UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Suzi Oliveira Marques

Estudo químico da esponja *Dysidea robusta*

São Carlos

2009

Suzi Oliveira Marques

Estudo químico da esponja *Dysidea robusta*

Volume 1

Dissertação apresentada ao Instituto
de Química de São Carlos, da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências (Físico-Química)

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck

São Carlos

2009

DEDICATÓRIA

AOS MEUS PAIS, Sílvio e Neuza, meu maior tesouro, combustível e razão da minha luta! Pelo amor incondicional, carinho, confiança, apoio e compreensão em todos os momentos de minha vida.

*À minha irmã Carla, pelo amor
e cuidado, cada vez mais
maduros, que cultivamos!*

Ao meu querido Wladimir, meu amor e companheiro durante toda minha trajetória. Pela cumplicidade e amor!

Amo vocês!

*À Santa Rita de Cássia,
minha Santa Amada e Protetora!*

*Ao meu avô Bento, pela força
incessante de sua presença na
minha vida e no meu coração!*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Roberto Berlinck, pela confiança, ensinamentos, amizade e compreensão durante a realização deste trabalho.

Ao CNPq e FAPESP, pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

A minha grande amiga Naiara, pelo amor, cumplicidade e apoio durante os seis anos de convivência compartilhados e eterna amizade!

Aos meus amigos do Laboratório de Produtos Naturais, Simone, Fábio, Miriam, Eli, Marília, Raquel, Michelli, Renata, Stela, Richele, Carolina, Juliana, Marina, Camila e Milene pela alegria e amizade.

Ao Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira e Katyuscya Veloso (DQ- UFSCAR) pela colaboração na obtenção de espectros de RMN.

Ao Prof. Eduardo Hajdu, colaborador do projeto, pelo maravilhoso trabalho de identificação das esponjas.

A equipe do Prof. Dr. Andersen, da Universidade de Cambridge, Canadá, pela colaboração.

Aos colaboradores da Biblioteca da Química e da Seção de Pós-Graduação, em especial à Sílvia e Andréia.

E a todos aqueles que me incentivaram e estiveram ao meu lado durante a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Símbolos e Abreviaturas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Esponjas Marinhas	13
1.2. Produtos Naturais de Esponjas Marinhas	13
1.3. Esponjas do gênero <i>Dysidea</i>	14
2. OBJETIVOS	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1. Técnicas Cromatográficas	21
3.1.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)	21
3.1.2. Cromatografia em coluna pré empacotada Sep-Pak®	21
3.1.3. Cromatografia em coluna	21
3.1.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	22
3.1.5. Análises por LC-MS-ELSD	23
3.2. Solventes	24
3.3. Técnicas espectrométricas	24
3.3.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	24
3.3.2. Infravermelho (IV)	25
3.3.3. Espectrometria de Massa Atômica (EM)	25
3.3.4. Medidas de Rotação Específica ($[\alpha]^D$)	25
4. PARTE EXPERIMENTAL	26
4.1. ESTUDO DE INVERTEBRADOS MARINHOS	26
4.1.1. Avaliação biológica de alíquotas dos extratos selecionados	26
4.1.2. Extração e fracionamento dos extratos	28
4.1.2.1. Esponja <i>Dysidea robusta</i> (BA99ES-111)	28
4.1.2.2. Esponja <i>Dysidea robusta</i> (BA99ES-108)	35

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1. Isolamento e identificação dos compostos isolados da amostra 2 de <i>Dysidea robusta</i> – DR2.....	45
5.1.1. Fracionamento do extrato DR2-AQ-6.....	45
5.1.1.1. Fracionamento de DR2-AQ-6D e isolamento dos compostos: ácido pirodisinóico B (20), ácido pirodisinóico (18) e ácido isopirodisinóico (19).....	45
5.1.1.1.1. Determinação estrutural do ácido pirodisinóico (18).....	47
5.1.1.1.2. Determinação estrutural do ácido isopirodisinóico (19)...	51
5.1.1.1.3. Determinação estrutural do ácido pirodisinóico B (20)....	56
5.1.1.1.4. Determinação estrutural do ácido 13-hidróxi-isopirodisinóico (21).....	57
5.2. Isolamento e identificação dos compostos isolados da amostra de <i>Dysidea robusta</i> – DR1.....	61
5.2.1. Determinação estrutural das ceramidas 22 - 24 a partir de dados espectrocópicos de seus produtos de transesterificação 25 – 27	61
6. CONCLUSÃO	70
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

Lista de Figuras

Figura 1. Estruturas: furodisina e da lactona da O-etil-9-hidróxi.....	15
Figura 2. Estruturas de um esteroide poliidroxilado e haterumadisa A.....	15
Figura 3. Estruturas de linshuiperóxido (7) e spirolingsuolóldeo (8).....	16
Figura 4. Estruturas de hidroquinona sesquiterpenóidica e halissulfato 3....	16
Figura 5. Estruturas da classe das azirinas.....	17
Figura 6. Éteres difenílicos bromados.....	18
Figura 7. Estruturas do ácido herbácico e da barbamida.....	18
Figura 8. Estrutura da disidenina.....	19
Figura 9. Compostos puros isolados de <i>Dysidea rbosuta</i> (DR2).....	28
Figura 10. Fluxograma de obtenção dos extratos de <i>Dysidea robusta</i>	29
Figura 11. Fracionamento do extrato aquoso DR2-AQ.....	31
Figura 12. Fracionamento por HPLC dos extratos DR2-AQ-4 e DR2-AQ-6.	32
Figura 13. Análise da fração DR-2-Aq-6 por LC-PDA-MS-ELSD. Condições: coluna Phenyl- Inertsil –Phenomenex; grad. H ₃ O ⁺ (ácido fórmico) : MeOH; fluxo = 1 mL/min; λ = 254 e 280 nm.....	33
Figura 14. Análise da fração DR-2-Aq-6 por LC-DA em 254 nm Condições: coluna Phenyl- Inertsil –Phenomenex; grad. H ₃ O ⁺ (ácido fórmico) : MeOH; fluxo = 1 mL/min; λ = 254 e 280 nm.....	34
Figura 15. Mistura de ceramidas da esponja <i>Dysidea robusta</i> (DR1).....	35
Figura 16. Fluxograma de extração e fracionamento da esponja <i>D.</i> <i>robusta</i>	36
Figura 17. Fluxograma de obtenção dos extratos DR1-Aq e DR1-Ac.....	37
Figura 18. Fracionamento do extrato DR1-Ac por cromatografia em gel Sephadex LH-20.....	39
Figura 19. Fracionamento do extrato de éter de petróleo da esponja <i>D.</i> <i>robusta</i>	40
Figura 20. Separação das frações DR1-EP-5A e -5B, por solubilidade.....	41
Figura 21. Reação de acetilação da fração DR1-EP-5A, em piridina e anidrido acético.....	42
Figura 22. Isolamento do composto acetilado, DR1-EP-5A-4, por Sep Pak.	42

Figura 23. Mecanismo da reação de metanólise de DR1-EP-5A, gerando a fração esfingosínica DR1-EP-A-4-TD.....	44
Figura 24. Esquema de purificação e obtenção de 18 , 19 e 20	46
Figura 25. Estrutura dos compostos: ácido pirodisinóico (18), ácido isopirodisinóico (19) e ácido pirodisinóico B (20).....	46
Figura 26. Acoplamentos observados no espectro de RMN – COSY da fração DR2-AQ-6D-1-2.....	48
Figura 27. Estrutura do ácido pirodisinóico (18).....	49
Figura 28. Correlações do ácido pirodisinóico (DR2-AQ-6D-1-2) observadas no espectro tROESY.....	52
Figura 29. Correlações do ácido isopirodisinóico (DR2-AQ-6D-1-1) observadas no espectro HSQC.....	52
Figura 30. Acoplamentos ^1H - ^1H do ácido isopirodisinóico (DR2-AQ-6D-1-1) observadas no espectro COSY.....	53
Figura 31. Correlações do ácido isopirodisinóico (19) observadas no espectro RMN tipo HMBC	54
Figura 32. Correlações do ácido isopirodisinóico (19) observadas no espectro tROESY.....	55
Figura 33. Correlações do ácido pirodisinóico B (20) observadas no espectro tROESY.....	57
Figura 34. Estrutura do ácido 13-hidróxi-isopirodisinóico (21).....	58
Figura 35. Correlações do ácido 13-hidróxi-isopirodisinóico (21) observadas no espectro tROESY.....	59
Figura 36. Correlações observadas no espectro de RMN tipo COSY- ^1H - ^1H , da porção esfingosínica das ceramidas tetracetiladas 25-27	65
Figura 37. Correlações observadas no espectro de RMN tipo COSY- ^1H - ^1H , da porção do ácido graxo α -hidroxilado das ceramidas tetracetiladas 25-27	65
Figura 38. Correlações observadas no espectro de RMN tipo HMBC ^1H - ^{13}C das ceramidas tetracetiladas 25-27	66
Figura 39. Porção esfingosínica das estruturas básicas de 22-24	67
Figura 40. Estruturas das ceramidas isoladas e seus respectivos derivados acetilados.....	67
Figura 41. Estruturas das ceramidas similares a mistura 22-24	69

Lista de Tabelas

Tabela 1. Atividades biológicas apresentadas pelos extratos brutos das duas amostras de esponjas <i>Dysidea robusta</i> a serem estudadas.....	27
Tabela 2. Condições de análise por CCD dos extratos DR2-EP e DR2-AQ	30
Tabela 3. Extratos brutos da amostra DR1: Composições eluentes e padrões de comparação utilizados.....	38
Tabela 4. Dados da análise por LC-MS da fração DR1-EP-5A-4.....	43
Tabela 5. Dados comparativos de RMN- ¹ H para o ácido pirodisinóico, segundo Goetz, et al, 2001.....	49
Tabela 6. Dados comparativos de RMN- ¹³ C para o ácido pirodisinóico, segundo Goetz, et al, 2001.....	50
Tabela 7. Dados espectroscópicos de RMN- ¹ H, ¹³ C e HSQC para o ácido isopirodisinóico (19).....	52
Tabela 8. Dados comparativos de RMN- ¹ H, COSY ¹ H- ¹ H e ¹³ C entre o ácido pirodisinóico (18) e o ácido pirodisinóico B (20).....	56
Tabela 9. Dados espectroscópicos comparativos entre o ácido isopirodisinóico (19) e o ácido 13-hidróxi-isopirodisinóico (21).....	58
Tabela 10. Dados de RMN- ¹ H dos compostos 18 , 19 , 20 e 21 em DMSO- <i>d</i> ₆ (600 MHz) [δ, multiplicidade (<i>J</i> em Hz)].....	60
Tabela 11. Dados de RMN- ¹³ C e - ¹⁵ N dos compostos, 18 , 19 , 20 e 21 em DMSO- <i>d</i> ₆ (150 MHz).....	60
Tabela 12. Dados comparativos de RMN- ¹ H entre as ceramidas 25-27 , (CDCl ₃ , 400 MHz) e a mistura de ptiloceramidas isoladas da esponja <i>Ptilocaulis spiculifer</i>	64

Lista de Símbolos e Abreviaturas

IC₅₀ – Concentração que promove 50% de inibição da população testada

MS – *Mass Spectrometry*

UV - Ultravioleta

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

PDA – *Photodiode Array Detector*

ELSD – Evaporative Light Scattering Detector

RMN-¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

ESI-MS – Espectrometria de Massa Atômica por ionização de spray de elétrons

COSY – Correlation Spectroscopy

HSQC – Heteronuclear Single Quantum Coherence

HMBC – Heteronuclear Multiple Bond Coherence

HRESIMS – High Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry

tROESY – Transverse Rotating Frame Overhauser Enhancement Spectroscopy

s – singleto

d – dubleto

t – tripleto

q – quarteto

m – multipletto

RESUMO

SUZI, O. M. **Estudo químico da esponja *Dysidea robusta***. 2009. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

Esponjas do gênero *Dysidea* (Ordem: Dictyoceratida) caracterizam-se por apresentarem grande diversidade de metabólitos secundários, muitos dos quais apresentam potentes atividades biológicas. Este trabalho descreve o estudo de duas amostras de esponjas da espécie *Dysidea robusta*, DR1 e DR2, coletadas no litoral da Bahia em 1999. Tal estudo consistiu no fracionamento das amostras, nas análises de seus extratos brutos por LC-MS e técnicas de RMN- mono e bidimensionais. Dentre os extratos de DR1, a fração DR1-EP-5A obtida do extrato éter de petróleo apresentou uma mistura de três ceramidas saturadas (**22**, **23** e **24**). Já da amostra DR2, as frações do extrato aquoso DR2-AQ-6B e DR2-AQ-6D mostraram ser constituídas por derivados do ácido pirodisinóico (**18**, **19**, **20** e **21**). Com exceção do ácido pirodisinóico (**18**), os demais compostos isolados ainda não foram relatados na literatura.

Palavras-chave: *Dysidea*, metabólito secundário, ceramidas, derivados do ácido pirodisinóico; HPLC-PDA-MS.

ABSTRACT

SUZI, O. M. **Chemical study of the brazilian sponge *Dysidea robusta***. 2009.

