

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Michelli Massaroli da Silva

**Investigação do perfil químico de esponjas do gênero
Aplysina por LC-PDA-MS**

São Carlos

2009

Michelli Massaroli da Silva

**Investigação do perfil químico de esponjas do gênero *Aplysina* por
LC-PDA-MS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck

São Carlos

2009

DEDICATÓRIA

AOS MEUS PAIS

Sem eles nada disso seria possível. Por todo amor, carinho, paciência e dedicação durante toda a minha vida. Pelo apoio e compreensão em todos os momentos principalmente durante as etapas dos meus estudos.

MUITO OBRIGADA!

Aos meus queridos irmãos Melissa e Rodrigo. Obrigada por todo o apoio, carinho, incentivo e pelo amor e amizade que temos um pelo outro.

Amo todos vocês!!!

Meu coração pertence a vocês!!!

AGRADECIMENTOS

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

As minhas grandes amigas Catarinie e Lilian pela amizade e apoio desde os tempos de graduação.

Ao pessoal do Laboratório de Produtos Naturais, Fábio, Eli, Marília, Raquel, Suzi, Renata, Stela, Richeli, Carolina, Juliana, Marina, Camila e Milene e em especial à Miriam e à Simone pela ajuda durante todo o período do meu trabalho.

Aos meus amigos Gustavo, Fernanda e Lizandra pelo apoio e amizade.

À Silvia e Santelmo, pela amizade, apoio e carinho, por estarem sempre ao meu lado me ajudando em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira e Katyuscya Veloso (Departamento de Química - UFSCAR) pela obtenção de espectros de RMN.

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

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

A Deus.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	VII
Lista de Esquemas	XIV
Lista de Tabelas	XV
Lista de Símbolos e Abreviaturas	XVI
Resumo	XVII
Abstract	XVIII
1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Esponjas Marinhas	18
1.2. Esponjas do Gênero <i>Aplysina</i>	21
1.3. Biossíntese de compostos derivados da dibromotirosina	29
1.4. Sistemas de desreplicação produtos naturais	32
2. JUSTIFICATIVA	38
3. OBJETIVOS	39
4. PARTE EXPERIMENTAL	40
4.1. Técnicas Cromatográficas	40
4.1.1. Extração em fase sólida	40
4.1.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um Espectrômetro de Massas e Ultravioleta (arranjo fotodiodos) (HPLC-PDA-MS)	40
4.1.3. Solventes	41
4.2. Estudo de 14 extratos de esponjas do gênero <i>Aplysina</i> coletadas na Bahia de todos os Santos	41
4.2.1. Coleta e processamento inicial das esponjas	41
4.2.2. Frações AcOEt	43

4.2.3. Frações aquosas	44
4.2.4. Otimização das condições cromatográficas	45
4.2.5. Análise dos dados	48
5. RESULTADOS & DISCUSSÃO	49
5.1. Estudo químico das diferentes espécimens de esponjas do gênero <i>Aplysina</i>	49
5.2. Otimização Cromatográfica	52
5.2.1. Otimização das condições cromatográficas para as frações oriundas da fração AcOEt	52
5.3. Análise dos compostos-padrões	54
5.4. Análise dos extratos brutos das espécimens de esponjas do gênero <i>Aplysina</i>	61
5.5. Análise das 42 frações oriundas das frações AcOEt	62
5.6. Análise das 28 frações oriundas das frações aquosas	129
6. CONCLUSÕES	131
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133

Lista de Figuras

Figura 1. Diagrama de uma esponja asconóide parcialmene seccionada	19
Figura 2. Esponjas da espécie <i>Aplysina</i> sp. (fonte: Hajdu, 2007)	21
Figura 3. Estrutura da dienona (1) e dimetoxicetal (2)	23
Figura 4. Estrutura da aeroplisinina-1	23
Figura 5. Estrutura da fistularina-3 (4), 11-cetofistularina-3 (5) e desoxifistularina-3 (6)	24
Figura 6. Estrutura do ácido 2-(3-amino-2,4-dibromo-6-hidroxifenil) acético	25
Figura 7. Estrutura das Caissarinas A e B	25
Figura 8. Estrutura das agelocaissarinas A1 (10), A2 (11), B1 (12), B2 (13), da caissarina C (14) e da 11-hidroxiaerotionina (15)	26
Figura 9. Estrutura do <i>N</i> ^o -sulfamato da araplisillina (16) e do ácido <i>N</i> -[5 <i>S</i> , 10 <i>R</i>]-7,9-dibromo-10-hidróxi-8-metóxi-1-oxa-2-azaspiro[4, 5] deca-2,6-8-trieno-3-carboxi]-4-aminobutanóico (17)	27
Figura 10. Compostos derivados da dibromotirosina	28
Figura 11. Compostos derivados da dibromotirosina	29
Figura 12. Rota biossintética para a dienona e a dibromogentisamida	30
Figura 13. Estrutura dos precursores	31
Figura 14. Rota biossintética para metabólitos de esponjas da Ordem Verongida	32
Figura 15. Estrutura da oroidina (40), esceptrina (41), oxiscetrina (42) e do ácido nakamurico (43)	36
Figura 16. Estrutura da manzacidina A e B (44 e 45) e da longamida A e B (46 e 47)	37
Figura 17. Picos observados na região do íon molecular de compostos bromados (Silverstein e Webster, 1998)	50
Figura 18. Estrutura e espectro de UV típicos de derivados da dibromotirosina	51
Figura 19. Estrutura da bis-oxazolidinona	57
Figura 20. Cromatograma com detecção no UV (280 nm) do composto bis-oxazolidinona, com seus respectivos espectro UV: (a) <i>t</i> _R = 4,85 min.; espectro de massas: (b) <i>t</i> _R = 4,85 min.; (c) e (d) ampliação dos picos (voltagem do cone de ionização de 25 e 50 V).	58

- Figura 21.** Cromatograma com detecção UV ($\lambda = 280\text{nm}$) da amostra BA07ES-52-8:2. 62
- Figura 22.** Espectros de UV na região dos picos cromatográficos: (a) pico com t_R de 12,1 min; (b) pico com t_R de 12,3 min; (c) pico com t_R de 12,9 min; (d) pico com t_R de 13,1 min; (e) pico com t_R de 13,6 min; (f) pico com t_R de 14,1 min; (g) pico com t_R de 15,1 min; 66
- Figura 23.** Espectros de massas do primeiro pico cromatográfico da amostra BA07ES-52-8:2 com $t_R = 12,1$ min: (a) espectro de massas; (a₁) ampliação do íon pseudo-molecular; (a₂) ampliação do íon fragmento. Segundo pico cromatográfico com $t_R = 12,3$ min: (b) espectro de massas; (b₁) ampliação do íon pseudo-molecular; (b₂) ampliação do íon fragmento. Condições: cone de voltagem de ionização do massas de 50 V. 67
- Figura 24.** Possível estrutura do composto com m/z 851. 68
- Figura 25.** Possível estrutura do íon fragmento m/z 295.0. 69
- Figura 26.** Espectros de massas na região do terceiro pico cromatográfico ($t_R = 12,9$ min): (a₂₅, a₅₀) espectro de massas; (a₂₅', a₅₀') ampliação do íon pseudo-molecular; (a₂₅'', a₅₀'') ampliação do íon fragmento. Dados: a₂₅ = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 V e a₅₀ = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V. $[M+H]^+$: m/z 835.0; $[M+Na]^+$: m/z 856.9. 70
- Figura 27.** Possível estrutura do composto com m/z 851. 70
- Figura 28.** Possível mecanismo de fragmentação para o íon fragmento m/z 496.0 72
- Figura 29.** Possível mecanismo de fragmentação para o íon fragmento m/z 435.0 73
- Figura 30.** Espectros de massas na região do quarto pico cromatográfico ($t_R = 13,1$ min): (a₂₅, a₅₀) espectro de massas; (a₂₅') ampliação do íon pseudo-molecular; (a₂₅'', a₂₅'', a₅₀', a₅₀'') ampliação do íon fragmento. Dados: a₂₅ = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 V e a₅₀ = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V. $[M+Na]^+$: m/z 870.9. 75
- Figura 31.** Possíveis estruturas para o composto com m/z 848.7. 76
- Figura 32.** Possível mecanismo de fragmentação para o íon fragmento m/z 510.0 do composto ceto-hidroxi-aerotionina. 77
- Figura 33.** Possível mecanismo de fragmentação para o íon fragmento m/z 510.0 do composto caissarina C. 78

- Figura 34.** Espectros de massas na região do quinto pico cromatográfico ($t_R = 13,6$ min): (a_{25} , a_{50}) espectro de massas; (a_{50}') ampliação do íon pseudo-molecular; (a_{25}' , a_{50}'') ampliação do íon fragmento. Dados: a_{25} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 V e a_{50} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V. $[M+Na]^+$: m/z 855.0. 79
- Figura 35.** Possíveis estruturas para o composto com m/z 833.0. 80
- Figura 36.** Possível mecanismo de fragmentação para o íon fragmento m/z 494.0 do composto homoaerotionina. 81
- Figura 37.** Possível mecanismo de fragmentação para o íon fragmento m/z 494.0 do composto 11-oxoaerotionina. 82
- Figura 38.** Possível mecanismo de fragmentação para o íon fragmento m/z 521.0 do composto homoaerotionina. 83
- Figura 39.** Possível mecanismo de fragmentação para o íon fragmento m/z 521.0 do composto 11-oxoaerotionina. 84
- Figura 40.** Espectros de massas na região do sexto pico cromatográfico ($t_R = 14,1$ min): (a_{25} , a_{50}) espectro de massas; (a_{50}') ampliação do íon pseudo-molecular; (a_{50}'' , a_{50}''') ampliação do íon fragmento Dados: a_{25} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 V e a_{50} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V. $[M+H]^+$: m/z 818.9; $[M+Na]^+$: m/z 841.0. 86
- Figura 41.** Possível mecanismo de fragmentação para o íon fragmento m/z 480.0. 88
- Figura 42.** Espectros de massas na região do sétimo pico cromatográfico ($t_R = 15,1$ min): (a_{25} , a_{50}) espectro de massas; (a_{50}') ampliação do íon pseudo-molecular; (a_{25}' , a_{50}'' , a_{50}''') ampliação do íon fragmento Dados: a_{25} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 V e a_{50} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V. $[M+Na]^+$: m/z 1136.8. 90
- Figura 43.** Possível estrutura do íon fragmento m/z 439.8. 92
- Figura 44.** Cromatograma com detecção UV ($\lambda = 280$ nm) da amostra BA07ES-91-MeOH 100%. 92
- Figura 45.** Espectro de RMN- 1H da fistularina-3 (DMSO- d_6 , 400 MHz). 93
- Figura 46.** Expansão do espectro de RMN- 1H da fistularina-3 (DMSO- d_6 , 400 MHz). 94
- Figura 47.** Estrutura da fistularina-3. 96

Figura 48. Cromatograma com detecção UV ($\lambda = 280\text{nm}$) da amostra BA07ES-52-1:1. 97

Figura 49. Espectros UV na região dos picos cromatográficos: (a) pico com t_R de 12,1 min; (b) pico com t_R de 12,3 min; (c) pico com t_R de 12,9 min; (d) pico com t_R de 13,1 min; (e) pico com t_R de 13,6 min; (f) pico com t_R de 14,1 min; (g) pico com t_R de 15,1 min; 98

Figura 50. Espectros de massas na região do primeiro pico cromatográfico ($t_R = 12,1$ min): (a) espectro de massas; (b) ampliação do íon pseudo-molecular; (c) ampliação do íon fragmento. Condições: cone de voltagem de ionização do massas de 50 V. 99

Figura 51. Espectros de massas na região do segundo pico cromatográfico ($t_R = 12,3$ min): (a_{25} , a_{50}) espectro de massas; (a_{25}' , a_{50}') ampliação do íon pseudo-molecular; (a_{25}'' , a_{50}'') ampliação do íon fragmento. Dados: a_{25} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 V e a_{50} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V.. $[M+H]^+$: m/z 851.0; $[M+Na]^+$: m/z 872.9. 100

Figura 52. Espectros de massas na região do terceiro pico cromatográfico ($t_R = 12,9$ min): (a_{25} , a_{50}) espectro de massas; (a_{25}' , a_{50}') ampliação do íon pseudo-molecular; (a_{25}'' , a_{50}'') ampliação do íon fragmento. Dados: a_{25} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 V e a_{50} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V. $[M+H]^+$: m/z 834.9; $[M+Na]^+$: m/z 857.0. 101

Figura 53. Espectros de massas na região do quarto pico cromatográfico ($t_R = 13,1$ min): (a_{25} , a_{50}) espectro de massas; (a_{50}') ampliação do íon pseudo-molecular; (a_{25}' , a_{25}'') ampliação do íon fragmento. Dados: a_{25} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 V e a_{50} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V. 102

Figura 54. Espectros de massas na região do quinto pico cromatográfico ($t_R = 13,6$ min): (a_{25} , a_{50}) espectro de massas; (a_{25}' , a_{50}') ampliação do íon pseudo-molecular; (a_{50}'' , a_{50}''') ampliação do íon fragmento. Dados: a_{25} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 V e a_{50} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V. $[M+H]^+$: m/z 832.8; $[M+Na]^+$: m/z 854.9. 103

- Figura 55.** Espectros de massas na região do sexto pico cromatográfico ($t_R = 14,1$ min): (a_{25} , a_{50}) espectro de massas; (a_{25}' , a_{50}') ampliação do íon pseudo-molecular; (a_{25}'' , a_{50}'' , a_{50}''') ampliação do íon fragmento. Dados: a_{25} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 V e a_{50} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V. $[M+H]^+$: m/z 818.9; $[M+Na]^+$: m/z 840.9. 105
- Figura 56.** Espectros de massas na região do sétimo pico cromatográfico ($t_R = 15,1$ min): (a) espectro de massas; (b) ampliação do íon pseudo-molecular; (c, d) ampliação do íon fragmento. Condições: cone de voltagem de ionização do massas de 50 V. 106
- Figura 57.** Cromatograma com detecção UV ($\lambda = 280$ nm) da amostra BA07ES-52-MeOH 100%. 108
- Figura 58.** Espectros UV na região dos picos cromatográficos da fração BA07ES-92-8:2: (a) pico com t_R de 12,9 min; (b) pico com t_R de 13,1 min; (c) pico com t_R de 13,6 min; (d) pico com t_R de 14,1 min; (e) pico com t_R de 15,1 min; 109
- Figura 59.** Espectros de massas na região do primeiro pico cromatográfico ($t_R = 12,9$ min): (a_{25} , a_{50}) espectro de massas; (a_{25}' , a_{50}') ampliação do íon pseudo-molecular; (a_{50}'' , a_{50}''') ampliação do íon fragmento Dados: a_{25} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 V e a_{50} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V. $[M+H]^+$: m/z 834.9; $[M+Na]^+$: m/z 856.9. 110
- Figura 60.** Espectros de massas na região do segundo pico cromatográfico ($t_R = 13,1$ min): (a_{25} , a_{50}) espectro de massas; (a_{50}') ampliação do íon pseudo-molecular; (a_{50}'') ampliação do íon fragmento. Dados: a_{25} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 V e a_{50} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V. 111
- Figura 61.** Espectros de massas na região do terceiro pico cromatográfico ($t_R = 13,6$ min): (a_{25} , a_{50}) espectro de massas; (a_{25}' , a_{50}') ampliação do íon pseudo-molecular; (a_{25}'' , a_{50}'') ampliação do íon fragmento. Dados: a_{25} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 V e a_{50} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V. 112

- Figura 62.** Espectros de massas na região do quarto pico cromatográfico ($t_R = 14,1$ min): (a_{25} , a_{50}) espectro de massas; (a_{25} , a_{50}) ampliação do íon pseudo-molecular; (a_{50}'' , a_{50}''') ampliação do íon fragmento. Dados: a_{25} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 V e a_{50} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V: m/z 818.9; $[M+Na]^+$: m/z 840.9. 113
- Figura 63.** Espectros de massas na região do quinto pico cromatográfico ($t_R = 15,1$ min): (a_{25} , a_{50}) espectro de massas; (a_{25}' , a_{50}') ampliação do íon pseudo-molecular; (a_{50}'' , a_{50}''' , a_{50}'''') ampliação do íon fragmento. Dados: a_{25} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 V e a_{50} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V. $[M+H]^+$: m/z 1114.8; $[M+Na]^+$: m/z 1136.8. 115
- Figura 64.** Cromatograma com detecção UV ($\lambda = 280$ nm) da amostra BA07ES-92-1:1. 116
- Figura 65.** Cromatograma com detecção UV ($\lambda = 280$ nm) da amostra BA07ES-92-MeOH 100%. 116
- Figura 66.** Cromatograma com detecção UV ($\lambda = 280$ nm) da amostra BA07ES-92-8:2. 116
- Figura 67.** Espectros UV na região dos picos cromatográficos: (a) pico com t_R de 12,9 min; (b) pico com t_R de 13,1 min; (c) pico com t_R de 13,6 min; (d) pico com t_R de 14,1 min; (e) pico com t_R de 15,1 min; (f) pico com t_R de 15,8 min. 117
- Figura 68.** Espectros de massas na região do primeiro pico cromatográfico ($t_R = 12,9$ min): (a_{25} , a_{50}) espectro de massas; (a_{25}' , a_{50}') ampliação do íon pseudo-molecular; (a_{25}'' , a_{50}'' , a_{50}''') ampliação do íon fragmento. Dados: a_{25} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 V e a_{50} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V. $[M+H]^+$: m/z 834.8; $[M+Na]^+$: m/z 856.8. 119
- Figura 69.** Espectros de massas na região do segundo pico cromatográfico ($t_R = 13,1$ min): (a_{25} , a_{50}) espectro de massas; (a_{50}') ampliação do íon pseudo-molecular; (a_{25}' , a_{25}'' , a_{50}') ampliação do íon fragmento. Dados: a_{25} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 V e a_{50} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V. 120

Figura 70. Espectros de massas na região do terceiro pico cromatográfico ($t_R = 13,6$ min): (a_{25} , a_{50}) espectro de massas; (a_{50}') ampliação do íon pseudo-molecular; (a_{25}' , a_{50}'') ampliação do íon fragmento. Condições: Dados: a_{25} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 V e a_{50} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V. $[M+Na]^+$: m/z 854.7. 121

Figura 71. Espectros de massas na região do quarto pico cromatográfico ($t_R = 14,1$ min): (a_{25} , a_{50}) espectro de massas; (a_{25}' , a_{50}') ampliação do íon pseudo-molecular; (a_{25}'' , a_{50}'' , a_{50}''') ampliação do íon fragmento. Dados: a_{25} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 V e a_{50} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V. $[M+H]^+$: m/z 818.8; $[M+Na]^+$: m/z 840.8. 123

Figura 72. Espectros de massas na região do quinto pico cromatográfico ($t_R = 15,1$ min): (a) espectro de massas; (b) ampliação do íon pseudo-molecular; (c, d, e) ampliação do íon fragmento Dados: cone de voltagem de ionização do massas 50 V. $[M+Na]^+$: m/z 1136.7 124

Figura 73. Espectros de massas na região do sexto pico cromatográfico ($t_R = 15,8$ min): (a_{25} , a_{50}) espectro de massas; (a_{25}') ampliação do íon pseudo-molecular; (a_{25}'' , a_{50}') ampliação do íon fragmento. Dados: a_{25} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 V e a_{50} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V. 125

Figura 74. Possível estrutura para o composto com t_R 15,8 minutos. 126

Lista de Esquemas

Esquema 1. Método de desreplicação (Wolf; Siems, 2007)	35
Esquema 2. Fluxograma geral do estudo químico das esponjas do gênero <i>Aplysina</i>	43
Esquema 3. Fluxograma geral do fracionamento das frações AcOEt das esponjas do gênero <i>Aplysina</i>	44
Esquema 4. Fluxograma geral do fracionamento das frações aquosas das esponjas do gênero <i>Aplysina</i>	45
Esquema 5. Esquema geral de busca no Marinlit	48

Lista de Tabelas

Tabela 1. Informações sobre a espécie, massa seca e massa analisada das esponjas do gênero <i>Aplysina</i> .	40
Tabela 2. Compostos isolados pelo grupo de pesquisa de QOPN, IQSC-USP. Compostos utilizados como padrões.	55
Tabela 3. Fórmula molecular, peso molecular, relação m/z dos compostos-padrões e seus respectivos fragmentos.	60
Tabela 4. Identificação das esponjas do gênero <i>Aplysina</i> .	61
Tabela 5. Frações oriundas da SPE das frações AcOEt.	63
Tabela 6. Dados comparativos de t_R , espectro de UV e espectros de massas do composto aerotionina e do composto 6 da fração BA07ES-8:2.	86
Tabela 7. Dados comparativos de t_R , espectro de UV e espectros de massas do composto fistularina-3 e do composto 7 da fração BA07ES-8:2.	91
Tabela 8. Dados comparativos de RMN- ¹ H da fração BA07ES-91-MeOH 100% e da fistularina-3.	95
Tabela 9. Relação de todas as frações acetato de etila, suas massas (mg), t_R e os valores de m/z dos derivados da dibromotirosina.	127

Lista de Símbolos e Abreviaturas

DE₅₀ – 50% da dose efetiva

DL₅₀ – 50% da dose letal

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

CIM – Concentração Inibitória Mínima

MS – *Mass Spectrometry*

UV - Ultravioleta

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

PDA – *Photodiode Array Detector*

ELSD – *Electrospray Light Scattering Detector*

SPE – *solid phase extraction*

RMN-¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

s – singleto

d – dubleto

t – tripleto

q – quarteto

se – sexteto

m – multipleteo

Resumo

SILVA, M. M. **Investigação do perfil químico de esponjas do gênero *Aplysina* por LC-PDA-MS**. 2009. 136 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

Esponjas do gênero *Aplysina* (Ordem: VERONGIDA) são conhecidas por apresentarem em seu metabolismo secundário compostos derivados da dibromotirosina, os quais são um importante aliado para o processo de identificação dessas esponjas. Este trabalho descreve o estudo do perfil químico de 14 espécimens de esponjas do gênero *Aplysina*, coletadas na Bahia de Todos os Santos-BA, no ano de 2007. Também foi desenvolvida uma metodologia de desreplicação, utilizando-se da técnica hifenada HPLC-PDA-MS(ESI), busca na literatura (MarinLit) e comparação com padrões. Os resultados obtidos demonstram claramente que essas esponjas apresentam os derivados da dibromotirosina e que a metodologia de desreplicação permitiu confirmar e/ou prever possíveis estruturas desses compostos com eficiência e sem a necessidade do seu isolamento. Entretanto, não foi possível distinguir as espécies dos organismos estudados através do seu perfil químico, uma vez que eles apresentaram praticamente os mesmos metabólitos em todas as frações analisadas. Isto demonstra que a classificação taxonômica em nível de espécie requer, necessariamente, a análise do esqueleto (espículas) das esponjas e possivelmente análises genômicas. A análise das frações aquosas permitiu apenas confirmar a presença desses derivados através da análise das absorções típicas no espectro de UV. Também, este é o primeiro trabalho sobre o estudo do perfil químico dessas esponjas com a utilização de um sistema de desreplicação que inclui a técnica hifenada HPLC-PDA-MS(ESI).

