UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Avaliação da variação do metabolismo secundário da esponja marinha

***Aplysina fulva* em função de sua distribuição geográfica**

Fábio Renato Pereira

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

2006

DEDICATÓRIA

AOS MEUS PAIS

Por terem tornado possível tudo isso! Por todo o apoio, dedicação e compreensão durante todas as etapas dos meus estudos. Pelo amor e carinho durante toda a minha vida e na realização deste e dos outros trabalhos que virão. MUITO OBRIGADO!

À minha querida irmã Cynthia pelo incentivo e pela linda amizade que temos.

À minha grande amiga e companheira Thelma pela amizade e todo o amor e apoio em todos os momentos de nossas vidas.

Aos meus avós Oswaldo, Adelina, Raphael e Tereza. Pelo amor e incentivo durante toda a minha vida

Meu coração pertence a todos vocês!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Roberto Berlinck, pela orientação, paciência e amizade durante a realização deste trabalho.

À CNPq, pela bolsa de estudos concedida.

Aos grandes amigos Rafael, Juliana e Fabiana pela amizade desde os tempos de graduação.

Ao pessoal do Laboratório de Produtos Naturais, Eli, Marília, Raquel, Suzi, Michelli, Renata, Stela, e em especial à Miriam e à Simone pela ajuda durante todo o período do meu trabalho.

À Silvana e ao Mauro, do CAQI, pelos espectros de Ressonância Magnética Nuclear, ultravioleta e infravermelho.

À todo pessoal da Biblioteca da Química e da Seção de Pós-Graduação, em especial à Sílvia e Andréia.

Aos amigos: Fernando (Lerdo), Antônio (Césio), Dani, Lidiane, Aline (Lilica), Erikinha, Rodrigo (Turcão), Sérgio, Izequiel, Fabinho.

Aos Drs. Norrie Pearce e Brent Copp da University of Auckland, Auckland, Nova Zelândia, pela obtenção dos espectros de massas.

Ao Prof. Gil V. J. Silva e Virgínia H. Betarello do Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências, e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, pelos espectros de Ressonância Magnética Nuclear.

Ao Prof. Eduardo Hajdu, colaborador do projeto, pela identificação das esponjas *Aplysina fulva*.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

<i>1. INTRODUÇÃO</i>	<i>15</i>
1.1. As esponjas marinhas	15
1.2. - Os Produtos Naturais Marinhos	17
1.3. Esponjas da Ordem Verongida	22
1.4. A esponja <i>Aplysina fulva</i>	28
<i>2. OBJETIVOS</i>	<i>31</i>
<i>3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</i>	<i>32</i>
3.1. Aparelhagem Espectroscópica.....	32
3.1.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	32
3.1.2. Infravermelho (IV).....	32
3.1.3. Ultravioleta-Visível (UV-Vis)	33

3.1.4. Espectrometria de Massas (EM)	33
3.1.5. Dicroísmo Circular.....	33
3.1.6. Medidas de Rotação Específica [α_D]	33
3.2. Técnicas Cromatográficas.....	34
3.2.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	34
3.2.2. Cromatografia em Coluna pré-empacotada Sep-Pak®.....	34
3.2.3. Cromatografia em Coluna	34
3.2.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ou HPLC	34
3.2.5. Solventes	35
3.3. Estudo da esponja Aplysina fulva coletada em Angra dos Reis-RJ	35
3.3.1. Estudo da fração Acetato de Etila da Esponja A. fulva de Angra dos Reis (AfAR)	35
3.3.2. Análise e separação dos constituintes da fração AfAR-3.....	36
3.3.2.1. Purificação da fração AfAR-3A4B.....	38
3.3.3. Purificação da fração AfAR-3A4B6	39
3.3.4. Análise e separação dos constituintes da fração AfAR-4.....	40
3.3.4.1. Separação da fração AfAR-4B4	41

3.4. Estudo da esponja <i>Aplysina fulva</i> coletada em São Sebastião-SP (AfSSAc).....	42
3.4.1. Estudo da fração Acetato de Etila (AfSSAc)	43
3.4.2. Análise e separação dos constituintes da fração AfSSAc-4..	43
3.4.3. Análise e separação dos constituintes da fração AfSSAc-5..	45
<i>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</i>	<i>47</i>
4.1. Isolamento e identificação dos compostos isolados da amostra <i>A. fulva</i> coletada em Angra dos Reis	47
4.1.1. Determinação estrutural da Cavernicolina-1 e -2	47
4.1.2. Determinação Estrutural da fistularina-3	56
4.1.3. Determinação estrutural da bis-oxazolidinona	63
4.2. Isolamento e identificação dos compostos isolados da amostra <i>A. fulva</i> coletada em São Sebastião	66
4.2.1 Determinação Estrutural da Aerotionina.....	66
4.2.2 – Determinação Estrutural da AfSSAc-5B2.....	73
<i>5. CONCLUSÃO.....</i>	<i>81</i>
<i>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	<i>85</i>

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Diagrama de uma esponja asconóide parcialmente seccionada.....	16
Figura 2 - Estruturas da morfina e da penicilina.....	18
Figura 3 - Estruturas da salicinina, salicigenina e do ácido acetilsalicílico.....	19
Figura 4 - Estruturas da nicotina e da cânfora.....	19
Figura 5 - Distribuição de produtos naturais por filo.....	20
Figura 6 - Porcentagem de organismos marinhos ativos contra leucemia em relação ao total testado por filo.....	21
Figura 7 - Estruturas químicas dos compostos halicondrina B e dehidrodidemnina B.....	21
Figura 8 - Estruturas da haliclonaciclamina E, arenosclerinas A, B e C.....	22
Figura 9 - Estruturas da dienona e dimetoxicetal.....	23
Figura 10 - Estruturas químicas de derivados da dibromotirosina.....	25
Figura 11 - Estrutura da Aplizanzina A.....	25
Figura 12 - Estruturas da psammaplina A e derivados.....	26
Figura 13 - Estruturas das purpurealidinas A-H.....	27
Figura 14 - Estruturas da Caissarina A e B.....	28
Figura 15 - Aplysina fulva.....	29
Figura 16 - Fluxograma da separação do extrato acetato de etila (Angra dos Reis-RJ).....	36
Figura 17 - Fluxograma de separação da fração AfAR-3.....	38
Figura 18 - Fluxograma de separação da fração AfAR-3A4B.....	39

Figura 19 - Cromatograma de purificação da fração AfAR-3A4B.....	39
Figura 20: Cromatograma de purificação da fração AfAR-3A4B6.....	40
Figura 21 - Fluxograma de separação da fração AfAR-4.....	41
Figura 22 - Fluxograma de separação da fração AfAR-4B4.....	42
Figura 23 - Cromatograma de separação da fração AfAR-4B4.....	42
Figura 24 - Fluxograma de separação do extrato acetato de etila (São Sebastião– SP).....	43
Figura 25 - Fluxograma de separação da fração AfSSAc-4.....	44
Figura 26: Cromatograma de purificação da fração AfSSAc-4B3.....	44
Figura 27: Fluxograma de separação da fração AfSSAc-5.....	46
Figura 28: Cromatograma de separação da fração AfSSAc-5B.....	46
Figura 29 - Espectro no infravermelho da mistura cavernicolina-1 e -2 (filme).....	48
Figura 30 - Espectro no ultravioleta da mistura cavernicolina-1 e -2 (MeOH).....	48
Figura 31 - Sistemas de spin para as cavernicolinas 1 e 2.....	50
Figura 32 - Correlações observadas no espectro HMBC ^1H - ^{13}C , para cavernicolina-1.....	52
Figura 33 - Correlações observadas no espectro HMBC ^1H - ^{13}C , para cavernicolina-2.....	52
Figura 34 - Estruturas da cavernicolina-1 e -2.....	53
Figura 35 - Espectro no ultravioleta da fistularina-3.....	57
Figura 36 - Espectro no infravermelho da fistularina-3 (filme).....	57
Figura 37 - Sistemas de spin para a fistularina-3.....	59

Figura 38 - Correlações observadas no espectro HMBC, do sistema spiroxazolidínico da fistularina-3.....	61
Figura 39 - Correlações observadas no espectro HMBC, do sistema central da fistularina-3.....	62
Figura 40: Estrutura da bis-oxazolidinona.....	65
Figura 41 – Configuração relativa dos centros quirais da bis-oxalidinona isolada da fração AfAR-4B4B.....	66
Figura 42 - Espectro no ultravioleta da aerotionina (MeOH).....	67
Figura 43 - Espectro no infravermelho da aerotionina (filme).....	68
Figura 44 - Sistema de spin para a aerotionina.....	70
Figura 45 - Correlações observadas no espectro HMBC ^1H - ^{13}C , para a aerotionina.....	71
Figura 46 - Estrutura da aerotionina.....	72
Figura 47 – Espectro no ultravioleta da fração AfSSAc-5B2.....	74
Figura 48 - Correlações observadas no espectro COSY ^1H - ^{13}C , para a AfSSAc-5B2.....	76
Figura 49 - Correlações observadas no espectro HMBC ^1H - ^{13}C , para amostra AfSSAc-5B2.....	77
Figura 50 - Estruturas propostas para os compostos da fração AfSSAc-5B2.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atribuições dos espectros de RMN- ^1H e ^{13}C para cavernicolina-1.....	54
Tabela 2 - Atribuições dos espectros de RMN- ^1H e ^{13}C para cavernicolina-2.....	55
Tabela 3 - Dados comparativos de RMN ^{13}C das frações isoladas da <i>Aplysina fulva</i> e da <i>Aplysina cavernicola</i> (D'Ambrosio, 1982).....	56
Tabela 4 - Dados comparativos de RMN ^{13}C da fração AfAR-4B4D e da fistularina-3.....	63
Tabela 5 -. Dados comparativos de RMN ^1H da fração AfAR-4B4B e da bis- oxazolidinona.....	65
Tabela 6 - Atribuições dos espectros de RMN- ^1H e ^{13}C para aerotionina.....	73
Tabela 7: Dados comparativos de RMN ^{13}C dos compostos propostos da fração AfSSAc-5B2.....	80

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

MeCN - Acetonitrila

CD₃CN - Acetonitrila deuterada

AcOEt - Acetato de etila

CCD - Cromatografia em camada delgada

COSY - Correlation spectroscopy

DC - Dicroísmo circular

CH₂Cl₂ - Diclorometano

DMSO - Dimetilsulfóxido

DMSO-d₆ - Dimetilsulfóxido deuterado

EM - Espectrometria de massas

DEPT – Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

HMBC - Heteronuclear multiple-bond correlation

HMQC - Heteronuclear single-quantum coherence

HPLC - High Performance Liquid Chromatograph

IV - Infravermelho

J - Constante de acoplamento

MeOH - Metanol

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

UV - Ultravioleta

δ - deslocamento químico

s - singleto

d – dubleto

dd – duplo dubleto

t – tripleto

m – multiplete

$[\alpha]_D$ – rotação ótica específica

EI – Impacto de elétrons

ESI – Ionização por spray de elétrons

RESUMO

Estudos realizados em 1979 por Kelecom e Kanengiesser mostraram que extratos brutos obtidos a partir de amostras da esponja marinha *Aplysina fulva* não possuíam derivados bromados. Estes foram resultados inesperados, uma vez que esponjas pertencentes à ordem Verongida são conhecidos produtores de metabólitos derivados da dibromotirosina. O presente projeto teve como meta a investigação química de extratos obtidos de duas amostras de *A. fulva*, sendo uma coletada em São Sebastião (SP) e a outra em Angra dos Reis (RJ), objetivando verificar a ocorrência de derivados da bromotirosina e uma possível variabilidade química dependendo da distribuição geográfica das esponjas. Sete derivados da dibromotirosina foram isolados das duas amostras de *Aplysina fulva*: quatro compostos da amostra de Angra dos Reis e três da de São Sebastião. As estruturas dos compostos foram identificadas por análises espectroscópicas (como IV, UV, RMN ^1H , RMN ^{13}C , HMQC, COSY, HMBC) e de espectrometria de massas, e ainda por comparação com dados da literatura. Os resultados obtidos confirmaram que os derivados da dibromotirosina são bons marcadores quimiotaxonômicos para as esponjas da Ordem Verongida. Além disso, a variabilidade química observada para a *A. fulva* parece ser influência de fatores abióticos e bióticos como sazonalidade, disponibilidade de nutrientes, ou associação com diferentes micro-organismos.