Dissertation (Masters) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

Sponges of the genus *Dysidea* (Order: Dactyloceratida) are characterized as sources of several biologically active secondary metabolites. This work describes the study of two samples of *D.robusta*, DR1 and DR2, both collected at the Bahia state coastline, in 1999. The investigation aimed the crude extract fractionation and analysis by LC-MS and by 1D and 2D NMR techniques. Among the extracts DR1, the fraction DR1-EP-5A obtained from the petroleum ether extract showed a mixture of three saturated ceramides, represented by **22**, **23** and **24**. From the DR2 sample, the fractions obtained from the aqueous extract DR2-AQ-6B and -6D presented pyrodisinoic acid derivatives **18**, **19**, **20** and **21**. Except for pyrodisinoic acid (**18**), all other isolated compounds haven't been reported in the literature yet.

Keywords: *Dysidea*, secondary metabolite, ceramides, pyrodisinoic acid derivatives, HPLC-PDA-MS.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Esponjas marinhas

Pertencentes ao filo *Porifera*, as esponjas são os animais multicelulares mais primitivos. Não possuem órgãos, porém suas funções são desempenhadas por células do tecido conjuntivo, que é bem desenvolvido (Rupert, Barnes, 1996).

O nome *Porifera* origina-se do latim (porus = poro; ferre = portar). São animais aquáticos, predominantemente marinhos. Apresentam uma corrente unidirecional de água através de seu corpo, da qual se nutrem e também se utilizam para fins reprodutivos. O plano de construção dos poríferos é bem simples e apresenta uma constante reorganização do sistema aquífero (Kelly-Borges, 1995). As esponjas apresentam uma ampla distribuição geográfica, sendo abundantemente encontradas em todo o oceano, desde mares tropicais até glaciais.

1.2. Produtos Naturais Marinhos

Nos últimos 50 anos quase 20.000 produtos naturais marinhos foram descobertos, muitos com atividade farmacológica, incluindo acetogeninas, policetídeos, terpenos, alcalóides, peptídeos e metabólitos de origem biossintética mista (Faulkner, 2002).

Na década de 60 deram-se início as pesquisas com Produtos Naturais marinhos no Brasil. No entanto, ainda são poucas as informações sobre as

substâncias isoladas e a atividade biológica de produtos naturais de organismos marinhos coletados ao longo do litoral brasileiro (Berlinck et al, 2004).

O estudo químico de invertebrados marinhos, em especial com cnidários, teve grande impulso durante a década de 60 com o descobrimento das prostaglandinas em varias espécies de corais moles do Caribe (em especial a gorgónia *Plexaura homomalla*) (Weinnheimer, Spraggins, 1969). Desde então, ficou evidenciado o potencial destes organismos como produtores de compostos de interesse biológico e farmacológico.

As esponjas são os invertebrados marinhos que apresentam a maior diversidade de metabólitos secundários bioativos. Desde então, as esponjas do gênero *Dysidea* merecem destaque.

1.3. Esponjas do gênero *Dysidea*

Esponjas marinhas pertencentes ao gênero *Dysidea* (Ordem Dictyoceratida) vêm sendo investigadas por mais de 40 anos em função da grande diversidade de produtos naturais que este gênero apresenta. Alguns metabólitos da família *Dysideidae* incluem éteres difenílicos polibromados (Zhang et al., 2008) terpenos (Ueda et al., 2007), peptídeos modificados (Matsunaga; Fusetani, 2003), derivados atípicos de ácidos graxos (Skepper; Molinski, 2008), neurotoxinas funcionalizadas altamente polares (Sakai, et al., 1997), um meroterpeno-nucleosídeo conjugado (Sakai, et al. 1999), aminoácidos modificados (MacMillan; Molinski, 2000) e também um alcalóide peptídico ligado a um grupo guanidina (Caroll, et al. 2002). Uma vez que vários compostos de *Dysidea spp.* foram também isolados de cianobactérias, (Usher, et al., 2008; Sakai, et al., 2008; Flatt et al., 2005; Flowers et al., 1998) as quais também são uma importante fonte de

produtos naturais (Goetz, et al., 2001), o fato dessas esponjas terem estabelecido uma associação íntima com tais simbiossiontes durante a evolução faz desse grupo de esponjas marinhas uma notável fonte de metabólitos secundários bioativos e estruturalmente variados.

Dentre os compostos isolados de *Dysidea* spp. destacam-se os derivados sesquiterpênicos furodisina (**1**), a lactona da o-etil-9-hidróxi (**2**) e um esteroide poli-hidroxiado (**3**) (Piggott; Karuso, 2005), isolados de *Dysidea arenaria*, bem como a haterumadisa A (**4**), isolada de *Dysidea chlorea* (Ueda et al., 2006).

Figura 1. Estruturas: furodisina e a lactona da o-etil-9-hidróxi.

Figura 2. Estruturas de um esteroide poli-hidroxiado e haterumadisa A.

Também na classe dos sesquiterpenos incluem-se linshuiperóxido (**5**) e spirolingsuolídeo (**6**), ambos isolados de *Dysidea septosa* (Huang et al., 2008).

Uma nova hidroquinona sesquiterpenóidica, (**7**), isolada de *Dysidea arenaria* (Qiu; Wang, 2008) e o halissulfato 3 (**8**), um sulfato de sesterterpeno, com atividade antifúngica contra *Candida albicans* ($IC_{50} = 18.2 \mu\text{g/ml}$) (Lee, et al., 2008).

Figura 3. Estruturas de linshuiperóxido (**5**) e spirolingsuiolídeo (**6**).

Figura 4. Estruturas de hidroquinona sesquiterpenóidica e halissulfato 3.

Exemplos da grande diversidade química do gênero *Dysidea* são as azirinas, i.e., ácidos graxos modificados com um grupo azaciclopropeno, como o derivado **9** (Skepper, Molinski, 2008) e a disidazirina (**10**) (Molinski, Ireland, 1988). Este último apresentou atividade citotóxica contra células L1210 com IC_{50} de $0.27 \mu\text{g/mL}$. Tais compostos foram isolados da esponja *D. fragilis*.

Figura 5. Estruturas da classe das azirinas.

Uma outra classe biologicamente importante de compostos precedentes de espécies do gênero *Dysideidade* é a dos éteres difenílicos bromados. Vários destes compostos apresentaram atividades biológicas e farmacológicas. Dentre elas antiinflamatória e antitumoral, através do mecanismo de inibição da 15-lipoxigenase em mamíferos. Os compostos **11** e **12** foram isolados de *Dysidea* sp. (Zhang et al., 2008) e apresentaram atividade antitumoral. Tal classe de compostos caracteriza-se, além das diversas modalidades de atividades biológicas, pela ampla variação nos graus de hidroxilação, metoxilação e bromação, como se pode observar na figura 6.

Figura 6. Éteres difenílicos bromados.

Dentre as esponjas do gênero *Dysidea*, uma das espécies que mais se destacam é *Dysidea herbacea*. Dentre os metabólitos secundários já registrados pela literatura, incluem-se os compostos **13** e **14** (Utkina; Denisenko, 2006) da classe dos éteres difenílicos e peptídeos modificados derivados da leucina [ácido herbácico (**15**) e barbamida (**16**)] (MacMillan; Molinski, 2000).

Figura 7. Estruturas do ácido herbácico e da barbamida.

Juntamente com **15** e **16**, destaca-se ainda a disidenina (Kazlauskas, et al., 1977) (**17**), produzida por uma relação simbiótica entre *D. herbacea* e a cianobacteria *Oscillatoria spongelliae* (Hinde, et al., 1994).

Figura 8. Estrutura da disidenina.

Neste trabalho foi feito um estudo de duas amostras de de *Dysidea robusta* (Vilanova e Muricy, 2001; Muricy e Hajdu, 2006), com o intuito de se observar a diversidade química de seus metabólitos secundários e possíveis atividades biológicas.

A esponja *Dysidea robusta* é endêmica do Brasil e não há relatos na literatura sobre investigações químicas desta espécie.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como principais objetivos avaliar a diversidade do metabolismo secundário de duas amostras da espécie *Dysidea robusta*, realizando-se as seguintes etapas:

- Obtenção dos extratos brutos e fracionamento dos extratos por diversas modalidades cromatográficas, visando o isolamento de metabólitos puros;
- Determinação estrutural dos compostos puros isolados e;
- Se isolados em quantidades suficientes, realizar a avaliação biológica das substâncias puras.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Técnicas Cromatográficas

3.1.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

Foram utilizadas cromatofolhas de sílica-gel 60 sobre poliéster, com indicador ultravioleta F254, de dimensões 20 x 20 cm (Aldrich). As manchas nas cromatofolhas foram observadas sob luz ultravioleta (UV) Spectroline Model ENF-240 C/FE, no comprimento de onda de 254 nm e 365 nm, após eluição.

3.1.2. Cromatografia em coluna pré empacotada Sep-Pak®

Para cromatografias realizadas em colunas pré-empacotadas foram utilizadas as seguintes colunas: a) Waters Sep-Pak® vac 35cc com as seguintes fases estacionárias: sílica-gel, C₁₈ e cianopropila; b) Strata sílica-gel e C₁₈. O tipo de coluna e a massa de fase estacionária utilizados na coluna foram escolhidos, respectivamente, de acordo com a natureza da amostra a ser fracionada e de sua quantidade.

3.1.3. Cromatografia em coluna

Para a cromatografia em coluna foi utilizada a técnica de permeação em gel Sephadex LH-20. Utilizou-se uma coluna de vidro com 170 cm de altura e 2 cm de diâmetro interno e MeOH grau analítico como eluente.

3.1.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Para as análises por HPLC foram utilizados dois equipamentos da marca Waters: um sistema com duas bombas Pump 600, um detector espectrofotométrico UV-Visível modelo 2487 com leitura em dois comprimentos de onda, um registrador modelo 746 e um sistema de controle Controller 600; o outro sistema utilizado é idêntico ao primeiro, porém com detector de arranjo de fotodiodos (PDA), e monitoramento pelo Software Millenium, versão 4.00. Em ambos os sistemas, foi utilizado fluxo de gás hélio para degaseificação dos eluentes.

Nas análises e separações por HPLC, foram utilizadas as seguintes colunas cromatográficas: a) de fase normal: coluna semi-preparativa Waters μ -porasil sílica gel 125 Å, 10 μ m, de dimensões 7,8 x 300 mm; b) fase reversa: coluna analítica C₁₈ Phenomenex, 5 μ m, de dimensões 4,6 x 250 mm; coluna analítica GL Sciences Inc., C₁₈ Inertsil, 5 μ m, de dimensões 4,6 x 250 mm; coluna analítica GL Sciences Inc., Phenyl Inertsil, 5 μ m, de dimensões 4,6 x 250 mm; coluna semipreparativa CSC-Inertsil, ODS-2, 150 Å, 5 μ m, de dimensões 0,94 x 25 cm; coluna semipreparativa Waters μ -Bondapak Phenyl, 125 Å, 10 μ m, dimensões 7,8 x 300 mm; coluna preparativa Whatman Partisil ODS-3, de dimensões 9,5 x 500 mm; e coluna preparativa Waters C₁₈ Deltapak, 100 Å, 15 μ m, de dimensões 19 x 300 mm.

3.1.5. Análises por LC-MS-ELSD

Nas análises por LC-MS-ELSD foram utilizados os seguintes equipamentos: um cromatógrafo Waters Alliance Series – Column Heater and Column Heater/Cooler, modelo 2695; um detector ultravioleta com arranjo de fotodiodos Waters 2996; um espectrômetro ESCi Multi-mode Ionization Source; e um detector de espalhamento de luz Waters 2424 Evaporative Light Scattering Detector. Tais análises foram monitoradas pelos softwares Empower 2 e ZQ V4.1/ ZQ Mass Detector Software.

Após os fracionamentos de todos os extratos das esponjas estudadas, foram selecionadas frações para análises por LC-MS-ELSD. Por ser uma técnica com sensibilidade suficiente para detectar pequenas quantidades em massa, foram selecionadas aquelas frações de maior interesse para o estudo, que compreendiam misturas complexas de substâncias. Além do mais, a técnica de espalhamento de luz permite verificar se há compostos que não possuem cromóforos, ou seja, que não absorvem na região do ultravioleta. Outra vantagem da utilização deste tipo de detector é que as análises permitem verificar se existem, em frações de pouca massa, compostos majoritários, uma vez que o sinal obtido em ELSD é proporcional à concentração de cada composto presente na mistura.

Das diversas frações analisadas, somente de algumas delas foi possível realizar o isolamento de compostos puros. Nas análises de espectrometria de massas, foi utilizado um espectrômetro operando em dois diferentes modos, APCi e ESI, dependendo da natureza da fração, de sua polaridade, solubilidade e afinidade com diversas fases estacionárias. Nas análises por HPLC foram

utilizados tanto fase reversa quanto normal, prevalecendo o uso das fases estacionárias C₁₈ ou fenila; e sílica gel, respectivamente.

3.2. Solventes

Para cromatografias em camada delgada e de coluna em geral, foram utilizados solventes de pureza analítica das marcas Sinth e Quimex. Para cromatografia líquida de alta eficiência foram utilizados solventes grau HPLC das marcas J. T. Baker e Mallinckrodt. A água utilizada em todos os processos cromatográficos foi fornecida por um sistema Milli-Q Millipore equipado com resina de troca iônica e filtro biológico.

As frações aquosas resultantes das cromatografias em fase reversa foram evaporadas utilizando um sistema de centrífuga a vácuo da marca Savant, modelo SpeedVac®Plus SC 210.

3.3. TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS

3.3.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram obtidos nos seguintes aparelhos:

- Bruker DRX (9,4 Tesla), operando a 400,35 MHz na frequência do hidrogênio (¹H) e a 100,1 MHz na frequência do carbono (¹³C), pertencente ao DQ-UFSCar;
- Bruker AV-600, operando a 600 MHz na frequência do hidrogênio (¹H) e a 150 MHz na frequência do carbono (¹³C).