Palavras-chave: *Aplysina*, desreplicação, derivados da dibromotirosina, HPLC-PDA-MS.

ABSTRACT

SILVA, M. M. **Investigation of the chemical profile of sponges of the genus *Aplysina* by LC-PDA-MS.** 2009. 136 f. Dissertation (Masters) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

Sponges of the genus *Aplysina* (Order: VERONGIDA) are commonly recognized by the presence of dibromotyrisine derivatives at their secondary metabolites, compounds which are an important tool for their taxonomic identification. The present study describes the chemical profile of 14 sponges of *Aplysina* sp., collected in Bahia de Todos os Santos-BA. We developed a dereplication methodology using the hyphenated technique HPLC-PDA-MS(ESI), a database research (MarinLit) and comparison with chemical standards. The results showed that the 14 sponges analysed present dibromotyrisine derivatives and that the dereplication methodology enabled the prediction and/or confirmation of such structures without their previous isolation. However, the taxonomic identification of the 14 individual sponges at the species level was impossible due to the fact that chemical profile was of the sponges too similar. This result demonstrates that the taxonomic identification *Aplysina* sponges at the species level also requires the skeleton analysis and possibly genomic studies. Analyses of aqueous fraction confirmed the presence of dibromotyrisine derivatives. Furthermore, this is the first study of the chemical profile of *Aplysina* sponges that utilizes a dereplication methodology which includes the hyphenated technique HPLC-PDA-MS(ESI).

Keywords: *Aplysina*, dereplication, dibromotyrisine derivatives, HPLC-PDA-MS.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Esponjas Marinhas

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

O nome Porifera tem sua origem do latim (*porus* = poro; *ferre* = portar). São animais aquáticos, predominantemente marinhos. Apresentam uma corrente unidirecional de água através de seu corpo, da qual se nutrem e também se utilizam para fins reprodutivos. 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 (Kelly-Borges, 1995).

O tamanho das esponjas varia muito, podendo apresentar desde o tamanho de grão de arroz até exceder um metro de altura e diâmetro como é o caso da esponja-de-tartaruga. A maioria das espécies de esponjas é extremamente colorida. As esponjas do tipo asconóides têm as formas radiais mais simples e ilustram a estrutura básica deste filo como mostra a **Figura 1** (Rupert, 1996).

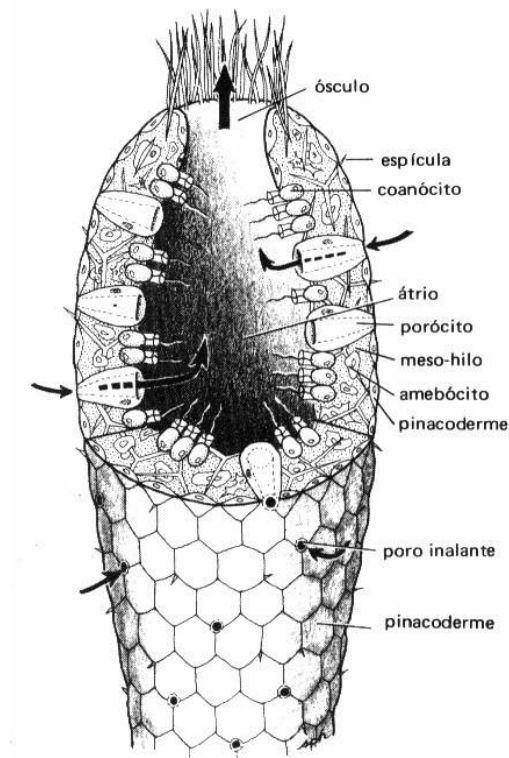


Figura 1. Diagrama de uma esponja asconóide parcialmente seccionada (Rupert, 1996).

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

espículas são muito importantes na identificação e classificação das espécies. A maioria delas é hermafrodita, sendo que o esperma sai de uma esponja e entra em outra pelas correntes que fluem através dos canais de água (Rupert,1996).

As esponjas se nutrem de material particulado. As partículas são selecionadas com base no tamanho e são triadas no curso de sua passagem no interior das câmaras flageladas (Rupert,1996).

Muitas esponjas produzem metabólitos que podem impedir que outros organismos se fixem em sua superfície e podem até impedir o ataque de predadores. Algumas delas excretam metabólitos para competir pelo espaço com outros animais, como no caso da esponja *Chondrila mucula* (“fígado-de-galinha”) do Caribe (Rupert,1996).

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

1.2. Esponjas do Gênero *Aplysina*

As esponjas pertencentes ao gênero *Aplysina* são classificadas taxonomicamente da seguinte forma:

Filo: Porífera
Classe: Demospongiae
Ordem: Verongida
Família: Aplysinidae
Gênero: *Aplysina*

Essas esponjas são caracterizadas por possuírem ramificações sólidas, cilíndricas e de consistência mole, sendo a estrutura do seu esqueleto rica em fibras. Sua coloração varia desde amarelo até marrom quando em seu habitat (**Figura 2**), ficando muito escura quando exposta à atmosfera.



Figura 2. Esponjas da espécie *Aplysina* sp (fonte: Hajdu, 2007).

Estas esponjas caracterizam-se pela alta variabilidade fenotípica, fornecendo algumas vezes resultados ambíguos de identificação quando baseados em critérios morfológicos. Um importante aliado para o processo de identificação é o

fato de que essas esponjas apresentam indicadores quimiotaxonômicos, os derivados da dibromotirosina (Ciminiello, 1996).

Através de um estudo da quimiotaxonomia de esponjas Van Soest e Erpenbeck (2007) mostraram que um marcador quimiotaxonômico ideal é aquele em que um composto ou classe de compostos deve estar presente em esponjas da mesma ordem ou gênero e ausente em outras. Através de vários estudos pôde-se comprovar que esponjas do gênero *Aplysina* (ordem Verongida) apresentam os derivados da dibromotirosina em seu metabolismo secundário indicando que estes compostos são marcadores taxonômicos deste gênero (Gunasekera, *et al.*, 1992; Saeki *et al.*, 2002; Lira *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2006; Rogers; Molinski, 2007; Ñunez, *et al.*, 2008). Porém, esses compostos também foram encontrados em esponjas como *Lotrochota* (ordem: Poecilosclerida), *Agelas* spp. (ordem: Agelasida), *Poecillastra* e *Jaspis* spp. (ordem: Astrophorida) e *Dysidea rhex* (ordem: Dicyoceratida) (Van Soest; Erpenbeck, 2007). Estes estudos comprometem esses compostos como marcadores quimiotaxonômicos de esponjas do gênero *Aplysina*, já que eles aparecem em outras esponjas de outras ordens e gêneros. Para a análise taxonômica dessas esponjas esses compostos podem ser utilizados para auxiliar nas análises, mas não podem ser um parâmetro exclusivo. Análises do esqueleto (espículas) das esponjas, e possivelmente análises genômicas, devem ser realizados para se comprovar a ordem, gênero e espécie das esponjas estudadas.

Durante vários anos foram isolados diversos derivados da dibromotirosina e alguns apresentaram importantes atividades biológicas, tais como, antimicrobiana, anticancerígena, citotóxica, antiviral, antituberculose, dentre outras (Sharma; Burkholder, 1967; Kreuter, 1990; Gunasekera *et al.*, 1992; Teeuapant, 1993; Compagnone *et al.*, 1999; Oliveira, *et al.*, 2006).

Os primeiros compostos reportados na literatura isolados de esponjas do gênero *Aplysina* foram a dienona (1) e o dimetoxicetal (2), isolados do extrato metanólico das espécies *Aplysina fistularis* e *Aplysina cauliformis*, os quais apresentaram atividade antimicrobiana (Sharma; Burkholder, 1967).

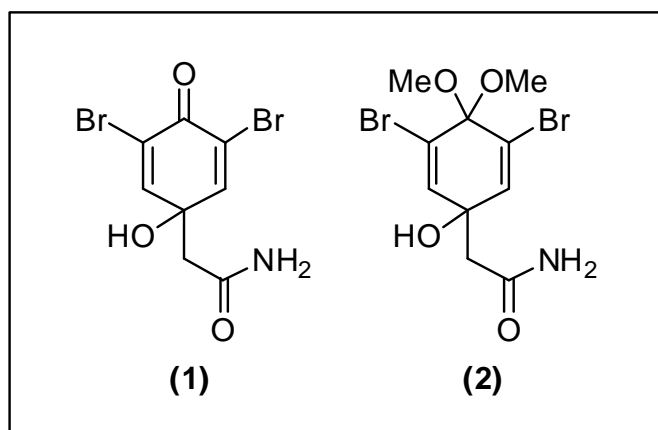
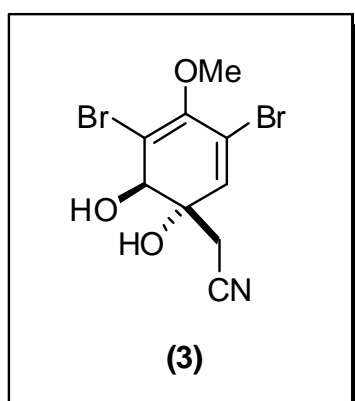


Figura 3. Estruturas da dienona (1) e dimetoxicetal (2).



A aeroplisinina-1 (3) isolada da esponja *Aplysina aerophoba* (Sharma; Burkholder 1967), apresentou atividade citotóxica *in vitro* em linhagens de células de câncer de mama, linfomas e câncer de pele (Kreuter, 1990), e atividade citotóxica *in vitro* em células HeLa (câncer uterino) com IC_{50} de 3,0 μ M (Teeyapant, 1993).

Figura 4. Estrutura da aeroplisinina-1

Da esponja *Aplysina archeri* isolou-se a fistularina-3 (4) e a 11-cetofistularina-3 (5). Ambas apresentaram atividade antiviral contra o vírus de

leucemia felino de $DE_{50} = 22 \mu\text{M}$ e $42 \mu\text{M}$ (Gunasekera, *et al.*, 1992). A fistularina-3 (4) ainda apresentou atividade contra a bactéria *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv como também a desoxifistularina-3 (6) isolada da esponja *Aplysina cauliformis* (Oliveira, *et al.*, 2006), sendo que esta última também apresentou atividade *in vitro* contra linhagem de células de câncer de mama (MCF-7) com um $DL_{50} = 17 \mu\text{g/mL}$, isolada da esponja *Aplysina fistularis* (Compagnone *et al.*, 1999) (Figura 5).

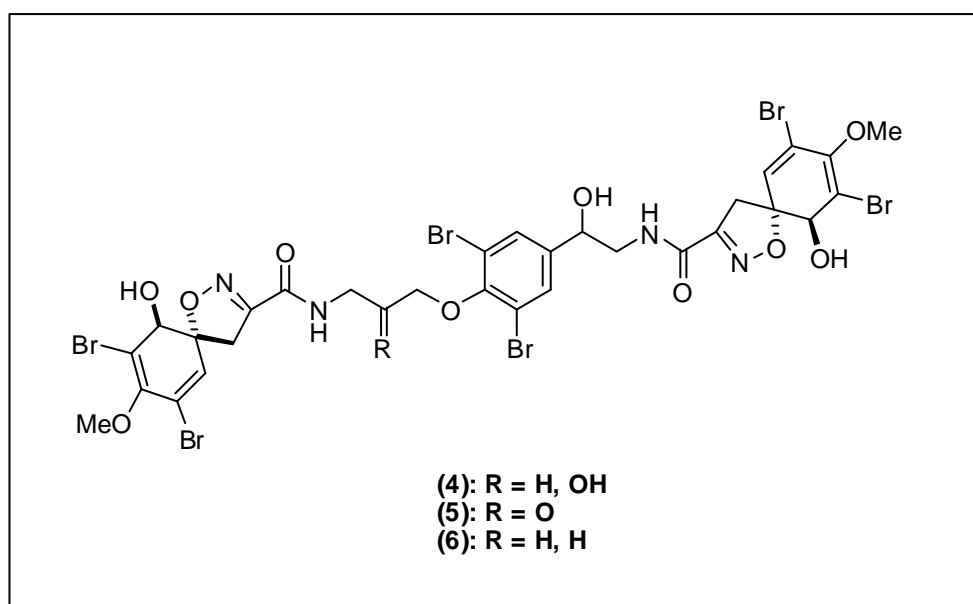


Figura 5. Estrutura da fistularina-3 (4), 11-cetofistularina-3 (5) e desoxifistularina-3 (6).

Outro composto isolado da esponja *Aplysina cauliformis* foi o ácido 2-(3-amino-2,4-dibromo-6-hidroxifenil) acético (7) que apresentou atividade antimicobactéria com CIM de $49 \mu\text{M}$ (Oliveira *et al.*, 2006) (Figura 6, pág. 25).

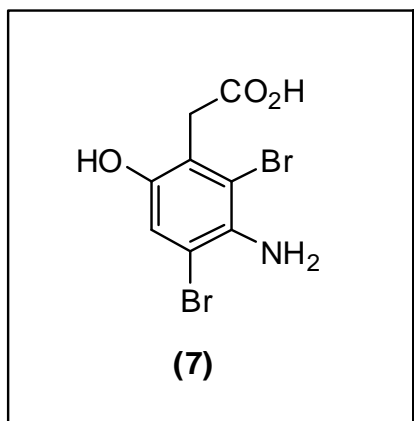


Figura 6. Estrutura do ácido 2-(3-amino-2,4-dibromo-6-hidroxifenil) acético.

Da esponja *Aplysina caissara* isolou-se dois alcalóides derivados da bromotirosina, a caissarina A (**8**) e a caissarina B (**9**). A caissarina A (**8**) apresenta em sua estrutura um resíduo hidroxiagmatina e a caissarina B (**9**) apresenta o 1,7-diamino-3-hidroxiheptano em sua estrutura (Saeki *et al.*, 2002).

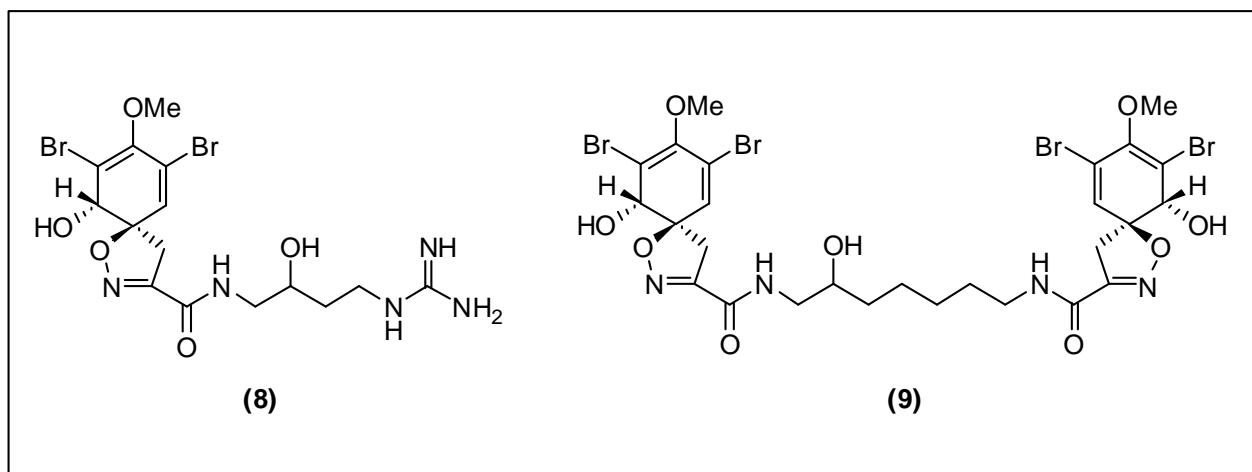


Figura 7. Estrutura das Caissarinas A (**8**) e B (**9**).

Do estudo do extrato bruto da esponja *Aplysina caissara*, Lira e colaboradores (2006) isolaram cinco derivados da dibromotirosina denominados,

agelocassarinas A1 (**10**), A2 (**11**), B1 (**12**), B2 (**13**) e caissarina C (**14**), além da fistularina-3 (**4**) e da 11-hidroxiaerotionina (**15**).

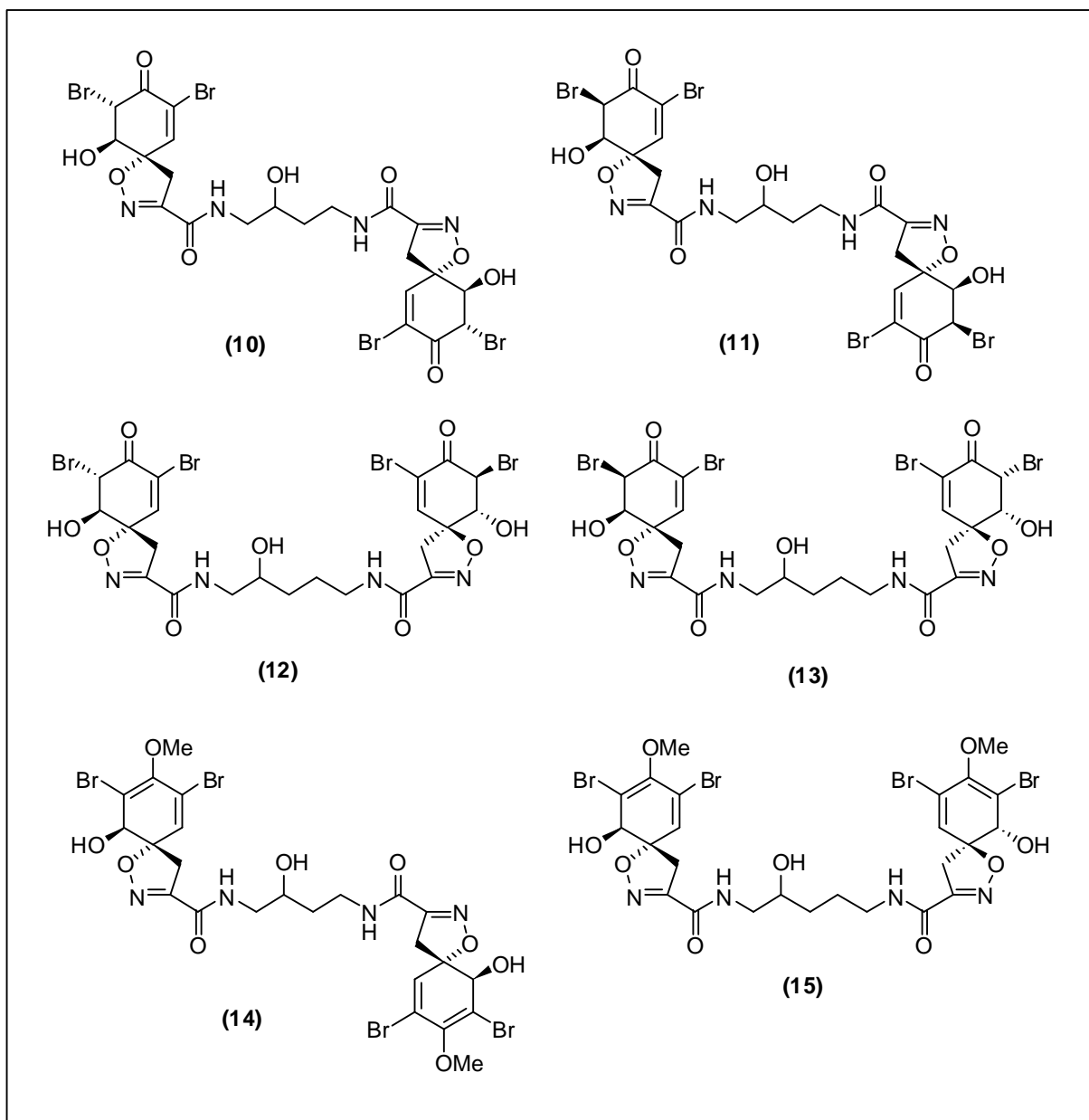


Figura 8. Estrutura das agelocassarinas A1 (**10**), A2 (**11**), B1 (**12**), B2 (**13**), da caissarina C (**14**) e da 11-hidroxiaerotionina (**15**)

Dois novos compostos spiroisoxazolinícos bromados, o N^{β} - sulfamato da araplisillina (**16**) e o ácido N -[5*S*,10*R*]-7,9-dibromo-10-hidroxi-8-metoxi-1-oxa-2-

azaspiro[4,5]deca-2,6,8-trieno-3-carboxi]-4-aminobutanóico (**17**) foram isolados de *Aplysina fulva* (Rogers; Molinski, 2007).

