UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

"Metabólitos Secundários Bioativos de Invertebrados Marinhos:
Isolamento, Determinação Estrutural e Atividades Biológicas"

Miriam Harumi Kossuga

Tese apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos para a
obtenção do título de doutor em
Ciências. Área de concentração:
Físico-Química.

Orientador: Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck

São Carlos-SP
2008

DEDICATÓRIA

AOS MEUS PAIS

*José e Luíza, pela dedicação, apoio e amor incondicional
em todos os momentos de minha vida. Amo vocês!*

MUITO OBRIGADA!

Ao meu irmão Márcio pela amizade e carinho.

*Ao João pelo carinho, compreensão e especialmente muito
amor durante todos esses anos.*

*“Ninguém cresce sozinho, sempre é preciso um olhar de apoio, uma palavra de
incentivo, um gesto de compreensão,
uma atitude de amor”.*

À vocês, que sempre estiveram ao meu lado.

Agradecimentos

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

- *Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck, pela dedicação, confiança, paciência e amizade durante a realização deste trabalho;*
- *Aos Profs. Dr. Eduardo Hajdu (Museu Nacional- UFRJ) e Dra. Rosana M. Rocha (Setor de Ciências Biológicas - UFPR) pela classificação da esponja e ascídias estudadas nesta tese;*
- *Ao Prof. Dr. Célio Lopes Silva (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP) pela realização dos bioensaios de atividade antituberculose;*
- *Aos Profs. Manoel Odorico de Moraes e Cláudia do Ó Pessoa (Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC), pela realização dos bioensaios de atividade citotóxica;*
- *Ao Dr. André Tempone (Instituto Adolfo Lutz – São Paulo) pela realização dos bioensaios de atividade antiparasitária contra o protozoário *Leishmania chagasi*;*
- *Ao Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves (Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp) pela realização dos bioensaios de atividade antimicrobiana associadas a doenças do trato bucal;*
- *À Profa. Dra. Gislene G.F. Nascimento (Faculdade de Ciências da Saúde –Unimep) pela realização dos bioensaios de atividade antimicrobiana;*
- *Aos Profs. Dr. Antonio Gilberto Ferreira e Katyuscya Veloso (Departamento de Química - UFSCar), Dr. Gil V. J. da Silva e Virgínia H. B. Glass (Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP) pela obtenção de espectros de RMN;*
- *Aos Profs. Dr. Tim R. Brockson e Dr. Alcindo A. dos Santos (Departamento de Química - UFSCar) e ao Dr. Luiz Carlos Dias (Instituto de Química - UNICAMP) pela disponibilização de polarímetros para obtenção de medidas de rotação específica;*
- *Aos Profs. Dr. Tim S. Bugni e Chris M. Ireland (University of Utah, EUA), ao Dr. Brent R. Copp (University of Auckland, Nova Zelândia), ao Dr. Raymond J. Andersen e Dr. Davis E.*

Williams (University of British Columbia, Vancouver, Canadá) e ao Dr. Norberto P. Lopes (Faculdade de Ciências Farmacêuticas – FFCLRP) pela obtenção dos espectros de massas;

- *Ao Prof. Dr. Tadeusz F. Molinski (University of Califórnia, EUA) pela obtenção das curvas de dicroísmo circular, bem como pela assistência na determinação da configuração absoluta dos compostos obtidos da ascídia Clavelina oblonga;*

- *À Profa. Dra. Maria Tereza P. Gambardella (IQSC-USP) pela colaboração na determinação estrutural por difração de raios-X do composto obtido da ascídia Didemnum ligulum;*

- *Ao Instituto de Química de São Carlos pela infra-estrutura disponibilizada;*

- *Aos técnicos da Central Analítica, Silvana e Mauro pela obtenção dos espectros de RMN, ultravioleta e infravermelho;*

- *À Silvia e Andréia da seção de pós-graduação;*

- *À CAPES, pela bolsa de estudos concedida e à FAPESP pelo apoio financeiro;*

- *Aos amigos e colegas do Grupo de Química Orgânica de Produtos Naturais: Simone, Fábio, Michelli, Raquel, Eli, Stella, Carol, Érica, Renata, Suzi, Marília, Juliana, Marina, Camila, Milene, Luis Fernando, Vinícius e Richele;*

- *Em especial, à Simone e ao Fábio pela amizade e por estarem sempre dispostos a me ajudar;*

- *Aos queridos amigos: Daniela, Ana Paula, Adriano, Eurico, Haruo, Lafon, Fabiano, Driele, Josy, Tiago, Willy, Maristela, Tatiana, Avelardo, Raquel, Douglas, Jorge e Lisbeth pelos momentos felizes vividos durante todos esses anos, mas também pela presença e apoio nos momentos difíceis. Vocês são especiais! Obrigada!*

- *À todos os amigos do IQSC pela amizade, convivência e momentos de descontração;*

- *À Deus pela minha existência e oportunidade de viver tudo isso.*

Volume 1

Sumário

Índice de Figuras.....	v
Índice de Esquemas.....	viii
Índice de Tabelas.....	x
Lista de Símbolos e Abreviaturas.....	xii
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xv
 Capítulo 1 - Introdução à Química de Produtos Naturais.....	 1
1.1. Produtos Naturais.....	1
1.2. Produtos Naturais Marinhos	7
Capítulo 2 - Objetivos	18
Capítulo 3 - Parte Experimental – Equipamentos e ensaios biológicos.....	19
3.1. Metodologia geral utilizada no projeto.....	19
3.2. Técnicas Espectroscópicas	21
3.2.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	21
3.2.2. Ultravioleta-Visível (UV-Vis)	21
3.2.3. Infravermelho (IV)	21
3.2.4. Espectrometria de Massas (EM)	22
3.2.5. Rotação Ótica $[\alpha]_D$	22
3.3. Técnicas Cromatográficas	22
3.3.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	22
3.3.2. Cromatografia em Coluna pré-empacotada	23
3.3.3. Cromatografia em Coluna por exclusão de tamanho.....	23
3.3.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	23
3.3.5. Solventes	24
3.4. Protocolos dos bioensaios	25

3.4.1. Avaliação do potencial antimicrobiano.....	25
3.4.2. Determinação <i>In Vitro</i> da Atividade Antiparasitária e da Concentração Efetiva 50% (CE ₅₀) para morte de parasitas <i>Leishmania</i> sp. e <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
3.4.3. Atividade antimicobacteriana <i>in vitro</i>	28
3.4.4. Atividade antiproliferativa contra células tumorais humanas.....	29
3.4.5. Atividade antineuroinflamatória	30
3.4.6. Atividade antimicrobiana do trato bucal	30
Capítulo 4 - Estudo químico do extrato bruto da ascídia <i>Clavelina oblonga</i>	32
4.1. Introdução.....	32
4.2. Produtos Naturais isolados de ascídias do gênero <i>Clavelina</i>	32
4.3. Estudo químico da ascídia <i>Clavelina oblonga</i> – Procedimento Experimental.....	36
4.3.1 Estudo do extrato hexânico da ascídia <i>Clavelina oblonga</i>	39
4.3.2 Estudo do extrato butanólico da ascídia <i>Clavelina oblonga</i>	40
4.3.3 - Estudo do extrato de acetato de etila da ascídia <i>Clavelina oblonga</i>	40
4.3.4 Determinação da configuração absoluta do composto 2-amino-3-dodecanol (74) - (AcOEt-4A).....	41
4.4. Resultados e Discussão.....	42
4.4.1. Determinação estrutural do composto ClO-H-1B3D (73).....	43
4.4.1.1 Análise da configuração relativa dos hidrogênios 7 e 11 do composto 5-[3,5-dibromo-4([2-oxo-5-oxazolidinil]) metoxifenil]2-oxazolidinona (73) - (ClO-H-1B3D).....	46
4.4.1.2 Análise da configuração absoluta dos hidrogênios 7 e 11 do composto 5[3,5-dibromo-4([2-oxo-5-oxazolidinil]) metoxifenil]2-oxazolidinona (73) - (ClO-H-1B3D) – (Trabalho realizado com a colaboração do grupo do Prof. Molinski – EUA).....	46
4.4.2. Determinação estrutural do composto ClO-AcOEt-4A (74).....	49
4.4.2.1 - Determinação da configuração absoluta do composto 2-amino-3-dodecanol (74) - (ClO-AcOEt-4A).....	51
4.4.3 - Avaliação biológica do composto (2S,3R)- 2-amino-3-dodecanol (74).....	53
Capítulo 5 - Estudo químico do extrato bruto da ascídia <i>Didemnum ligulum</i>	55
5.1. Produtos Naturais isolados de ascídias do gênero <i>Didemnum</i>	55
5.2. Estudo químico da ascídia <i>Didemnum ligulum</i> – Procedimento Experimental.....	63
5.2.1 Estudo do extrato de acetato de etila da ascídia <i>Didemnum ligulum</i>	65

5.2.2 Estudo do extrato hexânico da ascídia <i>Didemnum ligulum</i>	66
5.2.3 Determinação da estrutura cristalina da asterubina (109).....	66
5.3. Resultados e Discussão.....	67
5.3.1. Determinação estrutural da asterubina (109).....	68
5.3.1.1 Determinação da estrutura cristalina da asterubina (109).....	69
5.3.2. Determinação estrutural da <i>N,N</i> -dimetil- <i>O</i> -metiletanolamina (110).....	71
5.3.3 Avaliação biológica dos compostos isolados da ascídia <i>Didemnum ligulum</i> : asterubina (109) e <i>N,N</i> -dimetil- <i>O</i> -metiletanolamina (110).....	74
Capítulo 6 - Estudo químico do extrato bruto da ascídia <i>Didemnum</i> sp.-Isolamento das dicetopiperazinas (130-133).	75
6.1 Introdução.....	75
6.2 Estudo químico da ascídia <i>Didemnum</i> sp. – Procedimento Experimental.....	79
6.2.1 Procedimento experimental do estudo da ascídia <i>Didemnum</i> sp. A.....	79
6.2.1.1 Determinação da configuração absoluta da fenilalanina presente nas estruturas 130 e 131.....	82
6.3 Resultados e Discussão.....	87
6.3.1. Determinação estrutural das rodriguesinas A (130) e B (131).....	88
6.3.1.1. Estudo da estereoquímica absoluta das rodriguesinas A (130) e B (131).....	96
6.3.2. Determinação estrutural da <i>N</i> -acetil-rodriguesina A (132).....	100
6.3.3. Determinação estrutural do composto <i>N</i> -acetil-rodriguesina B (133).....	104
6.4. Avaliação biológica da mistura das rodriguesinas A e B isoladas da ascídia <i>Didemnum</i> sp.	107
Capítulo 7 - Isolamento de policetídeos a partir do extrato bruto da esponja <i>Plakortis angulospiculatus</i>.	109
7.1. Introdução.....	109
7.2. Produtos Naturais isolados de esponjas do gênero <i>Plakortis</i>	110
7.3. Estudo químico do extrato bruto da esponja <i>Plakortis angulospiculatus</i> – Procedimento Experimental.....	118
7.3.1 Estudo do extrato AcOEt da esponja <i>Plakortis angulospiculatus</i>	122
7.3.2 Estudo do extrato hexânico da esponja <i>Plakortis angulospiculatus</i>	123
7.4. Resultados e Discussão.....	125

7.4.1. Determinação estrutural do composto inédito presente na fração PaE-23P4C (183) – plakortenona.....	126
7.4.2. Determinação estrutural do composto PaAE-1-2A (182) (plakortina ou 4,8-dietil-6-metil-3,6-peroxi-9-dodecanoato de metila).....	135
7.4.3. Determinação estrutural do composto PaE-2-6-P4 (184) (plakortídeo P).....	143
7.4.4. Determinação estrutural dos compostos idênticos PaE-2-5-P3 e PaE-2-4-P6 (185) (3,6-epóxi-4,6,8-trietil-2,4,9-dodecatrienoato de metila).....	150
7.4.5. Determinação estrutural dos compostos idênticos PaE-2-4-P7 e PaE-2-5-P4 (186) (espongosoritina A).....	158
7.4.6. Determinação estrutural dos compostos idênticos PaE-2-5-P2 e PaE-2-4-P5 (187) (3,6-epóxi-4,6,8-trietil-2,4,-dodecadienoato de metila).....	163
7.4.7. Avaliação biológica dos compostos isolados da esponja <i>Plakortis angulospiculatus</i> – Atividades antiparasítica, antineuroinflamatória e citotóxica.....	167
7.4.7.1 Uma breve introdução sobre doenças parasitárias: leishmaniose e doença de Chagas.....	167
7.4.7.2 Avaliação biológica dos compostos isolados da esponja <i>Plakortis angulospiculatus</i>	169
Capítulo 7 - Estudo químico do extrato bruto do ocotocoral <i>Carijoa riisei</i>	176
8.1.Introdução.....	176
8.2. Produtos Naturais isolados de ocotocorais do gênero <i>Carijoa</i>	177
8.3. Estudo químico do extrato bruto do ocotocoral <i>Carijoa riisei</i> – Procedimento Experimental.....	181
8.3.1 Estudo do extrato hexânico do ocotocoral <i>Carijoa riisei</i>	183
8.3.2 Estudo do extrato aquoso do ocotocoral <i>Carijoa riisei</i>	184
8.4. Resultados e Discussão.....	184
8.4.1. Determinação estrutural do 18-acetóxipregna-1,4,20-trien-3-ona (216).....	185
8.4.2 - Avaliação biológica do 18-acetóxipregna-1,4,20-trien-3-ona (216).....	194
Capítulo 9 – Conclusões	196
Capítulo 10 - Referências Bibliográficas	204
10.1 – Referências bibliográficas para o Capítulo 1	204
10.2 – Referências bibliográficas para o Capítulo 3.....	206
10.3 – Referências bibliográficas para o Capítulo 4.....	207

10.4 – Referências bibliográficas para o Capítulo 5.....	208
10.5 – Referências bibliográficas para o Capítulo 6.....	211
10.6 – Referências bibliográficas para o Capítulo 7.....	212
10.7 – Referências bibliográficas para o Capítulo 8.....	216

Índice de Figuras

Figura 1.1 Coniina e alguns alcalóides opióides.....	2
Figura 1.2. Salicilatos que marcaram o desenvolvimento de fármacos no período de 1800-1900.....	4
Figura 1.3. Exemplos de produtos naturais utilizados como fármacos.....	5
Figura 1.4. Distribuição dos produtos naturais que se tornaram fármacos nos últimos 25 anos, de acordo com sua origem (Newman e Cragg, 2007).....	6
Figura 1.5. Estrutura da tetrodotoxina.....	8
Figura 1.6. Estruturas dos nucleosídeos isolados e análogos sintéticos.....	10
Figura 1.7. Estrutura da briostatina 1.....	11
Figura 1.8. Exemplos de compostos de origem marinha que se encontram em fases de testes clínicos.....	12
Figura 1.9. Distribuição dos produtos naturais de origem marinha por filos (Blunt, et al., 2008).....	13
Figura 1.10. Exemplos de compostos isolados no grupo de QOPN-IQSC.....	15
Figura 1.11. Compostos derivados da dibromotirosina isolados no grupo de QOPN-IQSC.....	16
Figura 1.12. Compostos derivados da dibromotirosina isolados no grupo de QOPN-IQSC.....	17
Figura 4.1. Exemplos de compostos isolados de ascídias do gênero <i>Clavelina</i>	33
Figura 4.2. Alcalóides isolados da ascídia <i>Clavelina cylindrica</i>	34
Figura 4.3. Aminoálcoois citotóxicos obtidos a partir da ascídia <i>Clavelina phlegrae</i>	35
Figura 4.4. Foto da ascídia <i>Clavelina oblonga</i>	42
Figura 4.5. Taxonomia da ascídia <i>Clavelina oblonga</i>	42
Figura 4.6. Estrutura do composto ClO-H-1B3D (73) com os respectivos valores de deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C	44

Figura 4.7. Estrutura do composto (7 <i>R</i> ,11 <i>S</i>)-5[3,5-dibromo-4([2-oxo-5-oxazolidinil]metoxifenil)2-oxazolidinona (73).....	48
Figura 4.8. Estrutura do composto isolado (74), do composto isolado derivatizado (74b) e do composto modelo sintetizado 2 <i>S</i> , 3 <i>R</i> (74c).....	52
Figura 4.9. Espectro de dicroísmo circular de 74b (linha azul) e do modelo (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)- 74c (MeOH a 24°C).....	52
Figura 4.10. Estrutura do composto isolado da ascídia <i>Clavelina oblonga</i> com a configuração absoluta estabelecida - (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)- 2-amino-3-dodecanol.....	53
Figura 5.1. Compostos obtidos a partir de ascídias do gênero <i>Didemnum</i>	56
Figura 5.2. Estruturas das didemnimidas A-E, granulitimidas e ascididemina.....	58
Figura 5.3. Exemplos de substâncias isoladas da ascídia <i>Didemnum rodriguesi</i>	59
Figura 5.4. Ascidiatrienolídeos A-C (98-100) isolados do extrato da ascídia <i>Didemnum candidum</i>	60
Figura 5.5. Compostos obtidos de extratos de ascídias do gênero <i>Didemnum</i> que apresentaram atividade inibitória das enzimas protease HIV-1 e integrase HIV-1.....	61
Figura 5.6. Shishididemnióis A-E (104-108) obtidos do extrato de uma ascídia da família Didemnidae.....	62
Figura 5.7. Foto da ascídia <i>Didemnum ligulum</i>	67
Figura 5.8. Taxonomia da ascídia <i>Didemnum ligulum</i>	67
Figura 5.9. Estrutura da asterubina (109) com os respectivos valores de deslocamentos químicos de RMN ¹ H e ¹³ C.....	68
Figura 5.10: Representação ORTEP da molécula de asterubina (109) com os átomos identificados.....	71
Figura 5.11. Estrutura da <i>N,N</i> -dimetil- <i>O</i> -metiletanolamina (110) com os respectivos valores de deslocamentos químicos de RMN ¹ H e ¹³ C.....	72
Figura 5.12. Estrutura da <i>N,N</i> -dimetil- <i>O</i> -metiletanolamina (110).....	73
Figura 6.1. Exemplos de dicetopiperazinas.....	76
Figura 6.2. Exemplos de dicetopiperazinas obtidas de esponjas marinhas.....	77
Figura 6.3. Dicetopiperazinas obtidas de microrganismos de origem marinha.....	78
Figura 6.4 - Foto da ascídia <i>Didemnum</i> sp.....	87
Figura 6.5 - Taxonomia da ascídia <i>Didemnum</i> sp.....	87
Figura 6.6 – Fragmento estrutural dos compostos 130 e 131	89
Figura 6.7. Fragmento estrutural dos compostos 130 e 131	90

Figura 6.8. Estrutura dos homólogos rodriguesinas A (130) e B (131) presentes na forma de mistura nas frações Da-CH ₂ Cl ₂ -8D4C e Da-CH ₂ Cl ₂ -8E5D.....	91
Figura 6.9. Estruturas dos compostos 130 e 131 com a fragmentação em <i>m/z</i> 385,2500 e <i>m/z</i> 385,2488.....	94
Figura 6.10. Cromatogramas das injeções do reagente de Marfey, padrão derivatizado, amostra hidrolisada e derivatizada e co-injeção: padrão + amostra.....	98
Figura 6.11. Espectros de massas: reagente de Marfey; fenilalanina-padrão derivatizado; amostra contendo os produtos naturais hidrolisada e derivatizada, e co-injeção.....	99
Figura 6.12. Estrutura dos peptídeos modificados 130 e 131 com as configurações absolutas das fenilalaninas estabelecidas como sendo (<i>L</i>).....	100
Figura 6.13. Estrutura do composto <i>N</i> -acetil-rodriguesina A (132).....	104
Figura 6.14. Estrutura do composto <i>N</i> -acetil-rodriguesina B (133).....	107
Figura 7.1. Estruturas dos ácidos espiculólicos e dos ácidos zigônifcos.....	111
Figura 7.2. Estruturas dos o plakortídeo Q e seus derivados.....	112
Figura 7.3. Substâncias obtidas a partir do extrato da esponja <i>Plakortis quasiamphiaster</i>	113
Figura 7.4. Compostos isolados do extrato da esponja <i>Plakortis nigra</i>	114
Figura 7.5. Exemplos de compostos isolados de esponjas do gênero <i>Plakortis</i>	115
Figura 7.6. Exemplos de compostos isolados de esponjas da espécie <i>Plakortis halichondrioides</i>	116
Figura 7.7. Exemplos de compostos isolados de esponjas do gênero <i>Plakortis</i>	117
Figura 7.8. Foto da esponja <i>Plakortis angulospiculatus</i>	125
Figura 7.9 - Taxonomia da esponja <i>Plakortis angulospiculatus</i>	125
Figura 7.10 - Estrutura da plakortenona (183) com a atribuição dos respectivos valores de deslocamentos químicos de RMN de ¹ H e de ¹³ C.....	129
Figura 7.11. Experimento de desacoplamento seletivo com irradiação em δ 2,32 (H-2a) o qual simplificou o sinal de H-3.....	132
Figura 7.12. Conformações para (3 <i>R</i> [*] , 4 <i>R</i> [*] , 6 <i>S</i> [*]) plakortenona (183) – (A e B) e conformações da (3 <i>S</i> [*] , 4 <i>R</i> [*] , 6 <i>S</i> [*]) plakortenona (183) – (C e D), bem como as respectivas correlações observadas no espectro NOESY (183).....	133
Figura 7.13. Estrutura da plakortenona (183).....	135

Figura 7.14. Estrutura da plakortina (182) – (4,8-dietil-6-metil-3,6-peroxi-9-dodecanoato de metila).....	136
Figura 7.15. Estruturas com configurações relativas da plakortina e 3- <i>epi</i> -plakortina.....	142
Figura 7.16. Configuração absoluta da plakortina (182).....	142
Figura 7.17 Estrutura planar do plakortídeo P (184).....	148
Figura 7.18. Estrutura do (3 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,10 <i>R</i>) plakortídeo P (184).....	150
Figura 7.19. Estrutura planar do PaE-2-5-P3 e PaE-2-4-P6 (185) – (3,6-epóxi-4,6,8 trietil-2,4,9-dodecatrienoato de metila).....	156
Figura 7.20. Estrutura do (2 <i>Z</i> , 6 <i>R</i> , 8 <i>R</i> , 9 <i>E</i>)-3,6-epóxi-4,6,8-trietil-2,4,9-dodecatrienoato de metila (185).....	158
Figura 7.21. Estrutura planar do PaE-2-4-P7 e PaE-2-5-P4 (186) – espongosoritina A.....	161
Figura 7.22. Estrutura do (6 <i>R</i> [*] , 8 <i>R</i> [*]) espongosoritina A (186).....	163
Figura 7.23. Estrutura do (6 <i>R</i> [*] , 8 <i>S</i> [*]) 3,6-epóxi-4,6,8-trietil-2,4,-dodecadienoato de metila (187).....	167
Figura 7.24. Microscopia de transmissão eletrônica de <i>Leishmania chagasi</i> incubada com composto plakortídeo P (184). Promastigotas foram incubados por diferentes períodos a 24 °C.....	173
Figura 8.1. Substâncias isoladas da espécie <i>Carijoa multiflora</i>	178
Figura 8.2. Punaglandinas obtidas do extrato do octocoral <i>Telestoa riisei</i>	179
Figura 8.3. Exemplos de compostos isolados de octocorais.....	180
Figura 8.4. Esteróis glicosilados citotóxicos obtidos da espécie <i>Carijoa riisei</i>	180
Figura 8.5. Foto do octocoral <i>Carijoa riisei</i>	184
Figura 8.6. Taxonomia do octocoral <i>Carijoa riisei</i>	184
Figura 8.7 - Estrutura do esteróide 18-acetóxipregna-1,4,20-trien-3-ona (216).....	191

Índice de Esquemas

Esquema 3.1. Metodologia geral utilizada no desenvolvimento do presente projeto de doutorado.....	20
Esquema 4.1. Fluxograma do estudo químico (extração e partição) da ascídia <i>Clavelina oblonga</i>	36

Esquema 4.2. Fluxograma do fracionamento do extrato hexânico da ascídia <i>Clavelina oblonga</i>	37
Esquema 4.3. Fluxograma do fracionamento do extrato AcOEt da ascídia <i>Clavelina oblonga</i>	38
Esquema 4.4. Reação de derivatização do composto 2-amino-3-dodecanol (74) isolado da ascídia <i>Clavelina oblonga</i>	41
Esquema 4.5. Mecanismo da reação de hidrólise ácida de 73 resultando na liberação do (2S)-amino-1,2-propanodiol.....	47
Esquema 4.6. Reação de derivatização do (2S) e (2R) 3-amino-1,2-propanodiol com reagente de Marfey-(L).....	48
Esquema 4.7. Estrutura planar do composto 2-amino-3-dodecanol (74) com as respectivas correlações observadas nos espectros COSY e HMBC.....	50
Esquema 5.1. Fluxograma do estudo químico do extrato da ascídia <i>Didemnum ligulum</i>	64
Esquema 5.2. Estrutura da <i>N,N</i> -dimetil- <i>O</i> -metiletanolamina (110) com as respectivas correlações observadas nos espectros de COSY ¹ H- ¹ H e HMBC.....	73
Esquema 6.1. Fluxograma do estudo químico (extração e partição) do extrato da ascídia <i>Didemnum</i> sp. A.....	79
Esquema 6.2 - Fluxograma do fracionamento do extrato metanólico da ascídia <i>Didemnum</i> sp. A.....	80
Esquema 6.3 - Fluxograma do estudo químico (Extração e partição) do extrato da ascídia <i>Didemnum</i> sp. B.....	83
Esquema 6.4 - Fluxograma do estudo químico (Fracionamento) do extrato da ascídia <i>Didemnum</i> sp. B.....	84
Esquema 6.5 - Fluxograma do estudo químico (Purificação) do extrato da ascídia <i>Didemnum</i> sp. B.....	85
Esquema 6.6 - Correlações observadas no espectro do tipo HMBC para os compostos 130 e 131	92
Esquema 6.7 - Correlações observadas no espectro de RMN do tipo COSY para os compostos 130 e 131	93
Esquema 6.8. Reação de derivatização dos aminoácidos (L) ou (D), com reagente de Marfey-(L).....	96
Esquema 6.9. Estrutura do composto <i>N</i> -acetil-rodriguesina A (132) com as respectivas correlações observadas no espectro do tipo HMBC e COSY.....	102
Esquema 6.10. Estrutura do composto <i>N</i> -acetil-rodriguesina B (133) com as respectivas correlações observadas no espectro do tipo HMBC e COSY.....	105
Esquema 7.1. Fluxograma do estudo químico (extração e partição) do extrato da esponja <i>Plakortis angulospiculatus</i>	119

Esquema 7.2. Fluxograma do fracionamento do extrato AcOEt da esponja <i>Plakortis angulospiculatus</i>	120
Esquema 7.3. Fluxograma do fracionamento do extrato de éter de petróleo da esponja <i>Plakortis angulospiculatus</i>	121
Esquema 7.4. Estrutura planar da plakortenona (183) com as respectivas correlações observadas no espectro de RMN do tipo COSY.....	129
Esquema 7.5. Estrutura planar da plakortenona (183) com as respectivas correlações observadas no espectro de RMN do tipo HMBC.....	130
Esquema 7.6. Estrutura da PaAE-1-2A- plakortina (182) com as respectivas correlações observadas no espectro de RMN do tipo COSY.....	137
Esquema 7.7. Estrutura da PaAE-1-2A- plakortina (182) com as respectivas correlações observadas no espectro HMBC.....	138
Esquema 7.8. Estrutura do composto PaE-2-6-P4 (184) com as respectivas correlações observadas no espectro HMBC e COSY.....	146
Esquema 7.9. Estrutura do composto PaE-2-5-P3 = PaE-2-4-P6 (185) com as respectivas correlações observadas no espectro HMBC e COSY.....	154
Esquema 8.1. Fluxograma do estudo químico do extrato do octocoral <i>Carijoa riisei</i>	182
Esquema 8.2 - Esquema de correlações observadas no espectro de RMN do tipo COSY para o esteróide 18-acetóxipregna-1,4,20-trien-3-ona (216).....	188
Esquema 8.3 - Esquema de correlações observadas no espectro de RMN do tipo HMBC para o esteróide 18-acetóxipregna-1,4,20-trien-3-ona (216).....	190

Índice de Tabelas

Tabela 4.1. Tabela de comparação de valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C do composto CIO-H-1B3D (73) com dados de compostos encontrados na literatura.....	45
Tabela 4.2. Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) e correlações à longa distância da substância (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)- 2-amino-3-dodecanol (74) em MeOH- d_4	51
Tabela 5.1.- Dados cristalográficos da asterubina (109).....	70
Tabela 5.2. Geometria das ligações de hidrogênio da asterubina (109).....	71
Tabela 5.3. Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) e correlações à longa distância da <i>N,N</i> -dimetil- <i>O</i> -metiletanolamina (110) em MeOH- d_4	73

Tabela 6.1. Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H (500 Hz) e ^{13}C (125 Hz) bem como as correlações observadas nos espectros COSY e HMBC dos compostos 130 e 131	95
Tabela 6.2. Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C bem como as correlações observadas nos espectros COSY e HMBC do composto 132	103
Tabela 6.3. Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C bem como as correlações observadas nos espectros COSY e HMBC do composto 133	106
Tabela 6.4. Resultado da avaliação biológica no teste de atividade antimicrobiana da mistura das rodriguesinas A (130) e B (131).....	108
Tabela 7.1. Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C bem como as correlações observadas nos espectros COSY e HMBC do composto PaE-2-3P4C (183) – plakortenona.....	131
Tabela 7.2. Valores de comparação de deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C da plakortenona (183) com dados dos estereoisômeros da plakortina (182) encontrados na literatura.....	134
Tabela 7.3. Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C bem como as correlações observadas nos espectros COSY e HMBC do composto PaAE-1-2A– plakortina (182).....	139
Tabela 7.4. Valores de comparação de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C da substância PaAE-1-2A – plakortina (182) com dados encontrados na literatura.....	140
Tabela 7.5. Valores de comparação de deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C da substância PaAE-1-2A – plakortina (182) com dados dos estereoisômeros encontrados na literatura.....	141
Tabela 7.6. Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C bem como as correlações observadas nos espectros COSY e HMBC do composto PaE-2-6-P4 (184) - (plakortídeo P).....	147
Tabela 7.7. Valores de comparação de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C do composto PaE-2-6-P4 (184) com dados encontrados na literatura.....	149
Tabela 7.8. Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C bem como as correlações observadas nos espectros COSY e HMBC do composto PaE-2-5-P3 = PaE-2-4-P6 (185).....	155
Tabela 7.9. Valores de comparação de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C do composto PaE-2-5-P3 = PaE-2-4-P6 (185) com dados encontrados na literatura.....	157
Tabela 7.10. Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C bem como as correlações observadas nos espectros COSY e HMBC do composto PaE-2-4-P7 = PaE-2-5-P4 (186) (espongosoritina A).....	160
Tabela 7.11. Valores de comparação de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C do composto PaE-2-4-P7 = PaE-2-5-P4 (186) com dados encontrados na literatura.....	162

Tabela 7.12. Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C bem como as correlações observadas nos espectros COSY e HMBC do composto PaE-2-5-P2 = PaE-2-4-P5 (187) (3,6-epóxi-4,6,8-trietil-2,4,-dodecadienoato de metila).....	165
Tabela 7.13. Valores de comparação de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C do composto PaE-2-5-P2 e PaE-2-4-P5 (187) com dados encontrados na literatura.....	166
Tabela 7.14. Resultado do teste leishmanicida contra o parasita <i>Leishmania chagasi</i> e da atividade tripanossomicida contra <i>T.cruzi</i> dos compostos isolados da esponja <i>Plakortis angulospiculatus</i>	171
Tabela 7.15. Resultado do teste de atividade antineuroinflamatória.....	175
Tabela 7.16. Resultado do teste de citotoxicidade dos compostos isolados da esponja <i>Plakortis angulospiculatus</i>	175
Tabela 8.1. Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C e correlações à longa distância observadas no espectro COSY ^1H - ^1H e HMBC ^{13}C - ^1H do esteróide (216) em DMSO- d_6	192
Tabela 8.2. Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C do esteróide (216) comparados com valores de deslocamentos químicos do mesmo composto encontrado na literatura.....	193
Tabela 8.3. Resultado do ensaio <i>in vitro</i> da atividade citotóxica do 18-acetóxipregna-1,4,20-trien-3-ona (216).....	194
Tabela 8.4. Avaliação biológica do 18-acetóxipregna-1,4,20-trien-3-ona (216) frente aos testes de atividade leishmanicida contra <i>L.chagasi</i> , tripanomicida contra <i>T.cruzi</i> e citotoxicidade em mamíferos.....	195
Tabela 9.1. Compostos isolados de invertebrados marinhos durante o presente projeto de doutorado.....	199

Lista de Símbolos e Abreviaturas

CE₅₀ – 50% da concentração efetiva

IC₅₀ – Concentração que promove 50% de inibição do desenvolvimento celular ou atividade enzimática

CIM - Concentração Inibitória Mínima

RMN- ^1H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN- ^{13}C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

HMBC – Heteronuclear Multiple-bond Correlation

HSQC – Heteronuclear Single-Quantum Coherence

COSY - Correlation Spectroscopy

NOESY – Nuclear Overhauser Effect Correlation Spectroscopy

DEPT – Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

ESIMS – Espectrometria de massas em modo spray de elétrons

FABMS – Espectrometria de massas por bombardeio rápido de átomos

IV - infravermelho

UV - ultravioleta

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

PDA – Photodiode Array Detector

DBU – 1,8-diazobiciclo-[5,4,0]-unden-7-ene

TFA – ácido trifluoracético

J – constante de acoplamento

δ - deslocamento químico

s - singleto

d – dubleto

t - tripleto

q – quarteto

qui - quintupletto

m - multipletto

$[\alpha]_D$ – rotação óptica específica

c - concentração

AIDS - Síndrome da Imune Deficiência Adquirida

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

AZT – azidotimidina

Resumo

Ao longo dos últimos 20 anos os organismos marinhos se tornaram uma das fontes mais interessantes para o isolamento de produtos naturais biologicamente ativos. Apesar disso, os organismos marinhos da costa brasileira foram muito pouco explorados como fonte de metabólitos secundários.

A presente investigação se insere no âmbito de dois projetos temáticos, o primeiro desenvolvido entre 2002 e 2006 e o segundo em andamento, que têm por objetivo melhor conhecer as potencialidades de organismos marinhos da costa brasileira como fonte de metabólitos secundários biologicamente ativos. Assim, foram investigados extratos bioativos de cinco espécies de invertebrados marinhos: três ascídias, uma esponja e um octocoral, todos oriundos da costa brasileira. O fracionamento dos extratos destes animais resultou no isolamento de 15 compostos, dos quais sete inéditos na literatura.

A partir do extrato bruto da ascídia *Clavelina oblonga* foram isolados dois compostos: a 5-[3,5-dibromo-4([2-oxo-5-oxazonidinil])metoxifenil]2-oxazolidinona e o (2*S*,3*R*)- 2-amino-3-dodecanol. Este último apresentou uma potente atividade antifúngica contra *Candida albicans*.

Do extrato da ascídia *Didemnum ligulum* foram obtidos dois compostos: a asterubina e a *N,N*-dimetil-*O*-metiletanolamina.

A investigação química do extrato da ascídia *Didemnum* sp. resultou no isolamento de quatro dicetopiperazinas modificadas denominadas rodriguesinas A e B, e *N*-acetil-rodriguesinas A e B. As rodriguesinas A e B foram obtidas na forma de mistura inseparável, e puderam ser identificadas por análises espectroscópicas detalhadas, inclusive por experimentos MS/MS. A mistura contendo as rodriguesinas A e B apresentou moderada atividade antibiótica contra um isolado clínico de *Streptococcus mutans*, contra *S. mutans* UA159 e *Staphylococcus aureus* ATCC6538.

A partir do extrato bruto da esponja *Plakortis angulospiculatus* foram obtidos seis policetídeos: a plakortenona, a plakortina, o plakortídeo P, o 3,6 epoxi, 4,6,8 trietil-2,4,9-dodecatrienoato de metila, a espongosoritina A e o 3,6 epoxi, 4,6,8 trietil-2,4,-dodecadienoato de metila. Os compostos puros obtidos da esponja *P.angulospiculatus* foram avaliados em testes de atividade antiparasitária contra *Leishmania chagasi* e *Trypanosoma cruzi*, antineuroinflamatória e citotóxica frente a quatro diferentes linhagens de células tumorais. O composto plakortídeo P apresentou potente atividade leishmanicida altamente seletiva.

Finalmente, a investigação do extrato bruto do octocoral *Carijoa riisei* resultou no isolamento de um único constituinte, o esteróide 18-acetoxipregna-1,4,20-trien-3-ona, na qual apresentou atividades tripanomicida e leishmanicida.

Abstract

Throughout the last 20 years, marine organisms have become one of the most interesting sources for the isolation of biological active natural products. However, marine organisms from the Brazilian coastline have been largely underexplored as source of secondary metabolites.

The present investigation was developed in the scope of two thematic projects, the first one during 2002 and 2006 the second one, still in progress, aims the discovery of the potentialities of marine organisms of the Brazilian coast as a source of biologically active secondary metabolites.

Bioactive extracts of five species of marine invertebrates have been investigated: three ascidians, one sponge and one octocoral. The fractionation of these extracts led to the isolation of 15 compounds, of which seven are unprecedented in the literature.

From the crude extract of the ascidian *Clavelina oblonga* two compounds have been isolated: [3,5-dibromo-4-[(2-oxo-5-oxazolidinyl)]methoxyphenyl]-2-oxazolidinone and (2*S*,3*R*)-2-aminododecan-3-ol. The last one displayed potent antifungal activity against *Candida albicans*.

Two compounds have been obtained from the crude extract of the ascidian *Didemnum ligulum*: asterubine and *N,N*-dimethyl-*O*-methylethanolamine.

The chemical investigation of the extract of the ascidian *Didemnum* sp. resulted in the isolation of four modified diketopiperazines: rodriguesines A and B, as well as *N*-acetyl-rodriguesines A and B. Rodriguesines A and B have been obtained as an unseparable mixture, and have been identified by detailed analysis of spectroscopic data including MS/MS experiments. The mixture of the rodriguesines A and B displayed moderate antibiotic activity against a clinical isolate of *Streptococcus mutans*, against *S. aureus mutans* UA159 and *Staphylococcus aureus* ATCC6538.

The crude extract of the sponge *Plakortis angulospiculatus* have been investigated and six polyketides have been isolated: plakortene, plakortin, plakortide P, methyl 3,6-epoxy-4,6,8-triethyl-2,4,9-dodecatrienoate, spongisoritin A and methyl 3,6-epoxy-4,6,8-triethyldodeca-2,4-dienoate.

The polyketides isolated from the sponge *P. angulospiculatus* have been evaluated in tests of antiparasitic activity against *Leishmania chagasi* and *Trypanosoma cruzi*, antineuroinflammatory and cytotoxic against four different human cancer cell lines. Plakortide P exhibited potent and highly selective leishmanicidal activity.

Finally, the chemical investigation of the crude extract from the octocoral *Carijoa riisei* resulted in the isolation of a single constituent, the known steroid 18-acetoxypregna-1,4,20-trien-3-one, which displayed cytotoxic, antitrypanosomal and antileishmanial activity.

Capítulo 1

Introdução à Química de Produtos Naturais

1.1 - Produtos Naturais

A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (Viegas Jr., et al., 2006). A utilização de plantas no tratamento de doenças no homem data dos tempos remotos de sua história, com registro na antiga China há cerca de 2700 a.C. e em papiros egípcios por volta de 1500 a.C. (Souza, et al., 2007). A medicina tradicional chinesa desenvolveu-se com tal grandiosidade e eficiência que até hoje muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados na busca do entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento dos princípios ativos (Viegas Jr. et al., 2006).

Na Idade Antiga, além de técnicas medicinais, muitos venenos foram descobertos na natureza e utilizados para fins de defesa, caça e mesmo ilícitos, como a utilização de um veneno extraído de *Conium maculatum* na execução de prisioneiros, inclusive Sócrates, que morreu após a ingestão de uma bebida à base de cicuta que continha a coniína (**1**), durante o Império Grego (Viegas Jr. et al., 2006; Pinto, 1995).

Um exemplo marcante de produtos naturais que causaram grande impacto na humanidade, e que de certa forma modificou o comportamento do homem moderno, foi a descoberta das substâncias alucinógenas. Os povos antigos utilizavam largamente rapés e bebidas alucinógenas em suas práticas religiosas (Hostettmann et al., 2003; Viegas Jr. et al., 2006).

O ópio, preparado dos bulbos de *Papaver somniferum*, é conhecido há séculos por suas propriedades soporíferas e analgésicas. Esta planta era utilizada desde a época dos Sumérios (4000 a.C.), havendo relatos na mitologia grega atribuindo à papoula do ópio o simbolismo de Morfeu, o deus do sono. Em 1803 Derosne descreveu o “sal de ópio”, iniciando os primeiros estudos sobre a constituição química do ópio. Do ópio são obtidos alcalóides como a morfina (**2**), constituinte majoritário utilizado como analgésico até hoje; a codeína (**3**), um antitussígeno; a tebaína (**4**), antagonista da

morfina; a narcotina (5), um antitussígeno e espasmolítico, e a papaverina (6), com atividade espasmolítica. A grande eficácia da morfina como analgésico foi reconhecida após a invenção da seringa hipodérmica (1835), e foi largamente utilizada pelas tropas dos Estados Unidos durante a Guerra de Secessão (1861-1865) (Hostettmann et al., 2003; Viegas Jr. et al., 2006).

Figura 1.1 – Coniína e alguns alcalóides opióides.

As plantas representaram durante muitos séculos a única fonte de agentes terapêuticos para o homem. Muitos desses produtos naturais são utilizados até hoje.

A história do Brasil está intimamente relacionada ao comércio de produtos naturais (as especiarias), os quais determinaram as várias disputas de posse da nova terra e, por fim, a colonização portuguesa. Do pau-brasil (*Cesalpinia echinata*) era obtido um corante de cor vermelha, muito utilizado para tingimento de roupas e como

tinta de escrever, que já era conhecido e utilizado nas Índias Orientais desde a Idade Média (Souza et al., 2007).

Apesar da utilização dos produtos naturais desde tempos imemoriais, o desenvolvimento e aplicação dos produtos naturais apresentaram pouco progresso até a década de 1940. Isto se deve às inúmeras limitações existentes para a caracterização dos princípios ativos presentes nas espécies, já que, até então, a principal ferramenta utilizada na elucidação dessas substâncias era a realização dos métodos químicos de análise, que consistiam no uso de reações para degradar, derivatizar e identificar grupos funcionais, na tentativa de se determinar a estrutura da substância desejada. Como consequência, eram necessárias grandes quantidades da substância a ser analisada, o que na área de produtos naturais é uma séria limitação, já que, na grande maioria dos casos, as substâncias são isoladas em quantidades na ordem de miligramas. Apesar da importância dos métodos químicos de análise, a área de produtos naturais somente pôde se desenvolver a partir do advento dos métodos físicos de análise e de purificação, como por exemplo, a espectroscopia na região do visível, ultravioleta e infravermelho, desenvolvidas no início dos anos 40 e ressonância magnética nuclear nos anos 60 (Souza et al., 2007).

O conhecimento de plantas e animais com extratos bioativos pelos povos primitivos e indígenas pode ser considerado fator fundamental para o descobrimento de substâncias tóxicas e medicamentosas ao longo do tempo. A convivência e o aprendizado com os mais diferentes grupos étnicos trouxeram valiosas contribuições para o desenvolvimento da pesquisa em produtos naturais (Viegas Jr. et al., 2006).

No século XIX, com o desenvolvimento da indústria farmacêutica, os produtos naturais começaram a ser explorados comercialmente para o desenvolvimento de medicamentos e as plantas terrestres tiveram grande importância como a primeira fonte de matéria prima para estas indústrias (Hostettmann et al., 2003).

Talvez o marco mais importante para o desenvolvimento dos fármacos a partir de produtos naturais tenha sido a descoberta dos salicilatos obtidos da casca de *Salix alba*, que apresentaram propriedades analgésicas e antipiréticas. Do extrato de *S. alba* foi isolada a salicina (**7**), a qual serviu de modelo para a síntese do ácido salicílico (**8**) e do ácido acetil-salicílico (AAS) (**9**), um composto menos ácido que o ácido salicílico mas com a mesma propriedade analgésica desejada. Após mais de 100 anos de sua

descoberta, o AAS continua sendo alvo de inúmeras pesquisas sobre sua aplicação terapêutica como analgésico e anti-inflamatório, atuando no controle da febre, na artrite reumatóide e na inibição da agregação plaquetária (Yunes, 2001).

Figura 1.2 – Salicilatos que marcaram o desenvolvimento de fármacos no período de 1800-1900.

A importância dos produtos naturais, de origem vegetal ou animal, no combate a diferentes tipos de doenças adquiridas pela espécie humana, pode ser vista pelo grande número de fármacos que estão disponíveis no mercado. Como exemplo, podemos citar a artemisinina (**10**), um antimalárico obtido da planta *Artemisia annua*; a atropina (**11**), anticolinérgico extraído da planta *Atropa belladonna*; a cafeína (**12**), estimulante extraído de diferentes plantas como *Coffea arábica* (café), *Ilex paraguariensis* (erva-mate) e *Paullinia cupana* (guaraná); a estreptomicina (**13**), o primeiro antibiótico utilizado no tratamento da tuberculose, isolado do fungo *Streptomyces griseus*; o eugenol (**14**), anestésico local recomendado em casos de dor de dente, extraído do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) e a pilocarpina (**15**), extraída das folhas da planta *Pilocarpus jaborandi*, sendo utilizada como colírio no tratamento de glaucoma (Rocha et al., 2001).

Figura 1.3 – Exemplos de produtos naturais utilizados como fármacos.

A grande diversidade estrutural de metabólitos sintetizados por organismos vivos representa um grande potencial para a descoberta de compostos para serem utilizados comercialmente.

Segundo pesquisa realizada entre 1981 – 2006, nos últimos 25 anos foram introduzidas no mercado 1010 novas entidades químicas (NCEs – “New Chemical Entities”), que apresentaram as mais variadas atividades biológicas: antifúngica, antibacteriana, antiviral, anticancerígena, entre outras. Como demonstrado na **Figura 1.4**, cerca de 42% desses novos fármacos são produtos naturais ou derivados de produtos naturais, ou foram sintetizados e tiveram suas estruturas baseadas em grupos farmacofóricos de produtos naturais. Estas estatísticas claramente demonstram a

importância e grande potencial dos produtos naturais para a descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos (Newman e Cragg, 2007).