ABSTRACT

Studies developed in 1979 by Kelecom and Kanengiesser showed that crude extracts obtained from samples of the marine sponge *Aplysina fulva* were devoid of bromotyrosine derivatives. These results were rather unexpected, since sponges belonging to the Order Verongida are well-known producers of bromotyrosine-derived metabolites. The present project aimed the chemical investigation of crude extracts obtained from two samples of *A. fulva*, one collected at São Sebastião (SP) and the second from Angra dos Reis (RJ), in order to verify the occurrence of bromotyrosine derivatives and a possible chemical variability depending on the geographical distribution of the sponge. Seven bromotyrosine derivatives have been isolated from the two samples of *A. fulva*: four compounds from the Angra dos Reis sample and three from the São Sebastião sample. The structures of the compounds have been established by spectroscopic analysis, (including IR, UV, RMN ^1H , RMN ^{13}C , HMQC, COSY, HMBC) and mass spectrometry, as well as by comparison with literature data. The results obtained confirmed that bromotyrosine derivatives are good chemotaxonomic markers for sponges of the Order Verongida. Moreover, it appears that chemical variability of *A. fulva* may be influenced by abiotic and biotic factors, such as seasonality, nutrients availability, or association with distinct micro-organisms.

1. INTRODUÇÃO

1.1– As Esponjas Marinhas

As esponjas marinhas são os animais multicelulares mais primitivos. Estes animais não possuem órgãos, mas têm tecido conjuntivo bem desenvolvido, no qual as células realizam várias funções. Em comparação com outros metazoários, as células das esponjas apresentam um alto grau de independência (Rupert,1996).

O nome *Porifera* tem sua origem 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 apresentam constante reorganização do sistema aquífero (Kelly-Borges,1995).

As esponjas apresentam uma grande variação em relação ao seu tamanho; determinadas esponjas calcárias possuem o tamanho aproximado de um grão de arroz, enquanto que uma esponja-de-tartaruga pode exceder até um metro de altura e de diâmetro. A maioria das espécies comuns é extremamente colorida. As esponjas do tipo asconóides têm as formas radiais mais simples e ilustram a estrutura básica deste filo.

Figura 1: Diagrama de uma esponja asconóide parcialmente seccionada.

A superfície de uma esponja asconóide é perfurada por muitas aberturas pequenas, denominadas óstios (ou poros incorrentes), de onde é derivado o nome Porifera. Esses poros abrem-se dentro da cavidade interior, a espongiocele (átrio), que por sua vez se abre para o exterior através do ósculo, que se caracteriza por uma grande abertura no topo do tubo. Uma corrente de água constante passa através dos poros incorrentes no interior da espongiocele e sai pelo ósculo. Esta água tem a função de trazer oxigênio e alimento (material particulado extremamente fino), e ainda remover detritos. A superfície externa reveste-se de células achatadas denominadas pinacócitos, que juntas constituem a pinacoderme. O esqueleto é relativamente complexo e proporciona uma sustentação para as células vivas do animal. Estes animais podem ser constituídos de espículas calcárias, espículas silicosas, fibras de espongina protéicas ou uma combinação das duas últimas. Estas espículas são muito importantes na identificação e classificação das espécies. A

maioria delas é hermafrodita, sendo que o esperma sai de uma esponja e entra em outra pelas correntes que fluem através dos canais de água (Rupert,1996).

Os poríferos se nutrem das menores frações orgânicas, tais como matéria orgânica dissolvida e do picoplâncton, podendo ser altamente eficientes na execução de tal tarefa (Reiswig,1973). Hábitos carnívoros já foram descritos para várias espécies de Porífera (Vacelet,1995).

Conhece-se no mundo todo cerca de 6.000 a 7.000 espécies de Porífera, e estima-se que o número real de espécies esteja entre 10.000 e 15.000. No Brasil já são descritas mais de 300 espécies, sendo que a estimativa do número total de espécies no Brasil situa-se entre 600 e 700 (Hajdu,1999). Como a forma de crescimento de uma esponja está intimamente relacionada com fatores como a inclinação do substrato, disponibilidade de espaço e movimento das correntes de água, algumas confusões taxonômicas ocorrem devido à uma mesma espécie se apresentar em diferentes formas (Bergquist,1978). As esponjas marinhas são classificadas dentro de quatro classes: Calcarea ou Calcispongiae, Hexactinallida ou Hyalospongiae, Demospongiae e Sclerospongiae, sendo que a classe Demospongiae corresponde a 90% das espécies de esponjas conhecidas.

1.2- Os Produtos Naturais Marinhos

O termo “produto natural” é usado para aquelas substâncias que são produzidas por um organismo ou por um número pequeno de organismos intimamente relacionados. Na maioria das vezes, essas substâncias parecem não serem essenciais aos organismos que as produzem (denominado metabolismo secundário), em contraste com outros metabólitos os quais são essenciais a esses organismos (metabolismo primário) (Dewick,1997).

Alguns exemplos de produtos naturais típicos podem ajudar a esclarecer esta definição. A morfina **(1)** ocorre em duas espécies de papoula, *Papaver somniferum* e *P. setigerum*, e embora amplamente utilizada pelo homem, não possui uma função conhecida nestas plantas. De maneira similar, a penicilina **(2)** é produzida por algumas espécies de fungos e parece não possuir uma utilidade para esses organismos que a produzem (Mann, 1978).

Figura 2: Estruturas da morfina e da penicilina.

O homem tem feito uso de produtos naturais há muito tempo, mas principalmente no século XIX, com o desenvolvimento da indústria farmacêutica, esses produtos começaram a ser explorados comercialmente para o desenvolvimento de medicamentos, sendo que as plantas foram as primeiras matérias primas para esta indústria (Hostettmann, 2003). Um exemplo clássico é o ácido salicílico **(5)**, que foi sintetizado a partir da salicinina **(3)** e da salicigenina **(4)**, substâncias isoladas da casca da *Salix alba* e da *Filipendula ulmaria* respectivamente (Hostettmann, 2003; Mann, 1996). Outras substâncias importantes isoladas nesta época foram a nicotina **(6)** e a cânfora **(7)** (Mann, 1996; McConnell, 1994).

Figura 3: Estruturas da salicinina, salicigenina e do ácido acetilsalicílico.

Figura 4: Estruturas da nicotina e da cânfora.

Os organismos dos oceanos são fonte de um grande número de substâncias químicas únicas, freqüentemente produzidas e acumuladas em invertebrados marinhos como esponjas, briozoários, tunicados e moluscos. Muitos destes compostos apresentam atividades farmacológicas, tornando-se candidatos interessantes para o desenvolvimento de novos fármacos (Proksch,2002).

As esponjas têm sido a fonte do maior número de metabólitos secundários dentre todos os filos marinhos (Blunt, Munro,2006). Nos últimos anos, o estudo sistemático destes metabólitos tem levado ao isolamento de um número crescente de produtos naturais, os quais apresentam diversas atividades farmacológicas e biológicas (antibiótica, antifúngica, tóxica, citotóxica, antimitótica e antiviral) (Kelecom,2002), sendo que as esponjas apresentaram a maior incidência de extratos biologicamente ativos dentre todos os filos marinhos (Blunt,2005).

Figura 5: Distribuição de produtos naturais por filo (Blunt, 2004).

Estudos adicionais feitos pelo National Cancer Institute mostraram que o filo Porifera (esponjas) apresentou a maior quantidade e também a maior porcentagem de organismos com atividade contra leucemia, em relação a todos os outros filios marinhos (Cragg, 2006). Alguns exemplos de substâncias com atividade antitumoral que se encontram atualmente submetidas à testes clínicos são a halicondrina B **(8)**, isolada originalmente da esponja *Halichondria okadai* e a dehidrodidemnina B **(9)**, isolada do tunicado *Aplidium albicans*.

Figura 6: Porcentagem de organismos marinhos ativos contra leucemia em relação ao total testado por filo (Cragg,2006).

Figura 7: Estruturas químicas dos compostos halicondrina B e dehidrodidemnina B.

A partir do extrato bruto da esponja *Arenosclera brasiliensis*, endêmica do Brasil, foram isolados quatro novos alcalóides que apresentaram atividade antibacteriana e citotóxica, a haliclonaciclamina E (**10**), e arenosclerinas A, B e C (**11**, **12** e **13**) (Torres, 2000).

Figura 8: Estruturas da haliclonaciclamina E, arenosclerinas A, B e C.

1.3- Esponjas da Ordem Verongida

As esponjas da Ordem Verongida são caracterizadas por apresentarem compostos derivados da dibromotirosina, e esses metabólitos servem como marcadores químicos em estudos taxonômicos. Durante os últimos anos, diversos

derivados da dibromotirosina foram isolados, alguns apresentando importantes atividades biológicas.

Os dois primeiros compostos dessa série foram isolados do extrato metanólico da *Verongia (Aplysina) fistularis* e *V. cauliformis* por Sharma e Burkholder (1967), os quais apresentam atividade antimicrobiana. São eles a dienona (**14**) e o dimetoxicetal (**15**). Estudos posteriores sugeriram que estes compostos podem ser derivados de um mesmo intermediário durante o processo de extração (Andersen,1973).

Figura 9: Estruturas da dienona e dimetoxicetal.

A aeroplisinina-1 foi isolada da esponja *Aplysina aerophoba*, sendo que esta substância também foi isolada de outras esponjas como *Pseudoceratina crassa* (Ciminello,1995), *lanthella ardis* (Fulmor,1970), *Aplysina thiona* (Cruz,1990).

Recentemente, o grupo do Dr. Ernesto Fattorusso investigou a composição em derivados da dibromotirosina das esponjas *Aplysina fistularis* forma *fulva* (Ciminello,1994), *Verongula* sp. (Ciminello,1994b), *Pseudoceratina crassa* (Ciminello,1995), *Aplysina archeri* (Ciminello,1996), *Aplysina aerophoba* e *Aplysina cavernicola* (Ciminello,1997), e isolou diversos compostos deste tipo, tais como os compostos **16-25** confirmando a ocorrência destes derivados como indicadores quimiotaxonômicos de esponjas desta Ordem.

Figura 10: Estruturas químicas de derivados da dibromotirosina.

A partir da esponja *Aplysina sp.*, coletada próxima da costa de Zanzibar, isolou-se a aplizanzina A **(26)** (Evan,2001). Este composto apresenta em sua estrutura um esqueleto dibromotirosina-dibromotiramina, com uma estrutura N,N-dimetiltirosina, esta sem precedentes como um produto natural marinho.

Figura 11: Estrutura da Aplizanzina A.

Embora estes derivados bromados sejam na maioria dos casos isolados de esponjas da ordem Verongida, existem trabalhos recentes que mostram o isolamento destes compostos em espécies não pertencentes a esta ordem (Jung,1995 e Nicholas,2001). Como exemplo podemos citar o isolamento de três novos derivados da dibromotirosina **(28, 29 e 30)** a partir de uma associação de duas esponjas, *Jaspis wondoensis* e *Poecillastra wondoensis*. Os compostos são

considerados derivados da psammaplina A (**27**), previamente isolado desta mesma associação (Park,2003).

Uma série de alcalóides derivados da dibromotirosina, as purpurealidinas A-H (**31-38**), foram isoladas da esponja *Psammaplysilla purpurea* na Índia (Tilvi,2004). A purpurealidina B (**32**) apresentou atividade antibacteriana.

Figura 12: Estruturas da psammaplina A e derivados.

Figura 13: Estruturas das purpurealidinas A-H.