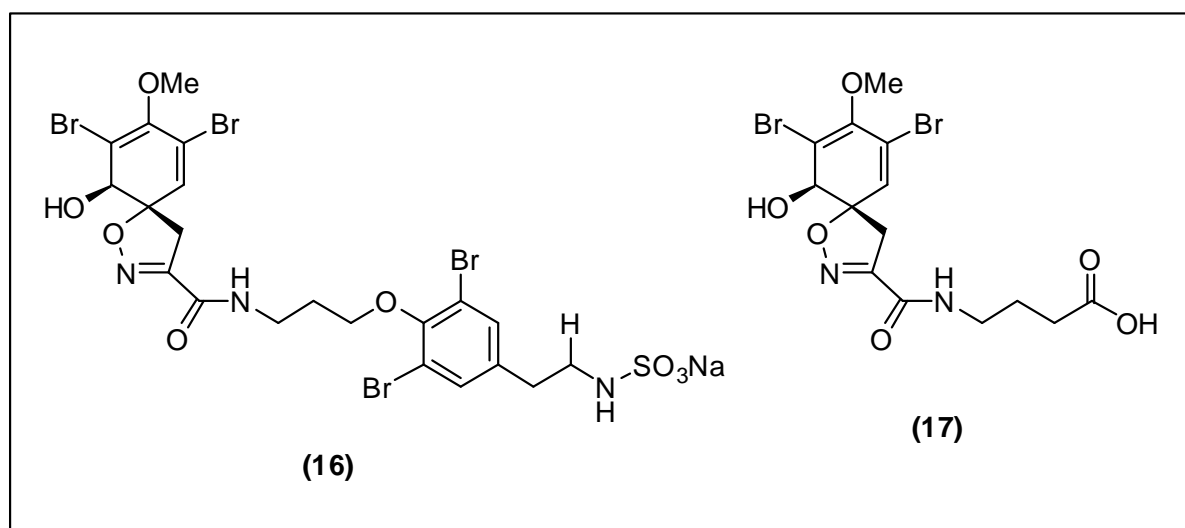


Figura 9. Estrutura do N^{β} - sulfamato da araplisillina (**16**) e o ácido N -[5*S*,10*R*]-7,9-dibromo-10-hidroxi-8-metoxi-1-oxa-2-azaspiro[4,5]deca-2,6,8-trieno-3-carboxi]-4-aminobutanóico (**17**).

Outros compostos derivados da dibromotirosina isolados a partir de um estudo sobre a variabilidade química de metabólitos secundários de extratos oriundos da esponja *Aplysina fulva* coletada uma na costa americana e outras cinco em diferentes localidades da costa brasileira foram: a aplysinafulvina (**18**), a subereatensina (**19**), uma mistura do cetal (**20**) e a oxazolidinona (**21**), as cavernicolina-1 e -2 (**22** e **23**), a fistularina-3 (**4**), a aerotionina (**24**), a 11-oxoaerotionina (**25**), a 11-oxo-12-hidroxiaerotionina (**26**), a 11-hidroxiaerotionina (**15**), a homoaerotionina (**27**), a aerofobina-1 (**28**), a aerofobina-2 (**29**), a aplisinamisina-1 (**30**), a aeroplisinina-1 (**31**), a 2-(3,5-dibromo-1-hidroxi-4-oxociclohexa-2,5-dienil) acetamida (**32**), e outros dois compostos (**33** e **34**), comprovando que esses metabólitos podem ser considerados indicadores quimiotaxômicos de esponjas da Ordem Verongida. Dentre estes compostos, a aplysinafulvina (**31**) é descrita pela primeira vez na literatura (Nuñez et al., 2008).

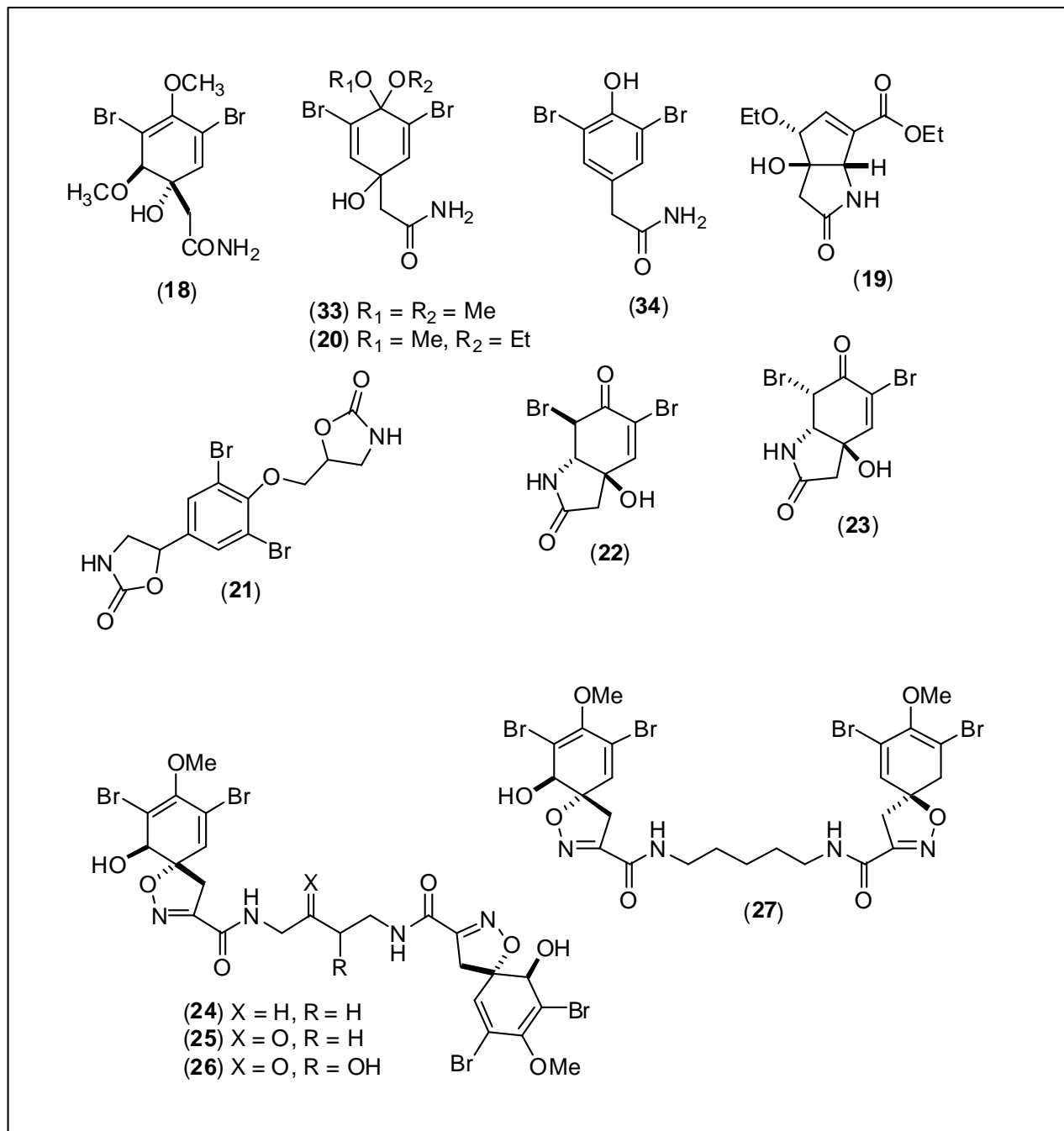


Figura 10. Compostos derivados da dibromotirosina.

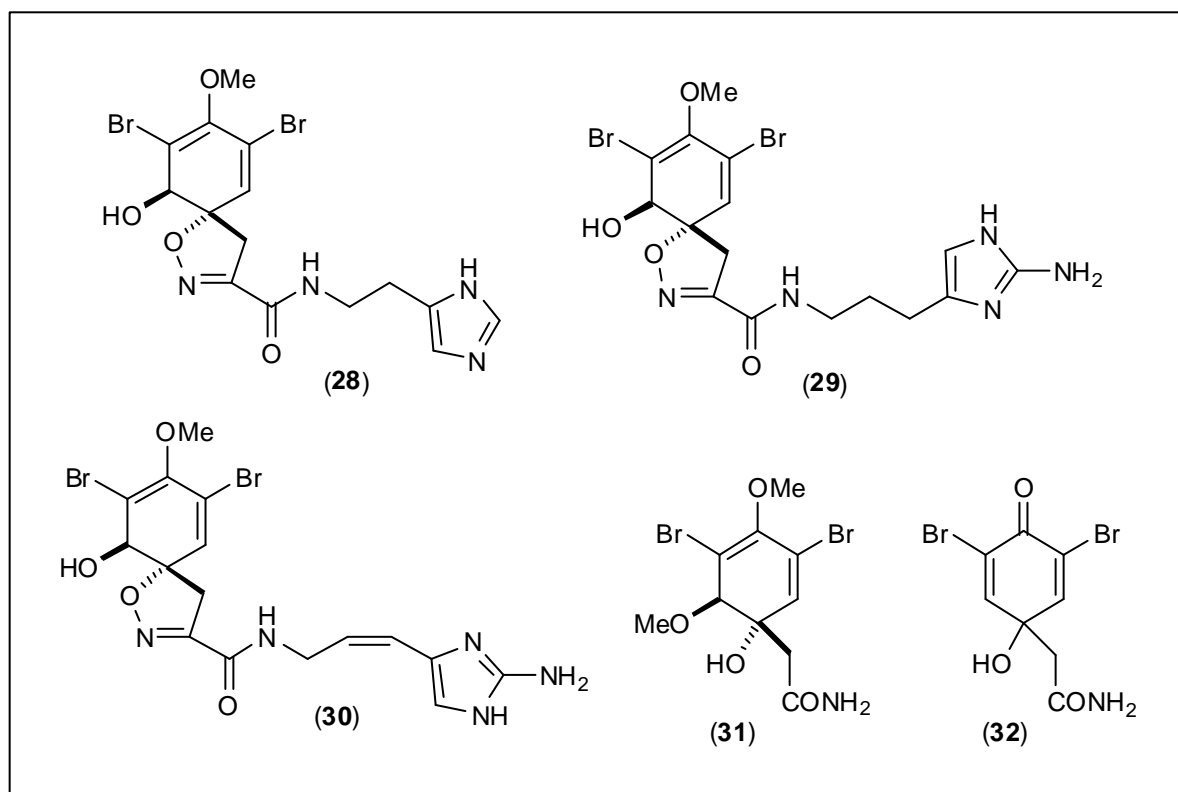


Figura 11. Compostos derivados da dibromotirosina.

1.3. Biossíntese de compostos derivados da dibromotirosina

Existem poucos trabalhos que descrevem a utilização de precursores marcados isotopicamente para o estudo da biossíntese de derivados da dibromotirosina.

Tymiak e Rinehart (1981) estudaram a biossíntese de fenóis bromados e bromoquinonas, na esponja *Aplysina fistularis*, coletada na Califórnia. Os experimentos comprovaram que ambas fenilalanina e tirosina são precursores biossintéticos da dienona e que esta sofre rearranjo para formar a dibromogentisamida. Com base nos experimentos realizados foi proposta a rota biossintética da **Figura 12**.

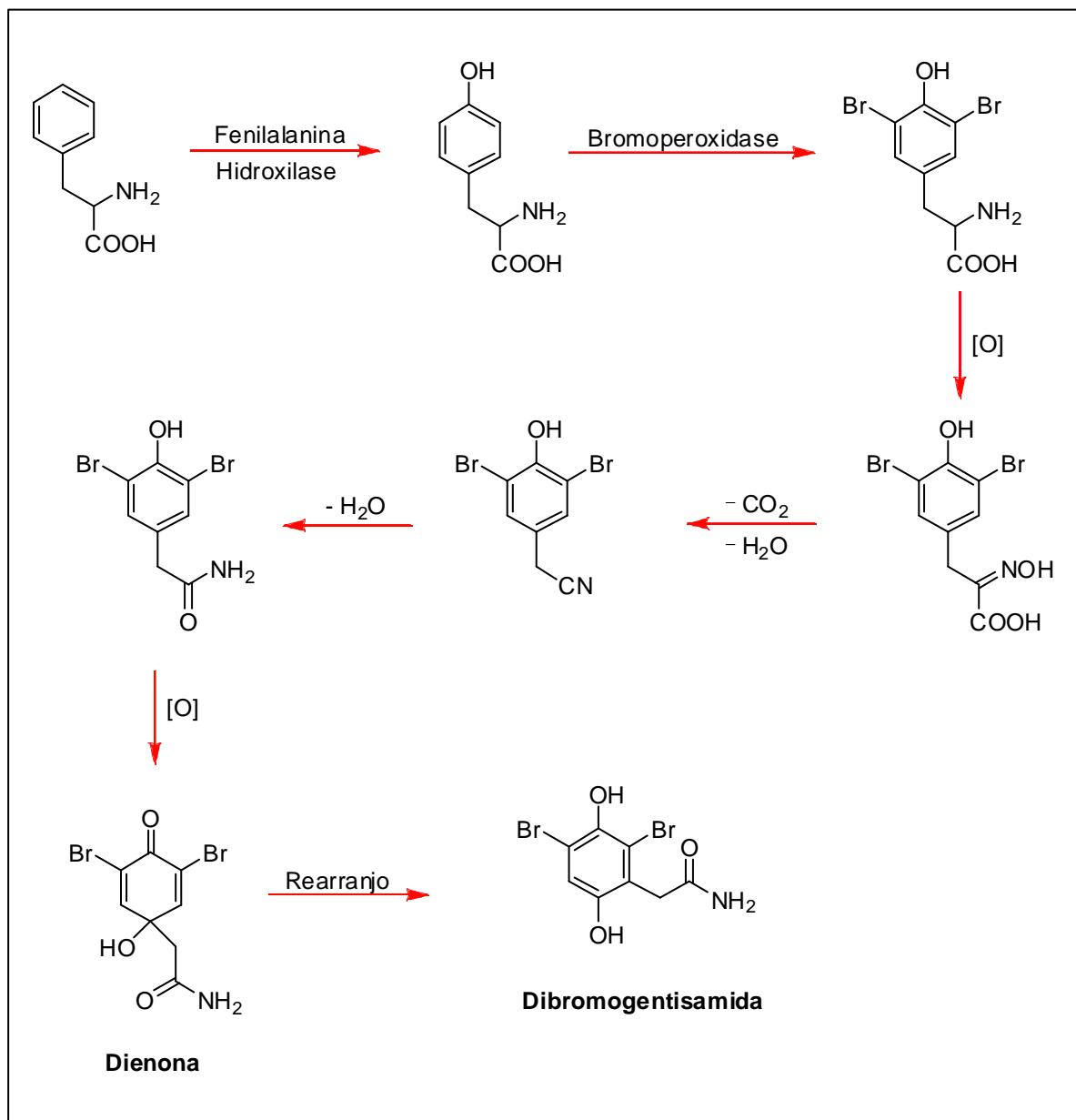


Figura 12. Rota biossintética para a dienona e a dibromogentisamida (Tymiak; Rinehart, 1981).

Carney e Rinehart (1995) realizaram experimentos de incorporação utilizando precursores (35), (36), (37), (38) e (39) (Figura 13, pág. 31). A partir desses experimentos verificou-se que nos compostos isolados, aeroplisinina-1 e dienona, houve maior incorporação de tirosina do que da bromotirosina e

dibromotirosina. Isto provavelmente acontece porque o volume do bromo deve interferir na permeabilidade dos precursores através da membrana celular.

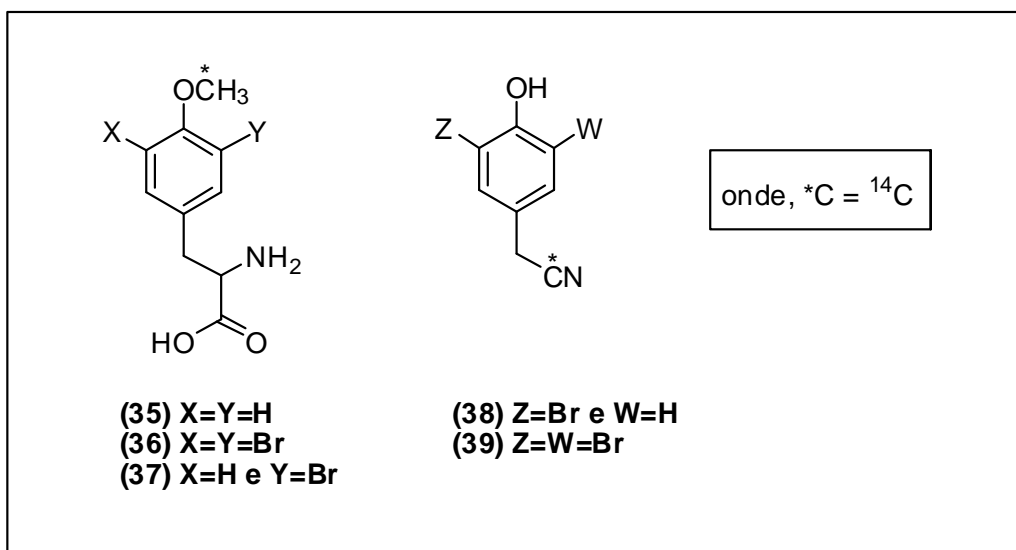


Figura 13. Estrutura dos precursores.

No caso das nitrilas fenólicas não foram incorporadas nos compostos isolados. Isso porque, segundo Goo, a O-metilação ocorre antes da formação do grupo nitrila durante o processo de biossíntese. Portanto, apenas as O-metil nitrilas serviriam como precursores para os compostos isolados. Assim, a formação de um anel areno epóxido na O-metil tirosina, que é metabolizado por uma abertura nucleofílica, leva a formação da aeroplisinina-1 (Carney e Rinehart, 1995).

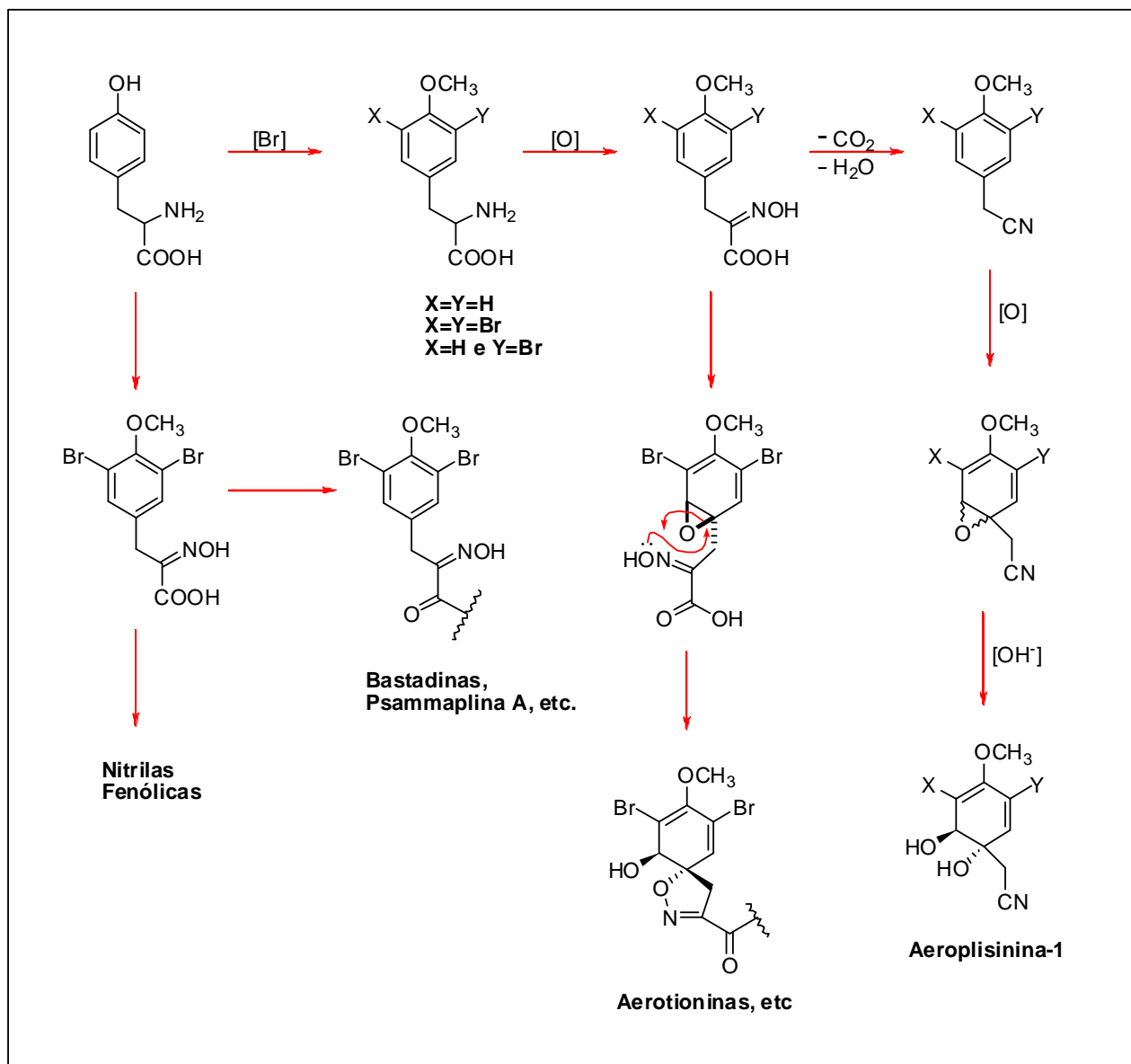


Figura 14. Rota biossintética para metabólitos de esponjas da Ordem Verongida (Carney; Rinehart, 1995).

1.4. Sistemas de desrepliação para produtos naturais

A palavra “dereplication”, em português desrepliação, foi denominada pela comunidade científica na década de 50, quando químicos de produtos naturais passaram por problemas em relação à descoberta de novos compostos e a re-avaliação de produtos naturais já descritos na literatura. Com isso, foi proposto

um novo método, o qual utilizava informações sobre compostos já isolados, identificados e descritos na literatura, no estudo de novos extratos e/ou frações parcialmente purificadas. Este novo método auxiliava na identificação dos compostos já isolados e bem descritos evitando assim, o seu re-isolamento. Com esses dados poderiam ser feitas identificações de misturas parcialmente purificadas e identificadas, sendo estas suficientes para priorizar uma determinada fração e assim tentar isolar e identificar compostos de interesse (Cannell, 1998).