As amostras foram preparadas com os seguintes solventes deuterados: clorofórmio deuterado (CDCl₃), acetonitrila deuterada (CD₃CN), metanol

deuterado, (CD₃OD), dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆) e piridina deuterada (py-*d*₅), todos da marca Cambridge Isotopes. O padrão de referência interna utilizado foi o tetrametilsilano (TMS), da Cambridge Isotopes.

3.3.2. Infravermelho (IV)

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro FTIR Bomem, modelo MB-102, pertencente ao IQSC – USP. As amostras foram dissolvidas em um solvente volátil e aplicadas sob forma de filme em disco de silício. Posteriormente, o disco de silício foi colocado em um dessecador para evaporação completa do solvente.

3.3.3. Espectrometria de Massa (EM)

Os espectros de massas foram obtidos utilizando-se um espectrômetro Bkuker-Hewlett-Pachard 1100.

As análises por espectrometria de massas foram realizadas com ionização do tipo ESI (Electro-Spray) e APCi (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)).

3.3.4. Medidas de Rotação Específica ($[\alpha]^D$)

Os experimentos de rotação específica foram realizados em um polarímetro Jasco P-1010, a 589 nm.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. ESTUDO DE INVERTEBRADOS MARINHOS

4.1.1. Avaliação biológica de alíquotas dos extratos selecionados

Alíquotas dos extratos de todas as amostras de esponjas marinhas foram avaliadas quanto à sua bioatividade, em vários ensaios biológicos. A escolha dos invertebrados para estudo foi feita em função dos resultados obtidos pelos bioensaios.

Os extratos brutos das duas amostras de *Dysidea robusta* apresentaram-se ativos contra *S. aureus*, *E. coli*, *S. aureus* resistente a oxilina, *M. tuberculosis* H37R, também atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais dos pulmões MCF-7 e do cólon, HCT-8 (Selegim et al, 2007).

O motivo pelo qual foram selecionadas duas amostras da mesma espécie, DR1 e DR2, foi verificar a existência ou não de diferentes classes de metabólitos entre amostras coletadas em uma mesma área geográfica.

Tabela 1. Atividades biológicas apresentadas pelos extratos brutos das duas amostras de esponjas *Dysidea robusta* a serem estudadas (Seleglim et al, 2007)

Atividade	BA99-ES-108 (DR1)	BA99ES-111 (DR2)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	+	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (linhagem resistente # 6.4)	+	+
<i>S. aureus</i> resistente a oxacilina	+	+
<i>S. aureus</i> resistente a oxacilina (linhagem # 35);		+
<i>S. aureus</i> resistente a oxacilina (linhagem # 36);		+
<i>S. aureus</i> resistente a oxacilina (linhagem # 61);	+	
<i>S. aureus</i> resistente a oxacilina (linhagem # 63);	+	+
<i>S. aureus</i> resistente a oxacilina (linhagem # 68);	+	+
<i>S. aureus</i> resistente a oxacilina (linhagem # 108);		+
<i>S. aureus</i> resistente a oxacilina (linhagem # 115);	+	+
<i>S. aureus</i> resistente a oxacilina (linhagem # 135); nível de atividade antibacteriana: + inhibition hallii >5 mm and < 10 mm;	+	+
MCF-7 Células do cancer de pulmão	+	+++
HCT-8 Células do cancer do colon	+++	
Células de melanoma murino B16; Nível de atividade citotóxica: + inibição de até 50% do crescimento das células cancerígenas;+++ inibição maior que 75% do crescimento da célula	+	+++

4.1.2. Extração e fracionamento dos extratos

4.1.2.1. Esponja *Dysidea robusta* (BA99ES-111)

A esponja foi coletada no litoral baiano em 1999. A amostra (BA99ES-111) da esponja *Dysidea robusta* foi identificada pela equipe do Prof. Eduardo Hajdu, do Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Após liofilização da esponja congelada, a amostra foi armazenada em MeOH:EtOH 1:1 a 0°C.

O fracionamento do extrato polar desta esponja levou ao isolamento do ácido pirodisinóico (**18**), do ácido isopirodisinóico (**19**), do ácido pirodisinóico B (**20**) e do ácido 13-hidróxi-isopirodisinóico (**21**).

Figura 9. Compostos puros isolados de *Dysidea robusta* (DR2).

A amostra selecionada para estudo foi codificada como “DR2” (= *Dysidea robusta*; amostra 2) e pesada, obtendo-se uma massa úmida de aproximadamente

100g. Em seguida, esta foi triturada com MeOH:EtOH 1:1 e filtrada a vácuo através de Celite. O material sólido foi submetido a mais uma extração com 300 mL de MeOH, a temperatura ambiente, sob agitação, por doze horas. O resíduo sólido foi separado do filtrado por filtração através de Celite em papel de filtro e o líquido foi parcialmente evaporado, obtendo-se desta forma o extrato bruto.

Ao extrato bruto dissolvido em MeOH e EtOH ($V \sim 300$ mL) foram adicionados 10% vol. de H_2O e em seguida realizaram-se três partições líquido-líquido com éter de petróleo, utilizando-se 300 mL de éter de petróleo por cada extração. Das partições realizadas obtiveram-se dois extratos, éter de petróleo (DR2-EP) e metanólico/aquoso (DR2-AQ), que após evaporação total dos solventes, a massa obtida foi de, respectivamente, 146 e 907 mg. Todo o procedimento é sumarizado e ilustrado no fluxograma a seguir:

Figura 10. Fluxograma de obtenção dos extratos de *Dysidea robusta*

Os dois extratos foram detalhadamente analisados por cromatografia em camada delgada em placas de sílica gel com dimensões de 20 x 20 cm, com indicador UV e comparados com padrões de metabólitos primários (colesterol e timidina). Os extratos foram eluídos com diversas composições eluentes, afim de se observar todas as manchas possíveis em seus variados tempos de retenção. Todas as placas foram observadas à luz UV em 254 nm e 365 nm e reveladas com: a) solução de ninidrina 0,1% em EtOH, que revela aminas primárias e secundárias; b) reagente de Dragendorff, que detecta a presença de alcalóides; e c) solução de ácido fosfomolibdico 5% em EtOH, agente oxidante de compostos que contêm ligações π . Uma relação completa da análise por CCD está descrita na tabela 2.

Tabela 2 : Condições de análise por CCD dos extratos DR2-EP e DR2-AQ:

Extrato	Composições eluentes	Padrão / composição eluente
DR2-EP	éter de petróleo/ EtOAc: 9:1, 7:3 e 1:1	Colesterol/ éter de petróleo/EtOAc/MeOH 50:48:2
DR2-AQ	CH ₂ Cl ₂ / MeOH 9:1 e 7:3	Timidina/ diclorometano/metanol 7:3

O extrato DR2-EP apresentou grande quantidade de compostos com absorção em 254 nm e que migraram abaixo do colesterol, indicando a possível presença de compostos contendo grupos polares. Sendo assim, o extrato DR2-EP foi submetido a um pré-fracionamento em coluna Sep Pak (10,0 g) de sílica gel, objetivando-se desengordurar o extrato. As frações obtidas foram analisadas por LC-MS. Tendo-se obtido um grande número de frações em quantidades muito pequenas (poucos miligramas de cada fração), descartou-se o prosseguimento do estudo da fração DR2-EP.

O extrato DR2-AQ apresentou várias substâncias com tempo de retenção menor que o do padrão timidina e alto grau de polaridade. Geralmente, compostos que apresentam este comportamento em relação à timidina, constituem metabólitos primários sem interesse (aminoácidos essenciais e nucleosídeos). Entretanto, em função de uma pequena quantidade de manchas de polaridade menor que a do padrão, considerou-se viável o estudo deste extrato.

Desta forma, depois de estabelecidas as condições de fracionamento de ambos extratos, tal procedimento foi realizado de acordo com o fluxograma da figura 11:

Figura 11. Fracionamento do extrato aquoso DR2-AQ.

Neste processo, o extrato DR2-AQ foi eluído a um gradiente crescente de MeOH em H₂O, iniciando-se com 100% de água (50 mL) e aumentando-se gradativamente em proporções de 5% de MeOH a composição da mistura, até 100% de metanol. Foram obtidos 124 tubos de ensaio, com aproximadamente 7 mL cada. As frações foram analisadas por CCD, eluídas em CH₂Cl₂/MeOH 8:2, observadas sob UV em $\lambda = 254$ nm e reunidas conforme semelhanças nos tempos de retenção das manchas.

Após reunião, as frações obtidas foram novamente analisadas por CCD e em função dos resultados (complexidade química, quantidade em massa) e algumas delas foram submetidas a separações por HPLC.

As frações DR2-AQ-4 e DR2-AQ-6 (figura 12) foram analisadas por LC-PDA-MS-ELSD. Para ambas, foi utilizado um sistema gradiente de eluição, constituído por MeOH e H₂O + 0,1% de ácido fórmico.

Figura 12. Fracionamento por HPLC dos extratos DR2-AQ-4 e DR2-AQ-6

Após tal análise, a fração DR2-AQ-4 foi purificada por HPLC. Utilizou-se como fase estacionária uma coluna Phenyl – Inertsil e como fase móvel um gradiente de MeOH em H₂O + 0,1% de ácido fórmico, a uma taxa de 1 mL por minuto, com detecção UV em dois comprimentos de onda, 220 e 254 nm. Coletaram-se três frações, sendo que a fração DR2-AQ-4B apresentou vários compostos. Análises por RMN-¹H das frações DR2-AQ-4A e –4C indicaram misturas razoavelmente complexas. Portanto, em função da quantidade escassa de massa e da complexidade das frações, o estudo destas foi interrompido.

A fração DR2-Aq-6 foi analisada por LC-MS-ELSD com MS no modo eletrospray positivo (figura 13) e estabeleceu-se uma condição favorável de separação dos picos da fração.

Em seguida, esta foi purificada em HPLC (figura 14) com detector UV em 254 e 280 nm, em uma coluna Phenyl Inertsil semipreparativa, utilizando gradiente de H₂O + 0,1% de ácido fórmico em MeOH, em um fluxo de 1 mL por minuto. Foi possível coletar quatro picos bem definidos (DR2-Aq-6B, -6C, -6D e -6F) e outras duas misturas de picos superpostos (frações DR2-Aq-6A e -6E).

Figura 13. Análise da fração DR-2-Aq-6 (23,0 mg) por LC-PDA-MS-ELSD

(condições: Coluna Phenyl- Inertsil – Phenomenex; grad. H₂O + 0,1% de ácido fórmico : MeOH; fluxo 1 mL/min; Ion mode ESI⁺).

Figura 14. Cromatograma da separação semipreparativa da fração DR-2-Aq-6 por LC-DA em 254 nm. Condições: coluna Phenyl- Inertsil –Phenomenex; grad. H_3O^+ (ácido fórmico) : MeOH; fluxo = 1 mL/min; λ = 254 e 280 nm.

Foram obtidos espectros de RMN- ^1H das frações DR2-Aq-6B, -6C, -6D e -6F. As análises indicaram que as frações -6C, -6D e -6F eram misturas de dois ou mais compostos e que a fração DR2-Aq-6B de massa igual a 5,5 mg continha um composto majoritário, juntamente com impurezas. Desta forma, a fração DR2-Aq-6B foi repurificada por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. Foi utilizada em tal processo uma coluna CSC-Inertsil 150A/ODS2, 5 μm , 25 X 0.94 cm, com eluição de (0.05% TFA/ H_2O)/MeCN, resultando no isolamento do ácido 13-hidróxi-isopirodisinóico (**21**) (1,3 mg).

Utilizando-se as mesmas condições, a purificação da fração DR2-AQ-6D (3,7 mg) forneceu o ácido pirodisinóico B (**20**) (0,2 mg) e uma mistura de ácido pirodisinóico (**18**) e do ácido isopirodisinóico (**19**). A mistura de **18** e **19** foi fracionada por HPLC em fase reversa (C_{18}), usando a mesma coluna em uma mistura 3:2 MeOH/(0,05% TFA/ H_2O) como eluentes, obtendo-se o ácido pirodisinóico (**18**) (0,2 mg) e o ácido isopirodisinóico (**19**) (0,5 mg).

Os compostos obtidos foram analisados por técnicas de RMN bidimensionais, tendo por fim suas estruturas determinadas. Todo o processo de determinação estrutural dos compostos está descrito no item Resultados e Discussão, página 45.

4.1.2.2. Esponja *Dysidea robusta* (BA99ES-108)

A esponja de código BA99ES-108 também foi coletada no litoral baiano em 1999. A amostra foi liofilizada e armazenada em MeOH/EtOH 1:1 a 0°C.

O fracionamento do extrato hexânico desta esponja levou ao isolamento da mistura de ceramidas **22**, **23** e **24**.

Figura 15. Mistura de ceramidas da esponja *Dysidea robusta* (DR1).

A amostra de *Dysidea robusta* foi codificada como “DR1” (= *Dysidea robusta*; amostra 1) e sua massa úmida (300 g) foi triturada com MeOH:EtOH 1:1 e filtrada a vácuo através de Celite. Foram realizadas mais duas extrações com 300 mL de MeOH, a temperatura ambiente, sob agitação, por vinte horas. O resíduo sólido foi separado do filtrado por filtração através de Celite em papel de filtro e o extrato

bruto em solução foi obtido através de evaporação parcial (até ~ 300 mL) da mistura de solventes.

