade antiproliferativa das frações do extrato metanólico de *E. vannamei* sobre a 1ª divisão de ovos de ouriço do mar

Frações	% de inibição	
	100 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$
Hexânica	0,50	97,58*
Hidroalcoólica	-3,92	99,60*

* $p < 0,05$

Figura 93 - Atividade antiproliferativa das frações de *E. vannamei* sobre a 1ª divisão de ovos de ouriço do mar

4.2.2. Estudos em células tumorais *in vitro*

4.2.2.1. Ensaio do MTT

De acordo com ensaios realizados previamente (JIMENEZ *et al*, 2003), o extrato de *D. psammátodes* não foi ativo no intervalo de concentração (2-125 µg/mL) e nas linhagens celulares tumorais utilizadas (CEM, HL-60, B-16 e HCT-8).

As frações provenientes da primeira partição do extrato metanólico de *D. psammátodes*, coletado em Trairi (CE) foram avaliadas no intervalo de concentração de 1,56 - 100 µg/mL, observando-se atividade nas frações mais apolares: hexânica e clorofórmica (Tab. 50, p. 157), como ocorreu no ensaio com ovos de ouriço do mar, sendo que a fase hexânica foi mais ativa nas linhagens leucêmicas (CEM e HL-60) e a clorofórmica na linhagem B-16 (melanoma murino) e HL-60 (leucemia promielocítica).

As substâncias isoladas da fase hexânica da primeira partição do extrato metanólico de *D. psammátodes*, coletado em Trairi (CE), que apresentavam-se em quantidade suficiente para ensaio, também foram avaliadas no intervalo de concentração de 0,39 - 25 µg/mL para as linhagens B-16 e HCT-8 e de 1,56 - 100 µg/mL para as linhagens leucêmicas (Tab. 51, p. 158). A mistura de ácidos graxos (**21** + **23**) foi citotóxica apenas na linhagem leucêmica MOLT-4, com CI_{50} de 14,59 µg/mL, corroborando com os resultados apresentados por Harada *et al.* (2002), onde o ácido palmítico isolado da alga vermelha *Amphiroa zonata* foi ativo nas linhagens leucêmicas MOLT-4, HL-60, K-562 e Raji, com CI_{50} variando entre 10 - 15 µg/mL e 25 µg/mL para células WIL2-NS. A mistura de monoalquil glicerol éteres (**24** + **25** + **26**) foi ativa em todas as linhagens leucêmicas avaliadas, apresentando valores de CI_{50} variando entre 7,36 µg/mL para a linhagem celular MOLT-4 e 22,24 µg/mL para linhagem K-562. De acordo com Han *et al.* (2005) o 2,3-propanodiol, 1-nonadeciloxi (**26**) mostrou atividade citotóxica fraca em linhagens celulares A549 (carcinoma de pulmão), HT-29 (adenocarcinoma coloretal), HT-1080 (fibrosarcoma) e SNU-638 (adenocarcinoma de estômago), com valores de CI_{50} de 15,1, 14,5, 13,7 e 15,5 µg/mL, respectivamente. Porém, a mistura de ácidos graxos metilados (**13** + **14** + **15**) foi a mais ativa em todas as linhagens leucêmicas, apresentando valores de CI_{50}

variando entre 2,43 µg/mL para a linhagem celular MOLT-4 e 9,96 µg/mL para linhagem K-562.

Padrões dos ácidos graxos metilados também foram avaliados separadamente nas mesmas condições. Miristato de metila (**13***) e estearato de metila (**15***) foram citotóxicos em células HL-60 e MOLT-4, com valores de Cl_{50} de 4,68 e 4,31 µg/mL para o miristato de metila (**13***) e 3,08 e 4,65 µg/mL para estearato de metila (**15***), respectivamente. Palmitato de metila (**14***), por outro lado, foi citotóxico somente para células MOLT-4, com Cl_{50} de 2,28 µg/mL (Tab. 51, p. 158). A comparação dos resultados da mistura e dos padrões sugere a ocorrência de um possível sinergismo entre as substâncias, pois a mistura (**13 + 14 + 15**) foi tóxica em todas as linhagens leucêmicas analisadas, enquanto que os padrões foram ativos somente em células HL-60 e MOLT-4.

Não foi observada atividade dos ácidos graxos metilados (**13 + 14 + 15**) para as linhagens B-16 e HCT-8 no intervalo de concentração utilizado. Esses resultados mostram que os ácidos graxos metilados (**13 + 14 + 15**) podem ser responsáveis pela atividade em células tumorais da linhagem leucêmica (CEM e HL-60) observada na fase hexânica. Quanto à atividade desta fase em outras linhagens tumorais (B-16 e HCT-8), pode ser devido à presença de outras substâncias em menor concentração que não puderam ser isoladas e/ou identificadas ou possível sinergismo de vários compostos presentes na fase hexânica.

A mistura de ácidos graxos (**18 + 19 + 20 + 21 + 22 + 23**) obtida da fase clorofórmica da segunda partição do extrato metanólico de *D. psammotodes*, coletado em Trairi (CE), também foi avaliada no intervalo de concentração de 1,56 - 100 µg/mL para as linhagens leucêmicas (Tab. 51, p. 158). Ela foi citotóxica em todas as linhagens leucêmicas avaliadas, apresentando valores de Cl_{50} variando entre 8,81 µg/mL para a linhagem celular MOLT-4 e 21,8 µg/mL para linhagem K-562, sendo mais ativa que a mistura de ácidos graxos proveniente da fase hexânica. Estes resultados corroboram com aqueles apresentados por Harada *et al.* (2002). Provavelmente estas substâncias sejam responsáveis pela atividade observada na fração clorofórmica para as células CEM e HL-60, porém menos pronunciada por apresentar em menor concentração e maior mistura.

A presença de efeito das frações sobre células tumorais e ausência de efeito do extrato sobre as mesmas pode ser devido a algum efeito antagônico da grande

quantidade de substâncias em mistura no extrato, provavelmente há compostos que não são ativos no extrato e reduziriam o efeito das substâncias ativas presentes nas frações hexânica e clorofórmica quando em mistura no extrato ou talvez a concentração das substâncias ativas das frações, presentes no extrato, seja tão baixa a ponto de não se observar a mesma atividade quando se encontra em menor mistura e maior concentração nas frações.

A substância **6** (2'-deoxiguanosina), isolada do extrato metanólico de *D. psammátodes*, coletado em Icapuí (CE), também foi avaliada no intervalo de concentração de 0,78 – 50,0 µg/mL para as linhagens leucêmicas e na concentração única de 25 µg/mL para a linhagem HCT-8 (Tab. 51, p. 158), tendo sido ativa nas linhagens leucêmicas (CEM, K-562 e MOLT-4). As substâncias **1** (2'-deoxiuridina), **5** (2'-deoxiinosina) e a mistura de esteróides (**9** + **10** + **11**) foram avaliadas na concentração única de 25 µg/mL para as linhagens HL-60 e HCT-8 (Tab. 51, p. 158) e não mostraram atividade.

Tabela 50 – Cl_{50} (µg/mL) da atividade antiproliferativa em linhagens celulares tumorais das frações obtidas de *D. psammátodes* avaliadas pelo método colorimétrico do MTT

Frações	Linhagens				
	CEM	HL-60	B-16	MCF-7	HCT-8
Hexânica	33,19	45,92	47,89	81,09	99,04
Clorofórmica	73,66	52,66	42,40	85,46	95,73
Butanólica	>100	>100	>100	>100	>100
Hidroalcoólica	>100	>100	>100	>100	>100
Resíduo	>100	>100	>100	>100	>100

TABELA 51 – Cl_{50} ($\mu\text{g/mL}$) e respectivos intervalos de confiança (IC 95%) da atividade antiproliferativa em linhagens celulares tumorais dos componentes de *D. psammatoidea* e *E. vannamei*, avaliadas pelo método colorimétrico do MTT