Figura 1.4 – Distribuição dos produtos naturais que se tornaram fármacos nos últimos 25 anos, de acordo com sua origem (Newman e Cragg, 2007).

PN: Produto natural; **DPN:** Derivado de produto natural; **S*:** Totalmente sintetizado mas com grupo farmacofórico originário de um produto natural; **S:** Totalmente sintetizado; **V:** Vacina; **B:** Biológico (geralmente grandes peptídeos ou proteínas).

A descoberta de novos fármacos pela indústria farmacêutica é considerada por especialistas uma atividade complexa, multifatorial, cara, demorada, envolvendo a aplicação de técnicas e metodologias modernas, e cuja produtividade é questionada com base em dados que demonstram a relação inversamente proporcional entre os investimentos em Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) e a descoberta de NCEs. A identificação de NCEs seguras e eficazes para um determinado alvo terapêutico, constitui o principal foco das indústrias farmacêuticas. Os requisitos básicos para um NCE de uso oral incluem boa disponibilidade, potência intrínseca, ausência de toxicidade e vantagens significativas quando comparado à terapia usual, para o tratamento da doença alvo. O potencial de ação completo de um NCE só é conhecido até que seja testado nas diferentes etapas de ensaios clínicos. Estima-se que a taxa de

insucesso deste processo seja superior a 90%. As principais razões incluem perda de eficácia clínica, propriedades farmacocinéticas inadequadas, toxicidade, reações adversas, razões comerciais e limitações farmacotécnicas. A taxa de sucesso de NCEs, desde a etapa de descoberta até o estágio de desenvolvimento pré-clínico, pode variar de 1 a cada 10.000 compostos (Lima, 2007; Cragg et al., 1997).

Os fatos relatados só vêm comprovar a valiosa contribuição da pesquisa de produtos naturais como fonte para o desenvolvimento de novos NCEs, já que, mesmo com todas as dificuldades enfrentadas para um novo fármaco entrar no mercado, muitos tiveram sua origem em produtos naturais.

1.2 - Produtos Naturais Marinhos

Com a necessidade de se combater novas linhagens resistentes de microrganismos e produzir fármacos eficazes contra novas doenças, estimulou-se a procura por fontes não convencionais de alimentos e medicamentos. A imensidão dos oceanos e a grande variedade de espécies marinhas tornaram os oceanos um campo bastante atrativo tanto para obtenção de alimentos como para a farmacologia moderna (Kelecom, 1997).

Embora a diversidade de vida do ambiente terrestre seja extraordinária, a maior biodiversidade se encontra nos oceanos. Os oceanos cobrem mais de 70% da superfície terrestre e conta com milhões de espécies de organismos vivos, entre plantas, invertebrados marinhos e microrganismos. Acredita-se que nos amplos e inexplorados fundos oceânicos habitem até cinco milhões de espécies diferentes (Fonte:<http://paginas.terra.com.br/educação/sariego/organismosmarinhos.htm/biodiversidade> - acessada em 10/09/2008). Esses organismos são, na sua maioria, sésseis e se desenvolvem em condições totalmente diferentes do ambiente terrestre. A evolução e sobrevivência destas espécies resultaram em organismos que produzem e/ou acumulam metabólitos secundários estruturalmente únicos com funções ecológicas das mais diversas, os quais possuem diversas atividades biológicas (Donia e Hamann, 2003; Saleem et al., 2007). Um fator particularmente significativo dos animais do meio ambiente marinho é a grande diversidade e altos níveis taxonômicos (Filos e Classes) associados com microrganismos, que resultaram em uma imensa diversidade de

moléculas sem precedentes, com incorporação de elementos e grupos funcionais não encontrados em produtos naturais de espécies terrestres (Hamann et al., 2007).

Milhões de organismos marinhos produzem substâncias que são utilizadas na comunicação, defesa, inibição do desenvolvimento de competidores, reprodução, ou simplesmente como subproduto do seu metabolismo. Sendo assim, essas moléculas podem apresentar atividades biológicas diversas, sendo úteis no desenvolvimento de novas terapias contra muitas enfermidades (Donia e Hamann, 2003).

Por muito tempo os oceanos permaneceram inexplorados devido às dificuldades de acesso ao ambiente marinho. Apesar das dificuldades em se estudar produtos naturais marinhos, antigas civilizações chinesas já usavam algas marinhas como vermífugos e também possuíam vastos conhecimentos sobre peixes tóxicos, como o *Tetraodon stellatus*, que concentra em seus tecidos a tetrodotoxina (**16**) (Halstead, 1965). Há, ainda, registros de organismos tóxicos como peixes, moluscos, equinodermas e águas vivas, que eram de conhecimento das civilizações Babilônicas, Assírias, Persas, Indianas, Helênicas e Romanas (Kelecom, 1999).

Figura 1.5 – Estrutura da tetrodotoxina.

Trabalhos científicos sobre produtos naturais de origem marinha começaram de forma esporádica no início do século XX, com o isolamento de esteróides a partir de esponjas e outros animais marinhos, de carotenóides presentes em diversos animais marinhos e dos estudos de toxinas dos peixes da família Tetraodontidae (Dorée, 1909; Henze, 1909; Lederer, 1938; Tahara, 1910).

Mas foi somente a partir da Segunda Guerra Mundial que os estudos sobre produtos naturais de origem marinha cresceram de forma significativa, principalmente

em decorrência do desenvolvimento de equipamentos de mergulho que deram início ao mergulho autônomo facilitando o até então difícil acesso ao ambiente submarino. Mas também devido aos avanços tecnológicos na área de instrumentação de isolamento e análise que possibilitaram isolar e identificar compostos mais complexos em quantidades menores de massa e de forma mais rápida (McConnell et al., 1994).

Historicamente considera-se que a química de produtos naturais de origem marinha teve início com o isolamento dos nucleosídeos espongotimidina (**17**) e espongouridina (**18**) a partir da esponja *Cryptotethya crypta*, por Bergmann e seus colaboradores (Bergmann, 1949; Bergmann e Feeney, 1950, 1951; Bergmann e Burke, 1955; Bergmann et al., 1957). O estudo de análogos sintéticos desses nucleosídeos levou ao desenvolvimento dos agentes antiviral Ara-A (**19**) e do anticancerígeno Ara-C (**20**). Estes compostos foram os primeiros derivados de produtos naturais marinhos a atingir o mercado para uso clínico. O Ara-C é produzido sinteticamente e distribuído como Cytosar U[®], utilizado para o tratamento de leucemia aguda não-linfocítica, leucemia crônica mielocítica e leucemia da meninge. O Ara-A é obtido biotecnologicamente, através da cultura de bactéria terrestre *Streptomyces antibioticus* e distribuído como Vira-A[®] e é indicado para o tratamento de viroses por *Herpes simplex* e *Herpes zoster*. Estes compostos deram origem a toda uma nova geração de agentes antivirais, dos quais os mais notáveis são, sem dúvida, o acyclovir (**21**) e a azidotimidina (AZT) (**22**), potentes agentes antivirais (Munro et al., 1993; König et al., 1996; McConnell et al., 1994; Newman et al., 2000).

Figura 1.6 – Estruturas dos nucleosídeos isolados e análogos sintéticos.

Os produtos naturais de origem marinha têm fornecido considerável número de candidatos a fármacos. Muitas dessas substâncias estão em fase de testes pré-clínicos e clínicos.

Como exemplo de um composto de origem marinha que se encontra em testes de fases clínicas, podemos citar a briostatina 1 (**23**), uma lactona macrocíclica isolada do briozoário *Bugula neritina* nos anos 70, que apresentou propriedades anticancerígenas. Posteriormente descobriu-se que a briostatina possui uma origem simbiótica, sendo produzida por uma bactéria. A briostatina 1 foi licenciada pela Bristol-Mayers Squibb. Tendo completado as Fases I e II dos testes clínicos, encontra-se atualmente na Fase III dos testes clínicos em humanos realizados pelo National Câncer Institute (NCI). Entretanto, a briostatina só é eficiente se administrada em conjunto com outros medicamentos (Kijjoa e Sawangwong, 2004; Newman e Cragg, 2004; Baker et al., 2007).

Figura 1.7 – Estrutura da briostatina 1.

Outros exemplos de produtos naturais de origem marinha que se encontram em fases de testes clínicos são:

- a ecteinascidina 743 (**24**), um alcalóide tetrahidroisoquinolínico isolado do tunicado *Ecteinascidia turbinata*, o qual apresentou atividade anticancerígena. A ecteinascidina 743 foi licenciada pela Ortho Biotech (J&J) e encontra-se na Fase III dos testes clínicos em humanos (Kijjoa e Sawangwong, 2004; Newman e Cragg, 2004);
- o kahalalídeo F (**25**), um depsipeptídeo cíclico com atividade anticancerígena encontrado no molusco marinho *Elysia rufescens*. O kahalalídeo F encontra-se na Fase II dos testes clínicos (Kijjoa e Sawangwong, 2004; Newman e Cragg, 2004);
- a aplidina (**26**) isolada a partir da ascídia *Aplidium albicans*, apresentou propriedade anticancerígena e encontra-se na Fase II de testes clínicos (Kijjoa e Sawangwong, 2004; Newman e Cragg, 2004).
- o discodermolídeo (**27**), uma lactona polihidroxilada, isolada da esponja *Discodermia dissoluta*. Este composto é um potente agente imunossupressor e anticancerígeno. Foi licenciado pelo Novartis Pharma AG, em 1998 e encontra-se na Fase I de testes clínicos (Kijjoa e Sawangwong, 2004; Newman e Cragg, 2004).

Esses são apenas alguns dos muitos compostos de origem marinha que estão em estudos de testes clínicos. Provavelmente nos próximos 20 anos, ao menos 1 composto de origem marinha deverá ser aprovado e entrará no mercado como um novo fármaco (Newman e Cragg, 2004).

Figura 1.8 – Exemplos de compostos de origem marinha que se encontram em fases de testes clínicos.

Muitos compostos de origem marinha isolados de invertebrados, algas e microrganismos demonstraram apresentar as mais diversas atividades biológicas, tais como antibacteriana, anticoagulante, antifúngica, anti-inflamatória, antimalárica, antituberculose, antiviral, dentre outras (Mayer, et al., 2007).

Segundo a base de dados MARINLIT, mais de 18.000 metabólitos secundários de origem marinha foram descritos até 12/2007 (Blunt, et al., 2008). A maioria desses compostos foram isolados do Filo Porifera (37%), seguido pelo Filo Cnidaria e de microrganismos em geral (13%), conforme ilustrado na **Figura 1.9**.

Figura 1.9 – Distribuição dos produtos naturais de origem marinha por filos (Blunt, et al., 2008).

Somente no ano de 2006 foram isolados 779 novos metabólitos secundários de origem marinha (Blunt, et al., 2008).

Nas últimas décadas, tem se observado o desenvolvimento de novas enfermidades associadas ao envelhecimento populacional e à adoção de novos padrões de vida e de consumo instituídos pela sociedade moderna, como por exemplo, as doenças degenerativas e o câncer. Terapias de alto custo nem sempre acessíveis a todas as classes sociais e fármacos com graves efeitos colaterais são fatos comumente observados no tratamento dessas doenças. Cada vez mais se torna necessário a procura por novos compostos bioativos mais eficazes e menos agressivos à saúde dos pacientes, assim como desenvolvimento de metodologias de síntese, que tornem

economicamente viáveis a produção desses novos medicamentos como também a compreensão dos mecanismos de ação biológica dessas substâncias.

1.3 – A Química de Produtos Naturais Marinhos no IQSC-USP

As pesquisas com Produtos Naturais marinhos no Brasil tiveram início na década de 60 no Centro de Pesquisas de Produtos Naturais no Núcleo de Pesquisas de Ciências Naturais da UFRJ (Kelecom, 1997). No entanto, ainda são poucos os trabalhos científicos que relatam os compostos isolados e suas atividades biológicas de produtos naturais de organismos marinhos do litoral brasileiro. As poucas informações existentes sobre a química desses organismos, muitos dos quais são espécies endêmicas, indicam um grande potencial de pesquisa para a área no Brasil.

Até o ano de 2002, apenas 4 grupos de pesquisa dedicavam a totalidade de seus trabalhos ao isolamento, identificação e avaliação biológica e/ou função ecológica de produtos naturais de organismos marinhos coletados no Brasil (Pinto, et al., 2002).

O Grupo de Química Orgânica de Produtos Naturais do Instituto de Química de São Carlos (GQOPN), coordenado pelo Prof. Dr. Roberto Berlinck, há mais de 15 anos desenvolve atividades de pesquisas que objetivam o isolamento e a identificação de produtos naturais biologicamente ativos provenientes de invertebrados e de microrganismos marinhos. A pesquisa do grupo tem por principal objetivo a descoberta de produtos naturais com atividade biológica, com potencial de utilização médica, biológica e agroquímica (<http://www.iqsc.usp.br/pesquisa/gopn/>).

Como exemplos de compostos isolados recentemente pelo Grupo de Química Orgânica de Produtos Naturais do Instituto de Química de São Carlos, coordenado pelo Prof. Dr. Roberto Berlinck, podemos citar três novos meroterpenóides sulfatados obtidos da esponja *Callyspongia* sp. (**28-30**) que apresentaram atividade inibitória da enzima adenina fosforribosil transferase de *Leishmania tarentolae* (L-APRT). Os compostos ilhabelanol (**28**) e ilhabreno (**29**) apresentaram inibição da L-APRT de 0,7 µg/mL a uma concentração de 50 µg/mL. A isoakaterpina (**30**) foi avaliada nos testes de inibição da enzima L-APRT e apresentou IC₅₀ de 1,05 µM. Os compostos isolados de *Callyspongia* sp são os mais potentes inibidores da enzima L-APRT testados até o momento (Gray et al., 2006).

Figura 1.10 – Exemplos de compostos isolados no grupo de QOPN-IQSC.

De um estudo sobre a variabilidade química de metabólitos secundários produzidos pela esponja *Aplysina fulva* coletada em cinco diferentes localidades da costa brasileira e uma coletada na costa americana, foram identificados 19 (**31-49**) compostos derivados da dibromotirosina, comprovando que esses metabólitos podem ser considerados marcadores quimiotaxômicos de esponjas da Ordem Verongida. Dentre estes compostos, a aplisinafulvina (**31**) é inédita na literatura (Nuñez et al., 2008).

Figura 1.11 – Compostos derivados da dibromotirosina isolados no grupo de QOPN-IQSC.

Figura 1.12 – Compostos derivados da dibromotirosina isolados no grupo de QOPN-IQSC.

Estes são apenas alguns exemplos de metabólitos secundários isolados a partir de extratos de invertebrados marinhos obtidos por nosso grupo de pesquisa.

Capítulo 2

OBJETIVOS

Dando continuidade aos estudos realizados no Grupo de Química Orgânica de Produtos Naturais do Instituto de Química de São Carlos, coordenado pelo Prof. Dr. Roberto Berlinck, no âmbito dos projetos temáticos “Produtos Naturais de Invertebrados Marinhos: Potenciais Agentes Quimioterápicos Anti-Proliferativos, Antibióticos e Contra Doenças Tropicais” e “Descoberta e desenvolvimento de potenciais agentes quimioterapêuticos a partir de invertebrados marinhos e de microrganismos associados” esse projeto de doutorado teve por objetivos:

- 1- Selecionar extratos de invertebrados marinhos baseando-se em testes de atividades biológicas;
- 2- Isolar e identificar as substâncias presentes nos extratos selecionados;
- 3- Avaliar as atividades biológicas das substâncias puras nos bioensaios cujo extrato bruto foi ativo.

Capítulo 3

Parte Experimental

3.1 – Metodologia geral utilizada no projeto - Isolamento e Determinação Estrutural.

Os extratos investigados foram selecionados a partir de uma triagem realizada com 500 extratos de invertebrados marinhos. Esses extratos foram submetidos a testes de atividade antituberculose, citotóxica, antiparasitária e antimicrobiana.

O isolamento das substâncias presentes nos extratos foi monitorado por cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência com detector espectrofotométrico UV-Visível (detector de arranjo de fotodiodos - “Photodiode Array Detector”) (CLAE-PDA) e por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-¹H). No processo de isolamento e purificação foram empregadas diversas técnicas cromatográficas.

Para identificação das substâncias isoladas foram utilizadas técnicas espectroscópicas de uso corrente: infravermelho, ultravioleta, diferentes experimentos de ressonância magnética nuclear, espectrometria de massas e de dicroísmo circular.

Os bioensaios foram realizados por colaboradores:

- Atividade antituberculose – realizado pelo grupo do Prof. Dr. Célio Lopes Silva da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP;
- Atividade citotóxica – realizado pelo grupo dos Profs. Manoel Odorico de Moraes e Claudia do Ó Pessoa do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC;
- Atividade antiparasitária contra o protozoário *Leishmania chagasi* e contra *Trypanosoma cruzi* – realizado pelo Dr. André Tempone do Instituto Adolfo Lutz – São Paulo;
- Atividade antimicrobiana – realizado pelos grupos dos Profs. Dra. Gislene G.F. Nascimento da Faculdade de Ciências da Saúde – Unimep e Dr. Reginaldo Gonçalves da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp.

Esquema 3.1 - Metodologia geral utilizada no desenvolvimento do presente projeto de doutorado.

3.2. Técnicas Espectroscópicas

3.2.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram obtidos utilizando-se os seguintes aparelhos: Bruker AC 200 (4,7 Tesla), operando a 200,1 MHz na frequência do hidrogênio (^1H); Bruker DRX 400 (9,4 Tesla), operando a 400,35 MHz na frequência do hidrogênio (^1H) e a 100,10 MHz na frequência do Carbono (^{13}C) no 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) na FFCLRP.

As amostras para análise foram preparadas utilizando-se de solventes deuterados de marca Cambridge Isotopes: metanol deuterado ($\text{MeOH-}d_4$), dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$), clorofórmio deuterado (CDCl_3), acetonitrila deuterada ($\text{MeCN-}d_3$) e benzeno deuterado (C_6D_6). O padrão usado como referência interna foi o tetrametilsilano (TMS).

3.2.2. Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

Os espectros na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) foram obtidos com um espectrofotômetro Hitachi, modelo U-3210 na região de 200-500 nm (IQSC-USP). As amostras foram preparadas em MeOH grau espectroscópico (99,9% A.C.S.), da marca Sigma- Aldrich.

3.2.3. Infravermelho (IV)

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos em um espectrofotômetro FTIR Bomem modelo MB-102 (IQSC-USP). As amostras foram dissolvidas em pequena quantidade de solvente volátil apropriado e aplicadas sob forma de filme em disco de silício, evaporando o solvente sob vácuo em dessecador.

3.2.4. Espectrometria de Massas (EM)

Os espectros de massas foram obtidos por bombardeamento rápido de átomos (FABMS), por impacto de elétrons (EIMS), ionização química (CIMS) ou spray de elétrons (ESIMS). Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos em um espectrômetro VG-7070 operando a 70 eV. Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos operando-se com resolução nominal 5000-10000. Como padrões internos foram utilizados: perfluorquerosene, 3-nitrobenzil álcool ou polietilenoglicol.

Também foram obtidos espectros de massas de baixa e alta resolução nos espectrômetros Bruker-Hewlett Packard 1100 Esquire (LC system mass spectrometer ESI-QIT-MS) na University of British Columbia e no espectrômetro Bruker Daltonics modelo Ultra-TOF (gás de colisão N₂) na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

3.2.5. Rotação Ótica [α]_D

As medidas de rotação ótica foram obtidas em um Polarímetro Perkin-Elmer modelo 241 (DQ-UFSCar) ou em um Polarímetro Perkin-Elmer modelo 341 em 589 nm (UNICAMP). As amostras foram dissolvidas em 1,0 mL de MeOH grau espectroscópico da marca Aldrich e o experimento realizado em temperaturas de 20 °C ou 25 °C.

3.3. Técnicas Cromatográficas

3.3.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para análise qualitativa em CCD foram utilizadas cromatofolhas de sílica-gel 60 sobre poliéster com indicador ultravioleta F₂₅₄ 20 x 20 cm (Aldrich). As cromatofolhas foram reveladas por inspeção sob luz ultravioleta (UV) com lâmpada Spectroline modelo ENF-240 C/FE nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm, além de serem usados os seguintes reagentes como reveladores:

- a- Solução de 0,2 g de ninidrina em 100 mL de EtOH P.A. (Quimex), aquecendo-se a placa em seguida por 5 minutos em estufa a 120° C, para identificação qualitativa de aminoácidos e aminas primárias;
- b- Solução de 20% de ácido fosfomolibdico em EtOH P.A. (Quimex), aquecendo-se em seguida por 5 minutos em estufa a 120° C, para identificação qualitativa de substâncias redutoras;
- c- Solução Dragendorff. (solução A: 0,85 g de nitrato básico de bismuto em 10,0 mL de ácido acético glacial + 40 mL de água, e solução B: 8,00 g de iodeto de potássio dissolvido em 20 mL de água. Mistura-se 1:1 de soluções A e B resultando em uma solução estoque. Utiliza-se a mistura na proporção: 1,0 mL da solução estoque com 2,0 mL de ácido acético glacial e 10,0 mL de água), para identificação qualitativa de alcalóides, principalmente.

3.3.2. Cromatografia em Coluna pré-empacotada

Dependendo da polaridade da amostra em análise, foram realizadas cromatografias em colunas pré-empacotadas de marca Waters Sep-Pak[®] vac 35 cc ou de marca Phenomenex Strata[®] de diferentes dimensões (2,0 g, 5,0 g ou 10,0 g) e com diferentes fases estacionárias: sílica-gel ou sílica-gel derivatizada com grupos octadecilsilano (C₁₈), fenila ou cianopropila.

3.3.3. Cromatografia em Coluna por exclusão de tamanho

Para cromatografia de permeação em gel utilizou-se de uma coluna de vidro com dimensões de 170 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro interno. O material utilizado como fase estacionária foi o Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech[®]). A eluição foi realizada em modo isocrático com MeOH grau P.A.

3.3.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os equipamentos utilizados nas separações por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) consistiam em um sistema Waters[®] com duas bombas modelo Pump

600, um degaseificador Degasser em linha, um detector espectrofotométrico UV-Visível com leitura em dois comprimentos de onda, modelo 2487, um registrador modelo 746 e um sistema de controle Controller 600.

Também foi utilizado um sistema cromatográfico Waters® que consiste em um sistema de controle Alliance Modelo Waters 2695 acoplado com detector espectrofotométrico UV-Visível modelo Waters 2996 com detector de arranjo de fotodiodos (“Photodiode Array Detector” - PDA), que nos permitiu observar entre os comprimentos de ondas de 200 a 800 nm; detector de espalhamento de luz modelo Waters 2424 (“Evaporative light scattering detector” – ELSD) e detector espectrométrico de massas (MS) modelo Waters Micromass ZQ (CLAE-PDA-ELSD-MS).

Para as separações foram utilizadas as colunas: a) sílica-gel derivatizada com grupos fenila, Prodigy 5 μ , Phenyl-3, (PH-3) 100Å de dimensões 250 x 4,6 mm, da marca Phenomenex®; b) coluna C₁₈ CSC-Inertsil 150 Å/ODS 2 de 5 μ m, de dimensões 25 x 0,94 cm; c) coluna de sílica-gel derivatizada com grupos fenila μ Bondapak, 125 Å, de dimensões 300 x 7,8 mm, da marca Waters®; d) coluna de sílica-gel μ -porasil Bondapak™ 125 Å/10 μ m - 7,8 x 300 mm, da marca Waters®; e) coluna de sílica –gel Nova Pak™, 6 μ m – 19,0 x 300 mm, da marca Waters®, e; f) coluna de sílica-gel derivatizada com grupos cianopropil CN μ Bondapak™ 125 Å/10 μ m - 7,8 x 300 mm da marca Waters®.

As frações aquosas provenientes das cromatografias em fase reversa foram secas em um sistema de centrífuga a vácuo Savant modelo Speedvac® Plus SC 210. As frações orgânicas provenientes de cromatografia em fase normal foram secas em um evaporador rotativo.

3.3.5. Solventes

Os solventes utilizados em CCD, Sephadex LH-20 e Sep-Pak foram todos de grau analítico. Nas cromatografias líquidas de alta eficiência (CLAE) foram utilizados solventes de grau cromatográfico (J.T. Baker, Mallinckrodt, etc). A água utilizada em todas as cromatografias foi destilada e purificada em um sistema Milli-Q Millipore equipado com resina de troca iônica e filtro biológico.

3.4. Protocolos dos bioensaios

3.4.1. Avaliação do potencial antimicrobiano

Cepas Padrões para controle dos antibiogramas: *Staphylococcus aureus* ATCC 259223, *Escherichia coli* ATCC 259222, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Candida albicans* ATCC 10231.

Amostras Bacterianas: Isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina e de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a antibióticos, obtidos em pesquisas anteriores em diferentes ambientes.

Meios de Cultura: Ágar Manitol, Ágar Cetrimide, caldo Mueller-Hinton, Ágar Sabouraud, meio GYW, BHI e BHA.

Procedimento para determinação da CIM: Os extratos foram dissolvidos em DMSO e a atividade antimicrobiana destes foi determinada frente a 8 cepas microbianas (7 bacterianas sensíveis e resistentes a antibióticos e 1 levedura) utilizando-se a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), pela técnica da microdiluição em placa. Do inóculo de cada bactéria, foram transferidas quatro a seis colônias para caldo Mueller-Hinton, e incubadas por 6 horas a 37 °C de modo a se obter uma turbidez moderada. A suspensão de células foi ajustada para cerca de 10^6 bactérias/mL, usando a escala padrão de McFarland. Foram adicionados 100 µL de cada cultura em orifícios de microplacas de 96 orifícios, acrescentando-se a seguir 100 µL de caldo Mueller-Hinton contendo diferentes concentrações dos extratos, conforme diluição recomendada pelo NCCLS (2000). A microplaca foi incubada a 37 °C por 24 horas, e o crescimento microbiano avaliado pela leitura da densidade óptica (620 nm) em aparelho ELISA (Multikan MS - Labsystem). Como controles, foram utilizados o caldo Mueller-Hinton estéril e culturas microbianas crescidas sem a adição dos extratos. Todas as amostras foram testadas em duplicata.

Screening geral: Culturas bacterianas desenvolvidas em BHI (*Brain Heart Infusion*) por 6 horas, foram diluídas convenientemente (cerca de 10^6 bactérias/mL) e semeadas na superfície de ágar Mueller-Hinton. A seguir, discos de papel de filtro impregnados com

os extratos a serem avaliados foram colocados sobre a superfície do ágar inoculado com cada uma das cepas microbianas. Após incubação por 48 horas a 37° C, foram observados os halos de inibição, sendo consideradas sensíveis as bactérias que apresentaram halos ≥ 7 mm. Os solventes de cada extrato foram usados como controle negativo. Extratos insolúveis no meio de cultura foram diluídos previamente em DMSO e Tween. Os extratos e/ou compostos que apresentaram atividade antibacteriana foram testados para determinação de sua Concentração Inibitória Mínima para cada uma das espécies de bactérias.

3.4.2 - Determinação *In Vitro* da Atividade Antiparasitária e da Concentração Efetiva 50% (CE₅₀) para morte de parasitas *Leishmania* sp. e *Trypanosoma cruzi*

Compostos puros foram dissolvidos em DMSO ou tampão fosfato-salina (PBS), diluídos em meio de cultura e incubados com os parasitas em diferentes concentrações com o objetivo de se determinar suas respectivas CE₅₀.

***Leishmania* spp.**

A concentração efetiva 50% (CE₅₀) dos diferentes compostos foi determinada utilizando-se promastigotas de *Leishmania chagasi*, que foram aplicados a 10⁶/poço em placas de 96 poços contendo os diferentes compostos, utilizando-se meio M-199 como meio de desenvolvimento do parasita. Após 24 horas, foi verificada a viabilidade dos promastigotas observando-se a atividade oxidativa mitocondrial com o ensaio de MTT (Tada et al., 1986) a 570 nm. Foi utilizado o fármaco pentamidina como controle positivo do ensaio. Avaliou-se a atividade leishmanicida dos compostos em macrófagos peritoneais de camundongos infectados, os quais foram adicionados (4x10⁵/lamínula) a lamínulas de vidro (13 mm) em placas de 24 poços, permanecendo em estufa a 37 °C por 120 horas (Tempone et al., 2004). A CE₅₀ foi determinada pela contagem de 600 macrófagos/poço, avaliando-se o número de macrófagos infectados, utilizando-se como controle (100% infectado) macrófagos não tratados. O fármaco glucantima[®] foi utilizado como controle.

Os animais utilizados nos bioensaios foram hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) fornecidos pelo biotério do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo e mantidos em

caixas esterilizadas com material absorvente, recebendo água e alimento *ad libitum*. Os hamsters foram infectados a cada mês com amastigotas provenientes de baço para manutenção da cepa de *L. chagasi*. Todos os procedimentos realizados nos ensaios foram previamente aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz.

Amastigotas de *L. chagasi* (MHOM/BR/1972/LD) foram purificados de baço de hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) utilizando-se centrifugação diferencial, sendo a infecção avaliada pelo método de Stauber (1958) em 60-70 dias após o inóculo. Promastigotas de *L. chagasi* foram cultivadas em meio M199 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 0,25% de hemina e 5% de urina humana, a 24°C.

Para verificar a efetividade das amostras em *L. chagasi*, realizou-se a determinação da Concentração Efetiva 50% (CE₅₀) em diferentes concentrações (150 µg/mL a 0,073 µg/mL), utilizando-se ainda o isotiocianato de pentamidina (EUROFARMA) como fármaco padrão. O composto foi previamente dissolvido em DMSO e posteriormente diluído em meio M 199, sendo incubado por um período de 48 horas com 1x10⁶ promastigotas/poço (previamente contados em hemocitômetro-Neubauer) em placas de 96 poços (triplicata). A viabilidade dos promastigotas foi verificada por observação em microscópio óptico e do ensaio com MTT (Tada et al., 1986). Neste, o MTT (5,0 mg/mL) foi dissolvido em tampão fosfato-salina (PBS), esterilizado em membranas de 0,22 µm e adicionado à concentração de 20 µL/poço. A placa foi novamente incubada por 4 h a 24°C. A extração da formazana foi realizada através da adição (100 µL/poço) de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% em HCl 0,01M por um período de 18 h. A densidade óptica dos poços foi verificada em um espectrofotômetro Multiskan MS (UNISCIENCE) em 570 nm. Poços sem a adição de fármacos e com DMSO foram utilizados como controle de viabilidade do ensaio. A Concentração Efetiva 50% (CE₅₀) foi analisada pelo software Graph Pad Prism 3.0 (curva sigmóide dose-resposta) com base em pelo menos dois ensaios distintos (Lane et al., 1996; Tada et al., 1986 e Tempone et al., 2004).

Trypanosoma cruzi

Formas tripomastigotas sanguíneas, extraídas no primeiro dia da cultura de células LLC-MK2, foram aplicadas na concentração 1 x 10⁶/poço em placas de 96

poços contendo diferentes amostras em meio RPMI-1640, suplementado com 2% de soro fetal bovino. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas e a viabilidade dos tripomastigotas foi determinada pelo método do MTT (Lane et al., 1996). SDS 10% foi aplicado por 18 horas (50 µL/poço) a 24°C e o número de parasitas viáveis foi determinado através da densidade óptica (D.O.) a 570 nm. Foi utilizado o fármaco benznidazol como controle positivo do ensaio. Formas amastigotas de *T. cruzi* foram testadas frente aos diferentes compostos, utilizando-se células LLC-MK2, as quais foram infectadas com formas tripomastigotas. Avaliou-se a atividade anti-amastigota dos compostos através de contagem microscópica de células LLC-MK2 infectadas e não infectadas após 72 horas de incubação a 37°C (Lane et al., 1996; Tada et al., 1986 e Tempone et al., 2004)

3.4.3. Atividade antimicobacteriana *in vitro*

O efeito antimicobacteriano dos compostos em teste foi avaliado sobre *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e em macrófagos infectados com *M. tuberculosis* H37Rv, para determinação das unidades formadoras de colônia (UFC).

A concentração inibitória mínima (CIM) de extratos e substâncias puras foi determinada pela técnica da microdiluição em placa utilizando como revelador o corante Alamar Blue (Collins e Franzblau, 1997). As amostras foram dissolvidas em DMSO e diluídas em meio líquido de Middlebrook 7H9 em concentrações de 1,0 a 80,0 µg/mL. A concentração de DMSO nas diluições foi inferior a 1 %. A cepa *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 foi cultivada em meio de cultura Lowenstein-Jensen a 37°C por três semanas e subcultivadas em meio líquido de Middlebrook 7H9 (Difco) a 37°C por 10 dias. A suspensão de micobactérias foi ajustada a uma concentração de 4×10^5 micobactérias/mL usando a escala padrão de McFarland, e foram adicionados a microplaca contendo 100 µL de meio de cultura e diferentes concentrações das amostras. Como controles foram usados meios de cultura (controle negativo) e meio de cultura contendo micobactérias (controle positivo). Como droga controle foi utilizada a rifampicina nas concentrações de 0,015 a 25 µmolL⁻¹. A microplaca foi incubada a 37°C.

Após 6 dias foram adicionados 25 µL de uma mistura 1:1 de tween 80 a 10% e alamar blue às cavidades da microplaca. A microplaca foi re-incubada a 37°C e após 24 horas a leitura macroscópica foi realizada para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), definida pela menor concentração da droga capaz de impedir a alteração da cor azul para rósea. A permanência da cor azul nas cavidades indicou a ausência de crescimento micobacteriano e o desenvolvimento da cor rósea indicou a presença de crescimento micobacteriano.

3.4.4. Atividade antiproliferativa contra células tumorais humanas

A citotoxicidade dos extratos e substâncias puras foi avaliada pelo método da sulforodamina B. Foram utilizadas 4 placas de 96 cavidades por experimento, uma para cada linhagem celular testada [SF 295 (sistema nervoso central), MDA-MB435 (mama humano), HCT8 (cólon humano) e HL60 (leucemia humana)] e uma placa controle com as quatro linhagens. Após 24 horas de incubação, a placa controle foi fixada em ácido tricloroacético 50% gelado. Os extratos foram incubados nas demais placas na dose de 125 µg/mL. As amostras foram testadas em duplicata. O etoposídeo (500 µg/mL) e o paclitaxel (150 µg/mL) foram utilizados como padrões com ação anti-proliferativa. Estas placas foram fixadas após 48 horas de incubação com as drogas. Todas as placas foram coradas com sulforodamina B e lidas em espectrofotômetro de placa no comprimento de onda de 540 nm. O percentual de crescimento celular (% G) foi calculado comparando a absorbância do teste com o controle (100%), tempo-zero (0%) e padrões, paclitaxel e etoposídeo, (-100%). As frações foram classificadas em: sem atividade (não tabuladas), com pouca atividade (aquelas que induziram inibição de até 50% do crescimento celular), com atividade moderada (aquelas que induziram inibição entre 50% e 75% do crescimento celular), e com muita atividade (aquelas que induziram inibição maior que 75% do crescimento celular) para cada linhagem celular testada.

3.4.5. Atividade antineuroinflamatória

Micróglias (2×10^5 células) retiradas de cérebros de ratos neonatais foram semeadas em uma placa de incubação com 24 poços e estimuladas com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (0,3 ng/mL) em meio de cultura modificado Dulbecco Eagle + 10% de soro fetal bovino + penicilina + estreptomicina por 17 horas em uma incubadora humidificada com 5% de CO₂ a 35,9 °C.

O meio de cultura foi então removido e as micróglias foram lavadas com solução salina balanceada de Hanks (HBSS) aquecida (37 °C) e então incubadas com os compostos puros (0,1-10 µM) ou controle (DMSO) por 15 minutos e depois estimuladas com forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) (1 µM). Todos os experimentos foram realizados em duplicata e em um volume final de 1 mL. Setenta minutos depois da estimulação com PMA, o HBSS foi aspirado de cada um dos 24 poços e foram determinadas as concentrações dos ânions superóxido (O₂⁻), tromboxana B₂ (TXB₂) e lactato desidrogenase (LDH).

Os resultados foram expressos como a concentração inibitória a 50% (IC₅₀) dos compostos puros, tanto para O₂⁻ como para TXB₂. A liberação de LDH pela micróglia foi determinada espectrometricamente como descrito em Mayer et al., 2005. A liberação de LDH foi expressa como a concentração dos compostos (µM) que resultou em 50% da liberação de LDH observada no controle de microglia tratadas com 0,1% de Triton X-100 (Mayer et al., 2005).

3.4.6. Atividade antimicrobiana do trato bucal

Determinação de CIM (Concentração Inibitória Mínima) – Método de Microdiluição

Os extratos ou frações na concentração de 400-500 µg/mL foram diluídos serialmente em DMSO (1%). Suspensões bacterianas de cultura *overnight* de determinada cepa padrão (Tabela 3.1), ou isolado clínico crescido em BHI (*Brain Heart Infusion*), foram diluídos até a concentração de 10⁶ UFC/mL. Os testes foram realizados em microplacas estéreis com 96 poços de fundo chato, com um volume total de 100 µL (40 µL de meio de cultura + 20 µL de inóculo + 40 µL da substância diluída em água).

As placas foram incubadas por 24h, a 37°C em microaerofilia (10% CO₂) e o crescimento microbiano foi determinado pelas absorbâncias mensuradas antes e após incubação, a 550-560 nm em leitor automático de microplacas (Molecular Devices, Programa Versa Max). A CIM foi definida como a menor concentração do antimicrobiano que inibiu o crescimento. Os experimentos foram realizados em triplicatas e tiveram como controle negativo a cultura microbiana sem adição do extrato ou fração (Oliveira et al., 2006).

Tabela 3.1 - Relação de cepas padrões selecionadas para o rastreamento de extratos marinhos com atividade antimicrobiana.

Microrganismo	Origem
<i>Escherichia coli</i>	NTCC861
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC6538
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC14506
<i>Streptococcus sanguinis</i>	ATCC15300
<i>Streptococcus sobrinus</i>	ATCC27607
<i>Streptococcus mutans</i>	UA159
<i>Streptococcus mutans</i>	Isolado clínico 2.M7/4
<i>Candida albicans</i>	ATCC36801(sorotipo A)

Capítulo 4

Estudo químico do extrato bruto da ascídia *Clavelina oblonga*

4.1. Introdução

As ascídias são animais que pertencem à classe Ascidiacea (Subfilo Urochordata ou Tunicata), que por sua vez pertencem ao Filo Chordata, o maior filo dos Deuterostômios, ou seja, de animais que possuem orifícios distintos e distantes entre si e destinados à absorção e excreção de alimentos. São animais exclusivamente marinhos, sendo a grande maioria sésil e encontrada desde águas rasas até em profundidades de 50 metros. Possuem uma túnica que reveste sua superfície externa como exoesqueleto. Esta túnica é um tecido orgânico responsável pela proteção e por processos de troca entre o corpo do animal e o ambiente. Geralmente, estas túnicas são constituídas por polissacarídeos diversos, que possuem propriedades químicas e físico-químicas únicas, e por isso mesmo são objetos de diversos estudos (Ruppert e Barnes, 1996).

Compostos nitrogenados, em geral alcalóides, peptídeos e derivados de aminoácidos, correspondem a 85% dos produtos do metabolismo secundário isolados de ascídias; os 15% restantes são compostos provenientes da rota do acetato e, em muito menor extensão, da rota do acetato-mevalonato (Ireland et al., 1993).

Muitos compostos biologicamente ativos já foram isolados de ascídias (977 produtos naturais, segundo banco de dados Marillit – Blunt, et al., 2008) comprovando sua importância como grupo biológico devido ao grande potencial de aplicação farmacológica de várias substâncias isoladas deste grupo de invertebrado.

4.2. Produtos Naturais isolados de ascídias do gênero *Clavelina*

Ascídias pertencentes ao gênero *Clavelina* são uma rica reserva de metabólitos secundários estruturalmente diversificados e biologicamente ativos.

Como exemplos de compostos isolados de ascídias deste gênero podemos citar as clavepictinas A (**50**) e B (**51**), quinolizidinas citotóxicas isoladas da ascídia *Clavelina picta* (Raub et al., 1991). Desta mesma ascídia, também foi isolado outro alcalóide quinolizidínico, a pictamina (**52**), um homólogo da clavepictina A (Kong et al., 1991).

A wakayina (**53**), isolado da ascídia *Clavelina* sp. (Copp et al., 1991), é o primeiro exemplo de um alcalóide pirroloiminoquinona isolado de uma ascídia. Apresentou atividade citotóxica *in vitro* contra linhagem de células tumorais de cólon humano HCT116 com IC₅₀ 0,5 µg/mL.

Da ascídia *Clavelina lepadiformis* foi isolado um alcalóide decahidroquinolínico, a lepadina A (**54**), (Steffan, 1991). Já a lepadiformina (**55**), um alcalóide citotóxico, foi obtido a partir da ascídia *Clavelina lepadiformis* Müller (Biard et al., 1994).

Figura 4.1 – Exemplos de compostos isolados de ascídias do gênero *Clavelina*.

A investigação química do extrato da ascídia *Clavelina cylindrica* levou ao isolamento de 11 novos alcalóides, as cilindricinas A – K (**56** - **66**), (Blackman et al., 1993, 1994 e 1995). Cilindricina B (**57**) é o primeiro exemplo de um novo sistema de anel pirido-[2,1-]-quinolínico, enquanto cilindricina A (**56**) é o primeiro composto pirrolo[2,1-]-quinolínico encontrado na natureza. Cilindricinas F (**61**) e G (**62**) são os primeiros tiocianatos isolados a partir de uma ascídia, enquanto cilindricinas I (**64**) e J (**65**) são os primeiros isotiocianatos obtidos de uma ascídia.

Figura 4.2 – Alcalóides isolados da ascídia *Clavelina cylindrica*.

Clavaminóis A-F (**67** - **72**), são aminoálcoois citotóxicos obtidos a partir da ascídia *Clavelina phlegrae* (Aiello et al., 2007). Nota-se que o composto clavaminol A (**67**) corresponde ao enantiômero do composto apresentado nesta tese (**Ver resultados**).

Figura 4.3 – Aminoálcoois citotóxicos obtidos a partir da ascídia *Clavelina phlegrae*.

4.3. Estudo químico da ascídia *Clavelina oblonga* – Procedimento Experimental

A coleta da ascídia *Clavelina oblonga* foi realizada em São Sebastião - SP em 1996. O material coletado (365,0 g) foi preservado em EtOH e mantido a -20° C. Um espécimen voucher foi depositado na coleção de ascídias do Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Uma alíquota do extrato bruto deste animal apresentou atividade antibiótica contra *Candida albicans*, *Enterobacter* spp. e *Staphylococcus aureus*.

O trabalho de isolamento químico do extrato da ascídia *Clavelina oblonga* foi realizado de acordo com o procedimento sumarizado nos **Esquemas 4.1, 4.2 e 4.3**.

Esquema 4.1. Fluxograma do estudo químico (extração e partição) da ascídia *Clavelina oblonga*.

Esquema 4.2. Fluxograma do fracionamento do extrato hexânico da ascídia *Clavelina oblonga*.

Esquema 4.3. Fluxograma do fracionamento do extrato AcOEt da ascídia *Clavelina oblonga*.

O EtOH de armazenamento da ascídia foi filtrado e evaporado. O animal foi triturado e re-extraído exaustivamente com MeOH. Os extratos EtOH e MeOH foram filtrados sob vácuo (utilizando-se uma camada de celite em funil de Büchner), reunidos e concentrados. O extrato bruto concentrado foi ressuspensionado em água (500 mL). Realizou-se uma partição da suspensão aquosa metanólica (500 mL) com *n*-hexano (500 mL, procedimento repetido por três vezes), resultando em duas frações, MeOH-H₂O e hexânica. A fração MeOH-H₂O foi evaporada até remoção completa do MeOH, cuja suspensão aquosa obtida foi submetida a uma partição com AcOEt (500 mL, procedimento repetido por três vezes) obtendo-se duas frações: a fração AcOEt e a fração aquosa. A suspensão aquosa resultante foi submetida à outra partição com *n*-butanol. Os extratos foram concentrados, pesados e avaliados por CCD.

4.3.1 - Estudo do extrato hexânico da ascídia *Clavelina oblonga*

Tendo-se detectado a possível presença de alcalóides no extrato hexânico (Dragendorff), este extrato foi submetido a uma separação por cromatografia em fase normal com coluna pré-empacotada Sep Pak[®] de sílica-gel derivatizada com grupos diol (10g, Waters[®]), utilizando-se um gradiente de B em A, no qual A foi uma mistura de Hex/CH₂Cl₂ (25:75) e B foi uma mistura de AcOEt/MeOH (50:50). As frações foram analisadas por CCD (eluente: CH₂Cl₂/MeOH 9:1; reveladores: lâmpada UV e Dragendorff) e reunidas de acordo com sua similaridade cromatográfica, resultando em três frações. Após análise por CCD, a fração CIO-H-1 (CCD positivo para Dragendorff) foi selecionada para dar continuidade ao fracionamento.

A fração CIO-H-1 (0,569 g) foi submetida à uma separação por cromatografia em coluna pré-empacotada Sep Pak[®] de sílica-gel (5g, Waters[®]) utilizando-se um gradiente de B em A, sendo A uma mistura de Hex/CH₂Cl₂ (50:50) e B uma mistura de AcOEt/MeOH (75:25). Após análise por CCD (eluente: CH₂Cl₂/MeOH 9:1; revelador: lâmpada UV e Dragendorff), obteve-se cinco frações que foram avaliadas por RMN-¹H. Após esta avaliação a fração CIO-H-1B foi selecionada para ser purificada.