Ao extrato bruto foram adicionados aproximadamente 150 mL de água milli-Q e 300 mL de hexano. Todo o volume (750 mL) foi conduzido a um funil de separação e submetido a uma partição líquido-líquido da mistura. Esta partição foi realizada três vezes, tendo-se utilizado 300 mL de hexano a cada partição. Após evaporação da fração hexânica, foram obtidos 668,4 mg de extrato hexânico seco. Este procedimento está ilustrado no fluxograma seguinte.

Figura 16. Fluxograma de extração e fracionamento da esponja *D. robusta*.

Quanto à mistura remanescente - DR1-MeOH/Aq - todo o solvente orgânico (metanol e pequena quantidade de etanol) foi evaporado, de maneira que só restasse água. Foram adicionados a este volume mais 100 mL de água Milli-Q e 250 mL de acetato de etila. Todo o volume foi submetido a uma partição líquido-líquido com água e acetato de etila, por três vezes, adicionando-se 250 mL de

acetato de etila por vez. Desta maneira, a etapa de partição líquido-líquido foi finalizada, obtendo-se os dois últimos extratos, o aquoso (DR1-Aq) e o extrato acetato de etila (DR1-Ac). O procedimento está descrito conforme a figura a seguir:

Figura 17. Fluxograma de obtenção dos extratos DR1-Aq e DR1-Ac.

Após todo o processo de obtenção dos extratos, estes foram cuidadosamente analisados por CCD e comparados com padrões de aminoácidos e esteróis. As análises foram feitas em placas de sílica gel de dimensões 20 x 20 cm com indicador ultravioleta na região de 254 nm. Foi utilizado o colesterol como padrão de comparação na análise do extrato éter de petróleo. Já para o extrato aquoso foi utilizada a timidina como padrão. O extrato acetato de etila, por apresentar um caráter de polaridade médio entre os extratos éter de petróleo e aquoso, foi analisado com ambos os padrões. As placas foram eluídas com diferentes composições de misturas eluentes e todas elas, após eluição, foram observadas a luz UV em 254 nm e 365 nm e reveladas com diferentes reagentes específicos. Todo o processo está descrito na tabela 3:

Tabela 3: Extratos brutos da amostra DR1: Composições eluentes e padrões de comparação utilizados

Extrato	Composições eluentes	Padrão; composição eluente
DR1-EP	éter de petróleo/ EtOAc: 90:10, 70:30 e 50:50	Colesterol; E.P/EtOAc/MeOH 50:45:5
DR1-Ac	éter de petróleo/ EtOAc, 70:30 e 50:50	Timidina; E.P/CH ₂ Cl ₂ /EtOAc, 25:25:50; Colesterol; E.P/CH ₂ Cl ₂ /EtOAc, 40:30:30
DR1-Aq	CH ₂ Cl ₂ / MeOH, 90:10 e 70:30	Timidina; CH ₂ Cl ₂ /MeOH, 70:30

Dos três extratos analisados, apenas o extrato aquoso apresentou um perfil cromatográfico de pouco interesse para o estudo, uma vez que foram observadas somente manchas com tempo de retenção menor que a da timidina, indicando provavelmente a presença de metabólitos primários ligados a açúcares, que são classes de compostos comuns. Além do mais, grande parte da massa do extrato aquoso mostrou ser constituída de sais. Os extratos éter de petróleo e acetato de etila (DR1-EP e DR1-Ac, respectivamente) apresentaram perfis químicos interessantes frente aos padrões. Em função destes resultados, o extrato EtOAc foi selecionado para ser fracionado.

O extrato DR1-Ac, contendo 335,0 mg de massa, foi submetido a cromatografia em coluna de gel Sephadex LH-20, com eluição isocrática de MeOH. Com o auxílio de um coletor automático, as frações de 500 gotas foram coletadas, por ação da gravidade, gerando 95 tubos de ensaio. O solvente de eluição foi evaporado em um sistema SpeedVac®. As frações foram analisadas por CCD em sílica gel com indicador UV. A análise compreendeu eluição com

$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 90:10, observação a luz UV em 254 e 365 nm e revelação com ninidrina. As frações foram reunidas de acordo com suas características químicas, gerando onze frações finais, denominadas de DR1-Ac-1 a DR1-Ac-11. Estas frações resultantes do processo foram transferidas para frascos, foram evaporadas, secas em um dessecador a vácuo e tiveram suas massas determinadas. Por fim, foram novamente analisadas por CCD e reveladas com ninidrina e ácido fosfomolibdico. O processo está ilustrado na figura 18.

Figura 18. Fracionamento do extrato DR1-Ac por cromatografia em gel Sephadex LH-20.

A análise por CCD de cada fração final indicou manchas avermelhadas intensas provenientes da revelação com ninidrina, significando a predominância de metabólitos primários (aminoácidos e nucleosídeos) cuja natureza não é interessante ao estudo. Em função destes indicadores, descartou-se o estudo dessas frações.

A fração DR1-EP foi submetida a uma separação por cromatografia em coluna Sep Pak® de sílica gel (figura 19). No processo foi utilizado um gradiente de "P" (EtOAc/MeOH 9:1) em "A" (éter de petróleo/ CH_2Cl_2). Foram obtidas 96

frações, contendo 8 mL cada. As frações foram analisadas por CCD sob eluição de uma mistura de éter de petróleo, CH_2Cl_2 , EtOAc e MeOH, em composições variadas. As frações foram aplicadas sobre cromatofolhas de Si com indicador ultravioleta, as quais foram observadas sob luz UV em 254 nm. Desta maneira, as frações foram reunidas conforme seus padrões de absorção e tempos de retenção semelhantes. Foram obtidas nove frações, de DR1-EP-1 a DR1-EP-9. Estas frações apresentaram um perfil bastante complexo, contendo variações de polaridades consideráveis em uma mesma fração, de acordo com interações com a sílica gel.

Figura 19. Fracionamento do extrato de éter de petróleo da esponja *D. robusta*.

A fração DR1-EP-5 resultou da reunião de frações semelhantes eluídas em uma proporção de polaridade média (gradiente de hexano, CH_2Cl_2 , EtOAc e MeOH). Com o intuito de se purificar esta fração, foram realizados vários testes de solubilidade em hexano, CH_2Cl_2 , CHCl_3 , EtOAc, ACN, acetona, MeOH, EtOH, DMSO e H_2O , tanto puros quanto em misturas destes solventes. A fração mostrou-se insolúvel em todos os testes, sendo parcialmente solúvel em MeOH, resultando em uma solução límpida amarelada com partículas brancas sólidas suspensas. Desta forma, o frasco contendo a mistura foi submetido à

centrifugação e separou-se a parte insolúvel (DR1-EP-5A) da parte solúvel em MeOH (DR1-EP-5B). A fração DR1-EP-5A demonstrou ser solúvel somente em piridina (figura 20).

Figura 20. Separação das frações DR1-EP-5A e -5B, por solubilidade.

A fração DR1-EP-5A demonstrou caráter anfifílico através da análise por CCD. Foi então dissolvida em piridina e enviada para análise por RMN-¹H, que demonstrou sinais intensos na região de δ 1.26 indicando metilenos em uma cadeia longa, e um sinal em δ 8.57 correspondente a um grupo N-H, para o composto majoritário (Figura 1, p. 6 – 11, Volume 2). Tal análise permitiu-nos identificar parcialmente a substância da fração DR1-EP-5A-4 como sendo uma mistura de ceramidas. (ver determinação estrutural na página 62).

Desta forma, realizou-se uma reação de esterificação dos grupos hidroxila (figura 21), para tornar a fração solúvel em solventes orgânicos apolares, com o intuito de viabilizar a separação por HPLC. Foram utilizados 15,0 mg dos cristais dissolvidos em 1,5 mL de piridina e 1,5 mL de anidrido acético, sob agitação em temperatura ambiente, por 24 horas.

Figura 21. Reação de acetilação da fração DR1-EP-5A, em piridina e anidrido acético.

Com o objetivo de pré-purificar a amostra, a mistura foi submetida à cromatografia em coluna Sep Pak sílica gel (1g), através de um gradiente de MeOH, CH₂Cl₂ e éter de petróleo. Foram coletadas 105 frações, sendo uma a uma analisada por CCD (eluição: hexano/EtOAc 9:1). As frações foram devidamente reunidas em seis finais, DR1-EP-5A-1 a DR1-EP-5A-6 (figura 22). Através de análises das frações por RMN-¹H, foi possível identificar o composto acetilado na fração DR1-EP-5A-4.

Figura 22. Isolamento do composto acetilado, DR1-EP-5A-4, por Sep Pak.

A fração DR1-EP-5A-4 foi submetida a análise por LC-MS (tabela 4), utilizando-se um fluxo de 1,0 mL/min do eluente em coluna de fase normal (sílica gel) e no modo APCi⁺ para a análise de massa atômica.

Tabela 4: Dados da análise por LC-MS da fração DR1-EP-5A-4.

Condições de análise	LC	MS
DR1-EP-5A-4	Coluna: Waters Sílica μ -porasil Eluição Isocrática: Hexano/EtOAc/MeOH 70:27:3 Fluxo: 1 mL/min	Modo: APCi ⁺ contínuo Corona: 3,0 Cones: 25 e 50 V Extractor: 3.0 Source Temp: 100.°C APCi Probe Temp: 200 °C Scan Time: 1s

Com o intuito de facilitar o processo de determinação estrutural da ceramida isolada, foi realizada, com uma alíquota do composto original (DR1-EP-5A), uma reação de metanólise (Ahmed et al., 2008). Tomou-se 3,0 mg da fração original (não acetilada), a qual foi submetida a refluxo com 10,0 mL de MeOH e uma solução 1N de HCl, por quatro horas. Em seguida, a mistura foi extraída três vezes com hexano e evaporada, gerando a fração hexânica, DR1-EP-5A-Hex, de massa igual a 1,2 mg. À parte aquosa remanescente foi adicionado um excesso de solução de NaOH 10%, até atingir pH-12,0. A fase aquosa alcalinizada foi extraída com CH₂Cl₂ por três vezes. Após o solvente ter sido evaporado, obteve-se a fração DR1-EP-5A-TD, de massa igual a 1,4 mg, segundo a ilustração a seguir:

Figura 23. Mecanismo da reação de metanólise de DR1-EP-5A, gerando a fração esfingosínica DR1-EP-A-4-TD.

A porção esfingosínica foi então submetida a análises bidimensionais de RMN- 1H , ^{13}C e espectrometria de massas (Figuras 9 e 10, pp. 25 – 29, Volume 2), podendo ter desta forma sua estrutura determinada.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Isolamento e identificação dos compostos isolados da amostra 2 de *Dysidea robusta* – DR2.

5.1.1. Fracionamento do extrato DR2-AQ-6

A fração aquosa DR2-AQ-6 foi submetida a análise por HPLC-DA (condições : coluna Phenyl- Inertsil – Phenomenex; gradiente de H_3O^+ (ácido fórmico) : MeOH; fluxo = 1 mL/min; λ = 254 e 280 nm). Foram obtidas as frações DR2-AQ-6A a DR2-AQ-6F, cujos picos majoritários corresponderam às frações DR2-AQ-6B e DR2-AQ-6D. A fração DR2-AQ-6A apresentou-se como uma mistura muito complexa, cuja separação não foi possível. E as frações DR2-AQ-6C e -6F apresentaram-se com quantidades em massa muito pequenas. Assim sendo, as frações DR2-AQ-6B e DR2-AQ-6D foram analisadas por RMN, a primeira apresentando-se como uma fração quase pura e a segunda, como uma mistura de vários compostos.

5.1.1.1. Fracionamento de DR2-AQ-6D e isolamento dos compostos: ácido pirodisinóico B (**20**), ácido pirodisinóico (**18**) e ácido isopirodisinóico (**19**).

A fração DR2-AQ-6D (3,7 mg) foi repurificada (condições: coluna CSC-Inertsil 150A/ODS2, 5 μm , 25 X 0.94 cm, com eluição de (0.05% TFA/ H_2O)/MeCN, λ = 254 nm) fornecendo uma mistura de ácido pirodisinóico (**18**) e do ácido isopirodisinóico (**19**) e o ácido pirodisinóico B (**20**) (0,2 mg) .

Figura 24. Esquema de purificação e obtenção de **18**, **19** e **20**.

A mistura de **18** e **19** foi fracionada por HPLC em fase reversa (C₁₈), usando a mesma coluna em uma mistura 3:2 MeOH/(0,05% TFA/H₂O) como eluentes, obtendo-se o ácido pirodisisinóico (**18**) (0,2 mg) e o ácido isopirodisisinóico (**19**) (0,5 mg).

Figura 25. Estrutura dos compostos: ácido pirodisisinóico (**18**), ácido isopirodisisinóico (**19**) e ácido pirodisisinóico B (**20**).