Substâncias	Linhagens					
	HL-60	CEM	K-562	Molt-4	B-16	HCT-8
1	> 25,0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	> 25,0
5	> 25,0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	> 25,0
6	> 50,0	15,45 (9,86 - 24,20)	14,12 (4,66 - 42,78)	7,15 (2,40 - 21,25)	n.a.	> 25,0
9 + 10 + 11	> 25,0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	> 25,0
13*	4,68 (1,52 - 14,44)	> 6,25	> 6,25	4,31 (3,66 - 5,09)	n.a.	n.a.
14*	> 6,25	> 6,25	> 6,25	2,28 (0,24 - 21,81)	n.a.	n.a.
15*	3,08 (1,35 - 7,07)	> 6,25	> 6,25	4,65 (1,56 - 13,79)	n.a.	n.a.
13 + 14 + 15	9,49 (6,91 - 14,33)	8,95 (5,62 - 14,26)	9,96 (4,33-22,90)	2,43 (1,64 - 3,62)	> 25,0	> 25,0
13 + 14 + 15 + 16 + 17	13,18 (12,22 - 14,21)	12,34 (8,97 - 14,21)	>25,0	4,94 (2,69 - 9,05)	n.a.	n.a.
21 + 23	>25,0	>25,0	>25,0	14,59 (4,43 - 48,05)	> 25,0	> 25,0
18 + 19 + 20 + 21 + 22 + 23	11,61 (4,10 - 32,87)	10,48 (7,14 - 15,36)	21,8 (14,27 - 33,20)	8,81 (3,99 - 19,39)	n.a.	n.a.
19 + 20 + 21 + 22 + 23	21,46 (10,21 - 45,10)	19,54 (11,88 - 32,16)	> 25,0	6,31 (2,97 - 13,4)	n.a.	n.a.
24 + 25 + 26	12,10 (5,03 - 29,11)	14,11 (7,14 - 27,92)	22,24 (15,19 - 32,56)	7,36 (3,46 - 15,65)	> 25,0	> 25,0

* padrões obtidos da Sigma Chemical Co.

n.a. – não avaliado

De acordo com ensaios realizados previamente (JIMENEZ *et al*, 2003), o extrato metanólico de *E. vannamei* foi ativo em células tumorais *in vitro*, apresentando valores de CI_{50} de <2,0; 11,2; 23,8 e 14,2 $\mu\text{g/mL}$, para as linhagens CEM, HL-60, B-16 e HCT-8, respectivamente.

As fases hexânica e hidroalcoólica do extrato metanólico de *E. vannamei* foram avaliadas quanto à atividade citotóxica em células tumorais *in vitro*. Apenas a fase hexânica foi ativa em células tumorais da linhagem B-16, apresentando valor de CI_{50} de 5,48 $\mu\text{g/mL}$ (Tab. 52).

Apesar de a fase hexânica ter mostrado valor de CI_{50} maior que 25 $\mu\text{g/mL}$ para as linhagens CEM e HL-60, tanto os ácidos graxos, quanto os ácidos graxos metilados apresentaram valores menores que este, demonstrando alguma atividade nestas células (Tab. 51, p. 158). A mistura de ácidos graxos (**19 + 20 + 21 + 22 + 23**) foi avaliada no intervalo de concentração de 1,56 - 100 $\mu\text{g/mL}$ para as linhagens leucêmicas (Tab. 51, p. 158). Ela foi citotóxica nas linhagens leucêmicas HL-60, CEM e MOLT-4, apresentando valores de CI_{50} de 21,46, 19,54 e 6,31 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, sendo mais ativa em células Molt-4 que as misturas de ácidos graxos obtidos de *D. psammotodes*. Estes resultados corroboram com aqueles apresentados por Harada *et al*. (2002). Os ácidos graxos metilados (**13 + 14 + 15 + 16 + 17**) também obtidos da fase hexânica foram citotóxicos nas linhagens leucêmicas HL-60, CEM e MOLT-4, apresentando valores de CI_{50} de 13,13, 12,11 e 4,94 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Estes resultados indicam um possível antagonismo entre as substâncias presentes na fase hexânica, diminuindo assim, a atividade em células leucêmicas desta fração. Pode ser também que a concentração dos ácidos graxos e ácidos graxos metilados na fase hexânica seja baixa e por isso não se observa a mesma atividade na fração.

Tabela 52 – CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) da atividade antiproliferativa em linhagens celulares tumorais das frações obtidas do extrato metanólico de *E. vannamei* avaliadas pelo método colorimétrico do MTT

Frações	Linhagens			
	CEM	HL-60	B-16	HCT-8
Hexânica	>25,0	>25,0	5,48	>25,0
Hidroalcoólica	>25,0	>25,0	>25,0	>25,0

4.2.2.2. Estudo do mecanismo de ação de misturas de ácidos graxos metilados sobre células HL-60

4.2.2.2.1. Curva de crescimento celular

Com a finalidade de se avaliar a cinética de crescimento das células tratadas e não tratadas por um período de 72 horas, foram obtidas curvas de crescimento celular para as misturas de ácidos graxos metilados de *D. psammatoles* (DPT-1.2) e *E. vannamei* (EV-1.3) (Fig. 94, p. 161). As amostras DPT-1.2 e EV-1.3 reduziram a contagem de células nas concentrações de 3 e 10 µg/mL com relação à curva obtida para as células controle, sendo que na concentração de 10 µg/mL houve maior redução da proliferação celular para as duas amostras.

A amostra DPT-1.2 reduziu 50% das células em relação ao controle entre a 60^a e a 72^a hora na concentração de 10 µg/mL, enquanto que a amostra EV-1.3, na mesma concentração, mostrou efeito mais cedo, entre a 48^a e a 60^a hora. O comportamento de ambas amostras na curva de crescimento de células HL-60 sugere uma atividade tempo e concentração dependente.

Figura 94 - Curva de crescimento de células de leucemia humana HL-60 tratadas com DPT-1.2 e EV-1.3. A viabilidade celular foi determinada por exclusão de azul de tripan nos tempos de 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas após a incubação. As amostras foram testadas nas concentrações de 1, 3 e 10 $\mu\text{g/mL}$. Os dados correspondem a media $\pm$ E.P.M. de dois experimentos independentes

4.2.2.2.2. Viabilidade celular - Exclusão por Azul de Tripán

O ensaio de viabilidade celular de exclusão por azul de tripan possibilita a comparação do padrão de crescimento das células tratadas e não tratadas pela contagem de células viáveis para cada tratamento. Com esse objetivo foi realizado ensaio de viabilidade celular de exclusão por azul de tripan para as amostras DPT-1.2 e EV-1.3 (Fig. 95). As amostras DPT-1.2 e EV-1.3 reduziram de forma significativa o número de células viáveis com relação ao controle na maior concentração (10 $\mu\text{g/mL}$) após 24 horas de incubação, corroborando com os resultados obtidos no ensaio do MTT, sendo que EV-1.3 teve maior efeito que DPT-1.2.

Figura 95 - Efeito de DPT-1.2 e EV-1.3 na viabilidade de células leucêmicas HL-60 determinado por exclusão de azul de tripan depois de 24 horas de incubação. O controle negativo foi realizado na ausência (C) e na presença do veículo usado para diluir a droga (V). Doxorubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) foi usada como controle positivo (D). Os dados correspondem a média $\pm$ E.P.M. de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste Student Newman Keuls

4.2.2.2.3. Inibição da síntese de DNA – BrdU

Este ensaio avalia a capacidade proliferativa das células tratadas em comparação às não tratadas pela incorporação de BrdU, análogo da timidina, durante a fase S no DNA e é detectado por técnicas imuno-histoquímicas (HOLM *et al.*, 1998). Com esse objetivo foi realizado ensaio de inibição da síntese de DNA para as amostras DPT-1.2 e EV-1.3 (Fig. 96, p. 164). As amostras DPT-1.2 e EV-1.3 apresentaram atividade antiproliferativa na maior concentração utilizada (10 µg/mL), reduzindo o número de células que incorporaram BrdU e dessa forma inibindo de forma significativa a síntese de DNA, sendo que DPT-1.2 foi mais ativa que EV-1.3. Enquanto 60% das células não tratadas incorporaram BrdU, apenas 20% delas incorporaram BrdU após tratamento com doxorrubicina na concentração de 0,3 µg/mL. A amostra DPT-1.2 foi um pouco mais ativa que EV-1.3, inibindo a incorporação de BrdU em 41% das células tratadas, comparando-se com as células do controle negativo, enquanto EV-1.3 inibiu 37% das células tratadas em relação ao controle negativo, ambas na concentração de 10 µg/mL. Estes resultados indicam que as amostras possuem possível ação citostática com inibição da síntese de DNA.

Figura 96 - Efeito de DPT-1.2 e EV-1.3 na inibição da incorporação da 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) em células leucêmicas HL-60 depois de 24 horas de incubação. O controle negativo foi realizado na ausência (C) e na presença do veículo usado para diluir a droga (V). Doxorubicina (0,3 µg/mL) foi usada como controle positivo (D). Os dados correspondem a média ± E.P.M. de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste Student Newman Keuls

4.2.2.2.4. Análise morfológica – Coloração diferencial por hematoxilina/eosina

Com a finalidade de se analisar a célula quanto a sua integridade nuclear, bem como alterações no citoplasma, foi realizado ensaio de análise morfológica para as amostras DPT-1.2 e EV-1.3 (Fig. 97, p. 166). As células controle, tratadas apenas com a mesma concentração do veículo de dissolução (DMSO), apresentaram núcleos volumosos e homogêneos, presença de poucos vacúolos pequenos ou medianos no citoplasma, e membrana plasmática fenestrada. Não raro, também podem ser encontradas figuras mitóticas neste grupo.