O primeiro estudo de esponjas da Ordem Verongida realizado no Brasil foi publicado em 1979 por Kelecom e Kannengiesser (Kelecom, 1979). Foram realizados estudos comparativos entre diferentes espécimes de uma esponja do gênero *Verongia* (= *Aplysina*) (posteriormente identificada como sendo *A. fulva*), coletados em diferentes regiões (Guarapari, Cabo Frio e Abrolhos) e a esponja *Verongia aerophoba* proveniente do Mediterrâneo, e não se observou a presença de derivados da dibromotirosina nos espécimes brasileiros. Aparentemente, este é um caso único para esponjas desta Ordem (Munro, 1987).

Nosso grupo de pesquisa em química de produtos naturais marinhos realizou recentemente o estudo químico da esponja *Aplysina caissara*, que é descrita como uma espécie endêmica do Brasil (Saeki, 2000). Durante o trabalho foram isolados dois novos derivados da dibromotirosina: a caissarina A **(39)** e a caissarina B **(40)**. A caissarina A é o primeiro alcalóide desta classe de compostos que apresenta uma cadeia do tipo 2-hidroxiagmatina, enquanto que a caissarina B é o primeiro produto natural que apresenta a cadeia 1,7-diamino-2-hidroxiheptano, sem precedentes na literatura.

Figura 14: Estruturas da Caissarina A e B.

1.4- A esponja *Aplysina fulva*

A esponja *Aplysina fulva* é classificada da seguinte forma (Munro, 1987):

↳ Filo: Porífera

↳ Classe: Demospongia

↳ Ordem: Verongida

↳ Família: Aplysinidae

↳ Gênero: Aplysina

↳ Espécie: *fulva*

As esponjas desta espécie são caracterizadas por possuírem ramificações sólidas, cilíndricas e de consistência mole. A estrutura de seu esqueleto é rica em fibras e pode se apresentar nas cores amarela ou marrom quando em seu habitat, ficando muito escura quando exposta a atmosfera.

Figura 15: *Aplysina fulva*.

Assim como a maioria das esponjas da Ordem Verongida, esta espécie se caracteriza pela alta variabilidade fenotípica, fornecendo algumas vezes resultados ambíguos de identificação, quando baseado em critérios morfológicos. A presença dos derivados da dibromotirosina no metabolismo secundário destas esponjas torna-se, portanto, importantes aliados no processo de identificação servindo como marcadores químicos para estas espécies (Ciminiello, 1996b).

Diversos estudos, assim como o realizado pelo grupo Dr. Fatorusso com esponjas da ordem Verogida, relatam a relativa homogeneidade quimiotaxonômica apresentada por grupos de esponjas pertencentes a outras Ordens. Bergquist e Wells (1983) e posteriormente Braekman (1992) realizaram estudos quimiotaxonômicos com esponjas pertencentes à Ordem Agelasida e notaram que estas são ricas em alcalóides pirrólicos, da mesma forma como Andersen, van Soest e Kong (1996) analisaram em um trabalho a ocorrência de diversos alcalóides piperidínicos e piridínicos em esponjas da Ordem Haplosclerida.

2- OBJETIVOS

O presente projeto tem como principais objetivos:

- Verificar a ocorrência de derivados da dibromotirosina em amostras de *Aplysina fulva* coletadas em São Sebastião-SP e Angra dos Reis-RJ.
- Detectada a presença de substâncias dessa classe, realizar um estudo detalhado dos constituintes, e identificar as estruturas químicas das substâncias isoladas por meio de diversas técnicas espectroscópicas.
- Estabelecer um paralelo entre os constituintes químicos de amostras de *Aplysina fulva* coletadas em diferentes localidades da costa brasileira.

3- PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1- Aparelhagem Espectroscópica

3.1.1- Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos nos seguintes aparelhos:

- Bruker AC 200 (4,7 Tesla), operando a 200,1 MHz na frequência do hidrogênio (^1H) e a 50,3 MHz na frequência do carbono (^{13}C);
- Bruker DRX (9,4 Tesla), operando a 400,35 MHz na frequência do hidrogênio (^1H) e 100,1 MHz na frequência do carbono (^{13}C), pertencente ao DQ – UFSCar;
- Bruker DRX 500 (11,75 Tesla), operando a 500,13 MHz na frequência do hidrogênio (^1H) e a 125,76 MHz na frequência do carbono (^{13}C), da FFCLRP da USP.

O preparo das amostras foi feito utilizando-se clorofórmio deuterado (CDCl_3 , Cambridge Isotopes), acetonitrila deuterada (MeCN-d_3 , Cambridge Isotopes) e dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6 , Cambridge Isotopes). O padrão de referência interna utilizado foi o tetrametilsilano (TMS, Cambridge Isotopes).

3.1.2- 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 a forma de filme em disco de silício. Posteriormente, o disco de silício foi colocado em dessecador para evaporação completa do solvente.

3.1.3- Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

Os espectros na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) foram obtidos em um espectrofotômetro Hitachi, modelo U-3210, na região de 200-450nm, pertencente ao IQSC-USP. As amostras foram preparadas em metanol grau espectroscópico (MeOH, Aldrich).

3.1.4- Espectrometria de Massas (EM)

Os espectros de massas foram obtidos utilizando-se um aparelho KRATUS concept IIIHQ híbrido com ionização secundária promovida por íons, pertencente ao Department of Chemistry da University of British Columbia, Vancouver, Canadá; e também um aparelho VG 7070 do Department of Chemistry da University of Auckland, Auckland, Nova Zelândia.

As análises por espectrometria de massas foram realizadas com ionização do tipo FAB (Fast Atom Bombardment), CI (Chemical Ionization) ou Electro-Spray (ESI).

3.1.5- Dicroísmo Circular

Os espectros de dicroísmo circular foram obtidos utilizando-se um Espectro polarímetro Jasco, modelo J-720, do IFSC-USP.

3.1.6- Medidas de Rotação Específica $[\alpha_D]$

Os experimentos de rotação específica foram realizados em um aparelho Perkin Elmer 241, pertencente ao Departamento de Química da UFSCar.

3.2- Técnicas Cromatográficas

3.2.1- Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para análise qualitativa em CCD utilizou-se cromatofolhas de Sílica-gel 60 sobre poliéster, com indicador ultravioleta F₂₅₄ 20X20 cm (Aldrich). As cromatofolhas foram observadas sob luz ultravioleta (UV) Spectroline Model ENF-240 C/FE, no comprimento de onda de 254 nm, após sua eluição.

3.2.2- Cromatografia em Coluna pré-empacotada Sep-Pak®

Para cromatografias realizadas em colunas pré-empacotadas, utilizou-se uma coluna da Waters Sep-Pak® vac 35cc com sílica gel como fase estacionária. As colunas utilizadas possuíam 5 ou 10 g de fase estacionária e foram escolhidas de acordo com a quantidade de amostra a ser estudada.

3.2.3- Cromatografia em Coluna

Para a cromatografia de permeação em gel Sephadex LH-20, utilizou-se uma coluna de vidro com 170 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro interno, utilizando MeOH grau analítico como eluente.

3.2.4- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ou HPLC

Utilizou-se dois equipamentos para estas análises: um sistema Waters com duas bombas Pump 600, um degaseificador Degasser em linha, 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; um segundo sistema Waters idêntico ao primeiro, porém com um detector de arranjo de diodos ("Photodiode Array Detector"). As colunas cromatográficas utilizadas variaram conforme a amostra estudada.

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

3.2.5- Solventes

Os solventes utilizados nas cromatografias do tipo CCD foram todos de grau analítico (Quimex), assim como nas cromatografias líquidas do tipo “Flash” e Sephadex LH-20. Na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram utilizados solventes de grau cromatográfico (J.T. Baker, Mallinckrodt) Um sistema Milli-Q Millipore equipado com resina de troca iônica e filtro biológico, forneceu toda a água utilizada nos processos de cromatografias líquidas.

3.3 – Estudo da esponja *Aplysina fulva* coletada em Angra dos Reis-RJ

A esponja *Aplysina fulva* foi coletada em 2002 em Angra dos Reis-RJ e imediatamente preservada em acetona. O material foi triturado e filtrado em papel filtro. Evaporou-se a solução resultante até eliminação da acetona, restando a fase aquosa. A fração então foi particionada três vezes com 500 mL de AcOEt, cada vez. A fase orgânica resultante foi por fim evaporada fornecendo a fração AfAR com 4,0414g.

3.3.1- Estudo da fração Acetato de Etila da esponja *A. fulva* de Angra dos Reis (AfAR)

Para realizar o estudo do extrato AfAR, dividiu-se a massa total deste (4,0414 g) em 4 porções de aproximadamente 1g cada, com as quais foram realizadas cromatografias em coluna pré-empacotada da Waters Sep-Pak® com fase estacionária SiOH (10g) utilizando um gradiente de diclorometano, acetato de

etila e metanol, como mostra a figura a seguir. Após coletadas e evaporadas, as frações foram analisadas em CCD ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 como eluente e observadas sob luz ultravioleta em 254nm) e reunidas de acordo com o perfil cromatográfico em 7 frações maiores.

Figura 16: Fluxograma da separação do extrato acetato de etila (Angra dos Reis-RJ).

As análises qualitativas realizadas por CCD com as frações **AfAR-3** e **AfAR-4**, indicaram a possível presença de compostos derivados da dibrotirosina os quais, além de absorverem luz ultra-violeta na região de 254nm, apresentam-se nas folhas cromatográficas como manchas marrom escuro após algum tempo, um comportamento típico desta classe de compostos. Assim, o estudo destas frações foi priorizado.

3.3.2- Análise e separação dos constituintes da fração AfAR-3

Com a fração AfAR-3 foi realizada uma cromatografia em coluna pré-empacotada Sep-Pak® com fase estacionária sílica-gel utilizando um gradiente de ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Hexano}$ 9:1)/(AcOEt/MeOH 95:5) como eluente. Após análise em CCD (utilizando $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 como eluente e reveladas em luz ultravioleta) das

frações obtidas, estas foram reunidas em 2 novas frações chamadas AfAR-3A (322,5mg) e AfAR-3B (78,3mg).

Através da análise realizada por CCD viu-se que a fração AfAR-3A continha características da presença dos compostos derivados da dibromotirosina. Assim foi realizada uma nova cromatografia em coluna pré-empacotada Sep-Pak® (SiOH como fase estacionária) utilizando um gradiente de (CH₂Cl₂/hexano 1:1)/(AcOEt/MeOH 95:5) como eluente. O processo gerou 5 novas frações denominadas AfAR-3A1 (55,8 mg), AfAR-3A2 (54 mg), AfAR-3A3 (41,2 mg), AfAR-3A4 (81,7 mg), AfAR-3A5 (59 mg).

A fração AfAR-3A4 foi então submetida a outra cromatografia coluna Sep-Pak® (SiOH como fase estacionária) com um gradiente de (CH₂Cl₂/hexano 8:2)/(AcOEt/MeOH 8:2) como eluente. Após análise por CCD (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 como eluente) as frações coletadas foram reunidas em 4 novas frações AfAR-3A4A (15,5mg), AfAR-3A4B (41,8 mg), AfAR-3A4C (11,3 mg), AfAR-3A4D (7,5 mg). A figura a seguir mostra claramente todo o processo de separação da fração AfAR-3.

Figura 17: Fluxograma de separação da fração AfAR-3.

3.3.2.1- Purificação da fração AfAR-3A4B

A purificação da fração AfAR-3A4B foi realizada em HPLC, utilizando-se uma coluna μ Bondpack com fase estacionária C₁₈, em modo isocrático com eluente H₂O/MeOH (6:4) e fluxo 1,0 mL/min. O processo forneceu duas frações contendo compostos derivados da dibromotirosina, AfAR-3A4B-3 (4,6 mg) e AfAR-3A4B-6 (6,2 mg).

Figura 18: Fluxograma de separação da fração AfAR-3A4B.

Figura 19: Cromatograma de purificação da fração AfAR-3A4B.

3.3.3- Purificação da fração AfAR-3A4B6

A fração AfAR-3A4B6 foi purificada por HPLC utilizando uma coluna Phenomenex com fase estacionária C₁₈, com H₂O/MeOH (6:4) como eluente, um fluxo de 1,0mL/min e monitorado por ultravioleta em $\lambda=254\text{nm}$. A amostra purificada foi analisada por diversos métodos de identificação estrutural, sendo identificada como sendo uma mistura de estereoisômeros denominados cavernicolina-1 e -2.