5.1.1.1.1. Determinação estrutural do ácido pirodisinóico (18)

O espectro de massas da fração DR2-AQ-6D-1-2 (ácido pirodisinóico) apresentou o íon negativo $[M-H]^-$ em m/z 288.1598 (Figura 18, p.48, Volume 2). A análise dos espectros de RMN- 1H (DMSO- d_6 , 600 MHz – Figura 21, pp. 54 - 58, Volume 2) e HSQC (Figura 14, pp. 41 – 42, Volume 2) forneceu os seguintes sinais:

- um singleto em δ 5.78 referente a um hidrogênio ligado a um carbono sp^2 ;
- um duplo dubleto em δ 2.71 ($J = 4.9, 13.8$ Hz) e um tripleto em δ 2.14 ($J = 13.8$ Hz) referentes a dois hidrogênios ligados ao mesmo carbono (δ 31.3);
- um multiplete em δ 2.36 referente a um hidrogênio ligado a um carbono sp^3 (δ 32.9);
- um dubleto em δ 5.41 ($J = 4.3$ Hz) referente a um hidrogênio ligado a um carbono sp^2 (δ 125.1);
- um multiplete em δ 1.98 referente a dois hidrogênios ligados ao mesmo carbono (δ 31.5);
- um dubleto em δ 1.76 ($J = 11.5$ Hz) e um multiplete em δ 1.58, referentes a dois hidrogênios distintos ligados ao mesmo átomo de carbono (δ 18.0);
- um dubleto em δ 1.38 ($J = 11.0$ Hz) ligado a um carbono em δ 46.1;
- dois singletes, sendo um em δ 3.97 referente a um hidrogênio ligado ao carbono em δ 67.2 e outro em δ 1.61, referente a três hidrogênios de um grupo metil (δ 23.0)
- dois singletes, um em δ 0.70 e outro em δ 1.18, referentes a três hidrogênios cada (grupo metil); ligados ao carbono em δ 20.6 e δ 27.0, respectivamente.

- dois dubletes, um em δ 4.27 ($J = 8.0$ Hz) e outro em δ 3.81 ($J = 8.0$ Hz) referentes a dois hidrogênios ligados ao mesmo carbono (δ 44.2);

- um singlete em δ 12.72 referente a um hidrogênio ligado a oxigênio (hidroxila de um grupo carboxila).

O espectro de RMN- ^{13}C (DMSO- d_6 , 150 MHz – Figura 12, pp. 36-39, Volume 2) forneceu os seguintes sinais: em δ 172.6 e 170.8, referentes a carbonos carbonílicos e sinais em δ 67.2 e 44.2 de carbonos ligados a nitrogênio. Os sinais em δ 20.6, 23.0 e 27.0 referem-se a carbonos sp^3 de grupos metila e os sinais em δ 31.5, 18.0, 31.3 representam carbonos metilênicos. Os carbonos metínicos referem-se aos sinais em δ 32.9 e 46.1. Sinais em δ 117.8, 125.1, 133.4 e 161.9 referem-se a carbonos sp^2 e o sinal em δ 40.0 corresponde a um carbono tetrassubstituído.

O espectro de RMN do tipo COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz – Figura 13, p. 40, Volume 2) forneceu as seguintes acoplamentos:

Figura 26. Acoplamentos observados no espectro de RMN – COSY da fração DR2-AQ-6D-1-2.

Uma busca no banco de dados Marinlit, utilizando o fragmento estrutural determinado pela análise do espectro COSY levou-nos a encontrar a estrutura do

ácido pirodisinóico (**18**) como uma potencial estrutura relacionada ao composto DR2-AQ-6D-1-2.

Figura 27. Estrutura do ácido pirodisinóico (**18**)

Através de comparação com dados da literatura, foi possível identificar a estrutura do composto DR2-AQ-6D-1-2 como sendo o ácido pirodisinóico. Através de comparação entre os dados espectroscópicos (Tabelas 5 e 6), verificou-se que a estrutura planar de DR2-AQ-6D-1-2 era idêntica àquela previamente registrada para o ácido pirodisinóico (**18**) isolado de uma esponja *Dysidea sp.* coletada nas Filipinas. Entretanto, na publicação original os autores não haviam determinado a estereoquímica relativa de **18** (Goetz, et al., 2001).

Tabela 5. Dados comparativos de RMN-¹H para o ácido pirodisinóico, segundo Goetz, et al, 2001.

Átomo	DR2-AQ-6D-1-2	18
H-3	5.78 (s)	5.77 (m)
H-4		
H-5 _{eq}	2.71 m(dd, 4.9, 13.8)	2.70 (dd, 4.9, 14.1)
H-5 _{ax}	2.14 (t, 13.8)	2.13 (ddd, 14.1, 2.2, 0.5)
H-6	2.36 (m)	2.35, m
H-7	5.41 (d, 4.3)	5.40, dd (1.6, 5.4)
H-9 _{eq}	1.98 (m)	1.98, m (7.0)
H-9 _{ax}	1.98 (m)	1.98, m (7.0)
H-10 _{eq}	1.76 (bd, 11.5)	1.76, m
H-10 _{ax}	1.58 (m)	1.56, m
H-11	1.38 (d, 11.0)	1.37, m
H-13	3.97 (s)	3.97, s
H-14	1.61 (s)	1.60, s
Me15 _{ax}	0.70 (s)	0.70, s
Me16 _{eq}	1.18 (s)	1.17, s
H-17a	4.27 (d, 18.0)	4.27, d (18.0)
H-17b	3.81 (d, 18.0)	3.80, d (18.0)
CO ₂ H	12.72 (s)	

Tabela 6. Dados comparativos de RMN-¹³C para o ácido pirodisinóico, segundo Goetz, et al, 2001.

Átomo	DR2-AQ-6D-1-2	18
2	172.6	172.5
3	117.8	117.7
4	161.9	161.7
5	31.3	31.0
6	32.9	32.6
7	125.1	124.9
8	133.4	133.3
9	31.5	31.2
10	18.0	17.6
11	46.1	45.8
12	40.0	39.7
13	67.2	67.0
14	23.0	22.7
15	20.6	20.3
16	27.0	26.7
17	44.2	44.0
18	170.8	170.8

Estas atribuições foram confirmadas pelas análises dos espectros HSQC (Figura 14, pp. 41-42, Volume 2) e HMBC (Figura 15, pp. 43-44, Volume 2).

Análises do espectro tROESY do ácido pirodisinóico (**18**, Figura 16, pp. 45-46, Volume 2), por nós isolado de *D. robusta* (DR2-AQ-6D-1-2), mostraram uma junção *cis* entre dois anéis de seis membros, tendo em vista o acoplamento dipolar entre H-6 (δ 2.36) e H-11 (δ 1.38). Também pôde-se observar no espectro tROESY correlações de H-13 (δ 3.97) com os hidrogênios H-5_{ax} (δ 2.14) e H-10_{ax} (δ 1.58) e também com Me-16_{eq} (δ 1.18). A partir de tais observações estabeleceu-se que a estereoquímica relativa de **18** requer que os dois anéis de seis membros estejam na conformação indicada, com uma junção *cis* dos anéis de 6 membros e que N-1 esteja em orientação equatorial (figura 28).

Figura 28. Correlações do ácido pirodisinóico (DR2-AQ-6D-1-2) observadas no espectro tROESY.

Uma vez que a medida de $[\alpha]_D^{25} + 18.9^\circ$ (c 0.13, MeOH) obtido para **18** confere favoravelmente com o valor $[\alpha]_D^{25} + 9.1^\circ$ (c 0.666, MeOH) reportado para o ácido pirodisinóico isolado por Goetz et al (2001), ambas provavelmente apresentam a mesma stereoquímica absoluta, ainda indefinida.

5.1.1.1.2. Determinação estrutural do ácido isopirodisinóico (**19**).

O espectro de massas em modo negativo HRESIMS da fração DR2-AQ-6D-1-1 originou o íon negativo $[M-H]^-$ em m/z 288.1598, indicando que a fórmula molecular para **19** era a mesma que aquela do ácido pirodisinóico (**18**). Além disso, os espectros de RMN- 1H e ^{13}C de **18** e **19** mostraram ser bastante similares.

Tabela 7. Dados espectroscópicos de RMN- ^1H e ^{13}C para o ácido isopirodisinóico (19).

RMN- ^1H		RMN- ^{13}C	
δ^1_{H}		δ^{13}_{C}	
3	5.67 (s)	2	170.2
4	4.17 (dd, 6.1, 12.1)	3	116.9
5 _{eq}	2.25 (m)	4	59.2
5 _{ax}	0.87 (ddd, 12.1, 12.1, 12.1)	5	35.6
6	2.59 (m)	6	30.5
7	5.36 (d, 4.8)	7	124.4
		8	133.0
9 _{eq}	1.91 (m)	9	30.6
9 _{ax}	1.86 (m)		
10 _{eq}	1.59	10	18.5
10 _{ax}	1.03 (ddd, 13.5, 13.5, 6.2)	11	46.6
11	1.59	12	37.1
13		13	169.7
14	1.57 (s)	14	23.0
Me15 _{ax}	1.21 (s)	15	29.3
Me16 _{eq}	1.16 (s)	16	24.3
17a	4.07 (d, 17.8)	17	41.3
17b	3.85 (d, 17.8)	18	170.9
CO ₂ H	12.67 (s)		
4-OH

Figura 29. Correlações do ácido isopirodisinóico (DR2-AQ-6D-1-1) observadas no espectro HSQC (Figura 14, pp. 41-42, Volume 2).

Através do espectro de RMN do tipo COSY (DMSO- d_6 , 600 MHz – Figura 13, p. 40, Volume 2), observou-se os seguintes acoplamentos $^1\text{H} - ^1\text{H}$:

Figura 30. Acoplamentos $^1\text{H}-^1\text{H}$ do ácido isopirodisinóico (DR2-AQ-6D-1-1) observadas no espectro COSY.

Análises dos espectros de RMN- ^1H , ^{13}C e HSQC (Tabelas 11 e 12, p. 61) indicaram que os compostos **18** e **19** apresentavam as mesmas características estruturais de C-5 ao C-12. Havia entretanto, algumas diferenças significativas nos espectros de RMN- ^1H e ^{13}C observadas na região da junção dos anéis 6/5. Por exemplo, em **19**, os prótons metilênicos de H-5 surgem em δ 0.87 e δ 2.25, enquanto que em **18** são observados em δ 2.14 e δ 2.71. Além disso, C-4 e C-13 apresentam deslocamentos químicos inversos para **18** e **19**. Em **19** eles são vistos em δ 59.2 e 169.7 (RMN- ^{13}C – Figura 12, pp. 36-39, Volume 2), enquanto em **18** estes são observados em δ 161.9 e 67.2, respectivamente. Desta forma, pôde-se suspeitar que o ácido isopirodisinóico (**19**) representa um isômero de posição de **18** na junção 6/5 de anel. Esta hipótese foi confirmada através de análise de dados de RMN-2D de **19**. No espectro COSY, os prótons metilênicos de H-5

surtem não só correlacionados com H-6 (δ 2.59) mas, ao contrário de **18**, também com H-4 (δ 4.17). Correlações à longa distância observadas no espectro HMBC ^1H - ^{13}C estabeleceram que N-1 está ligado a C-4, C-3 a C-13 e que o C-2 de carbonila está situado entre N-1 e C-3. Essas correlações foram observadas entre H-3 (δ 5.67) e C-2 (δ 170.2), C-4 (δ 59.2), C-12 (δ 37.1) e C-13 (δ 169.7), entre o H-4 metínico com C-3 (δ 116.9), C-5 (δ 35.6) e C-13 e entre Me-15 (δ 1.21), e Me-16 (δ 1.16) com C-11 (δ 46.6), C-12 e C-13.

Figura 31. Correlações do ácido isopirodisinóico (**19**) observadas no espectro RMN tipo HMBC .

De acordo com o espectro HMBC (Figura 15, pp.43-44, Volume 2), as correlações entre os prótons metilênicos CH₂-17 (δ 3.85 e 4.07) e C-2, C-4 e C-18 (δ 170.9), juntamente com uma correlação tROESY entre H-5_{eq} (δ 2.25) e H-17b (δ

3.85), estabeleceram a posição do grupamento glicina. Finalmente, as correlações entre N-1 (δ -256.9) e H-3, H-4 e H-17b no espectro HMBC- ^{15}N - ^1H confirmaram a estrutura planar do ácido isopirodisinóico (**19**).

Assim como o ácido pirodisinóico (**18**), a análise do espectro tROESY (DMSO- d_6 , 600 MHz – Figura 16, p. 45, Volume 2) do ácido isopirodisinóico (**19**) indicou uma junção cis 6/6, uma vez que foi observado um acoplamento dipolar entre H-6 e H-11. O hidrogênio H-4 apareceu como um duplo dubleto com um acoplamento com H-5ax (δ 0.87) de aproximadamente 12 Hz, indicando uma relação *trans* diaxial entre H-4 e H-5ax. No espectro tROESY H-4 correlaciona-se com H-6 e Me-15ax, enquanto H-5ax correlaciona-se com H-10ax (δ 1.03). Tais observações indicaram que a estereoquímica relativa de **19** requer uma junção cis de anel, e que N-1 esteja em orientação equatorial. (figura 32).

Figura 32. Correlações do ácido isopirodisinóico (**19**) observadas no espectro tROESY.

5.1.1.1.3. Determinação estrutural do ácido pirodisinóico B (20)

Análises HRESIMS do ácido pirodisinóico B (**20**) indicaram que a fórmula molecular, $C_{17}H_{22}NO_3$, era a mesma de **18** e **19**.

A determinação estrutural do ácido pirodisinóico B foi feita a partir de comparação com os dados espectroscópicos do ácido pirodisinóico (**18**), uma vez que os sinais observados no espectro de RMN- 1H e ^{13}C de **20** e **18** apresentam muitas semelhanças.

Dados espectroscópicos de RMN-1D e -2D prontamente estabeleceram que a estrutura planar de **20** era a mesma que de **18**. Através de uma análise detalhada dos dados de RMN-2D e dos valores das constantes de acoplamento J indicaram que a única diferença entre **20** e **18** era a configuração relativa na junção dos dois anéis de seis membros.