No controle positivo, onde as células foram tratadas com doxorubicina 0,3 µM, observa-se a intensa presença de pequenos fragmentos celulares permeando a lâmina e fragmentos maiores contendo DNA fragmentado e raras células

semelhantes às do controle negativo. Tais características são compatíveis com as de morte por apoptose tardia ou necrose.

As células tratadas com as amostras DPT-1.2 e EV-1.3 na menor concentração (3 µg/mL), de modo geral, foram bastante semelhantes às do controle negativo sendo que algumas apresentaram pequenas alterações como membrana plasmática mais irregular e raras células com núcleo fragmentado. Porém as células tratadas com DPT-1.2 na maior concentração (10 µg/mL) apresentaram alterações mais significativas, tais como, eosinofilia, presença de inúmeros e diminutos vacúolos corados intensamente com eosina, indicativo da presença de grande quantidade de proteína nos mesmos, esta característica foi observada em várias células e é típica do início da necrose. Também foram encontradas raras células com condensação regular da cromatina, indicativo de morte por apoptose, além de aumento da irregularidade da membrana plasmática, raras células tumefeitas ou com fragmentação irregular do núcleo e presença de fragmentos celulares permeando a lâmina. Observou-se uma rarefação de células e aumento da irregularidade da membrana plasmática nas lâminas tratadas com EV-1.3 na maior concentração. Também foram observados poucos exemplares entumecidos e com fragmentação nuclear, indicativos de necrose e condensação regular da cromatina, característica de células apoptóticas.

Figura 97 – Microfotografias das células HL-60 coradas com Hematoxilina/Eosina. A: controle; B: veículo; C: células tratadas por 24h com doxorrubicina (0,3 µg/mL); D: células tratadas por 24h com DPT-1.2 (3 µg/mL); E: células tratadas por 24h com DPT-1.2 (10 µg/mL); F: células tratadas por 24h com EV-1.3 (3 µg/mL); G: células tratadas por 24h com EV-1.3 (10 µg/mL). Aumento x 400.

4.2.2.2.5. Análise morfológica – coloração diferencial por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina

Laranja de acridina é um corante que pode corar células apoptóticas e necróticas, enquanto brometo de etídio cora somente células que têm perda da integridade da membrana. Quando analisadas sob microscopia de fluorescência, células viáveis mostram-se verdes com núcleo contínuo e necróticas coram-se de vermelho, também apresentando núcleo contínuo. Células em apoptose inicial também se coram de verde, mas devido à fragmentação e condensação da cromatina, o núcleo apresenta-se com manchas verdes brilhantes. Células em apoptose tardia coram-se com laranja de acridina e brometo de etídio, mostrando coloração amarelo para laranja e núcleo fragmentado (TIAN *et al.*, 2005).

Foi realizada análise morfológica através de coloração diferencial por brometo de etídio/laranja de acridina para as amostras DPT-1.2 e EV-1.3 (Fig. 98, p. 168). Neste ensaio foi avaliado o processo de indução de morte celular determinando-se a proporção de células viáveis, apoptóticas e necróticas após tratamento das células HL-60 com as amostras DPT-1.2 e EV-1.3 (3 e 10 µg/mL) por 24 horas.

Células vivas verdes e uniformes com morfologia de membrana e núcleo normais foram observadas no grupo controle, atingindo aproximadamente 90% das células. Para ambos grupos tratados por 24 horas, contagem de células viáveis foi ligeiramente, mas significativamente menor quando comparado ao grupo não tratado. As duas amostras, em ambas concentrações, foram ativas para indução de apoptose e necrose, apresentando aumento significativo no número de células apoptóticas e necróticas ao comparar-se com as células não tratadas. Quando células tratadas com ambas amostras por 24 horas foram analisadas, aproximadamente 20% das células encontravam-se em processo de morte, em contraste com somente 7% das células não tratadas. Contagem de células apoptóticas foi de aproximadamente 11-12% e 9-11% para DPT-1.2 e EV-1.3, respectivamente. Enquanto a contagem de células necróticas foi de aproximadamente 6-8% e 6-13% para DPT-1.2 e EV-1.3, respectivamente.

Concentrações diferentes de 3 e 10 µg/mL não mostraram resultados significativamente diferentes para DPT-1.2 e para células viáveis e apoptóticas após tratamento com EV-1.3. Células tratadas com DPT-1.2 sofreram aumento de 3 e 2 vezes na contagem de células apoptóticas e necróticas, respectivamente, em ambas

concentrações, quando comparado com o grupo controle. Por outro lado, células tratadas com EV-1.3 sofreram aumento de 3 e 2 vezes na contagem de células apoptóticas e necróticas, respectivamente, na concentração de 3 $\mu\text{g/mL}$ e 3 e 4 vezes na contagem de células apoptóticas e necróticas, respectivamente, na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. Portanto, observou-se um maior aumento no número de células necróticas para EV-1.3 na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. Estes resultados indicam que as amostras DPT-1.2 e EV-1.3 possuem possível ação citotóxica, ou seja, são indutoras de morte celular, tanto por apoptose quanto por necrose.

Figura 98 - Efeito de DPT-1.2 e EV-1.3 em células leucêmicas HL-60, analisado pela coloração por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina depois de 24 horas de incubação. O controle negativo foi realizado na ausência (C) e na presença do veículo usado para diluir a droga (V). Doxorubicina (0,3 $\mu\text{g/mL}$) foi usada como controle positivo (D). Os dados correspondem a média $\pm$ E.P.M. de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste Student Newman Keuls

5. CONCLUSÕES

O extrato metanólico de *D. psammátodes*, por ser ativo contra ovos de ouriço do mar, foi o selecionado para ser fracionado. Esta opção ocorreu em relação aos extratos de outros organismos marinhos também disponíveis.

A partir do extrato metanólico de *D. psammátodes*, obtido da ascídia coletada em Icapuí (CE), foram identificados:

- quatro nucleosídeos: 2'-deoxiuridina, 2'-deoxiinosina, timidina e 2'-deoxiguanosina,
- três esteróides: colestanol, colestanona e estigmasterol,
- três monoalquil glicerol éteres: 2,3-propanodiol, 1-heptadeciloxi; 2,3-propanodiol, 1-octadeciloxi (álcool batílico) e 2,3-propanodiol, 1-nonadeciloxi.

A partir do extrato metanólico de *D. psammátodes*, proveniente da ascídia coletada em Trairi (CE), foram obtidos:

- três ácidos graxos metilados: miristato de metila, palmitato de metila e estearato de metila,
- dois esteróides: colestanol e colestanona,
- seis ácidos graxos: ácido láurico, ácido mirístico, ácido pentadecanóico, ácido palmítico, ácido margárico e ácido esteárico,
- três monoalquil glicerol éteres: 2,3-propanodiol, 1-heptadeciloxi; 2,3-propanodiol, 1-octadeciloxi (álcool batílico) e 2,3-propanodiol, 1-nonadeciloxi,
- três nucleosídeos: 2-deoxiguanosina, timidina e uridina,
- um núcleo purínico: hipoxantina.

As frações obtidas do extrato metanólico de *D. psammátodes*, coletado em Trairi (CE), foram analisadas quanto à atividade citotóxica, observando-se maior efeito para as frações hexânica e clorofórmica, sobre ovos de ouriço do mar (primeira divisão e blástula) e células tumorais.

Em relação às substâncias isoladas de *D. psammátodes*, estas foram analisadas quanto à atividade citotóxica e observou-se efeito sobre ovos de ouriço do mar, tanto na primeira divisão quanto na blástula para as substâncias 2'-deoxiuridina e 2'-deoxiguanosina. Foi observado efeito sobre a primeira divisão de ovos de ouriço do mar para os ácidos graxos metilados, ácidos graxos e derivados

do glicerol éter. Este efeito sobre ovos de ouriço do mar está correlacionado ao fato do extrato também ter demonstrado atividade. Quanto à atividade sobre células tumorais, a mistura de ácidos graxos metilados mostrou maior efeito sobre as linhagens leucêmicas, indicando atividade dose e tempo dependente, bem como atividade antiproliferativa e citotóxica pela indução de morte celular através de apoptose e necrose. Este efeito está correlacionado ao fato da fração hexânica, de onde foi obtida a mistura de ácidos graxos metilados, também ter sido ativa sobre as linhagens leucêmicas.

O extrato metanólico de *E. vannamei*, por ser ativo contra ovos de ouriço do mar e células tumorais *in vitro*, também foi selecionado para ser fracionado, pelas mesmas razões expostas acima. A partir do extrato metanólico de *E. vannamei* foram identificados:

- cinco ácidos graxos metilados: miristato de metila, palmitato de metila, estearato de metila, palmitoleato de metila e oleato de metila,
- dois esteróides: colestano e colesterol,
- cinco ácidos graxos: ácido mirístico, ácido pentadecanóico, ácido palmítico, ácido margárico e ácido esteárico,
- dois nucleosídeos: guanosina e adenosina.