Com a fração CIO-H-1B (65,0 mg) foi realizada uma separação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV), utilizando-se uma coluna de sílica-gel derivatizada com grupos cianopropila (Waters[®] CN μ BondapakTM 125 Å/10 μ m - 7,8 x 300 mm), com eluição isocrática de *i*-PrOH/MeOH (95:5), fluxo de 1 mL/minuto e monitorando-se a separação em $\lambda_{\text{máx}}$ = 220 nm. Foram obtidas três frações desta separação. Após análise por RMN-¹H a fração CIO-H-1B3 foi selecionada para mais uma etapa de purificação. A fração CIO-H-1B3 foi purificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV) utilizando-se uma coluna de sílica-gel derivatizada com grupos fenila (Waters[®] Ph μ BondapakTM 125 Å/10 μ m - 7,8 x 300 mm). A eluição isocrática foi realizada com *i*-PrOH/MeOH/H₂O (40:10:50), fluxo de 1 mL/minuto e a separação foi monitorada em $\lambda_{\text{máx}}$ = 260 nm. Essa última etapa de purificação resultou no isolamento da substância **CIO-H-1B3D**.

A substância **CIO-H-1B3D** foi analisada por ressonância magnética nuclear de ¹H e de ¹³C e por espectrometria de massas. Uma busca na literatura nos permitiu

identificar o composto como sendo a 5-[3,5-dibromo-4([2-oxo-5-oxazonidinil])metoxifenil]2-oxazolidinona (**73**) (2,3 mg, 0,0006%). (Norte et al., 1988; Borders et al., 1974).

4.3.2 - Estudo do extrato butanólico da ascídia *Clavelina oblonga*

O extrato butanólico CIO-Bu (0,8573 g) foi submetido a uma separação por cromatografia de fase reversa em coluna pré-empacotada Sep Pak[®] de sílica-gel derivatizada com grupos octadecil - C₁₈ (10g, Waters[®]) com eluição gradiente de MeOH em H₂O, nas seguintes proporções: 100% H₂O, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1 e 100% MeOH. Após análises por CCD, verificamos que não havia substâncias de interesse na fração butanólica, sendo assim, o estudo desta fração foi abandonado.

4.3.3 - Estudo do extrato de acetato de etila da ascídia *Clavelina oblonga*

Com o extrato CIO-AcOEt (280,3 mg) foi realizada uma separação por cromatografia em permeação em gel de Sephadex LH-20 com eluição isocrática de AcOEt/MeOH/H₂O (20:5:2). As frações obtidas foram reunidas por sua similaridade em CCD (eluente: CH₂Cl₂/MeOH 9:1 e reveladores: lâmpada UV e Dragendorff) resultando em seis frações. Após análise por CCD, a fração CIO-AcOEt-4 foi selecionada e purificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV). Foi utilizada uma coluna de sílica-gel derivatizada com grupos fenila (Waters[®] Ph μ BondapakTM 125 Å/10 μ m - 7,8 x 300 mm), utilizando-se como eluentes *i*-PrOH/MeOH (98:2), fluxo de 1 mL/minuto e monitorando-se a separação em $\lambda_{\text{máx}}$ = 206 nm. A purificação por CLAE-UV resultou no isolamento do composto **CIO-AcOEt-4A**.

A análise dos dados espectroscópicos possibilitou a identificação da estrutura da substância **CIO-AcOEt-4A** como sendo o aminoálcool (2*S*,3*R*)- 2-amino-3-dodecanol (**74**), (7,8 mg, 0,002 %), inédita na literatura.

4.3.4 - Determinação da configuração absoluta do composto 2-amino-3-dodecanol (**74**) - (AcOEt-4A)

A determinação da configuração absoluta do composto 2-amino-3-dodecanol (**74**), isolado da ascídia *Clavelina oblonga* foi realizada com a colaboração do Prof. Dr. Tadeusz F. Molinski, do Departamento de Química da Universidade da Califórnia, Davis, EUA.

Para a determinação da configuração absoluta dos centros estereogênicos em C-2 e C-3 do composto 2-amino-3-dodecanol (**74**), foi realizada reação de derivatização e posterior comparação da curva de dicroísmo circular do composto isolado derivatizado com as curvas de dicroísmo circular dos padrões sintetizados obtidos a partir da *L*-alanina.

Em uma solução de MeCN (1,0 mL) do 2-amino-3-dodecanol (**74**) (1,05 mg, 5,2 μ mol) foi adicionado *N*-benzoilimidazol (6,0 mg, 30 μ mol) e DBU (4,5 mg, 30 μ mol). A mistura foi agitada a 65° C por 16 h. O solvente foi evaporado e o resíduo purificado por CLAE-UV utilizando-se uma coluna de sílica (Dynamax, 5 μ m, 10 x 250 mm, *n*-hexano/*i*-PrOH (97:3), fluxo de 3,0 mL/min).

Esquema 4.4. - Reação de derivatização do composto 2-amino-3-dodecanol (**74**) isolado da ascídia *Clavelina oblonga*.

A comparação das curvas de dicroísmo circular do composto isolado derivatizado com compostos modelo sintetizados indicou a configuração absoluta do composto 2-amino-3-dodecanol (**74**) como sendo 2*S*, 3*R*.

4.4. Resultados e Discussão

A ascídia *Clavelina oblonga* (**Figura 4.4**) foi descrita pela primeira vez por Herdman (1880) e sua classificação taxonômica é apresentada na **Figura 4.5**.

Figura 4.4 - Foto da ascídia *Clavelina oblonga* (Rocha, R.M.)

Filo: Chordata
Classe: Ascidiacea
Ordem: Enterogona
Família: Clavelinidae
Gênero: <i>Clavelina</i>
Espécie: <i>Clavelina oblonga</i>

Figura 4.5 - Taxonomia da ascídia *Clavelina oblonga*.

O extrato bruto deste animal apresentou atividade antibiótica contra *Candida albicans*, *Enterobacter* spp. e *Staphylococcus aureus*.

A investigação química do extrato da ascídia *Clavelina oblonga* levou ao isolamento de dois compostos: **CIO-H-1B3D** cuja estrutura foi identificada como sendo o 5-[3,5-dibromo-4([2-oxo-5-oxazonidinil])metoxifenil]2-oxazolidinona (**73**) e **CIO-AcOEt-4A** como sendo o composto então inédito, o (2S,3R)- 2-amino-3-dodecanol (**74**).

4.4.1. Determinação estrutural do composto ClO-H-1B3D (73)

A identificação do composto ClO-H-1B3D (**73**) foi realizada pela análise dos seus dados espectroscópicos de RMN- ^1H , RMN- ^{13}C (BBD e DEPT 135°) e HMQC (**V.2, Figuras 4.1, 4.2 e 4.3**, respectivamente), por espectrometria de massas (**V.2, Figura 4.4**) e por comparação com dados existentes na literatura (Borders et al., 1974; Norte et al., 1988).

A confirmação da estrutura (**73**) pôde ser estabelecida pela comparação com os dados de RMN de ^1H , de ^{13}C e com o espectro de massas com os dados dos compostos isolados por Borders (1974) e Norte (1988).

O espectro de RMN- ^1H (**V.2, Figura 4.1**) apresentou os seguintes deslocamentos químicos:

- um singleto em δ 7,71 referente a hidrogênios ligados a carbonos de anel aromático;
- dois singletos em δ 7,62 e 7,76 referentes a hidrogênios ligados a nitrogênios;
- um tripleto em δ 5,6 referente a um hidrogênio ligado a carbono funcionalizado com oxigênio;
- um multipletto em δ 4,14 referente a hidrogênios metilênicos ligados a carbono de cadeia alquila funcionalizada com oxigênio;
- sinais em δ 3,37 (dd); 3,84 (t); 3,65 (t); e 3,52 (dd) referentes a hidrogênios metilênicos.

O espectro de RMN- ^{13}C – BBD e DEPT 135° (**V.2, Figura 4.2**) do composto **ClO-H-1B3D** apresentou sinais de seis carbonos quaternários: δ 158,5 (C-9 ou C-13), δ 158,2 (C-13 ou C-9), δ 151,6 (C-1), δ 138,9 (C-4) e δ 117,6 (C-2 e C-6), quatro carbonos do tipo CH [δ 74,3 (C-7); δ 73,5 (C-11) e δ 130,4 (C-3 e C-5)] e três carbonos do tipo CH_2 [δ 73,0 (C-10), 46,9 (C-8) e 41,1 (C-12)].

O composto (**73**) mostrou ser opticamente ativo com $[\alpha]_D^{24} = -9,2$ ($c = 0,35$, MeOH).

O espectro de massas (**V.2 Figura 4.4**) em modo spray de elétrons (LRESIMS) apresentou um conjunto de três picos referentes aos picos de íons adutos cationizados com sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ em m/z 456,9; 458,9 e 460,9 compatível com a fórmula $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{Br}_2\text{N}_2\text{O}_5$. O pico de íon aduto cationizado com sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ na forma de um

conjunto de picos com sinais de intensidades relativas 1:2:1, indicou a presença de dois átomos de bromo na estrutura.

Figura 4.6 - Estrutura do composto **CIO-H-1B3D (73)** com os respectivos valores de deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C .

Tabela 4.1 – Tabela de comparação de valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C do composto **CIO-H-1B3D (73)** com dados de compostos encontrados na literatura.

	CIO-H-1B3D (DMSO- d_6)		bis-oxazolidinona (Literatura)* (DMSO- d_6)		bis-oxazolidinona (Literatura)** (CDCl $_3$)	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz, integral)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz, integral)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz, integral)
1	138,9	-	140,6	-	140,0	-
2	130,4	7,71 (s, 1H)	131,9	7,75	130,8	7,75 (s, 1H)
3	117,6	-	119,3	-	118,2	-
4	151,6	-	153,5	-	-	-
5	117,6	-	119,3	-	118,2	-
6	130,4	7,71 (s, 1H)	131,9	7,75	130,8	7,75 (s, 1H)
7	74,3	5,60 (t, 7,4 Hz, 1H)		5,6		5,65 (dd, 8,5 e 9,2 Hz, 1H)
8	46,9	3,37 (dd, 7,4 e 8,9 Hz, 1H); 3,85 (t, 8,9 Hz, 1H)		3,38; 3,89	47,0	3,71 (dd, 8,5 e 11,5 Hz, 1H)
9	158,5	-	160,2	-	158,0	-
10	73,0	4,14 (m, 2H)		4,16	73,5	4,15 (d, 4,2 Hz, 2H)
11	73,5	4,94 (m, 1H)		4,96	74,1	4,96 (dddd, 4,2; 4,2; 7,1; 8,5 Hz, 1H)
12	41,1	3,65 (t, 8,9 Hz, 1H); 3,52 (dd, 6,7 e 8,3 Hz, 1H)		3,61	41,5	3,65 (t, 8,5 Hz, 1H); 3,52 (dd, 7,1 e 8,5 Hz, 1H)
13	158,2	-	159,8	-	157,8	-

* Borders et al., 1974, ** Norte et al., 1988.

De acordo com os dados obtidos, pudemos identificar a substância **CIO-H-1B3D** como sendo a 5-[3,5-dibromo-4([2-oxo-5-oxazonidinil])metoxifenil]2-oxazolidinona (**73**). Este composto foi previamente isolado de esponjas da Ordem Verongida durante as décadas de 70 e 80 (Norte et al., 1988; Borders et al., 1974).

O isolamento do composto 5-[3,5-dibromo-4([2-oxo-5-oxazolidinil]) metoxifenil]2-oxazolidinona (**73**) a partir de uma ascídia é atípico, já que metabólitos derivados da dibromotirosina tem sido associados a esponjas da ordem Verongida (Filo Porífera) sendo usualmente considerados marcadores filogenéticos de esponjas dessa ordem, embora outros compostos derivados da dibromotirosina já tenham sido isolados de ascídias do gênero *Botryllus* (McDonald et al., 1995, Smith et al., 1998, Faulkner et al., 2004).

4.4.1.1 - Análise da configuração relativa dos hidrogênios 7 e 11 do composto 5-[3,5-dibromo-4([2-oxo-5-oxazolidinil]) metoxifenil]2-oxazolidinona (**73**) - (ClO-H-1B3D)

A análise das constantes de acoplamento dos hidrogênios 7 e 11 da 5-[3,5-dibromo-4([2-oxo-5-oxazolidinil])metoxifenil]2-oxazolidinona (**73**) observadas em solução de DMSO- d_6 não diferenciam claramente as suas duas possíveis configurações relativas. Isso porque os valores de J observados para os acoplamentos dos hidrogênios em ambos os lados das cadeias carbamóil estão entre 6 e 8 Hz. Entretanto, a determinação da configuração pôde ser realizada por comparação de medidas de rotação específica. A configuração absoluta do isômero levorotatório (R,R) de **73** ($[\alpha]^{24}_D = -33$, $c = 1,1$, MeOH) foi estabelecida sem ambigüidade por difração de raio-X (Norte, et al., 1988). Já que a rotação específica de **73**, por nós isolado da ascídia *C. oblonga*, é $[\alpha]^{24}_D = -9,2$ ($c = 0,35$, MeOH), podemos desconsiderar como sendo o isômero (S,S). A magnitude da rotação específica de dois compostos, reportados como enantiômeros de configuração indeterminada ($[\alpha]^{24}_D = -6,5$, $c = 0,44$, MeOH; $[\alpha]^{24}_D = +7,1$, $c = 0,35$, MeOH) (Makarieva, et al., 1981), são comparáveis com a rotação específica de **73**.

Portanto, podemos afirmar que (**73**) é o enantiômero levorotatório de configuração relativa ($7R^*, 11S^*$), estabelecendo-se assim sua configuração relativa.

4.4.1.2 - Análise da configuração absoluta dos hidrogênios 7 e 11 do composto 5[3,5-dibromo-4([2-oxo-5-oxazolidinil]) metoxifenil]2-oxazolidinona (**73**) - (ClO-H-1B3D) – (Trabalho realizado com a colaboração do grupo do Prof. Molinski – EUA)

A configuração absoluta do composto contendo a bis-oxazolidinona (**73**) foi determinada por hidrólise em microescala seguida por derivatização com 1-flúor-2,4-dinitrofenil-5-L-alaninamida (Reagente de Marfey) e posterior comparação por CLAE-MS com compostos padrões.

Hidrólise ácida de **73** (12 M HCl, 100-110 °C, 20 horas) promoveu a liberação do 3-amino-1,2-propanodiol, estável sob estas condições (**Esquema 4.5**). O composto resultante da hidrólise e os compostos padrões foram tratados, separadamente, com 1-

flúor-2,4-dinitrofenil-5-L-alaninamida (Reagente de Marfey) o que resultou na formação de derivados diastereoisoméricos (**Esquema 4.6**). Os compostos derivatizados (produto da hidrólise e os padrões) foram analisados por CLAE-MS. Com a comparação dos tempos de retenção do composto hidrolisado e derivatizado com os tempos de retenção dos compostos padrões pudemos estabelecer a configuração absoluta.

A hidrólise ácida seguida pela reação de derivatização e posterior análise dos compostos obtidos por CLAE-MS indicaram que o fragmento 3-amino-1,2-propanodiol apresenta configuração absoluta 11S. Levando-se em conta a configuração relativa de **73** previamente estabelecida, conclui-se que a configuração absoluta do composto 5-[3,5-dibromo-4-([2-oxo-5-oxazolidinil]) metoxifenil]2-oxazolidinona (**73**) é 7R, 11S.

Esquema 4.5 – Mecanismo da reação de hidrólise ácida de **73** resultando na liberação do (2S) 3-amino-1,2-propanodiol.

Esquema 4.6 - Reação de derivatização do (2S) e (2R) 3-amino-1,2-propanodiol com reagente de Marfey-(L).

Figura 4.7 – Estrutura do composto (7R,11S)-5[3,5-dibromo-4([2-oxo-5-oxazolidinil])metoxifenil]2-oxazolidinona (**73**).

4.4.2. Determinação estrutural do composto ClO-AcOEt-4A (74)

A análise da substância ClO-AcOEt-4A (**74**) por diversos experimentos de ressonância magnética nuclear mono e bidimensionais - RMN- ^1H , RMN- ^{13}C (BBD e DEPT 135 $^\circ$), HMQC, HMBC e COSY, de infravermelho, de espectrometria de massas (**V.2, Figuras 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10 e 4.11** respectivamente) e de dicroísmo circular, possibilitou estabelecer sua estrutura e configuração absoluta.

O composto ClO-AcOEt-4A (**74**) foi isolado como um sólido vítreo que mostrou ser opticamente ativo com $[\alpha]_D^{29} = + 4,5$ ($c = 0,22$, MeOH).

O espectro de massas de alta resolução (**V.2, Figura 4.11**) em modo ionização química (HRCIMS) indicou a fórmula $\text{C}_{12}\text{H}_{28}\text{NO}$ para o pico de íon pseudomolecular $[\text{M} + \text{H}]^+$ em m/z 202,2173. (calculado: 202,2171).

Em seu espectro de absorção no infravermelho (**V.2, Figura 4.10**) (filme em disco de silício) foram observadas as seguintes bandas:

- região entre 3300 - 3388 cm^{-1} , atribuída a grupo O-H e a grupo N-H (superposição de bandas);
- 2920 e 2850 cm^{-1} atribuídas a grupos C-H alifáticos.

A análise dos dados dos experimentos de RMN de ^1H e ^{13}C e dos experimentos bidimensionais HMQC, HMBC e COSY indicou a presença de um único sistema spin. Uma metila (δ ^1H 1,12, δ ^{13}C 12,0) mostrou estar acoplada com um grupamento metino substituído por um átomo de nitrogênio (δ ^1H 3,16, δ ^{13}C 52,6), o qual seqüencialmente apresentou acoplamento com um grupo metino substituído por um átomo de oxigênio (δ ^1H 3,6, δ ^{13}C 71,7). O hidrogênio deste último grupo metino mostrou estar acoplado vicinalmente com um grupo metileno (δ ^1H 1,35, δ ^{13}C 34,0), substituído por uma cadeia alquila de oito carbonos. Desta forma, estabeleceu-se a estrutura planar de (**74**) como sendo 2-amino-3-dodecanol.

Esquema 4.7 – Estrutura do composto 2-amino-3-dodecanol (**74**) com as respectivas correlações observadas nos espectros COSY e HMBC.

Tabela 4.2 – Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) e correlações à longa distância da substância (2*S*,3*R*)- 2-amino-3-dodecanol (**74**) em $\text{MeOH-}d_4$.

Posição	$\delta^{13}\text{C}$ (HMQC)	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz, integral)	COSY	HMBC
1	12,0	1,12 (d, 6,7 Hz, 3H)	H2	C2, C3
2	52,6	3,16 (dq, 6,7 e 2,8 Hz, 1H)	H1, H3	C1, C3
3	71,7	3,60 (m, 1H)	H2, H4	C1, C2
4	34,0	1,35 (m, 2H)	H3, H5	C2, C3, C5
5	27,0	1,43 (m, 2H)	H4, H6	C4, C6
6	30,7	1,22-1,20 (m, 2H)	H5	-
7	30,6	1,22-1,20 (m, 2H)	-	-
8	30,5	1,22-1,20 (m, 2H)	-	-
9	30,3	1,22-1,20 (m, 2H)	-	C10, C11
10	33,1	1,22-1,20 (m, 2H)	-	C9
11	23,0	1,22-1,20 (m, 2H)	H10, H12	C10, C12
12	14,4	0,80 (t, 6,7 Hz, 3H)	H11	C10, C11

4.4.2.1 - Determinação da configuração absoluta do composto 2-amino-3-dodecanol (**74**) - (C1O-AcOEt-4A)

Com o propósito de se estabelecer a configuração absoluta dos centros estereogênicos em C-2 e C-3, o composto **74** foi derivatizado com *N*-benzoilimidazol e DBU em MeCN a 65 °C. Após purificação por CLAE-UV, o composto **74b** foi analisado por dicroísmo circular. A comparação da curva de dicroísmo circular do composto **74b** com a curva do composto modelo **74c**, obtido a partir da L-alanina, indicou a configuração absoluta do composto **74** como sendo 2*S*, 3*R*.

Figura 4.8 – Estrutura do composto isolado (**74**), do composto isolado derivatizado (**74b**) e do composto modelo sintetizado 2*S*, 3*R* (**74c**).

Figura 4.9 – Espectro de dicroísmo circular de **74b** (linha azul) e do modelo (2*S*,3*R*)-**74c** (MeOH a 24°C).

Dessa forma, pôde-se concluir que a configuração absoluta da substância inédita em questão é (2*S*,3*R*)- 2-amino-3-dodecanol.

Figura 4.10 – Estrutura do composto isolado da ascídia *Clavelina oblonga* com a configuração absoluta estabelecida - (2*S*,3*R*)- 2-amino-3-dodecanol.

2-Aminoálcoois são comumente encontrados em ascídias e esponjas. As estruturas destas moléculas são geralmente relacionadas com a ampla distribuição de esfingosinas anfifílicas, o elemento estrutural central dos esfingolipídios. O comprimento da cadeia carbônica destes compostos varia de C₁₂ a C₃₀ sendo saturada ou insaturada. Recentemente, foi isolado o enantiômero do composto (2*S*,3*R*)- 2-amino-3-dodecanol (Aiello et al., 2007).

4.4.3 - Avaliação biológica do composto (2*S*,3*R*)- 2-amino-3-dodecanol (**74**)

A substância, isolada da ascídia *Clavelina oblonga*, (2*S*,3*R*)-2-amino-3-dodecanol (**74**) apresentou uma potente atividade antifúngica contra *Candida albicans* (CIM = 0,7 µg/mL) e moderada atividade contra *Candida glabrata* (CIM = 30,0 µg/mL). A atividade antifúngica contra *Candida albicans* do composto isolado (2*S*,3*R*)- 2-amino-3-dodecanol (**74**) é comparável com atividade de medicamentos antifúngicos clinicamente comercializados, como a nistatina (CIM = entre 1,0 e 4,0 (µg/mL) e cetoconazol (CIM = entre 0,01 e 1,0 (µg/mL)).

Espécies de *Candida* estão entre as mais comuns causas de infecções causadas por fungos. Casos de candidíase, que afeta principalmente pacientes imunodeficientes,

recém-nascidos, mulheres e pessoas idosas, têm crescido de forma bastante significativa.

Os resultados de atividade biológica demonstram que o composto isolado (2*S*,3*R*)- 2-amino-3-dodecanol (**74**) pode ser objeto de estudo para o desenvolvimento de um promissor candidato a medicamento antifúngico.

Capítulo 5

Estudo químico do extrato bruto da ascídia *Didemnum ligulum*

5.1. Produtos Naturais isolados de ascídias do gênero *Didemnum*

Os didemnídeos constituem a maior família de ascídias em termos de número de espécies. Estes animais são uma fonte excepcional de compostos naturais com diversidade química e potente propriedade biológica (Takeara et al., 2007).

Ascídias coloniais pertencentes à família Didemnidae freqüentemente apresentam associações com microalgas simbióticas fotossintetizadoras dos gêneros *Synechocystis* e *Prochloron*, que podem residir nos tecidos, na túnica ou na superfície da ascídia hospedeira (Kott et al. 1984; Lewin e Cheng, 1989; Monniot et al. 1991; Sings e Rinehart 1996). Diversos estudos demonstram que estas bactérias subministram matéria orgânica ao hospedeiro e transmitem parte da energia acumulada durante a fotossíntese para o invertebrado, e por isso muitas ascídias desenvolvem-se apenas em águas rasas onde a luminosidade é suficiente para o processo de fotossíntese (Johns et al. 1981; Pardy e Lewin 1981; Griffiths e Thinh 1983). Em decorrência destas associações entre ascídias e cianobactérias, a verdadeira origem de alguns compostos isolados a partir de ascídias da família Didemnidae permanece indeterminada: será o composto em questão produto do metabolismo secundário da ascídia, do organismo simbiótico ou produto da interação de ambos?

Compostos nitrogenados, derivados de aminoácidos, são comumente isolados de ascídias da família Didemnidae, principalmente peptídeos cíclicos e alcalóides. Como exemplos de compostos isolados de ascídias do gênero *Didemnum* podemos citar a plakinidina D (**75**), um alcalóide pirroloacridínico isolado das ascídias *Didemnum* sp. e *Didemnum rubeum*. A plakinidina D apresentou atividade citotóxica contra a linhagem de célula tumoral HCT-116 (cólon) (Smith et al., 1997; Ford e Davidson, 1997). As didemnolinas A e B (**76-77**) foram obtidas a partir de um extrato de *Didemnum* sp. (Schumacher e Davidson, 1995). Da ascídia *Didemnum molle* foram

isolados os peptídeos cíclicos citotóxicos comoramidas A e B (**78-79**) e as mayotamidas A e B (**80-81**) (Rudi et al., 1998).

Figura 5.1 - Compostos obtidos a partir de ascídias do gênero *Didemnum*.

O fracionamento do extrato da ascídia *Didemnum conchyliatum*, levou ao isolamento de 4 novos alcalóides, as didemnimidas A-D (**82-85**) compostos contendo um esqueleto que combina anéis do tipo indol, maleimida e imidazol (Vervoort et al., 1997).

Posteriormente, foi verificado que o extrato metanólico da ascídia *Didemnum granulatum*, coletada no Brasil, apresentava atividade em um novo teste para detectar substâncias inibidoras do ponto de checagem G2 do ciclo celular. O fracionamento deste extrato levou ao isolamento das didemnimidas A e D (**82** e **85**), anteriormente isoladas da ascídia *Didemnum conchyliatum*, de um novo alcalóide denominado didemnimida E (**86**) e de um novo composto inibidor do ponto de checagem G2 do ciclo celular. Com o intuito de se determinar a estrutura desse composto, foram sintetizados os compostos **87** e **88** denominados isogranulatimida e granulatimida, respectivamente. A comparação dos dados de RMN de ambos compostos com o produto natural revelou que a estrutura correta para o composto natural isolado correspondia com a isogranulatimida (**87**). O posterior estudo do extrato de *D.granulatum* levou ao isolamento da granulatimida (**88**) e da 6-bromogranulatimida (**89**). Os compostos isogranulatimida (**87**) e granulatimida (**88**), produtos da ciclização da didemnimida A (**82**), constituem os primeiros exemplos de uma nova classe de compostos inibidores do ponto de checagem G2 do ciclo celular (Berlinck et al., 1998; Britton et al., 2001). Mais tarde, a isogranulatimida (**87**) foi isolada da mesma ascídia *Didemnum conchyliatum*, a partir da qual foram isoladas as didemnimidas A-D (Vervoort et al., 1999).

A ascididemina (**90**) é um exemplo de alcalóide aromático pentacíclico do tipo piridoacridínico derivado de uma ascídia do gênero *Didemnum*. Este composto apresentou potente citotoxicidade *in vitro* contra células leucêmicas L1210 com IC₅₀ de 0,39 µg/mL (Kobayashi et al, 1988).

Figura 5.2 – Estruturas das didemnimidas A-E, das granulatomidas e da ascididemina.

A caledonina (**91**) foi isolada a partir da ascídia *Didemnum rodriguesi*. O composto **91** é um peptídeo modificado que contém uma unidade derivada do α -aminoácido fenilalanina, um β -aminoácido residual, derivado do ácido S-3-amino-5-mercaptopentanóico, e um grupo guanidínico cíclico (Vázquez et al., 1995). A caledonina apresentou citotoxicidade *in vitro* contra células KB com 85% de inibição à uma concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. Da mesma espécie de ascídia também foram isolados 6 novos peptídeos guanidínicos, as minaleminas A-F (**92-97**), que apresentam o mesmo esqueleto diferenciando-se apenas na substituição no nitrogênio do bloco central e no

comprimento da cadeia saturada. As minaleminas A-F foram os primeiros exemplos na natureza de derivados ácidos sulfâmicos guanidínicos (Expósito et al., 1998).

Figura 5.3 – Exemplos de substâncias isoladas da ascídia *Didemnum rodriguesi*.

Ascidiatrienolídeos A-C (**98-100**) isolados do extrato da ascídia *Didemnum candidum*, foram os primeiros exemplos de eicosanóides lactonizados obtidos a partir de invertebrados marinhos (Lindquist e Fenical, 1989).

Figura 5.4 – Ascidiatrienolídeos A-C (**98-100**) isolados do extrato da ascídia *Didemnum candidum*.

De extratos de ascídias do gênero *Didemnum* também foram obtidos compostos inibidores das enzimas integrase HIV-1 e protease HIV-1, que são atrativos alvos para a quimioterapia anti-retroviral. O ciclodidemniserinol trissulfato (**101**), um serinolípido sulfatado isolado da ascídia *Didemnum guttatum*, mostrou ser inibidor da enzima integrase HIV-1 (Mitchell, et al., 2000). Os didemnacetais A e B (**102** e **103**) demonstraram inibir a enzima protease HIV-1 (Potta e Faulkner, 1991).

Figura 5.5 – Compostos obtidos de extratos de ascídias do gênero *Didemnum* que apresentaram atividade inibitória das enzimas protease HIV-1 e integrase HIV-1.

Recentemente, do extrato de uma ascídia da família Didemnidae, foram isolados novos derivados serinolipídicos, os shishididemnióis A-E (**104-108**), os quais apresentaram atividade antibacteriana contra a bactéria patogênica de peixe *Vibrio anguillarum* (Kobayashi et al., 2007a; 2007b).

Figura 5.6 – Shishididemnióis A-E (104-108) obtidos do extrato de uma ascídia da família Didemnidae.

5.2. Estudo químico da ascídia *Didemnum ligulum* – Procedimento Experimental

A ascídia *Didemnum ligulum* (204 g) foi coletada em São Sebastião-SP em 1999, conservada em EtOH e mantida a -20° C.

Um espécimen voucher foi depositado na coleção de ascídias do Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Uma alíquota do extrato bruto deste animal apresentou atividade antimicobacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

O trabalho de isolamento químico do extrato da ascídia *Didemnum ligulum* foi realizado de acordo com o procedimento sumarizado no **Esquema 5.1**.

Esquema 5.1. Fluxograma do estudo químico do extrato da ascídia *Didemnum ligulum*.

O EtOH de armazenamento foi filtrado e evaporado. O animal foi triturado e re-extraído exaustivamente com MeOH. Os extratos EtOH e MeOH foram filtrados (filtrados a vácuo, utilizando-se uma camada de celite em funil de Büchner) reunidos e concentrados. O extrato bruto concentrado foi ressuspensionado em água (500 mL). Realizou-se uma partição da suspensão aquosa metanólica (500 mL) com *n*-hexano (500 mL, procedimento repetido por três vezes), resultando em duas frações, MeOH-H₂O e hexânica. A fração MeOH-H₂O foi evaporada até remoção completa do MeOH, cuja suspensão aquosa obtida foi submetida a uma partição com AcOEt (500 mL, procedimento repetido por três vezes) obtendo-se duas frações: a fração AcOEt e a fração aquosa. Os extratos foram concentrados, pesados e avaliados por CCD.

5.2.1 - Estudo do extrato de acetato de etila da ascídia *Didemnum ligulum*

O extrato AcOEt foi fracionado através de separação por cromatografia de permeação em gel Sephadex LH-20 com eluição isocrática de MeOH e em seguida por cromatografia em fase reversa com uma coluna pré-empacotada de sílica-gel derivatizada com grupos octadecil (C₁₈) (Waters® Sep Pak® 10 g) utilizando-se gradiente de MeOH em H₂O.

Após análise por CCD, decidimos analisar por RMN-¹H a fração contendo compostos nitrogenados (positiva ao revelador Dragendorff). A fração foi dissolvida em MeOH-*d*₄ (500 µL), transferida para um tubo de RMN e mantida em geladeira a 4° C. Após 24 h observou-se a formação de cristais monoclinicos os quais foram cuidadosamente retirados do tubo e analisados por difração de raios-X. Posteriormente os cristais foram solubilizados em DMSO-*d*₆ e analisados por RMN-¹H, RMN-¹³C e HMQC. O composto cristalino foi identificado como sendo a asterubina (**109**) (4,0 mg, 0,002%), um metabólito primário isolado na década de 40 (Ackermann, et al., 1935).

A água-mãe da cristalização (em MeOH-*d*₄) foi purificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV) no modo fase reversa, utilizando-se uma coluna de sílica-gel derivatizada com grupos fenila (Waters® Ph µBondapak™ 125 Å/10 µm - 7,8 x 300 mm). A eluição isocrática foi realizada com MeOH/H₂O (70:30), fluxo de 1 mL/minuto e monitorando-se a separação em λ_{máx} = 212 nm. Esta purificação resultou

no isolamento da substância inédita *N,N*-dimetil-*O*-metiletanolamina (**110**) (10,4 mg, 0,005%).

Isolada na forma de um sólido vítreo amarelo, a substância inédita *N,N*-dimetil-*O*-metiletanolamina (**110**), teve sua estrutura determinada pela análise de seus dados espectroscópicos de diversas técnicas de ressonância magnética nuclear mono e bidimensionais e espectrometria de massas de alta resolução.

5.2.2 - Estudo do extrato hexânico da ascídia *Didemnum ligulum*

Foram realizadas algumas separações cromatográficas com o extrato hexânico, porém após análise das frações resultantes por CCD e RMN-¹H concluímos que esta se constituía principalmente de compostos derivados de esteróis de pouco interesse para nosso estudo. Sendo assim, decidimos não continuar seu fracionamento.

5.2.3 - Determinação da estrutura cristalina da asterubina (**109**)

A determinação estrutural da asterubina por difração de raios-X foi realizada com a colaboração da Prof. Dr. Maria Teresa P. Gambardella do grupo de Cristalografia do IQSC-USP (Ver resultados e discussão).

5.3. - Resultados e Discussão

A ascídia *Didemnum ligulum* (**Figura 5.7**) foi descrita pela primeira vez por Monniot F., em 1983 e sua classificação taxonômica é apresentada na **Figura 5.8**.

Figura 5.7. Foto da ascídia *Didemnum ligulum* (Rocha, R.M.).

Filo: Chordata
Classe: Ascidiacea
Ordem: Enterogona
Família: Didemnidae
Gênero: <i>Didemnum</i>
Espécie: <i>Didemnum ligulum</i>

Figura 5.8. Taxonomia da ascídia *Didemnum ligulum*.

Durante uma triagem farmacológica realizada com extratos de mais de 100 ascídias, verificamos que o extrato bruto da ascídia *Didemnum ligulum* oriunda de São Sebastião (SP) apresentou atividade antimicobacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

O fracionamento cromatográfico do extrato desse animal resultou no isolamento de duas substâncias: a asterubina (**109**), identificada por análise por difração de raio-x, e a substância inédita *N,N*-dimetil-*O*-metiletanolamina (**110**) identificada pela análise de seus dados espectroscópicos.

5.3.1. Determinação estrutural da asterubina (109)

O composto cristalino foi identificado como sendo a asterubina (**109**) por análise por difração de raios-X. Posteriormente obtivemos os dados de RMN- ^1H , RMN- ^{13}C e HMQC (V.2, Figuras 5.1, 5.2 e 5.3), que possibilitaram a atribuição dos sinais de ^1H s e ^{13}C s, ainda não reportada na literatura.

O espectro de massas de alta resolução (V.2, Figura 5.4) em modo spray de elétrons positivo (HRESIMS) apresentou um pico de íon pseudomolecular $[\text{M} + \text{Na}]^+$ em m/z 218,0578 compatível com a fórmula molecular $\text{C}_5\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3\text{NaS}$.

O experimento HMQC forneceu informações sobre acoplamentos diretos ^1H - ^{13}C , sendo possível verificar os hidrogênios que se encontram ligados a cada carbono.

A estrutura estabelecida por análise por difração de raios-X possibilitou a atribuição dos sinais de RMN de ^1H , ^{13}C e HMQC sem ambigüidade. O espectro de RMN de ^{13}C mostrou um sinal de carbono típico de guanidina com deslocamento em δ 155,7, um sinal em δ 49,1, que pôde ser atribuído ao carbono ligado ao átomo de enxofre, e três sinais de carbonos com valores de deslocamentos químicos característicos de carbonos ligados a átomos de nitrogênio [δ 39,0, 37,8 (x 2)]. Por fim, os valores de deslocamentos químicos bem como a multiplicidade dos sinais observados no espectro de RMN de ^1H condizem com a estrutura estabelecida por difração de raios-X.

Figura 5.9. Estrutura da asterubina (**109**) com os respectivos valores de deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C .

A asterubina (**109**) já havia sido isolada anteriormente da estrela do mar *Asteria rubens* (Ackermann, et al., 1935; Ackermann, et al., 1936) e mais recentemente da esponja *Phoriospongia* sp., (Prof. Robert Capon, The University of Queensland, comunicação pessoal), mas nunca de uma ascídia. Tal fato pode indicar que a ocorrência de compostos estruturalmente relacionados pode ser ampla, inclusive em organismos com pouca relação filogenética.

Estudos de biogênese de compostos guanidínicos mostram que estes provêm da arginina por transferência de seus grupos amidínicos ou por degradação. Em vertebrados como também em invertebrados, o metabolismo de derivados guanidínicos não apenas abrange a ação da arginina na fixação ou excreção de nitrogênio; sua presença tem também outros papéis biológicos. Alguns compostos guanidínicos têm relação com glicólise muscular e outros atuam como aceptores de fosfato (Thoai, 1959).

Embora a maioria dos compostos guanidínicos de ocorrência biológica seja derivados da arginina, a asterubina, deve certamente resultar da guanilação e metilação da taurina. A taurina é um aminoácido derivado do ácido sulfônico e da arginina.

5.3.1.1 - Determinação da estrutura cristalina da asterubina (**109**)

A determinação da estrutura cristalina da asterubina por difração de raios-X foi realizada com a colaboração da Prof. Dr. Maria Teresa P. Gambardella do grupo de Cristalografia do IQSC-USP.

Os dados de difração da asterubina (**109**) foram coletados em um difratômetro automático CAD4 Enraf-Nonius, a 273 K no modo $\omega-2\theta$. Os parâmetros de cela unitária foram obtidos e refinados usando 22 reflexões centradas automaticamente. Na **Tabela 5.1** estão listados os principais dados cristalográficos e as condições de refinamento. Os dados de intensidade foram corrigidos pelos fatores de absorção usando o Método PSISCAN (North et al., 1968).

A estrutura foi resolvida pelo método SIR92 (Altomare et al., 1993), e refinada pelo método de mínimos quadrados com matriz completa e sucessivas sínteses de Fourier diferença, usando o sistema WinGX (Farrugia, 1999).

Os átomos de hidrogênio ligados aos átomos de N foram localizados em mapas de Fourier diferença e foram incluídos no refinamento com parâmetros de deslocamento

térmico 1,2 vezes o Ueq do átomo ao qual se ligam. Os demais átomos de hidrogênio foram colocados em suas posições ideais com parâmetros de deslocamento térmico 1,5 vezes o Ueq do átomo ao qual se ligam para hidrogênios de metilas e 1,2 para os demais. Todos os átomos “não hidrogênios” foram refinados anisotropicamente. Uma representação ORTEP (Farrugia, 1997) da molécula com os átomos identificados é apresentada na **Figura 5.10**. No empacotamento cristalino a molécula de asterubina forma três ligações de hidrogênio intermoleculares entre N1 e O3, N1 e O2 e N3 e O1. A geometria das ligações de hidrogênio, com respectivas operações de simetria, é apresentada na **Tabela 5.2**.

Tabela 5.1 - Dados cristalográficos da asterubina (**109**).

Fórmula empírica	C ₅ H ₃ N ₃ SO ₃
Dimensões do cristal	0,2 x 0,2 x 0,1
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁ /c
a (Å)	6,0852(5)
b (Å)	8,7508(8)
c (Å)	16,553(1)
β (°)	97,063(6)
V (Å ³)	874,8(1)
Z	4
F(000)	416
Densidade calculada (Mg. m ⁻³)	1,483
μ (mm ⁻¹)	0,345
Difratômetro	CAD4
Radiação, λ (Å)	MoKα, 0,71073
Temperatura (K)	293
Intervalo de θ	2,48 – 29,95
Intervalo de hkl	-8 ≤ h ≤ 0, 0 ≤ k ≤ 12, -23 ≤ l ≤ 23
Reflexões medidas	2759
Reflexões únicas / Rint	2540 / 0,024
Reflexões observadas (I ≥ 2σ(I))	1752
Parâmetros refinados / restrições	120 / 0
R (obs/all)	0,0433/ 0,086
wR (obs/all)	0,107 / 0,122
S	1,032
Δρ min/max (e Å ⁻³)	-0,354 / 0,461

Tabela 5.2: Geometria das ligações de hidrogênio da asterubina (**109**).

D-H	d(D-H)	D(H..A)	<DHA	d(D..A)	A
N1-HN1a	0,84(2)	2,10(2)	163(2)	2,917(2)	O3 ⁱ
N1-HN1b	0,84(2)	2,04(2)	163(2)	2,860(2)	O2 ⁱⁱ
N3-HN3	0,87(2)	2,03(2)	157(2)	2,855(2)	O1 ⁱⁱⁱ

Operações de simetria: (i) $x, -y+1/2, z-1/2$, (ii) $-x, y-1/2, -z+1/2$, (iii) $x+1, y, z$

Figura 5.10: Representação ORTEP da molécula de asterubina (**109**) com os átomos identificados.

5.3.2. Determinação estrutural da *N,N*-dimetil-*O*-metiletanolamina (**110**)

Isolada na forma de um sólido vítreo amarelo, a substância inédita *N,N*-dimetil-*O*-metiletanolamina (**110**), teve sua estrutura determinada pela análise de seus dados espectroscópicos - RMN-¹H, RMN-¹³C (BBD e DEPT 135°), HMQC, HMBC, COSY (V.2, Figuras 5.5, 5.6, 5.7, 5.8 e 5.9 respectivamente) e espectrometria de massas de alta resolução em modo bombardeamento rápido de átomos (HRFABMS), cujo espectro (V.2, Figura 5.10) apresentou pico de íon pseudomolecular [M+H]⁺ em m/z 104,10813 (calculado: 104,10754), compatível com a fórmula C₅H₁₄NO.

De acordo com os valores observados para os sinais no espectro de RMN-¹³C, pôde-se constatar que provavelmente todos os átomos de carbono estariam ligados a

heteroátomos, sendo sinais com valores de deslocamentos químicos típicos de carbonos ligados a nitrogênio e oxigênio. Como o espectro de massas nos forneceu um valor ímpar para o pico de íon molecular, o composto deve apresentar um número ímpar de átomos de nitrogênios.

O experimento HMQC forneceu informações sobre acoplamentos diretos ^1H - ^{13}C , sendo possível verificar os hidrogênios que se encontram ligados a cada átomo de carbono. Por fim, a análise do espectro de correlação a longa distância HMBC indicou que o grupo metoxila, com sinal no espectro de RMN- ^1H (MeOH- d_4 , 400 MHz) em δ 3,22 (δ ^{13}C 54,7), estava acoplado ao grupo metileno em δ 3,50 (δ ^{13}C 69,0) o qual por sua vez estaria acoplado ao outro grupo metileno em δ 4,00 (δ ^{13}C 57,1), que constitui um sistema do tipo AA'BB'. O átomo de nitrogênio demonstrou estar substituído por dois grupos metila, que apresentaram sinal no espectro de RMN- ^1H em δ 2,67 (δ ^{13}C 40,5). Com isso, pudemos estabelecer a elucidação estrutural do composto *N,N*-dimetil-O-metiletanolamina (**110**).

Figura 5.11. Estrutura da *N,N*-dimetil-O-metiletanolamina (**110**) com os respectivos valores de deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C .

No espectro COSY, onde comumente são observados acoplamentos 2J e 3J entre os hidrogênios, foi observada apenas a correlação ^1H - ^1H entre os hidrogênios vicinais dos grupos metilenos.

O espectro HMBC nos forneceu acoplamentos ^{13}C - ^1H à longa distância onde foram observados acoplamentos 2J e 3J como demonstrado no **Esquema 5.2**.

Esquema 5.2. Estrutura da *N,N*-dimetil-*O*-metiletanolamina (**110**) com as respectivas correlações observadas nos espectros de COSY ^1H - ^1H e HMBC.

Tabela 5.3 – Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) e correlações à longa distância da *N,N*-dimetil-*O*-metiletanolamina (**110**) em MeOH- d_4 .

Posição	$\delta^{13}\text{C}$ (HMQC)	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz, integral)	COSY	HMBC
1	57,1	4,00 (m, 2H)	H2	H2
2	69,0	3,50 (m, 2H)	H1	H3
3	54,7	3,22 (s, 3H)	-	H2
4	40,5	2,67 (s, 3H)	-	H4'
4'	40,5	2,67 (s, 3H)	-	H4

Figura 5.12 - Estrutura da *N,N*-dimetil-*O*-metiletanolamina (**110**).

A etanolamina é na verdade considerada um metabólito primário, sendo constituinte estrutural da colina e da acetilcolina. (Lehninger et al.,1995).

5.3.3 - Avaliação biológica dos compostos isolados da ascídia *Didemnum ligulum*: a asterubina (109) e *N,N*-dimetil-*O*-metiletanolamina (110)

Infelizmente os compostos puros isolados não apresentaram atividade biológica no bioensaio de atividade antimicobacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv cujo extrato bruto foi ativo. Tal fato pode ser explicado por inúmeras hipóteses, como o efeito sinérgico que alguns compostos podem apresentar; talvez outro composto não isolado que seria o responsável pela atividade, ou mesmo um falso positivo no bioensaio realizado com o extrato bruto.

Capítulo 6

Estudo químico do extrato bruto da ascídia *Didemnum* sp. Isolamento das dicetopiperazinas (130-133)

6.1 – Introdução

Embora as piperazinas sejam conhecidas há mais de um século, apenas recentemente as 2,5-dicetopiperazinas têm atraído atenção dos pesquisadores devido às suas propriedades biológicas. Seu peculiar sistema heterocíclico encontrado em diversos produtos naturais constitui um quimiotipo único, relacionado a vários compostos bioativos. O amplo espectro de suas propriedades biológicas inclui compostos com atividade antitumoral, antiviral, antifúngico, antibacteriana, entre outras (Martins e Carvalho, 2007).

Dicetopiperazinas são os menores peptídeos cíclicos conhecidos, comumente biossintetizados a partir de aminoácidos por diferentes organismos, incluindo mamíferos. São considerados metabólitos secundários funcionais ou produtos laterais de clivagem peptídica terminal. Devido às suas estruturas funcionalizadas, rígidas e quirais, as dicetopiperazinas ligam-se a uma grande variedade de receptores com alta afinidade (Martins e Carvalho, 2007).

Dicetopiperazinas são tipicamente consideradas como metabólitos secundários de fungos, o que aumenta ainda mais a dúvida sobre sua real origem biossintética (microrganismos vs. animal hospedeiro) (Barton, 1979; Thomson, 1985). Esses compostos foram isolados de microrganismos e esponjas a partir de vários tecidos e fluídos corporais (Furtado et al., 2005).