Figura 20: Cromatograma de purificação da fração AfAR-3A4B6.

A fração AfAR-3A4B3 não necessitou ser purificada por já ter apresentado um bom grau de pureza quando feita a separação da fração AfAR-3A4B no HPLC. Após análise de todos os espectros obtidos para esta fração, foi observado que esta continha a mesma mistura da fração anterior.

3.3.4- Análise e separação dos constituintes da fração AfAR-4

Devido a sua similaridade por CCD, as frações AfAR-4 e AfAR-5 foram reunidas em uma única fração. A nova fração foi então submetida a uma cromatografia em coluna pré-empacotada Sep-Pak® (SiOH, 10g) utilizando um gradiente de CH_2Cl_2 /(AcOEt/MeOH 9:1) como eluente. As frações coletadas foram analisadas por CCD (eluente CH_2Cl_2 /MeOH 9:1 e reveladas sob luz ultravioleta) e reunidas em três frações chamadas AfAR-4A (60,7 mg), AfAR-4B (125,1 mg) e AfAR-4C (41,9 mg).

Através da análise por CCD, observou-se que a fração AfAR-4B continha compostos derivados da dibrotirosina. Realizou-se uma nova cromatografia em coluna Sep-Pak (SiOH, 5g) utilizando um gradiente de (CH_2Cl_2 /hexano 6:4)/(AcOEt/MeOH 9:1) como eluente no processo. As frações coletadas foram novamente analisadas por CCD (eluente CH_2Cl_2 /MeOH 85:15) e reunidas em 6

novas frações, AfAR-4B1 (6,8 mg), AfAR-4B2 (6,7 mg), AfAR-4B3 (8,7 mg), AfAR-4B4 (78,3 mg), AfAR-4B5 (4,0 mg) e AfAR-4B6 (5,6 mg). A figura abaixo mostra o processo de separação da fração AfAR-4.

Figura 21: Fluxograma de separação da fração AfAR-4.

3.3.4.1- Separação da fração AfAR-4B4

A separação da fração AfAR-4B4 foi realizada por HPLC, utilizando-se uma coluna μ Bondpack com fase estacionária C₁₈, em modo isocrático com eluente H₂O/MeOH (6:4) e fluxo 1,0 mL/min. O processo forneceu duas frações contendo compostos derivados da dibromotirosina, AfAR-4B4-B (14,0 mg) e AfAR-4B4-D (2,2 mg), como mostra a figura a seguir. Devido a ótima qualidade dos espectros obtidos para as duas amostras, estas não necessitaram ser purificadas para a identificação

estrutural dos compostos, que são a bis-oxazolidinona e fistularina-3, respectivamente.

Figura 22: Fluxograma de separação da fração AfAR-4B4.

Figura 23: Cromatograma de separação da fração AfAR-4B4.

3.4 – Estudo da esponja *Aplysina fulva* coletada em São Sebastião-SP (AfSSAc)

A esponja *Aplysina fulva* foi coletada em São Sebastião-SP em 2002 e imediatamente preservada em EtOH. O processo de extração foi realizado por outra aluna do grupo de pesquisa e infelizmente não temos as informações detalhadas do procedimento.

3.4.1- Estudo da fração Acetato de Etila (AfSSAc)

O extrato AcOEt teve sua massa (2,9243 g) dividida em 3 partes aproximadamente iguais sendo que com cada uma dessas foram realizadas cromatografias em coluna Sephadex LH-20, utilizando MeOH como eluente. Após evaporadas em sistema Speedvac, as frações foram analisadas por CCD (utilizando $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 8:2 como eluente e observadas sob luz ultravioleta) e reunidas em 6 frações maiores de acordo com o perfil cromatográfico.

Figura 24: Fluxograma de separação do extrato acetato de etila (São Sebastião–SP).

3.4.2- Análise e separação dos constituintes da fração AfSSAc-4

Com a fração AfSSAc-4 foi realizada uma cromatografia em coluna pré-empacotada Sep-Pak® com fase estacionária sílica-gel utilizando um gradiente de ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{Éter de petróleo}$ 8:2)/(AcOEt/MeOH 85:15) como eluente. Após análise em CCD (utilizando $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 como eluente e reveladas em luz ultravioleta) as frações foram reunidas em 5 novas frações chamadas AfSSAc-4A (78,0 mg), AfSSAc-4B (51,4 mg), AfSSAc-4C (79,5 mg), AfSSAc-4D (19,2 mg) e AfSSAc-4E (14,9 mg). Através da análise por CCD, observou-se que a fração AfSSAc-4B continha características que indicaram a presença de compostos derivados da

dibrotirosina. A separação da amostra foi realizada em HPLC, utilizando-se uma coluna μ Bondpack com fase estacionária C_{18} , em modo isocrático com eluente $H_2O/MeOH$ (45:55) e fluxo 1,0 mL/min. O processo de separação forneceu a fração AfSSAc-4B3 (2,5 mg) contendo o composto aerotionina, identificado através de diversos métodos espectroscópicos.

Figura 25: Fluxograma de separação da fração AfSSAc-4.

Figura 26: Cromatograma de purificação da fração AfSSAc-4B3.

3.4.3- Análise e separação dos constituintes da fração AfSSAc-5

A fração AfSSAc-5 foi submetida a uma cromatografia em coluna pré-empacotada Sep-Pak® com fase estacionária sílica-gel utilizando um gradiente de (CH_2Cl_2 /éter de petróleo 7:3)/(AcOEt/MeOH 8:2) como eluente. Após análise em CCD (com CH_2Cl_2 /MeOH 9:1 como eluente e reveladas em luz ultravioleta em comprimento de onda 254nm) das frações obtidas, estas foram reunidas em 6 novas frações denominadas AfSSAc-5A (120,3 mg), AfSSAc-5B (18,6 mg), AfSSAc-5C (132,5 mg), AfSSAc-5D (19,6 mg), AfSSAc-5E (33,6 mg) e AfSSAc-5F (26,2 mg).

A partir da análise realizada por CCD observou-se que a fração AfSSAc-5B continha características da presença de derivados da dibromotirosina. O processo de purificação desta amostra foi realizada por HPLC, utilizando-se uma coluna Phenomenex C_{18} , em modo isocrático com eluente H_2O /MeOH (1:1) e fluxo 1,0 mL/min, e forneceu a fração AfSSAc-5B2 (2,9 mg) contendo dois compostos, cuja identificação foi feita através de diversos métodos espectroscópicos. As figuras 26 e 27 mostram o processo de separação da fração AfSSAc-5 e o cromatograma de separação da fração AfSSAc-5B, respectivamente.

Figura 27: Fluxograma de separação da fração AfSSAc-5.

Figura 28: Cromatograma de separação da fração AfSSAc-5B.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Isolamento e identificação dos compostos isolados da amostra *A. fulva* coletada em Angra dos Reis

4.1.1 – Determinação estrutural da Cavernicolina-1 e -2

Após uma série de etapas cromatográficas realizadas com o extrato bruto da amostra da esponja *Aplysina fulva* coletada em Angra dos Reis, duas frações, AfAR-3A4B3 e AfAR-3A4B6, demonstraram serem constituídas por uma mistura dos compostos cavernicolina-1 e -2. A determinação estrutural que segue foi realizada após a análise dos espectros obtidos da fração AfAR-3A4B3, que se encontrava com um bom grau de pureza. A mistura isolada apresenta-se como um pó amarelado e solúvel em MeOH. O espectro no infravermelho obtido em disco de sílica apresentou as seguintes bandas:

- Banda larga entre 3500 - 3000 cm^{-1} referente a deformação axial de N-H e O-H;
- Banda em 2920 cm^{-1} de deformação axial de C-H alifático;
- Banda em 1698 cm^{-1} atribuída a deformação axial da ligação C=O.

O espectro no ultravioleta desta amostra apresentou absorção λ_{max} 256 nm ($\epsilon = 621$), sugerindo a presença de grupo cromóforo possivelmente aromático.

Figura 29: Espectro no infravermelho da mistura cavernicolina-1 e -2 (filme).

Figura 30: Espectro no ultravioleta da mistura cavernicolina-1 e -2 (MeOH).

O espectro de RMN-¹H (Fig. 1, vol. 2) obtido da mistura contendo as cavernicolinas 1 e 2, em CD₃CN (400MHz), apresentou os seguintes sinais:

- dois singletos em δ 7,3 e 7,2, referentes a dois hidrogênios ligados a dois carbonos sp^2 ;
- um singlete largo em δ 6,9 referente a dois hidrogênios ligados a átomos de nitrogênio de amida;
- dois dubletos em δ 5,18 ($J = 4,0$ Hz) e 4,85 ($J = 10,1$ Hz), referentes a diferentes hidrogênios ligados a dois carbonos distintos funcionalizados com halogênios em posição α a carbonila;
- um dubleto em δ 4,28 ($J = 4,3$ Hz) e um duplo dubleto em δ 4,07 ($J = 10,1$ Hz e 1,5 Hz), referentes a hidrogênios ligados a dois carbonos distintos funcionalizados com nitrogênio;
- dois singletos, em δ 4,4 e 4,55, referentes a hidrogênios ligados a oxigênio (grupo hidroxila);
- quatro dubletos, em δ 2,74 ($J = 17,2$ Hz), 2,68 ($J = 16,9$ Hz), 2,55 (encoberto pelo sinal do solvente) e 2,4 ($J = 17,2$ Hz), referentes a hidrogênios metilênicos.

A partir do espectro de RMN-¹³C (Fig. 2, vol. 2) (100 MHz, CD₃CN) pôde-se observar sinais em δ 184,0, 173,9, 149,9, 149,0 e 120,9 referentes a carbonos do tipo sp^2 , sendo os sinais em δ 184,0 e 173,9 típicos de carbonos de grupos C=O. Os sinais em δ 76,6, 75,6, 68,7 e 64,7 são referentes a carbonos funcionalizados com oxigênio ou nitrogênio, enquanto que os sinais em δ 45,1 e 43,0 correspondem a carbonos do tipo metilênico (CH₂).

O espectro de RMN do tipo HMQC (Fig. 3, vol. 2), que apresenta correlações de hidrogênios ligados a carbonos (1J), apresentou os seguintes dados:

- carbono em δ 149,9 apresenta correlação com hidrogênio em δ 7,3;

- carbono em δ 149,0 apresenta correlação com hidrogênio em δ 7,2;
- carbono em δ 68,7 apresenta correlação com hidrogênio em δ 4,07;
- carbono em δ 64,7 apresenta correlação com hidrogênio em δ 4,28;
- carbono em δ 56,9 apresenta correlação com hidrogênio em δ 4,85;
- carbono em δ 53,1 apresenta correlação com hidrogênio em δ 5,18;
- carbono em δ 45,1 apresenta correlações com hidrogênios em δ 2,68 e 2,55;
- carbono em δ 43,0 apresenta correlações com hidrogênios em δ 2,74 e 2,4.

O espectro de RMN tipo COSY ^1H - ^1H (Fig. 4, vol. 2), que correlaciona hidrogênios acoplando entre si, forneceu os seguintes resultados:

- hidrogênio em δ 7,2 apresenta correlação com hidrogênio em δ 4,28, que por sua vez apresenta acoplamento com hidrogênio em δ 5,18;
- hidrogênio em δ 4,07 apresenta correlação com hidrogênio de amida em δ 6,9 e também com hidrogênio em δ 4,85;
- hidrogênios metilênicos em δ 2,74 e 2,4 apresentaram acoplamento entre si e com o hidrogênio de grupo hidroxila em δ 4,4.

Assim, com os dados dos espectros de RMN tipo COSY ^1H - ^1H e HMQC, pôde-se observar sub-unidades para a estrutura do composto investigado.

Figura 31: Sistemas de spin para as cavernicolinas 1 e 2.