Tabela 8. Dados comparativos de RMN- 1H , COSY 1H - 1H e ^{13}C entre o ácido pirodisinóico (**18**) e o ácido pirodisinóico B (**20**).

$\delta \ ^1H$			1H - 1H		$\delta \ ^{13}C$		
	18	20	18	20		18	20
3	5.78 (s)	5.82 (s)	13, 5 _{ax}	13	2	172.6	172.6
4					3	117.8	118.0
5 _{eq}	2.71 (dd, 4.9, 13.8)	2.72 (dd, 1.7, 11.9)	5 _{ax} , 6	5 _{ax}	4	161.9	161.6
5 _{ax}	2.14 (t, 13.8)	1.94 (t, 11.9)	3, 5 _{eq} , 6	5 _{eq}	5	31.3	34.6
6	2.36 (m)	1.97	5 _{ax} , 5 _{eq} , 7, 11	7, 11	6	32.9	36.2
7	5.41 (d, 4.3)	5.17 (bs)	6, 9, 14	6, 14	7	125.1	125.0
9 _{eq}	1.98 (m)	1.97	7, 10 _{eq} , 10 _{ax}	10 _{ax}	8	133.4	133.8
9 _{ax}	1.98 (m)	1.97	7, 10 _{eq} , 10 _{ax}	10 _{ax}	9	31.5	31.0
10 _{eq}	1.76 (d, 11.5)	1.86 (d, 10.1)	9, 10 _{ax} , 11	10 _{ax} , 11	10	18.0	21.7
10 _{ax}	1.58 (m)	1.15	9, 10 _{ax} , 11	9, 10 _{eq}	11	46.1	46.0
11	1.38 (d, 11.0)	1.18 (t, 11.3)	6, 10 _{eq} , 10 _{ax}	6, 10 _{eq}	12	40.0	40.7
13	3.97 (s)	3.88 (s)	3	3	13	67.2	71.2
14	1.61 (s)	1.62 (s)	7	7	14	23.0	22.8
Me15 _{ax}	0.70 (s)	1.14 (s)			15	20.6	26.0
Me15 _{eq}	1.18 (s)	0.51 (s)			16	27.0	13.5
17a	4.27 (d, 18.0)	4.39 (d, 18.0)	17b	17b	17	44.2	44.2
17b	3.81 (d, 18.0)	3.87 (d, 18.0)	17a	17a	18	170.8	170.9
CO ₂ H	12.72 (s)	12.78 (s)					

Considerando que no espectro de RMN- ^1H de **20** (Figura 22, pp. 60-65, Volume 2) o hidrogênio H-5_{ax} (δ 1.94) é um triplete com $J = 11.9$ Hz, este apresenta uma relação *trans pseudo*-axial com H-6 (δ 1.97). Uma vez que um acoplamento dipolar foi observado entre H-5_{ax} e H-11 (δ 1.18) e H-13 (δ 3.88), a estereoquímica relativa de **20** requer que os dois anéis de seis membros estejam em conformação de *pseudo*-cadeira com uma junção de anel *trans* ao invés de uma junção *cis*, observada no ácido pirodisinóico (**18**), e que N-1 esteja em orientação equatorial. Correlações adicionais observadas no espectro tROESY (Figura 26, pp. 74-75, Volume 2) confirmaram a estereoquímica relativa do ácido pirodisinóico B (**20**) (figura 33).

Figura 33. Correlações do ácido pirodisinóico B (**20**) observadas no espectro tROESY

5.1.1.1.4. Determinação estrutural do ácido 13-hidróxi-isopirodisinóico (**21**)

Após repurificação da fração DR2-AQ-6B por HPLC em fase reversa (condições: coluna CSC-Inertsil 150A/ODS2, 5 μm , 25 X 0.94 cm, com eluição de (0.05% TFA/H₂O)/MeCN, $\lambda = 254$ nm) obteve-se a fração DR2-AQ-6B-2D, que corresponde ao ácido 13-hidróxi-isopirodisinóico (**21**) (1,3 mg).

Figura 34. Estrutura do ácido 13-hidróxi-isopirodisinóico (**21**).

O sinal de um íon $[M-H]^-$ em m/z 304.1637 (Figura 34, p. 90, Volume 2) no modo HRESIMS negativo de **21** estabeleceu a fórmula $C_{17}H_{23}NO_4$ (calculado para $C_{17}H_{22}NO_4$ 304.1637) que corresponde a um oxigênio adicional com relação ao ácido isopirodisinóico (**19**).

Os dados espectrais de RMN obtidos para o ácido 13-hidróxi-isopirodisinóico (**21** – Figuras 28 – 33, pp. 78 – 89, Volume 2) foram muito similares àqueles obtidos para **19**.

Tabela 9. Dados espectroscópicos comparativos entre o ácido isopirodisinóico (**19**) e o ácido 13-hidróxi-isopirodisinóico (**21**).

δ^1_H			δ^{13}_C		
Átomo	19	21	Átomo	19	21
3	5.67 (s)	5.66 (s)	2	170.2	168.2
4	4.17 (dd, 6.1, 12.1)		3	116.9	118.2
5 _{eq}	2.25 (m)	1.93 (dd, 3.6, 13.5)	4	59.2	88.2
5 _{ax}	0.87 (ddd, 12.1, 12.1, 12.1)	1.29 (t, 13.5)	5	35.6	39.9
6	2.59 (m)	2.67 (m)	6	30.5	29.5
7	5.36 (bd, 4.8)	5.34 (d, 5.1)	7	124.4	124.7
9 _{eq}	1.91 (m)	1.90 (m)	8	133.0	133.0
9 _{ax}	1.86 (m)	1.90 (m)	9	30.6	30.6
10 _{eq}	1.59	1.58 (m)	10	18.5	18.3
10 _{ax}	1.03 (ddd, 13.5, 13.5, 6.2)	1.02 (m)	11	46.6	46.7
11	1.59	1.55 (m)	12	37.1	37.3
13			13	169.7	167.9
14	1.57 (bs)	1.56 (s)	14	23.0	23.0
Me15 _{ax}	1.21 (s)	1.32 (s)	15	29.3	27.3
Me15 _{eq}	1.16 (s)	1.13 (s)	16	24.3	25.5
17a	4.07 (d, 17.8)	3.89 (17.8)	17	41.3	38.9
17b	3.85 (d, 17.8)	3.72 (17.8)	18	170.9	170.9
CO ₂ H	12.67 (s)	12.54 (s)			
4-OH		5.93 (s)			

A presença de um grupo hidroxila em C-4 em **21** foi evidente. Os sinais correspondentes a C-4 (δ_H 4.17; δ_C 59.2) em **19** foram substituídos por ressonâncias a δ_C 88.2 e um singlete largo a δ_H 5.93 (4-OH). Correlações a longa distância observadas no espectro HMBC (DMSO- d_6 , 600 MHz – Figura 33, pp. 87-89, Volume 2) entre C-4 (δ 88.2) e H-3 (δ 5.66), o metileno CH₂-5 (δ 1.93 e 1.29) e os prótons H-17 (δ 3.89 e 3.72) confirmaram a posição do grupo hidroxila em C-4. Correlações observadas no espectro tROESY entre H-5_{eq} (δ 1.93) e os dois prótons metilênicos de CH₂-17, tanto quanto entre o grupo metil equatorial Me-16 (δ 1.13) e H-3, estabeleceram que o grupo –OH em C-4 encontrava-se em orientação axial. Este fato foi confirmado pela observação de uma correlação fraca entre H-6 e o próton de 4-OH. Um análise detalhada dos dados de RMN bidimensionais tROESY e dos valores das constantes de acoplamento J demonstraram que a configuração relativa da junção 6/6 do anel em **21** era *cis*, a mesma observada em **19**. Todas as demais características de **19** e **21** eram as mesmas e a estrutura do ácido 13-hidróxi-isopirodisinóico foi determinada assim como a do ácido isopirodisinóico (**19**).

21

Figura 35. Correlações do ácido 13-hidróxi-isopirodisinóico (**21**) observadas no espectro tROESY.

A título de comparação, as tabelas 10 e 11 apresentam dados de RMN-¹H e de ¹³C dos derivados do ácido pirodisinóico isolados de *Dysidea robusta*.

Tabela 10. Dados de RMN-¹H dos compostos **18**, **19**, **20** e **21** em DMSO-*d*₆ (600 MHz) [δ, multiplicidade (*J* em Hz)]

Átomo	18	19	20	21
3	5.78 (s)	5.67 (s)	5.82 (s)	5.66 (s)
4		4.17 (dd, 6.1, 12.1)		
5 _{eq}	2.71 (dd, 4.9, 13.8)	2.25 (m)	2.72 (dd, 1.7, 11.9)	1.93 (dd, 3.6, 13.5)
5 _{ax}	2.14 (t, 13.8)	0.87 (ddd, 12.1, 12.1, 12.1)	1.94 (t, 11.9)	1.29 (t, 13.5)
6	2.36 (m)	2.59 (m)	1.97	2.67 (m)
7	5.41 (d, 4.3)	5.36 (bd, 4.8)	5.17 (s)	5.34 (d, 5.1)
9 _{eq}	1.98 (m)	1.91 (m)	1.97	1.90 (m)
9 _{ax}	1.98 (m)	1.86 (m)	1.97	1.90 (m)
10 _{eq}	1.76 (d, 11.5)	1.59	1.86 (d, 10.1)	1.58 (m)
10 _{ax}	1.58 (m)	1.03 (ddd, 13.5, 13.5, 6.2)	1.15	1.02 (m)
11	1.38 (d, 11.0)	1.59	1.18 (t, 11.3)	1.55 (m)
13	3.97 (s)		3.88 (s)	
14	1.61 (s)	1.57 (s)	1.62 (s)	1.56 (s)
Me15 _{ax}	0.70 (s)	1.21 (s)	1.14 (s)	1.32 (s)
Me16 _{eq}	1.18 (s)	1.16 (s)	0.51 (s)	1.13 (s)
17a	4.27 (d, 18.0)	4.07 (d, 17.8)	4.39 (d, 18.0)	3.89 (17.8)
17b	3.81 (d, 18.0)	3.85 (d, 17.8)	3.87 (d, 18.0)	3.72 (17.8)
CO ₂ H	12.72 (s)	12.67 (s)	12.78 (s)	12.54 (s)
4-OH				5.93 (s)

Tabela 11. Dados de RMN-¹³C e -¹⁵N dos compostos, **18**, **19**, **20** e **21** em DMSO-*d*₆ (150 MHz).

Átomo	18	19	20	21
1	-263.0	-256.9	-	-244.3
2	172.6	170.2	172.6	168.2
3	117.8	116.9	118.0	118.2
4	161.9	59.2	161.6	88.2
5	31.3	35.6	34.6	39.9
6	32.9	30.5	36.2	29.5
7	125.1	124.4	125.0	124.7
8	133.4	133.0	133.8	133.0
9	31.5	30.6	31.0	30.6
10	18.0	18.5	21.7	18.3
11	46.1	46.6	46.0	46.7
12	40.0	37.1	40.7	37.3
13	67.2	169.7	71.2	167.9
14	23.0	23.0	22.8	23.0
15	20.6	29.3	26.0	27.3
16	27.0	24.3	13.5	25.5
17	44.2	41.3	44.2	38.9
18	170.8	170.9	170.9	170.9

5.2. Isolamento e identificação dos compostos isolados da amostra de *Dysidea robusta* – DR1.

5.2.1. Determinação estrutural das ceramidas 22 - 24 a partir de dados espectrocópicos de seus produtos de transesterificação 25 – 27.

A fração DR1-EP-5A, obtida após o fracionamento do extrato éter de petróleo, foi analisada por RMN- ^1H em piridina- d_5 (Figura 1, pp. 6 – 11, Volume 2). Observou-se que a fração DR1-EP-5A era constituída de uma mistura de ceramidas. A presença de sinais de hidrogênios de uma cadeia alifática em δ 1.26, e de uma série de duplos dubletos e outros sinais mais complexos de ^1H na região entre δ 4.0 e 5.2, atribuídos a grupos metino e metileno funcionalizados com oxigênios e/ ou nitrogênios, são típicos sinais de ceramidas observadas em espectro de RMN- ^1H (Ahmed et al, 2008; Ibrahim et al, 2008; Krishna et al, 2004; Radhika et al, 2004; Asai et al, 2000; Loukaci et al, 2000; Inagaki et al, 1998; Hirsch, Kashman, 1989). Um outro indicativo foi a presença do grupo N-H, observado em δ 8.57 (d, 8,9 Hz) de um grupo amida.

Os sinais de ^1H observados nesta fração foram bastante similares aos sinais das ptiloceramidas (Hirsch; Kashman, 1989) que também foram isoladas pelo Professor Roberto Berlinck a partir da esponja *Crambe-crambe*. (Berlinck, R.G.S., 1992 - Tabela 12, p.65).

Como a mistura de ceramidas isolada da esponja *D. robusta* mostrou ser solúvel apenas em piridina, optou-se pela acetilação da mistura para facilitar a obtenção de seus dados espectroscópicos. Após acetilada e purificada por cromatografia em sílica-gel, a mistura foi transformada nos derivados tetraacetilados 25 – 27. Estes apresentaram sinais no espectro ESI-MS de íons

quase-moleculares $[M+H]^+$ em m/z 824.69 (majoritário), 838.76 (intermediário) e 852.58 (minoritário). Tais sinais são idênticos aos sinais das ptiloceramidas (m/z 852, 838, 824), também obtidos como uma mistura de homólogos peracetilados de uma fração isolada da esponja *Ptilocaulis spiculifer* (Hirsch; Kashman, 1989). Comparando-se os dados de **25 - 27** (RMN- 1H) com os dados das tetracetil ptiloceramidas, e de vários outros compostos similares, foi possível observar que tais compostos são bastante parecidos e que correspondem a ceramidas saturadas (Tabela 12, p.65).