Como exemplo de dicetopiperazina podemos citar a fenilhistina (**111**), um metabólito isolado de *Aspergillus ustus* que mostrou ser citotóxico em diversas linhagens de células tumorais (Kanoh et al., 1999). O metabólito ciclo-[indol-*N*-isoprenil-Trp-Val] (**112**), isolado de uma linhagem de fungo marinho pertencente ao Filo Ascomycota, demonstrou uma potente atividade contra fungos filamentosos *Pyricularia oryzae*, um patógeno agrícola, com valor de CIM de 0,36 μ M (Byun et al., 2003).

Do fungo *Chaetomium globosum* foi obtido o alcalóide piperazínico (**113**), o qual apresentou atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra com valor de CIM de 170,0 μ M. A roquefortina (**114**) e 3,12-dihidroroquefortina (**115**) são alcalóides dicetopiperazínicos isolados de uma linhagem de *Penicillium aurantiogriseum*. A roquefortina (**114**) apresentou atividade bacteriostática sobre bactérias Gram-positivas, porém exibiu efeitos colaterais neurotóxicos (Kozlovsky et al., 2003).

Figura 6.1. Exemplos de dicetopiperazinas.

De esponjas marinhas do gênero *Dysidea* já foram isoladas mais de 20 dicetopiperazinas policloradas, como as disamidas A-C (**116-118**) (Su et al., 1993; Fu et al., 1998). A baretina (**119**) foi obtida a partir da esponja *Geodia baretii* (Lidgren et al., 1986) e teve sua estrutura revisada por Solter et al., 2002.

O estudo do extrato da esponja *Rhaphisia pallida* resultou no isolamento de um novo alcalóide *N*-carboxiindólico, a palidina (**120**). Sendo o primeiro caso de um alcalóide *N*-carboxiindólico obtido de uma reserva natural (Sue et al., 1996).

Quatro dicetopiperazinas chamadas verpacamidas A-D (**121-124**), foram isoladas da esponja marinha *Axinella vaceleti*, todas derivadas de ciclo-[Pro-Arg] (Vergne et al., 2006).

Figura 6.2 – Exemplos de dicetopiperazinas obtidas de esponjas marinhas.

Recentemente, foram obtidos da bactéria marinha *Salinispora arenicola* CNS-205, dois peptídeos dicetopiperazínicos: as ciclomarazinas A e B (**125-126**). As ciclomarazinas foram identificadas como moderados agentes antimicrobianos com valores de CIM de 18 e 13 $\mu\text{g/mL}$ contra *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecium*, respectivamente (Schultz et al., 2008). E de um fungo derivado de origem marinha da ordem Pleosporales (linhagem CRIF2) foram obtidas as dicetopiperazinas **127-129** (Prachyawarakorn et al., 2008).

Figura 6.3 – Dicetopiperazinas obtidas de microrganismos de origem marinha.

Estes são apenas alguns exemplos de compostos isolados de microrganismos e esponjas marinhas, pertencentes à classe das dicetopiperazinas.

6.2 - Estudo químico da ascídia *Didemnum* sp. – Procedimento Experimental

O estudo foi realizado com extratos de dois espécimens da ascídia *Didemnum* sp., ambas coletadas em 1999, na Baía de Todos os Santos (Salvador-BA), porém em diferentes localidades. Dessa forma, os extratos foram nomeados como *Didemnum* sp. A e *Didemnum* sp. B e estudados separadamente.

Imediatamente após a coleta, os animais foram congelados e preservados a - 20° C.

Uma alíquota do extrato bruto da ascídia *Didemnum* sp. A apresentou atividade antimicrobiana, enquanto que uma alíquota do extrato bruto da ascídia *Didemnum* sp. B apresentou atividade antimicobacteriana contra *Micobacterium tuberculosis*.

6.2.1 – Procedimento experimental do estudo da ascídia *Didemnum* sp. A

O estudo químico do extrato da ascídia *Didemnum* sp. A foi realizado de acordo com o procedimento sumarizado nos **Esquemas 6.1 e 6.2**.

Esquema 6.1. Fluxograma do estudo químico (extração e partição) do extrato da ascídia *Didemnum* sp. A.

Esquema 6.2 - Fluxograma do fracionamento do extrato metanólico da ascídia *Didemnum* sp. A.

Primeiramente o animal foi liofilizado e extraído exaustivamente com MeOH, filtrado a vácuo, utilizando-se uma camada de celite em funil de Büchner e concentrado. Ao extrato bruto metanólico concentrado foi adicionado água (~10% do volume de MeOH). Esta suspensão MeOH-H₂O foi submetida a uma partição líquido-líquido com *n*-hexano (500 mL, procedimento repetido por três vezes) resultando em dois extratos, o extrato MeOH-H₂O e o extrato hexânico, como demonstrado no **Esquema 6.1**. Os extratos MeOH-H₂O e hexânico foram concentrados, pesados e avaliados por CCD (reveladores: lâmpada de UV em 254 nm e Dragendorff e ninidrina). Como o extrato hexânico não demonstrou apresentar compostos de nosso interesse, decidimos pela não continuidade do estudo deste extrato.

O extrato MeOH-H₂O foi evaporado e fracionado por cromatografia em fase reversa com coluna pré-empacotada de sílica-gel (Waters® Sep Pak® 10 g) derivatizada com grupos octadecil (C₁₈) utilizando-se gradiente de MeOH em H₂O (H₂O/MeOH – 9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 1:1; 4:6; 3:7; 2:8; 1:9; 100% MeOH). A fração Da-MSP-8 resultante desta cromatografia foi submetida à cromatografia de permeação em gel Sephadex LH-20 com eluição isocrática de MeOH. As frações Da-MSP-8D e 8E foram selecionadas e submetidas à outra separação por cromatografia em fase reversa com coluna pré-empacotada Sep Pak Waters (10 g) de sílica-gel derivatizada com grupos octadecil (C₁₈) utilizando-se gradiente de MeOH em H₂O. Em seguida, as frações selecionadas por CCD e RMN de ¹H, foram purificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV) utilizando-se coluna de sílica-gel derivatizada com grupos fenil (Waters® Ph μBondapak™ 125 Å/10 μm - 7,8 x 300 mm) no modo fase reversa utilizando-se como eluente uma mistura de MeOH/H₂O + TFA 0,5% (65:35); fluxo de 1 mL/minuto e monitorando-se a separação em λ_{máx}= 220 nm (**Esquema 6.2**).

Destas purificações obteve-se as frações **Da-MSP-8D4C** e **Da-MSP-8E5D**. Após análise por RMN pudemos perceber que **Da-MSP-8D4C** e **Da-MSP-8E5D** eram constituídas das mesmas substâncias: uma mistura de dois homólogos dicetopiperazínicos que diferem entre si por um grupo metileno, cujas estruturas são inéditas na literatura.

As estruturas dos compostos isolados foram determinadas por análises espectroscópicas (RMN-¹H, RMN-¹³C, DEPT, HMQC, HMBC, COSY) e por espectrometria de massas de alta resolução (MS/MS).

6.2.1.1 – Determinação da configuração absoluta da fenilalanina presente nas estruturas 130 e 131

A reação de hidrólise foi realizada com 2,0 mg da fração contendo os compostos **130** e **131**. Esta fração foi solubilizada em 0,5 mL de ácido clorídrico 6 M, transferida para um sistema de refluxo e aquecida a 105° C por 24 horas. Após esse período, a solução ácida foi evaporada.

Após a reação de hidrólise, a fração contendo os compostos **130** e **131**, e o padrão do aminoácido (L)-Fenilalanina foram separadamente derivatizados com reagente de Marfey (1-flúor-2,4-dinitrofenil-5-L-alaninamida), segundo procedimento descrito por Marfey e Ottesen (1984).

À fração hidrolisada e ao padrão foram, separadamente, adicionados 40 µL de água, 16 µL de solução de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) 0,5 M e 80 µL de uma solução de reagente de Marfey em acetona (obedecendo a estequiometria de 1,0 mol de aminoácido para 1,4 mol de reagente). As amostras foram mantidas em aquecimento a 40° C por 1 hora. Em seguida adicionou-se 16 µL de HCl 0,5 M. As amostras foram evaporadas, solubilizadas em MeOH e analisadas por CLAE-UV-MS.

O padrão derivatizado e a fração contendo os produtos naturais hidrolisados e derivatizados foram analisados separadamente por CLAE-UV-MS, utilizando-se uma coluna de sílica-gel derivatizada com grupos octadecil [C₁₈, Phenomenex®, 100 Å, 250 x 4,6 mm], com gradiente de MeOH/MeCN (1:1) em tampão H₂PO₄/ Et₃N e trietilamina (pH= 3,5) e fluxo de 1 mL/minuto, monitorando-se em $\lambda_{\text{máx}}$ = 340 nm.

6.2.2 – Procedimento experimental do estudo da ascídia *Didemnum* sp. B

O estudo químico do extrato da ascídia *Didemnum* sp. B foi realizado de acordo com o procedimento sumarizado nos **Esquemas 6.3, 6.4 e 6.5**.

Esquema 6.3 - Fluxograma do estudo químico (Extração e partição) do extrato da ascídia *Didemnum* sp. B.

Esquema 6.4 - Fluxograma do estudo químico (Fracionamento) do extrato da ascídia *Didemnum* sp. B.

^aCondições: coluna de sílica-gel derivatizada com grupos octadecil – C₁₈, (inertsil ODS-3, 250 x 4,6 mm, 5 µm); eluentes: MeOH/H₂O + TFA 0,1% (68:32), fluxo de 1 mL/minuto, λ_{máx}= 220 nm.

Esquema 6.5 - Fluxograma do estudo químico (Purificação) do extrato da ascídia *Didemnum* sp. B

O procedimento de extração da ascídia *Didemnum* sp. B foi realizado de maneira análoga ao procedimento da outra amostra de *Didemnum* sp. A.

Ao extrato bruto metanólico concentrado foi adicionado água (~10% do volume de MeOH) e esta suspensão MeOH-H₂O foi submetida a uma partição líquido-líquido com éter de petróleo (500 mL, procedimento repetido por três vezes) resultando em dois extratos, o extrato MeOH-H₂O e o extrato EP. Em seguida, o MeOH do extrato MeOH-H₂O foi totalmente evaporado e a fração aquosa restante foi submetido a uma partição com AcOEt, resultando nos extratos AcOEt e aquoso. Por fim, o extrato aquoso foi particionado com uma mistura de CH₂Cl₂/MeOH (3:2) resultando nos extratos CH₂Cl₂/MeOH e aquoso/MeOH. Todo o procedimento de extração e partição está demonstrado no **Esquema 6.3**. Os extratos foram concentrados, pesados e avaliados por CCD (reveladores: lâmpada de UV em 254 nm e Dragendorff e ninidrina).

Os extratos de AcOEt e EP foram fracionados e analisados por CCD e RMN de ¹H. Como não demonstraram apresentar compostos de nosso interesse, decidimos pela não continuidade nos estudos destas frações.

O extrato Db-CH₂Cl₂/MeOH foi submetido a uma separação por cromatografia de permeação em gel Sephadex LH-20 com eluição isocrática de MeOH. A fração Db-CH₂Cl₂-5 foi selecionada, após análise por CCD, e submetida à uma separação por cromatografia em fase reversa com coluna pré-empacotada Sep Pak Waters (10 g) de sílica-gel derivatizada com grupos octadecil (C₁₈) utilizando-se gradiente de MeOH em H₂O. Em seguida, a fração Db-CH₂Cl₂-5C foi submetida a outra separação por cromatografia em fase reversa com coluna pré-empacotada Sep Pak Waters (10 g) de sílica-gel derivatizada com grupos octadecil (C₁₈) utilizando-se gradiente de MeOH em H₂O. Este procedimento é ilustrado no **Esquema 6.4**.

Deste último fracionamento, a fração Db-CH₂Cl₂-5C2 foi selecionada por CCD para ser purificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV) utilizando-se coluna de sílica-gel derivatizada com grupos fenil (Inertsil Ph⁺ 4,6 x 250 mm, 5µm) no modo reverso, utilizando-se como eluente MeCN/H₂O (45:55); fluxo de 1 mL/minuto e monitorando-se a separação em λ_{máx} = 228 nm. Posteriormente, as frações Db-CH₂Cl₂-5C2B e Db-CH₂Cl₂-5C2C foram submetidas a uma purificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV) utilizando-se coluna de sílica-gel derivatizada com grupos octadecil – C₁₈, (inertsil ODS-3, 250 x 4,6 mm, 5 µm) no modo reverso utilizando-se

como eluente MeOH/H₂O + TFA 0,1% (68:32), fluxo de 1 mL/minuto e monitorando-se a separação em $\lambda_{\text{máx}} = 220$ nm. Esta última etapa cromatográfica resultou no isolamento dos compostos Db-CH₂Cl₂-5C2B1 (**132**) e Db-CH₂Cl₂-5C2C2 (**133**), duas substâncias dicetopiperazínicas cujas estruturas são inéditas na literatura (**Esquema 6.5**).

As estruturas dos compostos isolados foram determinadas por análises espectroscópicas (RMN-¹H, RMN-¹³C, DEPT, HMQC, HMBC, COSY) e por espectrometria de massas de alta resolução.

6.3. Resultados e Discussão

Uma foto da ascídia *Didemnum* sp. está ilustrada na **Figura 6.4** e sua classificação taxonômica é apresentada na **Figura 6.5**.

Figura 6.4 - Foto da ascídia *Didemnum* sp. (Rocha, R.M.)

Filo: Chordata
Classe: Ascidiacea
Ordem: Enterogona
Família: Didemnidae
Gênero: <i>Didemnum</i>
Espécie: <i>Didemnum</i> sp.

Figura 6.5 - Taxonomia da ascídia *Didemnum* sp.

O extrato bruto da ascídia *Didemnum* sp. A, oriunda de Salvador-BA, apresentou atividade antimicrobiana, enquanto que o extrato bruto da ascídia *Didemnum* sp. B, também coletada em Salvador-BA, apresentou atividade antimicobacteriana contra *Micobacterium tuberculosis* H37Rv.

Os compostos **130** e **131**, denominados rodriguesinas A e B, foram obtidos na forma de uma mistura inseparável a partir da ascídia *Didemnum* sp. A. Já os compostos **132** e **133**, denominados *N*-acetil-rodriguesinas A e B, foram isolados separadamente a partir da ascídia *Didemnum* sp. B.

6.3.1. Determinação estrutural das rodriguesinas A (130) e B (131)

A elucidação estrutural dos compostos **130** e **131** foi realizada pela análise dos espectros de RMN- ^1H , RMN- ^{13}C , HMQC, HMBC e COSY ^1H - ^1H , infravermelho e por espectrometria de massas de alta resolução (MS/MS) (V.2. Figuras 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6 e 6.7, respectivamente).

Em seu espectro de absorção no infravermelho (filme em disco de silício) foram observadas as seguintes bandas (V.2 Figura 6.6):

- 1.671 cm^{-1} atribuída a grupos carbonílicos;
- 2.925 e 2.850 cm^{-1} atribuídas a grupos C-H alifáticos;
- 3.295 cm^{-1} atribuída a N-H de amina e/ou amida.

A análise dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C indicou a presença de um grupo benzênico com os valores de δ ^1H entre 7,24 e 7,36 e valores de δ ^{13}C entre 128,7 e 137,1. O padrão de acoplamento ^1H - ^1H e os valores de deslocamentos químicos dos hidrogênios e dos carbonos benzênicos nos permitiram supor tratar-se de um grupo benzeno monossustituído.

A análise conjunta dos espectros HMQC, COSY e HMBC nos permitiu verificar que o anel benzênico é parte constituinte de um resíduo de fenilalanina. No espectro COSY, o hidrogênio em δ 4,27 (H-3; δ_{C} 58,4) apresentou acoplamento com os hidrogênios em δ 3,05 e 3,20 (CH_2 -7; δ_{C} 41,2). Tanto H-3 como os hidrogênios CH_2 -7 apresentaram acoplamento à longa distância com o carbono aromático em δ 137,1.

Além do mais, H-7b (δ 3,20) apresentou acoplamento à longa distância com o sinal de carbonila em δ 168,7, tipicamente atribuído à uma carbonila de amida. Já H-7a (δ 3,05) apresentou acoplamento à longa distância com outra carbonila de amida em δ 168,9. Tal fato sugeriu a possibilidade de o resíduo de fenilalanina tomar parte de uma dicetopiperazina.

Tal hipótese foi confirmada observando-se os sinais dos hidrogênios de um resíduo de glicina *N*-substituída. Os sinais em δ 3,56 (d, 17 Hz) e δ 3,08 (d, 17 Hz) apresentaram acoplamentos com os mesmos carbonos carbonílicos em δ 168,7 e 168,9. Fato extremamente curioso é a presença de um segundo sinal dubleto em δ 3,55 (J = 17 Hz). Inicialmente julgamos ter um duplo dubleto. Porém, a análise cuidadosa dos espectros nos indicou a presença de dois compostos estruturalmente muito semelhantes, como discutidos em seguida.

Além do fragmento estrutural constituído pela dicetopiperazina *N*-substituída (**Figura 6.6**), verificamos a presença de dois fragmentos estruturais adicionais: um resíduo de β -aminoácido de cadeia longa e um resíduo de diamina *N*-acilada em uma de suas extremidades.

Figura 6.6 – Fragmento estrutural dos compostos **130** e **131**.

O fragmento estrutural correspondente ao resíduo de β -aminoácido de cadeia longa pôde ser identificado analisando-se os espectros COSY, HMQC e HMBC. No espectro COSY o metileno CH₂-18 (δ 2,27 e 2,39) apresentou correlação com o sinal largo do hidrogênio em δ 4,65 (δ_c 53,8), enquanto que no espectro HMBC o metileno CH₂-18 apresentou correlação com os sinais de carbonilas em δ 172,9 e 173,6. Por sua vez, o hidrogênio metínico em δ 4,65 (H-19) apresentou acoplamento com o metileno

em δ 1,55 e 1,59 (CH_2 -20; δ_{C} 31,8). Esse metileno mostrou estar acoplado ao metileno em δ 1,19 (CH_2 -21; δ_{C} 27,3), o qual é substituído pela cadeia alifática (sinal intenso em δ 1,30) com grupo metila terminal em δ 0,93 (CH_3 -28). Este fragmento estrutural pôde ser conectado à dicetopiperazina, observando-se o acoplamento entre os hidrogênios de glicina em δ 3,55 e 3,56 com o carbono CH-19 em δ_{C} 53,8. Dessa forma, foi possível estabelecer parte da estrutura, como indicado na **Figura 6.7**.

Figura 6.7 – Fragmento estrutural dos compostos **130** e **131**.

O último fragmento estrutural mostrou ser formado por dois homólogos de diamina: a 1,3-diamino propano e a 1,4-diamino butano. Observa-se que os hidrogênios em δ 2,97 (CH_2 -14; δ_{C} 38,5 e 40,6) acoplam com dois grupos metilenos: um em δ 1,88 (CH_2 -15; δ_{C} 28,9 do composto **130**) e o outro em δ 1,70 (CH_2 -15; δ_{C} 26,1 do composto **131**). Considerando-se os deslocamentos químicos de ^1H (δ 2,97) e de ^{13}C (δ 38,5) do metileno CH_2 -15, julgamos ser este um metileno *N*-substituído. Sendo assim, o fato deste acoplar com dois grupos metilenos indicou a presença de uma mistura de dois compostos.

De fato, o metileno em δ 1,88 mostrou estar sequencialmente acoplado a outro metileno, em δ 3,28 e 3,31 (CH_2 -16; δ_{C} 37,3 do composto **130**). Este apresentou acoplamento à longa distância com os sinais de carbonilas em δ 172,9 e 173,6. Por outro lado, o metileno em δ 1,70 mostrou estar acoplado ao metileno em δ 1,55 (CH_2 -15a; δ_{C} 27,6 do composto **131**), o qual se liga ao metileno em δ 3,28 e 3,23 (CH_2 -16; δ_{C} 39,8). Este por sua vez também acopla com os sinais de carbonos carbonílicos em δ

172,9 e 173,6. Sendo assim, a fração isolada é constituída por uma mistura de dois homólogos os quais foram denominados rodriguesinas A (**130**) e B (**131**) (**Figura 6.8**).

Figura 6.8 – Estrutura dos homólogos rodriguesinas **A (130)** e **B (131)** presentes na forma de mistura nas frações **Da-CH₂Cl₂-8D4C** e **Da-CH₂Cl₂-8E5D**.

As principais correlações observadas no espectro de HMBC e COSY estão ilustradas no **Esquema 6.6** e **6.7**, respectivamente.

Esquema 6.6 - Correlações observadas no espectro do tipo HMBC para os compostos **130** e **131**.

Esquema 6.7 - Correlações observadas no espectro de RMN do tipo COSY para os compostos **130** e **131**.

O espectro de massas de alta resolução da mistura constituída pelos compostos **130** e **131** (V.2. **Figura 6.7**) MS/MS apresentou picos de íons pseudomoleculares $[M+H]^+$ em m/z 459,2901 compatível com a fórmula $C_{26}H_{42}N_4O_3$, e em m/z 473,3018, compatível com a fórmula $C_{27}H_{44}N_4O_3$. A análise por HRMS/MS indicou um fragmento em m/z 385,2500 ($C_{23}H_{33}N_2O_3$) para ambos íons moleculares correspondendo à perda de $C_3H_{10}N_2$ (1,3-diaminopropano) para o composto **130** e à perda de $C_4H_{12}N_2$ (1,3-diaminobutano) para o composto **131**. Desta maneira, pudemos comprovar a presença de dois homólogos, cuja diferença está na cadeia da diamina (**Figura 6.9**).

Dessa forma, pôde-se estabelecer a estrutura planar dos compostos **130** e **131**, denominados por nós como rodriguesinas A e B, respectivamente.

Figura 6.9 - Estruturas dos compostos **130** e **131** com a fragmentação em m/z 385,2500 e m/z 385,2488.

Tabela 6.1 – Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H (500 Hz) e ^{13}C (125 Hz) bem como as correlações observadas nos espectros COSY e HMBC dos compostos **130** e **131**.

rodriguesinas A (130) e B (131) (CD_3OD)				
Posição	$\delta^{13}\text{C}$ 130/131	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz, integral) 130/131	HMBC (8 Hz)	COSY
1	-	-	-	-
2	168,7/168,7	-	H3, H6ab, H7ab	-
3	58,4	4,27 (t, 5,0 Hz)	H7ab	H7ab
4	-	-	-	-
5	168,8/168,9	-	H3, H6ab, H7ab	-
6	46,4	a) 3,08 (d, 17,0 Hz); b) 3,55/3,56 (2d, 17,0 Hz)	-	a) H6b b) H6a
7	41,1/41,2	a) 3,05 (m); b) 3,20 (m)	H3, H9	a) H3, H7b; b) H3, H7a
8	137,1	-	H3, H7, H9, H10, H11, H12, H13,	-
9	131,6	7,24 (m)	H7ab, H10, H11	H10, H11
10	130,0	7,36 (m)	H9, H11	H9, H11
11	128,7	7,35 (m)	H9, H10, H13	H9, H10
12	130,0	7,36 (m)	H13, H11	H11, H13
13	131,6	7,24 (m)	H7ab, H10, H11	H12, H11
14	38,5/40,6	2,97 (t, 7,0 Hz)	H15a, H16	Ver Esquema 6.7
15	28,9/26,1	1,88 (qui, 7,0 Hz)/1,70 (m)	H14	Ver Esquema 6.7
15a*	27,6	1,55 (m)	H16	Ver Esquema 6.7
16	37,3/ 39,8	a) 3,28 (dt, 7,0 e 17,0 Hz) b) 3,31/3,23 (m)	H14, H15a	Ver Esquema 6.7
17	172,9/173,6	-	H16, H18	-
18	39,6/39,7	a) 2,27 (ddd, 7,5; 12,5 e 13,2 Hz); b) 2,39 (m)	H20b	a) H18b, H19; b) H18a, H19
19	53,8	4,65 (sl)	H6b, H18	H18ab, H20ab
20	31,8	a) 1,55 (m); b) 1,59 (m)	H18	a) H19, H20b, H21; b) H19, H20a
21	27,3	1,19 (m)	H20b, H22	H20a, H22
22	30,9	1,56 (m)	H20a	H21
23	30,8	1,30 (m)	H24	-
24	30,6	1,30 (m)	H23, H25	-
25	30,4	1,30 (m)	H24, H26	-
26	33,3	1,30 (m)	H25, H27, H28	-
27	24,0	1,30 (m)	H26, H28	H28
28	14,7	0,93 (t, 7,0 Hz)	H27	H27

* Grupo metileno presente somente no homólogo superior (**131**).

A estereoquímica da fenilalanina presente nas estruturas pôde ser estabelecida pela hidrólise da mistura de **130** e **131**, seguida por reação de derivatização com reagente de Marfey. O produto natural derivatizado pôde ser comparado com (L)-fenilalanina padrão derivatizada com o mesmo reagente, utilizando-se de análise por CLAE-PDA-MS (Ver seção **6.3.1.1**).

6.3.1.1. Estudo da estereoquímica absoluta das rodriguesinas A (**130**) e B (**131**)

Realizou-se uma reação de hidrólise com a fração contendo os compostos **130** e **131**, objetivando-se obter o aminoácido fenilalanina. Após a reação de hidrólise, realizou-se uma reação de derivatização com reagente de Marfey (1-flúor-2,4-dinitrofenil-5-L-alaninamida). Sabendo-se que o reagente de Marfey possui configuração absoluta (L), foi possível determinar a configuração absoluta para o aminoácido fenilalanina, comparando-se os tempos de retenção por CLAE-PDA-MS do aminoácido proveniente da hidrólise e derivatização com reagente de Marfey, com o tempo de retenção do aminoácido padrão também derivatizado com o mesmo reagente.

O **Esquema 6.8** mostra os possíveis produtos da reação de derivatização.

Esquema 6.8 - Reação de derivatização dos aminoácidos (L) ou (D), com reagente de Marfey.

A amostra derivatizada do aminoácido (L)-fenilalanina utilizada como padrão foi analisada por CLAE-UV-MS e apresentou um pico de absorção na região do UV com tempo de retenção em 14,81 min. ($\lambda_{\text{máx}} = 340 \text{ nm}$).

A análise por CLAE-UV-MS da amostra contendo os produtos naturais (hidrolisada e derivatizada), apresentou um pico de absorção no UV com tempo de retenção em 14,83 min. ($\lambda_{\text{máx}} = 340 \text{ nm}$).

Por fim, foi realizada uma co-injeção do padrão derivatizado e da amostra hidrolisada e derivatizada. A coincidência dos tempos de retenção do aminoácido padrão derivatizado com os aminoácidos hidrolisados e derivatizados dos produtos naturais indica que a fenilalanina presente nos produtos naturais possui a mesma configuração absoluta que a fenilalanina padrão. Dessa forma, concluiu-se que a configuração absoluta da fenilalanina presente nas estruturas dos dois peptídeos modificados é (L) por apresentarem o mesmo tempo de retenção do aminoácido padrão.

Os cromatogramas referentes às injeções do reagente de Marfey, do aminoácido padrão derivatizado, da amostra hidrolisada e derivatizada, e da co-injeção (padrão derivatizado + amostra derivatizada) estão ilustrados na **Figura 6.10**.

Na **Figura 6.11** estão ilustrados os espectros de massas (LRESIMS) dos respectivos compostos detectados: reagente de Marfey, (L)-fenilalanina padrão derivatizada, amostra hidrolisada e derivatizada, e co-injeção (padrão derivatizado + amostra derivatizada).

Figura 6.10 – Cromatogramas das injeções do reagente de Marfey, padrão derivatizado, amostra hidrolisada e derivatizada e co-injeção: padrão + amostra.

Figura 6.11 – Espectros de massas referentes aos compostos: reagente de Marfey; fenilalanina-padrão derivatizada; amostra contendo os produtos naturais hidrolisados e derivatizados, e; espectro de massas referente à (L)-fenilalanina padrão derivatizada + fenilalanina da amostra hidrolisada e derivatizada (co-injeção).

Figura 6.12 – Estrutura dos peptídeos modificados **130** e **131** com as configurações absolutas das fenilalaninas estabelecidas como sendo (L).

6.3.2. Determinação estrutural da *N*-acetil-rodriguesina A (**132**)

A elucidação estrutural do composto **132**, outro peptídeo modificado inédito contendo uma dicetopiperazina em sua estrutura, foi realizada pela análise dos seus espectros de RMN- ^1H , RMN- ^{13}C – BBD e DEPT 135°, HSQC, HMBC e COSY ^1H - ^1H e por espectrometria de massas de alta resolução (V.2. **Figuras 6.8, 6.9, 6.10, 6.11, 6.12 e 6.13**, respectivamente).

O espectro de massas de alta resolução do composto **132** (V.2. **Figura 6.13**) em modo spray de elétrons (HRESIMS) apresentou pico de íon pseudomolecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 501,3473 compatível com a fórmula $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{N}_4\text{O}_4$.

Pelos cálculos do índice de deficiência de hidrogênios (IDH) verificamos que a estrutura possui nove insaturações.

A análise dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C indicou que o composto **132** é muito semelhante aos compostos **130** e **131**. A diferença estrutural entre estes compostos é que o grupo amina terminal na cadeia alifática é acetilado no composto

132. Dessa maneira, os nove graus de insaturações podem assim ser atribuídos: quatro do anel aromático, quatro carbonilas e um do ciclo dicetopiperazínico.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C indicou a presença de quatro carbonos carbonílicos. O carbono com deslocamento químico em δ 168,5 apresentou um sinal bastante intenso, quando comparado com sinais análogos, sugerindo duas carbonilas com o mesmo deslocamento químico. Também foi observado um grupo metila em δ 22,7 (CH_3 -14), sendo um singlete (δ 1,92) no espectro de RMN de ^1H . Este sinal é característico de um grupo acetila. As demais atribuições são semelhantes às atribuições dos compostos **130** e **131**.

As principais correlações observadas no espectro de HMBC e de COSY estão ilustradas no **Esquema 6.9**.

Esquema 6.9 - Estrutura do composto *N*-acetil-rodriguesina A (132) com as respectivas correlações observadas no espectro do tipo HMBC e COSY.

Tabela 6.2 – Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C bem como as correlações observadas nos espectros COSY e HMBC do composto **132**.

N-acetil-rodriguesina A (132) (CD_3OD)				
Posição	$\delta^{13}\text{C}$ (100 MHz)	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz, integral) (400 MHz)	HMBC (8 Hz)	COSY
1	-	-	-	-
2	168,5	-	H3, H6ab, H7ab	-
3	58,2	4,23 (t; 4,5 Hz)	H7ab	H7ab
4	-	-	-	-
5	168,5	-	H3, H6ab, H7ab	-
6	46,0	a) 3,00 (d; 17,4 Hz); b) 3,50 (d; 17,4 Hz)	-	a) H6b; b) H6a
7	41,1	a) 3,02 (dd; 4,5 e 13,6 Hz); b) 3,16 (m)	H3, H9, H13	a) H3, H7b; b) H3, H7a
8	136,9	-	H3, H7ab, H10	-
9	131,4	7,21 (m)	H7ab	-
10	129,8	7,31 (m)	H11	-
11	128,5	7,30 (m)	H9	-
12	129,8	7,31 (m)	H11	-
13	131,4	7,21 (m)	H7ab	-
14	38,0	3,18 (t; 6,5 Hz)	H15	H15
15	30,2	1,65 (qui; 6,5 Hz)	H14	H14, H16
16	38,0	3,18 (t; 6,5 Hz)	H15	H15
17	172,7	-	H18ab	-
18	39,6	a) 2,20 (dd; 7,5 e 14,0 Hz); b) 2,32 (dd; 7,5 e 14,0 Hz)	-	a) H18b, H19; b) H18a, H19
19	54,1	4,60 (b)	H18ab	H18ab, H20
20	31,5	1,52 (m)	H18ab	H19, H21
21	27,1	1,14 (m)	-	H20
22	30,7	1,26 (m)	H23	-
23	30,3	1,26 (m)	H22, H24	-
24	30,5	1,26 (m)	H23, H25	-
25	30,6	1,26 (m)	H24, H26	-
26	33,1	1,26 (m)	H25, H28	H28
27	23,8	1,28 (m)	H26, H28	H28
28	14,5	0,89 (t; 7,0 Hz)	H26	H26, H27
CO	173,4	-	Me, H15	-
Me	22,7	1,92 (s)	-	-

Figura 6.13 – Estrutura do composto *N*-acetil-rodriguesina A (**132**).

6.3.3. Determinação estrutural do composto *N*-acetil-rodriguesina B (**133**)

A elucidação estrutural do composto **133** foi realizada pela análise dos espectros de RMN- ^1H , RMN- ^{13}C , HSQC, HMBC e COSY ^1H - ^1H e por espectrometria de massas de alta resolução (V.2. **Figuras 6.14, 6.15, 6.16, 6.17, 6.18 e 6.19**, respectivamente), e indicou ser este o homólogo superior da *N*-acetil-rodriguesina A (**132**).

O espectro de massas de alta resolução do composto **133** (V.2. **Figura 6,19**) em modo spray de elétrons (HRESIMS) apresentou pico de íon pseudomolecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 515,3679 compatível com a fórmula $\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_4$, indicando um grupo metileno adicional com relação ao composto **132**. O cálculo do índice de deficiência de hidrogênios (IDH) forneceu nove graus de insaturações, o mesmo número de insaturações que o composto anteriormente citado (**132**).

A análise dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C possibilitou-nos concluir que o composto **133** difere de **132** apenas no número de carbonos presentes na cadeia alifática entre os dois grupos amida.

Dessa forma, a elucidação estrutural com a atribuição dos sinais de RMN foi realizada de maneira análoga aos compostos **130** e **131**.

As correlações observadas no espectro de HMBC e COSY estão ilustradas no **Esquema 6.10**.

Esquema 6.10 - Estrutura do composto *N*-acetil-rodriguesina B (**133**) com as respectivas correlações observadas no espectro do tipo HMBC e COSY.

Tabela 6.3 – Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C bem como as correlações observadas nos espectros COSY e HMBC do composto **133**.

N-acetil-rodriguesina B (133) (CD_3OD)				
Posição	$\delta^{13}\text{C}$ (100 MHz)	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz, integral) (400 MHz)	HMBC (8 Hz)	COSY
1	-	-	-	-
2	168,4	-	H3, H6ab, H7ab	-
3	58,2	4,22 (t; 4,5 Hz)	H7ab	H7ab
4	-	-	-	-
5	168,4	-	H3, H6ab, H7ab	-
6	46,3	a) 2,99 (d; 17,4 Hz); b) 3,50 (d; 17,4 Hz)	-	a) H6b; b) H6a
7	41,0	a) 3,01 (dd; 4,5 e 13,8 Hz); b) 3,16 (m)	H3, H9	a) H3; b) H3
8	136,8	-	H3, H7ab, H9, H10	-
9	131,4	7,20 (m)	H7ab, H10, H13	-
10	129,8	7,28 (m)	H9, H11, H12	-
11	128,5	7,24 (m)	H9, H13	-
12	129,8	7,28 (m)	H11, H13	-
13	131,4	7,20 (m)	H7ab, H9, H12	-
14	40,1	3,16 (m)	Me, H15, H15a	H15
15	27,8	1,50 (m)	H14, H15a, H16	H14
15a	27,8	1,50 (m)	H14, H15, H16	H16
16	40,1	3,16 (m)	H15a/H15	H15a
17	172,5	-	H16, H18ab	-
18	39,6	a) 2,18 (dd; 7,4 e 13,7 Hz); b) 2,32 (dd; 6,7 e 13,7 Hz)	-	a) H18b; b) H18a
19	54,1	4,57 (b)	H6b, H18ab	-
20	31,6	1,53 (m)	H18ab	-
21	27,1	1,14 (m)	H22	-
22	30,2	1,26 (m)	H21	-
23	30,4	1,26 (m)	H21	-
24	30,5	1,26 (m)	H23	-
25	30,6	1,26 (m)	H27	-
26	33,0	1,26 (m)	H27, H28	H28
27	23,7	1,28 (m)	H26, H28	H28
28	14,4	0,89 (t; 7,0 Hz)	H26	H26, H27
CO	174,0	-	Me	-
Me	22,6	1,91 (s)	-	-

Figura 6.14 – Estrutura do composto *N*-acetil-rodriguesina B (133).

6.4. Avaliação biológica da mistura das rodriguesinas A e B isoladas da ascídia *Didemnum* sp.

Como demonstrado na **Tabela 6.4**, a amostra contendo as rodriguesinas A (130) e B (131), apresentou potente atividade antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa* P1 resistente a antibióticos com valor de concentração inibitória mínima de 4,3 µg/mL. Os microrganismos i-p são patógenos do trato bucal. Os compostos 130 e 131 apresentaram moderada atividade contra o microrganismo *Streptococcus mutans* (Isolado clínico 2.M7/4) com valor de CIM de 31,25 µg/mL.

Tabela 6.4 – Resultado da avaliação biológica no teste de atividade antimicrobiana da mistura das rodriguesinas A (**130**) e B (**131**).

Microrganismos	CIM (µg/mL)
a) <i>S.aureus</i> ATCC 259223	22,6
b) <i>E.coli</i> ATCC 259222	45,6
c) <i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	22,6
d) ORSA 8	45,3
e) ORSA 108	91,0
f) <i>P.aeruginosa</i> 13	45,3
g) <i>P.aeruginosa</i> P1	4,3
h) <i>C.albicans</i> ATCC 10231 (levedura)	-
i) <i>Escherichia coli</i> NTCC861	125,0
j) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	62,5
k) <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC14506	125,0
l) <i>Streptococcus sanguinis</i> ATCC15300	125,0
m) <i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC27607	125,0
n) <i>Streptococcus mutans</i> UA159	62,5
o) <i>Streptococcus mutans</i> Isolado clínico 2.M7/4	31,25
p) <i>Candida albicans</i> ATCC36801(sorotipo A)	125,0

(-) sem atividade antimicrobiana

A mistura das rodriguesinas A (**130**) e B (**131**) também foi avaliada no teste de atividade antimicobacteriana contra *Micobacterium tuberculosis*, já que um dos dois extratos brutos da ascídia *Didemnum* sp. foi ativo nos testes preliminares. Porém, os compostos não apresentaram atividade biológica.

Devido a pouca massa obtida, os compostos *N*-acetil-rodriguesina A (**132**) e *N*-acetil-rodriguesina B (**133**) não puderam ser submetidos a ensaios biológicos.

Capítulo 7

Isolamento de policetídeos a partir do extrato bruto da esponja *Plakortis angulospiculatus*

7.1. Introdução

As esponjas (Filo Porifera) são animais bentônicos sésseis (fixos no substrato) e são os mais primitivos dos animais multicelulares. Possuem uma fisiologia bastante simples, não têm órgãos, mas têm tecido conjuntivo bem desenvolvido, no qual as células realizam várias funções. A arquitetura das esponjas é única, sendo construída ao redor de um sistema de canais de água – um arranjo correlacionado com a sessilidade das esponjas. A corrente de água entre os canais traz partículas orgânicas que são filtradas e digeridas. São geralmente sustentadas por um esqueleto mineral formado por espículas, que são estruturas de silício ou carbonato de cálcio cujo tamanho pode variar de poucos micrometros a centímetros. Apesar de sua morfologia simples e do seu baixo grau de organização, as esponjas apresentam uma enorme diversidade de formas e cores nas mais diferentes tonalidades (Ruppert e Barnes, 1996).

Exceto quanto à cerca de 150 espécies de água doce, as aproximadamente 7.000 espécies descritas de esponjas são marinhas (Hooper e Van Soest, 2002). Esponjas marinhas foram os primeiros invertebrados marinhos a fornecerem substâncias de interesse médico-farmacológico.

7.2. Produtos Naturais isolados de esponjas do gênero *Plakortis*

Esponjas do gênero *Plakortis* estão entre as esponjas mais estudadas do ambiente marinho. Já foram publicados mais de 80 trabalhos científicos sobre o estudo do extrato desses animais. E mesmo assim, ainda continuam sendo uma rica reserva de novos compostos, pois a cada ano são isolados mais metabólitos secundários estruturalmente inéditos e apresentando as mais diversas atividades biológicas.

O principal grupo de compostos isolados de esponjas do gênero *Plakortis* é constituído por policetídeos (Huang et al., 2004).

Os policetídeos constituem uma enorme classe de produtos naturais estruturalmente diversificados e de grande importância farmacológica. Estes compostos possuem um amplo espectro de atividades biológicas como, antifúngica, antibacteriana, antiparasítica, antitumoral, entre outras (Saleem et al., 2007).

Esta classe de metabólitos secundários é, em geral, produzida por vários microrganismos como bactérias e fungos, mas também podem ser encontradas em plantas e invertebrados marinhos. Em esponjas marinhas, bactérias simbióticas podem ser os reais produtores desses metabólitos. A produção de precursores de policetídeos por diferentes microrganismos em esponjas marinhas do gênero *Plakortis* poderia explicar a grande diversidade química encontrada nesse gênero de esponjas (Berrue et al., 2007).

Como exemplos de compostos isolados de esponjas do gênero *Plakortis* podemos citar a investigação química do extrato da esponja *Plakortis zyggompha* que resultou no isolamento dos ácidos espiculólicos (**134-140**), primeiramente obtidos da espécie *Plakortis angulospiculatus* (Huang, et al., 2004); os ácidos zigônficos (**141** e **142**), os quais apresentaram atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais e antimicobacteriana contra tuberculose (Berrue et al., 2005; 2007), e o plakortídeo Q (**143**) e seus derivados (**144-149**) que apresentaram atividade antitumoral (Berrue et al., 2005b).

Figura 7.1 – Estruturas dos ácidos espiculóicos (134-140) e dos ácidos zigôníficos (141 e 142).

Figura 7.2 – Estruturas dos o plakortídeo Q (143) e seus derivados (144-149).

Esponjas do gênero *Plakortis* são também fonte de compostos estruturalmente diferentes. Tal é o caso do estudo químico da esponja *Plakortis quasiamphiaster*, a partir da qual foram obtidas as anfiasterinas (**150-152**), totalizando 17 compostos pertencentes a uma classe de metabólitos secundários de origem marinha sem precedência na literatura (Zampella et al., 2001) e também, alcalóides pirrolacridínicos como a plakinidina E (**153**) (Ralifo et al., 2007).

Figura 7.3 – Substâncias obtidas a partir do extrato da esponja *Plakortis quasiamphiaster*.

Do estudo químico de extratos de esponjas da espécie *Plakortis nigra* foram isolados agentes antineoplásticos: as plakorestatinas 1 e 2 que diferem entre si por terem a configuração oposta no anel epóxido (**154** e **155**) (Pettit et al., 2004); as plakortaminas A-D (**156-159**); os ácidos epiplakínicos (G e H) (**160-161**) e uma lactona (**162**) (Sandler et al., 2002).

Figura 7.4 – Compostos isolados do extrato da esponja *Plakortis nigra*.

Da espécie *Plakortis simplex*, além de policetídeos contendo peróxido cíclico em suas estruturas, também foram encontrados policetídeos de cadeia aberta como as substâncias **163** e **164** (Campagnuolo et al., 2005). Já de uma esponja do gênero *Plakortis* coletada no Havaí, foram isoladas as lehualidas A-D (**165-168**), sendo que a lehualida B apresentou atividade citotóxica contra linhagem de células cancerígenas do

ovário e a lehualida D foi ativa contra linhagens de células cancerígenas ovarianas e leucêmicas (Sata et al., 2005).

Figura 7.5 – Exemplos de compostos isolados de esponjas do gênero *Plakortis*.

Alguns exemplos de compostos isolados da espécie *Plakortis halichondrioides* são as plakortonas A e B (169-170), lactonas bicíclicas que demonstraram ser ativadoras da bomba enzimática cardíaca SR- Ca^{2+} ATPase, podendo ser objeto de estudo para promissores medicamentos no tratamento de doenças cardíacas (Patil et al., 1996). Também foram isolados desta mesma espécie dois novos ácidos dihidroxi-

α,β -insaturados (**171-172**) os quais apresentaram atividade citotóxica contra linhagens de células leucêmicas P-388 (Rudi e Kashman, 1993).

Figura 7.6 – Exemplos de compostos isolados de esponjas da espécie *Plakortis halichondrioides*.

A plakoridina A (**173**), um alcalóide pirrolidínico obtido do fracionamento de uma esponja marinha do gênero *Plakortis* (*Plakortis* sp.) coletada em Okinawa - Japão, também apresentou atividade citotóxica contra células tumorais (Takeuchi et al., 1994). O grupo dos Profs. Takeuchi e Kobayashi, já havia estudado extratos de esponjas do gênero *Plakortis*, tendo isolado as manzamenonas A-H (**174-181**), tratando-se de derivados de ácidos graxos possuindo um esqueleto biciclíco [4,3,0] nonano, com exceção da manzamenona G (**180**) que possui um esqueleto biciclíco [4,4,0] decano. A manzamenona A (**174**) mostrou atividade contra linhagens de células tumorais L1210 (leucemia) e KB (carcinoma) (Tsukamoto et al., 1992; Kobayashi et al., 1993).

Figura 7.7 – Exemplos de compostos isolados de esponjas do gênero *Plakortis*.

Esses são apenas alguns dos metabólitos secundários obtidos de extratos de esponjas do gênero *Plakortis*; muitos outros compostos foram isolados apresentando as mais variadas atividades biológicas como antimalárica (Fattorusso et al., 2006; Campagnuolo et al., 2005; Hu, et al., 2001; Gochfeld e Hamann, 2001), antileishmaniose (Chi Won et al., 2006; Compagnone et al., 1998), citotóxica (Sata et al., 2005; Gochfeld e Hamann, 2001; Pettit et al., 2004; Sandler et al., 2002; Berrue et al., 2005; 2007); antifúngica (Chen et al., 2002), anti-histamínica (Borrelli et al., 2004), dentre outras.

7.3. Estudo químico do extrato bruto da esponja *Plakortis angulospiculatus* – Procedimento Experimental

A esponja *Plakortis angulospiculatus* (134,0 g) foi coletada na Baía de Todos os Santos, Salvador-BA em 1999. Imediatamente após a coleta, o animal foi congelado e preservado a -20° C. Um espécimen voucher foi depositado na coleção de esponjas do Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Uma alíquota do extrato bruto desta esponja apresentou atividade antimicrobiana moderada e potente atividade citotóxica.