As fases hexânica e hidroalcoólica, obtidas do extrato metanólico de *E. vannmei*, foram ativas sobre a primeira divisão de ovos de ouriço do mar e apenas a fase hexânica foi ativa em células tumorais da linhagem B-16. Quanto às substâncias isoladas, os ácidos graxos metilados, presentes na fase hexânica, foram ativos em células de linhagem leucêmica, indicando atividade dose e tempo dependente, bem como atividade antiproliferativa e citotóxica pela indução de morte celular através de apoptose e necrose. Estas substâncias podem estar presentes em baixa concentração na fase hexânica e por isso não se observou a mesma atividade para as células de linhagem leucêmica ou pode estar ocorrendo um possível antagonismo entre as substâncias presentes na fase hexânica, diminuindo a atividade desta.

Os nucleosídeos aqui encontrados já foram identificados em diversos organismos marinhos, incluindo ascídias, sendo que timidina já foi identificada no

gênero *Didemnum* e adenosina no gênero *Eudistoma*. Os esteróides já foram encontrados em ascídias, sendo que o estigmasterol pode ter sido obtido pelo animal através de dieta ou simbiose, já que esta substância é proveniente de fontes vegetais. O álcool batílico e seus análogos também já foram encontrados em outros organismos marinhos. Os ácidos graxos metilados e ácidos graxos aqui encontrados já foram identificados em esponjas e algas marinhas. Portanto, as substâncias encontradas não são inéditas e estão coerentes com o perfil químico dos gêneros *Didemnum* e *Eudistoma*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADESANYA, S.A.; CHBANI, M.; PAIS, M.; DEBITUS, C. Brominated β -carboline from the marine tunicate *Eudistoma album*. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.55, n.4, p.525-7, 1992.

ANJANEYULU, A.S.R.; KRISHNAMURTHY, M.V.R.; RAO, G.V. Rare aromadendrane diterpenoids from a new soft coral species of *Sinularia* genus of the Indian Ocean. **Tetrahedron**, Oxford, v.53, n.27, p.9301-12, 1997.

ANJANEYULU, A.S.R.; GOWRI, P.M.; KRISHNA MURTHY, V.R. New sesquiterpenoids from the soft coral *Sinularia intacta* of the Indian Ocean. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.62, n.12, p.1600-4, 1999.

ANJANEYULU, A.S.R.; KRISHNAMURTHY, M.V.R.; GOWRI, P.M. Novel epoxy steroids from the Indian Ocean soft coral *Sarcophyton crassocaule*. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.63, n.1, p.112-8, 2000.

ANTHONI, U.; NIELSEN, P.H.; SMITH-HANSEN, L.; WIUM-ANDERSEN, S.; CHRISTOPHERSEN, C. Charamin, a quaternary ammonium ion antibiotic from the green alga *Chara globularis*. **J. Org. Chem.**, Easton, v.52, n.4, p.694-5, 1987.

ANTHONI, U.; LARSEN, C.; NIELSEN, P.H.; CHRISTOPHERSEN, C.; LIDGREN, G. Hydrophilic organic nitrogenous metabolites from marine bryozoans. **Comp. Biochem. Physiol.**, Oxford, v.92B, n.4, p.711-3, 1989.

ARRAULT, A.; WITCZAK-LEGRAND, A.; GONZALEZ, P.; BONTEMPS-SUBIELOS, N.; BANAIGS, B. Structure and total synthesis of cyclodidemnamide B, a cycloheptapeptide from the ascidian *Didemnum molle*. **Tetrahedron Lett.**, Oxford, v.43, n.22, p.4041-4, 2002.

D'AURIA, M.V.; MINALE, L.; RICCIO, R. Polyoxygenated steroids of marine origin. **Chem. Rev.**, Washington, v.93, n.5, p.1839-95, 1993.

BERGMANN, W.; BURKE, D.C. Contributions to the study of marine products. XXXIX. The nucleosides of sponges. III. Spongothymidine and spongouridine. **J. Org. Chem.**, Easton, v.20, n.11, p.1501-7, 1955.

BERGMANN, W.; FEENEY, R.J. The isolation of a new thymine pentoside from sponges. **J. Am. Chem. Soc.**, Easton, v.72, n.6, p.2809-10, 1950.

BERLINCK, R.G.S.; BRITTON, R.; PIERS, E.; LIM, L.; ROBERGE, M.; ROCHA, R.M.; ANDERSEN, R.J. Granulatimide and isogranulatimide, aromatic alkaloids with G2 checkpoint inhibition activity isolated from the Brazilian ascidian *Didemnum granulatum*: structure elucidation and synthesis. **J. Org. Chem.**, Easton, v.63, n.26, p.9850-6, 1998.

BERLINCK, R.G.S. Chromatographic approach to polar compounds: isolation of hydrophilic constituents of the marine sponge *Crambe crambe*. **Quim. Nova**, São Paulo, v.17, n.2, p.167-71, 1994.

BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Nat. Prod. Rep.**, London, v.23, n.1, p.26-78, 2006.

BRITTON, R.; OLIVEIRA, J.H.H.L.; ANDERSEN, R.J.; BERLINCK, R.G.S. Granulatimide and 6-bromogranulatimide, minor alkaloids of the Brazilian ascidian *Didemnum granulatum*. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.64, n.2, p.254-5, 2001.

BUDZIKIEWICZ, H.; DJERASSI, C.; WILLIAMS, D.H. Esters and lactones. In: _____. **Mass spectrometry of organic compounds**. San Francisco: Holden-Day, 1967. p.174-213.

BUTLER, M.; DAWSON, M. **Cell culture**. Blackwell, Scientific Publications, 1992.

CAO, S.; GAO, Z.; THOMAS, S.J.; HECHT, S.M.; LAZO, J.S.; KINGSTON, D.G.I. Marine sesquiterpenoids that inhibit the lyase activity of DNA polymerase. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.67, n.10, p.1716-8, 2004.

CARDELINA II, J.H.; GRADEN, C.J.; GREER, B.J. 17Z-tetracosenyl 1-glycerol ether from the sponges *Cinachyra alloclada* and *Ulosa ruetzleri*. **Lipids**, Chicago, v.18, n.2, p.107-10, 1983.

CARROLL, A.R.; BOWDEN, B.F.; COLL, J.C. Studies of Australian ascidians. I. Six new lamellarin-class alkaloids from a colonial ascidian, *Didemnum* sp. **Aust. J. Chem.**, Melbourne, v.46, n.4, p.489-501, 1993.

CARROLL, A.R.; BOWDEN, B.F.; COLL, J.C.; HOCKLESS, D.C.R.; SKELTON, B.W.; WHITE, A.H. Studies of Australian ascidians. IV. Mollamide, a cytotoxic cyclic heptapeptide from the compound ascidian *Didemnum molle*. **Aust. J. Chem.**, Melbourne, v.47, n.1, p.61-9, 1994.

CARTÉ, B.K. Biomedical potential of marine natural products. **Bioscience**, Washington, v.46, n.4, p.271-86, 1996.

CHANG C.; GOMES, J.S.; BYRN, S.R. Chemical modification of deoxyribonucleic acids: a direct study by carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. **J. Org. Chem.**, Easton, v.48, n.26, p.5151-60, 1983.

COMPAGNONE, R.S.; FAULKNER, D.J.; CARTÉ, B.K.; CHAN, G.; FREYER, A.; HEMLING, M.E.; HOFMANN, G.A.; MATTERN, M.R. Pentathiepins and trithianes from two *Lissoclinum* species and a *Eudistoma* sp.: inhibitors of protein kinase C. **Tetrahedron**, Oxford, v.50, n.45, p.12785-92, 1994.

DAVIDSON, B.S. Ascidians: producers of amino acid derived metabolites. **Chem. Rev.**, Washington, v.93, n.5, p.1771-91, 1993.

DAVIS, R.A.; CARROLL, A.R.; PIERENS, G.K.; QUINN, R.J. New lamellarin alkaloids from the Australian ascidian, *Didemnum chartaceum*. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.62, n.3, p.419-24, 1999.

DAVIS, R.A.; CHRISTENSEN, L.V.; RICHARDSON, A.D.; Da ROCHA, R.M.; IRELAND, C.M. Rigidin E, a new pyrrolopyrimidine alkaloid from a Papua New Guinea tunicate *Eudistoma* species. **Mar. Drugs**, Basel, v.1, n.1, p.27-33, 2003.