A análise dos espectros de RMN bidimensionais das ceramidas acetiladas **25 - 27** (fração DR1-EP-5A-4-1, Figuras 6 – 8, pp. 22-24, Volume 2) possibilitou estabelecer suas estruturas planares.

O espectro de RMN- 1H (Figura 3, pp. 13-17, Volume 2) contendo a mistura de ceramidas acetiladas, em $CDCl_3$ (400 MHz), forneceu os seguintes sinais:

- dois duplos dubletos, sendo um em δ 4.34 ($J = 6.4$ e 11.7 Hz) e outro em δ 4.01 ($J = 3.1$ and 11.7 Hz), referentes a hidrogênios metilênicos de C-1;
- um multipeto em δ 4.45, referente a um hidrogênio ligado ao carbono funcionalizado com nitrogênio e um dubleto em δ 6.66 ($J = 8.9$ Hz), referente ao hidrogênio da ligação N-H;
- um multipeto em δ 5.09 referente a um hidrogênio ligado a carbono funcionalizado com oxigênio;
- um duplo tripleto em δ 4.95 ($J = 3.3$ e 9.8 Hz), referente a um hidrogênio ligado a outro carbono funcionalizado com oxigênio;
- dois multipletos, sendo o primeiro em δ 1.68 referente a dois hidrogênios ligados a C-5 e o segundo em δ 1.25, referente a vários hidrogênios metilênicos. Estes sinais indicaram a presença de uma cadeia alquílica;

- um septeto em δ 1.50 ($J = 6.5$ Hz), referente a um hidrogênio pertencente a um grupo isopropil e um dubleto em δ 0.86 ($J = 6.6$ Hz), referente a seis hidrogênios constituintes do grupo isopropil;
- dois multipletos, em δ 5.10 e δ 1.82, sendo que o primeiro refere-se a um hidrogênio ligado a carbono funcionalizado com oxigênio, e o segundo a dois hidrogênios metilênicos.
- dois multipletos, em δ 1.34 e em δ 1.28, referentes a quatro hidrogênios em dois diferentes metilenos;
- um tripleto em δ 0.88 ($J = 6.8$ Hz), referente a três hidrogênios de um grupo metila de fim de cadeia alifática;
- vários singletos em δ 2.05, δ 2.17, δ 2.08 e δ 2.03, referentes a três hidrogênios cada um, atribuídos a quatro grupos acetila.

A análise do espectro de RMN- ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Figuras 4 e 5, p.18-21, Volume 2), indicou sinais em δ 170.9, 170.1, 170.0 e 169.9 referentes a carbonos sp^2 , de grupos $\text{C}=\text{O}$. Sinais em δ 74.0, 72.8, 72.3 e 62.4 indicaram a presença de carbonos ligados a oxigênio e um sinal em δ 47.9 referente a carbono ligado a nitrogênio. Também foram observados os sinais em δ 36.7, 34.4, 31.9, 31.8, 29.9, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 29.2, 28.6, 24.9, 22.7, 22.6 e 19.2 correspondendo a carbonos metilênicos. Os sinais em δ 21.0, 20.9, 20.8, 20.7, 14.1 e 11.0 referem-se a carbonos sp^3 terminais, sendo que o último corresponde a um carbono do grupo isopropil, juntamente com o sinal em δ 28.0, referente ao carbono terciário do grupo isopropil.

Tabela 12. Dados comparativos de RMN-¹H entre as ceramidas **25-27**, (CDCl₃, 400 MHz) e a mistura de ptiloceramidas isoladas da esponja *Ptilocaulis spiculifer*.

Posição	Ceramidas Tetracetiladas 25-27	Ptiloceramidas (Hirsch; Kashman, 1989)
H-1a	4.34, 1H, dd, (<i>J</i> = 6.4 e 11.7 Hz)	4.35, dd, (<i>J</i> = 6.4 e 11.7 Hz)
H-1b	4.01, 1H, dd, (<i>J</i> = 3.1 e 11.7 Hz)	4.02, dd, (<i>J</i> = 11.7 Hz)
H-2	4.45, 1H, m	4.44, m
H-3	5.09, 1H, m	5.11, m
H-4	4.95, 1H, dt, (<i>J</i> = 3.3 e 9.8 Hz)	4.95, dt, (<i>J</i> = 3.2 e 9.8 Hz)
H-5	1.68, 2H, m	1.65, m
CH ₂ -6 ao CH ₂ -15	1.25 m	1.29, m
CH (isopropil)	1.50, 1H, sept, (<i>J</i> = 6.5 Hz)	1.50, m
CH ₃ (isopropil)	0.86, 6H, d, (<i>J</i> = 6.6 Hz)	0.85, d (<i>J</i> = 6.6 Hz)
NH	6.66, 1H, d, (<i>J</i> = 8.9 Hz)	6.64, d (<i>J</i> = 9.0 Hz),
H-2'	5.10, 1H, m	5.11, m
CH ₂ -3'),	1.82, 2H, m	1.82, m
CH ₂	1.34, 2H, m	Não listado
CH ₂	1.28, 2H, m	1.30, m
CH ₂ -18'	0.88, 2H, t, (<i>J</i> = 6.8 Hz)	0.88, t (<i>J</i> = 6.3 Hz)
CH ₂ -4' ao CH ₂ 17'	1.25 (m)	1.29, m
CH ₃ -20'	0.88, 3H, t, (<i>J</i> = 6.8 Hz)	0.88, t (<i>J</i> = 6.3 Hz)
CH ₃	2.05, 3H, s	2.06 s
CH ₃	2.17, 3H, s	2.19 s
CH ₃	2.08, 3H, s	2.09 s
CH ₃	2.03, 3H, s	2.03 s

O espectro de RMN tipo COSY ¹H-¹H (Figura 6, p. 22, Volume 2), que correlaciona hidrogênios acoplando entre si, forneceu os seguintes resultados:

- hidrogênios metilênicos (CH₂-1) em δ 4.34 e 4.01 apresentou correlações com hidrogênio (H-2) em δ 4.45;
- hidrogênio em δ 4.45 apresentou correlações com hidrogênio (N-H) em δ 6.66 e com hidrogênio em δ 5.09 (H-3);
- hidrogênio em δ 5.09 (H-3) apresentou correlação com hidrogênio em δ 4,95 (H-4), que por sua vez apresentou acoplamento com hidrogênio em δ 1.68 (H-5);
- hidrogênio em δ 1.68 (H-5) apresentou correlações com hidrogênios em δ 1.26.

Tais dados permitiram identificar a porção esfingosínica.

Figura 36. Correlações observadas no espectro de RMN tipo COSY- ^1H - ^1H , da porção esfingosínica das ceramidas tetracetiladas **25-27**.

Também foram observadas correlações adicionais, referentes à porção α -hidróxi-ácido, tais como:

- hidrogênio em δ 5.10 (H-2') apresenta correlação com hidrogênios em δ 1.82 (CH₂-3'), que por sua vez correlacionam-se com hidrogênios em δ 1.20-1.40, referentes à cadeia alquílica.

Figura 37. Correlações observadas no espectro de RMN tipo COSY- ^1H - ^1H , da porção do ácido graxo α -hidroxilado das ceramidas tetracetiladas **25-27**.

O espectro do tipo HMBC ^1H - ^{13}C (Figura 8, p. 24, Volume 2), que correlaciona hidrogênios ligados a carbonos através de 2, 3 ou 4 ligações (2J , 3J , 4J), apresentou os seguintes resultados:

- hidrogênio em δ 6.66 (N-H) se correlaciona com carbono em δ 169.9 (C-1');
- hidrogênio em δ 4.45 (H-2) se correlaciona com carbono em δ 169.9 (C-1');
- hidrogênio em δ 5.10 (H-2') se correlaciona com carbono em δ 31.8 (C-3');
- hidrogênios em δ 1.82 (H-3') se correlacionam com carbonos em δ 24.9, referentes à cadeia alquílica;
- hidrogênio em δ 4.34 (H-1a) se correlaciona com carbono em δ 47.9 (C-2);
- hidrogênio em δ 5.09 (H-3) se correlaciona com os seguintes carbonos: C-1, em δ 62.4, C-2, em δ 47.8 e C-4, em δ 72.8.

Figura 38. Correlações observadas no espectro de RMN tipo HMBC ^1H - ^{13}C das ceramidas tetracetiladas **25-27**.

A etapa seguinte consistiu na identificação da posição do grupo terminal isopropil, isto é, se este se encontrava na porção esfingosínica ou na porção do ácido graxo α -hidroxilado. Tal identificação foi realizada por meio da metanólise do grupo amida da fração DR1-EP-5A, solúvel em piridina, gerando a fração solúvel em CH_2Cl_2 , DR1-EP-5A-4-TD, que continha a fração esfingosínica (página 45, item: *Parte Experimental*).

Figura 39. Porção esfingosínica das estruturas básicas de **22-24**

Análises de RMN- ^1H (Figura 9, pp. 25-27, Volume 2) e LC-MS (Figuras 10A e 10B, p. 29, Volume 2) de DR1-EP-5A-4-TD indicaram a presença de três homólogos em m/z 346, 360 e 374. Um dubleto na região de δ 0.81 ($J = 7,2$ Hz) indicou a presença de um grupo isopropil no final da cadeia alquílica da mistura. Desta forma, a estrutura planar dos compostos **22-24** foi estabelecida como sendo 2-hidroxi-*N*-(1,3,4-trihidroxi-18- metilnonadecan-2-il) icosanamida, 2-hidroxi-*N*-(1,3,4 trihidroxi-19- metilicosan-2-il)icosanamida e 2-hydroxy-*N*-(1,3,4-trihydroxy-20-methylhenicosan-2-il)icosanamida, respectivamente (figura 28).

Figura 40. Estruturas das ceramidas isoladas e seus respectivos derivados acetilados.

Através de análises de deslocamentos químicos e das constantes de acoplamento de H-1a (δ 4.51, dd, J = 4.5 e 10.8 Hz), H-1b (δ 4.42, dd, J = 4.9 e 10.8 Hz), de H-2 (δ 5.11, dddd, aparentemente um sexteto, J = 4.6 Hz), de H-3 (δ 4.35, dd, J = 4.6 e 6.5 Hz), de H-4 (δ 4.28, m) e de H-2' (δ 4.62, dd, J = 3.7 e 7.7 Hz) de **22-24** realizadas em piridina- d_5 indicaram a estereoquímica relativa do tipo D-*eritro* na região de alta polaridade da porção esfingosínica. Através de comparações com dados da literatura das ceramidas naturais (Ibrahim et al, 2008; Krishna et al, 2004; Inagaki et al, 1998) e sintéticas (Sugiyama. et al, 1991), cujos compostos apresentam uma estereoquímica absoluta já conhecida, foi possível estabelecer a estereoquímica absoluta para C-2(S), C-3(S), C-4(R) e C-2'(R). A rotação específica da mistura **22-24** foi medida, obtendo-se o valor de $[\alpha]_{25}^D + 9.6$ (c 0.54, piridina) mostrando ser muito similar aos valores estabelecidos para os compostos análogos. Assim sendo, a estereoquímica absoluta dos compostos **22-24** foi estabelecida.

Ceramidas saturadas e insaturadas foram isoladas de esponjas marinhas, apresentando variações tanto na porção esfingosínica quanto na porção do ácido graxo α -hidroxilado. Entretanto, não há relatos do isolamento dos compostos **22-24** na literatura (Marques et al, 2009).

Uma mistura de ceramidas saturadas de caráter bastante similar a **22-24** (**28**) foi recentemente isolada da esponja *Negombata corticata* e apresentou atividade anticonvulsivante (Ahmed et al, 2008.). As ceramidas **29** e **30**, isoladas da gorgônia *Pseudopterogorgia australiensis* apresentaram atividade antibacteriana moderada (1 mg/ mL) contra *Bacillus pumilis*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* e *Pseudomonas aeruginosa* (Krishna et al, 2004).

28 $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{Me}$, $R_3 = \text{H}$; $m = 1$, $n = 10$ ou $m=3$, $n = 8$

29 $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{H}$; $m = 7$, $n = 7$

30 $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$; $m = 3$, $n = 6$

31 $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{Me}$, $R_3 = \text{OH}$; $m = 6$, $n = 1$

32 $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{Me}$, $R_3 = \text{OH}$; $m = 17, 18, 19$, $n = 7, 8, 9$

33 $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{Me}$, $R_3 = \text{H}$; $m = 7$, $n = 4$

34 $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{Me}$, $R_3 = \text{OH}$; $m = 7$, $n = 4$

35 $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{Me}$, $R_3 = \text{H}$; $m = 6$, $n = 5$

Figura 41. Estruturas das ceramidas similares a mistura **22-24**.

Outros membros desta classe (**31** e **32**) isolados da ascídia *Cystodytes* cf. *dellechiaiei* inibiram a atividade enzimática da fosfolipase A2 *Crotalus adamanteus* com um ED_{50} de 100 $\mu\text{g/mL}$ (Loukaci et al, 2000).