O estudo químico do extrato da esponja *Plakortis angulospiculatus* foi realizado de acordo com o procedimento sumarizado nos **Esquemas 7.1, 7.2, e 7.3.**

Esquema 7.1. Fluxograma do estudo químico (extração e partição) do extrato da esponja *Plakortis angulospiculatus*.

Esquema 7.2. Fluxograma do fracionamento do extrato AcOEt da esponja *Plakortis angulospiculatus*.

Esquema 7.3. Fluxograma do fracionamento do extrato de éter de petróleo da esponja *Plakortis angulospiculatus*.

^aCondições: coluna de sílica-gel derivatizada com grupos fenila, (Phenomenex®, Prodigy 5 µm, Phenyl-3, 100 Å, 4,6 x 250 mm); eluentes: *n*-hexano/AcOEt 95:5, fluxo de 1 mL/minuto, $\lambda_{\text{máx}}$ = 275 nm.

^{a'}Condições: coluna de sílica-gel (Waters® µ-porasil Bondapak™ 125 Å/10 µm - 7,8 x 300 mm); eluentes: *n*-hexano/*i*-PrOH 98:2, fluxo de 1 mL/minuto, $\lambda_{\text{máx}}$ = 220 nm.

^bCondições: coluna de sílica-gel (Waters® Nova Pak™, 6 µm – 19,0 x 300 mm); eluentes: *n*-hexano/AcOEt 9:1, fluxo de 1 mL/minuto, $\lambda_{\text{máx}}$ = 260 nm.

^cCondições: coluna de sílica-gel (Waters® Nova Pak™, 6 µm – 19,0 x 300 mm); eluentes: *n*-hexano/AcOEt 9:1, fluxo de 1 mL/minuto, $\lambda_{\text{máx}}$ = 320 nm.

^dCondições: coluna de sílica-gel (Waters® Nova Pak™, 6 µm – 19,0 x 300 mm); eluentes: *n*-hexano/AcOEt 85:15, fluxo de 1 mL/minuto, $\lambda_{\text{máx}}$ = 310 nm.

Primeiramente o animal foi liofilizado e extraído exaustivamente com MeOH, filtrado a vácuo, utilizando-se uma camada de celite em funil de Büchner, e concentrado. O extrato bruto concentrado foi ressuspenso em água (500 mL) e submetido a uma partição líquido-líquido com éter de petróleo (500 mL, procedimento repetido por três vezes) resultando em duas frações, MeOH-H₂O e éter de petróleo. A fração MeOH-H₂O foi evaporada até remoção completa do MeOH, e a suspensão aquosa obtida foi submetida a uma partição com AcOEt (500 mL, procedimento repetido por três vezes) obtendo-se duas frações: a fração AcOEt e a fração aquosa. Os extratos foram concentrados, pesados e avaliados por CCD (reveladores: lâmpada de UV em 254 nm e ácido fosfomolibdico).

7.3.1 - Estudo do extrato AcOEt da esponja *Plakortis angulospiculatus*

O extrato de AcOEt (PaAE) foi submetido a uma separação por cromatografia em fase normal com uma coluna pré-empacotada de sílica-gel (Waters® Sep Pak® 10 g) utilizando-se gradiente de MeOH em CH₂Cl₂, resultando em 8 sub-frações. Estas foram analisadas por CCD e por RMN-¹H, sendo selecionada para continuidade do estudo a fração PaAE-1.

A fração PaAE-1 (260,0 mg) foi submetida a uma separação por cromatografia em fase normal com uma coluna pré-empacotada de sílica-gel (Waters® Sep Pak® 5 g) utilizando-se um gradiente de CH₂Cl₂ em *n*-hexano, resultando em 6 sub-frações. Após análise por RMN -¹H e CCD (revelador lâmpada de UV em 254 nm e ácido fosfomolibdico) a fração PaAE-1-2 (39,0 mg) foi selecionada para purificação por CLAE-UV no modo fase normal, utilizando-se uma coluna de sílica-gel (Waters® µ-

porasil Bondapak™ 125 Å/10 µm - 7,8 x 300 mm). A eluição isocrática foi realizada com *n*-hexano/*i*-PrOH (9:1), fluxo de 1 mL/minuto e monitorando-se a separação em $\lambda_{\text{máx}} = 212$ nm, resultando no isolamento do composto **PaAE-1-2A** como demonstrado no **Esquema 7.2**.

A substância PaAE-1-2A (*m* = 4,3 mg, 0,003%) foi identificada como sendo plakortina (4,8-dietil-6-metil-3,6-peroxi-9-dodecanoato de metila) (**182**) (Higgs e Faulkner, 1978).

7.3.2 - Estudo do extrato hexânico da esponja *Plakortis angulospiculatus*

O extrato de éter de petróleo (PaE) foi submetido a uma separação por cromatografia em fase normal com uma coluna pré-empacotada de sílica-gel (Waters® Sep Pak® 10 g) utilizando-se um gradiente de CH₂Cl₂ em *n*-hexano, resultando em 5 sub-frações. Estas foram analisadas por RMN-¹H sendo selecionada a fração PaE-2 para continuidade do seu estudo.

A fração PaE-2 (1,36 g) foi submetida a uma cromatografia em fase normal com uma coluna pré-empacotada de sílica-gel (Waters® Sep Pak® 10 g) utilizando-se gradiente de CH₂Cl₂ em *n*-hexano, resultando em 7 sub-frações. Destas, após análise por RMN-¹H, as frações PaE-2-3, PaE-2-4, PaE-2-5 e PaE-2-6 foram purificadas por CLAE-UV. A fração PaE-2-3 (192,0 mg) foi purificada utilizando-se uma coluna de sílica-gel derivatizada com grupos fenila, (Phenomenex®, Prodigy 5 µm, Phenyl-3, 100 Å, 4,6 x 250 mm) com eluição isocrática de *n*-hexano/AcOEt 95:5, fluxo de 1 mL/minuto, e monitorando-se a separação em $\lambda_{\text{máx}} = 275$ nm. A fração PaE-2-3P4 (34,7 mg), resultante dessa última cromatografia foi purificada por CLAE-UV com uma coluna de sílica-gel (Waters® µ-porasil Bondapak™ 125 Å/10 µm - 7,8 x 300 mm); com eluição isocrática de *n*-hexano/*i*-PrOH 98:2, fluxo de 1 mL/minuto, em $\lambda_{\text{máx}} = 220$ nm. Esta purificação resultou no isolamento do composto inédito **PaE-2-3P4C** (*m* = 2,0 mg, 0,0015%), o qual denominamos de plakortenona (**183**).

As frações PaE-2-4 e PaE-2-5 foram purificadas por CLAE-UV utilizando-se uma coluna de sílica-gel (Waters® Nova Pak™, 6 µm – 19,0 x 300 mm). A eluição isocrática

foi realizada com *n*-hexano/AcOEt (9:1), fluxo de 1 mL/minuto e monitorando-se a separação em $\lambda_{\text{máx}}$ = 260 e 320, respectivamente.

Por fim, a fração PaE-2-6 foi purificada por CLAE-UV utilizando-se uma coluna de sílica-gel (Waters® Nova Pak™, 6 μm – 19,0 x 300 mm). A eluição isocrática foi realizada com *n*-hexano/AcOEt (95:15), fluxo de 1 mL/minuto e monitorando-se a separação em $\lambda_{\text{máx}}$ = 310 nm.

Destas purificações foram obtidos 7 compostos com bom grau de pureza o qual tiveram suas estruturas determinadas. Após análise por RMN pudemos perceber que se tratavam apenas de 4 compostos distintos, pois 3 compostos foram isolados de duas frações diferentes, como demonstrado no **Esquema 7.3**

Os compostos isolados foram identificados como sendo:

- **PaE-2-6-P4**, (m= 26,0 mg, 0,019%), como sendo o plakortídeo P (**184**) (del Sol Jiménez et al., 2003).
- **PaE-2-4-P6** e **PaE-2-5-P-3**, (m= 122,0 mg, 0,09%), como sendo 3,6-epóxi-4,6,8-trietil-2, 4, 9-dodecatrienoato de metila (**185**) (Stierle e Faulkner, 1980).
- **PaE-2-4-P-7** e **PaE-2-5-P-4**, (m= 21,0 mg, 0,016%), como sendo a espongosoritina A (**186**) (Hoye et al., 2003, Capon et al., 2005 e Epifânio et al., 2005)
- **PaE-2-4-P5** e **PaE-2-5-P2**, (m= 30,0 mg, 0,022%), como o sendo 3,6-epóxi-4,6,8-trietil-2,4-dodecadienoato de metila (**187**) (Compagnone et al., 1998).

7.4. Resultados e Discussão

A esponja *Plakortis angulospiculatus* (**Figura 7.8**) foi descrita pela primeira vez por Carter (1879) e sua classificação taxonômica é apresentada na **Figura 7.9**.

Plakortis angulospiculatus é a mais comum e amplamente distribuída espécie de *Plakortis* no oeste do Atlântico. Apresentam-se nas mais variadas cores e tamanhos.

Figura 7.8 - Foto da esponja *Plakortis angulospiculatus* (Hadju, E.).

Filo: Porifera
Classe: Demospongiae
Ordem: Homosclerophorida
Família: Plakinidae
Gênero: *Plakortis*
Espécie: *Plakortis angulospiculatus*.

Figura 7.9 - Taxonomia da esponja *Plakortis angulospiculatus*.

Uma alíquota do extrato bruto da esponja *Plakortis angulospiculatus* apresentou atividade antimicrobiana moderada e potente atividade citotóxica.

O fracionamento do extrato desse animal resultou no isolamento de seis policetídeos, sendo um inédito e cinco conhecidos: PAE- 2-3P4C (**183**) o qual foi denominado de plakortenona; PaAE-1-2A (**182**) (plakortina ou 4,8-dietil-6-metil-3,6-peroxi-9-dodecanoato de metila); PaE-2-6-P4 (**184**) (plakortídeo P ou ácido 3,6 – epidioxi - 4,6,8,10-tetraetiltetradeca-7,11-dienóico); PaE-2-5-P3 e PaE-2-4-P6 (**185**) (3,6-epóxi- 4,6,8-trietil-2,4,9-dodecatrienoato de metila); PaE-2-4-P7 e PaE-2-5-P4 (**186**) (espongosoritina A) e PaE-2-5-P2 e PaE-2-4-P5 (**187**) (3,6-epóxi-4,6,8-trietil-2,4,-dodecadienoato de metila).

7.4.1. Determinação estrutural do composto inédito presente na fração PaE-23P4C (183) – plakortenona

A elucidação estrutural da plakortenona (**183**), um policetídeo contendo uma cetona α,β -insaturada e um peróxido cíclico em sua estrutura, foi realizada pela análise dos espectros de RMN- ^1H , RMN- ^{13}C – BBD e DEPT 135°, HSQC, HMBC e COSY ^1H - ^1H , rotação óptica, ultravioleta e espectrometria de massas. A configuração relativa foi estabelecida pela análise do espectro obtido com o experimento de RMN- ^1H de desacoplamento seletivo e também pela análise do espectro NOESY.

Isolada como um sólido vítreo incolor, a fração PaE-23P4C (**183**) demonstrou ser opticamente ativa com $[\alpha]_{\text{D}} = +45,5$ ($c = 0,2$ em MeOH).

O espectro de massas de alta resolução da plakortenona (**183**) (V.2 Figura 7.8) em modo spray de elétrons (HRESIMS) apresentou pico de íon pseudomolecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 327,2177 (calculado: 327,2166) e $[\text{M}+\text{Na}]^+$ em m/z 349,1986 (calculado: 349,1990), compatível com as fórmulas $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_5$ e $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_5\text{Na}$, respectivamente, a qual apresenta quatro insaturações.

A análise dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C indicou a natureza de três dos cinco oxigênios presentes na fórmula: dois oxigênios do éster metílico (δ 172,0 (C=O) e δ 51,8 (^1H em δ 3,68, $-\text{OCH}_3$) e um oxigênio de uma cetona (δ 198,7).

Em princípio, pudemos deduzir que os outros dois oxigênios seriam de um peróxido cíclico, já que este é bastante comum em policetídeos isolados de esponjas do gênero *Plakortis*. Tal suposição foi posteriormente confirmada.

A presença de um grupo metil enona conjugada na estrutura deste composto foi evidenciada com base no espectro de absorção no UV (V.2. Figura 7.8) em $\lambda_{\text{máx}}$ 225 nm (ϵ 8300) e também através da análise dos sinais no espectro de RMN de ^{13}C com valores de deslocamentos químicos em δ 26,8 (C-12), 198,7 (C-11), 130,7 (C-10) e 152,8 (C-9).

Com isso, estabelecemos as quatro insaturações encontradas pelo cálculo de IDH: uma da carbonila do éster metílico, duas da carbonila de cetona α,β -insaturada e uma do peróxido cíclico. Sendo assim, o composto deve possuir um sistema cíclico.

O espectro de RMN- ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) (**V.2. Figura 7.1a**) indicou a presença de uma olefina dissustituída [δ 6,55 (dd, J = 15,8 e 9,5 Hz, 1H) e δ 6,02 (d, J = 15,8 Hz, 1H)] e de um éster metílico em δ 3,70 (s, 3H). Também foram observados sinais referentes a quatro metilas em δ 0,84 (t, J = 7,4 Hz, 3H), 0,89 (t, J = 7,4 Hz, 3H), 1,37 (s, 3H) e 2,27 (s, 3H),

O espectro de RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) (**V.2. Figura 7.2**) apresentou um sinal referente a uma carbonila de cetona α,β -insaturada em δ 198,7 (C-11), uma carbonila de éster em δ 172,0, um sinal de metoxila em δ 51,8 (C-18), dois sinais de carbonos ligados a oxigênio em δ 78,9 (C-3) e 80,7 (C-6) e dois sinais em δ 152,8 (C-9) e 130,7 (C-10) referentes a uma olefina dissustituída.

O mapa de correlações ^1H - ^1H do experimento COSY (**V.2. Figura 7.5**) mostrou correlações de um sistema de spin que inclui o grupo metileno em δ 1,63 (CH_2 -7), o grupo metino em δ 2,32 (CH -8), o grupo metino em δ 6,55 (CH -9) e o grupo metino em δ 6,02 (CH -10).

Adicionalmente, o espectro COSY mostrou correlações entre o grupo metino em δ 2,32 (CH -8) e o grupo metileno em δ 1,32 e 1,51 (CH_2 -13), o qual por sua vez mostrou estar ligado ao grupo metila em δ 0,84 (CH_3 -14). Também foram observadas correlações entre o grupo metila em δ 0,89 (CH_3 -17) com o sinal do grupo metileno em δ 1,17 e 1,23 (CH_2 -16); entre o grupo metileno em δ 1,32 e 1,51 (CH_2 -13) com os sinais do grupo metila em δ 0,84 (CH_3 -14) e o grupo metino em δ 2,32 (CH -8) indicando a conexão do grupo etila com o C-8. O hidrogênio do grupo metino em δ 4,50 (CH -3) mostrou acoplamento com os hidrogênios do grupo metileno em δ 2,32 e 2,87 (CH_2 -2) com o hidrogênio do grupo metino em δ 2,20 (CH -4) indicando a ligação da cadeia contendo o grupo éster metílico com o peróxido cíclico.

Também foram observadas correlações que indicam o acoplamento geminal entre os hidrogênios: H-2a e H-2b (δ 2,32 e 2,87); H-5a e H-5b (δ 1,35 e 1,40); H-13a e H-13b (δ 1,32 e 1,51) e entre os hidrogênios H-16a e H-16b (δ 1,17 e 1,23). As principais correlações observadas no espectro de RMN do tipo COSY estão ilustradas no **Esquema 7.4**.

A análise do espectro de HMBC (**V.2. Figura 7.4**) indicou correlações à longa distância de C-1 (δ 172,0) com H-18 (δ 3,70), H-2a (δ 2,32) e H-2b (δ 2,87); de C-2 com

H-3 (δ 4,50) estabelecendo ligação da cadeia lateral do éster metílico com o peróxido cíclico.

Foram observadas correlações de C-3 (δ 78,9) com H-2a (δ 2,32), H-2b (δ 2,87), H-5b (δ 1,40) e H-16a (δ 1,17) e de C-4 (δ 34,8) com H-3 (δ 4,50), H-5a (δ 1,35), H-5b (δ 1,40), H-16a (δ 1,17), H-16b (δ 1,23) e H-17 (δ 0,89) indicando a conexão de um grupo etila com o endoperóxido.

Com a correlação do sinal atribuído à C-6 (δ 80,7) com H-5a (δ 1,35), H-7 (δ 1,63) e H-15 (δ 1,37), pudemos estabelecer a conexão do grupo metila do C-15 (δ 22,1) e da cadeia lateral contendo a cetona α,β -insaturada com o carbono quaternário C-6 do peróxido cíclico. O C-8 (δ 39,9) mostrou estar correlacionado com H-7 (δ 1,63), H-9 (δ 6,55), H-10 (δ 6,02), H-13a (δ 1,32), H-13b (δ 1,51) e H-14 (δ 0,84). O C-11 (δ 198,7) referente ao carbono da cetona α,β -insaturada mostrou correlações com H-9 (δ 6,55), H-10 (δ 6,02) e H-12 (δ 2,27). A correlação observada entre C-14 (δ 11,4) e H-13a (δ 1,32), H-13b (δ 1,51) indica a presença do outro grupo etila na cadeia lateral.

As principais correlações observadas no espectro de HMBC estão ilustradas no **Esquema 7.5**.

A estereoquímica da ligação dupla da enona conjugada foi determinada como sendo *E* já que a constante de acoplamento $^3J_{H-9/H-10}$ mostrou ser de 15,8 Hz.

Desta forma, foi possível estabelecer a estrutura planar do composto presente na fração **PaE-23P4C**, o qual denominamos de plakortenona (**183**).

Figura 7.10 - Estrutura da plakortenona (**183**) com a atribuição dos respectivos valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e de ^{13}C .

Esquema 7.4. - Estrutura planar da plakortenona (**183**) com as respectivas correlações observadas no espectro de RMN do tipo COSY.

Esquema 7.5. - Estrutura planar da plakortenona (**183**) com as respectivas correlações observadas no espectro de RMN do tipo HMBC.

Tabela 7.1 – Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C bem como as correlações observadas nos espectros COSY e HMBC do composto PaE-2-3P4C (**183**) – plakortenona.

PaE-2-3P4C (CDCl_3)				
	$\delta^{13}\text{C}$ (HMQC)	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz, integral) (400 MHz)	COSY	HMBC
1	172,0	-	-	H18, H2a, H2b
2	31,5	a) 2,32 (dd, 15,8 e 3,4 Hz, 1H); b) 2,87 (dd, 15,8 e 9,7 Hz, 1H),	a) H2b, H3 b) H2a, H3, H4	H3
3	78,9	4,50 (m, 1H)	H2a, H2b, H4	H2a, H2b, H5b, H16a
4	34,8	2,20 (m, 1H)	H5a, H5b, H3	H5a, H5b, H16a, H16b, H3, H17
5	34,7	a) 1,35 (m, 1H); b) 1,40 (m, 1H)	a) H4, H5b b) H4, H5a	H15, H7, H16a, H16b
6	80,7	-	-	H7, H15, H5a
7	46,0	1,63 (m, 2H)	H8	H15, H13a, H13b
8	39,9	2,32 (m, 1H)	H7, H13a, H13b, H9	H7, H9, H10, H13a, H13b, H14
9	152,8	6,55 (dd, 15,8 e 9,5 Hz, 1H)	H8, H10	H7, H8
10	130,7	6,02 (d, 15,8 Hz, 1H)	H9, H12	H12
11	198,7	-	-	H9, H10, H12
12	26,7	2,27 (s, 3H)	H10	H10
13	29,0	a) 1,32 (m, 1H); b) 1,51 (m, 1H)	a) H14, H13b, H8 b) H14, H13a, H8	H14, H7
14	11,4	0,84 (t, 7,4 Hz, 3H)	H13a, H13b	H13a, H13b
15	22,1	1,37 (s, 3H)	-	H7
16	25,0	a) 1,17 (m, 1H); b) 1,23 (m, 1H)	a) H17, H16b b) H17, H16a	H3, H4, H5a, H17
17	11,0	0,89 (t, 7,4 Hz, 3H)	H16a, H16b	H16a, H16b
18	51,8	3,70 (s, 3H)	-	-

Com o objetivo de se estabelecer a estereoquímica relativa da plakortenona (**183**), realizou-se um experimento de ressonância magnética nuclear de ^1H de desacoplamento seletivo (**V.2. Figura 7.7**).

Pelo fato de observarmos sobreposição dos sinais de ^1H entre δ 2,0 e 2,5, a amostra foi dissolvida em $\text{MeOH-}d_4$ para obtenção de seu espectro de RMN- ^1H neste solvente. Verificamos menor sobreposição dos sinais da plakortenona de ^1H em $\text{MeOH-}d_4$, (**V.2. Figura 7.1b**) e, os experimentos de desacoplamento seletivo foram realizados neste solvente.

A irradiação do sinal em δ 2,32 (H-2a e H-8) simplificou os sinais de H-2b em δ 2,87 de um duplo dubleto ($J = 10,2$ e $15,6$ Hz) para um duplo dubleto ($J = 3,8$ Hz “W” e $10,2$ Hz); de H-3 em δ 4,50 de um multipeto para um duplo dubleto ($4,4$ e $10,2$ Hz), e; de H-9 em δ 6,67 de um duplo dubleto para um dubleto (16 Hz). Assim verificamos que a constante de acoplamento de $^3J_{\text{H-3/H-4}}$ é $4,4$ Hz, em concordância com um acoplamento equatorial/axial, compatível com a configuração relativa ($3R^*$, $4R^*$, $6S^*$), mas não com ($3S^*$, $4R^*$, $6S^*$) (**Figura 7.11**).

Figura 7.11 – Experimento de desacoplamento seletivo com irradiação em δ 2,32 (H-2a) o qual simplificou o sinal de H-3.

Análise das duas conformações do peróxido cíclico para ($3R^*$, $4R^*$, $6S^*$) – plakortenonas (**Figura 7.12 A e B**) indicou que a conformação **A** é menos sujeita a interações estéricas entre os substituintes do peróxido cíclico do que a conformação da plakortenona **B**.

Figura 7.12 – Conformações para ($3R^*$, $4R^*$, $6S^*$) plakortena (**183**) – (A e B) e conformações da ($3S^*$, $4R^*$, $6S^*$) plakortena (**183**) – (C e D), bem como as respectivas correlações observadas no espectro NOESY para a plakortena (**183**).

Finalmente, a análise do espectro de NOESY (V.2, **Figura 7.6**) mostrou acoplamentos dipolares entre o grupo metila em δ 1,37 (CH_3 -15) e o hidrogênio do grupo metino em δ 2,20 (CH -4), e também entre ambos os prótons do grupo metilênico em δ 2,87 e 2,32 (CH_2 -2) e o próton em δ 1,31 de CH_2 -5 (**Figura 7.12**).

Estes acoplamentos dipolares confirmaram a estereoquímica relativa ($3R^*$, $4R^*$, $6S^*$) para a plakortena. A estereoquímica relativa de C-8 não pôde ser estabelecida sem ambigüidades.

A estereoquímica relativa da plakortena também pôde ser confirmada através da comparação com dados de RMN de ^{13}C (**Tabela 7.2**) encontrados na literatura dos estereoisômeros da plakortina (**182**), composto que difere da plakortena apenas pela ausência do grupo cetona no C-11.

Tabela 7.2 – Valores de comparação de deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C da plakortenona (**183**) com dados dos estereoisômeros da plakortina (**182**) encontrados na literatura.

	plakortenona (183) (CDCl ₃) (3 <i>R</i> *, 4 <i>R</i> *, 6 <i>S</i> *)	plakortina (Literatura)* (CDCl ₃) (3 <i>R</i> *, 4 <i>R</i> *, 6 <i>S</i> *)	3-<i>epi</i>-plakortina (Literatura)** (CDCl ₃) (3 <i>S</i> *, 4 <i>R</i> *, 6 <i>S</i> *)	3-<i>epi</i>-plakortina (Literatura)*** (CDCl ₃) (3 <i>S</i> *, 4 <i>R</i> *, 6 <i>S</i> *)
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	172,0	171,9	170,7	171.0
2	31,5	31,4	36,9	36.9
3	78,9	78,8	81,5	81.8
4	34,8	34,9	36,6	36.6
5	34,7	36,0	40,1	39.3
6	80,7	81,0	82,4	82.5
7	46,0	46,5	46,6	46.8
8	39,9	40,2	40,4	40.4
9	152,8	134,4	135,0	134.9
10	130,7	131,5	131,6	131.6
11	198,7	29,5	25,9	25.8
12	26,7	13,9	14,1	14.0
13	29,0	29,9	30,0	29.8
14	11,4	11,5	11,7	11.7
15	22,1	21,3	21,1	21.3
16	25,0	25,2	24,4	24.0
17	11,0	11,0	10,6	10.6
18	51,8	51,5	51,3	51.5

* Higgs e Faulkner, 1978; **Stierle e Faulkner, 1980 e *** Campagnuolo et al., 2005.

Figura 7.13 - Estrutura da plakortena (183).

7.4.2. Determinação estrutural do composto PaAE-1-2A (182) (plakortina ou 4,8-dietil-6-metil-3,6-peroxi-9-dodecanoato de metila)

A completa elucidação estrutural do composto PaAE-1-2A (182), foi realizada pela análise dos seus dados espectroscópicos (RMN- ^1H , RMN- ^{13}C , HMQC, HMBC e COSY ^1H - ^1H), infravermelho e espectrometria de massas, bem como por comparação com dados existentes na literatura.

Após análise dos dados espectroscópicos obtidos verificamos que o composto PaAE-1-2A (182), difere da plakortena (183) apenas pela ausência do grupo cetona em C-11, apresentando somente a dupla ligação entre os carbonos C-9 e C-10. Devido à semelhança estrutural desses dois compostos, a elucidação estrutural de PaAE-1-2A (182) com a atribuição dos sinais será discutida de forma sucinta.

A substância PaAE-1-2A (182) foi obtida como um óleo levemente amarelo, opticamente ativo com $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +62$ ($c = 0,20$, MeOH) e $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +141$ ($c = 1,0$; CHCl_3).

O espectro de massas do composto PaAE-1-2A (182) (V.2 Figura 7.14) em modo spray de elétrons (LRESIMS) apresentou picos de íons adutos cationizados com potássio, sódio e lítio, respectivamente, $[\text{M} + \text{K}]^+$ em m/z 351,2; $[\text{M} + \text{Na}]^+$ em m/z 335,2 e $[\text{M} + \text{Li}]^+$ em m/z 319,2.

Em seu espectro de absorção no infravermelho (V.2 Figura 7.15) (filme em disco de silício) pôde-se verificar a presença de uma carbonila com uma banda em 1738 cm^{-1} .

O espectro de RMN- ^1H (C_6D_6 , 500 MHz) (**V.2 Figura 7.9**) indicou a presença de uma olefina *E*-dissubstituída [δ 5,30 (dt, J = 15,2 e 6,3 Hz, 1H) e δ 5,09 (dd, J = 15,2 e 9,1 Hz, 1H)] e de um éster metílico em δ 3,36 (s, 3H). Também foram observados sinais referentes a quatro metilas em δ 1,38 (s, 3H); 0,66 (t, J = 7,1 Hz, 3H); 0,83 (t, J = 7,1 Hz, 3H) e 0,95 (t, J = 7,1 Hz, 3H).

O espectro de RMN- ^{13}C (C_6D_6 , 125 MHz) (**V.2 Figura 7.10**) da substância PaAE-1-2A (**182**) apresentou um sinal referente a uma carbonila em δ 171,8 (C-1), um sinal de metoxila em δ 51,2 (C-18), dois sinais de carbonos ligados a oxigênio em δ 79,0 (C-3) e 80,9 (C-6) e dois sinais em δ 134,9 (C-9) e 131,7 (C-10) referentes a uma olefina dissubstituída.

As atribuições dos deslocamentos químicos para a substância PaAE-1-2A (**182**) foram realizadas pela análise do mapa de correlações HMQC (**V.2 Figura 7.11**), HMBC (**V.2 Figura 7.12**) e COSY (**V.2 Figura 7.13**). Nos **Esquemas 7.6** e **7.7** estão ilustradas as correlações observadas nos espectros COSY e HMBC, respectivamente.

Dessa forma, foi possível estabelecer a estrutura planar do composto PaAE-1-2A (**182**). Uma busca na literatura indicou a substância PaAE-1-2A (**182**) como sendo a plakortina – (4,8-dietil-6-metil-3,6-peroxi-9-dodecanoato de metila) - o primeiro de uma série de policetídeos isolados de esponjas do gênero *Plakortis*, contendo peróxido cíclico em suas estruturas (Higgs e Faulkner, 1978).

Figura 7.14 – Estrutura da plakortina (**182**) – (4,8-dietil-6-metil-3,6-peroxi-9-dodecanoato de metila).

Esquema 7.6 - Estrutura da PaAE-1-2A- plakortina (**182**) com as respectivas correlações observadas no espectro de RMN do tipo COSY.

Esquema 7.7 - Estrutura da PaAE-1-2A- plakortina (**182**) com as respectivas correlações observadas no espectro HMBC.

Tabela 7.3 – Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C bem como as correlações observadas nos espectros COSY e HMBC do composto PaAE-1-2A–plakortina (**182**).

PaAE-1-2A - plakortina (C_6D_6)				
Posição	$\delta^{13}\text{C}$ (HMQC)	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz, integral) (500 MHz)	COSY	HMBC
1	171,8	-	-	H2ab, H3, H18.
2	31,8	a) 2,23 (dd, 15,5 e 3,9 Hz, 1H); b) 3,12 (dd, 15,5 e 8,0 1H)	a) H2b, H3 b) H2a, H3	H3, H4
3	79,0	4,61 (m, 1H)	H2ab, H4	H2ab, H4, H5, H16ab
4	35,1	1,91 (m, 1H)	H5ab, H3, H16	H3, H5ab, H16b, H17
5	36,5	a) 1,06 (t, 14,3 Hz, 1H); b) 1,28 (dd, 14,3 e 4,8 Hz, 1H)	a) H5b b) H4, H5a	H3, H7ab, H15, H16a
6	80,9	-	-	H7ab, H5ab, H8, H15
7	46,9	a) 1,36 (m, 1H); b) 1,44 (dd, 14,3 e 4,8 Hz, 1H)	a) H7b, H8 b) H7a, H8	H5, H8, H15
8	40,4	2,03 (m, 1H)	H7ab, H13ab, H9	H7ab, H9, H10, H13ab
9	134,9	5,09 (dd, 15,2 e 9,1 Hz, 1H)	H8, H11	H7ab, H8, H11, H13
10	131,7	5,30 (dt, 15,2 e 6,3 Hz, 1H)	H9, H11	H11, H12
11	25,9	1,98 (m, 2H)	H12, H10	H9, H10, H12
12	14,1	0,95 (t, 7,1 Hz, 3H)	H11	H10, H11
13	30,1	a) 1,15 (m, 1H), b) 1,36 (m, 1H)	a) H14, H13b, H8 b) H14, H13a, H8	H7ab, H8, H14
14	11,7	0,83 (t, 7,1 Hz, 3H)	H13ab	H13ab, H8
15	21,4	1,38 (s, 3H)	-	H5ab, H7ab
16	25,2	a) 0,75 (m, 1H); b) 0,88 (m, 1H)	a) H17 b) H17, H4	H4, H5a, H17
17	11,0	0,66 (t, 7,1 Hz, 3H)	H16ab	H16ab
18	51,2	3,36 (s, 3H)	-	-

Após a determinação estrutural do composto PaAE-1-2A – plakortina (**182**), foi possível construir a **Tabela 7.4** comparando os valores dos deslocamentos de ^1H e ^{13}C do composto isolado com dados do mesmo composto encontrado na literatura.

Tabela 7.4 – Valores de comparação de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C da substância PaAE-1-2A – plakortina (**182**) com dados encontrados na literatura.

Posição	PaAE-1-2A – plakortina (182) (C_6D_6)		plakortina (Literatura)* (CDCl_3)	
	$\delta^{13}\text{C}$ (HMQC)	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz, integral)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz, integral)
1	171,8	-	171,9	
2	31,8	2,23 (dd, 15,5 e 3,9 Hz, 1H); 3,12 (dd, 15,5 e 8,0 1H)	31,4	2,35 (dd, 15,5 e 3,5 Hz, 1H); 3,05 (dd, 15,5 e 9,5 Hz, 1H)
3	79,0	4,61 (m, 1H)	78,8	4,49 (m, 1H)
4	35,1	1,91 (m, 1H)	34,9	2,05 (m, 1H)
5	36,5	1,06 (t, 14,3 Hz, 1H); 1,28 (dd, 14,3 e 4,8 Hz, 1H)	36,0	
6	80,9	-	81,0	
7	46,9	1,36 (m, 1H); 1,44 (dd, 14,3 e 4,8 Hz, 1H)	46,5	1,55 (dd, 13,4 Hz, 2H)
8	40,4	2,03 (m, 1H)	40,2	2,18 (m, 1H)
9	134,9	5,09 (dd, 15,2 e 9,1 Hz, 1H)	134,4	5,10 (dd, 15,9 Hz, 1H)
10	131,7	5,30 (dt, 15,2 e 6,3 Hz, 1H)	131,5	5,38 (dd, 15,6 e 6,0 Hz, 1H)
11	25,9	1,98 (m, 2H)	29,5	
12	14,1	0,95 (t, 7,1 Hz, 3H)	13,9	0,97 (t, 7,0 Hz, 3H)
13	30,1	1,15 (m, 1H); 1,36 (m, 1H)	29,9	
14	11,7	0,83 (t, 7,1 Hz, 3H)	11,5	0,90 (t, 7,0 Hz, 3H)
15	21,4	1,38 (s, 3H)	21,3	1,37 (s, 3H)
16	25,2	0,75 (m, 1H); 0,88 (m, 1H)	25,2	
17	11,0	0,66 (t, 7,1 Hz, 3H)	11,0	0,80 (t, 7,0 Hz, 3H)
18	51,2	3,36 (s, 3H)	51,5	3,7 (s, 3H)

* Higgs e Faulkner, 1978

Tabela 7.5 – Valores de comparação de deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C da substância PaAE-1-2A – plakortina (**182**) com dados dos estereoisômeros encontrados na literatura.

	PaAE-1-2A – plakortina (182) (C_6D_6)	plakortina (Literatura)* (CDCl_3)	3-<i>epi</i>-plakortina (Literatura)** (CDCl_3)
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	171,8	171,9	170,7
2	31,8	31,4	36,9
3	79,0	78,8	81,5
4	35,1	34,9	36,6
5	36,5	36,0	40,1
6	80,9	81,0	82,4
7	46,9	46,5	46,6
8	40,4	40,2	40,4
9	134,9	134,4	135,0
10	131,7	131,5	131,6
11	25,9	29,5	25,9
12	14,1	13,9	14,1
13	30,1	29,9	30,0
14	11,7	11,5	11,7
15	21,4	21,3	21,1
16	25,2	25,2	24,4
17	11,0	11,0	10,6
18	51,2	51,5	51,3

* Higgs e Faulkner, 1978.

**Stierle e Faulkner, 1980.

A substância PaAE-1-2A (**182**) foi identificada como sendo a (3*S**, 4*S**, 6*R**) plakortina baseando-se na comparação dos dados de RMN de ^{13}C e de valores de $[\alpha]_{\text{D}}$ com dados obtidos na literatura. A substância PaAE-1-2A (**182**), opticamente ativa com $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +62$ ($c = 0,20$, MeOH) e $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +141$ ($c = 1,0$; CHCl_3) demonstrou maior similaridade com a (3*S**, 4*S**, 6*R**) plakortina (Higgs e Faulkner, 1978) que apresentou $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +189$ ($c = 2,9$; CHCl_3) do que com a (3*R**, 4*S**, 6*R**) 3-*epi*-plakortina (Stierle e Faulkner, 1980) com $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +22$ ($c = 2,5$; CHCl_3) (**Figura 7.15**).

Para concluir, como demonstrado na **Tabela 7.5**, a concordância dos valores de deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C do composto PaAE-1-2A (**182**) com os valores da (3*S**, 4*S**, 6*R**) plakortina, isolada por Higgs e Faulkner (1978), confirmam a configuração relativa do composto PaAE-1-2A (**182**) como sendo (3*S**, 4*S**, 6*R**).

Figura 7.15 – Estruturas com configurações relativas da plakortina e 3-*epi*-plakortina.

A estereoquímica absoluta da plakortina foi determinada por Cafieri, et al., em 1999 como sendo (3*R*, 4*R*, 6*S*, 8*R*) baseando-se na aplicação de método modificado de Mosher (Ohtani, et al., 1991) e método de Kusumi (Nagai e Kusumi, 1995).

Figura 7.16 – Configuração absoluta da plakortina (**182**).

7.4.3. Determinação estrutural do composto PaE-2-6-P4 (**184**) (plakortídeo P)

A elucidação estrutural do composto PaE-2-6-P4 (**184**) também foi realizada pela análise dos dados espectroscópicos (RMN- ^1H , RMN- ^{13}C , HMQC, HMBC e COSY ^1H - ^1H), infravermelho e espectrometria de massas. A configuração relativa foi estabelecida pela comparação dos dados de RMN de ^{13}C e de valores de $[\alpha]_{\text{D}}$ com dados obtidos na literatura.

A fração PaE-2-6-P4 (**184**) foi obtida como um óleo levemente amarelo, opticamente ativo com $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -107$ ($c = 0,56$, MeOH). A análise dos espectros de RMN- ^1H , RMN- ^{13}C e do espectro de massas (V.2 Figura 7.21) em modo spray de elétrons (LRESIMS) de (**184**) indicou a fórmula $\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{O}_4$ para os picos de íons adutos cationizados com potássio e sódio, respectivamente, $[\text{M} + \text{K}]^+$ em m/z 405,0 e $[\text{M} + \text{Na}]^+$ em m/z 389,1. Pelo cálculo do índice de deficiência de hidrogênios (IDH) pudemos perceber que a estrutura apresenta quatro graus de insaturações. O espectro de absorção no infravermelho (V.2 Figura 7.22) (filme em disco de silício) de PaE-2-6-P4 (**184**) indicou a presença de uma banda característica de grupo ácido carboxílico (2880-3000 e 1714 cm^{-1}).

A análise dos espectros de RMN de ^{13}C , do espectro de absorção no infravermelho e, também por comparação com dados na literatura, pudemos atribuir os quatro oxigênios presentes na fórmula como sendo dois oxigênios do grupo ácido carboxílico (presença confirmada pelo espectro de absorção no infravermelho e RMN- ^{13}C) e os outros dois oxigênios referentes ao peróxido cíclico, encontrado frequentemente em compostos isolados de esponjas do gênero *Plakortis*.

O espectro de RMN- ^1H (C_6D_6 , 500 MHz) (V.2 Figura 7.16) indicou a presença de uma olefina dissustituída [δ 5,15 (dd, 16,3 e 5,4 Hz, 1H) e δ 5,38 (dt, 16,3 e 5,4 Hz, 1H)] e uma olefina trissustituída em δ 5,19 (s, 1H). Também foram observados sinais referentes a cinco metilas em δ 0,67 (t, 7,2 Hz, 3H); 0,88 (t, 7,2 Hz, 3H); 0,91 (t, 7,2 Hz, 3H); 0,96 (t, 7,2 Hz, 3H) e 1,05 (t, 7,2 Hz, 3H).

O espectro de RMN- ^{13}C (C_6D_6 , 125 MHz) (V.2, Figura 7.17) do composto PaE-2-6-P4 (**184**) apresentou sinais referentes a quatro carbonos olefínicos: [δ 127,5 (C-7) sobreposto pelo sinal do solvente; 142,8 (C-8); 133,7 (C-11) e 132,0 (C-12)],

confirmando sinais observados no espectro de RMN- ^1H (C_6D_6 , 500 MHz). Assim, estabelecemos os quatros graus de insaturações encontrados pelo cálculo de IDH: um da carbonila do ácido carboxílico, duas insaturações na cadeia lateral e um grau de insaturação referente ao peróxido cíclico.

No espectro de RMN- ^{13}C (C_6D_6 , 125 MHz) (V.2, **Figura 7.17**) do composto PaE-2-6-P4 (**184**) pudemos verificar além da presença do carbono referente ao ácido carboxílico em δ 177,9 (C-1), dois sinais de carbonos ligados a átomos de oxigênios em δ 78,8 (C-3) e 84,0 (C-6); cinco sinais de metilas; oito carbonos metilênicos e um carbono metínico.

O mapa de correlações ^1H - ^1H do experimento COSY (V.2, **Figura 7.20**) mostrou correlações de um sistema de spin que inclui o grupo metila em δ 0,96 (CH_3 -14), o grupo metileno em δ 1,34 e 1,96 (CH_2 -13), o grupo metino em δ 5,38 (CH -12), o grupo metino em δ 5,15 (CH -11), o grupo metino em δ 1,83 (CH -10) e o grupo metileno em δ 2,06 e 2,21 (CH -9). As correlações observadas entre os hidrogênios do grupo metilênico em CH_2 -21 com o hidrogênio do grupo metino CH -10 possibilitaram estabelecer a ligação do grupo etila com a cadeia lateral.

Adicionalmente, o espectro COSY mostrou correlações entre o grupo metileno em δ 1,43 (CH_2 -5) com grupo metino em δ 5,19 (CH -7) e com o grupo metileno em δ 1,57 (CH -17) estabelecendo a conexão do anel do peróxido cíclico com a cadeia lateral contendo as duplas ligações e também a conexão do grupo etila em C-6.

Também foram observadas correlações entre o grupo metila em δ 0,67 (CH_3 -16) com o sinal do grupo metilênico em δ 0,80 e 0,84 (CH_2 -15), e deste com o grupo metino em δ 2,02 (CH -4) estabelecendo a ligação de outro grupo etila com o peróxido cíclico.

Finalmente, o hidrogênio do grupo metino em δ 4,54 (CH -3) mostrou acoplamento com os hidrogênios do grupo metilênico em δ 2,18 e 3,07 (CH_2 -2) e com o hidrogênio do grupo metino em δ 2,02 (CH -4) indicando a ligação da cadeia contendo o grupo ácido carboxílico com o peróxido cíclico.

Também foram observadas correlações que indicam o acoplamento geminal entre os hidrogênios: H-2a e H-2b (δ 2,18 e 3,07); H-5a e H-5b (δ 1,00 e 1,43); H-9a e H-9b (δ 2,06 e 2,21); H-19a e H-19b (δ 2,18 e 2,45) e entre os hidrogênios H-21a e H-

21b (δ 1,21 e 1,44). As correlações observadas no espectro de RMN do tipo COSY estão ilustradas no **Esquema 7.8**.

A análise do espectro de HMBC (**V.2. Figura 7.19**) indicou correlações à longa distância do carbono do ácido carboxílico C-1 (δ 177,9) com os hidrogênios do grupo metilênico H-2a (δ 2,18) e H-2b (δ 3,07) e com o hidrogênio do grupo metino H-3 (δ 4,54) estabelecendo ligação da cadeia lateral do ácido carboxílico com o peróxido cíclico.

Foram observadas correlações do C-3 (δ 78,8) com H-2ab (δ 2,18 e 3,07); H-4 (δ 2,02), H-5ab (δ 1,00 e 1,43), H-15ab (δ 0,80 e 0,84) e do C-4 (δ 2,02) com H-15ab (δ 0,80 e 0,84) e H-16 (δ 0,67) indicando a ligação de um grupo etila com o anel do peróxido.

Com a correlação do sinal atribuído à C-5 (δ 36,2) com H-7 (δ 5,19) e com H-17ab (δ 1,47 e 1,57), pudemos estabelecer a conexão do grupo etila do C-17 e da cadeia lateral contendo as duplas ligações com o carbono quaternário C-6 do peróxido cíclico. As correlações observadas para o sinal atribuído a C-6 com H-5; H-7 e H-17 confirmam esta conexão.

O sinal de C-8 (δ 142,8) mostrou estar correlacionado com H-7 (δ 5,19), H-9b (δ 2,21), H-19ab (δ 2,18 e 2,45) e H-20 (δ 1,05), o que indicou a ligação do grupo etila C-19 e C-20 com C-8.

As correlações observadas para o sinal atribuído a C-10 (δ 43,0) com H-11 (δ 5,15); H-12 (δ 5,38); H-21ab (δ 1,21 e 1,44) e H-22 (δ 0,91) demonstram que C-10 está ligado ao grupo etila C-21 e C-22.

As principais correlações observadas no espectro de HMBC estão ilustradas no **Esquema 7.8**.

A estereoquímica da ligação dupla presente entre H-11 e H-12 foi determinada como sendo *E* já que a constante de acoplamento $^3J_{H-11/H-12}$ mostrou ser de 16 Hz.

Em virtude da enorme semelhança observada na comparação com dados de RMN de ^{13}C do composto PaE-2-6-P4 (**184**) com dados do plakortídeo P encontrados na literatura, consideramos que a estereoquímica da ligação dupla entre C-7 e C-8 também seja *E*.

Esquema 7.8 - Estrutura do composto PaE-2-6-P4 (**184**) com as respectivas correlações observadas no espectro HMBC e COSY.

Tabela 7.6 – Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C bem como as correlações observadas nos espectros COSY e HMBC do composto PaE-2-6-P4 (**184**) - (plakortídeo P).