DEMATTE, N.; GUERRIERO, A.; De CLAUSER, R.; De STANCHINA, G.; LAFARGUE, F.; CUOMO, V.; PIETRA, F. A screening of some colonial Ascidiacea of Banyuls-Sur-Mer for antibacterial and antifungal activities and, preliminarlily, for natural products: 2'-deoxyribonucleosides from *Trididemnum cereum* (Giard, 1872). **Comp. Biochem. Physiol.**, Oxford, v.81B, n.2, p.479-84, 1985.

DONG, H.; GOU, Y.L.; KINI, R.M.; XU, H.X.; CHEN, S.X.; TEO, S.L.M.; BUT, P.H. A new cytotoxic polyhydroxysterol from soft coral *Sarcophyton trocheliophorum*. **Chem. Pharm. Bull.**, Tokyo, v.48, n.7, p.1087-9, 2000.

DONIA, M.; HAMANN, M.T. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. **Lancet Infect. Dis.**, New York, v.3, n.6, p.338-48, 2003.

EINAT, M.; LISHNER, M.; AMIEL, A.; NAGLER, A.; YARKORLI, S.; RUDI, A.; KASHMAN, Y.; MARKEL, D.; FABIAN, I. Eilatin: a novel marine alkaloid inhibits in vitro proliferation of progenitor cells in chronic myeloid leukemia patients. **Exp. Hematol.**, Amsterdam, v.23, n.14, p.1439-44, 1995.

EXPÓSITO, M.A.; LÓPEZ, B.; FERNÁNDEZ, R.; VÁZQUEZ, M.; DEBITUS, C.; IGLESIAS, T.; JIMÉNEZ, C.; QUIÑOÁ, E.; RIGUERA, R. Minalemines A-F: sulfamic acid peptide guanidine derivatives isolated from the marine tunicate *Didemnum rodriguessi*. **Tetrahedron**, Oxford, v.54, n.26, p.7539-50, 1998.

FAHY, E.; POTTS, B.C.M.; FAULKNER, D.J.; SMITH, K. 6-bromotryptamine derivatives from the Gulf of California tunicate *Didemnum candidum*. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.54, n.2, p.564-9, 1991.

FINDLAY, J.A.; DALJEET, A.; MATSOUKAS, J.; MOHARIR, Y.E. Constituents of the sea cucumber *Cucumaria frondosa*. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.47, n.3, p.560, 1984.

FODERARO, T.A.; BARROWS, L.R.; LASSOTA, P.; IRELAND, C.M. Bengacarboline, a new β -carboline from a marine ascidian *Didemnum* sp. **J. Org. Chem.**, Easton, v.62, n.17, p.6064-5, 1997.

FORD, P.W.; DAVIDSON, B.S. Plakinidine D, a new pyrroloacridine alkaloid from the ascidian *Didemnum rubeum*. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.60, n.10, p.1051-3, 1997.

GENG, C.X.; ZENG, Z.C.; WANG, J.Y. Docetaxel inhibits SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells growth and induces apoptosis. **World J. Gastroenterol.**, Beijing, v.9, n.4, p.696 - 700, 2003.

GONZÁLEZ, N.; RODRÍGUEZ, J.; JIMÉNEZ, C. Didemniserinolipids A-C, unprecedented serinolipids from the tunicate *Didemnum* sp. **J. Org. Chem.**, Easton, v.64, n.15, p.5705-7, 1999.

HAEFNER, B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. **Drug Discov. Today**, Oxford, v.8, n.12, p.536-44, 2003.

HAM, J.; KANG, H. A novel cytotoxic alkaloid of lamellarin class from a marine ascidian *Didemnum* sp. **Bull. Korean Chem. Soc.**, Seoul, v.23, n.1, p.163-6, 2002.

HAN, A.R.; SONG, J.I.; JANG, D.S.; MIN, H.Y.; LEE, S.K.; SEO, E.K. Cytotoxic constituents of the octocoral *Dendronephthya gigantean*. **Arch. Pharm. Res.**, Seoul, v.28, n.3, p.290-3, 2005.

HARADA, H.; YAMASHITA, U.; KURIHARA, H.; FUKUSHI, E.; KAWABATA, J.; KAMEI, Y. Antitumor activity of palmitic acid found as a selective cytotoxic substance in a marine red alga. **Anticancer Res.**, Athens, v.22, n.5, p.2587-90, 2002.

HAY, M.E. Marine chemical ecology: what's known and what's next? **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, Amsterdam, v.200, n.1-2, p.103-34, 1996.

HAYAT, S.; ATTA-UR-RAHMAN; CHOUDHARY, M.I.; KHAN, K.M.; ABBASKHAN, A. Two new cinnamic acid esters from marine brown alga *Spatoglossum variabile*. **Chem. Pharm. Bull.**, Tokyo, v.50, n.9, p.1297-9, 2002.

HE, H.; FAULKNER, D.J. Eudistones A and B: two novel octacyclic alkaloids from a Seychelles tunicate, *Eudistoma* sp. **J. Org. Chem.**, Easton, v.56, n.18, p.5369-71, 1991.

HOLM, M.; THOMSEN, M.; HOYER, M.; HOKLAND P. Optimization of a flow cytometric method for the simultaneous measurement of cell surface antigen, DNA content, and in vitro BrdU incorporation into normal and malignant hematopoietic cells. **Cytometry**, New York, v.32, n.1, p.28-36, 1998.

HORTON, P.A.; LONGLEY, R.E.; McCONNELL, O.J.; BALLAS, L.M. Staurosporine aglycone (K252-c) and arcyriaflavin A from the marine ascidian, *Eudistoma* sp. **Experientia**, Basel, v.50, n.9, p.843-5, 1994.

IRELAND, C.M.; DURSO JÚNIOR, A.R.; SCHEUER, P.J. N, N'-Diphenethylurea, a metabolite from the marine ascidian *Didemnum ternatanum*. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.44, n.3, p.360-1, 1981.

ISAACS, S.; KASHMAN, Y.; BENAYAHU, Y. 3-hydroxy-7-phenyl-4*E*,6*E*-heptadienoic acid from an ascidian *Didemnum granulatum*. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.57, n.5, p.648-9, 1994.

JIMENEZ, P.C.; FORTIER, S.C.; LOTUFO, T.M.C.; PESSOA, C.; MORAES, M.E.A.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V. Biological activity in extracts of ascidians (Tunicata, Ascidiaceae) from the northeastern Brazilian coast. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, Amsterdam, v.287, n.1, p.93-101, 2003.

KANG, H.; JENSEN, P.R.; FENICAL, W. Isolation of microbial antibiotics from a marine ascidian of the genus *Didemnum*. **J. Org. Chem.**, Easton, v.61, n.4, p.1543-6, 1996.

KANG, H.; FENICAL, W. Ningalins A-D: novel aromatic alkaloids from a Western Australian ascidian of the genus *Didemnum*. **J. Org. Chem.**, Easton, v.62, n.10, p.3254-62, 1997.

KEARNS, P.S.; COLL, J.C.; RIDEOUT, J.A. A β -carboline dimer from an ascidian, *Didemnum* sp. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.58, n.7, p.1075-6, 1995.

KEHRAUS, S.; GORZALKA, S.; HALLMEN, C.; IQBAL, J.; MÜLLER, C.E.; WRIGHT, A.D.; WIESE, M.; KÖNIG, G.M. Novel amino acid derived natural products from the ascidian *Atrium robustum*: identification and pharmacological characterization of a unique adenosine derivative. **J. Med. Chem.**, Washington, v.47, n.9, p.2243-55, 2004.

KIKUCHI, Y.; ISHIBASHI, M.; SASAKI, T.; KOBAYASHI, J. Iejimalides C and D, new antineoplastic 24-membered macrolide sulfates from the Okinawan marine tunicate *Eudistoma* cf. *rigida*. **Tetrahedron Lett.**, Oxford, v.32, n.6, p.797-8, 1991.

KIM, J.; PORDESIMO, E.O.; TOTH, S.I.; SCHMITZ, F.J.; ALTENA, I.V. Pantherinine, a cytotoxic aromatic alkaloid, and 7-deazainosine from the ascidian *Aplidium pantherinum*. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.56, n.10, p.1813-6, 1993.

KINNEL, R.B.; SCHEUER, P.J. 11-hydroxystaurosporine: a highly cytotoxic, powerful protein kinase C inhibitor from a tunicate. **J. Org. Chem.**, Easton, v.57, n.23, p.6327-9, 1992.

KINZER, K.F.; CARDELLINA II, J.H. Three new β -carbolines from the Bermudian tunicate *Eudistoma olivaceum*. **Tetrahedron Lett.**, Oxford, v.28, n.9, p.925-6, 1987.

KITAJIMA, J.; ISHIKAWA, T.; TANAKA, Y.; IDA, Y. Water-soluble constituents of fennel. IX. Glucides and nucleosides. **Chem. Pharm. Bull.**, Tokyo, v.47, n.7, p.988-92, 1999.