O espectro do tipo HMBC ^1H - ^{13}C (Fig. 5, vol. 2), que correlaciona hidrogênios ligados a carbono através de 2, 3 ou 4 ligações (2J , 3J , 4J), apresentou os seguintes resultados:

- hidrogênio em δ 7,3 se correlaciona com os carbonos em δ 68,7, 120,8 e 184,0;
- hidrogênio em δ 7,2 se correlaciona com os carbonos em δ 64,7, 120,8 e 184,0;
- hidrogênio em δ 4,85 se correlaciona com os carbonos em δ 68,7 e 184,0;
- hidrogênio em δ 4,07 se correlaciona com os carbonos em δ 56,9, 76,6 e 173,9;
- hidrogênios em δ 2,74 e 2,4 se correlacionam com carbono em δ 173,9, mas somente hidrogênio em δ 2,4 se correlaciona com carbono em δ 76,6;
- hidrogênios em δ 2,68 e 2,55 se correlacionam com carbono em δ 173,9, mas somente hidrogênio em δ 2,55 se correlaciona com carbono em δ 75,6 enquanto hidrogênio em δ 2,68 se correlaciona com carbono em δ 149,0.

Considerando-se as correlações observadas, pôde-se estabelecer que a amostra em questão contém uma mistura de diastereoisômeros, contendo um anel lactama ligado a outro anel dibromo-ciclohexenona. As estruturas a seguir ilustram as correlações fornecidas pelo espectro do tipo HMBC ^1H - ^{13}C .

Figura 32: Correlações observadas no espectro HMBC ^1H - ^{13}C , para cavernicolina-1.

Figura 33: Correlações observadas no espectro HMBC ^1H - ^{13}C , para cavernicolina-2.

O espectro de massas da cavernicolina (Fig. 6, vol. 2) foi obtido pela técnica de impacto de elétrons (E.I.) e o pico do íon molecular M^+ pode ser visto em m/z 323, com a massa calculada do composto sendo 322,8786 referente a fórmula molecular $\text{C}_8\text{H}_7^{79}\text{Br}_2\text{NO}_3$. Observa-se também picos do íon molecular em m/z 325 e 327, referentes às fórmulas moleculares $\text{C}_8\text{H}_7^{81}\text{Br}^{79}\text{BrNO}_3$ e $\text{C}_8\text{H}_7^{81}\text{BrNO}_3$.

Desta forma, considerando todas as correlações observadas nos espectros bidimensionais e massas, as estruturas dos compostos isolados correspondem à das cavernicolinas-1 e -2.

Figura 34: Estruturas da cavernicolina-1 e -2.

As tabelas a seguir mostram as correlações vistas nos espectros de RMN ¹H e ¹³C obtidos, comparando com os dados da cavernicolina-1 e 2 isoladas anteriormente da esponja *Aplysina cavernicola*.(D'Ambrosio, 1982).

Observando-se os valores obtidos no espectro de RMN ¹H, é possível afirmar que, no caso da cavernicolina-1 os hidrogênios H₂ e H₃ encontram-se em uma relação *trans* pseudo-diaxial, resultando em um grande valor de *J* (10,1 Hz), enquanto que na cavernicolina-2 estes hidrogênios encontram-se em uma posição *cis* pseudo-axial/pseudo-equatorial entre si (baixo valor de *J*, 4,2 Hz), e, conseqüentemente, a configuração relativa C-2/C-3 pode ser aferida de acordo com a relação de Karplus. Com os dados obtidos não é possível se fazer qualquer inferência com relação à estereoquímica de C-4. Todavia, em se considerando que os derivados da dibromotirosina apresentam, na sua grande maioria, configuração absoluta C-6 S, pode-se supor esta mesma estereoquímica para ambas cavernicolinas.

Ao observarmos as relações entre as integrais dos sinais no espectro de RMN ¹H da amostra contendo as cavernicolinas, vê-se uma proporção de

aproximadamente 2:1 dos sinais atribuídos à cavernicolina-1 em relação aos sinais da cavernicolina-2, indicando que o primeiro estereoisômero é majoritário na mistura.

Tabela 1: Atribuições dos espectros de RMN- ^1H e ^{13}C para cavernicolina-1.

Cavernicolina-1 (400MHz, CD_3CN)			Cavernicolina-1 (Literatura)* (CDCl_3)	
Posição	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
1	-	184,0	-	183,7
2	4,85 (d, $J = 10,1\text{Hz}$)	56,9	5,16 (d, $J = 9,8\text{ Hz}$)	57,4
3	4,05 (dd, $J = 10,1\text{Hz}$ e $J = 1,5\text{ Hz}$)	68,7	4,22 (dd, $J = 9,8\text{ Hz}$ e $J = 1,6\text{ Hz}$)	68,0
4	-	76,6	-	75,5
5	7,3 (s)	149,9	7,44 (s)	150,4
6	-	120,8	-	119,0
7	2,8 (d, $J = 17,2\text{ Hz}$) e 2,4 (d, $J = 17,2\text{ Hz}$)	43,0	2,92 (d, $J = 16,8\text{ Hz}$) e 2,48 (d, $J = 16,8\text{ Hz}$)	42,3
8	-	173,9	-	173,9
OH	4,4	-	5,5	-
NH	6,9	-	7,6	-

*D'Ambrosio et al., 1982

Tabela 2: Atribuições dos espectros de RMN-¹H e ¹³C para cavernicolina-2.

Cavernicolina-2 (400MHz, CD ₃ CN)			Cavernicolina-2 (Literatura)* (CDCl ₃)	
Posição	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C
1	-	184,0	-	183,9
2	5,2 (d, <i>J</i> = 4,0 Hz)	53,1	5,28 (d, <i>J</i> = 4,2 Hz)	52,7
3	4,3 (d, <i>J</i> = 4,3 Hz)	64,7	4,46 (d, <i>J</i> = 4,2 Hz)	63,4
4	-	75,7	-	74,2
5	7,2 (s)	149,0	7,33 (s)	149,2
6	-	120,8	-	119,2
7	2,7 (d, <i>J</i> = 16,9 Hz) e 2,55 (d)	45,1	2,75 (d, <i>J</i> = 16,8Hz) e 2,58 (d, <i>J</i> = 16,8Hz)	44,1
8	-	173,9	-	173,5
OH	4,6	-	5,6	-
NH	6,9	-	7,6	-

*D'Ambrosio, 1982

A Tabela 3 abaixo, mostra os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos das frações AfAR-3A4B3 e AfAR-3A4B6 (Fig. 8, vol. 2), juntamente com os valores obtidos na literatura. A comparação destes valores confirma a presença da mistura dos estereoisômeros também na segunda fração citada. O espectro de massas da fração AfAR-3A4B6 (Fig. 9, vol. 2) foi obtido pela técnica de electrospray (ESI+) e, assim como para a outra fração, observa-se o pico do íon molecular em *m/z* 323 referente a fórmula molecular C₈H₇⁷⁹Br₂NO₃.

Tabela 3: Dados comparativos de RMN ^{13}C das frações isoladas da *Aplysina fulva* e da *Aplysina cavernicola* (D'Ambrosio, 1982)

	Cavernicolina-1			Cavernicolina-2		
	AfAR-3A4B3 (CD ₃ CN)	AfAR-3A4B6 (DMSO-d ₆)	Literatura (CDCl ₃)	AfAR-3A4B3 (CD ₃ CN)	AfAR-3A4B6 (DMSO-d ₆)	Literatura (CDCl ₃)
1	184,0	183,4	183,7	184,0	183,4	183,9
2	56,9	57,4	57,4	53,1	52,6	52,7
3	68,7	67,8	68,0	64,7	63,2	63,4
4	76,6	75,3	75,5	75,7	74,0	74,2
5	149,9	153,2	150,4	149,0	150,3	149,2
6	120,8	118,9	119,0	120,8	118,6	119,2
CONH	173,9	173,3	173,9	173,9	172,3	173,5
CH ₂	43,0	42,1	42,3	45,1	45,0	44,1

4.1.2 – Determinação Estrutural da fistularina-3

A identificação estrutural a seguir foi realizada com base nos espectros obtidos da amostra AfAR-4B4D, na forma de um material oleoso alaranjado, solúvel em MeOH. O espectro no ultravioleta desta fração apresentou absorções em comprimento de onda λ 284nm (ϵ = 312) e λ 223nm (ϵ = 952). O espectro no IV obtido em disco de sílica apresentou algumas bandas principais:

- Banda larga na região entre 3500-3100 cm^{-1} referente a deformação axial de ligação N-H e O-H;
- Banda em 2930 cm^{-1} referente a deformação axial da ligação C-H de cadeia alifática;
- Banda em 1659 cm^{-1} referente a deformação axial da ligação C=O de amida ou de C=C;

- Banda em 1536 cm^{-1} referente a deformação axial da ligação C=N.

Figura 35: Espectro no ultravioleta da fistularina-3.

Figura 36: Espectro no infravermelho da fistularina-3 (filme).

O espectro de RMN ^1H (Fig. 10, vol. 2), feito em DMSO- d_6 (400 MHz), obtido da amostra contendo a fistularina-3 apresentou os seguintes sinais:

- singleto em δ 7,69 referente a hidrogênio ligado a carbono sp^2 de anel aromático;
- singleto em δ 6,58 referente a hidrogênio ligado a carbono do tipo sp^2 ;
- tripleto em δ 5,57 ($J = 7,6$ Hz) referente a hidrogênio ligado a um carbono funcionalizado com oxigênio;
- multiplete em δ 4,07 referente a hidrogênio ligado a um carbono funcionalizado com oxigênio;
- singleto em δ 3,65 referente a hidrogênios ligados a um carbono de metila, funcionalizado com oxigênio (metoxila);
- dois dubletos em δ 3,62 ($J = 16,8$ Hz) e 3,20 ($J = 16,8$ Hz) referentes a hidrogênios ligados a um carbono metilênico;
- multipletos em δ 3,93 e 3,85 referentes a hidrogênios metilênicos;
- dubleto em δ 6,37 ($J = 7,8$ Hz) referente a hidrogênio ligado a oxigênio (hidroxila);
- singleto largo em δ 5,28 referente a hidrogênio ligado a oxigênio (hidroxila);
- tripleto em δ 8,36 ($J = 5,7$ Hz) e singleto em δ 7,74 referentes a hidrogênios ligados a dois nitrogênios de amida.

No espectro de RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) (Fig. 11, vol. 2) podemos observar diversos sinais de carbonos do tipo sp^2 em δ 113,0, 117,7, 120,8, 130,4, 131,2, 138,6, 147,1, 152,4, 154,4, 158,2 e 159,1, sendo os dois últimos típicos de carbonos ligados a oxigênio (grupo carbonila) e os sinais em δ 154,4 e 152,4 referentes a carbonos sp^2 ligados a nitrogênio. Os sinais em δ 75,4, 74,4, 73,5, 68,0 e 59,6 são de carbonos sp^3 funcionalizados com oxigênio ou nitrogênio, sendo o

último típico de grupo metila (metoxila). Os sinais em δ 47,0, 42,5 e 39,2 são referentes a carbonos de cadeia alquila.

A partir do espectro de RMN do tipo HMQC ^1H - ^{13}C (Fig. 12, vol. 2), pôde-se obter as seguintes informações:

- os hidrogênios em δ 7,69 correlacionam-se com carbonos em δ 130,4;
- o hidrogênio em δ 6,58 correlaciona-se fracamente com o carbono em δ 131,2;
- o hidrogênio em δ 5,57 correlaciona-se com carbono em δ 74,4;
- o hidrogênio em δ 4,07 correlaciona-se com carbono em δ 68,0;
- o hidrogênio em 3,90 correlaciona-se com carbono em 73,5;
- os hidrogênios em δ 3,65 correlacionam-se com carbono em δ 59,6;
- os hidrogênios em δ 3,88 e 3,95 correlacionam-se com carbono em δ 75,4;
- os hidrogênios em δ 3,38 e δ 3,8 correlacionam-se com carbono em δ 47,0;
- os hidrogênios em δ 3,2 e 3,62 correlacionam-se com carbono em δ 39,2;

O espectro do tipo COSY ^1H - ^1H (Fig. 13, vol. 2) apresentou as seguintes informações:

- o hidrogênio em δ 5,57 acoplado com os hidrogênios em δ 7,70, 3,8 e 3,38;
- o hidrogênio em δ 4,06 acoplado com os hidrogênios em δ 3,95, 3,4 (encoberto pelo sinal do solvente) e com o hidrogênio de hidroxila em δ 5,26.