PaE-2-6-P4 (C_6D_6)				
Posição	$\delta^{13}\text{C}$ (HMQC)	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz, integral) (500 MHz)	COSY	HMBC
1	177,9	-	-	H2ab, H3
2	31,8	a) 2,18 (m, 1H); b) 3,07 (dd, 16,3 e 10,8 Hz, 1H)	a) H2b, H3 b) H2a, H3	H3, H4
3	78,8	4,54 (m, 1H)	H2ab, H4	H2ab, H4, H5ab, H15ab
4	35,8	2,02 (m, 1H)	H2a, H5a, H3, H15ab	H2b, H3, H5ab, H7, H15ab, H16, H17a,
5	36,2	a) 1,00 (m, 1H); b) 1,43 (m, 1H)	a) H5b, H4 b) H4, H5a, H7, H17	H3, H4, H7, H15ab, H17ab
6	84,1	-	-	H7, H5ab, H17ab, H18
7	127,5	5,19 (s, 1H)	-	H4, H5a, H8, H17ab, H19ab
8	142,8	-	-	H7, H9b, H19ab, H20
9	43,0	a) 2,06 (m, 1H); b) 2,21 (m, 1H)	a) H9b, H10 b) H9a, H10	H5b, H7, H11, H17a, H19ab, H21ab, H22
10	43,0	1,83 (m, 1H)	H9ab, H11, H21ab	H11, H12, H21ab, H22
11	133,7	5,15 (dd, 16,3 e 5,4 Hz, 1H)	H12, H10	H9ab, H10, H12, H13b, H21a
12	132,1	5,38 (dt, 16,3 e 5,4 Hz, 1H)	H11, H13ab	H10, H11, H13b, H14
13	26,0	a) 1,34 (m, 1H); b) 1,96 (m, 1H)	a) H14 b) H11, H12, H14	H11, H12, H14
14	14,2	0,96 (t, 7,2 Hz, 3H)	H13ab	H12, H13b
15	25,1	a) 0,80 (m, 1H); b) 0,84 (m, 1H)	a) H16; b) H4, H16	H4, H5b, H16
16	11,0	0,67 (t, 7,2 Hz, 3H)	H15ab	H4, H15ab
17	33,4	a) 1,47 (m, 1H); b) 1,57 (m, 1H)	H18	H5a, H7, H18
18	7,9	0,88 (t, 7,2 Hz, 3H)	H17ab	H5ab, H17ab
19	23,1	a) 2,18 (m, 1H); b) 2,45 (m, 1H)	a) H19b, H20 b) H19a, H20	H7, H9b, H20,
20	12,4	1,05 (t, 7,2 Hz, 3H)	H19ab	H7, H9a, H19a
21	28,3	a) 1,21 (m, 1H); b) 1,44 (m, 1H)	a) H10, H21b, H22 b) H10, H21a, H22	H9ab, H13a, H22
22	11,9	0,91 (t, 7,2 Hz, 3H)	H21ab	H21ab, H10

Desta maneira foi possível estabelecer a estrutura planar do composto PaE-2-6-P4. Uma busca na literatura (**Tabela 7.7**) nos possibilitou identificar o composto PaE-2-6-P4 como sendo o plakortídeo P (**184**).

Figura 7.17 – Estrutura planar do plakortídeo P (**184**).

Tabela 7.7 – Valores de comparação de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C do composto PaE-2-6-P4 (**184**) com dados encontrados na literatura.

Posição	PaE-2-6-P4 (C_6D_6)		(plakortídeo P)* (CDCl_3)	
	$\delta^{13}\text{C}$ (HMQC)	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz, integral)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz, integral)
1	177,9	-	176,4	-
2	31,8	a) 2,18 (m, 1H); b) 3,07 (dd, 16,3 e 10,8 Hz, 1H)	31,1	2,42 (dd, 15,9 e 3,4 Hz, 1H); 3,06 (dd, 15,9 e 9,6 Hz, 1H)
3	78,8	4,54 (m, 1H)	78,5	4,43 (ddd, 3,6; 4,8 e 9,0 Hz, 1H)
4	35,8	2,02 (m, 1H)	35,2	2,12 (m, 1H)
5	36,2	a) 1,00 (m, 1H); b) 1,43 (m, 1H)	35,7	1,71 (dd; 4,0 e 13,3 Hz); 1,27 (dd; 13,0 e 13,3 Hz)
6	84,0	-	84,4	-
7	127,5	5,19 (s, 1H)	126,9	5,14 (s, 1H)
8	142,8	-	142,5	-
9	43,0	a) 2,06 (m, 1H); b) 2,21 (m, 1H)	42,5	2,13-1,99 (m, 2H)
10	43,0	1,83 (m, 1H)	42,5	1,97 (m, 1H)
11	133,7	5,15 (dd, 16,3 e 5,4 Hz, 1H);	133,2	5,11 (dd, 15,3 e 8,3 Hz, 1H)
12	132,0	5,38 (dt, 16,3 e 5,4 Hz, 1H)	131,7	5,37 (dt, 15,3 e 6,2 Hz, 1H)
13	26,0	a) 1,34 (m, 1H); b) 1,96 (m, 1H)	25,6	1,97 (m, 2H)
14	14,2	0,96 (t, 7,2 Hz, 3H)	14,0	0,95 (t, 7,5 Hz)
15	25,1	0,80 (m, 2H)	25,0	1,18; 1,16 (m, 2H)
16	11,0	0,67 (t, 7,2 Hz, 3H)	11,0	0,91 (t, 7,4 Hz, 3H)
17	33,4	a) 1,47 (m, 1H); b) 1,57 (m, 1H)	32,9	1,56; 1,23 (m, 2H)
18	7,9	0,88 (t, 7,2 Hz, 3H)	7,7	0,85 (t, 7,6 Hz)
19	23,1	a) 2,18 (m, 1H); b) 2,45 (m, 1H)	22,7	2,20 (m, 2H),
20	12,4	1,05 (t, 7,2 Hz, 3H)	12,1	0,97 (t, 7,5 Hz)
21	28,3	a) 1,21 (m, 1H); b) 1,44 (m, 1H)	27,8	1,16 (m, 1H); 1,42 (m, 1H)
22	11,9	0,91 (t, 7,2 Hz, 3H)	11,6	0,84 (t, 7,5 Hz, 3H)

* del Sol Jiménez, et al., 2003.

A substância PaE-2-6-P4 (**184**) foi identificada como sendo o plakortídeo P, um estereoisômero do ácido 3,6-dioxi-4,6,8,10-tetraetiltetradeca-7,11-dienóico, baseando-se na comparação de valores de $[\alpha]_D$ com dados obtidos na literatura, já que os dados de RMN- ^{13}C são muito similares.

O composto PaE-2-6-P4 (**184**), opticamente ativo com $[\alpha]_D^{20} = -107$ ($c = 0,56$, MeOH) demonstrou maior similaridade com (3*S*, 4*S*, 6*R*, 10*R*) plakortídeo P cujo valor de $[\alpha]_D^{24} = -275$ ($c = 0,52$, CHCl_3) (del Sol Jiménez, et al., 2003) do que com o estereoisômero do ácido 3,6-dioxi-4,6,8,10-tetraetiltetradeca-7,11-dienóico com valores de $[\alpha]_D^{23} = +76,2$ ($c = 1,6$, CHCl_3) (Fontana, et al., 1998) e $[\alpha]_D^{24} = +164$ ($c = 2,4$, CHCl_3) (Compagnone et al., 1998).

Com isso, concluímos que a substância PaE-2-6-P4 (**184**) trata-se do plakortídeo P com configuração absoluta 3*S*, 4*S*, 6*R*, 10*R*.

Figura 7.18 – Estrutura do (3*S*, 4*S*, 6*R*, 10*R*) plakortídeo P (**184**).

7.4.4. Determinação estrutural dos compostos idênticos PaE-2-5-P3 e PaE-2-4-P6 (**185**) (3,6-epóxi-4,6,8-trietil-2,4,9-dodecatrienoato de metila)

A elucidação estrutural dos compostos PaE-2-5-P3 e PaE-2-4-P6 (**185**), um policetídeo contendo um dihidrofurano e um éster metílico $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -diinsaturado conjugado em sua estrutura, foi realizada pela análise dos dados espectroscópicos (RMN- ^1H , RMN- ^{13}C , HMQC, HMBC e COSY ^1H - ^1H) – (V.2. Figuras 7.23, 7.24, 7.25, 7.26 e 7.27, respectivamente), infravermelho, rotação óptica, ultravioleta, espectrometria de massas e pela comparação com dados da literatura.

O composto (**185**) foi obtido como um óleo incolor, opticamente ativo com $[\alpha]_D^{20} = -258$ ($c = 1,00$, MeOH). O seu espectro de absorção no infravermelho (**V.2 Figura 7.29**) (filme em disco de silício) indicou a presença de uma carbonila com banda em 1714 cm^{-1} .

O espectro de massas de alta resolução (**V.2 Figura 7.28**) em modo spray de elétrons (HRESIMS) apresentou pico de íon aduto cationizado com sódio $[M+Na]^+$ em m/z 329,2091, compatível com a fórmula $C_{19}H_{30}O_3Na$.

Pela fórmula molecular fornecida pelo espectro de massas pudemos calcular o Índice de deficiência de hidrogênios (IDH) e verificamos que a molécula possui 5 graus de insaturações. Dos três oxigênios presentes na fórmula fornecida pelo espectro de massas, dois puderam ser atribuídos a um éster metílico. O outro seria de um derivado dihidrofurano, bastante comum em compostos isolados de esponjas do gênero *Plakortis*.

A presença de uma conjugação estendida na estrutura deste composto foi evidenciada com base no espectro de absorção no UV (**V.2. Figura 7.29**) em $\lambda_{\text{máx}}$ 289 nm (ϵ 10700).

Com isso, estabelecemos as cinco insaturações encontradas pelo cálculo de IDH: três da carbonila do éster metílico $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -diinsaturado conjugado, uma do anel dihidrofurano e a outra restante referente a uma dupla ligação cuja presença pôde ser confirmada pelos valores de deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C e de ^1H [δ 133,9 e 5,05] e [132,1 e 5,23].

O espectro de RMN- ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) (**V.2, Figura 7.23**) apresentou sinais de hidrogênios olefínicos em δ 4,8 (s), 6,19 (s), 5,05 (dd, 15,0 e 7,8 Hz) e 5,23 (dt, 15,0 e 7,8 Hz). O sinal referente à metila do grupo éster pôde ser observado como um singlete em δ 3,7. Também foram observados quatro sinais referentes a quatro grupos metilas em δ 1,14 (t, 7,5 Hz, 3H), 0,95 (t, 7,5 Hz, 3H), 0,76 (t, 7,5 Hz, 3H) e 0,77 (t, 7,5 Hz, 3H).

No espectro de RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) (**V.2, Figura 7.24**) pôde-se distinguir 19 sinais de carbonos:

- um sinal referente a uma carbonila do éster metílico $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -diinsaturado conjugado em δ 167,0 (C-1);
- um sinal de carbono do tipo metoxila em δ 50,5 (C-19);
- seis sinais de carbonos olefínicos em δ 139,2 (C-4); δ 140,3 (C-5); δ 133,9 (C-9); δ 132,1 (C-10); δ 83,3 (C-2) e δ 172,2 (C-3), este último ligado a oxigênio;
- quatro sinais de carbonos referentes a grupos metilas em δ 14,0 (C-12); δ 11,8 (C-14); δ 8,0 (C-16) e δ 11,4 (C-18);
- cinco sinais de carbonos referentes a grupos metilenos em δ 43,5 (C-7); δ 25,7 (C-11); δ 18,5 (C-13); δ 32,4 (C-15) e δ 29,4 (C-17);
- um sinal de carbono quaternário ligado a oxigênio em δ 97,8 (C-6).

A estereoquímica da ligação dupla entre H-9 e H-10 foi determinada como sendo *E* já que a constante de acoplamento $^3J_{H-9/H-10}$ mostrou ser de 15,0 Hz.

Pela análise do espectro de HMBC (**V.2. Figura 7.26**) verificamos que o sinal em δ 167,0 (C-1) correlaciona apenas com o singlete em δ 3,70 (H-19) referentes ao grupo éster metílico. O carbono com sinal em δ 172,2 (C-3) apresentou correlações com os hidrogênios H-2 (δ 4,8); H-5 (δ 6,19) e H-13 (δ 2,14) dando indícios da conexão da cadeia lateral contendo o grupo éster e de um grupamento etila, ambos ligados ao anel dihidrofurano, o que pôde ser confirmado pelos acoplamentos observados do sinal de carbono em δ 139,2 (C-4) com os hidrogênios H-2 (δ 4,8), H-5 (δ 6,19), H-13 (δ 2,14) e H-14 (δ 1,15).

As correlações observadas para o sinal atribuído à C-6 (δ 97,8) nos indicaram a posição de mais um grupamento etila referentes aos sinais de carbonos em δ 32,4 (C-15) e δ 8,0 (C-16) e também da conexão com a cadeia lateral contendo os carbonos C-7 (δ 43,5) e C-8 (δ 39,7).

O carbono com sinal em δ 39,7 referente ao C-8 mostrou estar acoplado aos hidrogênios H-7a (δ 1,76); H-9 (δ 5,05) e H-17 (δ 1,36) indicando a ligação de um grupamento etila no C-8.

As principais correlações observadas no espectro de HMBC estão ilustradas no **Esquema 7.9**.

Adicionalmente, o mapa de correlações 1H - 1H do experimento COSY (**V.2. Figura 7.27**) mostrou correlações de um sistema de spin que inclui o grupo metila em

δ 0,95 (CH₃-12); o grupo metilênico em δ 1,96 (CH₂-11); o grupo metínico em δ 5,23 (CH-10); o grupo metínico em δ 5,05 (CH-9) e o grupo metínico em δ 1,77 (CH-8). Este último (CH-8) mostrou correlação com os hidrogênios da metila em δ 0,77 (CH₃-18) do grupamento etila estabelecendo, assim, parte da cadeia lateral ligada ao ciclo em C-6 (δ 97,8).

O hidrogênio do grupo metilênico em δ 1,85 (CH₂-15b) apresentou correlações com os hidrogênios em δ 1,76 (CH₂-7) e com a metila em δ 0,76 (CH₃-16) conectando o grupo etila à cadeia lateral ligada ao ciclo em C-6 (δ 97,8).

As principais correlações observadas no espectro de RMN do tipo COSY estão ilustradas no **Esquema 7.9**.

Esquema 7.9 - Estrutura do composto PaE-2-5-P3 = PaE-2-4-P6 (**185**) com as respectivas correlações observadas no espectro HMBC e COSY.

Tabela 7.8 – Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C bem como as correlações observadas nos espectros COSY e HMBC do composto PaE-2-5-P3 = PaE-2-4-P6 (**185**).

PaE-2-5-P3 = PaE-2-4-P6 (185)				
(CDCl ₃)				
Posição	$\delta^{13}\text{C}$ (HMQC)	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz, integral) (500 MHz)	COSY	HMBC
1	167,0	-	-	H19
2	83,3	4,8 (s, 1H)	-	-
3	172,2	-	-	H2, H5, H13
4	139,2	-	-	H2, H5, H13, H14
5	140,3	6,19 (s, 1H)	-	H7, H8, H14
6	97,8	-	-	H7, H5, H8, H15, H16
7	43,5	a) 1,76 (m, 1H); b) 1,94 (m, 1H)	H15	-
8	39,7	1,77 (m, 1H)	H9, H18	H7, H9, H11, H15, H17
9	133,9	5,05 (dd, 7,8 e 15,0 Hz, 1H)	H8, H10, H11	H8, H7, H10, H11, H12
10	132,1	5,23 (dt, 7,8 e 15,0 Hz, 1H)	H9, H11	H7, H8, H9, H11, H12
11	25,7	1,96 (m, 2H)	H9, H10, H12	H9, H10, H12
12	14,0	0,95 (t, 7,5 Hz, 3H)	H11	H11
13	18,5	2,14 (m, 2H)	H14	H5, H14
14	11,8	1,15 (t, 7,5 Hz, 3H)	H13	H13
15	32,4	a) 1,72 (m, 1H); b) 1,85 (q, 10,0 Hz, 1H)	H7, H16	H16
16	8,0	0,76 (t, 7,5 Hz, 3H)	H15	H15
17	29,4	1,36 (m, 2H)	H18	H7, H8
18	11,4	0,77 (t, 7,5 Hz, 3H)	H8, H17	H17
19	50,5	3,7 (s, 3H)	-	-

Desta forma, foi possível estabelecer a estrutura planar do composto PaE-2-5-P3 e PaE-2-4-P6 (**185**). Uma busca na literatura nos possibilitou identificar o composto como sendo o 3,6-epóxi-4,6,8-trietil-2,4,9-dodecatrienoato de metila, substância previamente isolada de uma esponja do gênero *Plakortis*, por Faulkner e Stierle em 1980.

Figura 7.19 – Estrutura planar do PaE-2-5-P3 e PaE-2-4-P6 (**185**) – (3,6-epóxi-4,6,8 trietil-2,4,9-dodecatrienoato de metila).

Tabela 7.9 – Valores de comparação de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C do composto PaE-2-5-P3 = PaE-2-4-P6 (**185**) com dados encontrados na literatura.

Posição	PaE-2-5-P3 = PaE-2-4-P6 (185) (CDCl_3)		(Literatura)* (CDCl_3)	
	$\delta^{13}\text{C}$ (HMQC)	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz, integral)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz, integral)
1	167,0	-	166,0	-
2	83,3	4,8 (s, 1H)	84,4	4,8 (s, 1H)
3	172,2	-	171,5	-
4	139,2	-	139,7	-
5	140,3	6,19 (s, 1H)	139,9	6,18 (s, 1H)
6	97,8	-	97,2	-
7	43,5	1,76 (m, 1H); 1,94 (m, 1H)	43,6	
8	39,7	1,77 (m, 1H)	39,9	
9	133,9	5,05 (dd, 7,8 e 15,0 Hz, 1H)	134,5	5,03 (dd, 15,7 e 7,6 Hz, 1H)
10	132,1	5,23 (dt, 7,8 e 15,0 Hz, 1H)	131,9	5,24 (dt, 15,7 e 7,0 Hz, 1H)
11	25,7	1,96 (m, 2H)	25,9	
12	14,0	0,95 (t, 7,5 Hz, 3H)	14,1	
13	18,5	2,14 (m, 2H)	18,7	2,15 (q, 7,0 Hz, 2H)
14	11,8	1,15 (t, 7,5 Hz, 3H)	11,9	1,14 (t, 7,0 Hz, 3H)
15	32,4	1,85 (q, 10,0 Hz, 1H); 1,72 (m, 1H)	32,4	
16	8,0	0,8 (t, 7,5 Hz, 3H)	7,9	0,77 (t, 7,0 Hz, 3H)
17	29,4	1,36 (m, 2H)	29,6	
18	11,4	0,80 (t, 7,5 Hz, 3H)	11,5	0,78 (t, 7,0 Hz, 3H)
19	50,5	3,7 (s, 3H)	50,1	3,69 (s, 3H)

* Stierle, D.B., Faulkner, J., 1980

A substância PaE-2-5-P3 = PaE-2-4-P6 (**185**), opticamente ativa com $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -258$ ($c = 1,0$, MeOH) demonstrou similaridade com o (2Z, 6R, 8R, 9E)-3,6-epóxi-4,6,8-trietil-2,4,9-dodecatrienoato de metila cujo valor de $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -175$ ($c = 1,4$, CCl_4) (Schmidt e Faulkner, 1996).

Baseando-se na comparação do sinal e magnitude dos valores de medida de rotação óptica encontrados na literatura, e uma vez que os dados espectrais são praticamente idênticos, assumimos que os ésteres metílicos PaE-2-5-P3 e PaE-2-4-P6

(185) são idênticos ao (2*Z*, 6*R*, 8*R*, 9*E*)-3,6-epóxi-4,6,8 trietil-2,4,9-dodecatrienoato de metila.

A estereoquímica absoluta do éster metílico PaE-2-5-P3 = PaE-2-4-P6 (185) foi determinada por Schmidt e Faulkner (1996) como sendo 6*R*, 8*R* através de meios de degradação química (Nagai e Kusumi, 1995) e aplicação de uma modificação do método de Mosher (Ohtani et al., 1991).

Figura 7.20 – Estrutura do (2*Z*, 6*R*, 8*R*, 9*E*)-3,6-epóxi-4,6,8-trietil-2,4,9-dodecatrienoato de metila (185).

7.4.5. Determinação estrutural dos compostos idênticos PaE-2-4-P7 e PaE-2-5-P4 (186) (espongosoritina A)

A elucidação estrutural dos compostos idênticos PaE-2-4-P7 e PaE-2-5-P4 (186), outro policetídeo contendo um dihidrofurano e um éster metílico $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -diinsaturado conjugado em sua estrutura, foi realizada pela análise dos dados espectroscópicos [RMN- ^1H (V.2 Figura 7.30), RMN- ^{13}C – BBD (V.2 Figura 7.31a) e DEPT 135° (V.2 Figura 7.31b), HMQC (V.2 Figura 7.32), HMBC (V.2 Figura 7.33) e COSY ^1H - ^1H (V.2 Figura 7.34)], infravermelho, rotação óptica, ultravioleta, espectrometria de massas e pela comparação com dados da literatura.

A espongosoritina A (186) foi obtida a partir de duas frações: PaE-2-4-P7 e PaE-2-5-P4 e é um homólogo do composto PaE-2-5-P3 = PaE-2-4-P6 (185) citado anteriormente. Os dados espectroscópicos de RMN são praticamente idênticos com

exceção do grupo ligado ao C-6 (δ 95,1) cujo sinais do grupo etila foram substituídos por sinais referentes a uma metila em δ 26,4 (^{13}C) e em δ 1,42 (^1H).

O espectro de massas (**V.2 Figura 7.35**) em modo spray de elétrons (LRESIMS) apresentou pico de íon aduto cationizado com sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ em m/z 315,1, compatível com a fórmula $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{O}_3\text{Na}$. No espectro de absorção no infravermelho (**V.2. Figura 7.36**) (filme em disco de silício) verificamos a presença de uma carbonila com banda em 1713 cm^{-1} .

As substâncias PaE-2-4-P7 e PaE-2-5-P4 (**186**), foram obtidas como um óleo levemente amarelo, opticamente ativo com $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -189$ ($c=0,19$, MeOH).

O comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}}$ 294 nm (ϵ 4600) observado no espectro de absorção no UV (**V.2. Figura 7.36**) indica a presença de uma conjugação estendida referente ao éster metílico $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -diinsaturado.

Como já mencionado, os dados espectroscópicos da substância PaE-2-4-P7 = PaE-2-5-P4 (**186**) são muito semelhantes aos dados do composto PaE-2-5-P3 = PaE-2-4-P6 (**185**), citado anteriormente onde a única diferença estrutural encontra-se na substituição de um grupamento metila no C-6 em vez de um grupamento etila.

Dessa forma, a elucidação estrutural da substância PaE-2-4-P7 = PaE-2-5-P4 (**186**) foi realizada de maneira análoga à determinação estrutural do composto PaE-2-5-P3 = PaE-2-4-P6 (**185**) mencionado anteriormente

Como a constante de acoplamento $^3J_{\text{H-9/H-10}}$ mostrou ser de 14 Hz, deduzimos que a estereoquímica da ligação dupla entre os hidrogênios H-9 e H-10 também é *E*.

Tabela 7.10 – Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C bem como as correlações observadas nos espectros COSY e HMBC do composto PaE-2-4-P7 = PaE-2-5-P4 (**186**) (espongosoritina A).

PaE-2-4-P7 = PaE-2-5-P4 (186) (CDCl_3)				
Posição	$\delta^{13}\text{C}$ (HMQC)	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz, integral) (500 MHz)	COSY	HMBC
1	167,0	-	-	H18
2	83,8	4,83 (s, 1H)	H5	-
3	171,6	-	-	H2, H5, H13
4	138,1	-	-	H2, H5, H13, H14
5	141,7	6,25 (s, 1H)	H2, H13	H7ab, H13, H15
6	95,1	-	-	H7ab, H5, H8, H15
7	45,0	a) 1,77 (m, 1H) b) 1,98 (m, 1H)	a) H8, H9, H16ab b) H7a, H8	H8, H15, H16ab
8	40,1	1,77 (m, 1H)	H7ab, H9, H16ab	H7ab, H9, H10, H11, H16ab, H17
9	133,8	5,05 (dd, 14,0 e 7,0 Hz, 1H)	H7ab, H8, H10,	H8, H7a, H10, H11, H16ab
10	132,2	5,24 (dt, 14,0 e 7,0 Hz, 1H)	H9, H11	H8, H11, H12
11	25,6	1,98 (m, 2H)	H9, H10, H12	H9, H10, H12
12	13,9	0,96 (t, 7,2 Hz, 3H)	H11	H10, H11
13	18,5	2,12 (m, 2H)	H5, H14	H5, H14
14	11,6	1,14 (t, 7,2 Hz, 3H)	H13	H13
15	26,4	1,42 (s, 3H)	-	H7b
16	29,4	a) 1,16 (m, 1H); b) 1,37 (m, 1H)	a) H7a, H17, H16a b) H16b, H17, H7a	H7ab, H8, H17
17	11,4	0,77 (t, 7,2 Hz, 3H)	H16ab	H16a
18	50,6	3,7 (s, 3H)	-	-

Assim, estabelecemos a estrutura planar do composto PaE-2-4-P7 = PaE-2-5-P4 (**186**), onde uma busca na literatura nos possibilitou identificar o composto como sendo a espongosoritina A, uma substância isolada de esponjas dos gêneros *Plakortis* e *Spongosorites*, em 2005, por Epifânio, et al., Capon, et al. e Hoye et al., 2003.

Figura 7.21 – Estrutura planar do PaE-2-4-P7 e PaE-2-5-P4 (**186**) – espongosoritina A.

Tabela 7.11 – Valores de comparação de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C do composto PaE-2-4-P7 = PaE-2-5-P4 (**186**) com dados encontrados na literatura.

	PaE-2-4-P7 = PaE-2-5-P4 (CDCl_3)			(Literatura)* (CDCl_3)		(Literatura)** (CDCl_3)	
	$\delta^{13}\text{C}$ (HMQC)	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz, integral)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz, integral)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz, integral)	
1	167,0	-	166,9	-	166,9	-	
2	83,8	4,83 (s, 1H)	83,9	4,80 (bs, 1H)	83,8	4,82 (d, 0,9 Hz, 1H)	
3	171,6	-	171,5	-	171,5	-	
4	138,1	-	138,2	-	138,1	-	
5	141,7	6,25 (s, 1H)	141,7	6,21 (dt, 0,7 e 1,6 Hz, 1H)	141,6	6,25 (dt, 0,9 e 1,8 Hz, 1H)	
6	95,1	-	95,1	-	5,0	-	
7	45,0	1,77 (m, 1H); 1,98 (m, 1H)	45,0	1,76 (m, 1H); 1,96 (m, 1H)	44,9	1,76 (m, 1H); 1,94 (m, 1H)	
8	40,1	1,77 (m, 1H)	40,1	1,76 (m, 1H)	40,0	1,78 (m, 1H)	
9	133,8	5,05 (dd, 14,0 e 7,0 Hz, 1H)	133,8	5,02 (dd, 15,4 e 8,0 Hz, 1H)	133,7	5,04 (ddt, 15,3; 8,7 e 1,8 Hz, 1H)	
10	132,2	5,24 (dt, 14,0 e 7,0 Hz, 1H)	132,2	5,23 (dt, 15,4 e 6,2 Hz, 1H)	132,1	5,26 (dt, 15,3 e 6,3 Hz, 1H)	
11	25,6	1,98 (m, 2H)	25,6	1,96 (m, 2H)	25,5	1,98 (m, 2H)	
12	13,9	0,96 (t, 7,2 Hz, 3H)	13,9	0,93 (t, 7,5 Hz, 3H)	13,9	0,95 (t, 7,4 Hz, 3H)	
13	18,5	2,12 (m, 2H)	18,5	2,10 (ddq, 1,6; 1,6 e 7,5 Hz, 2H)	18,4	2,12 (dq, 7,5 e 1,8 Hz, 2H)	
14	11,6	1,14 (t, 7,2 Hz, 3H)	11,7	1,12 (t, 7,5 Hz, 3H)	11,6	1,14 (t, 7,4 Hz, 3H)	
15	26,4	1,42 (s, 3H)	26,3	1,40 (s, 3H)	26,3	1,42 (s, 3H)	
16	29,4	1,16 (m, 1H); 1,37 (m, 1H)	29,4	1,16 (m, 1H); 1,36 (m, 1H)	29,3	1,16 (m, 1H), 1,36 (m, 1H)	
17	11,4	0,77 (t, 7,2 Hz, 3H)	11,3	0,75 (t, 7,5 Hz, 3H)	11,3	0,77 (t, 7,4 Hz, 3H)	
18	50,6	3,7 (s, 3H)	50,5	3,7 (s, 3H)	50,5	3,64 (s, 3H)	

* Capon et al., 2005, ** Epifânio et al., 2005.

Nota-se que a atribuição do sinal referente ao carbono C-6 estabelecida por Epifânio et al., 2005 foi realizada de forma equivocada.

Após comparação do sinal e magnitude dos valores de medida de rotação óptica do composto isolado PaE-2-4-P7 = PaE-2-5-P4 (**186**) com $[\alpha]_D^{20} = -189$ ($c = 0,19$, MeOH)] com os dados da (6*R*, 8*R*, 9*E*) espongosoritina A cujo valor de $[\alpha]_D^{20} = -205$ ($c = 0,01$, CHCl₃) (Epifânio et al., 2005) e $[\alpha]_D = -148$ ($c = 1,54$, MeOH) (Capon et al., 2005) assumimos que o éster metílico PaE-2-4-P7 = PaE-2-5-P4 (**186**) possui a mesma configuração da (6*R*^{*}, 8*R*^{*}, 9*E*) espongosoritina A.

Figura 7.22 – Estrutura do (6*R*^{*}, 8*R*^{*}) espongosoritina A (**186**).

7.4.6. Determinação estrutural dos compostos idênticos PaE-2-5-P2 e PaE-2-4-P5 (**187**) (3,6-epóxi-4,6,8-trietil-2,4,-dodecadienoato de metila)

A elucidação estrutural do composto PaE-2-5-P2 = PaE-2-4-P5 (**187**), mais um policetídeo contendo um dihidrofurano e um éster metílico $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -diinsaturado conjugado em sua estrutura, foi realizada pela análise dos dados espectroscópicos [RMN-¹H (V.2 Figura 7.37), RMN-¹³C – BBD e DEPT 135° (V.2 Figura 7.38), HMQC (V.2 Figura 7.39), HMBC (V.2 Figura 7.40) e COSY ¹H-¹H (V.2 Figura 7.41)], infravermelho, rotação óptica, ultravioleta, espectrometria de massas e pela comparação com dados da literatura.

O composto PaE-2-5-P2 = PaE-2-4-P5 (**187**), foi obtido como um óleo incolor, opticamente ativo com $[\alpha]_D^{20} = -135$ ($c = 0,52$, MeOH).

O espectro de massas (V.2 Figura 7.42) em modo spray de elétrons (LRESIMS) apresentou pico de íon pseudomolecular $[M+H]^+$ em m/z 309,1, compatível com a

fórmula $C_{19}H_{32}O_3$. Já o espectro de absorção no infravermelho (**V.2 Figura 7.43**) (filme em disco de silício) indicou a presença de uma carbonila com banda em 1.714 cm^{-1} .

Os dados espectroscópicos de PaE-2-5-P2 = PaE-2-4-P5 (**187**) são praticamente idênticos aos dados do composto PaE-2-5-P3 = PaE-2-4-P6 (**185**), citado anteriormente, e diferem entre si apenas pela ausência da dupla ligação entre os carbonos C-9 e C-10 no composto PaE-2-5-P2 = PaE-2-4-P5 (**187**).

Como nos compostos **185** e **186** já citados, o comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}}$ 288 nm (ϵ 10600) observado no espectro de absorção no UV (**V.2. Figura 7.43**) indicou a presença de uma conjugação estendida referente ao éster metílico $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -diinsaturado.

A atribuição dos deslocamentos químicos de RMN detalhada foi realizada de maneira análoga à determinação estrutural do composto PaE-2-5-P3 = PaE-2-4-P6 (**185**) mencionado anteriormente.

Tabela 7.12 – Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C bem como as correlações observadas nos espectros COSY e HMBC do composto PaE-2-5-P2 = PaE-2-4-P5 (**187**) (3,6-epóxi-4,6,8-trietil-2,4,-dodecadienoato de metila).

PaE-2-5-P2 = PaE-2-4-P5 (187) (CDCl_3)				
Posição	$\delta^{13}\text{C}$ (HMQC)	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz, integral) (500 MHz)	COSY	HMBC
1	166,9	-	-	H19
2	83,7	4,81 (s, 1H)	H5	-
3	171,7	-	-	H2, H5, H13
4	140,0	-	-	H2, H5, H14
5	139,8	6,22 (s, 1H)	H2, H13	H7ab, H13, H15ab
6	98,0	-	-	H5, H15ab, H16
7	41,7	a) 1,61(dd, 5,1 e 15,4 Hz, 1H); b) 1,81 (m, 1H)	a) H7b; b) H7a	H8, H15ab
8	27,0	1,28 (m, 1H)	H9, H17, H18	H7ab, H8
9	34,4	1,17 (m, 2H)	H7ab	H7ab, H8
10	29,0	1,18 (m, 2H)	-	H9, H11, H12
11	23,0	1,23 (m, 2H)	H12	H10, H12
12	14,1	0,87 (t, 6,7 Hz, 3H)	H11	H11
13	18,6	2,18 (dq, 1,8 e 7,8 Hz, 2H)	H14	H14
14	12,1	1,17 (t, 7,8 Hz, 3H)	H13	H13
15	31,7	a) 1,72 (m, 1H); b) 1,86 (m, 1H)	a) H16; b) H16	H7ab, H16
16	8,1	0,81 (t, 7,8 Hz, 3H)	H15ab	H15ab
17	34,3	1,20 (m, 2H)	H18	H7ab, H8, H18
18	10,7	0,82 (t, 7,8 Hz, 3H)	H8	-
19	50,5	3,68 (s, 3H)	-	-

Dessa forma, determinamos a estrutura planar do composto PaE-2-5-P2 = PaE-2-4-P5 (**187**) e uma busca na literatura nos possibilitou identificar o composto como sendo o 3,6-epóxi-4,6,8-trietil-2,4,-dodecadienoato de metila (**187**).

Tabela 7.13 – Valores de comparação de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C do composto PaE-2-5-P2 e PaE-2-4-P5 (**187**) com dados encontrados na literatura.

	PaE-2-5-P2 = PaE-2-4-P5 (CDCl_3)		(Literatura)* (CDCl_3)		(Literatura)** (CDCl_3)	
	$\delta^{13}\text{C}$ (HMQC)	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz, integral)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz, integral)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz, integral)
1	166,9	-	166,9	-	166,8	-
2	83,7	4,81 (s, 1H)	83,7	4,79 (s, 1H)	83,5	4,81 (d, 0,6 Hz, 1H)
3	171,7	-	171,7	-	171,6	-
4	140,0	-	140,0	-	139,7	-
5	139,8	6,22 (s, 1H)	139,8	6,20 (s, 1H)	139,9	6,22 (dt, 0,6 e 1,8 Hz, 1H)
6	98,0	-	98,0	-	98,0	-
7	41,7	1,61 (dd, 5,1 e 15,4 Hz, 1H); 1,81 (m, 1H)	41,7	1,59 (m, 1H); 1,78 (m, 1H)	41,5	1,60 (dd, 5,00 e 14,5 Hz, 1H); 1,80 (m, 1H)
8	27,0	1,28 (m, 1H)	27,1	1,23 (m, 1H)	34,2	1,13 (m, 1H)
9	34,4	1,17 (m, 2H)	34,4	1,10 (m, 2H)	34,1	1,13 (m, 2H)
10	29,0	1,18 (m, 2H)	29,0	1,17 (m, 2H)	28,9	1,14 (m, 2H)
11	23,0	1,23 (m, 2H)	23,0	1,28 (m, 2H)	22,9	1,22 (m, 2H)
12	14,1	0,87 (t, 6,7 Hz, 3H)	14,1	0,85 (t, 7,5 Hz, 3H)	14,0	0,87 (t, 6,6 Hz, 3H)
13	18,6	2,18 (dq, 1,8 e 7,8 Hz, 2H)	18,6	2,16 (q, 7,5 Hz, 2H)	18,5	2,18 (dq, 1,8 e 7,4 Hz, 2H)
14	12,1	1,18 (t, 7,8 Hz, 3H)	12,1	1,15 (t, 7,5 Hz, 3H)	12,0	1,17 (t, 7,5 Hz, 3H)
15	31,7	1,72 (m, 1H); 1,86 (m, 1H)	31,7	1,71 (m, 1H); 1,83 (m, 1H)	31,6	1,70 (m, 2H)
16	8,1	0,81 (t, 7,8 Hz, 3H)	8,1	0,77 (t, 7,5 Hz, 3H)	8,0	0,79 (t, 7,2 Hz, 3H)
17	34,3	1,20 (m, 2H)	34,3	1,18 (m, 2H),	26,9	1,26 (m, 2H),
18	10,7	0,82 (t, 7,8 Hz, 3H)	10,6	0,78 (t, 7,5 Hz, 3H)	10,5	0,80 (t, 7,5 Hz, 3H)
19	50,5	3,68 (s, 3H)	50,5	3,66 (s, 3H)	50,4	3,69 (s, 3H)

* Compagnone et al., 1998. ** Epifânio et al., 2005.

Nota-se que as atribuições dos sinais dos carbonos C-8 e C-17 estabelecidas por Epifânio et al., 2005 foram realizadas de forma equivocada.

Após comparação do sinal e magnitude dos valores de medida de rotação óptica do composto isolado PaE-2-5-P2 = PaE-2-4-P5 (**187**) com $[\alpha]_D^{20} = -135$ ($c = 0,52$, MeOH)] com dados da literatura, cujos valores de $[\alpha]_D^{20} = -167$ ($c = 0,01$, MeOH) (Epifânio et al., 2005) e $[\alpha]_D = -78$ ($c = 0,19$, CHCl_3) (Compagnone et al., 1998) assumimos que a estereoquímica relativa do composto PaE-2-5-P2 e PaE-2-4-P5 (**187**) - 3,6-epóxi- 4,6,8-trietil-2,4,-dodecadienoato de metila seja (6*R*, 8*S*).

Figura 7.23 – Estrutura do (6*R**, 8*S**) 3,6-epóxi-4,6,8-trietil-2,4,-dodecadienoato de metila (**187**).

7.4.7. Avaliação biológica dos compostos isolados da esponja *Plakortis angulospiculatus* – Atividades antiparasítica, antineuroinflamatória e citotóxica

7.4.7.1 - Uma breve introdução sobre doenças parasitárias: leishmaniose e doença de Chagas

Doenças infecciosas causadas por parasitas cinetoplástidas, incluindo malária, doença de Chagas e leishmanioses, constituem alguns dos maiores problemas de saúde pública em países em desenvolvimento (Gramiccia e Gradoni, 2005; Davis, et al., 2004; Croft, et al., 2003 e 2005).

A leishmaniose, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, é uma doença infecciosa crônica que afeta cerca de 12 milhões de pessoas no mundo todo. Essa doença é adquirida devido à ação hematófaga de insetos fêmeas pertencentes à família Psychodidae, conhecidos pelo nome genérico de flebótomos. Durante seu ciclo biológico, os parasitos do gênero *Leishmania* existem em duas formas: promastigota e

amastigota. A forma promastigota é flagelada e extracelular e infecta seres humanos e outros vertebrados, vivendo também no trato digestivo do inseto vetor. A forma amastigota é destituída de movimento e localiza-se nos macrófagos dos hospedeiros. Ambas formas possuem a propriedade de se dividir.

A principal forma de transmissão da leishmaniose é através da picada do inseto flebótomo, mas existem outros meios que, apesar de serem raros e sem muita importância epidemiológica, podem ocorrer, dentre eles: transmissão congênita, transfusão de sangue e acidentes em laboratórios.

As leishmanioses são conhecidas e caracterizadas pela diversidade de sintomas clínicos causados: cutânea, mucocutânea e visceral. A leishmaniose visceral é a forma mais grave da doença, sendo fatal na maioria dos casos. Cerca de 90% da leishmaniose visceral ocorrem em cinco países: Brasil, Bangladesh, Índia, Nepal e Sudão. Estima-se uma ocorrência de 500.000 casos de leishmaniose do tipo visceral a cada ano (Guerim et al., 2002).

As leishmanioses vêm aumentando em todo o mundo. Nas últimas três décadas, houve um grande avanço no conhecimento da biologia celular e imunologia destas infecções, mas a quimioterapia não foi igualmente aprimorada (Rath et al., 2003).

As formas de tratamento têm se baseado na utilização de antimônios pentavalentes, como o antimoniatto de *N*-metil glucamina (Glucantime®), e o estibogliconato de sódio (Pentosan® ou Solustibosan®). A duração da terapia e a resposta clínica variam dependendo da região e da interação patógeno-hospedeiro. Na prática, a aplicação de altas doses destes medicamentos por prolongados períodos é comum. Isto se deve, em parte, à rápida eliminação destes compostos da corrente sanguínea. Em casos de recidiva ou em casos de leishmanioses do tipo visceral, indica-se o emprego da anfotericina B (Fungizon®). A anfoterecina B apresenta efeitos colaterais indesejados e até graves, necessitando ser ministrada em hospitais, o que representa uma dificuldade adicional no tratamento em se considerando as condições de saúde pública precárias nas regiões endêmicas. Esta terapia tem se mostrado pouco eficiente em diversos casos. Em pacientes resistentes ao Glucantime® e ao Fugizon®, não se identificam alternativas eficazes. Tende-se a repetir o tratamento, com doses nos limites da tolerância ou a utilizar o isotionato de pentamidina como uma última alternativa. Aliado a baixa eficácia de tratamento, observam-se também diversas

reações de toxicidade que vão desde náusea, vômitos, mialgia e até, nos casos mais graves, alterações eletrocardiográficas, hipersensibilidade e trombose venosa. A toxicidade é particularmente severa no tratamento de crianças e idosos ou indivíduos portadores de infecções oportunistas secundárias.

A doença de Chagas é uma infecção causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e transmitida ao homem por insetos, conhecidos como barbeiros. A infestação também pode ocorrer por transfusão de sangue, transplante de órgãos ou por via placentária. Essa doença é uma das maiores causas de mortalidade em muitos países da América do Sul, com aproximadamente 16-18 milhões de pessoas infectadas mundialmente e uma incidência anual de 700.000 - 800.000 de novos casos (Coura et al., 1985). Em 2009, a doença de Chagas completará 100 anos desde a sua descrição por Carlos Chagas. É uma doença tão negligenciada que seu censo não muda há pelo menos 10 anos, o que podemos notar segundo estatística exibida pela WHO ("World Health Organization") (Pupo et al., 2007).

A quimioterapia da doença de Chagas é bastante difícil, principalmente devido ao limitado número de medicamentos disponíveis, que na maioria são ineficazes e apresentam alta toxicidade aos pacientes.

Portanto, têm se tornado extremamente necessária a busca por novos fármacos menos agressivos aos pacientes e mais eficazes contra doenças causadas por parasitas da ordem Kinetoplastida.

7.4.7.2 - Avaliação biológica dos compostos isolados da esponja *Plakortis angulospiculatus*

Devido à pequena quantidade obtida do composto plakortenona (**183**), não foi possível realizar a avaliação farmacológica nos bioensaios de atividades antiparasitária, antineuroinflamatória e citotóxica.

As atividades leishmanicida, tripanomicida, antineuroinflamatória e citotóxica dos compostos (**184-187**) foram avaliadas *in vitro*.

A atividade leishmanicida contra *Leishmania chagasi* na forma promastigota mostrou que os compostos **184-187** eliminaram 100% dos parasitas em uma concentração máxima de 25 µg/mL com valores de IC₅₀ entre 1,9-8,5 µg/mL. Como

ilustrado na **Tabela 7.14**, o efeito leishmanicida mais potente foi observado para o plakortideo P (**184**) (IC_{50} de 1,9 $\mu\text{g/mL}$). Além disso, a análise por microscopia de transmissão eletrônica (**Figura 7.24**) mostrou que plakortídeo P (**184**) induziu uma completa alteração sobre promastigostas de *L.chagasi* indicando um efeito leishmanicida.

Geralmente, atividade leishmanicida é avaliada em promastigotas. Entretanto, amastigotas intracelulares de *L.chagasi* são patologicamente mais relevantes, pois eles apresentam um metabolismo distinto e uma elevada resistência no tratamento terapêutico se comparados aos promastigotas extracelulares (Rabinovitch et al., 1987). Assim, os compostos **184-187** também foram submetidos aos ensaios com amastigotas intracelulares e demonstraram significativa atividade leishmanicida em amastigotas com IC_{50} entre 0,5-3,4 $\mu\text{g/mL}$. O composto plakortídeo P (**184**) foi novamente o mais ativo, reduzindo em 100% os amastigotas intracelulares, com o valor de IC_{50} de 0,5 $\mu\text{g/mL}$, preservando a integridade da célula hospedeira.

O plakortideo P (**184**) não exibiu atividade hemolítica em eritrócitos de ratos, enquanto o policetídeo **185** demonstrou significativa atividade hemolítica (7,24%) em 6,25 $\mu\text{g/mL}$.

Nossos resultados mostram que o plakortídeo P (**184**) deve ser melhor avaliado em ensaios experimentais *in vivo* contra leishmaniose, pois apresentou seletiva atividade leishmanicida.

Para avaliar o índice de seletividade (IS, citotoxicidade IC_{50} sobre macrófagos/ atividade leishmanicida IC_{50} em amastigostas de *L.chagasi*) para os compostos **184-187**, a citotoxicidade contra macrófagos humanos foi determinada depois de 48 horas de incubação com o ensaio de MTT (Tada et al., 1986). Todos os compostos testados mostraram se citotóxicos. O índice de seletividade (IS) para o composto plakortídeo P (**184**) foi de 31,7, que é um valor considerado excelente.

Tabela 7.14 – Resultado do teste leishmanicida contra o parasita *Leishmania chagasi* e da atividade tripanomicida contra *T.cruzi* dos compostos (**184-187**) isolados da esponja *Plakortis angulospiculatus*.