KLJAJIC, Z.; DOGOVIC, N.; GASIC, M.J. Sterols in Adriatic Sea ascidians. **Comp. Biochem. Physiol.**, Oxford, v.75B, n.3, p.519-21, 1983.

KOBAYASHI, J.; HARBOUR, G.C.; GILMORE, J.; RINEHART, K.L. Eudistomins A, D, G, H, I, J, M, N, O, P, and Q, bromo-, hydroxyl-, pyrrolyl-, and 1-pyrrolinyl- β -carbolines from the antiviral Caribbean tunicate *Eudistoma olivaceum*. **J. Am. Chem. Soc.**, Easton, v.106, n.5, p.1526-8, 1984.

KOBAYASHI, J.; NAKAMURA, H.; OHIZUMI, Y.; HIRATA, Y. Eudistomidin-A, a novel calmodulin antagonist from the Okinawan tunicate *Eudistoma glaucus*. **Tetrahedron Lett.**, Oxford, v.27, n.10, p.1191-4, 1986.

KOBAYASHI, J.; CHENG, J.; NAKAMURA, H.; OHIZUMI, Y.; HIRATA, Y.; SASAKI, T.; OHTA, T.; NOZOE, S. Ascididemin, a novel pentacyclic aromatic alkaloid with potent antileukemic activity from the Okinawan tunicate *Didemnum* sp. **Tetrahedron Lett.**, Oxford, v.29, n.10, p.1177-80, 1988a.

KOBAYASHI, J.; CHENG, J.; OHTA, T.; NAKAMURA, H.; NOZOE, S.; HIRATA, Y.; OHIZUMI, Y.; SASAKI, T. Iejimalides A and B, novel 24-membered macrolides with potent antileukemic activity from the Okinawan tunicate *Eudistoma* cf. *rigida*. **J. Org. Chem.**, Easton, v.53, n.26, p.6147-50, 1988b.

KOBAYASHI, J.; CHENG, J.; OHTA, T.; NOZOE, S.; OHIZUMI, Y.; SASAKI, T. Eudistomidins B, C, and D: novel antileukemic alkaloids from the Okinawan marine tunicate *Eudistoma glaucus*. **J. Org. Chem.**, Easton, v.55, n.11, p.3666-70, 1990a.

KOBAYASHI, J.; CHENG, J.; KIKUCHI, Y.; ISHIBASHI, M.; YAMAMURA, S.; OHIZUMI, Y.; OHTA, T.; NOZOE, S. Rigidin, a novel alkaloid with calmodulin antagonist activity from the Okinawan marine tunicate *Eudistoma* cf. *rigida*. **Tetrahedron Lett.**, Oxford, v.31, n.32, p.4617-20, 1990b.

KÖNIG, G.M.; WRIGHT, A.D. Hydrophilic metabolites from the tropical marine sponge *Carteriospongia* sp. **Planta Med.**, Stuttgart, v.65, n.7, p.679-80, 1999.

KRISHNAIAH, P.; REDDY, V.L.N.; VENKATARAMANA, G.; RAVINDER, K.; SRINIVASULU, M.; RAJU, T.V.; RAVIKUMAR, K.; CHANDRASEKAR, K.; RAMAKRISHNA, S.; VENKATESWARLU, Y. New lamellarin alkaloids from the Indian ascidian *Didemnum obscurum* and their antioxidant properties. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.67, n.7, p.1168-71, 2004.

KUMMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ROBBINS & COTRAN. **Pathology Basis of Disease**, 7th ed. WB Saunders, p.1552, 2004.

LIDGREN, G.; BOHLIN, L.; CHRISTOPHERSEN, C. Studies of Swedish marine organisms, part x. Biologically active compounds from the marine sponge *Geodia baretii*. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.51, n.6, p.1277-80, 1988.

LINDQUIST, N.; FENICAL, W.; SESIN, D.F.; IRELAND, C.M.; van DUYNE, G.D.; FORSYTH, C.J.; CLARDY, J. Isolation and structure determination of the didemnenones, novel cytotoxic metabolites from tunicates. **J. Am. Chem. Soc.**, Easton, v.110, n.4, p.1308-9, 1988a.

LINDQUIST, N.; FENICAL, W.; van DUYNE, G.D.; CLARDY, J. New alkaloids of the lamellarin class from the marine ascidian *Didemnum chartaceum* (Sluiter, 1909). **J. Org. Chem.**, Easton, v.53, n.19, p.4570-4, 1988b.

LINDQUIST, N.; FENICAL, W. Ascidiatrienolides A-C, novel lactonized eicosanoids from the colonial marine ascidian *Didemnum candidum*. **Tetrahedron Lett.**, Oxford, v.30, n.21, p.2735-8, 1989.

LOTUFO T.M.C. **Ascidacea (Chordata: Tunicata) do litoral tropical brasileiro**. 2002. 183 f. Tese de Doutorado – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

MAKARIEVA, T.N.; ILYIN, S.G.; STONIK, V.A.; LYSSENKO, K.A.; DENISENKO, V.A. Pibocin, the first ergoline marine alkaloid from the Far-Eastern ascidian *Eudistoma* sp. **Tetrahedron Lett.**, Oxford, v.40, n.8, p.1591-4, 1999.

MAKARIEVA, T.N.; DMITRENOK, A.S.; DMITRENOK, P.S.; GREBNEV, B.B.; STONIK, V.A. Pibocin B, the first *N*-O-methylindole marine alkaloid, a metabolite from the Far-Eastern ascidian *Eudistoma* species. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.64, n.12, p.1559-61, 2001.

McGAHON, A.J.; MARTIN, S.J.; BISSONNETTE, R.P.; MAHBOUBI, A.; SHI, Y.F.; MOGIL, R.J.; NISHIOKA, W.K.; GREEN, D.R. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. **Meth. Cell Biol.**, v.46, p.153-85, 1995.

MISHRA, P.D.; WAHIDULLAH, S.; D' SOUZA, L.D.; KAMAT, S.Y. Steroids from marine sponges *Suberites vestigium* and *Chrotella australiensis*. **Indian J. Chem.**, New Delhi, v.36B, n.8, p.719-21, 1997.

MITCHELL, S.S.; POMERANTZ, S.C.; CONCEPCIÓN, G.P.; IRELAND, C.M. Tubercidin analogs from the ascidian *Didemnum voeltzkowi*. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.59, n.10, p.1000-1, 1996.

MITCHELL, S.S.; RHODES, D.; BUSHMAN, F.D.; FAULKNER, D.J. Cyclodidemniserinol trisulfate, a sulfated serinolipid from the Palauan ascidian *Didemnum guttatum* that inhibits HIV-1 integrase. **Org. Lett.**, Washington, v.2, n.11, p.1605-7, 2000.

MIYAMOTO, T.; HIGUCHI, R.; FUNATSU, M.; SEIKE, H.; NOHARA, T.; KOMORI, T. Structures of the new diacylglycerol ether and cholesteryl ester mixture, and of three nucleosides from fertilized eggs of the sea hare *Aplysia kurodai*. **Liebigs Ann. Chem.**, Weinheim, n.6, p.585-7, 1988.

MOON, B.; BAKER, B.J.; McCLINTOCK, J.B. Purine and nucleoside metabolites from the Antarctic sponge *Isodictya erinacea*. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.61, n.1, p.116-8, 1998.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v.16, n.1-2, p.55-63, 1983.

MUNRO, M.H.G.; BLUNT, J.W.; DUMDEI, E.J.; HICKFORD, S.J.H.; LILL, R.E.; LI, S.; BATTERSHILL, C.N.; DUCKWORTH, A.R. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. **J. Biotechnol.**, Amsterdam, v.70, n.1-3, p.15-25, 1999.

MURATA, O.; SHIGEMORI, H.; ISHIBASHI, M.; SUGAMA, KO, HAYASHI, K.; KOBAYASHI, J. Eudistomidins E and F, new β -carboline alkaloids from the Okinawan marine tunicate *Eudistoma glaucus*. **Tetrahedron Lett.**, Oxford, v.32, n.29, p.3539-42, 1991.

NECHEV, J.; CHRISTIE, W.W.; ROBAINA, R.; De DIEGO, F.; POPOV, S.; STEFANOV, K. Lipid composition of the sponge *Verongia aerophoba* from the Canary Islands. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, Weinheim, v.104, n.12, p.800-7, 2002a.

NECHEV, J.; CHRISTIE, W.W.; ROBAINA, R.; De DIEGO, F.; IVANOVA, A.; POPOV, S.; STEFANOV, K. Chemical composition of the sponge *Chondrosia reniformis* from the Canary Islands. **Hydrobiologia**, Den Haag, v.489, n.1-3, p.91-8, 2002b.