Figura 37: Sistemas de spin para a fistularina-3.

O espectro de RMN tipo HMBC (Fig. 14, vol. 2), de correlação C-H a longa distância, apresentou as seguintes informações:

- o hidrogênio em δ 7,68 apresenta correlação com os carbonos em δ 152,4, 117,7 e 75,4;
- o hidrogênio em δ 6,57 apresenta correlação com os carbonos em δ 120,8, 147,1, 113,0, 90,3, e 73,5;
- o hidrogênio em δ 5,57 apresenta correlação com os carbonos em δ 158,2, 130,4 e 47,0;
- o hidrogênio em δ 4,06 apresenta correlação com carbono em δ 75,4;
- o hidrogênios em δ 3,65 apresentam correlações com o carbono em δ 147,1;
- o hidrogênios em δ 3,6 e 3,2 apresentam correlações com os carbonos em δ 73,5, 90,3, 131,2 e 154,4;
- o hidrogênios em δ 3,88 e 3,95 apresentam correlações com os carbonos em δ 42,5 e 68,0;
- o hidrogênio em δ 3,90 apresenta correlação com os carbonos em δ 90,3, 113,0, 131,2 e 147,1;
- o hidrogênios em δ 3,38 e 3,80 apresentam correlações com os carbonos em δ 138,6 e 158,2.

Assim, ao considerarmos todas as correlações observadas nos espectros, afirma-se que o composto possui em sua estrutura dois sistemas spiroazolidínicos idênticos ligados por uma cadeia alquila funcionalizada com grupo amida e um anel benzênico tetra-substituído. As figuras a seguir ilustram as correlações observadas no espectro de RMN HMBC.

Figura 38: Correlações observadas no espectro HMBC, do sistema spiroxazolidínico da fistularina-3.

Figura 39: Correlações observadas no espectro HMBC, do sistema central da fistularina-3.

Por não termos obtido os espectros de massa para esta amostra, realizou-se uma comparação com espectros de RMN obtidos anteriormente da fistularina-3, que foi isolada em nosso grupo de pesquisa das esponjas *Aplysina caissara* (Lira, 2005) e *Aplysina cauliformis* (Oliveira, 2005), e também da literatura (Gunasekera, 1992). Devido a grande similaridade observada, pode-se afirmar que a amostra isolada na fração AfAR-4B4D se trata mesmo da fistularina-3, ou um estereoisômero deste. A tabela a seguir mostra a comparação entre os resultados.

Tabela 4: Dados comparativos de RMN ¹³C da fração AfAR-4B4D e da fistularina-3.

	AfAR-4B4D (125MHz, DMSO-d ₆)	Oliveira, M.F. (100MHz, DMSO-d ₆)	Fistularina-3 (Piridina-d ₅)
C-1,1'	73,5	73,7	74,7
C-2,2'	120,8	121,1	121,8
C-3,3'	147,1	147,3	148,1
C-4,4'	113,0	113,3	115,2
C-5,5'	131,2	131,3	132,4
C-6,6'	90,3	90,4	91,9
C-7,7'	39,6	39,5	40,3
C-8,8'	154,4	154,5	155,2
C-9,9'	159,1 e 158,2	159,2	160,5
C-10	42,5	42,7	43,9
C-11	68,0	68,2	69,5
C-12	75,4	75,5	76,1
C-13	152,4	151,4	152,3
C-14,14'	117,7	117,3	118,4
C-15,15'	130,4	130,6	131,1
C-16	138,6	142,8	143,5
C-17	74,4	69,5	69,5
C-18	47,0	46,5	48,1
OMe	59,6	59,8	59,8

4.1.3 – Determinação estrutural da bis-oxazolidinona

O composto 3,5-Dibromo-4-[(2-oxo-5-oxazolidinil)metoxifenil]-2-oxazolidinona (ou bis-oxazolidinona) foi isolado na fração AfAR-4B4B, sendo que o mesmo composto já havia sido isolado anteriormente em nosso grupo por Miriam Kossuga, a partir da ascídia *Clavelina oblonga* (Kossuga, 2004). A identificação foi

feita por comparação direta do espectro de RMN ^1H (Fig. 15, vol. 2) obtido para a amostra (DMSO- d_6 , MHz) com os espectros obtidos anteriormente.

O espectro de RMN ^1H da fração AfAR-4B4B, apresentou os seguintes deslocamentos químicos:

- singlete em δ 7,71 referente a hidrogênios ligados a carbonos sp^2 de anel aromático;
- duplo dubleto em δ 5,59 referente a hidrogênio ligado a carbono sp^3 funcionalizado com oxigênio;
- multiplete em δ 4,95 referente a hidrogênio ligado a carbono sp^3 funcionalizado com oxigênio;
- dubleto em δ 4,14 referente a dois hidrogênios ligados a carbono de cadeia alquila funcionalizado com oxigênio;
- multipletos em δ 3,65, 3,52 e 3,37 referentes a hidrogênios metilênicos.

A tabela abaixo mostra os deslocamentos químicos da fração obtida e da literatura:

Tabela 5: Dados comparativos de RMN ^1H da fração AfAR-4B4B e da bis-oxazolidinona.

	AfAR-4B4B (400MHz, DMSO-d ₆)	bis-oxazolidinona (Literatura)* (MeOH-d ₄)
H3 –H5	7,71 (s)	7,73 (s)
H7	5,59 (t, J = 7,1 Hz)	5,59 (t)
H8	3,85 (t, J = 8,6 Hz) e 3,37 (J = 7,1 Hz)	3,84 (t) e 3,37 (m)
H10	4,14 (d, J = 5,6 Hz)	4,13 (m)
H11	4,95 (m)	4,94 (m)
H12	3,65 (t, J = 8,6 Hz) e 3,52 (J = 7,1 Hz)	3,64 (t) e 3,52 (dd)

*Kossuga, 2004

Abaixo segue a estrutura da bis-oxazolidinona:

Figura 40: Estrutura da bis-oxazolidinona.

De acordo com a análise configuracional realizada por Kossuga et al., pôde-se sugerir a estereoquímica relativa dos carbonos quirais bis-oxazolidinona isolada no presente trabalho como sendo ($7S^*$, $11R^*$), por comparação dos valores

medidos de $[\alpha]_D$ (+9,3°, c=0,9) com o da literatura (-9,2°, c=0,25), onde o composto isolado apresentava a configuração (7R*, 11S*).

Figura 41: Configuração relativa dos centros quirais da bis-oxalidinona isolada da fração AfAR-4B4B.

4.2- Isolamento e identificação dos compostos isolados da amostra *A. fulva* coletada em São Sebastião

4.2.1 – Determinação Estrutural da Aerotionina

A determinação estrutural foi realizada a partir dos espectros obtidos da amostra AfSSAc-4B3. O composto isolado apresentou-se na forma de um pó marrom e solúvel em MeOH. O espectro no ultravioleta desta amostra apresentou absorções com comprimento de onda em λ 282 nm (ϵ = 368) e λ 231 nm (ϵ = 804).

Figura 42: Espectro no ultravioleta da aerotionina (MeOH).

O espectro no infravermelho obtido em disco de sílica apresentou as seguintes bandas:

- Banda larga entre $3500 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ referente a deformação axial de N-H e O-H;
- Banda em $2937,4 \text{ cm}^{-1}$ de deformação axial de C-H alifático;
- Banda em $1652,7 \text{ cm}^{-1}$ atribuída a deformação axial da ligação C=O.
- Banda em 1540 cm^{-1} referente a deformação axial de ligação C=N.

Figura 43: Espectro no infravermelho da aerotionina (filme).

O espectro de RMN ^1H (Fig. 16, vol. 2) da aerotionina, em CD_3CN e 400 MHz, apresenta os seguintes sinais:

- singleto em δ 6,40, referente a hidrogênio ligado a carbono sp^2 ;
- singleto largo em δ 7,09, referente a hidrogênio de grupo amida;
- singleto em δ 4,14, referente a hidrogênio ligado a carbono funcionalizado com oxigênio;
- singleto em δ 3,70, referente a hidrogênios ligados a carbono sp^3 de metila, funcionalizado com oxigênio (grupo metoxila);
- dois dubletos em δ 3,05 ($J = 18,4$ Hz) e δ 3,69 ($J = 18,2$ Hz) referentes a hidrogênios metilênicos;
- dubleto em δ 3,27 ($J = 5,4$ Hz), referente a dois hidrogenios metilênicos;
- multipeto em δ 1,55, referente a dois hidrogênios metilênicos.

O espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3CN) (Fig. 17, vol. 2) apresentou sinais em δ 148,9, 132,5, 122,1 e 113,7 referentes a carbonos sp^2 , e sinais em δ 160,3 e 155,5 característicos de carbono de carbonila de grupo amida e imida do anel oxazolidínico, respectivamente. Os sinais em δ 91,8, 75,1 e 60,7 são referentes a carbonos do tipo sp^3 , sendo este último um carbono de metila ligado a oxigênio (grupo metoxila). Os sinais em δ 40,2, 39,6 e 27,3 são referentes a carbonos de cadeia alquila.

Através do espectro de RMN do tipo HMQC (Fig. 18, vol. 2), de correlação direta C-H, observamos as seguintes relações:

- correlação entre o carbono em δ 132,5 com o hidrogênio em δ 6,41;
- correlação entre o carbono em δ 75,12 com o hidrogênio em δ 4,13;
- correlação entre o carbono em δ 60,69 com os hidrogênios em δ 3,70;
- correlação entre o carbono em δ 40,18 com os hidrogênios em δ 3,05 e δ 3,69;
- correlação entre o carbono em δ 39,59 com dois hidrogênios em δ 3,27;
- correlação entre o carbono em δ 27,35 com dois hidrogênios em δ 1,55.

O espectro de RMN tipo COSY ^1H - ^1H (Fig. 19, vol. 2), apresentou as seguintes informações:

- hidrogênio em δ 7,09 acoplado com hidrogênios metilênicos em δ 3,27, os quais acoplam em série com os hidrogênios em δ 1,55;
- hidrogênio em δ 3,69 acoplado com hidrogênio em δ 3,05;
- hidrogênio em δ 4,13 acoplado muito fracamente com hidrogênio de hidroxila em δ 4,3 (não aparece no espectro de RMN ^1H).

Embora o espectro de RMN tipo COSY não tenha fornecido muitas informações, foi possível montar uma sub-unidade para o composto que está sendo investigado.

Figura 44: Sistema de spin para a aerotionina.

No espectro de RMN tipo HMBC ^1H - ^{13}C (Fig. 20, vol. 2) observou-se as seguintes correlações:

- hidrogênio em δ 6,41 correlaciona com carbonos em δ 148,9, 122,1, 113,7, 75,1 e 40,2;
- hidrogênios do grupo metila em δ 3,70 correlacionam com os carbonos em δ 148,9, 132,5, 113,7;
- hidrogênios em δ 3,05 e δ 3,69 correlacionam com carbonos em δ 155,5, 132,5, 91,7 e 75,1;
- hidrogênios em δ 3,27 correlacionam com carbonos em δ 160,3 e 27,3.

Levando em consideração todas as correlações observadas nos espectros obtidos, pode-se dizer que o composto investigado possui um sistema spiroazolidínico, o qual é típico de derivados da dibromotirosina, tal como observado para as caissarinas A e B, isoladas da esponja *Aplysina caissara* (Saeki, 2002) este ligado a uma cadeia alquila de 2 carbonos. As estruturas abaixo ilustram as correlações observadas nos espectros do tipo HMBC.

Figura 45: Correlações observadas no espectro HMBC ^1H - ^{13}C , para a aerotionina.