Os métodos de desreplicação são baseados no uso de técnicas acopladas as quais apresentam várias vantagens em relação à sensibilidade, resolução e escala (mg, µg), constituindo uma poderosa ferramenta para a análise prévia dos extratos brutos e/ou frações parcialmente purificadas. As técnicas utilizadas podem ser: HPLC-UV, HPLC-NMR, HPLC-MS, HPLC-MS-MS ou o acoplamento on-line de mais de um detector (HPLC-MS-UV, HPLC-MS-ELSD, HPLC-MS-PDA-ELSD), sendo que o HPLC-MS-MS é a mais comum dentre todas. (Sedlock *et al.*, 1992; Alvi *et al.*, 1995; Constant *et al.*, 1995; Ackermann *et al.*, 1996; Zhou e Hamburger, 1996; Chung *et al.*, 1997, Bradshaw *et al.*, 2001).

O uso de HPLC-MS e HPLC-MS-MS em sistemas de desreplicação geram informações estruturais (fórmula molecular) que podem ser pesquisadas na maioria dos bancos de dados como MarinLit, Dictionary of Natural Products e ScinFinder Scholar e são técnicas muito sensíveis. Porém, a presença de íons interferentes oriundos de compostos minoritários que são facilmente ionizáveis e que apresentam maior intensidade do que os compostos de interesse podem contribuir para uma identificação errônea dos compostos analisados (Lang *et al.* 2008).

Segundo Wolf e Siems (2007) o método de desreplicação (**esquema 1**) pode ser descrito da seguinte maneira:

- i) Análise preliminar de extratos de animais, plantas ou microorganismos por HPLC-MS-PDA-ELSD;
- ii) Análise dos dados como, tempo de retenção, absorções no UV, relação m/z dos compostos existentes nos extratos;
- iii) Elaboração de uma biblioteca de picos/compostos contendo todos os dados sem nenhuma restrição;
- iv) Triagem biológica completa ou parcial dos compostos existentes na biblioteca;
- v) Divide-se a biblioteca de picos/compostos em duas partes, são elas, parte A: banco de dados de compostos (BDC) e parte B: banco de dados de compostos bioativos (BDCB);
- vi) Combinar A com B.

Após a combinação e comparação das duas partes, consegue-se obter informações sobre quais extratos/frações são de interesse para a continuação o estudo de isolamento de compostos bioativos e/ou inéditos, dos extratos analisados.



Esquema 1. Método de desreplicação (Wolf; Siems, 2007).

As técnicas de HPLC-MS e HPLC-MS/MS também estão sendo amplamente empregadas na identificação de diferentes classes de produtos naturais, como por exemplo, sesquiterpenos, flavonóides e micotoxinas, sendo que geralmente é utilizado na identificação de compostos majoritários e conhecidos, enquanto que o HPLC-RMN é utilizado principalmente na identificação de compostos parcialmente conhecidos e/ou minoritários na amostra (Vogler *et al.*, 1998; Nielsen, Smedsgaard, 2003; Tatsis *et al.*, 2007).

Em 2001, Hao e colaboradores utilizaram as técnicas de HPLC-MS(ESI) e MS-MS para analisar a presença de compostos derivados do composto oroidina (**40**) em duas espécies de esponjas do gênero *Agelas*. Eles confirmaram a presença do composto sceptrina (**41**) e também relataram a presença de outros possíveis compostos: oxisceptrina (**42**), ácido nakamúrico (**43**), manzacidinas A e B (**44** e **45**), longamidas A e B (**46** e **47**), dentre outros; sendo que a mazacidina B é descrita pela primeira vez na literatura, demonstrando assim que esta técnica é uma excelente ferramenta para a análise rápida de produtos naturais estruturalmente conhecidos e descritos na literatura como também na identificação de novos compostos.

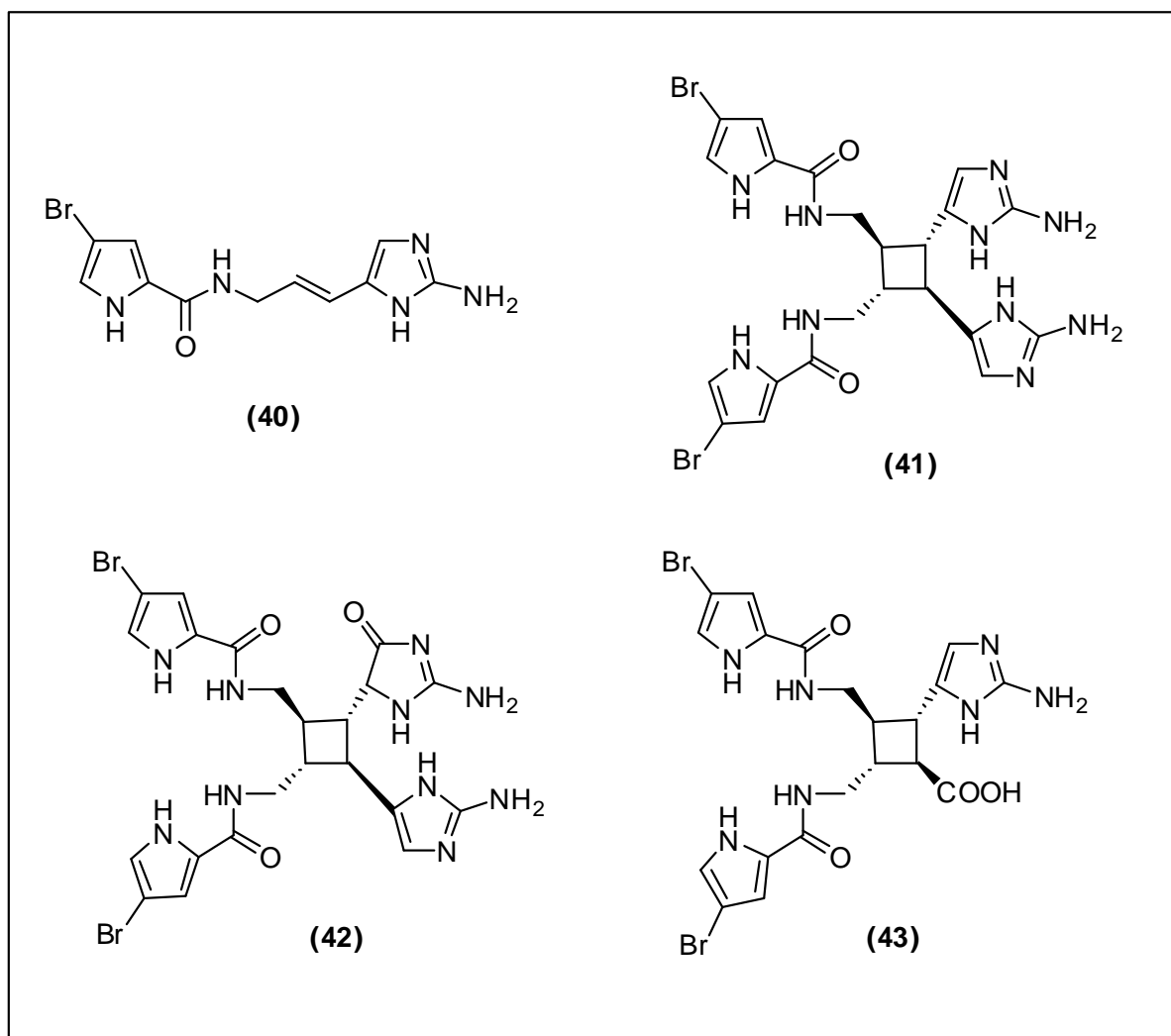


Figura 15. Estrutura da oroidina (**40**), sceptrina (**41**), oxisceptrina (**42**) e do ácido nakamúrico (**43**).

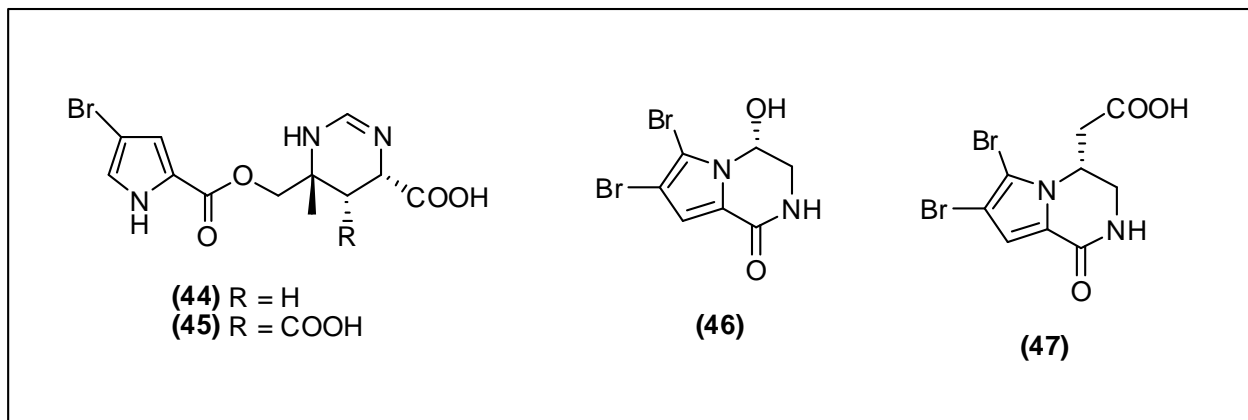


Figura 16. Estrutura das manzacidinas A e B (**44** e **45**) das longamidas A e B (**46** e **47**).

A desreplicação foi utilizada no processo de triagem de extratos com atividade antiviral realizado por pesquisadores do National Cancer Institute (NCI) (Cardellina *et al.*, 1993). A partir disto, a utilização deste termo começou a ser divulgada, aceita e amplamente utilizada por indústrias do ramo farmacêutico e por pesquisadores da área acadêmica. Porém, este processo no Brasil ainda é pouco explorado por pesquisadores da área de produtos naturais, seja de plantas, microrganismos ou organismos marinhos.

2. JUSTIFICATIVA

As esponjas do gênero *Aplysina* são amplamente conhecidas por apresentarem compostos derivados da dibromotirosina que são biogeneticamente derivados da tirosina. Esses compostos são bastante conhecidos na literatura como demonstrado no **item 1.2.**

Sendo assim, é necessário desenvolver metodologias que permitam uma análise rápida e confiável dos extratos dessas esponjas com a finalidade de se obter maiores informações a respeito do perfil químico de cada extrato para que possa realizar a priorização dos mesmos na busca de novos compostos inéditos e/ou bioativos.

O presente trabalho se insere no âmbito do projeto temático “Descoberta e desenvolvimento de potenciais agentes quimioterapêuticos a partir de invertebrados marinhos e de microrganismos associados”, o qual encontra-se atualmente em desenvolvimento no Grupo de Química Orgânica de Produtos Naturais do Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP). Durante o desenvolvimento deste projeto, foi realizada uma coleta na Bahia de Todos os Santos no ano de 2007, desta coleta foram identificadas 14 esponjas como sendo do gênero *Aplysina*. Sendo assim, essas esponjas mostraram ser interessantes para serem estudadas com o intuito de analisar o perfil químico de cada extrato, identificando assim os compostos já descritos na literatura e priorizar inicialmente os extratos que apresentarem compostos desconhecidos e posteriormente fazer a priorização baseado nas atividades biológicas de cada extrato.

3. OBJETIVOS

Dando continuidade aos estudos do Grupo de Química Orgânica de Produtos Naturais do Instituto de Química de São Carlos, coordenado pelo Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck, no âmbito do projeto temático “Descoberta e desenvolvimento de potenciais agentes quimioterapêuticos a partir de invertebrados marinhos e de microrganismos associados”, esse projeto tem por objetivos:

- a) Extração e pré-purificação dos extratos obtidos de esponjas do gênero *Aplysina* por extração em fase sólida;
- b) Elaboração de uma metodologia de desreplicação por HPLC-PDA-MS das frações pré-purificadas, inclusive o desenvolvimento de métodos de análise por HPLC-PDA-MS de maneira a selecionar o procedimento de separação mais adequado, em função da natureza química dos constituintes dos extratos;
- c) Busca de dados na literatura de derivados da dibromotirosina;
- d) Comparação de dados da literatura e de padrões (compostos isolados no laboratório) com os dados obtidos das análises das frações analisadas;
- e) Prover informações para a seleção e priorização de extratos a serem estudados futuramente pelo grupo.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Técnicas Cromatográficas

4.1.1. Extração em fase sólida

Para as extrações em fase sólida (SPE) realizadas em colunas pré-empacotadas, utilizaram-se colunas da marca Waters Sep-Pak[®] vac 35cc de 2 g e com fase estacionária de sílica-gel derivatizada com grupos octadecilsilano (C₁₈). A escolha desta coluna foi de acordo com a quantidade e as características da amostra em análise.

4.1.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um Espectrômetro de Massas e Ultravioleta (arranjo fotodiodos) (HPLC-PDA-MS)

O equipamento utilizado nas cromatografias de alta eficiência (HPLC) consistiu em um sistema Alliance modelo 2695 da marca Waters[®], um detector de arranjo de fotodiodos (PDA-“Photodiode Array Detector”), que permitiu observar entre os comprimentos de ondas de 200 a 800 nm e um detector de massas modelo Micromass ZQ.

Para as análises por HPLC-PDA-MS foi utilizada uma coluna de sílica-gel derivatizada com grupos octadecilsilano (C₁₈), 250 x 4.6 mm, 5µm, da marca Inertsil.

As frações aquosas provenientes das extrações em fase sólida foram secas em um sistema de centrífuga a vácuo Savant modelo Speedvac[®]Plus SC 210. As frações orgânicas provenientes da partição hexânica foram secas em um evaporador rotativo.

4.1.3. Solventes

Os solventes utilizados em Sep-Pak[®] foram todos de grau analítico (Quimex). Na cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um Espectrômetro de Massas e Ultravioleta (arranjo fotodiodos) (HPLC-PDA-MS) foram utilizados solventes grau cromatográfico (J.T. Baker e Mallinckrodt). 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.

4.2. Estudo de 14 extratos de esponjas do gênero *Aplysina* coletadas na Bahia de Todos os Santos-BA

4.2.1. Coleta e processamento inicial das esponjas

As esponjas foram coletadas em dezembro de 2007, na Bahia de Todos os Santos-BA.

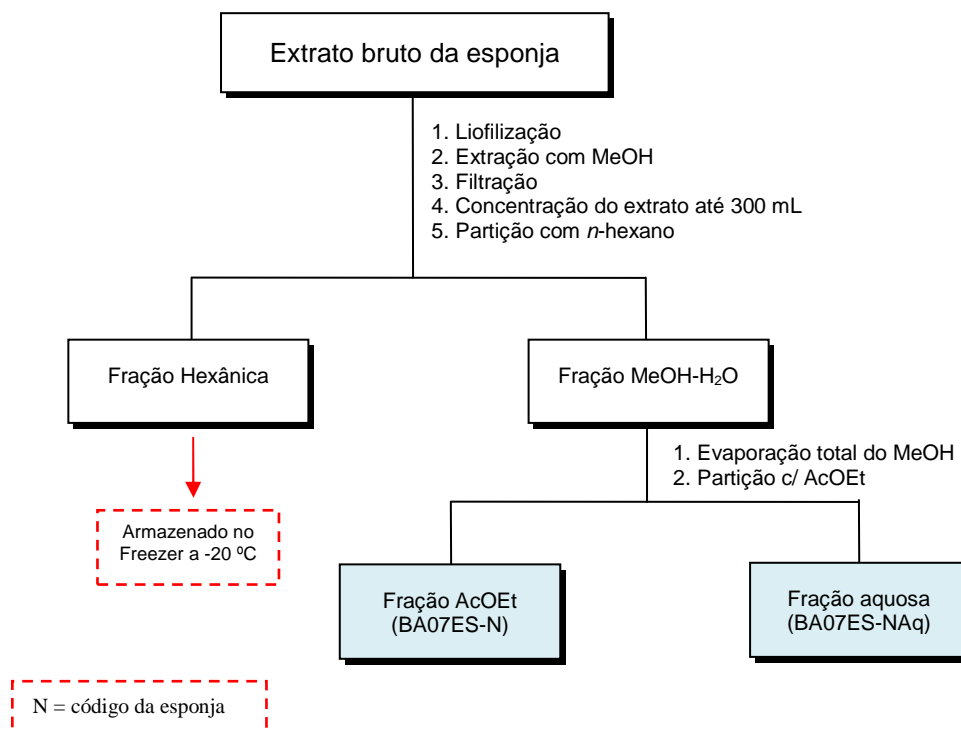
Os animais foram imediatamente congelados e preservados a -20° C. Em seguida as esponjas foram liofilizadas e pesadas. Posteriormente, foram retirados cerca de 10 g de cada animal para a preparação dos extratos (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Informações sobre a espécie, massa seca e massa analisada das esponjas do gênero *Aplysina*.

Esponjas do gênero <i>Aplysina</i>				
	Códigos das Esponjas	Nome das Esponjas	Massa Seca total (g)	Massa analisada (g)
1	BA07ES-09	<i>Aplysina cf. lactuca</i>	88,1	10,0
2	BA07ES-20	<i>Aplysina</i> sp.	49,2	10,5
3	BA07ES-33	<i>Aplysina fistularis</i>	65,6	10,4
4	BA07ES-52	<i>Aplysina</i> sp.	25,9	10,6
5	BA07ES-67	<i>Aplysina solangeae</i>	68,5	10,5
6	BA07ES-70	<i>Aplysina fulva</i>	46,8	10,1
7	BA07ES-72	<i>Aplysina</i> sp.	9,5	9,5
8	BA07ES-82	<i>Aplysina solangeae</i>	15,7	15,7
9	BA07ES-85	<i>Aplysina</i> sp. (nova)	114,7	10,5
10	BA07ES-90	<i>Aplysina lacuna</i> ou <i>insularis</i>	154,8	10,1
11	BA07ES-91	<i>Aplysina</i> sp. (fina)	34,3	11,2
12	BA07ES-92	<i>Aplysina</i> sp.	49,6	11,5
13	BA07ES-94	<i>Aplysina</i> sp.	32,6	11,8
14	BA07ES-108	<i>Aplysina</i> sp. (branca)	18,8	18,8

Todas as esponjas foram processadas utilizando-se o seguinte procedimento: 10 g de material liofilizado foram triturados e extraídos exaustivamente com MeOH, filtrado a vácuo, utilizando um papel filtro (1 µm) com uma camada de celite (0,5 cm) em funil de Büchner e concentrado utilizando um evaporador rotativo. Os extratos foram posteriormente secos em Speedvac. Realizou-se uma partição líquido-líquido da suspensão MeOH-aquosa (300 mL de metanol, com 5 % de água) utilizando 300 mL *n*-hexano, repetindo-se o procedimento por três vezes. Obteve-se 14 frações hexânicas e 14 aquosa-metanólicas.

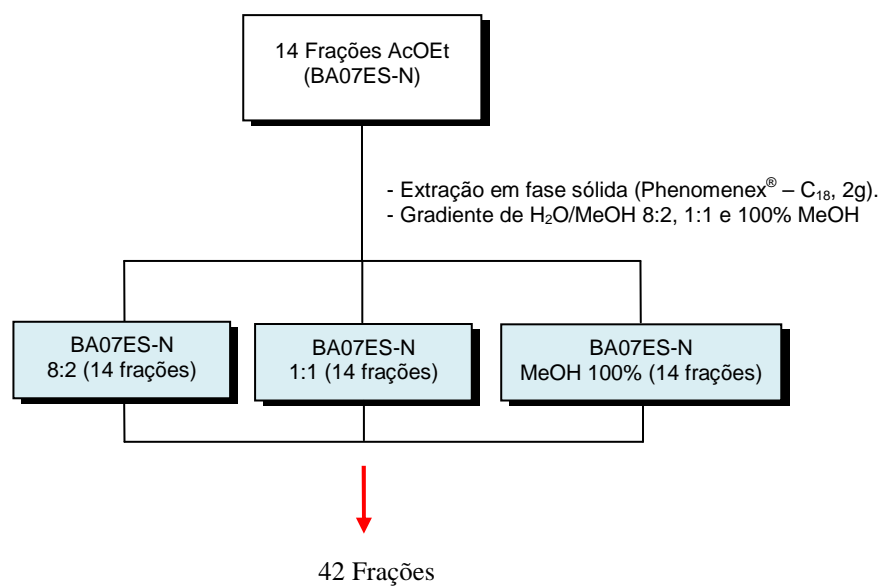
As frações aquosa-metanólicas foram concentradas em um evaporador rotativo até obter-se somente água e em seguida foi realizada uma partição líquido-líquido com AcOEt, (300 mL, repetindo-se por três vezes). Desta partição obteve-se duas frações, a aquosa e a AcOEt para cada esponja, ou seja, 14 frações aquosas e 14 AcOEt, como sumarizado no **Esquema 2**.



Esquema 2. Fluxograma geral do estudo químico das esponjas do gênero *Aplysina*.

4.2.2. Frações AcOEt

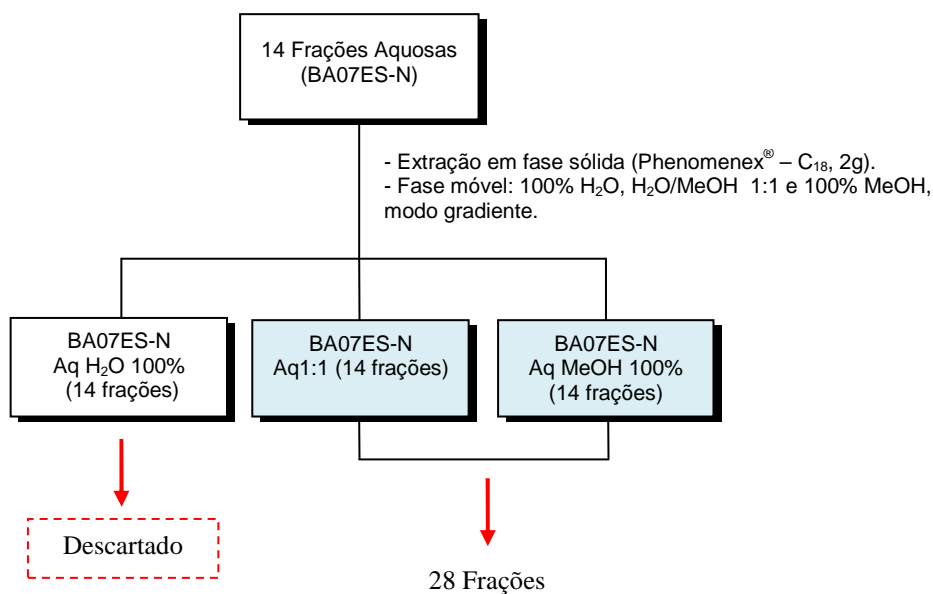
As frações AcOEt foram submetidas a uma extração em fase sólida em uma coluna pré-empacotada de sílica-gel (2 g, Phenomenex[®]) derivatizada com grupos octadecil (C₁₈) utilizando-se um gradiente de eluição H₂O/MeOH– 8:2, 1:1 e MeOH 100%, resultando em 42 frações (**Esquema 3**).