NECHEV, J.; CHRISTIE, W.W.; ROBAINA, R.; De DIEGO, F.; POPOV, S.; STEFANOV, K. Chemical composition of the sponge *Hymeniacidon sanguinea* from the Canarian Islands. **Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.**, Oxford, v.137, n.2, p.365-74, 2004.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.67, n.8, p.1216-38, 2004.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. The influence of natural products upon drug discovery. **Nat. Prod. Rep.**, London, v.17, n.3, p.215-34, 2000.

NIWA, H.; INAGAKI, H.; YAMADA, K. Didemnilactone and neodidemnilactone, two new fatty acid metabolites possessing a 10-membered lactone from the tunicate *Didemnum moseleyi* (Herdman). **Tetrahedron Lett.**, Oxford, v.32, n.38, p.5127-8, 1991.

NIWA, H.; WATANABE, M.; INAGAKI, H.; YAMADA, K. Didemnilactones A and B and neodidemnilactone, three new fatty acid metabolites isolated from the tunicate *Didemnum moseleyi* (Herdman). **Tetrahedron**, Oxford, v.50, n.25, p.7385-400, 1994.

OKU, N.; MATSUNAGA, S.; FUSEYANI, N. Shishijimicins A-C, novel enediyne antitumor antibiotics from the ascidian *Didemnum proliferum*. **J. Am. Chem. Soc.**, Easton, v.125, n.8, p.2044-5, 2003.

PALERMO, J.A.; BRASCO, M.F.R.; HUGHES, E.A.; SELDES, A.M.; BALZARETTI, V.T.; CABEZAS, E. Short side chain sterols from the tunicate *Polizoa opuntia*. **Steroids**, Woburn, v.61, n.1, p.2-6, 1996.

PARAMESWARAN, P.S.; DAS, B.; KAMAT, S.Y. Lipid contents of the sponge *Haliclona* sp. **Indian J. Chem.**, New Delhi, v.33B, n.1, p.99-101, 1994.

PAWLIK, J.R. Marine invertebrate chemical defenses. **Chem. Rev.**, Washington, v.93, n.5, p.1911-22, 1993.

PETTIT, G.R.; McNULTY, J.; HERALD, D.L.; DOUBEK, D.L.; CHAPUIS, J.C.; SCHMIDT, J.M.; TACKETT, L.P.; BOYD, M.R. Antineoplastic agents. 362. Isolation and x-ray crystal structure of dibromophakellstatin from the Indian Ocean sponge *Phakellia mauritiana*. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.60, n.2, p.180-3, 1997.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Quim. Nova**, São Paulo, v.25, p.45-61, 2002. Suplemento 1.

POTTS, B.C.M.; FAULKNER, D.J.; CHAN, J.A.; SIMOLIKE, G.C.; OFFEN, P.; HEMLING, M.E.; FRANCIS, T.A. Didemnaketals A and B, HIV-1 protease inhibitors from the ascidian *Didemnum* sp. **J. Am. Chem. Soc.**, Easton, v.113, n.16, p.6321-2, 1991.

POUCHERT, C.J.; BEHNKE, J. **The Aldrich library of ^{13}C and ^1H FT NMR spectra**. Aldrich Chemical Company, 1993. v.3. 1035 p.

RAJU, B.L.; SUBBARAJU, G.V.; REDDY, M.C.; RAO, D.V.; RAO, C.B.; RAJU, V.S. Polyhydroxysterols from the soft coral *Sarcophyton subviride* of Andaman and Nicobar Coasts. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.55, n.7, p.904-11, 1992.

RAO, K.V.; SANTARSIERO, B.D.; MESECAR, A.D.; SCHINAZI, R.F.; TEKWANI, B.L.; HAMANN, M.T. New manzamine alkaloids with activity against infectious and tropical parasitic diseases from an Indonesian sponge. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.66, n.6, p.823-8, 2003.

RASHID, M.A.; GUSTAFSON, K.R.; BOYD, M.R. New cytotoxic *N*-methylated β -carboline alkaloids from the marine ascidian *Eudistoma gilboverde*. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.64, n.11, p.1454-6, 2001.

REDDY, G.B.S.; DHANANJAYA, N. Chemical investigation of *Mycale mytilorum* and a study on toxicity and antidiabetic activity of 5-octadecylpyrrole-2-carboxaldehyde. **Bioorg. Med. Chem.**, Oxford, v.8, n.1, p.27-36, 2000.

REDDY, S.M.; SRINIVASULU, M.; SATYANARAYANA, N.; KONDAPI, A.K.; VENKATESWARLU, Y. New potent cytotoxic lamellarin alkaloids from Indian ascidian *Didemnum obscurum*. **Tetrahedron**, Oxford, v.61, p.9242-7, 2005.

RINEHART, K.L.; KOBAYASHI, J.; HARBOUR, G.C.; HUGHES, R.G.; MIZSAK, S.A.; SCAHILL, T.A. Eudistomins C, E, K, and L, potent antiviral compounds containing a novel oxathiazepine ring from the Caribbean tunicate *Eudistoma olivaceum*. **J. Am. Chem. Soc.**, Easton, v.106, n.5, p.1524-6, 1984.

RINEHART, K.L.; KOBAYASHI, J.; HARBOUR, G.C.; GILMORE, J.; MASCAL, M.; HOLT, T.G.; SHIELD, L.S.; LAFARGUE, F. Eudistomins A-Q, β -carbolines from the antiviral Caribbean tunicate *Eudistoma olivaceum*. **J. Am. Chem. Soc.**, Easton, v.109, n.11, p.3378-87, 1987.

De ROSA, S.; KAMENARSKA, Z.; BANKOVA, V.; STEFANOV, K.; DIMITROVA-KONAKLIEVA, S.; NAJDENSKI, H.; TZVETKOVA, I.; POPOV, S. Chemical composition and biological activities of the Black Sea Algae *Polysiphonia denudata* (Dillw.) Kütz and *Polysiphonia denudata* f. *fragilis* (Sperk) Woronich. **Z. Naturforsch.**, Tübingen, v.56, n.11-12, p.1008-14, 2001.

De ROSA, S.; TOMMONARO, G.; SLANTCHEV, K.; STEFANOV, K.; POPOV, S. Lipophylic metabolites from the marine sponge *Ircinia muscarum* and its cell cultures. **Mar. Biol.**, Berlin, v.140, n.3, p.465-70, 2002.

De ROSA, S.; KAMENARSKA, Z.; STEFANOV, K.; DIMITROVA-KONAKLIEVA, S.; NAJDENSKI, C.; TZVETKOVA, I.; NINOVA, V.; POPOV, S. Chemical composition of *Corallina mediterranea* Areschoug and *Corallina granifera* Ell. Et Soland. **Z. Naturforsch.**, Tübingen, v.58c, n.5-6, p.325-32, 2003a.

De ROSA, S.; IODICE, C.; NECHEV, J.; STEFANOV, K.; POPOV, S. Composition of the lipophilic extract from the sponge *Suberites domuncula*. **J. Serb. Chem. Soc.**, Belgrade, v.68, n.4-5, p. 249-56, 2003b.

RUDI, A.; BENAYAHU, Y.; GOLDBERG, I.; KASHMAN, Y. Alkaloid metabolites of the marine tunicate *Eudistoma* sp.: segoline A, isosegoline A and nor-segoline. **Tetrahedron Lett.**, Oxford, v.29, n.31, p.3861-2, 1988a.

RUDI, A.; BENAYAHU, Y.; GOLDBERG, I.; KASHMAN, Y. Eilatin, a novel alkaloid from the marine tunicate *Eudistoma* sp. **Tetrahedron Lett.**, Oxford, v.29, n.50, p.6655-6, 1988b.

RUDI, A.; KASHMAN, Y. Six new alkaloids from the purple red sea tunicate *Eudistoma* sp. **J. Org. Chem.**, Easton, v.54, n.22, p.5331-7, 1989.

RUDI, A.; AKNIN, M.; GAYDOU, E.M.; KASHMAN, Y. Four new cytotoxic cyclic hexa- and heptapeptides from the marine ascidian *Didemnum molle*. **Tetrahedron**, Oxford, v.54, n.43, p.13203-10, 1998.

RUDI, A.; CHILL, L.; AKNIN, M.; KASHMAN, Y. Didmolamide A and B, two new cyclic hexapeptides from the marine ascidian *Didemnum molle*. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.66, n.4, p.575-7, 2003.

RUPPERT, E.E.; BARNES, R.D. In:_____. **Zoologia dos invertebrados**. 6.ed. São Paulo: Roca, 1996. cap.17, p.855-70.

SCHMITZ, F.J.; VANDERAH, D.J.; HOLLENBEAK, K.H.; ENWALL, C.E.L.; GOPICHAND, Y.; SENGUPTA, P.K.; HOSSAIN, M.B.; Van der HELM, D. Metabolites from the marine sponge *Tedania ignis*. A new atisanediol and several known diketopiperazines. **J. Org. Chem.**, Easton, v.48, n.22, p.3941-5, 1983.