O espectro de massas (Fig. 21, vol. 2) da aerotionina foi realizado pela técnica de Ionização por spray de elétrons (ESI) e o pico do íon molecular $[\text{M}+\text{Na}^+]$ aparece em m/z 841, significando que a massa do composto é de m/z 818, referente a fórmula molecular $\text{C}_{24}\text{H}_{26}^{79}\text{Br}^{81}\text{Br}_2\text{N}_4\text{O}_8$. Observa-se também picos dos íons moleculares em m/z 845, 843, 839 e 837, referentes às fórmulas moleculares $[\text{C}_{24}\text{H}_{26}^{81}\text{Br}_4\text{N}_4\text{O}_8\text{Na}]$, $[\text{C}_{24}\text{H}_{26}^{79}\text{Br}^{81}\text{Br}_3\text{N}_4\text{O}_8\text{Na}]$, $[\text{C}_{24}\text{H}_{26}^{79}\text{Br}_3^{81}\text{BrN}_4\text{O}_8\text{Na}]$ e $[\text{C}_{24}\text{H}_{26}^{79}\text{Br}_4\text{N}_4\text{O}_8\text{Na}]$ respectivamente. O resultado indica a característica de simetria da estrutura da aerotionina, já que no espectro de RMN ^{13}C , identifica-se deslocamentos para apenas 12 carbonos, metade do total da estrutura.

Assim, após análise e todos os espectros de RMN ^1H e ^{13}C , bidimensionais e massas, podemos propor a seguinte estrutura:

Figura 46: Estrutura da aerotionina.

A tabela a seguir mostra as correlações vistas nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C obtidos, comparando com os dados da aerotionina isolada anteriormente das esponjas *Aplysina aerophoba* e *Verongia thiona* (Fatorusso, 1970). Este composto não havia ainda sido isolado da esponja *Aplysina fulva*.

Tabela 6: Atribuições dos espectros de RMN- ^1H e ^{13}C para aerotionina.

Aerotionina (400MHz, CD_3CN)			Aerotionina (literatura)* (100MHz, CD_3COCD_3)	
Posição	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
1,1'	75,1	4,13 (s)	75,5	4,18 (d, $J = 8$ Hz)
2,2'	113,7	-	114,2	-
3,3'	148,9	-	149,3	-
4,4'	122,1	-	122,7	-
5,5'	132,5	6,4 (s)	133,2	6,50 (s)
6,6'	91,8	-	92,6	-
7,7'	40,2	3,05 (d, $J = 18,4$ Hz) e 3,69 (d, $J = 18,2$ Hz)	40,1	3,14 ($J = 18$ Hz) e 3,84 (d, $J = 18$ Hz)
8,8'	155,5	-	155,5	-
9,9'	160,3	-	161,6	-
10,10'	39,6	3,28 (d, $J = 5,4$ Hz)	38,4	3,34 (m)
11,11'	27,3	1,55 (m)	26,1	1,60 (m)
CH_3	60,7	3,70 (s)	60,4	3,72 (s)
NH	-	7,09	-	7,58
OH	-	4,32	-	5,37 (d, $J = 8$ Hz)

*Fatorusso, 1970; Ciminiello, 1994

4.2.2 – Determinação Estrutural da AfSSAc-5B2

A determinação estrutural dos compostos presentes na fração AfSSAc-5B2 foi realizada levando-se em conta que esta se apresentava ainda impura. O espectro no ultravioleta desta amostra apresentou absorções com comprimento de onda em λ 287 nm ($\epsilon = 314$) e λ 226 nm ($\epsilon = 898$).

Figura 47: Espectro no ultravioleta da fração AfSSAc-5B2 (MeOH).

O espectro de RMN ^1H (Fig. 22, vol. 2) obtido da amostra AfSSAc-5B2, em DMSO- d_6 (400 MHz), apresentou os seguintes sinais:

- um dubleto em δ 6,59 ($J = 1$ Hz) referente a um hidrogênio ligado a carbono sp^2 ; um outro dubleto semelhante é visto em δ 6,57, porém de menor intensidade, indicando possivelmente a presença de um composto correlato minoritário;
- um singleto em δ 7,41 referente a dois hidrogênios ligados a dois carbonos sp^2 de anel benzênico;
- um dubleto em δ 3,90 ($J = 7,6$ Hz) referente a um hidrogênio ligado a carbono funcionalizado com oxigênio;
- dois singletos em δ 3,64 e δ 3,69 referentes a hidrogênios ligados a carbonos sp^3 de grupo metila, funcionalizado com oxigênio (2 grupos metoxila);
- dois dubletos, em δ 3,59 ($J = 17,7$ Hz) e δ 3,18 ($J = 18$ Hz), referentes a hidrogênios metilênicos;

- um singleto em δ 2,55 referentes a hidrogênios ligados a dois carbonos de grupo metila, funcionalizados com nitrogênio;
- um dubleto em δ 6,38 ($J = 8,1\text{Hz}$) referente a um hidrogênio de ligado a oxigênio (hidroxila);
- sinais em δ 7,85 (sl) e δ 7,60 (sl), referentes a hidrogênios de grupos amida e/ou hidroxila.

No espectro de RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) (Fig. 23, vol. 2) temos sinais de carbono sp^2 em δ 149,0, 147,0, 134,9, 132,6, 131,2, 130,8, 120,6, 112,9 e 111,5, e ainda sinais em δ 171,6, δ 160,57 e δ 154,43 referentes a carbono de grupo carbonila de éster ou amida e imida do anel oxazolidínico, respectivamente. Os sinais em δ 90,19, δ 74,8 e 73,46 se referem a carbonos sp^3 funcionalizados com oxigênio. O sinal em δ 59,4 refere-se a carbonos de grupo metila ligados a oxigênio (metoxila), enquanto que os sinais observados na região de δ 40 são típicos de carbonos de cadeia alquila.

O espectro de RMN do tipo HMQC (Fig. 24, vol. 2) apresentou as seguintes informações:

- o carbono em δ 131,2 apresenta correlação com hidrogênio em δ 7,41;
- o carbono em δ 130,8 apresenta correlação com hidrogênio em δ 6,59;
- o carbono em δ 73,4 apresenta correlação com hidrogênio em δ 3,90;
- o carbono em δ 59,8 apresenta correlação com hidrogênios em δ 3,68;
- o carbono em δ 59,5 apresenta correlação com hidrogênios em δ 3,64;
- o carbono em δ 39,1 apresenta correlação com hidrogênios em δ 3,59 e 3,18;
- o carbono em δ 40,2 apresenta correlação com hidrogênios em δ 2,55.

O carbono em δ 40,2 é observado no espectro de RMN ^{13}C tipo DEPT (Fig. 23A, vol. 2), aparecendo como sendo um carbono de grupo CH ou CH_3 . Baseado em seu deslocamento químico e na integração do pico do RMN ^1H que correlaciona com ele, afirma-se que se trata de um carbono de grupo metila.

O espectro de RMN tipo COSY ^1H - ^1H (Fig. 25, vol. 2), apresentou as seguintes informações:

- hidrogênio em δ 3,90 apresenta correlações com os hidrogênios em δ 6,38 e δ 6,59;
- hidrogênio em δ 7,41 apresenta correlação com hidrogênios metilênicos em δ 3,3 (encobertos pelo sinal do solvente);

Outras correlações podem ser observadas no espectro obtido, porém podendo ser resultados de impurezas presentes na amostra. Com base nas correlações observadas e ainda na análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , podemos construir um sistema de spin para o composto analisado.

Figura 48: Correlações observadas no espectro COSY ^1H - ^1H , para a amostra AfSSAc-5B2.

No espectro de RMN tipo HMBC ^1H - ^{13}C (Fig. 26, vol. 2) observou-se as seguintes correlações:

- o hidrogênio em δ 6,59 correlaciona com os carbonos em δ 120,6, 147,0 e 73,4;
- o hidrogênio em δ 3,90 correlaciona com os carbonos em δ 90,2, 112,9 e 147,0;

- os hidrogênios em δ 3,64 correlacionam com carbono em δ 147,0;
- os hidrogênios em δ 3,68 correlacionam com carbono em δ 149,0;
- o hidrogênio em δ 7,41 correlaciona com carbono em δ 149,0, 132,6 e 111,5;
- os hidrogênios em δ 3,59 e 3,18 correlacionam com carbono em δ 154,4, porém somente hidrogênio em δ 3,59 correlaciona com carbono em δ 73,4 enquanto que hidrogênio em δ 3,18 correlaciona com carbono em δ 130,8.

Figura 49: Correlações observadas no espectro HMBC ^1H - ^{13}C , para amostra AfSSAc-5B2.

Considerando as correlações observadas nos espectros de RMN, temos duas unidades estruturais distintas, sendo uma delas um sistema spiroxazolidínico típico de derivados da dibromotirosina e o outro um anel aromático tetra-substituído e ligado possivelmente a uma cadeia alquila, porém sem nenhum sinal de ligação entre os dois sistemas. Isto indica que a amostra analisada, muito possivelmente contém dois compostos distintos, cujas estruturas propostas são ilustradas na figura a seguir.

Figura 50: Estruturas propostas para os compostos da fração AfSSAc-5B2.

A tabela a seguir mostra as correlações vistas nos espectros de RMN ^{13}C e atribuídas ao composto I, o éster metílico do ácido verongidólico (assim denominado por ser uma estrutura diversas vezes encontradas em compostos isolados de esponjas da ordem Verongida) comparando com os dados obtidos por outra aluna do grupo de pesquisa, que isolou o composto da esponja *Aplysina fistularis*. A grande semelhança observada entre os deslocamentos químicos dos carbonos, indica fortemente que este composto está presente na amostra analisada. As correlações observadas para o composto II (2-(3,5-dibromo-4-metoxifenil)-N,N-

dimetilmetanamina foram comparadas com os dados da literatura do 2-(3,5-dibromo-4-metoxifenil)-N,N,N-trimetiletanamônio (Granato, 2005). Pelo fato da comparação ser realizada com um composto um pouco diferente, fica difícil afirmar com certeza a estrutura deste composto, mas os dados indicam que o anel benzênico tetra-substituído e simétrico se faz presente. Propõe-se uma estrutura com apenas dois grupos metila ligados ao nitrogênio baseado na intensidade do sinal presente no espectro de RMN ^1H e também pelo valor do deslocamento químico deste, que se encontra mais blindado, indicando um menor caráter eletronegativo do átomo de nitrogênio, que é resultado da carga positiva presente no composto da literatura.

Tabela 7: Dados comparativos de RMN ^{13}C dos compostos propostos da fração AfSSAc-5B2

Posição	AfSSAc-5B2 (100 MHz, DMSO- d_6)	Composto I (125 MHz, DMSO- d_6)*	Posição	AfSSAc-5B2 (100 MHz, DMSO- d_6)	Composto II (50 MHz, DMSO- d_6)**
1	73,4	73,4	1	111,5	117,3
2	112,9	112,9	2	149,0	152,2
3	147,0	147,1	3	111,5	117,3
4	120,6	120,9	4	131,2	133,3
5	130,8	130,9	5	132,6	135,9
6	90,2	91,3	6	131,2	133,3
7	39,1	38,7	7	41,0	26,9
8	154,4	151,7	8	-	65,0
9	160,6	159,9	$\text{N}(\text{Me})_2/\text{N}(\text{Me})_3^+$	40,2	52,2
10	59,5	59,5			
11	59,5	52,4			

*Espectros obtidos por Renata Gandolfi (IC)

**Granato, 2005

5. CONCLUSÃO

Com o isolamento de 7 compostos derivados da dibromotirosina, sendo dois da esponja *A. fulva* coletada em São Sebastião e outros 4 da mesma esponja coletada em Angra dos Reis, os resultados obtidos neste trabalho reforçam o fato destes compostos serem marcadores quimiotaxonômicos das esponjas da Ordem Verongida.

Vale ressaltar que as amostras da *Aplysina fulva* coletadas nos diferentes locais apresentaram uma composição química totalmente diferente em relação aos derivados da dibromotirosina. Esta variabilidade química aqui observada não parece estar relacionada com possível geração de artefatos de isolamento, uma vez que os procedimentos utilizados nas extrações e separações foram muito similares.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa realizou estudos semelhantes com esponjas da mesma espécie coletadas em Salvador-BA (1999) e em Arraial do Cabo -RJ (2001), e outros derivados bromados foram isolados apresentando também resultados distintos entre as amostras.