	<i>L. chagasi</i> promastigotas EC ₅₀ µg/mL (C.I. 95%)	<i>L. chagasi</i> intracelular amastigotas EC ₅₀ µg/mL (C.I. 95%)	Atividade Hemolítica (%) a 6,25 µg/mL	Citotoxicidade EC ₅₀ µg/mL (C.I. 95%)	Índice de seletividade (parasitas intracelular)	<i>T. cruzi</i> IC ₅₀ µg/mL (C.I. 95%)
184	1,912	0,525	0	16,66	31,73	2,3
185	8,531	1,621	7,24	30,24	18,65	16,5
186	2,515	3,085	1,77	29,77	9,64	25,7
187	3,968	3,44	0	31,61	9,18	31,6
*	0,096	nd	nd	8,72	-	-
**	nd	21,0	nd	>1000	-	-

* Pentamidina, ** Glucantima - (fármacos padrões)

Com o propósito de determinar o modo de ação do plakortídeo P (**184**), macrófagos peritoneais foram incubados por 24 horas e a produção de óxido nítrico (NO) foi determinada por reação de Griess (Panaro et al., 1999). Lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) foi usado como controle interno para ativação dos macrófagos. Macrófagos imunologicamente ativados eliminam amastigostas intracelulares com produção de NO induzido por INF- γ de CD4⁺ T-células do tipo 1 (Sousa-Franco et al., 2006). Em contraste com o LPS, o plakortídeo P (**184**) não ativou a produção de NO pelos macrófagos. Já o antimônio pentavalente induz a fosforilação da kinase regulada extracelular 1 (ERK-1) e ERK-2 por meio de fosfoinositídeo kinase-3 (P13K), resultando na ativação da produção de NO pelos macrófagos (Mookerjee-Basu et al., 2006). O efeito leishmanicida de antimoniais pentavalentes parece sugerir a ativação na célula hospedeira através da regulação de espécies reativas oxigenadas (ROS), indicando a necessidade de uma célula T funcional para atividade antimonial pentavalente (Mookerjee-Basu et al., 2006). Dessa forma, pacientes imunossuprimidos, como portadores do vírus HIV, e que apresentem sintomas de leishmaniose, não podem ser eficientemente tratados com antimoniais pentavalentes. Nossos dados sugerem que o plakortídeo P (**184**) elimina eficientemente amastigostas intracelulares por outro modo

que não a produção de NO, provavelmente envolvido em específica atividade leishmanicida.

Com o objetivo de avançar na avaliação de mudanças ultra-estruturais em *L.chagasi* na presença do plakortídeo P (184), promastigotas foram incubados com o ácido (184) e analisados por microscopia de transmissão eletrônica. A **Figura 7.24-A** mostra promastigotas na ausência do plakortídeo P (184). Depois de 3 horas de incubação com o plakortídeo P (184), observa-se um inchaço mitocondrial nas promastigotas (**Figura 7.24-B e 7.24-C** – “seta branca”) e um concomitante aumento do número de vacúolos. Além do mais, foi observado cromatina anormal nos parasitas demonstrando dano ao núcleo da *Leishmania* (**Figura 7.24-B** – “seta preta”), e a presença de bolhas na membrana do flagelo também demonstra danos induzidos pelo plakortídeo P (184). Apesar dessas modificações significativas, nenhuma alteração, como formação de poros, foi notada dentro da membrana celular, cuja integridade foi preservada (**Figura 7.24-F** – “seta branca”). Depois de 5 horas de incubação, a membrana celular descola e forma bolhas (**Figura 7.24-E** – “seta preta”), ocorrendo a destruição completa do núcleo com a descondensação da cromatina e bolhas na membrana nuclear (**Figura 7.24-D** – “seta branca”). Esta última etapa é só para mostrar que o parasita não se recupera do dano ocorrido nas etapas anteriores. Estas informações indicaram uma extensiva alteração morfológica de promastigotas de *L. chagasi* na presença de plakortídeo P (184).

Esta é a primeira vez que foi descrita a atividade leishmanicida contra *L.chagasi* altamente seletiva do plakortídeo P (184), isolado da esponja *Plakortis angulospiculatus*.

Figura 7.24 – Microscopia de transmissão eletrônica de *Leishmania chagasi* incubada com composto plakortídeo P (184). Promastigotas foram incubados por diferentes períodos a 24 °C.

(A) - Grupo controle; (B, C)- 3 horas de incubação; (D, E) - 5 horas de incubação.

K- Cinetoplastida; M- Mitocôndria; N- Núcleo; FP- bolsa flagelar; L- Inclusão de lipídio, V- Vacúolos e MT- Microtúbulos.

Os compostos **184-187** também foram testados contra o agente etiológico da doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*. A atividade tripanomicida foi determinada usando tripomastigotas do tipo LLC-MK2 derivadas de *T. cruzi* (linhagem Y), usando o ensaio MTT. Depois de 24 horas de incubação, todos os parasitas *T. cruzi* foram mortos pelos compostos **184-187**, sendo que o plakortídeo P (**184**), apresentou a atividade mais potente (IC_{50} de 2,3 $\mu\text{g/mL}$) (**Tabela 7.14**), sendo este valor de IC_{50} 15 vezes mais potente que a atividade apresentada pelo benzinidazol, o único agente antitripanossomal clinicamente disponível e, ineficiente em casos de doença de Chagas crônica (Coura et al., 1985).

Do nosso conhecimento, apenas sesterterpenos obtidos de esponjas da espécie *Hyrtios erecta* foram previamente descritos como produtos naturais marinhos ativos contra *T. cruzi*.

A **Tabela 7.15** apresenta os efeitos antineuroinflamatórios dos compostos **182, 184-187**, determinados pelo efeito sobre a liberação de tromboxana B_2 (TXB_2) ou ânion superóxido (O_2^-) de micróglia de cérebros de ratos ativada (Mayer et al., 2005), ambos mediadores envolvidos em distúrbios neurodegenerativos e neuroinflamatórios (Mayer et al., 1998 e 1999).

O plakortídeo P (**184**) inibiu potentemente a geração de TXB_2 ($IC_{50} = 0,93 \mu\text{M}$) com baixa liberação de lactato desidrogenase ($LDH_{50} > 10 \mu\text{M}$), uma enzima considerada um marcador para toxicidade celular (Mayer et al., 2005 e 1999). Em contraste, enquanto os compostos **185-187** foram relativamente não-tóxicos para microglia celular ($LDH_{50} > 10 \mu\text{M}$), eles foram minimamente efetivos como inibidores de liberação de TXB_2 e O_2^- ($IC_{50} > 10 \mu\text{M}$). Com esses dados, concluímos que o plakortídeo P (**184**), possui efeitos farmacológicos sem natureza toxicológica, e pode também ser considerado um promissor composto para o desenvolvimento de um novo potente agente antineuroinflamatório.

Tabela 7.15 – Resultado do teste de atividade antineuroinflamatória.

	Atividade antineuroinflamatória		
	O ₂ ⁻	TXB ₂	LDH
182	>1	>1	>10
184	>10	0,93	>10
185	>10	>10	>10
186	>10	>10	>10
187	>10	>10	>10

* Ensaios antineuroinflamatório – Efeito sobre micróglia de ratos PMA [1 mM] – liberação estimulada de O₂⁻, TXB₂ e LDH. Dados correspondem a dois experimentos independentes e são expressos como IC₅₀ (μM) para O₂⁻ e TXB₂LDH (μM) é a concentração do composto que causa 50% da liberação de LDH com 0,1% de triton-X-100 micróglia tratada.

Na **Tabela 7.16** estão apresentados os resultados da avaliação citotóxica dos compostos **182**, **185-187** contra 4 linhagens de células cancerígenas humanas. Todos os compostos mostraram apresentar fraca atividade neste bioensaio.

Tabela 7.16 – Resultado do teste de citotoxicidade dos compostos isolados (**182**, **185-187**) da esponja *Plakortis angulospiculatus*.

IC ₅₀ μg/mL (C.I. 95%)				
Compostos	MDA-MB435	HCT-8	HL60	SF 295
182	10,36	3,01	9,77	13,29
185	9,57	7,21	8,66	11,45
186	>25	>25	>25	>25
187	6,52	8,00	15,21	16,80

Linhagens celulares: MDA-MB435 (Mama humano), HCT-8 (cólon humano), HL60 (Leucemia humana), SF 295 (Sistema nervoso humano).

Com os resultados mencionados nas **Tabelas 7.14**, **7.15** e **7.16** conclui-se que apesar dos compostos já serem estruturalmente conhecidos, apresentaram ótimos resultados nos testes de avaliação biológica podendo ser objetos de estudo para promissores candidatos a fármacos antiparasitários e antineuroinflamatórios.

Capítulo 8

Estudo químico do extrato bruto do ocotocoral *Carijoa riisei*

8.1. Introdução

Os corais são animais pertencentes ao Filo Cnidaria (parentes das medusas e águas-vivas), classe Anthozoa (animais em forma de flor). Podem ser divididos em dois grupos bastante distintos: os octocorais - possuem oito tentáculos parecidos a plumas; e os hexacorais - possuem seis tentáculos simples ou múltiplos de seis. Os octocorais não constroem esqueleto de carbonato de cálcio e não são considerados organismos formadores de recifes. Por outro lado, os hexacorais, com mais de 2500 espécies conhecidas são os construtores de recifes mais importantes que existem. Os corais podem ser tanto solitários como viver em colônias (Ruppert e Barnes, 1996).

Os octocorais ou cnidários são invertebrados aquáticos, predominantemente marinhos. Ocorrem nos mais variados ambientes marinhos, desde a região entremarés até as grandes profundidades. São conhecidas cerca de 2000 espécies de octocorais no mundo todo, incluídas em aproximadamente 230 gêneros.

Os cnidários estão entre os organismos mais venenosos e peçonhentos que se conhece, apesar de a maioria ser inofensiva para o ser humano. Parte do seu arsenal químico tem grande potencial de aplicação farmacológica, uma vez que estas toxinas apresentam muitas vezes ação em sistemas específicos (Migotto et al., 1999). Estas toxinas são, na maioria das vezes, de natureza peptídica. Porém, os animais da Subclasse Octocorallia, em particular da Ordem Gorgonacea e da Ordem Alcyonacea, são notórios produtores de produtos naturais bioativos pertencentes principalmente à classe dos terpenos.

Ocotocorais são a mais prolífica reserva de pregnanos esteroidais entre os invertebrados marinhos. Há hipóteses em que estes esteróides atuam como biorreguladores no processo de reprodução destes invertebrados, mas também há hipóteses em que estes compostos promovam proteção contra predadores, induzindo vômitos, já que não possuem defesas físicas. A origem biossintética de misturas

freqüentemente complexas de esteróides torna-se enigmática. A conversão do colesterol para pregnanos esteroidais é realizada pela clivagem da cadeia lateral do colesterol, catalisada pela família de enzimas do citocromo P-450 (CYP). Ao menos 6 enzimas do citocromo P-450 parecem participar da esteroidogênese, catalisando seqüencial hidroxilação, e quebra das ligações dihidroxiladas C-20 a C-22 resultando na pregnenolona. (Dorta et al., 2004a).

Atualmente são conhecidos mais de 3.500 compostos isolados de cnidários marinhos, a grande maioria isolados a partir de octocorais (Blunt et al., 2008). Dentre estes, alguns se destacam pelo seu potencial de aplicabilidade farmacológica.

8.2. Produtos Naturais isolados de octocorais do gênero *Carijoa*

Octocorais do gênero *Carijoa*, também conhecido como *Telesto*, já foram bastante estudados, a partir dos quais já foram isolados muito compostos.

Da espécie *Carijoa multiflora*, coletado no Panamá, foram isolados pregnanos clorados incomuns. Os compostos **188** e **189** são epímeros em C-2, tendo ambos o anel A totalmente funcionalizados com uma 1,2-cloroidrina e um grupo 3-cetoenona (Dorta et al., 2004a). Desta mesma espécie, também foi obtida a carijenona (**190**), uma nova classe de prostanóide bicíclico. Prostanóides são um grupo de potentes substâncias bioativas produzidas, ou do ácido araquidônico via ciclo oxigenase (COX) ou de um dos diversos ácidos graxos poli-insaturados via ciclo lipoxigenase (LOX). (Dorta et al., 2004b).

Figura 8.1 – Substâncias isoladas da espécie *Carijoa multiflora*.

Do octocoral *Teleso riisei* já foram isolados 19 (**191-209**) prostanóides altamente funcionalizados, as punaglandinas. As punaglandinas, eicosanóides halogenados, são caracterizadas pela oxigenação nos carbonos C-5, C-6, C-7 e C-12, pela presença de um átomo de cloro no C-10 e por apresentar um ciclo pentenona no C-9. Estes compostos apresentaram atividade anti-inflamatória e antitumoral. (Baker et al., 1985 e 1994).

Figura 8.2 – Punaglandinas obtidas do extrato do octocoral *Telesto riisei*.

Duas novas amidas citotóxicas (**210** e **211**) e dois novos esteróides hidroxilados (**212** e **213**) foram obtidos do octocoral *Telesto riisei*, coletado no atol de Chuuk – Estado Federativo da Micronésia (Liyanage e Schmitz, 1996 e 1998).

Figura 8.3 – Exemplos de compostos isolados de octocorais.

De um extrato da espécie *Carijoa riisei* coletada no Rio de Janeiro, foram obtidos novos esteróis glicosilados citotóxicos. As riiseinas A (214) e B (215) demonstraram citotoxicidade *in vitro* contra células HCT-116 (Adenocarcinoma de cólon humano) com valor de IC₅₀ de 2,0 µg/mL (Maia, et al., 2000)

Figura 8.4 – Esteróis glicosilados citotóxicos obtidos da espécie *Carijoa riisei*.

A variedade de metabólitos secundários encontrados no octocoral *Carijoa riisei* pode indicar que variações temporais ou geográficas refletem na produção dos compostos devido as diferentes condições ambientais, fenótipas ou outros fatores bióticos.

8.3. Estudo químico do extrato bruto do ocotocoral *Carijoa riisei* – Procedimento Experimental

O ocotocoral *Carijoa riisei* (89,0 g) foi coletado em São Sebastião - SP, em 1997. O animal foi imediatamente imerso em EtOH e mantido a -20°C .

Uma alíquota do extrato bruto deste animal apresentou atividade citotóxica contra linhagens de células MCF-7 (câncer de mama), melanoma e cólon. Seu extrato bruto também apresentou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp e *Proteus* spp, todas contra bactérias resistentes a antibióticos.

O trabalho de isolamento químico do extrato do ocotocoral *Carijoa riisei* foi realizado de acordo com o procedimento sumarizado no **Esquema 8.1**.

Esquema 8.1. Fluxograma do estudo químico do extrato do octocoral *Carijoa riisei*.

O EtOH de armazenamento foi filtrado e concentrado. O animal foi triturado, re-extraído exaustivamente com MeOH. Os extratos EtOH e MeOH foram filtrados (filtrados a vácuo, utilizando-se uma camada de celite em funil de Büchner) reunidos e concentrados. O extrato bruto concentrado foi ressuspensionado em água (500 mL). Realizou-se uma partição da suspensão hidroalcolica (500 mL) com *n*-hexano (500 mL, procedimento repetido por três vezes), resultando em duas frações, MeOH-H₂O e hexânica. Os extratos foram concentrados, pesados e avaliados por CCD utilizando-se como reveladores lâmpada de UV ($\lambda_{\text{máx}} = 254 \text{ nm}$), Dragendorff, ácido fosfomolibdico e ninidrina.

8.3.1 - Estudo do extrato hexânico do ocotocoral *Carijoa riisei*

A fração hexânica (Cr-H) foi dividida em duas e ambas foram submetidas a uma separação por cromatografia rápida ("flash") em coluna de sílica gel 230-400 Mesh, utilizando-se um gradiente de AcOEt em *n*-hexano nas seguintes proporções: hex/AcOEt 95:5, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1, 100% AcOEt e 100% MeOH.

As frações foram analisadas por CCD (revelador: lâmpada UV e ácido fosfomolibdico) e, frações resultantes das duas cromatografias foram reunidas de acordo com sua similaridade cromatográfica (por CCD), resultando em 10 sub-frações. Estas foram analisadas por CCD e RMN-¹H sendo selecionada para continuidade do estudo a fração Cr-H-5. A fração Cr-H-5 foi purificada por CLAE-UV no modo fase reversa utilizando-se uma coluna C₁₈ CSC-inertsil (150 Å/ODS2, 5 µm) com eluição isocrática de uma mistura de H₂O/ACN/*i*-PrOH (35:15:50). A purificação foi monitorada em $\lambda_{\text{máx}} = 280 \text{ nm}$. Obteve-se assim o composto já conhecido na literatura identificado como sendo o 18-acetóxipregna-1,4,20-trien-3-ona (**216**) (5,0 mg, 0,006%) (Ross e Scheuer, 1979).

8.3.2 - Estudo do extrato aquoso do octocoral *Carijoa riisei*

Como o extrato aquoso demonstrou apresentar (por CCD) somente compostos característicos de metabólitos primários, como aminoácidos, decidimos por não continuar seu fracionamento.

8.4. Resultados e Discussão

O octocoral *Carijoa riisei* (**Figura 8.5**) foi descrito pela primeira vez por Duchassaing & Michelotti (1860) em Pearl Harbor - Hawaii e sua classificação taxonômica é apresentada na **Figura 8.6**.

O octocoral *Carijoa riisei* é muito comum no litoral norte de São Paulo, principalmente em águas rasas.

Figura 8.5 - Foto do octocoral *Carijoa riisei*.
(Fonte: <http://www.ipaq.org.br/modules.php?name=Aquarioes>)

Filo: Cnidaria
Classe: Anthozoa
Subclasse: Octocorallia
Ordem: Telestacea
Família: Clavulariidae
Gênero: *Carijoa*
Espécie: *Carijoa riisei*.

Figura 8.6 - Taxonomia do octocoral *Carijoa riisei*.

O extrato bruto do octocoral *Carijoa riisei* coletado em São Sebastião-SP, apresentou atividade citotóxica contra linhagens de células MCF-7 (câncer de mama), melanoma e cólon. O extrato bruto também apresentou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. e *Proteus* spp, todas contra bactérias resistentes à antibióticos.

O fracionamento do extrato bruto desse animal resultou no isolamento de um único constituinte, o esteróide 18-acetóxipregna-1,4,20-trien-3-ona (**216**). A identificação deste composto foi realizada pela análise dos seus dados espectroscópicos (RMN- ^1H , RMN- ^{13}C , HMQC, HMBC e COSY ^1H - ^1H), espectrometria de massas, bem como por comparação com dados existentes na literatura.

8.4.1. Determinação estrutural do esteróide 18-acetóxipregna-1,4,20-trien-3-ona (**216**)

O esteróide 18-acetóxipregna-1,4,20-trien-3-ona (**216**) foi obtido como um sólido vítreo amarelo e mostrou ser opticamente ativo com $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = + 36,25$ (c 0,0032, MeOH). Seu espectro de absorção no ultravioleta (**V.2, Figura 8.6**) em MeOH apresentou $\lambda_{\text{máx}}$ (ϵ): 245 nm (15600).

O espectro de massas (**V.2, Figura 8.7**) em modo spray de elétrons (LRESIMS) apresentou um pico de íon aduto cationizado com sódio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ em m/z 377,3 compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{O}_3\text{Na}$. Pelo cálculo do índice de deficiência de hidrogênios (IDH) pudemos verificar que a estrutura possui nove insaturações, sendo quatro referentes a quatro anéis, duas de carbonilas e três de duplas ligações.

Em seu espectro de absorção no infravermelho (filme em disco de silício) foram observadas as seguintes bandas (**V.2, Figura 8.6**):

- 2939,53 cm^{-1} , atribuída a C-H de alcanos;
- 1737,27 cm^{-1} atribuída a grupo carbonila do tipo éster;
- 1663,53 cm^{-1} atribuída a grupo C=O.

A estrutura do esteróide isolado foi completamente determinada pela análise dos dados espectroscópicos de RMN mono e bidimensionais (^1H , ^{13}C - BBD, DEPT 135°,

HMQC, HMBC e COSY ^1H - ^1H) – (V.2, Figuras 8.1, 8.2, 8.3, 8.4 e 8.5, respectivamente) e também por comparação com dados da literatura.

Inicialmente, no espectro de RMN- ^1H (V.2, Figura 8.1), verificou-se a presença de seis sinais de hidrogênios em duplas ligações: δ 7,2 (d, 10,1 Hz); δ 6,11 (dd, 10,1 e 1,8 Hz); δ 6,00 (s); δ 5,79 (ddd, 17,2, 10,4 e 7,6 Hz); δ 4,94 (d, 10,4 Hz) e δ 4,91 (d, 1,6 Hz), um sinal com δ 2,0 (s) referente a uma metila característica de grupo éster e deslocamentos químicos entre δ 0,90 e 2,50 típicos de esqueleto terpênico do tipo esteroidal. Também se observou um sinal de um singlete em δ 1,2 referente a uma metila.

Os sinais em δ 5,79 (ddd, 17,2, 10,4 e 7,6 Hz); δ 4,94 (d, 10,4 Hz) e δ 4,91 (d, 1,6 Hz) no espectro de ^1H e os sinais de carbono em δ 139,3 (C-20) e 114,1 (C-21) caracterizam a presença da ligação dupla em C-20 e C-21, posição esta que pôde ser confirmada através da análise do mapa de correlações HMBC.

No espectro de RMN- ^{13}C do esteróide (216) (V.2, Figura 8.2), pôde-se distinguir 23 sinais de carbonos.

Os sinais de carbonos quaternários em δ 185,2 (C-3) e 170,5 (C-22) são característicos de carbonos carbonílicos, sendo o sinal em δ 170,5 (C-22) típico de grupo éster.

O sinal de carbono em δ 61,5 (C-18) é característico de carbono ligado a oxigênio. Como já havia sido observado a presença de uma metila de éster em δ_{H} 2,0 e δ_{C} 21,0 (CH₃-23), provavelmente o carbono em δ 61,5 (C-18) estaria ligado ao grupo acetato.

No espectro COSY pôde-se observar acoplamentos do hidrogênio com deslocamento químico em δ 5,79 (H-20) com os hidrogênios em δ 2,08 (H-17) e em δ 4,91 e 4,94 (H-21ab) mostrando a ligação entre o anel **D** no carbono 17 com a dupla ligação.

Os anéis **A** e **B** mostraram estar conectados através dos acoplamentos observados entre os hidrogênios da metila CH₃-19 (δ 1,2) com o hidrogênio em H-9 (δ 1,04), e entre os hidrogênios H-4 (δ 6,0) e H-6b (δ 2,5). A conexão entre os anéis **B** e **C** pôde ser estabelecida através dos acoplamentos entre os hidrogênios da metila em

δ 1,2 (CH₃-19) com os hidrogênios em H-8 (δ 1,74) e H-11b (δ 1,69). A correlação observada entre os hidrogênios H-14 (δ 1,22) com H15ab (δ 1,67 e 1,75, respectivamente) e a correlação entre H-12b (δ 1,72) e H-17 (δ 2,08) demonstra indícios da conectividade entre os anéis **C** e **D**. Também foram observadas correlações entre hidrogênios geminais: H-6 (δ 2,33 e 2,50); H-11 (δ 1,24 e 1,69); H-12 (δ 1,55 e 1,72); H-16 (δ 1,02 e 2,05); H-18 (δ 3,98 e 4,05) e H-21 (δ 4,91 e 4,94). As correlações observadas no espectro COSY (V.2, **Figura 8.5**) encontram-se ilustradas no **Esquema 8.2**.

Esquema 8.2 - Esquema de correlações observadas no espectro de RMN do tipo COSY para o esteróide 18-acetóxpregna-1,4,20-trien-3-ona (216).

No mapa de correlações HMBC (**V.2, Figura 8.4**) pôde-se observar correlação entre o C-1 (δ 156,6) com os hidrogênios da metila em δ 1,2 (CH₃-19) e entre C-2 (δ 126,9) com o hidrogênio olefínico em δ 6,00 (H-4).

O carbono carbonílico em δ 185,2 (C-3) mostrou estar acoplado com o hidrogênio olefínico em δ 7,2 (H-1). O sinal referente a C-4 (δ 123,3) mostrou acoplamento com H-2 (δ 6,11) e H-6b (δ 2,50) dando indícios da conectividade entre os anéis **A** e **B** o que também pôde ser observado com as correlações entre C-6 (δ 32,2) e H-1 (δ 7,2) e H-4 (δ 6,0). O carbono com sinal em δ 169,6 (C-5) apresentou correlação com H-1 (δ 7,2) e H-19 (δ 1,2).

O sinal em δ 35,0, referente a C-8, mostrou estar acoplado com os hidrogênios geminais em δ 0,96 e 1,92 (H-7ab), com o hidrogênio em δ 1,22 (H-14) e com o hidrogênio em δ 1,67 (H-15a) mostrando relação entre os anéis **B**, **C** e **D**.

Foram observadas correlações do carbono em δ 52,3 (C-9) com os hidrogênios H-1 (δ 7,2), H-14 (δ 1,22) e H-19 (δ 1,2) e do carbono em δ 43,4 (C-10) com os hidrogênios em δ 7,2 (H-1), δ 6,11 (H-2), δ 6,0 (H-4) e δ 1,2 (H-19).

O sinal referente ao carbono com deslocamento químico em δ 46,2 (C-13) deu indícios da conectividade entre os anéis **C** e **D** e a cadeia contendo o grupo éster já que apresentou correlações com os hidrogênios H-18b (δ 4,05), H-15b (δ 1,75), H-16ab (δ 1,02 e 2,05) e H-17 (δ 2,08).

O carbono em δ 54,1 (C-17) demonstrou acoplamento com os hidrogênios H-18ab (δ 3,98 e 4,05), H-15a (δ 1,67) e H-21ab (δ 4,91 e 4,94) sugerindo ligação do anel **D** com a cadeia olefínica e a cadeia contendo o grupo éster.

E, finalmente, o carbono carbonílico do grupo éster em δ 170,6 (C-22) mostrou estar acoplado com os hidrogênios do grupo metila em δ 2,0 (CH₃-23) e com os hidrogênios do grupo metilênico (CH₂-18) em δ 3,98 e 4,05.

As principais correlações observadas no espectro HMBC (**V.2, Figura 8.4**) encontram-se ilustradas no **Esquema 8.3**.

Esquema 8.3 - Esquema de correlações observadas no espectro de RMN do tipo HMBC para o esteróide 18-acetóxpregna-1,4,20-trien-3-ona (**216**).

Desta maneira foi possível estabelecer a estrutura do composto isolado do octocoral *Carijoa riisei* onde uma busca na literatura nos possibilitou identificar como sendo o esteróide 18-acetóxipregna-1,4,20-trien-3-ona (**216**).

Figura 8.7 - Estrutura do esteróide 18-acetóxipregna-1,4,20-trien-3-ona (**216**).

Tabela 8.1 – Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C e correlações à longa distância observadas no espectro COSY ^1H - ^1H e HMBC ^{13}C - ^1H do esteróide (**216**) em DMSO- d_6 .

	$\delta^{13}\text{C}$ HMQC	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz, integral) (500 MHz)	COSY	HMBC (4 Hz)	HMBC (8 Hz)	HMBC (12 Hz)
1	156,6	7,2 (d, 10,1 Hz, 1H)	H2	H19	H19	H19
2	126,9	6,11 (dd, 10,1 e 1,8 Hz, 1H)	H1	H4	H4	H4
3	185,2	-	-	H1	H1	H1
4	123,3	6,0 (s, 1H)	H6b	H2, H6b	H2	H2, H6a
5	169,6	-	-	H1, H19	H1, H19	H1, H19
6	32,2	a) 2,33 (dt, 12,8 e 2,2 Hz, 1H); b) 2,50 (m, 1H).	a) H6b, H7ab; b) H4, H6a, H7ab	H1, H4	H4	H4
7	33,6	a) 0,96 (dd, 13,4 e 2,9 Hz, 1H); b) 1,92 (m, 1H)	a) H6ab, H7b, H9 b) H6b, H7a, H9	-	H9	H8
8	35,0	1,74 (m, 1H)	H9, H14	H16a	H7ab, H14, H15a	H7a
9	52,3	1,04 (m, 1H)	H7ab, H8, H12a, H19	H1, H14, H19	H7b, H14, H19	H14, H19
10	43,4	-	-	H1, H19	H1, H2, H4, H6a, H19	H1, H2, H4, H19
11	24,5	a) 1,24(m, 1H); b) 1,69 (m, 1H)	a) H11b; b) H11a, H14, H17, H19	-	H14	H14
12	22,2	a) 1,55 (ddd, 26,0, 13,0 e 3,5 Hz, 1H); b) 1,72 (m, 1H)	a) H11b, H18b; b) H12a, H17	H9	-	H9
13	46,2	-	-	H15b, H16a, H18b	H16b, H17	H16b, H17
14	53,7	1,22 (m, 1H)	H15a	-	H11b, H15a, H18ab	H18b
15	26,8	a) 1,67 (m, 1H); b) 1,75 (m, 1H)	a) H16b, H17; b) H14, H16a, H17	-	H12a	H16b
16	32,1	a) 1,02 (m, 1H); b) 2,05 (m, 1H)	a) H15b, H16b, H17; b) H15a, H16a	H18ab	H18ab	H18a
17	54,1	2,08 (m, 1H)	H15b, H16a, H20, H21ab	H21ab, H18ab	H18ab, H21b, H15a	H18ab, H21b
18	61,5	a) 3,98 (d, 11,8 Hz, 1H); b) 4,05 (d, 11,8 Hz, 1H)	a) H18b; b) H18a	-	H17	H16a
19	18,7	1,20 (sl, 3H)	H8, H9, H12a	H1, H9	H1, H9	H1
20	139,3	5,79 (ddd, 17,2; 10,4 e 7,6 Hz, 1H)	H21ab, H17	-	H17, H11b	H21b, H17
21	114,1	a) 4,91 (d, 1,6 Hz, 1H); b) 4,94 (d, 10,4 Hz, 1H).	a) H17, H21b, H20; b) H17, H21a, H20	-	H17	H17
22	170,6	-	-	H23, H18b	H23	H23
23	21,0	2,00 (s, 3H)	-	-	-	-

Tabela 8.2 – Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C do esteróide (**216**) comparados com valores de deslocamentos químicos do mesmo composto encontrado na literatura.

	Cr-H-5b (DMSO- d_6)		(Literatura)* (CDCl $_3$)		(Literatura)** (CDCl $_3$)	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz, integral)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz, integral)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult, J/Hz, integral)
1	156,6	7,2 (d, 10,1 Hz, 1H)	155,8	7,06 (d, 10,0 Hz, 1H)	155,6	7,03 (d, 10,1 Hz, 1H)
2	126,9	6,11 (dd, 10,1 e 1,8 Hz, 1H)	127,6	6,25 (dd, 10,0 e 2,0 Hz)	127,6	6,23 (dd, 10,1 e 1,9 Hz, 1H)
3	185,2	-	186,3	-	186,3	-
4	123,3	6,0 (s, 1H)	124,0	6,09 (s)	124,0	6,07 (s, 1H)
5	169,6	-	168,9	-	168,5	-
6	32,2	2,50 (m, 1H); 2,33 (dt, 12,8 e 2,2 Hz, 1H)			32,7	2,46 (m, 1H); 2,36 (ddd, 13,3, 4,1 e 2,5 Hz, 1H)
7	33,6	0,96 (dd, 13,4 e 2,9 Hz, 1H); 1,92 (m, 1H)			33,7	1,08 (m, 1H); 1,98 (m, 1H)
8	35,0	1,74 (m, 1H)			35,6	1,73 (m, 1H)
9	52,3	1,04 (m, 1H)			52,6	1,12 (m, 1H)
10	43,4	-			43,5	-
11	24,5	1,24(m, 1H); 1,69 (m, 1H)			22,5	1,78 (m, 1H); 1,58 (m, 1H)
12	22,2	1,55 (ddd, 26,0; 13,0 e 3,5 Hz, 1H); 1,72 (m, 1H)			32,5	2,17 (m, 1H); 0,98 (m, 1H)
13	46,2	-			46,3	-
14	53,7	1,22 (m, 1H)			54,3	1,28 (m, 1H)
15	26,8	1,75 (m, 1H); 1,67 (m, 1H)			24,8	1,89 (m, 1H); 1,26 (m, 1H)
16	32,1	2,05 (m, 1H); 1,02 (m, 1H)			27,1	1,90 (m, 1H); 1,73 (m, 1H)
17	54,1	2,08 (m, 1H)			54,6	2,08 (m, 1H)
18	61,5	4,05 (d, 11,8 Hz, 1H); 3,98 (d, 11,8 Hz, 1H)	62,3	4,08 (s)	62,1	4,07 (Abq, 11,8, 1H)
19	18,7	1,20 (sl, 3H)	18,5	1,24 (s)	18,8	1,24 (s, 3H)
20	139,3	5,79 (ddd, 17,2; 10,4 e 7,6 Hz, 1H)	138,3	5,84 (dd, 18,0 e 10,0 Hz)	138,8	5,80 (ddd, 17,2, 10,2 e 7,7 Hz, 1H)
21	114,1	4,94 (d, 10,4 Hz, 1H); 4,91 (d, 1,6 Hz, 1H)	114,2	5,01 (dd, 18,0 e 2,0 Hz); 4,96 (dd, 10,0 e 2,0 Hz)	114,0	4,96 (dd, 17,2 e 1,6 Hz, 1H); 4,93 (dd, 10,2 e 1,6 Hz, 1H)
22	170,6	-	171,2	-	171,2	
23	21,0	2,00 (s, 3H)			21,1	2,05 (s, 3H)

* Ross e Scheuer, 1979. ** Ciavatta et al., 2004.

O esteróide 18-acetóxipregna-1,4,20-trien-3-ona (**216**), foi o primeiro metabólito secundário isolado deste octocoral (Ross e Scheuer, 1979). Mais recentemente, o mesmo composto foi re-isolado por Ciavatta et al., 2004.

Compostos esteroidais de organismos marinhos mostram uma ampla coleção de estruturas atípicas. Pregnanos C₂₁ e seus glicosídeos são caracterizados pela cadeia vinila lateral, representando um grupo minoritário de metabólitos secundários. Octocorais são a principal reserva deste tipo de composto, embora pregnanos tem sido isolados também de esponjas e equinodermos (Dorta et al., 2004a).

8.5 - Avaliação biológica do composto 18-acetóxipregna-1,4,20-trien-3-ona (**216**)

A substância 18-acetóxipregna-1,4,20-trien-3-ona (**216**) por nós isolada do octocoral *Carijoa riisei* apresentou moderada atividade citotóxica frente a 4 diferentes linhagens de células tumorais conforme a **Tabela 8.3** a seguir:

Tabela 8.3: Resultado do ensaio *in vitro* da atividade citotóxica do 18-acetóxipregna-1,4,20-trien-3-ona (**216**).

IC ₅₀ µg/mL (C.I. 95%)			
SF 295 (Sistema nervoso central)	MDA-MB435 (Mama humano)	HCT8 (Cólon humano)	HL60 (Leucemia humana)
14,4	23,1	22,0	12,4

O composto 18-acetóxipregna-1,4,20-trien-3-ona (**216**) também foi avaliado nos testes de atividade leishmanicida contra *L.chagasi*, tripanomicida contra *T.cruzi* bem como sua citotoxicidade em células de mamíferos (**Tabela 8.4**)

Tabela 8.4 - Avaliação biológica do 18-acetóxipregna-1,4,20-trien-3-ona (**216**) frente aos testes de atividade leishmanicida contra *L.chagasi*, tripanomicida contra *T.cruzi* e citotoxicidade em mamíferos.

	IC ₅₀ (µg/mL) (95%CI)			Citotoxicidade	Atividade hemolítica (%) à 25 µg/mL
	<i>L. chagasi</i> promastigotas	<i>L. chagasi</i> amastigotas	<i>T. cruzi</i> trypomastigotas		
Esteróide (216)	5,51 (4,94 - 6,14)	16,88 (9,62 - 29,59)	50,50 (37,29 - 68,40)	10,68 (7,75 - 14,72)	2,3
Pentamidina	0,17 (0,15 - 0,19)	nd	nd	8,70 (7,24 - 10,52)	nd
Glucantima	nd	29,55 (28,09 - 31,09)	nd	>1000	nd
Benzinidazol	nd	nd	44,86 (25,9 - 77,5)	> 500	nd

IC₅₀ = Concentração inibitória a 50%; 95% CI = 95% de intervalo de confiança; nd = não determinado.

O esteróide mostrou atividade contra tripomastigotas com valor de IC₅₀ (50,5 µg/mL) bem próximo ao valor de IC₅₀ do fármaco benzinidazol (IC₅₀ 44,86 µg/mL) (fármaco padrão). Contra promastigotas de *L.chagasi* demonstrou ser 10 vezes mais efetiva do que contra *T.cruzi* com IC₅₀ de 5,5 µg/mL. O índice de seletividade para *Leishmania* foi calculado considerando a citotoxicidade em macrófagos (IC₅₀ de 10,6 µg/mL) e demonstrou que o esteróide apresenta duas vezes mais toxicidade para promastigotas do que para macrófagos.

Contra amastigotas intracelulares de *Leishmania chagasi*, o composto 18-acetóxipregna-1,4,20-trien-3-ona (**216**) apresentou moderada atividade com valor de IC₅₀ de 16,88 µg/mL. A glucantima foi usado como fármaco padrão com valor de IC₅₀ de 29,55 µg/mL.

Não há na literatura nenhuma menção sobre atividade tripanomicida e leishmanicida do esteróide 18-acetóxipregna-1,4,20-trien-3-ona (**216**).

Com os resultados obtidos, concluímos que o esteróide 18-acetóxipregna-1,4,20-trien-3-ona (**216**) poderia ser objeto de estudo para protótipos de fármacos contra essas doenças parasitárias.

Capítulo 9

Conclusões

Neste trabalho realizou-se a investigação química de extratos bioativos de cinco invertebrados marinhos: três ascídias, uma esponja e um ocotocoral, todos oriundos da costa do Brasil. Estes extratos foram selecionados a partir das análises de atividades biológicas, de CCD, CLAE e RMN-¹H.

Foram isolados 15 compostos, sendo 7 estruturalmente inéditos e 8 conhecidos. Os compostos isolados a partir desses extratos são listados na **Tabela 9.1**.

O extrato da ascídia *Clavelina oblonga*, coletada em São Sebastião - SP, apresentou atividade antibiótica contra *Candida albicans*, *Enterobacter spp.* e *Staphylococcus aureus*. A partir desse extrato foram isolados dois compostos: a 5-[3,5-dibromo-4-([2-oxo-5-oxazonidinil])metoxifenil]2-oxazolidinona (**73**) e o (2S,3R)- 2-amino-3-dodecanol (**74**), inédito na literatura. A determinação da configuração absoluta de **74** foi estabelecida através de reação de derivatização seguida por comparação da curva de dicroísmo circular com curvas de compostos modelos. A substância (**74**) apresentou uma potente atividade antifúngica contra *Candida albicans* (CIM = 0,7 µg/mL) e moderada atividade contra *Candida glabrata* (CIM = 30,0 µg/mL).

Do extrato da ascídia *Didemnum ligulum*, coletada em São Sebastião – SP, foram obtidos a asterubina (**109**), identificada por análise por difração de raios-x, e a *N,N*-dimetil-O-metiletanolamina (**110**), inédita na literatura, identificada pela análise de seus dados espectroscópicos. Embora o extrato bruto dessa ascídia tenha apresentado atividade antimicobacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, os compostos puros isolados não apresentaram atividade biológica.

A partir de extratos de duas amostras da ascídia *Didemnum* sp., coletadas em regiões diferentes na Baía de Todos os Santos (Salvador-BA), foram obtidos 4 peptídeos modificados (**130-133**) estruturalmente inéditos na literatura, dois na forma de mistura inseparável. Os extratos brutos das duas amostras desta ascídia apresentaram atividades biológicas distintas: o extrato bruto da ascídia *Didemnum* sp. A apresentou atividade antimicrobiana, enquanto que o extrato bruto da ascídia *Didemnum* sp. B apresentou atividade antimicobacteriana contra *Micobacterium*

tuberculosis. Um fato curioso é que apesar de apresentarem atividades biológicas distintas, os compostos isolados são bastante semelhantes.

No decorrer do estudo desse animal nos deparamos com uma grande dificuldade em purificar os compostos **130** e **131**. Somente através da análise por MS/MS pudemos comprovar a presença dos dois homólogos, sendo que as substâncias diferem entre si pelo número de átomos de carbono na cadeia da diamina.

A mistura dos compostos dicetopiperazínicos **130** e **131** apresentou potente atividade antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa* P1 resistente a antibióticos com valor de concentração inibitória mínima de 4,3 µg/mL, bem como atividade antibiótica moderada contra uma série de microrganismos patogênicos.

O estudo do extrato bruto antimicrobiano e citotóxico da esponja *Plakortis angulospiculatus*, coletada na Baía de Todos os Santos, Salvador-BA, resultou no isolamento de seis policetídeos: a plakortenona, inédita na literatura; a plakortina ou 4,8-dietil-6-metil-3,6-peroxi-9-dodecanoato de metila; o ácido 3,6 – epidioxi - 4,6,8,10-tetraetiltetradeca-7,11-dienóico ou plakortídeo P; o 3,6-epóxi-4,6,8-trietil-2,4,9-dodecatrienato de metila; a espongosoritina A e o 3,6-epóxi-4,6,8-trietil-2,4-dodecadienoato de metila.

Com exceção da plakortenona (**183**), os compostos conhecidos foram avaliados em testes de atividades leishmanicida, tripanomicida, antineuroinflamatória e citotóxica. O plakortídeo P (**184**) demonstrou ser o mais ativo em todos os bioensaios.

Esta é a primeira vez que foi descrita a atividade leishmanicida contra *L.chagasi* altamente seletiva do plakortídeo P (**184**).

Diante dos resultados obtidos com o estudo da esponja *Plakortis angulospiculatus*, pode-se concluir que apesar dos compostos já serem estruturalmente conhecidos, é importante que sejam submetidos à bioensaios para se avaliar suas atividades biológicas. Desta maneira pudemos verificar que o plakortídeo P apresentou ótimos resultados nos testes de avaliação biológica podendo ser objeto de estudo para candidato a fármaco.

A partir do extrato bruto do octocoral *Carijoa riisei*, coletado em São Sebastião - SP, foi isolado um único constituinte, o esteróide 18-acetóxipregna-1,4,20-trien-3-ona (**216**).

O extrato bruto do octocoral *Carijoa riisei* apresentou atividade citotóxica contra linhagens de células MCF-7 (câncer de mama), melanoma e cólon. O extrato bruto também apresentou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp* e *Proteus spp*, todas contra bactérias resistentes à antibióticos. A 18-acetoxipregna-1,4,20-trien-3-ona (**216**) foi avaliada nos testes de atividade citotóxica frente a 4 diferentes linhagens de células tumorais, leishmanicida contra *L.chagasi*, tripanomicida contra *T.cruzi* bem como sua citotoxicidade em células de mamíferos. Não há na literatura nenhuma menção sobre atividade tripanomicida e leishmanicida do esteróide 18-acetóipregna-1,4,20-trien-3-ona (**216**). Com os resultados obtidos, concluímos que o esteróide 18-acetóipregna-1,4,20-trien-3-ona (**216**) poderia ser objeto de estudo como protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos contra essas doenças parasitárias, já que apresentou uma ótima atividade e sua estrutura pode ser facilmente obtida através de métodos de síntese ou semi-síntese.

Pode-se concluir que este trabalho contribuiu de maneira significativa para a ampliação do conhecimento químico e biológico da fauna marinha brasileira, mais especificamente de invertebrados (esponjas, ascídias e ootocorais). Finalmente, os resultados obtidos no presente trabalho mostram a importância do estudo dos organismos marinhos da costa brasileira, que possui uma biodiversidade rica e pouco conhecida cientificamente, como fonte de novos compostos biologicamente ativos.

Tabela 9.1 - Compostos isolados de invertebrados marinhos durante o presente projeto de doutorado.

Estrutura	Fonte	Atividade Biológica	Classe Biogenética	Artigo
<p>5-[3,5-dibromo-4([2-oxo-5-oxazolidinil]) metoxifenil]2-oxazolidinona (73)</p>	<p>Ascídia: <i>Clavelina oblonga</i></p>	-	Derivado da dibromotirosina	Journal of Natural Products
<p>(2S,3R)- 2-amino-3-dodecanol (74)</p> <p>inédito na literatura</p>	<p>Ascídia: <i>Clavelina oblonga</i></p>	Antifúngica contra <i>Candida albicans</i> (CIM = 0,7 µg/mL)	Origem biossintética mista: policetídeo/ aminoácido	Journal of Natural Products

<p>asterubina (109)</p>	<p>Ascídia: <i>Didemnum ligulum</i></p>	-	Derivado de aminoácido	Química Nova
<p><i>N,N</i>-dimetil-O-metiletanolamina (110) inédito na literatura</p>	<p>Ascídia: <i>Didemnum ligulum</i></p>	-	Derivado de aminoácido	Química Nova
<p>rodriguesina A (130) R=CH₂ rodriguesina B (131) R= C₂H₄ inéditos na literatura</p>	<p>Ascídia: <i>Didemnum</i> sp.</p>	<p>- Antimicrobiana contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> P1 (CIM 4,3 µg/mL)</p> <p>- Antimicrobiana contra bactérias do trato bucal</p>	Peptídeos modificados

<p>N-acetil-rodriguesina A (132)</p> <p>inédito na literatura</p>	<p>Ascídia:</p> <p><i>Didemnum</i> sp.</p>	-	<p>Peptídeo modificado</p>
<p>N-acetil-rodriguesina B (133)</p> <p>inédito na literatura</p>	<p>Ascídia:</p> <p><i>Didemnum</i> sp.</p>	-	<p>Peptídeo modificado</p>
<p>(3R*, 4R*, 6S*) - plakortenona (183)</p> <p>inédito</p>	<p>Esponja:</p> <p><i>Plakortis</i> <i>angulospiculatus</i></p>	-	<p>Policetídeo</p>	<p>Journal of Natural Products</p>

<p>(3S*, 4S*, 6R*)-plakortina (182)</p>	<p>Esponja:</p> <p><i>Plakortis angulospiculatus</i></p>	<p>Citotóxica contra linhagens de células tumoriais</p>	<p>Policetídeo</p>	<p>Journal of Natural Products</p>
<p>(3S,4S,6R,10R)-plakortídeo P (184)</p>	<p>Esponja:</p> <p><i>Plakortis angulospiculatus</i></p>	<p>- Antiparasitária contra <i>L.chagasi</i> e <i>T.cruzi</i></p> <p>- Antineuroinflamatória</p>	<p>Policetídeo</p>	<p>Journal of Natural Products</p>
<p>(2Z, 6R, 8R, 9E)-3,6-epóxi-4,6,8 trietil-2,4,9-dodecatríenoato de metila (185)</p>	<p>Esponja:</p> <p><i>Plakortis angulospiculatus</i></p>	<p>- Antiparasitária contra <i>L.chagasi</i> e <i>T.cruzi</i></p> <p>- Citotóxica contra linhagens de células tumoriais</p>	<p>Policetídeo</p>	<p>Journal of Natural Products</p>

<p>(6<i>R</i>*, 8<i>R</i>*)-espongosoritina A (186)</p>	<p>Esponja:</p> <p><i>Plakortis angulospiculatus</i></p>	<p>- Antiparasitária contra <i>L.chagasi</i> e <i>T.cruzi</i></p> <p>- Citotóxica contra linhagens de células tumorais</p>	<p>Policetídeo</p>	<p>Journal of Natural Products</p>
<p>(6<i>R</i>*, 8<i>S</i>*)-3,6-epóxi-4,6,8-trietil-2,4-dodecadienoato de metila (187)</p>	<p>Esponja:</p> <p><i>Plakortis angulospiculatus</i></p>	<p>- Antiparasitária contra <i>L.chagasi</i> e <i>T.cruzi</i></p> <p>- Citotóxica contra linhagens de células tumorais</p>	<p>Policetídeo</p>	<p>Journal of Natural Products</p>
<p>18-acetóxipregna-1,4,20-trien-3-ona (216)</p>	<p>Octocoral:</p> <p><i>Carijoa riisei</i></p>	<p>- Antiparasitária contra <i>L.chagasi</i> e <i>T.cruzi</i></p> <p>- Citotóxica contra linhagens de células tumorais</p>	<p>Esteróide</p>	<p>Química Nova e Parasitology Research</p>

Capítulo 10

Referências Bibliográficas

10.1 – Referências bibliográficas para o Capítulo 1

BAKER, D.D., CHU, M., OZA, U., RAJGARHIA, V., The value of natural products to future pharmaceutical discovery, **Natural Product Reports**, 24, 1225-1244, 2007.