Recentemente, três novas ceramidas saturadas, strepsiamidas A-C (**33** - **35**) foram isoladas da esponja *Strepsichordaia lendenfeldi* e apresentaram atividade citotóxica moderada contra L5178Y (linfoma de rato) e células cancerígenas HeLa (Ibrahim et al, 2008). E finalmente, uma mistura de 13 ceramidas isolada do caranguejo *Erimacrus isenbeckii* apresentou atividade de feromônio de atração sexual (Asai et al, 2000).

Pelo fato de os compostos **22-24** apresentarem solubilidade limitada nos demais solventes a não ser piridina, não foi possível a realização de ensaios biológicos com a mistura de ceramidas.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos deste estudo indicam que, apesar da grande frequência em que esponjas do gênero *Dysidea* vêm sendo estudadas, estas ainda podem apresentar substâncias estruturalmente únicas. O isolamento de três compostos inéditos contendo o esqueleto da furodisina e de uma mistura de três ceramidas ainda não relatadas na literatura indicou a importância do estudo de esponjas do gênero *Dysidea*.

Todavia, em função da solubilidade limitada apresentada pela mistura de ceramidas e a quantidade insuficiente obtida dos derivados do ácido pirodisinóico, não foi possível avaliar as atividades biológicas dos compostos isolados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, S.A.; KHALIFA, S.I.; HAMANN, M.T. Antiepileptic ceramides from the Red Sea sponge *Negombata corticata*. **Journal of Natural Products**, v.71, n.4, p.513-515, 2008.

ASAI, N.; FUSETANI, N.; MATSUNAGA, S.; SASAKI, J. Sex pheromones of the hair crab *Erimacrus isenbeckii*. Part 1: isolation and structures of novel ceramides. **Tetrahedron**, v. 56, p. 9895-9899, 2000.

BERLINCK, R. G. S. Chromatographic Approach To Polar Compounds: Isolation Of The Hydrophylic Constituents Of The Marine Sponge *Crambe Crambe*. **Química Nova**, v. 17, p. 167-171, 1994.

BERLINCK, R. G. S.; HAJDU, E.; ROCHA, R. M.; OLIVEIRA, J. H. H. L.; HERNANDEZ, I. L. C.; SELEGHIM, M. H. R.; GRANATO, A. C.; ALMEIDA, E. V. R.; NUNEZ, C. V.; MURICY, G.; PEIXINHO, S.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; CAVALCANTI, B. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; THIEMANN, O.; SILVA, M.; SOUZA, A. O.; SILVA, C. L.; MINARINI, P. R. R. Challenges and rewards of research in marine natural products chemistry in Brazil. **Journal of Natural Products**, v. 67, n.3, p. 510-522, 2004.

CARROLL, A. R.; PIERENS, G. K.; FECHNER, G.; DE ALMEIDA LEONE, P.; NGO, A.; SIMPSON, M.; HYDE, E.; HOOPER, J. N. A.; BOSTROM, S. L.; MUSIL, D.; QUINN, R. J. Dysinosin A: A Novel Inhibitor of Factor VIIa and Thrombin from a New Genus and Species of Australian Sponge of the Family Dysideidae. **Journal of the American Chemical Society**, v.124, n. 45, p. 13340-13341, 2002.

FAULKNER, D. J.; Marine Natural Products. **Natural Product Reports**, v.19, n.1, p. 1-48, 2002.

FLATT, P. M.; GAUTSCHI, J. T.; THACKER, R. W.; MUSAFIJA-GIRT, M.; CREWS, P.; GERWICK, W. Identification of the cellular site of polychlorinated peptide biosynthesis in the marine sponge *Dysidea* (Lamellodysidea) *herbacea* and symbiotic cyanobacterium *Oscillatoria spongeliae* by CARD-FISH analysis. **Marine Biology**, v. 147, p. 761-774, 2005.

FLOWERS, A. E.; GARSON, M. J.; WEBB, R. I.; DUMDEI, E. J.; CHARAN, R. D. Cellular origin of chlorinated diketopiperazines in the dictyoceratid sponge *Dysidea herbacea* (Keller). **Cell Tissue Research**, v. 292, p. 597-607, 1998.

GOETZ, G. H.; HARRIGAN, G. G.; LIKOS, J. Furodysin Lactone and Pyrodysinoic Acid, New Sesquiterpenes from a Philippines *Dysidea* Species. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1486-1488, 2001.

HINDE, R.; PIRONET, F.; BOROWITZKA, M. A. Isolation of *Oscillatoria spongelliae*, the filamentous cyanobacterial symbiont of the marine sponge *Dysidea herbacea*. **Marine Biology**, v.119, n. 1, p. 99-104, 1994.

HIRSCH, S.; KASHMAN, Y. New glycosphingolipids from marine organisms. **Tetrahedron**, v.45, n.12, p.3897-3906, 1989.

HUANG, X-C.; LI, J.; LI, Z. Y.; GUO, Y. W. Sesquiterpenes from the Hainan Sponge *Dysidea septosa*. **Journal of Natural Products**, v.71, p. 1399-1403, 2008.

IBRAHIM, S. R. M.; MOHAMED, G. A.; ELKHAYAT, E. S.; GOUDA, Y, G.; PROKSCH, P. Strepsiamide A-C, new ceramides from the marine sponge *Strepsichordaia lendenfeldi*. **Natural Product Communications**, v.3, p. 205-209, 2008.

INAGAKI, M., ISOBE, R., KAWANO, Y., MIYAMOTO, T., KOMORI, T.; HIGUCHI, R. Isolation and structure of three new ceramides from the starfish *Acanthaster planci*. **European Journal of Organic Chemistry**, v.1, p.129-131,1998.

KAZLAUSKAS, R.; LIDGARD, R. O.; WELLS, R. J.; VETTER, W. A novel hexachloro-metabolite from the sponge *Dysidea herbacea*. **Tetrahedron Letters**, v.36, p. 3183-3186, 1977.

KELLY-BORGES, K. Sponges out of their depth. **Nature**, v. 373, p. 284, 1995.

KRISHNA, N.; MURALIDHAR P.; MURALIKRISHNA KUMAR, M.; VENKATA RAO, D.; BHEEMASANKARA RAO, Ch. New sphingosines from a gorgonian, *Pseudopterogorgia australiensis* Ridley, of the Indian Ocean. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1423-1425, 2004.

LEE, D.; SHIN, J.; YOON, K-M.; KIM, T- I.; LEE, S-H.; LEE, H-S.; OH, K-B. Inhibition of *Candida albicans* isocitrate lyase activity by sesterterpene sulfates from the tropical sponge *Dysidea sp.* **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.18, p. 5377-5380, 2008.

LOUKACI, A.; BULTEL-PONCÉ, V.; LONGEON, A.; GUYOT, M. New lipids from the tunicate *Cystodytes cf. dellechiaiei* as PLA2 inhibitors. **Journal of Natural Products**, v. 63, n.6, p. 799-802, 2000.

MACMILLAN, J. B.; MOLINSKI, T. F. Herbacinic Acid, a simple prototype of 5,5,5-trichloroleucine metabolites from the sponge *Dysidea herbacea*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 155-157, 2000.

MARQUES, S. O.; VELOSO, K.; FERREIRA, A. G.; HAJDU, E.; PEIXINHO, S.; BERLINCK, R. G. S. Saturated ceramides from the sponge *Dysidea robusta*. **Natural Product Communication**, v. 7, n. 4, p. 917 – 920, 2009.

MATSUNAGA, S.; FUSETANI, N. Nonribosomal Peptides from Marine Sponges. **Current Organic Chemistry**, v. 7, n. 10, p. 945-966, 2003.

MOLINSKI, T.F.; IRELAND, C. M. Dysidazirine, a cytotoxic azacyclopropene from the marine sponge *Dysidea fragilis*. **Journal of Organic Chemistry**, v.53, n.9, p.2103-2105, 1988.

MURICY, G.; HAJDU, E. Porifera Brasilis: Guia de identificação das esponjas mais comuns do Sudeste do Brasil. **Museu Nacional**, série Livros, v.17, Rio de Janeiro, 2006.

PIGGOTT, A. M.; KARUSO, P. 9-Hydroxyfurodysin-O-ethyl Lactone: A New Sesquiterpene Isolated from the Tropical Marine Sponge *Dysidea arenaria*. **Molecules**, v.10, p. 1292-1297, 2005.

QIU, Y.; WANG, X. M. A New Sesquiterpenoid Hydroquinone from the Marine Sponge *Dysidea arenaria*. **Molecules**, v.13, p. 1275-1281, 2008.

RADHIKA, P.; LAKSHMANA RAO, V.; LAATSCH, H. Chemical constituents of a marine soft coral of the genus *Lobophytum*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, p. 1345-1348, 2004.

RAVI, B.N.; PERZANOWSKI, H. P.;ROSS, R. A.; ERDMAN, T. R.; SCHEUER, P. J.; FINER, J.; CLARDY, J. Recent Research in Marine Natural Products: The Puuhenones. **Pure and Applied Chemistry**, v.51, p. 1893-1900, 1979.

RUPERT, E.E.; BARNES, R.D. **Zoologia dos Invertebrados**. 6. ed. São Paulo: Editora Roca, 1996. p. 72-93.

SAKAI, R.; KAMIYA, H.; MURATA, M.; SHIMAMOTO, K. Dysiherbaine: a new neurotoxic amino acid from the Micronesian marine sponge *Dysidea herbacea*. **Journal of the American Chemical Society**, v.119, p. 4112-4116, 1997.

SAKAI, R.; OIWA, C.; TAKAISHI, K.; KAMIYA, H.; TAGAWA, M. Dysibetaine: a new α,α -disubstituted α -amino acid derivative from the marine sponge *Dysidea herbacea*. **Tetrahedron Letters**, v.40, n. 38, p. 6941-6944, 1999.

SAKAI, R.; YOSHIDA, K.; KIMURA, A.; KOIKE, K.; JIMBO, M.; KOIKE, K.; KOBAYAMA, A.; KAMIYA, H. Cellular Origin of Dysiherbaine, an Excitatory Amino Acid Derived from a Marine Sponge. **ChemBioChem: A European Journal of Chemical Biology**, v.9, n. 4, p. 543-551, 2008.

SELEGHIM, M. H. R.; LIRA, S. P.; KOSSUGA, M. H.; BATISTA, T.; BERLINCK, R. G. S.; HAJDU, E.; MURICY, G.; ROCHA, R. M. DA; NASCIMENTO, G. G. F. DO; SILVA, M.; PIMENTA, E. F.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; CAVALCANTI, B. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. O. DE; GALETTI, F. C. S.; SILVA, C. L.; SOUZA, A. O. DE; PEIXINHO, S. Antibiotic, cytotoxic and enzyme inhibitory activity of crude extracts from Brazilian marine invertebrates. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n.3, p. 287-318, 2007.

SKEPPER, C. K.; MOLINSKI, T. F. Long-Chain 2*H*-Azirines with Heterogeneous Terminal Halogenation from the Marine Sponge *Dysidea fragilis*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 73, p. 2592-2597, 2008.

SUGIYAMA, S.; HONDA, M.; HIGUCHI, R.; KOMORI, T. Biologically-active glycosides from Asteroidae. 26. Stereochemistry of the 4 diastereomers of ceramide and ceramide lactoside. **Liebigs Annalen der Chemie**, p. 349-356, 1991.

UEDA, K.; KADEKARU, T.; SIWU, E. R. O.; KITA, M.; UEMURA, D. Haterumadysins A-D, Sesquiterpenes from the Okinawan Marine Sponge *Dysidea chlorea*. **Journal of Natural Products**, v 69, p.1077-1079, 2006.

UEDA, K.; OGI, T.; SATO, A.; SIWU, E. R. O.; KITA, M.; UEMURA, D. Cytotoxic Haterumadienone Congeners from the Okinawan Sponge *Dysidea* sp. **Heterocycles**, v. 72, p. 655-663, 2007.

USHER, K. M. The ecology and phylogeny of cyanobacterial symbionts in sponges. **Marine Ecology**, v.29, n. 2, p. 178-192, 2008.

UTKINA, N. K.; DENISENKO, V. A. Nem Polybrominated Diphenyl Ether from the Marine Sponge *Dysidea herbacea*. **Chemistry of Natural Compounds**, v.42, n.5, p. 606-607, 2006.

VILANOVA, E.; MURICY, G. Taxonomy and distribution of the sponge genus *Dysidea* Johnston, 1842 (Demospongiae, Dendroceratida) in the extractive reserve of Arraial do Cabo, SE Brazil (SW Atlantic). **Boletim do Museu Nacional, série Zoologia**, v.453, p.1-16, 2001.

WEINHEIMER, A. J.; SPRAGGINS, R. L. The occurrence of two new prostaglandin derivatives (15-epi-PGA₂ and its acetate, methyl ester) in the Gorgonian *Plexaura homomalla*. Chemistry of Coelenterates. XV. **Tetrahedron Letters**, v. 10, n. 59, p. 5185-5188, 1969.

WILLIAMS, D. E.; MARQUES, S. O.; HAJDU, E.; PEIXINHO, S.; ANDERSEN, R. J.; BERLINCK, R. G. S. Pyrodisinoic Acid Derivatives from the marine sponge *Dysidea robusta*. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 1691 – 1694, 2009.

ZHANG, H.; SKILDUM, A.; STROMQUIST, E.; ROSE-HELLEKANT, T.; CHANG, L.C. Bioactive Polybrominated Diphenyl Ethers from the Marine Sponge *Dysidea* sp.. **Journal of Natural Products**, v.71, p. 262-264, 2008.