Esquema 3. Fluxograma geral do fracionamento das frações AcOEt das esponjas do gênero *Aplysina*.

4.2.3. Frações aquosas

As frações aquosas foram submetidas ao mesmo procedimento (extração em fase sólida), porém o gradiente de eluição utilizado foi H₂O 100%, MeOH/H₂O 1:1 e MeOH 100%. A fração 100% H₂O foi descartada já que este eluente teve por finalidade retirar o sal presente nas frações. Obteve-se 28 frações dos extratos aquosos de todas as esponjas como sumarizado no **esquema 4**.



Esquema 4. Fluxograma geral do fracionamento das frações aquosas das esponjas do gênero *Aplysina*.

4.2.4. Otimização das condições cromatográficas

As 70 frações (28 provenientes das frações aquosas + 42 das frações AcOEt) oriundas do fracionamento cromatográfico foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a dois detectores: ultravioleta (PDA), e espectrômetro de massas (HPLC-PDA-MS). Foram também utilizados compostos padrões de derivados da dibromotirosina, que foram anteriormente obtidos pelo nosso grupo de pesquisa, para verificar a presença destes nos extratos das esponjas estudadas.

Todas as frações bem como os padrões (bis-oxazolidinona, aerotionina, fistularina-3, cavernicolina-1 e -2 e éster metílico do ácido verongidóico) foram dissolvidos em MeOH grau HPLC, na concentração de 1mg/mL e posteriormente analisados em um sistema HPLC-PDA-MS.

Para a otimização das condições cromatográficas, foram utilizados os seguintes parâmetros:

1. **Fase estacionária:** fase reversa: C₁₈;
2. **Fase móvel:** (i) solvente: metanol, água milli-Q e acetonitrila. Adição ou não de ácido fórmico e acetato de amônio; (ii) tipo de eluição: gradiente.
3. **Espectrômetro de Massas:** voltagem do cone, modo de ionização: positivo/negativo, ionizador: ESI.
4. **PDA:** comprimento de onda.

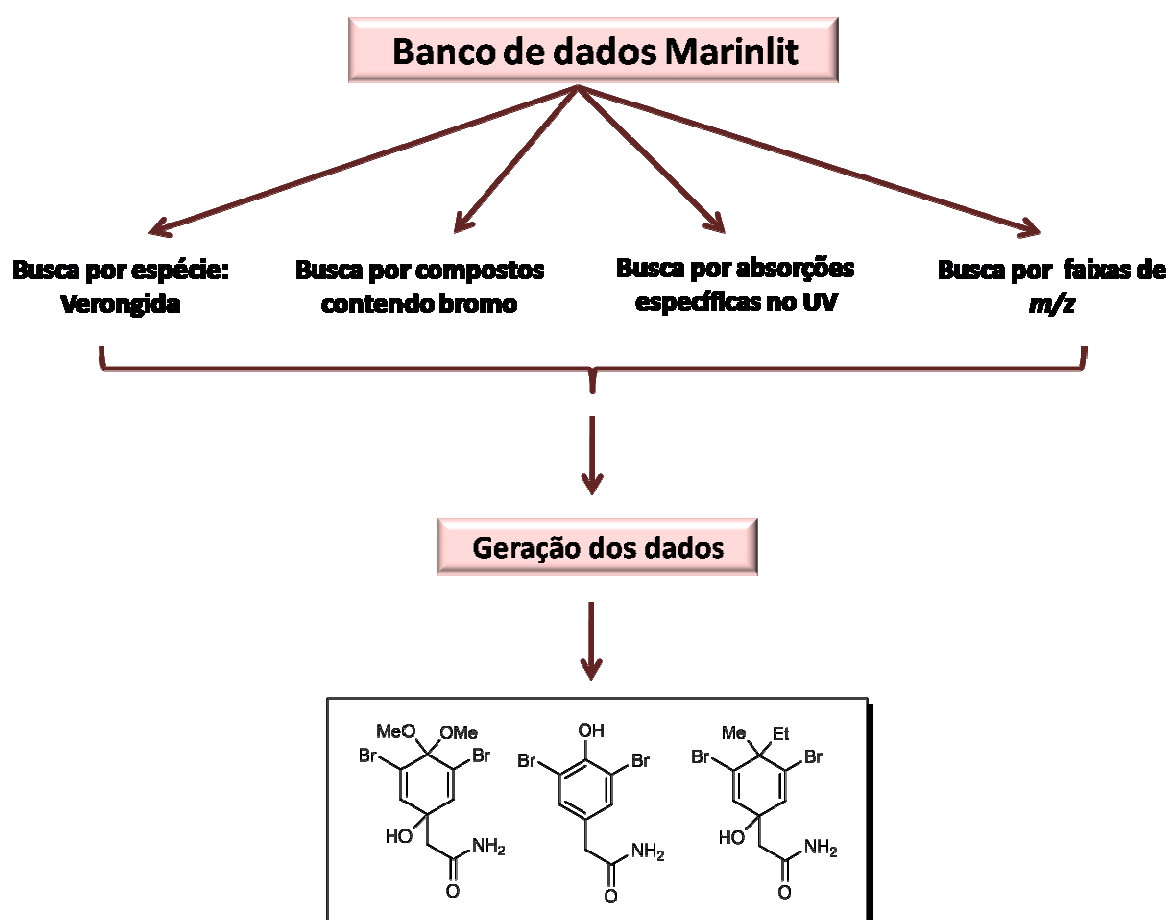
Foram realizados vários testes para a otimização das condições cromatográficas, são elas:

- 1) HPLC-PDA-MS utilizando-se coluna de sílica-gel derivatizada com grupos octadesil (C₁₈) (Inertsil[®] 5µm, 250 x 4.6 mm) no modo reverso utilizando-se como fase móvel gradiente [(H₂O/MeOH) + 0,1 % de ácido fórmico] 95:5 a (MeOH + 0,1 % de ácido fórmico) 100% durante 20 minutos, nos próximos 3 minutos (MeOH + 0,1 % de ácido fórmico) 100% e volta para a condição inicial em 7 minutos, totalizando 30 minutos, com fluxo de 1 mL/minuto, monitorando-se o perfil cromatográfico de 200 a 400 nm, massas: modo ESI+ com voltagens do cone de 25 e 50 V e ESI- com 25 V e monitoramento do massas entre 200-1500 Da.
- 2) HPLC-PDA-MS utilizando-se coluna de sílica-gel derivatizada com grupos octadesil (C₁₈) (Inertsil[®] 5µm, 250 x 4.6 mm) no modo reverso utilizando-se como fase móvel gradiente [(H₂O/MeOH) + 0,1 % de ácido fórmico] 50:50 a (MeOH + 0,1 % de ácido fórmico) 100% em 20 minutos, nos próximos 3 minutos (MeOH + 0,1 % de ácido fórmico) 100% e volta para a condição inicial em 7 minutos, totalizando 30 minutos, com fluxo de 1 mL/minuto,

- monitorando-se o perfil cromatográfico de 200 a 400 nm, massas: modo ESI+ com voltagens do cone de 25 e 50 V e ESI- com 25 V e monitoramento do massas entre 200-1500 Da.
- 3) HPLC-PDA-MS utilizando-se coluna de sílica-gel derivatizada com grupos octadesil (C₁₈) (Inertsil[®] 5µm, 250 x 4.6 mm) no modo reverso utilizando-se como fase móvel gradiente [(H₂O/MeOH/ACN) + 0,1 % de ácido fórmico] 50:25:25 a [(MeOH/ACN) + 0,1 % de ácido fórmico] 50:50 em 20 minutos, nos próximos 3 minutos [(MeOH/ACN) + 0,1 % de ácido fórmico] 50:50 e volta para a condição inicial em 7 minutos, totalizando 30 minutos, com fluxo de 1 mL/minuto, monitorando-se o perfil cromatográfico de 200 a 400 nm, massas: modo ESI+ com voltagens do cone de 25 e 50 V e ESI- com 25 V e monitoramento do massas entre 200-1500 Da.
- 4) HPLC-PDA-MS utilizando-se coluna de sílica-gel derivatizada com grupos octadesil (C₁₈) (Inertsil[®] 5µm, 250 x 4.6 mm) no modo reverso utilizando-se como fase móvel gradiente [(H₂O/MeOH)+0,1% de acetato de amônio]/ACN 50:25:25 a [ACN/(MeOH + 0,1 % de acetato de amônio)] 50:50 em 20 minutos, nos próximos 3 minutos [ACN/(MeOH + 0,1 % de acetato de amônio)] 50:50 e volta para a condição inicial em 7 minutos, totalizando 30 minutos, com fluxo de 1 mL/minuto, monitorando-se o perfil cromatográfico de 200 a 400 nm, massas: modo ESI+ com voltagens do cone de 25 e 50 V e ESI- com 25 V e monitoramento do massas entre 200-1500 Da.

4.2.3. Análise dos dados

As 70 frações foram analisadas por HPLC-PDA-MS(ESI), e seus dados foram comparados com os dos compostos padrões. Posteriormente foi realizada uma pesquisa no banco de dados Marinlit, como mostra o **esquema 4**.



Esquema 5. Esquema geral de busca no Marinlit.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudo químico das diferentes espécimens de esponjas do gênero

Aplysina

As esponjas do gênero *Aplysina* são amplamente conhecidas por apresentarem compostos derivados da dibromotirosina que são biogeneticamente derivados da tirosina, como demonstrado no **item 1.3**.

Devido a isto, este estudo é de extrema importância tanto para priorizar o isolamento de compostos inéditos como para o isolamento de compostos já conhecidos na literatura, mas que podem apresentar atividades biológicas interessantes.

Foram selecionadas 14 esponjas do gênero *Aplysina*. Os extratos destas esponjas foram submetidos a um procedimento de pré-purificação e subsequentemente analisados por um sistema de desreplicação, utilizando como técnica hifenada HPLC-PDA-MS(ESI) com o objetivo de detectar compostos bromados por meio de suas características típicas de absorção no ultravioleta (λ entre 220-230 e 280-290 nm) e também de sinais característicos de compostos bromados no espectro de massas. Estes sinais característicos ocorrem devido à distribuição isotópica do átomo de bromo, ^{79}Br e ^{81}Br . Para compostos que apresentam em sua estrutura dois átomos de bromo, a molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ observada apresentará três sinais (M, M+2 e M+4), sendo que $\frac{1}{4}$ da amostra apresentará os dois átomos de bromo com o isótopo ^{81}Br ; $\frac{1}{2}$ da amostra apresentará os dois átomos de bromo com os isótopos ^{79}Br e ^{81}Br ; por fim, $\frac{1}{4}$ da amostra apresentará átomos de bromo com os isótopos ^{79}Br . Isso porque a distribuição isotópica natural do átomo de bromo é de aproximadamente 1:1 ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$). No caso

de outros metabólitos contendo mais de 2 átomos de Br estes podem apresentar íons moleculares, M, M+2, M+4, M+6, M+8, e assim por diante, como demonstrado na **figura 17**.

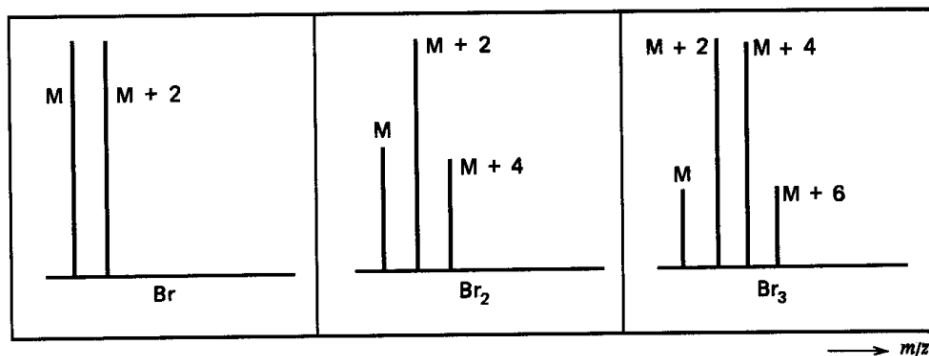


Figura 17. Picos observados na região do íon molecular de compostos bromados (Silverstein e Webster, 1998)

Foram analisados também compostos-padrões isolados pelo nosso grupo de pesquisa com o intuito de confirmar a presença dos mesmos nos extratos das esponjas selecionadas.

Os derivados da dibromotirosina apresentaram três tipos de cromóforos típicos (**Fig.18**). O primeiro cromóforo é referente ao composto cavernicolina-1 que apresentou a transição eletrônica $\pi-\pi^*$, o segundo do éster metílico do ácido verongidóico que apresentou a transição eletrônica $\pi-\pi^*$ (235,4 nm) e $n-\pi^*$ (288,6 nm) e por fim o cromóforo da bis-oxazolidinona que apresentou a transição eletrônica $\pi-\pi^*$ (274,4 nm).

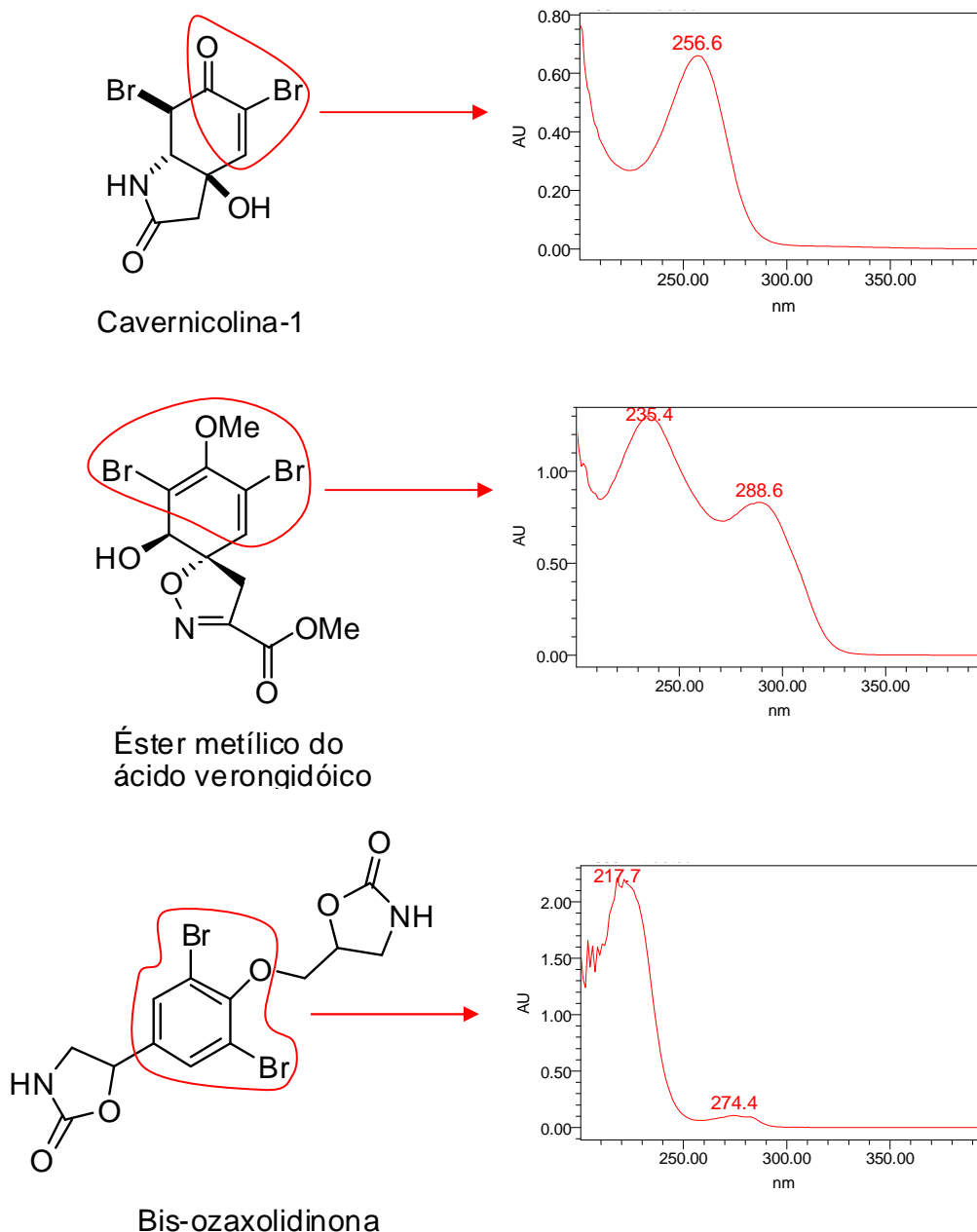


Figura 18. Estrutura e espectro de UV típicos de derivados da dibromotirosina.

Os compostos analisados nas frações obtidas das 14 amostras de esponjas tiveram seus espectros de UV comparados com as bandas de absorção dos compostos-padrões estudados. Os compostos que apresentaram espectros praticamente iguais aos compostos-padrões, foram também comparados quanto aos seus espectros de massas e tempo de retenção (t_R) para que pudesse ser confirmada a presença desses compostos-padrões. Os dados de UV e espectro de

massas dos compostos que não foram identificados como sendo um dos compostos-padrões foram comparados com dados disponíveis no banco de dados MarinLit.

5.2. Otimização Cromatográfica

5.2.1. Otimização das condições cromatográficas para as frações oriundas da fração AcOEt

Para avaliar o perfil químico das 42 frações oriundas da fração AcOEt foi necessário otimizar as condições cromatográficas. As frações foram analisadas em quatro condições, são elas:

- A) Fase móvel: [(H₂O/MeOH) + 0,1 % de ácido fórmico] 95:5 a (MeOH + 0,1 % de ácido fórmico) 100% durante 20 minutos, nos próximos 3 minutos (MeOH + 0,1 % de ácido fórmico) 100% e volta para a condição inicial em 7 minutos, totalizando 30 minutos, com fluxo de 1 mL/minuto.
- B) Fase móvel: [(H₂O/MeOH) + 0,1 % de ácido fórmico] 50:50 a (MeOH + 0,1 % de ácido fórmico) 100% em 20 minutos, nos próximos 3 minutos (MeOH + 0,1 % de ácido fórmico) 100% e volta para a condição inicial em 7 minutos, totalizando 30 minutos, com fluxo de 1 mL/minuto.
- C) Fase móvel: [(H₂O/MeOH/ACN) + 0,1 % de ácido fórmico] 50:25:25 a [(MeOH/ACN) + 0,1 % de ácido fórmico] 50:50 em 20 minutos, nos próximos 3 minutos [(MeOH/ACN) + 0,1 % de ácido fórmico] 50:50 e volta para a condição inicial em 7 minutos, totalizando 30 minutos, com fluxo de 1 mL/minuto.
- D) Fase móvel: [(H₂O/MeOH)+0,1% de acetato de amônio]/ACN 50:25:25 a [ACN/(MeOH + 0,1 % de acetato de amônio)] 50:50 em 20 minutos, nos

próximos 3 minutos [ACN/(MeOH + 0,1 % de acetato de amônio)] 50:50 e volta para a condição inicial em 7 minutos, totalizando 30 minutos, com fluxo de 1 mL/minuto.

As análises com as condições A e B indicaram que o uso do gradiente foi adequado já que as amostras eram constituídas de misturas relativamente complexas. Utilizando este modo de eluição conseguiu-se observar todos os constituintes presentes nas frações sem que nenhum composto ficasse retido na coluna. Apesar da condição B permitir uma separação adequada dos compostos, a definição dos picos ainda não era boa, então foi testada a adição de ACN tentar melhorar esta definição.

A condição C apresentou melhores resultados quanto à separação e à definição dos picos cromatográficos para a maioria dos compostos. Assim, as condições para a análise dos compostos-padrões e das frações foram fixadas e acordo com a condição C.

Para estas análises foi utilizado uma coluna de sílica-gel derivatizada com grupo octadecil (C_{18}) (Inertsil[®]), com detecção nos comprimentos de onda 220 e 280 nm, devido as absorções típicas deste derivados como explicado anteriormente.

Outras condições analisadas foram os parâmetros do espectrômetro de massas, como: energia do cone de voltagem de ionização, analisados em 25 e 50 V, ionizador e modo de ionização, ESI+ e ESI-, o intervalo de m/z de 200 a 1500 Da e adição de ácido fórmico e acetato de amônio na fase móvel.

Os resultados obtidos mostraram que a adição de 0,1% de ácido fórmico melhorou a ionização dos compostos contidos nas frações, e os melhores espectros de massas obtidos foram no modo positivo (ESI+). No modo negativo (ESI-) não conseguiu-se observar íons correspondentes às massas dos padrões.

A adição de acetato de amônio na fase móvel mostrou não ser adequada para a detecção dos compostos analisados nas frações.

5.3. Análise dos compostos-padrões

Foram utilizados como padrões compostos derivados da dibromotirosina isolados anteriormente em nosso grupo de pesquisa. Esses compostos foram denominados de compostos-padrões, seus dados foram comparados com os dados obtidos das frações para verificar a presença dos mesmos.

Foram analisados seis compostos-padrões (**Tabela 2, Figura 19**), sendo que as cavernicolinas- 1 e -2 se apresentam na forma de mistura. Eles foram analisados nas mesmas condições das frações em seqüência das mesmas.