SCHUMACHER, R.W.; DAVIDSON, B.S. Didemnolines A-D, new N9-substituted β -carboline derivatives from the marine ascidian *Didemnum* sp. **Tetrahedron**, Oxford, v.51, n.37, p.10125-30, 1995.

SCHUPP, P.; EDER, C.; PROKSCH, P.; WRAY, V.; SCHNEIDER, B.; HERDERICH, M.; PAUL, V. Staurosporine derivatives from the ascidian *Eudistoma toalensis* and its predatory flatworm *Pseudoceros* sp. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.62, n.7, p.959-62, 1999.

SCHUPP, P.; PROKSCH, P.; WRAY, V. Further new staurosporine derivatives from the ascidian *Eudistoma toalensis* and its predatory flatworm *Pseudoceros* sp. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.65, n.3, p.295-8, 2002.

SCHUPP, P.; POCHNER, T.; EDRADA, R.; EBEL, R.; BERG, A.; WRAY, V.; PROKSCH, P. Eudistomins W and X, two new β -carboline derivatives from the Micronesian tunicate *Eudistoma* sp. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.66, n.2, p.272-5, 2003.

SEARLE, P.A.; MOLINSKI, T.F. Structure and absolute configuration of (*R*)-(*E*)-1-aminotridec-5-en-2-ol, an antifungal amino alcohol from the ascidian *Didemnum* sp. **J. Org. Chem.**, Easton, v.58, n.26, p.7578-80, 1993.

SEGRAVES, N.L.; LOPEZ, S.; JOHNSON, T.A.; SAID, S.A.; FU, X.; SCHMITZ, F.J.; PIETRASZKIEWICZ, H.; VALERIOTE, F.A.; CREWS, P. Structures and cytotoxicities of fascaplysin and related alkaloids from two marine phyla – *Fascaplysinopsis* sponges and *Didemnum* tunicates. **Tetrahedron Lett.**, Oxford, v.44, n.17, p.3471-5, 2003.

SEGIN, D.F.; IRELAND, C.M. Iodinated phenethylamine products from a didemnid tunicate. **Tetrahedron Lett.**, Oxford, v.25, n.4, p.403-4, 1984.

SHOCHET, N.R.; RUDI, A.; KASHMAN, Y.; HOD, Y.; EL-MAGHRABI, M.R.; SPECTOR, I. Novel marine alkaloids from the tunicate *Eudistoma* sp. are potent regulators of cellular growth and differentiation and affect cAMP-mediated processes. **J. Cell. Physiol.**, New York, v.157, n.3, p.481-92, 1993.

SIMMONS T.L.; ANDRIANASOLO, K.M.; FLATT, P.; GERWICK W.H. Marine Natural products as anticancer drugs. **Mol. Cancer Ther.**, Philadelphia, v.4, n.2, p.333-42, 2005.

SLANTCHEV, K.; YALÇIN, F.; ERSÖZ, T.; NECHEV, J.; ÇAHS I.; STEFANOV, K.; POPOV, S. Composition of lipophilic extracts from two tunicates, *Styela* sp. and *Phallusia* sp. from the Eastern Mediterranean. **Z. Naturforsch.**, Tübingen, v.57c, n.5-6, p.534-40, 2002.

SMITH, C.J.; VENABLES, D.A.; HOPMANN, C.; SALOMON, C.E.; JOMPA, J.; TAHIR, A.; FAULKNER, D.J.; IRELAND, C.M. Plakinidine D, a new pyrroloacridine alkaloid from two ascidians of the genus *Didemnum*. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.60, n.10, p.1048-50, 1997.

SUBRAHMANYAM, C.; ANJANEYULU, C.V.R.V.; SATYANARAYANA, P.; RAO, P.V.S.; WARD, R.S.; PELTER, A. New diterpenes from a new species of *Lobophytum* soft coral of the South Andaman Coast. **Tetrahedron**, Oxford, v.48, n.15, p.3111-20, 1992.

TIAN, Z.; YANG, M.S.; HUANG, F.; LI, K.G.; SI, J.Y.; SHI, L.; CHEN, S.; XIAO, P.G. Cytotoxicity of three cycloartane triterpenoids from *Cimicifuga dahurica*. **Cancer Lett.**, Limerick, v.226, n.1, p.65-75, 2005.

TOSKE, S.G.; FENICAL, W. Cyclodidemnamide: a new cyclic heptapeptide from the marine ascidian *Didemnum molle*. **Tetrahedron Lett.**, Oxford, v.36, n.46, p.8355-8, 1995.

URBAN, S.; CAPON, R.J. Lamellarin-S: a new aromatic metabolite from an Australian tunicate, *Didemnum* sp. **Aust. J. Chem.**, Melbourne, v.49, n.6, p.711-3, 1996.

USOV, A.I.; SLANCHEV, K.I.; SMIRNOVA, G.P.; IVANOVA, A.P.; STEFANOV, K.L.; POPOV, S.S.; ANDREEV, S.N. Polar constituents of the tunicate *Botryllus schlosseri*. **Russ. J. Bioorganic Chem.**, New York, v.28, n.2, p.147-51, 2002.

VAN WAGONER, R.M.; JOMPA, J.; TAHIR, A.; IRELAND, C.M. Trypargine alkaloids from a previously undescribed *Eudistoma* sp. ascidian. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.62, n.5, p.794-7, 1999.

VAN WAGONER, R.M.; JOMPA, J.; TAHIR, A.; IRELAND, C.M. A novel modified pterin from a *Eudistoma* species ascidian. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.64, n.8, p.1100-1, 2001.

VÁZQUEZ, M.J.; QUIÑOÁ, E.; RIGUERA, R.; OCAMPO, A.; IGLESIAS, T.; DEBITUS, C. Caledonin, a natural peptide bolaphile with Zn^{II} and Cu^I complexing properties from the tunicate *Didemnum rodriguezi*. **Tetrahedron Lett.**, Oxford, v.36, n.48, p.8853-6, 1995.

VENKATESHAM, U.; RAO, M.R.; VENKATESWARLU, Y. New 5-alkylpyrrole-2-carboxaldehyde derivatives from the sponge *Mycale tenuispiculata*. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.63, n.9, p.1318-20, 2000.

VERAS, M.L.; BEZERRA, M.Z.B.; BRAZ-FILHO, R.; PESSOA, O.D.L.; MONTENEGRO, R.C.; PESSOA, C.O.; de MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V. Cytotoxic epimeric withaphysalins from leaves of *Acnistus arborescens*. **Planta Med.**, Stuttgart, v.70, n.6, p.551-5, 2004.

VERVOORT, H.C.; RICHARDS-GROSS, S.E.; FENICAL, W.; LEE, A.Y.; CLARDY, J. Didemnimides A-D: novel, predator-deterrent alkaloids from the Caribbean mangrove ascidian *Didemnum conchyliatum*. **J. Org. Chem.**, Easton, v.62, n.5, p.1486-90, 1997.

VERVOORT, H.C.; FENICAL, W.; KEIFER, P.A. A cyclized didemnimide alkaloid from the Caribbean ascidian *Didemnum conchyliatum*. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.62, n.2, p.389-91, 1999.

VERVOORT, H.; FENICAL, W.; EPIFANIO, R.A. Tamandarins A and B: new cytotoxic depsipeptides from a Brazilian ascidian of the family Didemnidae. **J. Org. Chem.**, Easton, v.65, n.3, p.782-92, 2000.

VICHNEWSKI, W. Cromatografia por adsorção. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. (Eds.) **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Editora da Unicamp, 1995. cap. 4, p.59-70.

VIRACAOOUNDIN, I.; FAURE, R.; GAYDOU, E.M.; AKNIN, M. A new alkaloid from the purple Indian Ocean tunicate *Eudistoma bituminis*. **Tetrahedron Lett.**, Oxford, v.42, n.14, p.2669-71, 2001.

de VRIES, D.J.; BEART, P.M. Fishing for drugs from the sea: status and strategies. **Trends Pharmacol Sci**, Amsterdam, v.16, n.8, p.275-9, 1995.

WRIGHT, A.D.; GOCLIK, E.; KÖNIG, G.M.; KAMINSKY, R. Lepadins D-F: antiplasmodial and antitrypanosomal decahydroquinoline derivatives from the tropical marine tunicate *Didemnum* sp. **J. Med. Chem.**, Washington, v.45, n.14, p.3067-72, 2002.

ZELNIK, R.; MATIDA, A.K.; DJERASSI, C.; KHALIL, M.W.; De FREITAS, J.C. Esteróis da túnica de *Ascidia nigra* (Savigny 1816) (Tunicata – Ascidiacea). **An. Acad. Bras. Cienc.**, Rio de Janeiro, v.53, n.4, p.733-6, 1981.