BERGMANN, W. E BURKE, D.C., Contributions of the study of marine products, XXXIX, The nucleosides of sponges: Spongthymidine and Spongouridine, **Journal of Organic Chemistry**, 20, 11, 1501-1507, 1955.

BERGMANN, W., Comparative biochemical studies on the lipids of marine invertebrates, with special reference to the sterols, **Journal of Marine Research**, 8, 2, 137-171, 1949.

BERGMANN, W., WATKINS, J.C., STEMPIEN, H.F., Contributions of the study of marine products, XIV, Sponges nucleic acids, **Journal of Organic Chemistry**, 22, 1308, 1957.

BERGMANN, W.; FEENEY, R.J., Contributions of the study of marine products, XXXII, The nucleosides of sponges, **Journal of Organic Chemistry**, 16, 6, 981-987, 1951.

BERGMANN, W.; FEENEY, R.J., The isolation of a new thymine pentoside from sponges, **Journal of the American Chemical Society**, 72, 6, 2809-2810, 1950.

BLUNT, J.W., COPP, B.R., HU, W.P., MUNRO, M.H.G., NORTHCOTE, P.T., PRINSEP, M.R., Marine Natural Products, **Natural Product Reports**, 25, 35-94, 2008.

CRAGG, G.M., NEWMAN, D.J., SNADER, K.M., Natural products in drug discovery and development, **Journal of Natural Products**, 60, 52-60, 1997.

DONIA, M., HAMANN, M.T., Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents, **Lancet Infectious Diseases**, 3, 6, 338-348, 2003.

DORÉE, C., The occurrence and distribution of cholesterol and allied compounds in the Animal Kingdom, **Biochemical Journal**, 4, 72-106, 1909.

GRAY, C.A., DE LIRA, S.P., SILVA, M., PIMENTA, E.F., THIEMANN, O.T., OLIVA, G., HAJDU, E., ANDERSEN, R.J., BERLINCK, R.G.S., Sulfated Meroterpenoids from the Brazilian Sponge *Callyspongia* sp. are Inhibitors of the Antileishmaniasis Target Adenosine Phosphoribosyl Transferase, **Journal of Organic Chemistry**, 71, 8685-8690, 2006.

HALSTEAD, B.W., Poisonous and venomous marine animals of the world, **US Government Printing Office**, 1, 4-5, 1965.

- HAMANN, M.T., HILL, R., ROGGO, S., Marine natural products. Key advances to the practical application of this resource in drug development, **Chimia**, 61, 6, 313-321, 2007.
- HENZE, M., Spongosterol, the cholesterol of *Suberites domuncula*. **Hoppe-Seyler's. Z. Physiol. Chem.**, 55, 427-432, 1909.
- HOSTETTMANN, K., QUIEROZ, E.F., VIEIRA, P.C., **Princípios de Plantas Superiores**, São Carlos: EdUFSCar, 9-13, 2003.
- KELECOM, A., Chemistry of marine natural products: Yesterday, today and tomorrow, **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 71, 2, 249-263, 1999.
- KELECOM, A., Marine Natural Products in Brazil, Par 1, Isolation and Structure Determination, Ciência e Cultura, **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, 49, 5/6, 321-330, 1997.
- KIJJOA, A., SAWANGWONG, P., Drugs and Cosmetics from the Sea, **Marine Drugs**, 2, 73-82, 2004.
- KÖNIG, G.M., WRIGHT, A.D., Marine natural products research: current directions and future potential, **Planta Medica**, 62, 193-211, 1996.
- LEDERER, E., Recherchers sur les carotenoides des invertébrés, **Bulletin de La Societe de Chimie Biologique.**, 20, 567-634, 1938.
- LIMA, L.M., Química medicinal moderna: Desafios e contribuição brasileira, **Química Nova**, 30, 6, 1456-1468, 2007.
- MAYER, A.M.S., RODRIGUEZ, A.D., BERLINCK, R.G.S., HAMANN, M.T., Marine pharmacology in 2003-4: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action, **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, 145, 553-581, 2007.
- McCONNELL, O.J., LONGLEY, R.E., KOEHN, F.E., The discovery of marine natural products with therapeutic potential, in **The Discovery of Natural Products With Potential**, 109-174, 1994.
- MUNRO, M.H.G., BLUNT, J.W., LAKE, R.J., LITAUDON, M., BATTERSHILL, C.N., PAGE, M.J., From seabed to sickbed: What are the prospects? In: Soest, R.W.M. Van; KEMPEN, T.M.G. VAN; BRAEKMAN, J.C., **Sponges in time and space: Biology, Chemistry, Paleontology**, Amsterdam, Brookfield, 503p, 1993.
- NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M., Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials, **Journal of Natural Products**, 67, 1216-1238, 2004.
- NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M., Natural products as sources of new drugs over the last 25 years, **Journal of Natural Products**, 70, 461-477, 2007.
- NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M., SNADER, K.M., The influence of natural products upon drug discovery, **Natural Product Reports**, 17, 3, 215-234, 2000.

NUNEZ, C.V., DE ALMEIDA, E.V.R., GRANATO, A.C., MARQUES, S.O., SANTOS, K.O., PEREIRA, F.R., MACEDO, M.L., FERREIRA, A.G., HAJDU, E., PINHEIRO, U.S., MURICY, G., PEIXINHO, S., FREEMAN, C.J., GLEASON, D.F., BERLINCK, R.G.S., Chemical variability within the marine sponge *Aplysina fulva*, **Biochemical Systematics and Ecology**, 36, 283-296, 2008.

PINTO, A.C., The Brazil of Travelers and Explorers and the Chemistry of Brazilian Natural-Products, **Química Nova**, 18, 608, 1995.

PINTO, A.C., SILVA, D.H.S.S., BOLZANI, V.S., LOPES, N.P., EPIFANIO, R.A., Produtos Naturais: Atualidade, Desafios E Perspectivas, **Química Nova**, Vol. 25, Supl. 1, 45-61, 2002.

ROCHA, A.B.; LOPES, R.M., SCHWARTSMANN, G., Natural products in anticancer therapy, **Current Opinion in Pharmacology**, 1, 4, 364-369, 2001.

SALEEM, M., ALI, M.S., HUSSAIN, S., JABBAR, A., ASHRAF, M., LEE, T.S., Marine natural products of fungal origin, **Natural Product Reports**, 24, 1142-1152, 2007.

SOUZA, M.V.N., PINHEIRO, A.C., FERREIRA, M.L., GONÇALVES, R.S.B., LIMA, C.H.C., Produtos naturais em fase avançada de testes clínicos no tratamento contra o câncer, **Revista Fitos**, 3, 2, 25-42, 2007.

TAHARA, Y., Uber das tetrodongift, **Biochemische Zeitschrift**, 30, 255-275, 1910.

VIEGAS, C.J., BOLZANI, V.S., BARREIRO, E.J., Os produtos naturais e a Química medicinal moderna, **Química Nova**, 29, 2, 326-337, 2006.

YUNES, R.A., PEDROSA, R.C., CECHINEL FILHO, V., Pharmaceutics and phytotherapies: The need for development of the industry of phytopharmaceutics and phytotherapies in Brazil, **Química Nova**, 24, 147-152, 2001.

10.2 – Referências bibliográficas para o Capítulo 3

LANE, J.E., RIBEIRO-RODRIGUES, R., SUAREZ, C.C., BOGITSH, B.J., JONES, M.M., SINGH, P.K. AND CARTER, C.E: In vitro trypanocidal activity of tetraethylthiuram disulfide and sodium diethylamine-N-carbodithioate on *Trypanosoma cruzi*. **Am. Soc. Trop. Med. Hyg**, v. 55, n. 3, p. 263-266, 1996.

MAYER, A. M. S.; HALL, M. L.; LYNCH, S. M.; GUNASEKERA, S. P.; SENNETT, S. H.; POMPONI, S. A., Differential modulation of microglia superoxide anion and thromboxane B₂ generation by the marine manzamines
BioMedCentral Pharmacology, 5, 6-18, 2005.

OLIVEIRA, J.H., SELEGHIM, M.H., TIMM, C., GRUBE, A., KOCK, M., NASCIMENTO, G.G., MARTINS, A.C., SILVA, E.G., SOUZA, A.O., MINARINI, P.R., GALETTI, F.C., SILVA, C.L., HADJU, E., BERLINCK, R.G., Antimicrobial and antimycobacterial Activity of Cyclostelletamine Alkaloids from Sponge *Pachychalina* sp. **Marine Drugs**. 4: 1-8, 2006.

TADA, H.; SHIHO, O.; KUROSHIMA, K.; KOYAMA, M.; TSUKAMOTO, M. An improved colorimetric assay for interleukin 2. **Journal of Immunological Methods**, v. 93, p. 157-165, 1986.

TEMPONE, A.G., PEREZ, D., RATH, S., VILARINHO, A.L. MORTARA, R.A. & ANDRADE JR, H.F. Targeting *Leishmania (L.) chagasi* amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, p. 60–68, 2004.

10.3 – Referências bibliográficas para o Capítulo 4

AIELLO, A., FATTORUSSO, E., GIORDANO, A., MENNA, M., NAVARRETE, C. E MUÑOZ, E., Clavaminols A-F, novel cytotoxic 2-amino-3-alkanols from the ascidian *Clavelina phlegrae*, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 15, 2920-2926, 2007.

BIARD, J.F., GUYOT, S., ROUSSAKIS, C., VERBIST, J.F., VERCAUTEREN, J., WEBER, J.F. E BOUKEF, K., Lepadiformine, a new marine cytotoxic alkaloid from *Clavelina lepadiformis* Müller, **Tetrahedron Letters**, 35, 17, 2691-2694, 1994.

BLACKMAN, A.J. E LI, C., Cylindricines C-G, perhydropyrrolo [2,1-]quinolin-7-one alkaloids from the ascidian *Clavelina cylindrica*, **Australian Journal of Chemistry**, 47, 1355-1361, 1994.

BLACKMAN, A.J., LI, C., Cylindricines H-K, novel alkaloids from the ascidian *Clavelina cylindrica*, **Australian Journal of Chemistry**, 48, 955-965, 1995.

BLACKMAN, A.J., LI, C., HOCKLESS, D.C.R., SKELTON, B.W. E WHITE, A.H., Cylindricines A and B, novel alkaloids from the ascidian *Clavelina cylindrica*, **Tetrahedron**, 49, 38, 8645-8656, 1993.

BLUNT, J.W., COPP, B.R., HU, W.P., MUNRO, M.H.G., NORTHCOTE, P.T., PRINSEP, M.R., Marine Natural Products, **Natural Product Reports**, 25, 35-94, 2008.

BORDERS, D.B., MORTON, G.O., WETZEL, E.R., Structure of a Novel Bromine Compound Isolated from a Sponge, **Tetrahedron Letters**, 2709-2712, 1974.

COPP, B.R., IRELAND, C.M. E BARROWS, L.R., Wakayin: a novel cytotoxic pyrroloiminoquinone alkaloid from the Ascidian *Clavelina* Species, **Journal of Organic Chemistry**, 56, 4596-4597, 1991.

FAULKNER, D.J., RAO, M.R., Botryllamides E-H, four new tyrosine derivatives from the ascidian *Botrylloides tyreum*, **Journal of Natural Products**, 67, 1064-1066, 2004.

IRELAND, C.M., COPP, B.R., FOSTER, M.P., Biomedical Potential of Marine Natural Products, **Marine Biotechnology**, editado por D.H. Attaway and O R. Zaborsky, Plenum Press, New York and London, 1-43, 1993.

KONG, F. E FAULKNER, D.J., Pictamine, a quinolizidine alkaloid from the Tunicate *Clavelina picta*, **Tetrahedron Letters**, 32, 30, 3667-3668, 1991.

MAKARIEVA, T.N., STONIK, V.A., Comparative study of the halogenated tyrosine derivatives from Demospongiae (Porifera), **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, 68, 481-484, 1981.

McDONALD, L.A., SWERSEY, J.C., IRELAND, C.M., CARROLL, A.R., COLL, J.C., BOWDEN, B.F., FAIRCHILD, C.R., CORNELL, L., Botryllamides A-D, New Brominated Tyrosine Derivatives from Styelid Ascidians of the Genus *Botryllus*, **Tetrahedron**, 51, 5237-5244, 1995.

NORTE, M., RODRIGUES, M.L., FERNANDEZ, J.J., EGUREN, L., ESTRADA, D.H., Aplysiniadiene and (r,r) 5 [3,5-dibromo-4-[(2-oxo-5-oxazolidinyl)] methoxyphenyl]-2-oxazolidinone, two novel metabolites from aplysina aerophoba syntheses, **Tetrahedron**, 44, 4973-4980, 1988.

RAUB, M.F., CARDELLINA, J.H., CHOUDHARY, M.I., NI, C.Z., CLARDY, J. E ALLEY, M.C., Clavepicitines A and B: cytotoxic quinolizidines from the Tunicate *Clavelina picta*, **Journal of The American Chemical Society**, 113, 3178-3180, 1991..

RUPPERT, E.E., BARNES, R.D., **Zoologia dos invertebrados**, Editora Roca Ltda., Rio de Janeiro.72-89, 103-150, 843-885, 974-999, 1996.

SMITH, C.J., HETTICH, R.L., JOMPA J., TAHIR, A., BUCHANAN M.V., IRELAND, C.M., Cadiolides A and B, New Metabolites from an Ascidian of the Genus *Botryllus*, **Journal of Organic Chemistry**, 63, 4147-4150, 1998.

STEFFAN, B., Lepadin A, A decahydroquinoline alkaloid from the Tunicate *Clavelina lepadiformis*, **Tetrahedron**, 47, 41, 8729-8732, 1991.

10.4 – Referências bibliográficas para o Capítulo 5

ACKERMANN, D. A sulfur-containing guanidine compound in living nature, **Verhandlungen Physikalischen Med. Gesellschaft Wurzburg**, 59, 73-76, 1936.

ACKERMANN, D., Asterubine, a sulfur-containing guanidine occurring in nature, **Zeitschrift fur Physiologische Chemie**, 232, 206-212, 1935.

ALTOMARE, A.; CASCARANO, G.; GIACOVAZZO, C.; GUAGLIARDI, A., Completion and Refinement of Crystal-Structures with Sir92, **Journal of Applied Crystallography**, 26, 343-350, 1993.

BERLINCK, R.G.S., BRITTON, R., PIERS, E., LIM, L., ROBERGE, M., DA ROCHA, M.R., ANDERSEN, R.J., Granulatimide and isogranulatimide, aromatic alkaloids with G2 checkpoint inhibition isolated from the Brazilian ascidian *Didemnum granulatum*: structure elucidation and synthesis. **Journal of Organic Chemistry**, 63, 9850-9856, 1998.

BRITTON, R., DE OLIVEIRA, J.H.H.L., ANDERSEN, R.J. E BERLINCK, R.G.S., Granulatimide and 6-bromogranulatimide, minor alkaloids of the Brazilian ascidian *Didemnum granulatum*, **Journal of Natural Products**, 64, 254-255, 2001.

EXPOSITO, A., FERNANDEZ-SÚAREZ, M., IGLESIAS, T., MUNOZ, L. E RIGUERA, R. Total Synthesis and Absolute Configuration of Minalemine A, a Guanidine Peptide from the Marine Tunicate *Didemnum rodriguesi*, **Journal of Organic Chemistry**, 66, 4206-4213, 2001.

EXPÓSITO, M.A., FERNÁNDEZ, R., VÁZQUEZ, M.J., DEBITUS, C., IGLESIAS, T., JIMÉNEZ, C., QUIÑOIA, E. E RIGUERA, R., Minalemine A-F sulfamic acid peptide guanidine derivatives isolated from the marine tunicate *Didemnum rodriguesi*, **Tetrahedron**, 54, 7539-7550, 1998.

FARRUGIA, L. J., WinGX suite for small-molecule single-crystal crystallography, **Journal of Applied Crystallography**, 32, 837-838, 1999.

FARRUGIA, L.J., ORTEP-3 for Windows - a version of ORTEP-III with a Graphical User Interface (GUI), **Journal of Applied Crystallography**, 30, 565-567, 1997.

FORD, P.W., DAVIDSON, B.S., Plakinidine D, a new pyrroloacridine alkaloid from the ascidian *Didemnum rubeum*, **Journal of Natural Products**, 60, 1051-1053, 1997.

GRIFFITHS, D.J. E THINH, L-V., Transfer of photosynthetically fixed carbon between the prokaryotic green alga *Prochloron* and its ascidian host, **Australian Journal of Marine Fresh Research**, 34, 431-440, 1983.

JOHNS, R.B., NICHOLS, P.D., GILLAN, F.T., PERRY, G.J. E VOLKMAN, J.K., Lipid composition of a symbiotic *Prochlorophyte* in relation to its host, **Comparative Biochemistry and Physiology**, 69B, 843-849, 1981.

KOBAYASHI, H., MIYATA, Y., OKADA, K., FUJITA, T., IWASHITA, T., NAKAO, Y., FUSEYANI, N., MATSUNAGA, S., The structures of three new shishididemniols from a tunicate of the family Didemnidae, **Tetrahedron**, 63, 6748-6754, 2007a.

KOBAYASHI, H., OHASHI, J., FUJITA, T., IWASHITA, T., NAKAO, Y., MATSUNAGA, S., FUSEYANI, N., Complete Structure Elucidation of Shishididemniols, Complex Lipids with Tyramine-Derived Tether and Two Serinol Units, from a Marine Tunicate of the Family Didemnidae, **Journal of Organic Chemistry**, 72, 1218-1225, 2007b.

KOBAYASHI, J., CHENG, J., NAKAMURA, H., OHIZUMI, Y., HIRATA, Y., SASAKI, I., OHTA, T. E NOZOE, S., Ascidiemin, a novel pentacyclic alkaloid with potent antileukemic activity from the Okinawan tunicate *Didemnum* sp., **Tetrahedron Letters**, 29, 1177-1180, 1988.

KOTT, P., PARRY, D.L. E COX, G.C., Prokaryotic symbionts with a range of ascidians hosts, **Bulletin of Marine Science**, 34, 308-312, 1984.

LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L., COX, M., **Principios de Bioquímica**, 2ª Edição, Editora Sarvier, São Paulo, Brasil, 1995.

LEWIN, R.A. E CHENG, L., **Collection and handling of *Prochloron* and its ascidian host**, In: Lewin, R.A.; Cheng, L., eds. *Prochloron*: a microbial enigma. New York, Chapman and Hall, 9-18, 1989.

LINDQUIST, N., FENICAL, W., Ascidiatrienolides A-C, novel lactonized eicosanoids from the colonial marine ascidian *Didemnum candidum*, **Tetrahedron Letters**, 30, 21, 2735-2738, 1989.

MITCHELL, S.S., RHODES, D., BUSHMAN, F.D., FAULKNER, D.J., cyclodidemniserinol trisulfate, a sulfated serinolipid from a Palaun ascidian *Didemnum guttatum* that inhibits HIV-1 integrase, **Organic Letters**, 2, 11, 1605-1607, 2000.

MONNIOT, C., MONNIOT, F. E LABOUE, P., General organization of an ascidian. In: **Coral reef ascidians of New Caledonia**, Paris, Orston, 9-78, 1991.

NORTH, A. C. T.; PHILLIPS, D. C.; MATHEWS, F. S., A semi-empirical method of absorption correction, **Acta Crystallographica, Section A: Foundations of Crystallography**, A24, 351-359, 1968.

PARDY, H.W. E LEWIN, R.A., Colonial ascidians with prochlorophyte symbionts: evidence for translocation of metabolites from alga to the host, **Bulletin of Marine Science**, 31, 817-823, 1981.

POTTA, B.C.M., FAULKNER, D.J., Didemnaketals A and B, HIV-1 protease inhibitors from the ascidian *Didemnum* sp., **Journal of the American Chemical Society**, 113, 6321-6322, 1991.

RUDI, A., AKNIN, M., GAYDOU, E.M., KASHMAN, Y., Four new cytotoxic hexa- and heptapeptides from the marine ascidian *Didemnum molle*, **Tetrahedron**, 54, 13203-13210, 1998.

SCHUMACHER, R.W., DAVIDSON, B.S., Didemnolides A-D: new N9-substituted β -carboline from the marine ascidian *Didemnum* sp., **Tetrahedron**, 51, 10125-10130, 1995.

SINGS, H.L. E RINEHART, K.L., Compounds produced from potential tunicate-blue-green algal symbiosis: a review, **Journal of Industrial Microbiology**, 17, 385-396, 1996.

SMITH, C.J., VENABLES, D.A., HOPMANN, C., SALOMON, C.E., JOMPA, J., TAHIR, A., D. FAULKNER, J., IRELAND, C.M., Plakinidine D, a New Pyrroloacridine Alkaloid from Two Ascidians of the Genus *Didemnum*, **Journal of Natural Products**, 60, 1048-1050, 1997.

TAKEARA, R., LOPES, J.L.C., LOPES, N.P., JIMENEZ, P.C., COSTA-LOTUFO, L.V., LOTUFO, T.M.C., Constituintes químicos da ascídia *Didemnum psammotodes* (Sluiter, 1985) coletada na costa cearense, **Química Nova**, 30, 5, 1179-1181, 2007.

THOAI, NGUYEN-VAN, Guanidine derivatives, their biological role, **Collog. Inter. Centre Natl. Recherche Sci.** (Paris), 2, 297-323, 1959.

VASQUEZ, M.J., QUINOÁ, E., RIGUERA, R., OCAMPO, A., IGLESIAS, T. E DEBITUS, C. Caledonin, a Natural Peptide Bolaphile with Zn^{II} and Cu^I Complexing Properties from the Tunicate *Didemnum rodriguesi*, **Tetrahedron Letters**, 36, 48, 8853-8856, 1995.

VERVOORT, H.C., FENICAL, W. E KEIFER, P.A., (1999), A cyclized didemnimide alkaloid from the Caribbean ascidian *Didemnum conchyliatum*, **Journal of Natural Products**, 62, 389-391, 1999.

VERVOORT, H.C., RICHARDS-GROSS, S.E. E FENICAL, W., Didemnimides A-D: novel, predator-deterrent alkaloids from the Caribbean mangrove ascidian *Didemnum conchyliatum*, **Journal of Organic Chemistry**, 62, 1486-1490, 1997.

10.5 – Referências bibliográficas para o Capítulo 6

BARTON, D. E OLLIS, W.D., “**Comprehensive Organic Chemistry**”, 1st Edn., vol.2, Ed. Jones, D.N., Pergamon Press, p. 1036, 1979.

BYUN, H.G., ZHANG, H., MOCHIZUKI, M., ADACHI, K., SHIZURI, Y., LEE, W.J. KIM, S.K., Novel antifungal diketopiperazine from marine fungus, **Journal of Antibiotics**, 56, 102-106, 2003.

FU, X., FERREIRA, M.L.G., SCHMITZ, F.J., KELLY-BORGES, M., New diketopiperazines from the sponge *Dysidea chlorea*, **Journal of Natural Products**, 61, 1226-1231, 1998.

FURTADO, N.A.J.C., PUPO, M.T., CARVALHO, I., CAMPO, V.L., DUARTE, M.C.T., BASTOS, J.K., Diketopiperazines produced by na *Aspergillus fumigatus* brazilian strain, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 16, 6B, 1448-1453, 2005.

KANOH, K., KOHNO, S., KATADA, J., TAKAHASHI, J., UNO, I. (-)-Phenylahistin arrests cells in mitosis by inhibiting tubulin polymerization, **Journal of Antibiotics**, 52, 134-141, 1999.

KOZLOVSKY, A.G., ZHELIFONOVA, V.P., ADANIN, V.M., ANTIPOVA, T.V., OZERSKAYA, S.M., IVANUSHKINA, N.E., GRAFE, U. *Penicillium aurantiogriseum* dierckx 1901: Producer of diketopiperazine alkaloids (roquefortine and 3,12-dihydroroquefortine), isolated from permafrost, **Applied Biochemistry and Microbiology**, 39, 393-397, 2003.

LIDGREN, G., BOHLIN, L., BERGMAN, J., Studies of swedish marine organisms VII. A novel biologically active indole alkaloid from the sponge *Geodia baretti*, **Tetrahedron Letters**, 27, 28, 3283-3284, 1986.

MARFEY, P.; OTTESEN, M. Determination of D-amino acids. I. Hidrolysis of DNP-L-Amino Acid Methyl Esters Carboxypeptidase-Y. **Carlsberg Res. Commun.** 49, 585-590, 1984.

MARTINS, M.B., CARVALHO, I. Diketopiperazines: biological activity and synthesis, **Tetrahedron**, 63, 9923-9932, 2007.

PRACHYAWARAKORN, V., MAHIDOL, C., SURERAM, S., SANGPETSIRIPAN, S., WIYAKRUTTA, S., RUCHIRAWAT, S., KITTA KOOP, P., Diketopiperazines and Phthalides from a marine derived fungus of the Order Pleosporales, **Planta Medica**, 74, 69-72, 2008.

SCHULTZ, A.W., OH, D-C., CARNEY, J.R., WILLIAMSON, R.T., UDWARY, D.W., JENSEN, P.R., GOULD, S.J., FENICAL, W., MOORE, B.S., Biosynthesis and structures of cyclomarins and cyclomarazines, prenylated cyclic peptides of marine actinobacterial origin, **Journal of the American Chemical Society**, 130, 4507-4516, 2008.

SOLTER, S., DRECKMANN, R., BLUNBERG, M., FRANCKE, W., Barettin, revisited?, **Tetrahedron Letters**, 43, 18, 3385-3386, 2002.

SU, J., ZHONG, Y., ZENG, L., WU, H., SHEN, X., MA, K., A new N-carboxyindole alkaloid from the marine sponge *Rhaphisia pallida*, **Journal of Natural Products**, 59, 504-506, 1996.

SU, J-Y., ZHONG, Y-L., ZENG, L-M., Three new diketopiperazines from a marine sponge *Dysidea fragilis*, **Journal of Natural Products**, 56, 4, 637-642, 1993.

THOMSON, R.H., “**The Chemistry of Natural Products**”, Edited by R. H. Thomson. The Blackie Publishing Group, Glasgow, 467 p, 1985.

VERGNE, C., BOURY-ESNAULT, N., PEREZ, T., MARTIN, M., ADELIN, M., DAU, E.T.H., AL-MOURABIT, A., Vercapamides A-D, a sequence of C₁₁N₅ diketopiperazines relating cyclo(Pro-Pro) to cyclo(Pro-Arg), from the marine sponge *Axinella vaceleti*: possible biogenetic precursors of pyrrole-2-aminoimidazole alkaloids, **Organic Letters**, 8, 11, 2421-2424.

10.6 – Referências bibliográficas para o Capítulo 7

BERRUE, F., THOMAS, O.P., FERNANDEZ, R., AMADE, P., Iso-, Nor-, and Dinor-Spiculoic Acids A, Polyketides from the Marine Sponge *Plakortis zyggompha*, **Journal of Natural Products**, 68, 547-549, 2005a.

BERRUE, F., THOMAS, O.P., FERNANDEZ, R., FUNEL-LE BOM, C., REYES, R., AMADE, P., New bioactive cyclic peroxides from the Caribbean marine sponge *Plakortis zyggompha*, **Tetrahedron**, 61, 11843–11849, 2005b.

BERRUE, F., THOMAS, O.P., LAVILLE, R., PRADO, S., GOLEBIOWSKI, J., FERNANDEZ, R., AMADE, P., The marine sponge *Plakortis zyggompha*: a source of original bioactive polyketides, **Tetrahedron**, 63, 10, 2328-2334, 2007.

BORRELLI, F., CAMPAGNUOLO, C., CAPASSO, R., FATTORUSSO, E., TAGLIALATELA-SCAFATI, O., Iodinated Indole Alkaloids From *Plakortis simplex* - New Plakohypaphorines and an Evaluation of Their Antihistamine Activity, **European Journal of Organic Chemistry**, 3227-3232, 2004.

CAFIERI, F., FATTORUSSO, E., TAGLIALATELA-SCAFATI, O., Metabolites from the sponge *Plakortis simplex*. Determination of absolute stereochemistry of plakortin. Isolation and stereostructure of three plakortin related compounds, **Tetrahedron**, 55, 7045-7056, 1999.

CAMPAGNUOLO, C., FATTORUSSO, E., ROMANO, A., TAGLIALATELA-SCAFATI, O., BASILICO, N., PARAPINI, S., TARAMELLI, D., Antimalarial Polyketide Cycloperoxides from the Marine Sponge *Plakortis simplex*, **European Journal of Organic Chemistry**, 5077–5083, 2005.

CAPON, R.J.; SINGH, S.; ALI, S. Spongisoritin A: A new polyketide from a Fijian marine sponge, *Spongisorites* sp. **Australian Journal of Chemistry**, 58, 1, 18-20, 2005.

CHEN, Y., MCCARTHY, P.J., HARMODY, D.K., SCHIMOLER-O’ROURKE, R., CHILSON, K., SELITRENNIKOFF, C., POMPONI, S.A., WRIGHT, A.E., New Bioactive Peroxides from Marine Sponges of the Family Plakiniidae, **Journal of Natural Products**, 65, 1509-1512, 2002.

CHI WON, L., YEON-KYE, K., HO DONG, Y., HEE-YEON, P., Enantiomeric compounds with antileishmanial activities from a sponge, *Plakortis* sp., **Agricultural Chemistry and Biotechnology** (English Edition), 49, 1, 21-23, 2006.

- COMPAGNONE, R.S., PINA, I.C., RANGEL, H. R.; DAGGER, F.; SUAREZ, A.I.; REDDY, M. V. R.; FAULKNER, D. J.. Antileishmanial Cyclic Peroxides from the Palauan Sponge *Plakortis* aff. *angulospiculatus*, **Tetrahedron**, 54, 3057-3068, 1998.
- COURA, J. R.; ABREU, L. L.; PEREIRA, J. B.; WILLCOX, H. P. Morbidade da doença de Chagas. IV. Estudo longitudinal de dez anos em Pains e Iguatama, Minas Gerais, Brasil, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 80, 73-80, 1985.
- CROFT, S. L., COOMBS, G.H., Leishmaniasis - current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs, **Trends in Parasitology**, 19, 502-508, 2003.
- CROFT, S.L., BARRETT, M.P., URBINA, J.A., Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis, **Trends in Parasitology**, 21, 508-512, 2005.
- DAVIS, A.J., MURRAY, H.W., HANDMAN, E., 2004, Drugs against leishmaniasis: a synergy of technology and partnerships, **Trends in Parasitology**, 20, 73-76, 2004.
- DEL SOL JIMÉNEZ, M, GARZÓN, S.P., RODRÍGUEZ, A.D., Plakortides M And N, Bioactive Polyketide Endoperoxides From The Caribbean Marine Sponge *Plakortis Halichondrioides*, **Journal of Natural Products**, 66, 655-661, 2003.
- DEL SOL JIMÉNEZ, M, GARZÓN, S.P., RODRÍGUEZ, A.D., Plakortides M And N, Bioactive Polyketide Endoperoxides From The Caribbean Marine Sponge *Plakortis Halichondrioides*, **Journal of Natural Products**, 66, 1404, 2003. ERRATA.
- EPIFÂNIO, R. A., PINHEIRO, L. S. and ALVES, N. C. Polyketides from the marine sponge *Plakortis angulospiculatus*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, vol.16, no.6b, p.1367-1371, 2005.
- FATTORUSSO, C., CAMPIANI, G., CATALANOTTI, B., PERSICO, M., BASILICO, N., PARAPINI, S., TARAMELLI, D., CAMPAGNUOLO, C., FATTORUSSO, E., ROMANO, A., TAGLIALATELA-SCAFATI, O., Endoperoxide Derivatives from Marine Organisms: 1,2-Dioxanes of the Plakortin Family as Novel Antimalarial Agents, **Journal of Medicinal Chemistry**, 49, 7088-7094, 2006.
- FONTANA, A., ISHIBASHI, M., KOBAYASHI, J., New Polyketide Peroxides from Okinawan Marine Sponge *Plakortis* sp., **Tetrahedron**, 54, 2041-2048, 1998.
- GOCHFELD, D.J., HAMANN, M.T., Isolation and Biological Evaluation of Filiformin, Plakortide F, and Plakortone G from the Caribbean Sponge *Plakortis* sp., **Journal of Natural Products**, 64, 1477-1479, 2001.
- GRAMICCIA, M., GRADONI, L., The Current Status of Zoonotic Leishmaniasis and Approaches to Disease Control, **International Journal for Parasitology**, 35, 1169-1180, 2005.
- GUERIN, P. J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; BOELAERT, M.; CROFT, S. L.; DESJEUX, P.; WASUNNA, M. K.; BRYCESON, A. D. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **The Lancet Infectious Diseases**, 2, 494-501, 2002.
- HIGGS, M.D., FAULKNER, D.J., Plakortin, an antibiotic from *Plakortis halichondrioides*, **Journal of Organic Chemistry**, 43, 18, 3454-3457, 1978.

HOOPER, J.N.A. E VAN SOEST, R.W.M., **Systema Porífera – A guide to the classification of sponges**, Kluwer Academic/ Plenum Publishers New York, vol.1, 1-13, 2002.

HOYE, T.R.; AYYAD, S.N.; ABO-ELKARM, M.; HAMANN, M.T. Cytotoxic metabolites, new plakortide, bicyclic lactone and cyclic peroxides from the marine sponge *Plakortis*, **Mansoura Science Bulletin, A: Chemistry**, 30(2), 149-156, 2003.

HU, J., GAO, H., KELLY, M., HAMANN, M.T., Plakortides I - L four new cyclic peroxides from an undescribed Jamaican sponge *Plakortis* sp. (Homosclerophorida, Plakinidae), **Tetrahedron**, 57, 46, 9379-9383, 2001.

HUANG, X., SOEST, R., ROBERGE, M., ANDERSEN, R.J., Spiculoic Acids A and B, New Polyketides Isolated from the Caribbean Marine Sponge *Plakortis angulospiculatus*, **Organic Letters**, 6, 1, 75-78, 2004.

KOBAYASHI, J., TSUKAMOTO, S., TAKEUCHI, S., ISHIBASHI, M., Manzamenones G and H, New Dimeric Fatty-Acid Derivatives from the Okinawan Marine Sponge *Plakortis* sp., **Tetrahedron**, 49, 27, 5955~5960, 1993.

MAYER, A. M. S. Therapeutic implications of microglia activation by lipopolysaccharide and reactive oxygen species generation in septic shock and central nervous system pathologies: a review, **Medicina (Buenos Aires)**, 58, 377–385, 1998.

MAYER, A. M. S.; HALL, M. L.; LYNCH, S. M.; GUNASEKERA, S. P.; SENNETT, S. H.; POMPONI, S. A. Differential modulation of microglia superoxide anion and thromboxane B2 generation by the marine manzamines, **BioMedCentral Pharmacology**, 5, 6–18, 2005.

MAYER, A. M. S.; OH, S.; RAMSEY, K. H.; JACOBSON, P. B.; GLASER, K. B.; ROMANIC, A. M. Escherichia coli lipopolysaccharide potentiation and inhibition of rat neonatal microglia superoxide anion generation: correlation with prior lactic dehydrogenase, nitric oxide, tumor necrosis factor-alpha, thromboxane B2, and metalloprotease release, **Shock**, 11, 180–186, 1999.

MOOKERJEE-BASU, J.; MOOKERJEE, A.; SEN, P.; BHAUMIK, S.; SEN, P.; BANERJEE, S.; NASKAR, K.; CHOUDHURI, S. K.; SAHA, B.; RAHA, S.; ROY, S. Sodium antimony gluconate induces generation of reactive oxygen species and nitric oxide via phosphoinositide 3-kinase and mitogen-activated protein kinase activation in *Leishmania donovani*-infected macrophages, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 50, 1788–1797, 2006.

NAGAI, Y., KUSUMI, T. New chiral anisotropic reagents for determining the absolute configuration of carboxylic acids, **Tetrahedron Letters**, 36, 1853-1856, 1995.

OHTANI, I., KUSUMI, T., KASHMAN, Y., KAKISAWA, H., High-Field Ft Nmr Application of Mosher Method - The Absolute-Configurations of Marine Terpenoids, **Journal of The American Chemical Society**, 113, 11, 4092-4096, 1991.

PANARO, M. A.; ACQUAFREDDA, A.; LISI, S.; LOFRUMENTO, D. D.; TROTTA, T.; SATALINO, R.; SACCIA, M.; MITOLO, V.; BRANDONISIO, O., Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in *Leishmania infantum*-infected human macrophages stimulated with interferon-gamma and bacterial lipopolysaccharide, **International Journal of Clinical & Laboratory Research**, 29, 122–127, 1999.

- PATIL, A.D., FREYER, A.J., BEAN, M.F., CARTE, B.K., WESTLEY, J.W., JOHNSON, R.K., LAHOURETATE, P., The Plakortones, Novel Bicyclic Lactones from the Sponge *Plakortis halichondrioides* : Activators of CardiacSR-Ca²⁺ -Pumping ATPase, **Tetrahedron**, 52, 2, 377-394, 1996.
- PETTIT, G.R., NOGAWA, T., KNIGHT, J.C., DOUBEK, D.L., HOOPER, J.N.A., Antineoplastic Agents. 535.1 Isolation and Structure of Plakorstatins 1 and 2 from the Indo-Pacific Sponge *Plakortis nigra*, **Journal of Natural Products**, 67, 1611-1613, 2004.
- PUPO, M.T., GALLO, M.B.C., VIEIRA, P.C., Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais, **Química Nova**, 30, 6, 1446-1455, 2007.
- RABINOVITCH, M.; ALFIERI, S. C., From Lysosomes To Cells, From Cells To Leishmania - Amino-Acid Esters As Potential Chemotherapeutic-Agents, **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, 20, 665-674, 1987.
- RALIFO, P., SANCHEZ, L., GASSNER, N.C., TENNEY, K., SCOTT LOKEY, R., HOLMAN, T.R., VALERIOTE, F.A., CREWS, P., Pyrroloacridine Alkaloids from *Plakortisquasiampiaster*. Structures and Bioactivity, **Journal of Natural Products**, 70, 95-99, 2007.
- RATH, S., TRIVELIN, L.A., IMBRUNITO, T.R., TOMAZELLA, D.M., JESUS, M.N., MARZAL, P.C., Antimoniais empregados no tratamento da Leishmaniose: Estado da Arte, **Química Nova**, 26, 4, 550-555, 2003.
- RUDI, A., KASHMAN, Y., Three new cytotoxic metabolites from the marine sponge *Plakortis Halichondrioides*, **Journal of Natural Products**, 56, 10, 1827-1830, 1993.
- RUPPERT, E.E., BARNES, R.D., **Zoologia dos invertebrados**, Editora Roca Ltda., Rio de Janeiro.72-89, 103-150, 843-885, 974-999, 1996.
- SALEEM, M., ALI, M.S., HUSSAIN, S., JABBAR, A., ASHRAF, M., LEE, T.S., Marine natural products of fungal origin, **Natural Product Reports**, 24, 1142-1152, 2007.
- SANDLER, J.S., COLIN, P.L., HOOPER, A., FAULKNER, D.J., Cytotoxic β -Carbolines and Cyclic Peroxides from the Palauan Sponge *Plakortis nigra*, **Journal of Natural Products**, 65, 1258-1261, 2002.
- SATA, N., ABINSAY, H., YOSHIDA, W. Y., HORGAN, F.D., SITACHITTA, N., KELLY, M., SCHEUER, P.J. Lehalides A-D, metabolites from a Hawaiian sponge of the genus *Plakortis*, **Journal of Natural Products**, 68, 9, 1400-1403, 2005.
- SCHMIDT, E.W., FAULKNER, J.D., Absolute Configuration of Methyl (2Z,6R,8R,9E)-3,6-epoxy-4,6,8-triethyl-2,4,9-dodecatrienoate from the Sponge *Plakortis halichondrioides*, **Tetrahedron Letters**, 37, 6681-6684, 1996.
- SOUSA-FRANCO, J.; ARAÚJO-MENDES, E.; SILVA-JARDIM, I.; L-SANTOS, J.; FARIA, D. R.; DUTRA, W. O.; HORTA, M. F. . Infection-induced respiratory burst in BALB/c macrophages kills *Leishmania guyanensis* amastigotes through apoptosis: possible involvement in resistance to cutaneous leishmaniasis, **Microbes and Infection**, 8, 390-400, 2006.
- STIERLE, D.B., FAULKNER, J.D. Metabolites of three marine sponges of the genus *Plakortis*, **Journal of Organic Chemistry**, 45, 3396-3401, 1980.

TADA, H.; SHIHO, O.; KUROSHIMA, K.; KOYAMA, M.; TSUKAMOTO, K., An Improved Colorimetric Assay For Interleukin-2, **Journal of Immunological Methods**, 93, 157–165, 1986.

TAKEUCHI, S., ISHIBASHI, M., KOBAYASHI, J., Plakoridine A, a New Tyramine-Containing Pyrrolidine Alkaloid from the Okinawan Marine Sponge *Plakortis* sp., **Journal of Organic Chemistry**, 59, 3712-3713, 1994.

TSUKAMOTO, A., TAKEUCHI, S., ISHIBASHI, M., KOBAYASHI, J., Manzamenones A-F from the Okinawan Marine Sponges *Plakortis* sp.: Novel Dimeric Fatty Acid Derivatives Possessing a Bicycle[4.3.0]nonane Skeleton, **Journal of Organic Chemistry**, 57, 5255-5260, 1992.

ZAMPELLA, A., GIANNINI, C.G., DEBITUS, C., D'AURIA, M.V., Amphisterins: a new family of cytotoxic metabolites from the marine sponge *Plakortis quasiamphister*, **Tetrahedron**, 51, 257-263, 2001.

10.7 – Referências bibliográficas para o Capítulo 8

BAKER, B.J. E SCHEUER, P.J., The punaglandins: 10-chloroprostanoids from the octocoral *Telesto riisei*, **Journal of Natural Products**, 57, 10, 1346-1353, 1994.

BAKER, B.J., OKUDA, R.K., YU, P.T.K. E SCHEUER, P.J., Punaglandins: Halogenated antitumor eicosanoids from the octocoral *Telesto riisei*, **Journal of the American Chemical Society**, 107, 2976-2977, 1985.

BLUNT, J.W., COPP, B.R., HU, W.P., MUNRO, M.H.G., NORTHCOTE, P.T., PRINSEP, M.R., Marine Natural Products, **Natural Product Reports**, 25, 35-94, 2008.

CIAVATTA, M.L., GRESA, M.P.L., MANZO, E., GAVAGNIN, M., WAHIDULLA, S., CIMINO, G. New C₂₁ Δ^{20} pregnanes, inhibitors of mitochondrial respiratory chain, from Indopacific octocoral *Carijoa* sp. **Tetrahedron Letters**, 45, 7745-7748, 2004.

DORTA, E., DÍAZ-MARRERO, A.R., CUETO, M., D'CROZ, L., MATÉ, J.L. E DARIAS, J., Carijenone, a novel class of bicyclic prostanoid from the eastern Pacific octocoral *Carijoa multiflora*, **Organic Letters**, 6, 13, 2229-2232, 2004a.

DORTA, E., DÍAZ-MARRERO, A.R., CUETO, M., D'CROZ, L., MATÉ, J.L., SAN-MARTÍN, A. E DARIAS, J., Unusual chlorinated pregnanes from the eastern Pacific octocoral *Carijoa multiflora*, **Tetrahedron Letters**, 45, 915-918, 2004b.

LIYANAGE, G.K. E SCHMITZ, F.J., Cytotoxic amides from the octocoral *Telesto riisei*, **Journal of Natural Products**, 59, 148-151, 1996.

LIYANAGE, G.K. E SCHMITZ, F.J., Cytotoxic amides from the octocoral *Telesto riisei*, **Journal of Natural Products**, 61, 1180, 1998, Errata.

MAIA, L.F., EPIFANIO, R.A. E FENICAL, W., New cytotoxic sterol glycosides from the octocoral *Carijoa* (*Telesto*) *riisei*, **Journal of Natural Products**, 63, 1427-1430, 2000.

MIGOTTO, A.E., DA SILVEIRA, F.L., SCHLENZ, E. E FREITAS, J.C. (1999) Cnidaria, in Joly, C.A. e Bicudo, C.E.M. (orgs.), Migotto, A.E. & Tiago, C.G. (eds.), "Biodiversidade do Estado de São Paulo: Síntese do Conhecimento ao Final do Século XX. Volume 3: Invertebrados Marinhos. FAPESP, São Paulo, 35-46.

ROSS, R.A. E SCHEUER, P.J., 18-acetoxy- and 18-hydroxypregna-1,4,20-trien-3-one from the Telestacean Octocoral *Telesto riisei*, **Tetrahedron Letters**, 49, 4701-4704, 1979.

RUPPERT, E.E., BARNES, R.D., **Zoologia dos invertebrados**, Editora Roca Ltda., Rio de Janeiro. 72-89, 103-150, 843-885, 974-999, 1996.

SHEN, Y., CHENG, Y., LIN, Y., GUH, J., TENG, C. E KO, C. New Prostanoids with Cytotoxic Activity from Taiwanese Octocoral *Clavularia viridis*, **Journal of Natural Products**, 67, 542-546, 2004.