Tabela 2 – Compostos isolados pelo grupo de pesquisa de QOPN, IQSC-USP. Compostos utilizados como padrões. (Continua)



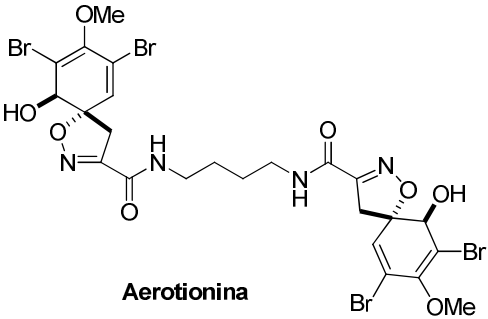
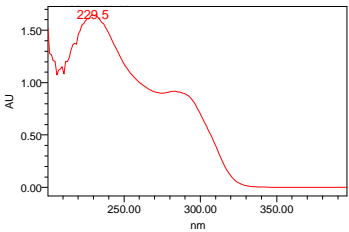
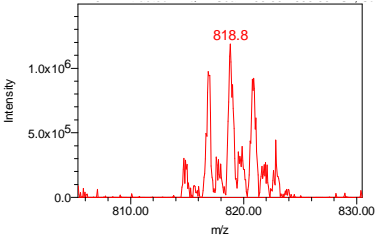


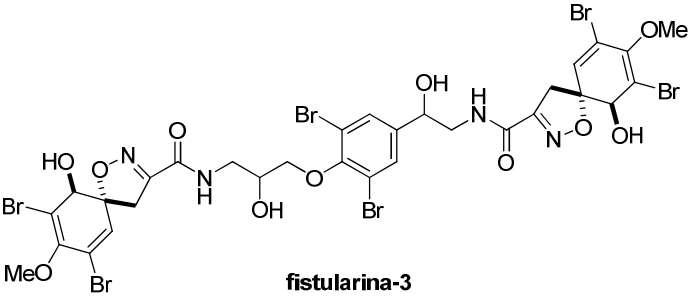
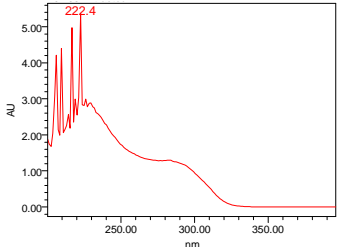
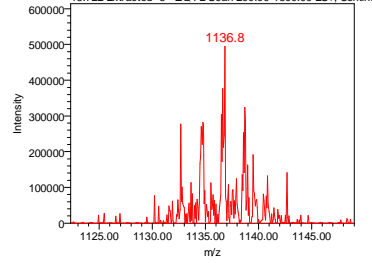

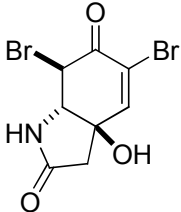
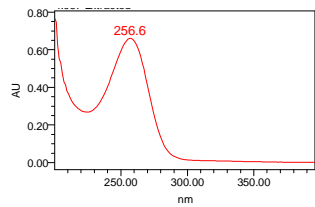
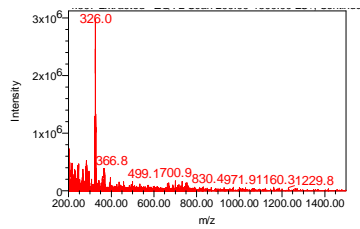

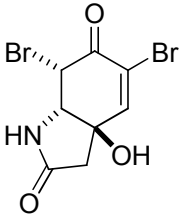
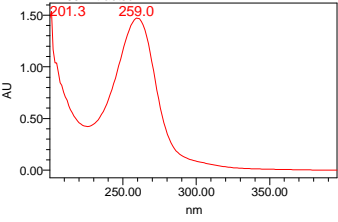
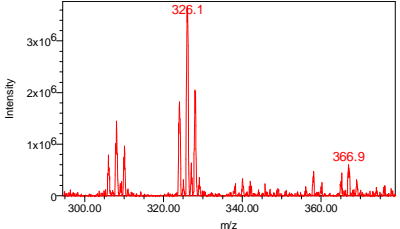

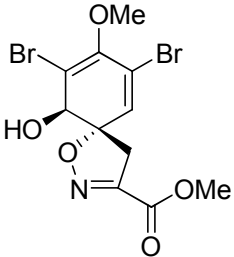
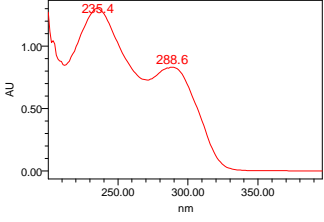
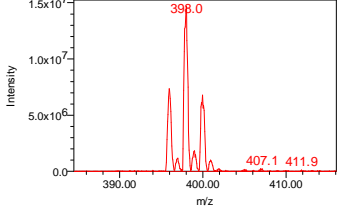
Espécie	Estrutura	Absorções no UV	Espectro de Massas
 <p><i>Aplysina fulva</i></p>  <p><i>Aplysina fistularis</i></p>	 <p>Aerotionina</p>		
 <p><i>Aplysina fulva</i></p>  <p><i>Aplysina fistularis</i></p>	 <p>fistularina-3</p>		

Tabela 2 – Compostos isolados pelo grupo de pesquisa de QOPN, IQSC-USP. Compostos utilizados como padrões. (Conclusão)

Fonte: *Aplysina fulva*: Pereira, 2006; *Aplysina fistularis*: <http://www.hiddenstar.com/>

Um exemplo destes derivados é o composto bis-oxazolidinona (**Figura 19**), o qual apresentou bandas de absorção no ultravioleta de 217,7 e 274,4 nm e espectro de massas com valores de m/z 868,9/870,9/872,9/874,9/876,9; 435,1/437,0/439,1; 391,1/393,0/395,1 (**Figura 20**). O pico em m/z 872,9 se refere à formação do dímero do composto e o íon pseudo-molecular protonado $[M+H]^+$ tem valor da m/z 435,1/437,0/439,1. Estes sinais “triplos” indicam a presença de dois bromos na estrutura da bis-oxazolidinona (**figura 19**).

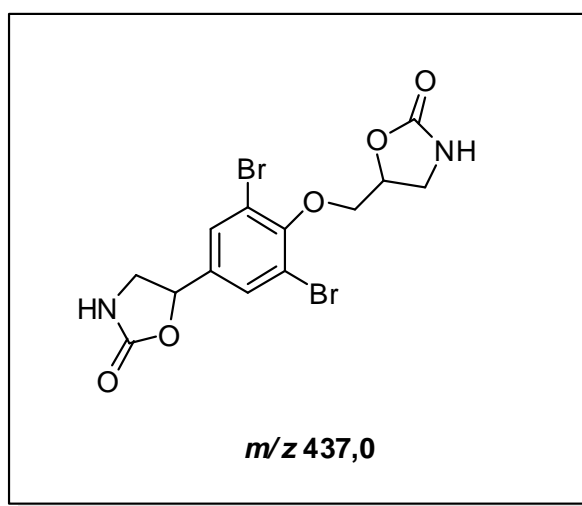


Figura 19. Estrutura da bis-oxazolidinona.

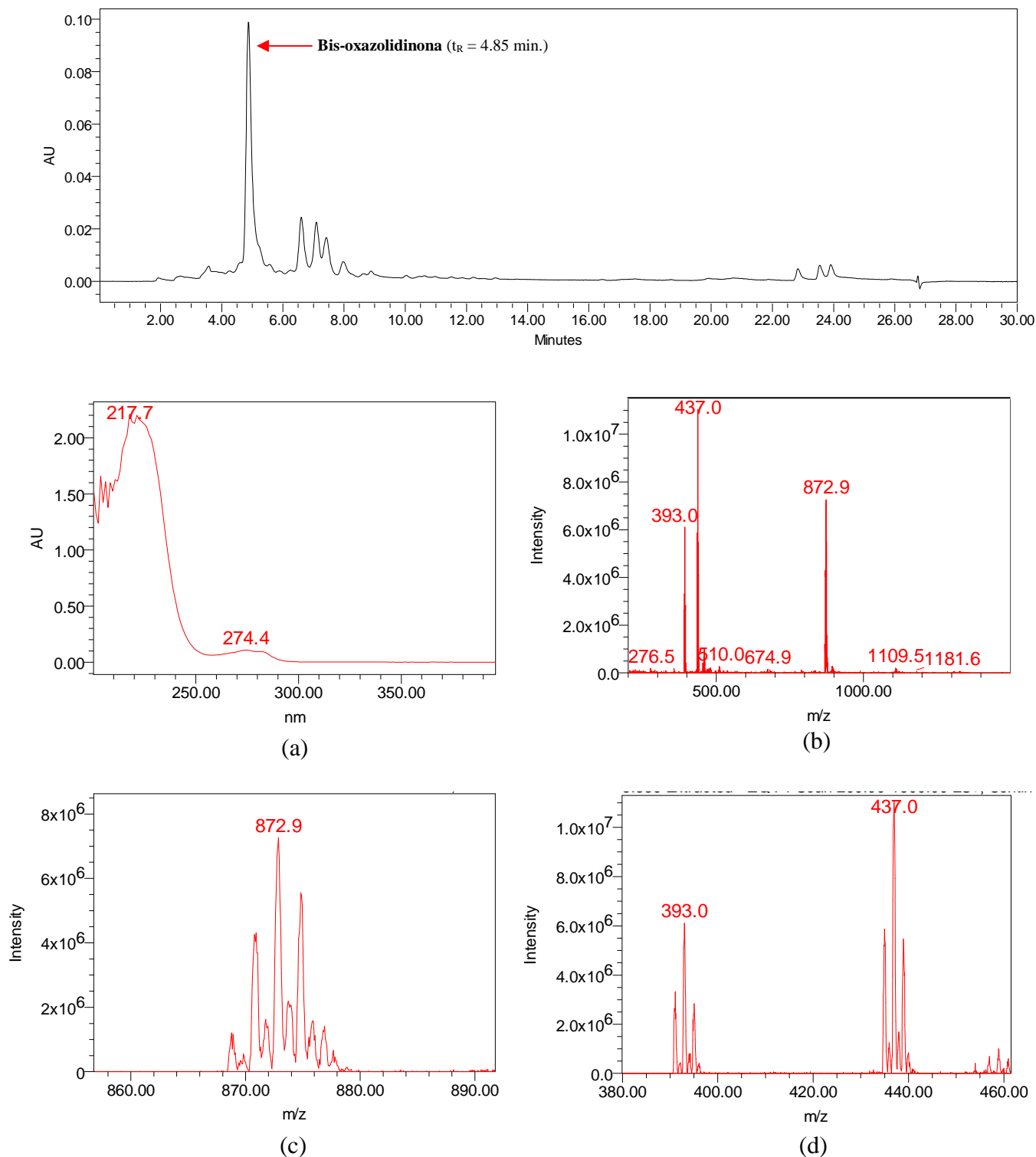


Figura 20. Cromatograma com detecção no UV (280 nm) do composto bis-oxazolidinona, com seus respectivos espectro UV: (a) $t_R = 4,85$ min.; espectro de massas: (b) $t_R = 4,85$ min.; (c) e (d) ampliação dos picos (voltagem do cone de ionização de 25 e 50 V).

Para os outros cinco compostos-padrões os valores de t_R , m/z da molécula protonada $[M+H]^+$ e/ou cationizada com sódio $[M+Na]^+$ e seus respectivos fragmentos estão descritos na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Fórmula molecular, peso molecular, relação m/z dos compostos-padrões e seus respectivos fragmentos.

Composto	Tempo de retenção (t_R)	Fórmula	$[M + X]^+$ ¹	Peso Molecular	Fragmentos m/z	Sinal
Bis-Ozaxolidinona	4.85 min.	C ₁₃ H ₁₂ Br ₂ N ₂ O ₅	[437,0+H] ⁺	436,05	391,1/393,0/395,1	Triplo
Aerotionina	14.20 min.	C ₂₄ H ₂₆ Br ₄ N ₄ O ₈	[818,8+H] ⁺ [841,0+Na] ⁺	818,10	477,9/479,8/481,9; 445,0/447,0/449,1; 293,1/295,0/297,1	Quíntuplo
Fistularina-3	15,1 min.	C ₃₁ H ₃₀ Br ₆ N ₄ O ₁₁	[1137,01+Na] ⁺	1114,01	802,8; 438,9; 295,0	Septeto
Cavernicolina-1 e - 2	4.10 min.; 4.40 min.	C ₈ H ₇ Br ₂ NO ₃	[326,0+H] ⁺	324,90	263,1/265,1/267,1	Triplo
Éster metílico do ácido verongidóico	10.47min.	C ₁₁ H ₁₁ Br ₂ NO ₅	[398,0+H] ⁺	397,02	318,0/320,1/322,0; 293,2/295,1/297,2	Triplo

¹ $[M + Na]^+$: íon pseudo-molecular do aduto de sódio correspondente observado no espectro de massas ou $[M + H]^+$: íon pseudo-molecular da molécula protonada correspondente observada no espectro de massas.

5.4. Análise dos extratos brutos das espécimens de esponjas do gênero *Aplysina*

Foram coletados em dezembro de 2007 na Bahia de Todos os Santos, 14 exemplares de esponjas que foram identificadas como sendo do gênero *Aplysina*, mostradas na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Classificação taxonômica das esponjas do gênero *Aplysina* coletadas em Salvador (2007).

Esponjas do Gênero <i>Aplysina</i>	
Código das esponjas	Identificação provisória
BA07ES-09	<i>Aplysina cf. lactuca</i>
BA07ES-20	<i>Aplysina</i> sp.
BA07ES-33	<i>Aplysina fistularis</i>
BA07ES-52	<i>Aplysina</i> sp.
BA07ES-67	<i>Aplysina solangeae</i>
BA07ES-70	<i>Aplysina fulva</i>
BA07ES-72	<i>Aplysina</i> sp.
BA07ES-82	<i>Aplysina solangeae</i>
BA07ES-85	<i>Aplysina</i> sp.
BA07ES-90	<i>Aplysina lacunosa ou insularis</i>
BA07ES-91	<i>Aplysina</i> sp.
BA07ES-92	<i>Aplysina</i> sp.
BA07ES-94	<i>Aplysina</i> sp.
BA07ES-108	<i>Aplysina</i> sp.

A partir dos 14 extratos brutos das esponjas foram obtidas 14 frações aquosas e 14 frações AcOEt, as quais foram submetidas a extração em fase sólida (SPE) utilizando modo reverso no modo de eluição gradiente, gerando 28 frações

aquosas e 42 frações AcOEt conforme descrito nos **itens 4.2.2 e 4.2.3** (parte experimental).

A realização desta etapa de “limpeza” dos extratos foi de grande importância, principalmente para as frações aquosas, já que os sais presentes nas amostras foram eliminados. Isto é necessário porque sais podem danificar os equipamentos utilizados bem como interferir nas análises.

Para as frações AcOEt esta etapa não se mostrou eficiente já que todas as frações obtidas do fracionamento apresentaram praticamente os mesmos constituintes.

5.5. Análise das 42 frações oriundas das frações AcOEt

Após a obtenção das 42 frações obtidas da extração em fase sólida das 14 frações AcOEt, estas foram nomeadas segundo mostra a **tabela 5**.

Tabela 5 – Frações oriundas da SPE das frações AcOEt.

Frações AcOEt	Frações oriundas da SPE
BA07ES-09	BA07ES-09-8:2, 1:1 e MeOH 100%
BA07ES-20	BA07ES-20-8:2, 1:1 e MeOH 100%
BA07ES-33	BA07ES-33-8:2, 1:1 e MeOH 100%
BA07ES-52	BA07ES-52-8:2, 1:1 e MeOH 100%
BA07ES-67	BA07ES-67-8:2, 1:1 e MeOH 100%
BA07ES-70	BA07ES-70-8:2, 1:1 e MeOH 100%
BA07ES-72	BA07ES-72-8:2, 1:1 e MeOH 100%
BA07ES-82	BA07ES-82-8:2, 1:1 e MeOH 100%
BA07ES-85	BA07ES-85-8:2, 1:1 e MeOH 100%
BA07ES-90	BA07ES-85-8:2, 1:1 e MeOH 100%
BA07ES-91	BA07ES-91-8:2, 1:1 e MeOH 100%
BA07ES-92	BA07ES-92-8:2, 1:1 e MeOH 100%
BA07ES-94	BA07ES-94-8:2, 1:1 e MeOH 100%
BA07ES-108	BA07ES-108-8:2, 1:1 e MeOH 100%

Todas as frações foram analisadas utilizando o procedimento empregando a técnica de HPLC-PDA-MS(ESI) (item 4.2.4, parte experimental).

Analisando os dados gerados por HPLC-PDA-MS(ESI) verificou-se que todas as amostras analisadas apresentaram um perfil químico muito similar, tanto nas absorções do ultravioleta (típicos de derivados da dibromotirosina) quanto na relação m/z dos íons pseudo-molecular e dos íons fragmentos dos compostos presentes nas frações analisadas.

Essas análises resultaram em uma grande quantidade de dados (cromatogramas, espectros de UV e espectros de massas). Assim sendo, foram selecionados os dados das amostras mais representativas para exemplificar os dados analíticos obtidos, são elas: BA07ES-52 (8:2, 1:1 e MeOH 100%) e BA07ES-92 (8:2, 1:1 e MeOH 100%).

Após a análise dos resultados os dados das frações foram comparados com os dos compostos-padrões para verificar a presença desses compostos nas esponjas deste gênero. Para as frações que não apresentaram o mesmo perfil químico (t_R , absorções no espectro de UV e picos com relação m/z seja da molécula protonada ($[M+H]^+$) como do fragmentos presentes no espectro de massas) que os compostos-padrões, foi realizada uma busca no banco de dados MarinLit. Esta busca baseou-se no seguinte critério: a massa molecular do composto encontrado na pesquisa no banco de dados obrigatoriamente deveria ser igual à massa molecular do íon menos uma unidade de massa (no caso do pico do cromatograma apresentar uma molécula protonada $[M+H]^+$) ou que a massa molecular do composto encontrado na busca seja igual à massa molecular do íon menos 23 unidades de massa (no caso do pico do cromatograma apresentar uma molécula cationizada com sódio, $[M+Na]^+$).

Para a amostra BA07ES-52-8:2, foram observados compostos com valores de t_R de 12,1; 12,3; 12,9; 13,1; 13,6; 14,1 e 15,1 minutos (**Figura 21**) e suas respectivas absorções no UV (**Figura 22**).

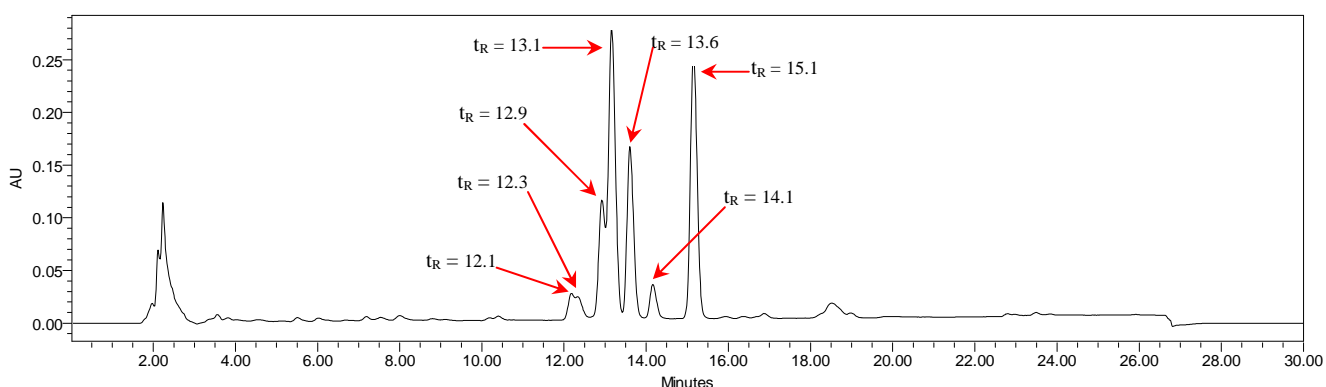
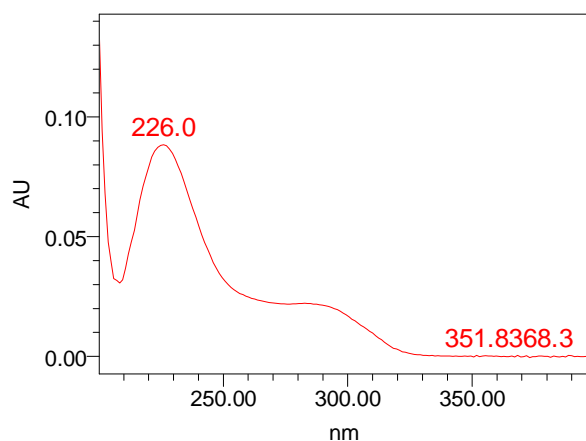
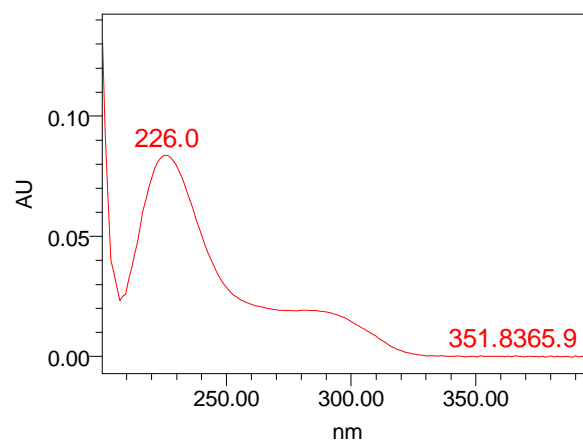


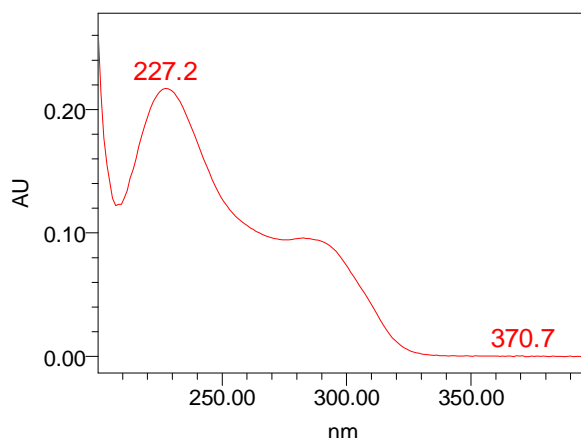
Figura 21. Cromatograma com detecção UV ($\lambda = 280\text{nm}$) da amostra BA07ES-52-8:2.