Dentre as possíveis razões para a variabilidade química encontrada nas amostras brasileiras da *Aplysina fulva* podemos citar a sazonalidade, diferenças de composição da água do mar afetando a nutrição da esponja ou ainda a associação com diferentes populações de microorganismos presentes no local. A seguir ilustramos todas os derivados bromados isolados de amostras de *A. fulva* coletadas em cada uma das localidades.

São Sebastião-SP (2001) – Resultados obtidos no presente trabalho.

Angra dos Reis-RJ (2002) – Resultados obtidos no presente trabalho.

Salvador-BA (1999) – Resultados obtidos pela Dra. Cecília Verônica

Nuñez.

Arraial do Cabo-RJ (2002) – Resultados obtidos pela aluna de iniciação

científica Érika V. R. Almeida.

Mangue de Jiribatuba, Baía de Todos os Santos-BA (2004) – Resultados obtidos por Suzi de O. Marques.

Os resultados apresentados ilustram a enorme variabilidade química dentre as diferentes amostras da esponja *Aplysina fulva*, não somente no atual

trabalho mas também em outros realizados com esta espécie, e também a presença dos derivados bromados nestas esponjas, não observada apenas nos estudos realizados por Kelecom e Kanengiesser (1979). Dentre possíveis razões para os resultados observados por Kelecom e Kanengiesser, podemos supor a falta de uma aparelhagem mais adequada tanto para a purificação das amostras como para a obtenção de espectros de alta qualidade, a fim de se identificar as estruturas destes compostos, uma vez que, geralmente, estes derivados bromados são isolados em quantidades muito pequenas, dificultando o processo de identificação.

O presente trabalho, portanto, apresenta sua contribuição nos estudos realizados com a esponja *Aplysina fulva* no Brasil, mostrando que estas contêm os compostos derivados da dibromotirosina em seu metabolismo secundário, sendo ainda o primeiro trabalho sobre variabilidade química apresentada por uma esponja em função de sua distribuição geográfica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRIZIO, S.; CIMINIELLO, P.; FATTORUSSO, E.; MAGNO, S.; PANSINI, M. Chemistry of Verongida Sponges I. Constituents of the Caribbean Sponge *Pseudoceratina crassa*. **Tetrahedron**, v. 50, n. 3, p. 783-788, 1994.

ANDERSEN, R.J. VAN SOEST, R.W.M.; KONG, F. 3-Alkylpiperidine alkaloids isolated from marine sponges in the Order Haplosclerida. In: PELLETIER, S.W. (Ed.). **Alkaloids: Chemical and biological perspectives**. New York: Pergamon, 1996. v. 10, p. 301-355.

ANDERSEN, R.J.; FAULKNER, D.J. A novel antibiotic from a sponge of the genus *Verongia*. **Tetrahedron Letters**, v. 14, n. 14, p. 1175-1178, 1973.

BERGQUIST, P.R. **Sponges**. London: Hutchinson of London, 1978. 268p.

BERGQUIST, P.R.; WELLS, R.J. Chemotaxonomy of the Porifera: the development and current status of the field. In: SCHEUER, P.J. **Marine Natural Products**. New York: Academic Press, 1983. v. 5, p. 1-50.

BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Natural Products Reports**, v. 21, p. 1-49, 2004.

BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Natural Products Reports**, v. 22, p. 15-61, 2005.

BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; MUNRO, M.H.G.; NORTHCOTE, P.T.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Natural Products Reports**, v. 23, p. 26-78, 2006.

BRAEKMAN, J.C.; DALOZE, D.; STOLLER, C.; VAN SOEST, R.W.M. Chemotaxonomy of Agelas (Porifera: Demospongiae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 20, p. 417-431, 1992.

CIMINIELLO, P.; CONSTANTINO, V.; FATTORUSSO, E.; MAGNO, S.; MANGONI, A. Chemistry of Verongida Sponges II. Constituents of the Caribbean Sponge *Aplysina fistularis* forma *fulva*. **Journal of Natural Products**, v. 57, p. 705-712, 1994.

CIMINIELLO, P.; FATTORUSSO, E.; MAGNO, S. Chemistry of Verongida Sponges IV. Comparison of the Secondary Metabolite Composition of Several Specimens of *Pseudoceratina crassa*. **Journal of Natural Products**, v. 58, p. 689-696, 1995.

CIMINIELLO, P.; FATTORUSSO, E.; MAGNO, S.; DELL' AVERSANO, C.; CARRANO, L.; PANSINI, M. Chemistry of Verongida Sponges VII. Bromocompounds from the Caribbean Sponge *Aplysina archeri*. **Tetrahedron**, v. 52, p. 9863-9868, 1996.

CIMINIELLO, P.; FATTORUSSO, E.; MAGNO, S.; FORINO, M.; PANSINI, M. Chemistry of Verongida Sponges VIII. Bromocompounds from the Caribbean Sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. **Tetrahedron**, v. 53, p. 6565-6572, 1997.

CIMINIELLO, P.; FATTORUSSO, E.; MAGNO, S.; PANSINI, M. Chemistry of Verongida Sponges III. Constituents of Caribbean *Verongula* sp. **Journal of Natural Products**, v. 57, p. 1564-1569, 1994.

CIMINIELLO, P.; FATTORUSSO, E.; MAGNO, S.; PANSINI, M. Chemistry of Verongida Sponges VI. Comparison of the Secondary Metabolic Composition of *Aplysina insularis* and *A. fulva*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 24, p. 105-107, 1996.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; YANG, S.S. Natural products extracts of plant and marine origin having Antileukemia potencial. The NCI experience. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 488-498, 2006.

D'AMBROSIO, M.; GUERRIERO, A.; TRALDI, P.; PIETRA, F. Cavernicolin-1 and cavernicolin-2, two epimeric dibromolactams from the mediterranean sponge *Aplysina cavernicola*. **Tetrahedron Letters**, v. 23, p. 4403-4406, 1982.

EVAN, T., RUDI, A., ILAN, M., KASHMAN, Y. Aplyzanzine A, a new dibromotyrosine derivative from a Verongida sponge. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 226-227, 2001.

FATORUSSO, E.; MINALE, L.; SODANO, G. Aerothionin, a tetrabromo-compound from *Aplysina aerophoba* and *Verongia thiona*. **Chemical Communications**, p. 752-753, 1970.

FULMOR, W.; VAN LEAR, G.E.; MORTON, G.O.; MILLS, R.D. Isolation and Absolute Configuration of the Aeroplysinin I Enantiomeric Pair from *Ianthella ardis*. **Tetrahedron Letters**, v. 11, p. 4551-4552, 1970.

GRANATO, A.C.; OLIVEIRA, J.H.L.; SELEGHIM, M.H.R.; BERLINCK, R.G.S.; MACEDO, M.L.; FERREIRA, A.G.; ROCHA, R.M.; HAJDU, E.; PEIXINHO, S. Produtos naturais da ascídia *Botrylloides giganteum*, das esponjas *Verongula gigantea*, *Ircinia Felix*, *Cliona delitrix* e do nudibrânquio *Tambja eliora*, da costa do Brasil. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 192-198, 2005.

GUNASEKERA, S.P.; CROSS, S.S. Fistularin-3 and Ketofistularin-3, feline leukemia virus active bromotyrosine metabolites from the sponge *Aplysina archeri*. **Journal of Natural Products**, v. 4, 509-512, 1992.

HADJU, E.; BERLINCK, R.G.S.; FREITAS, J.C. "Porifera". In: JOLY, C.A.; BICUDO, C.E.M. **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil**: síntese do conhecimento

ao final do século XX, 3: Invertebrados Marinhos. São Paulo: FAPESP, 1999. p. 19-31.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EdUFSCar, 2003. 151p.

JUNG, J.H.; SIM, C.J.; LEE, C.O. Cytotoxic compounds from a two-sponge association. **Journal of Natural Products**, v. 58, p. 1722-1726, 1995.

KELECOM, A. Secondary Metabolites from Marine Microorganisms. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 74, p. 151-170, 2002.

KELECOM, A.; KANNENGIESSER, G.J. Chemical Constituents of Verongia Sponges I. – A comparison Between Brazilian and Mediterranean Species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 51, p. 633-637, 1979.

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

KOSSUGA, M.H.; MACMILLAN, J.B.; ROGERS, E.W.; MOLINSKI, T.F.; NASCIMENTO, G.G.F.; ROCHA, R.M.; BERLINCK, R.G.S. (2S-3R)-2-Aminododecan-3-ol, a new antifungal agent from the ascidian *Clavelina oblonga*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1879-1881, 2004.

LIRA, T.O. **Isolamento e determinação estrutural de derivados da dibromotirosina da esponja *Aplysina caissara***. 2005. 117f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica)- Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

MANN, J. **Chemical aspects of Biosynthesis**. Oxford: Oxford University Press, 1996. p.1-3.

MANN, J. **Secondary Metabolism**. Oxford: Clarindon Press, 1978, p.316.

MC CONNELL, O.J.; LOGLEY, R.E.; KOEHN, F.E. **The discovery of marine natural products with therapeutic potencial**. Boston: Butterworth-Heinemann, 1994. p.109-174

MUNRO, M.H.G.; LUIBRAND, R.T.; BLUNT, J.W. The Search for Antiviral and Anticancer Compounds from Marine Organisms. In: SCHEUER, P.J. (Ed.). **Bioorganic Marine Chemistry**. Berlin: Heildelberg, 1987. V. 1, p. 93-185.

NICHOLAS, G.M.; NEWTON, G.L.; FAHEY, R.C. Novel bromotyrosine alkaloids: Inhibitors of micothiol S-conjugate amidase. **Organic Letters**, v. 3, p. 1543-1545, 2001.

OLIVEIRA, M.O. **Estudo químico do extrato bruto com atividade anti-tuberculose da esponja marinha *Aplysina cauliformis***. 2005. 103f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica)- Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.

PARK, Y.; LIU, Y.; HONG, J.; LEE, C.O.; KIM, D.K.; JUNG, J.H. New bromotyrosine derivatives from an association of two sponges, *Jaspis wondoensis* and *Poecillastra wondoensis*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1495-1498, 2003.

PROKSCH, P.; EDRADA, R.A.; EBEL, R. Drugs from the seas: current status and microbiological implications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 125-134, 2002.

REISWIG, H.M. Population dynamics of three Jamaican Demospongiae. **Bulletin of Marine Science**, v. 23, n. 2, p. 191-226, 1973.

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

SAEKI, B.M. **Alcalóides Bromados da Esponja *Aplysina Caissara***. 2000. 82f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica)- Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

SAEKI, B.M.; GRANATO, A.C.; BERLINCK, R.G.S.; MAGALHÃES, A.; SCHEFER A.B.; FERREIRA, A.G.; HAJDU, E. Two unprecedented dibromotyrosine-derived alkaloids from the brazilian endemic marine sponge *Aplysina caissara*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 796-799, 2002.

SHARMA, G.M.; BURKHOLDER, P.R. Studies on antimicrobial substance of sponge I. Isolation, purification, and properties of a new bromine-containing antibacterial substance. **The Journal of Antibiotics**, Serial A, v. 20, p. 200-203, 1967.

TILVI, S.; RODRIGUES, C.; NAIK, C.G.; PARAMESWARAN, P.S.; WAHIDHULLA, S. New bromotyrosine alkaloids from the marine sponge *Psammmaplysilla purpurea*. **Tetrahedron**, v. 60, p. 10207-10215, 2004.

TORRES, Y.R. BERLINCK, R.G.S., MAGALHÃES, A., SCHEFER A.B., FERREIRA, A.G., HAJDU, E., MURICY, G. Arenosclerins A-C and Haliclonacyclomine E, New tetracyclic alkaloids from a brazilian endemic Haplosclerid sponge *Arenosclera brasiliensis*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 8, p. 1098-1105, 2000.

VACELET, J.; BOURY-ESNAULT, N. Carnivorous sponges. **Nature**, v. 373, n. 6512, p. 333-335, 1995.