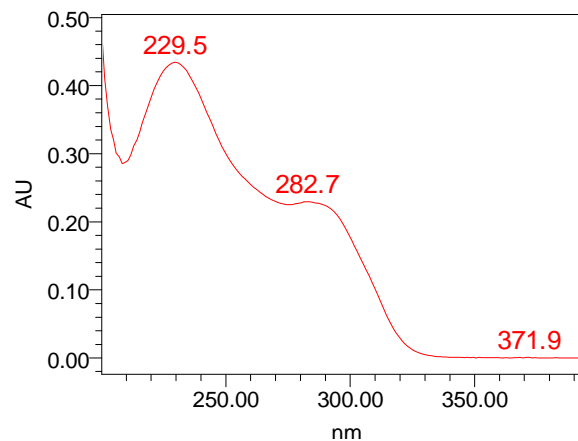
(a)



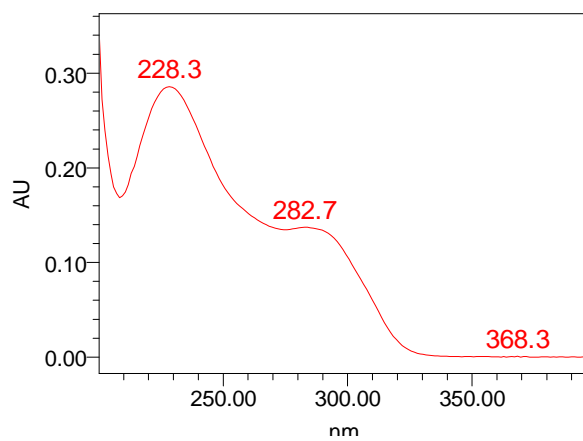
(b)



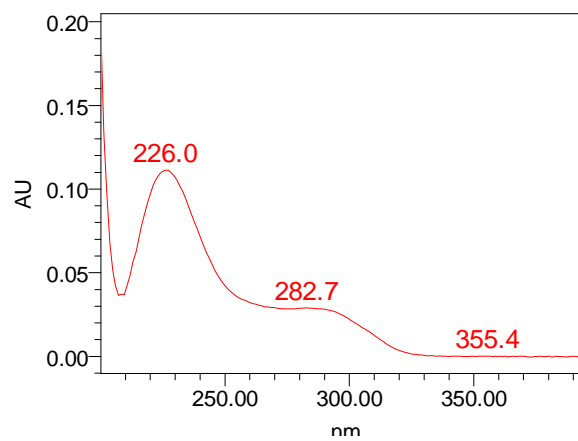
(c)



(d)



(e)



(f)

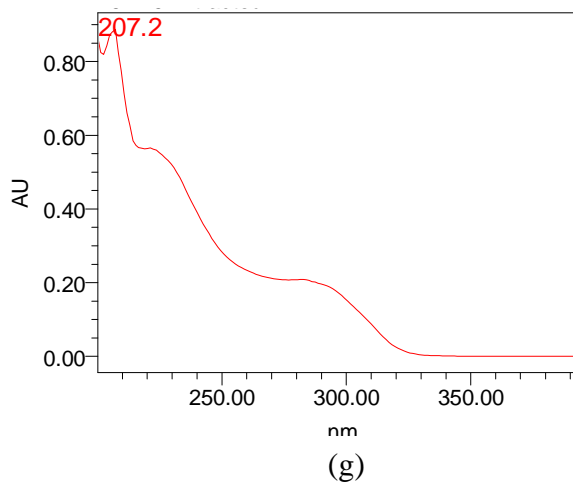


Figura 22. Espectros de UV na região dos picos cromatográficos: (a) pico com t_R de 12,1 min; (b) pico com t_R de 12,3 min; (c) pico com t_R de 12,9 min; (d) pico com t_R de 13,1 min; (e) pico com t_R de 13,6 min; (f) pico com t_R de 14,1 min; (g) pico com t_R de 15,1 min;

A análise dos espectros de UV indicou que todos os compostos presentes nesta fração apresentaram bandas de absorções nos comprimentos de onda entre 220-230 e 280-290 nm, característicos de compostos derivados da dibromotirosina.

Analisando os espectros de massas dos 7 metabólitos presentes na fração BA07ES-52-8:2, seis apresentaram um “sinal quártuplo” indicando a presença de 4 átomos de bromo na estrutura do composto e um metabólito com t_R 15,1 minutos apresentou um “sinal septeto”, o qual indica a presença de 6 átomos de bromo na estrutura do composto.

O primeiro e o segundo composto presente na região dos picos cromatográficos (t_R de 12,1 e 12,3 min.) apresentaram o mesmo íon pseudo-molecular em m/z 872.9 (**Figura 23**), isto nos indica que ambos podem ser isômeros.

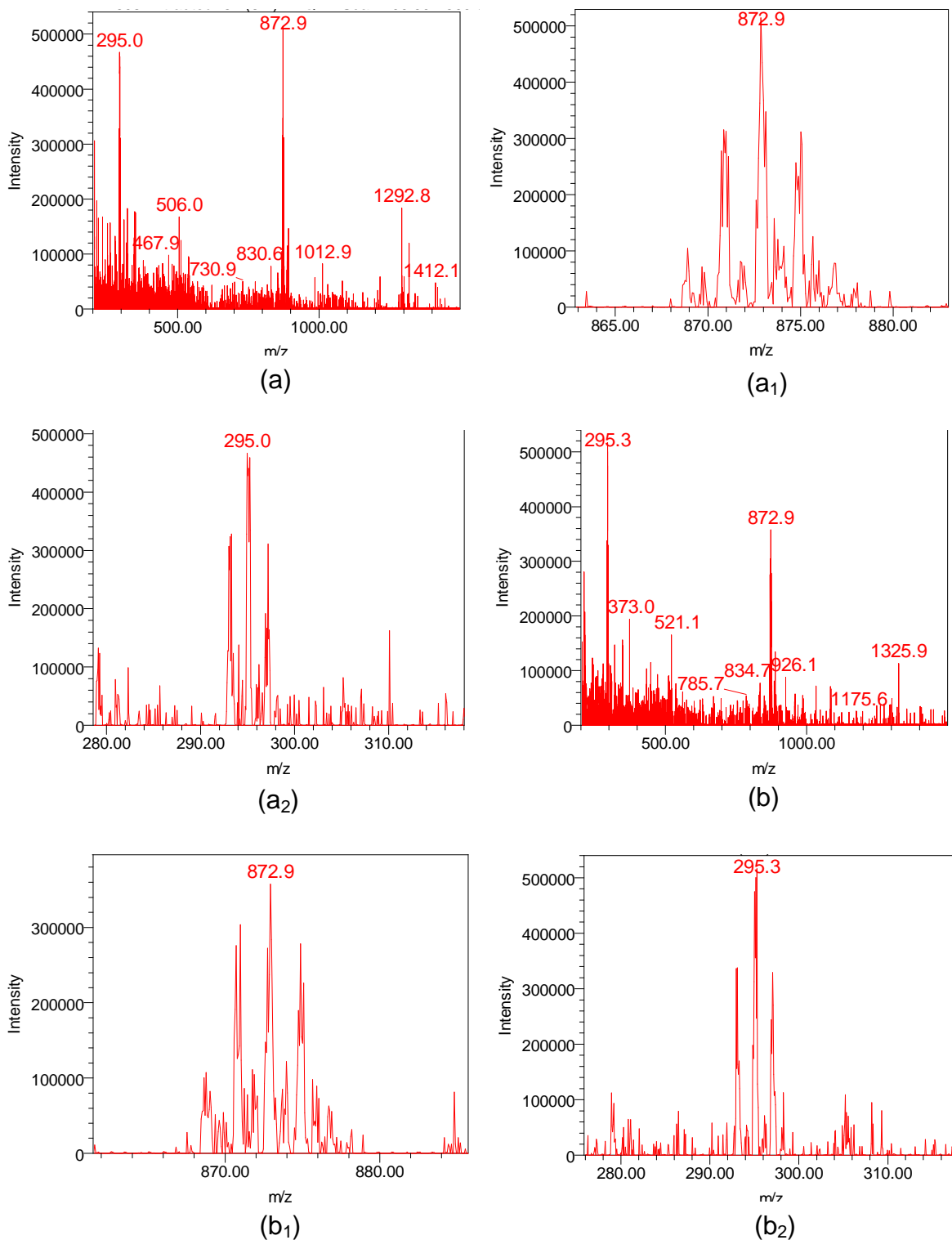


Figura 23. Espectros de massas do primeiro pico cromatográfico da amostra BA07ES-52-8:2 com $t_R = 12,1$ min: (a) espectro de massas; (a₁) ampliação do íon pseudo-molecular; (a₂) ampliação do íon fragmento. Segundo pico cromatográfico com $t_R = 12,3$ min: (b) espectro de massas; (b₁) ampliação do íon pseudo-molecular; (b₂) ampliação do íon fragmento. Condições: cone de voltagem de ionização do massas de 50 V.

No espectro de massas dessa amostra não pôde-se definir se o valor de m/z 872,9 é referente a molécula protonada, $[M+H]^+$, ou molécula cationizada com sódio, $[M+Na]^+$. Porém, analisando outras frações (BA07ES-52-1:1 (**Figura 48**, pág. 97), BA07ES-85-8:2 e 1:1, BA07ES-90-1:1 e BA07ES-108-1:1, **Tabela 9**, pág. 127) pôde-se verificar a presença de outro sinal em m/z 851.0 (**Figura 24**) que se refere ao $[M+H]^+$ e o valor de m/z 872,9 a respectiva molécula cationizada com sódio. Sendo então os dois valores referentes ao mesmo composto (de massa 850 u.m.a).

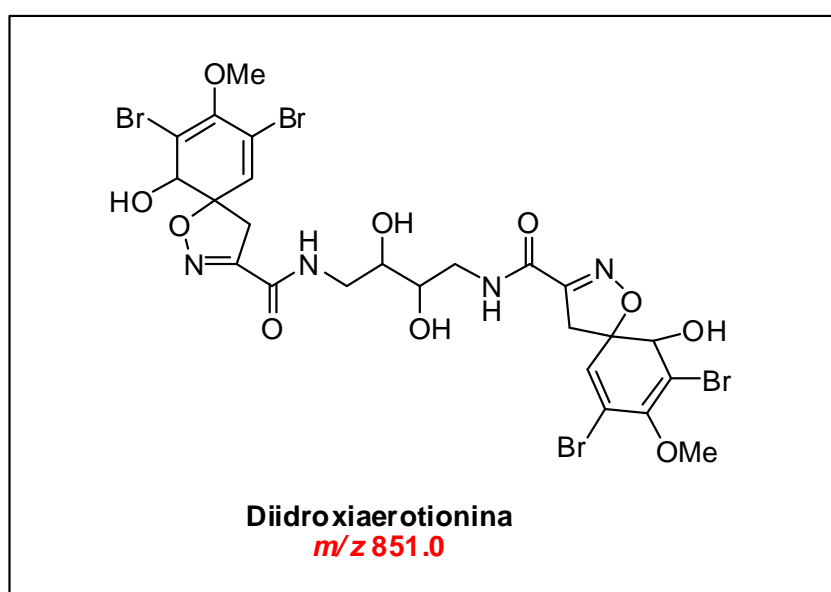


Figura 24. Possível estrutura do composto com $[M+H]^+$ m/z 851,0.

Este composto, denominado diidroxiaerotionina, foi isolado a partir da esponja *Verungula rígida* (Gunasekera M, Gunasekera S. P., 1989).

Analisando o espectro de massa (**Figura 23**) desse composto observou-se um fragmento com valor de m/z 295,3, sendo possível sugerir o seguinte íon fragmento mostrado na **Figura 25**.

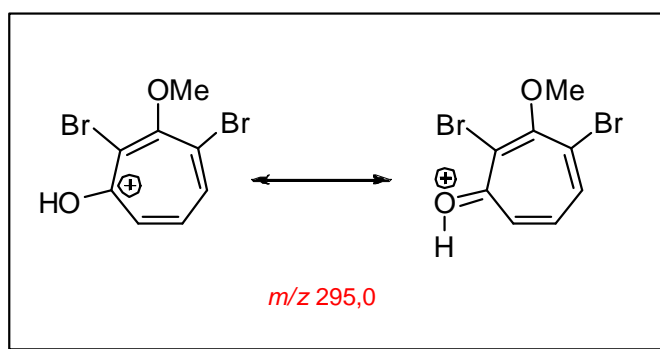
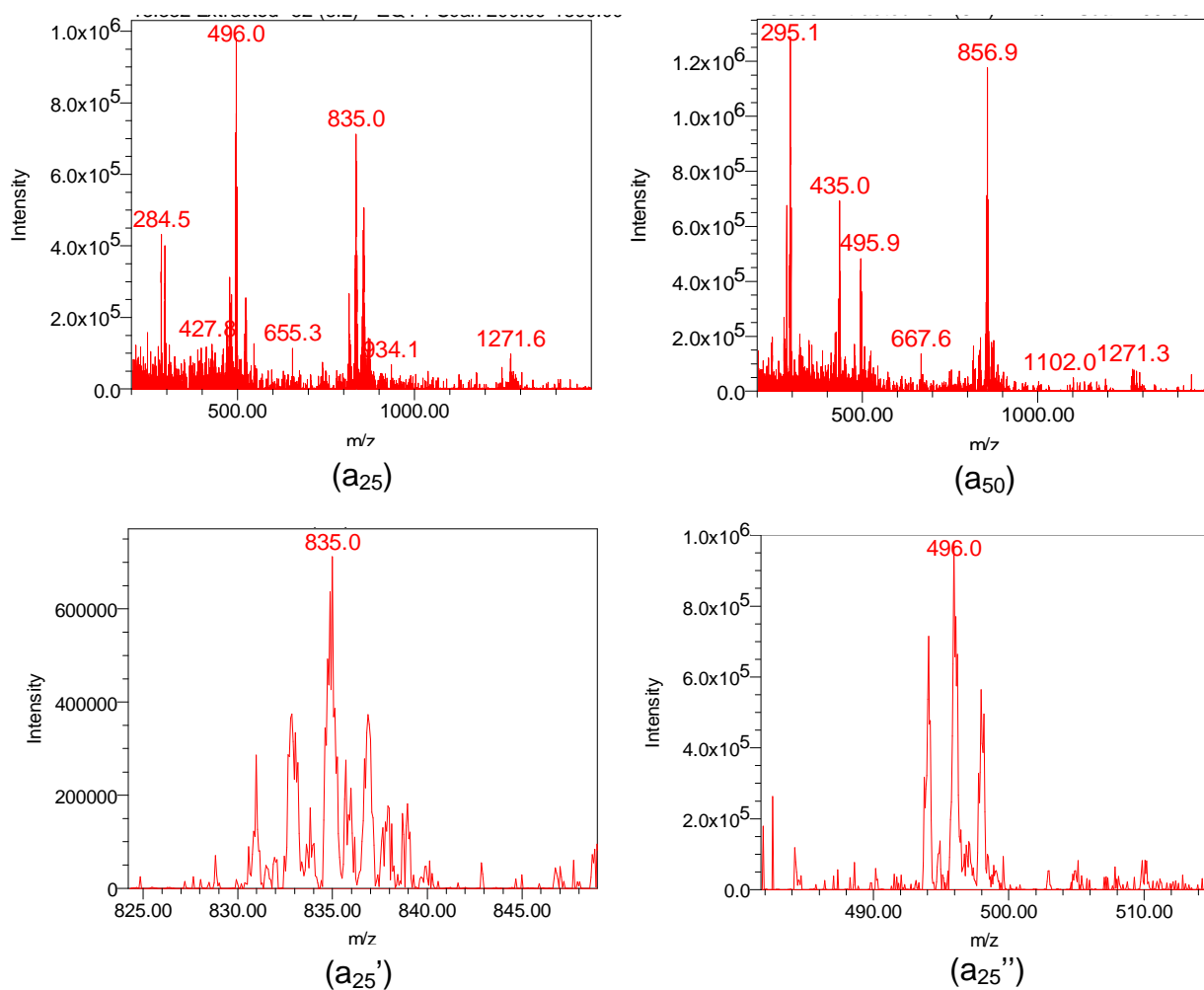


Figura 25. Possível estrutura do íon fragmento m/z 295,0.

Para o terceiro composto presente na região dos picos cromatográficos (t_R de 12,9 min., **Figura 21, pág. 64**) o sinal no espectro com m/z 835,0, refere-se a molécula protonada, $[M+H]^+$, e o sinal com m/z 856,9 refere-se a molécula cationizada com sódio, $[M+Na]^+$ (**Figura 26**).



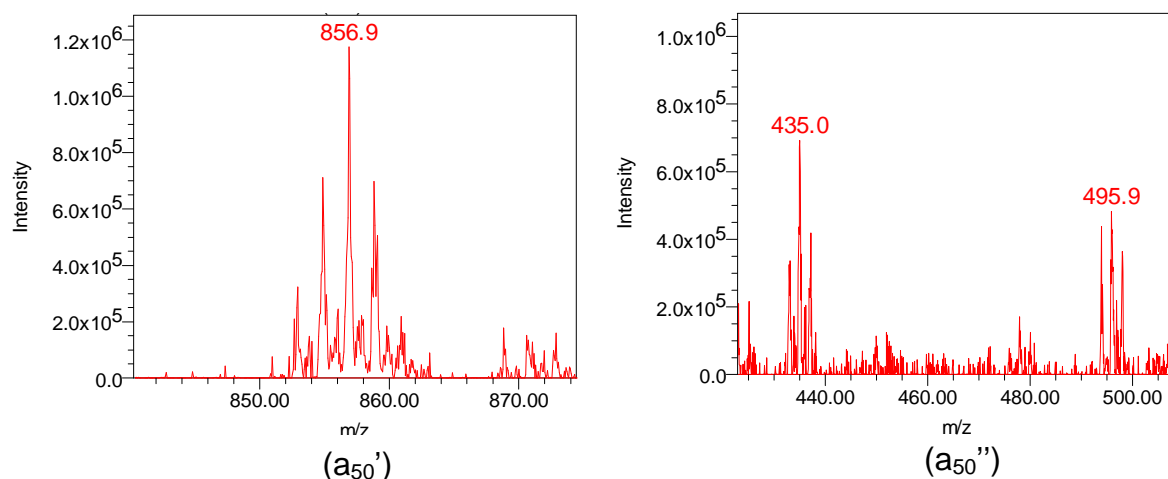


Figura 26. Espectros de massas na região do terceiro pico cromatográfico ($t_R = 12,9$ min): (a_{25} , a_{50}) espectro de massas; (a_{25}' , a_{50}') ampliação do íon pseudo-molecular; (a_{25}'' , a_{50}'') ampliação do íon fragmento. Dados: a_{25} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 kV e a_{50} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V. $[M+H]^+$: m/z 835,0; $[M+Na]^+$: m/z 856,9.

Como este composto não foi identificado como sendo nenhum dos compostos-padrões analisados, foi realizada uma busca no banco de dados, a partir do mesmo foi proposta a seguinte estrutura (**Figura 27**).

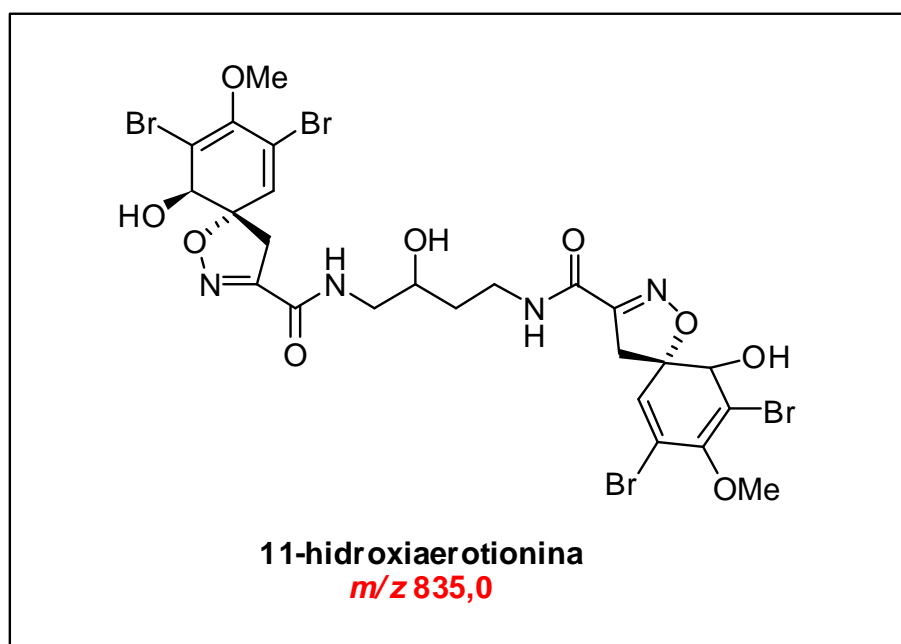


Figura 27. Possível estrutura do composto com m/z 835,0.

A 11-hidroxi-aerotionina foi isolada a partir da esponja *Pseudoceratina durissima* (Kerna, M. R.; Cambie, R. C.; Bergquist, P. R., 1990), de *Aplysina caissara* (Lira, O. T *et al.*, 2006) e da esponja *Aplysina fulva* (Ñunez *et al.*, 2008).

Analisando o espectro de massas (**Figura 26**) desse composto foi observado fragmentos com valores de m/z 496,1, 435,0 e 295,1. Esses valores levaram à perda de 339 u.m.a para o fragmento de m/z 496,1, 400 u.m.a para o fragmento de m/z 435,0 e 540 u.m.a para o fragmento de m/z 295,1, sendo possível sugerir um possível caminho de fragmentação para o fragmento de m/z de 496,1 (**Figura 28**) e m/z de 435,0 (**Figura 29**). O íon fragmento com valor de m/z 295,0 foi mostrado anteriormente (**Figura 25**).

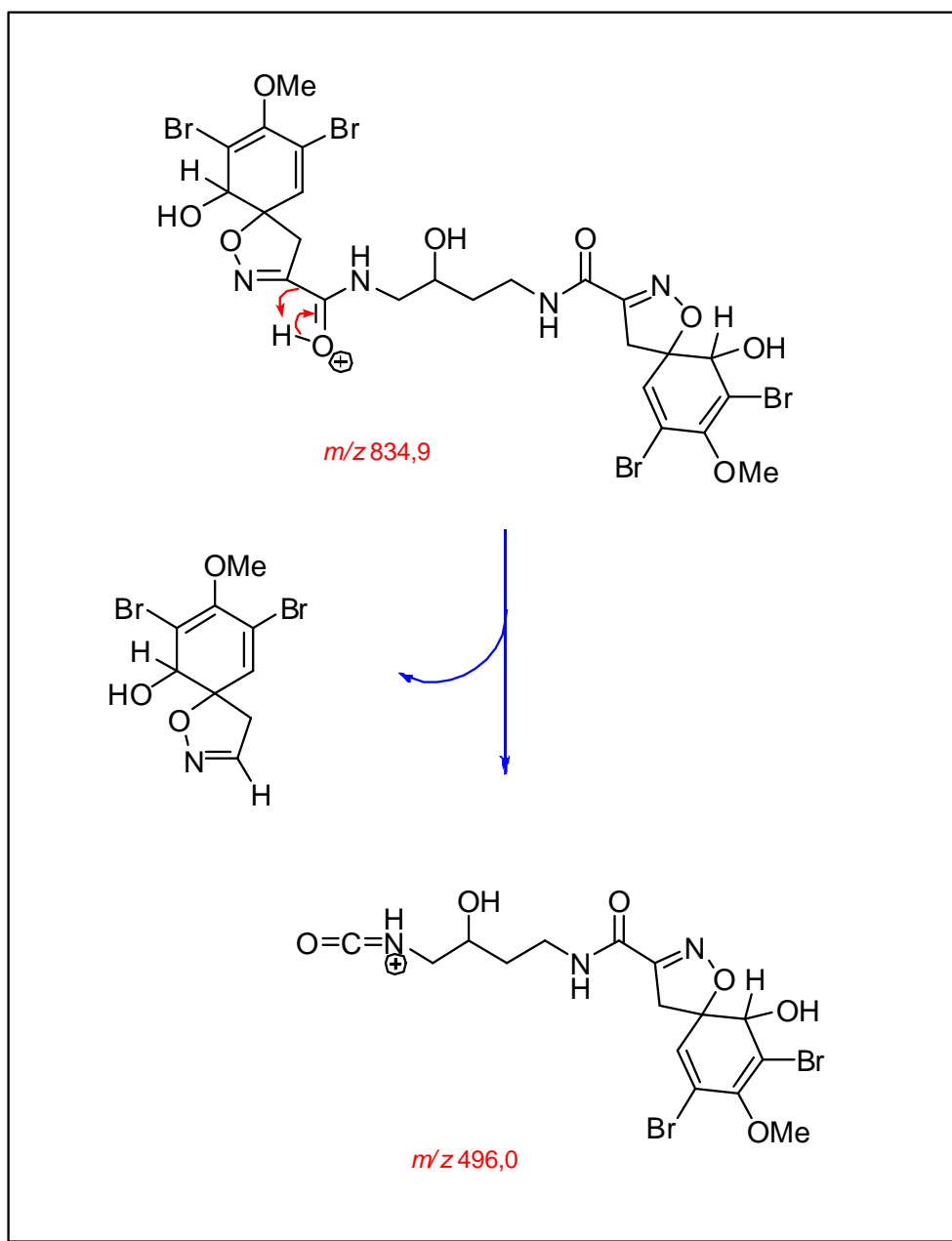


Figura 28. Possível caminho de fragmentação para o íon fragmento m/z 496,0.

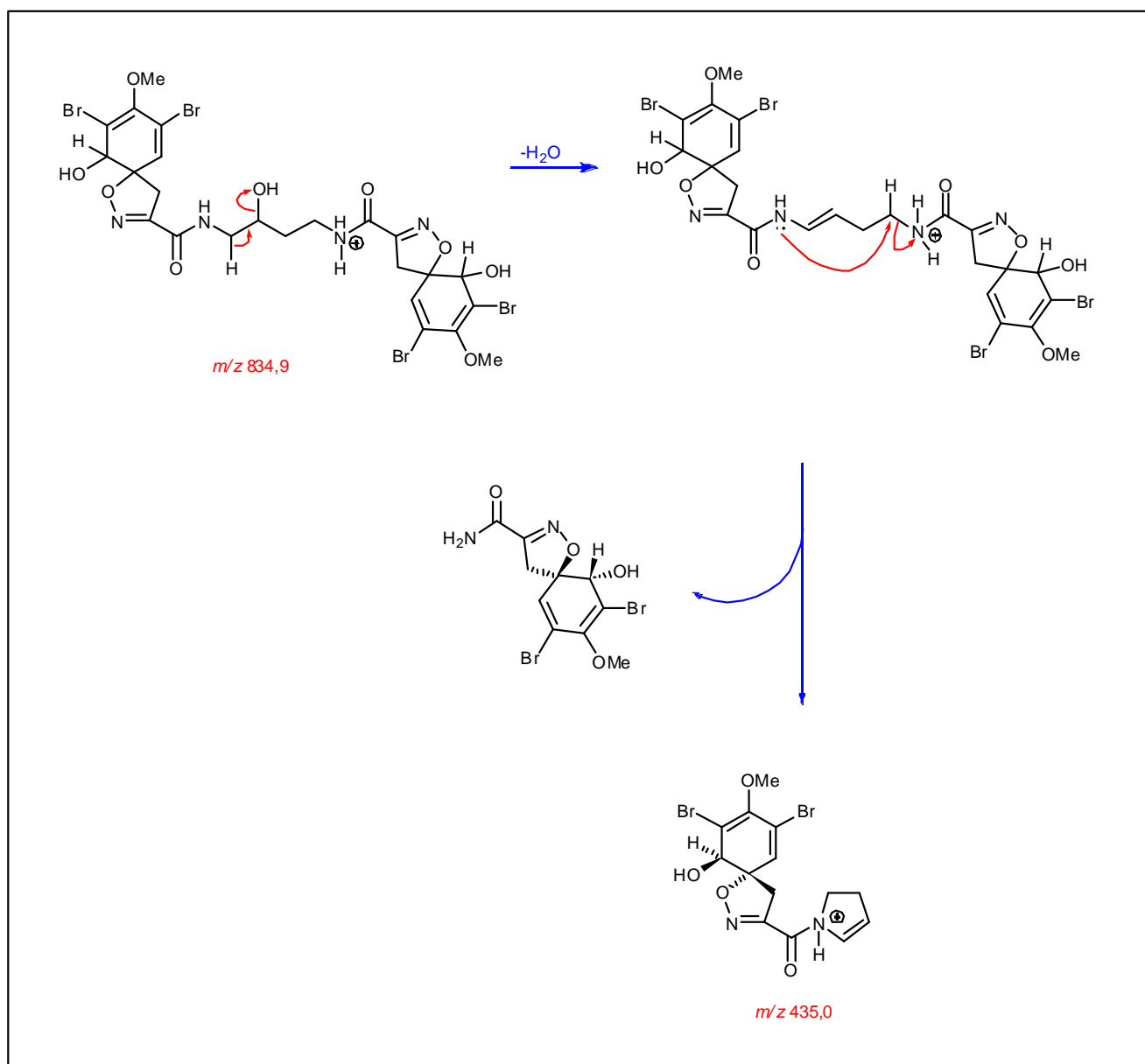
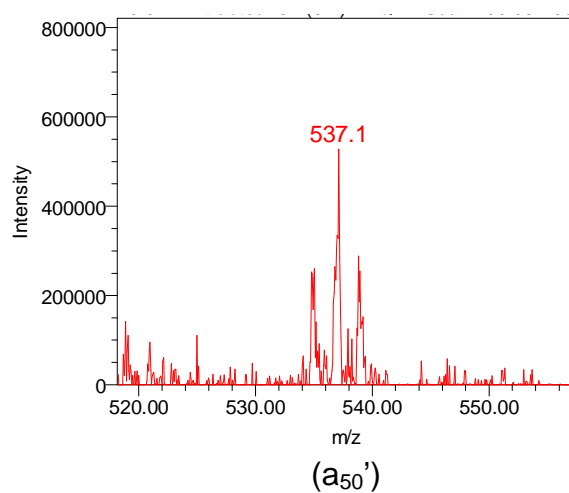
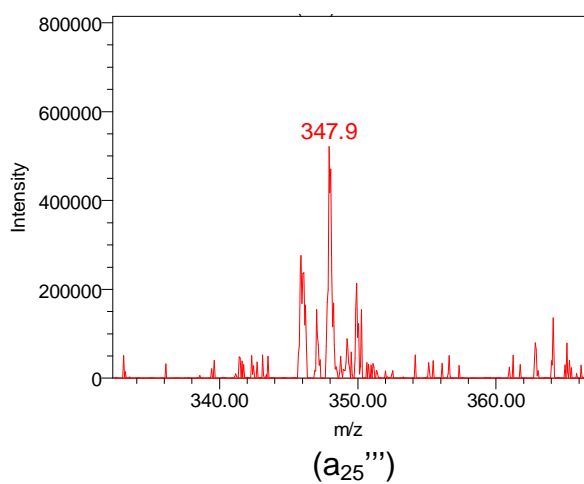
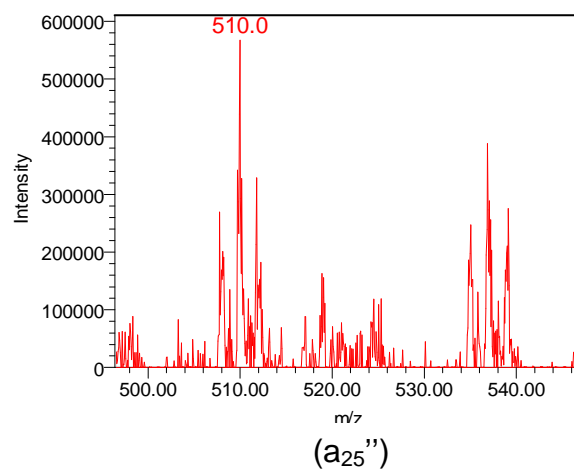
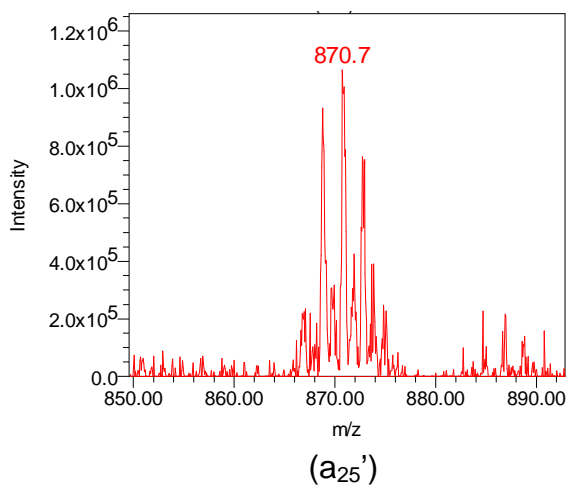
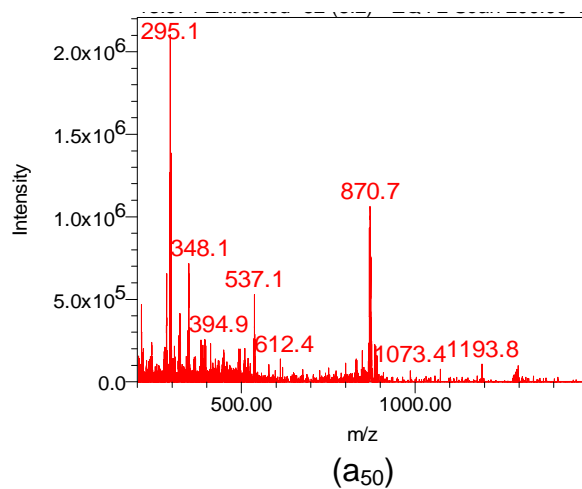
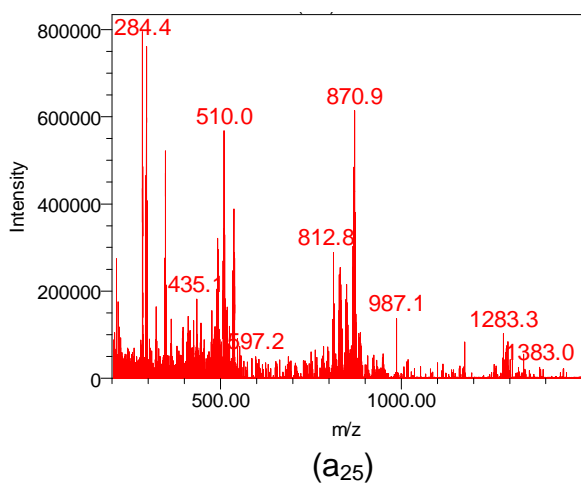


Figura 29. Possível caminho de fragmentação para o íon fragmento m/z 435,0.

O quarto composto com t_R de 13,1 minutos (**Figura 21**, **pág. 64**), apresentou um sinal no espectro de massas de m/z 870,9 (**Figura 30**).



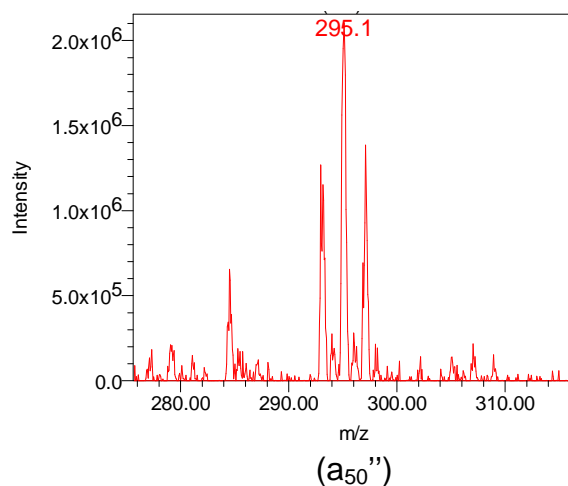


Figura 30. Espectros de massas na região do quarto pico cromatográfico ($t_R = 13,1$ min): (a_{25} , a_{50}) espectro de massas; (a_{25}') ampliação do íon pseudo-molecular; (a_{25}'' , a_{25}''' , a_{50}' , a_{50}'') ampliação do íon fragmento. Dados: a_{25} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 V e a_{50} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V. $[M+Na]^+$: m/z 870,9.

No espectro de massas desta fração não pôde-se definir se este valor de m/z é referente a molécula protonada, $[M+H]^+$, ou a molécula cationizada com sódio, $[M+Na]^+$. Porém, analisando outras frações (**Tabela 9, pág. 127**) observou-se a presença de um sinal com m/z 848,7. Este sinal refere-se à molécula protonada, $[M+H]^+$ e o valor de m/z 870,9 é referente a respectiva molécula cationizada com sódio.

Através da busca no banco de dados MarinLit foram encontradas duas possíveis estruturas que apresentaram o mesmo valor de massa molecular igual ao composto analisado (**Figura 31**).

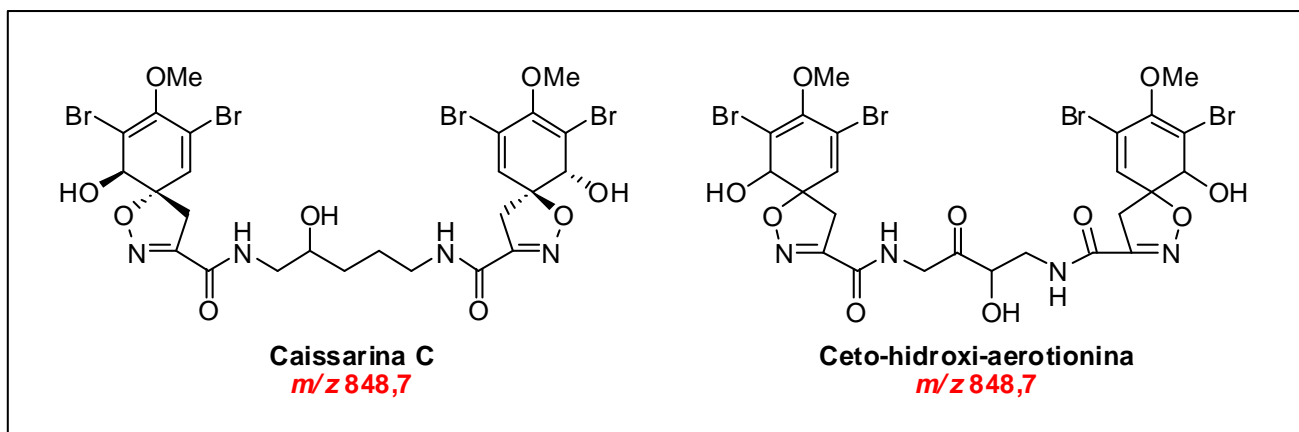


Figura 31. Possíveis estruturas para o composto com m/z 848,7.

A caissarina C foi isolada a partir da esponja *Aplysina caissara* (Lira, O. T et al., 2006) e a ceto-hidroxi-aerotionina foi isolado a partir da esponja *Aplysina fistularis* forma *fulva* (Ciminello P. et al., 1994).

Ao analisar o espectro de massas (**Figura 30**) desse composto foram observados fragmentos com valor de m/z 537,1, 510,0, 348,0 e 295,0. Esses valores correspondem à perda de 312 u.m.a para o fragmento de m/z 537,1, 339 u.m.a para o fragmento de m/z 510,0, 501 u.m.a para o fragmento de m/z 348,0 e 554 u.m.a para o fragmento de m/z 295,0 para o composto com m/z 848,7, sendo possível sugerir um possível caminho de fragmentação para o íon fragmento de m/z 510,0 para a ceto-hidroxi-aerotionina (**Figura 32**) e para a caissarina C (**Figura 33**). Para os íons fragmentos de m/z 537,1 e 348,0 não conseguiu-se obter nenhuma estrutura possível. Para o íon fragmento m/z 295,0 foi proposta a estrutura demonstrada na **Figura 25**.

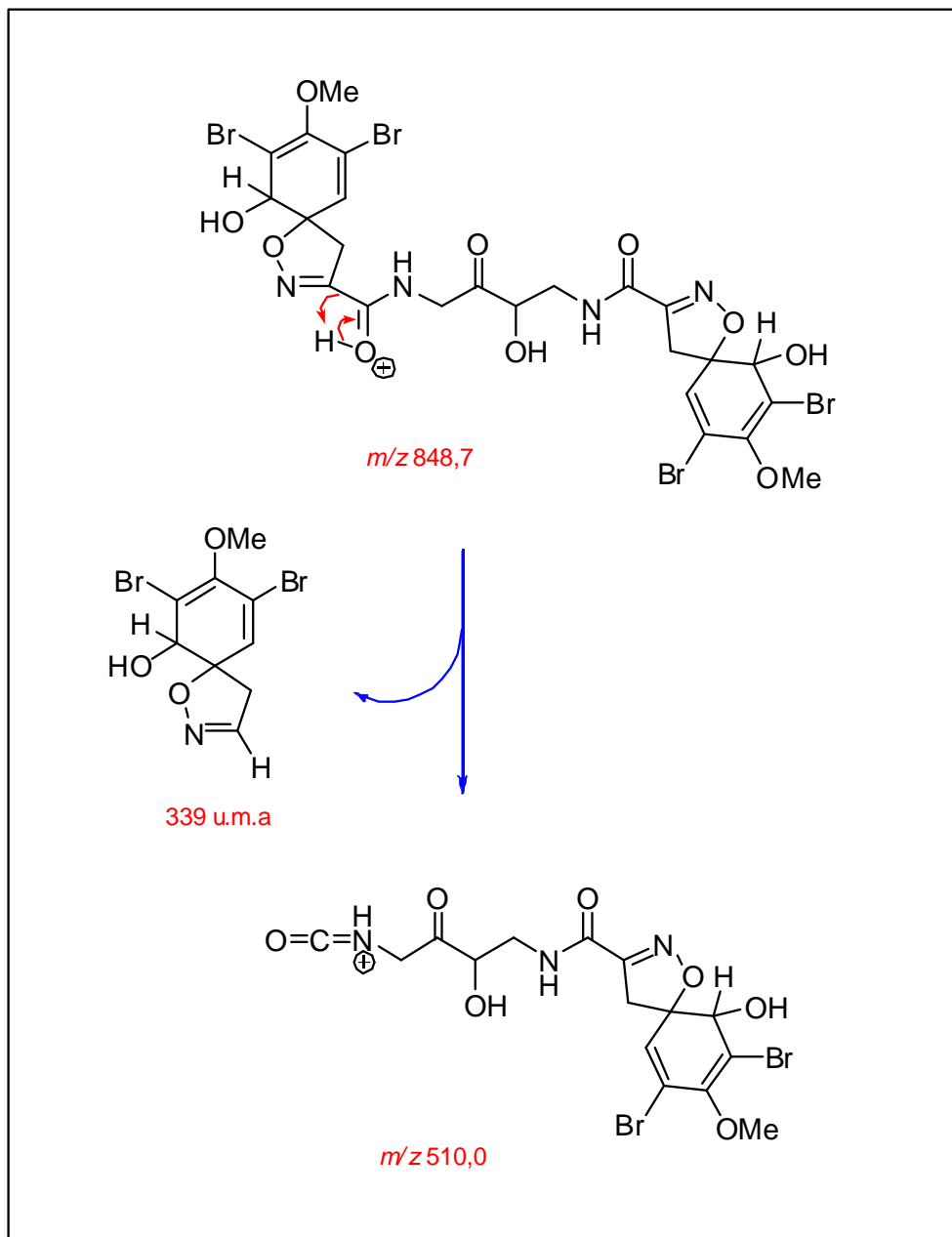


Figura 32. Possível caminho de fragmentação para o íon fragmento m/z 510,0 do composto ceto-hidroxi-aerotionina.

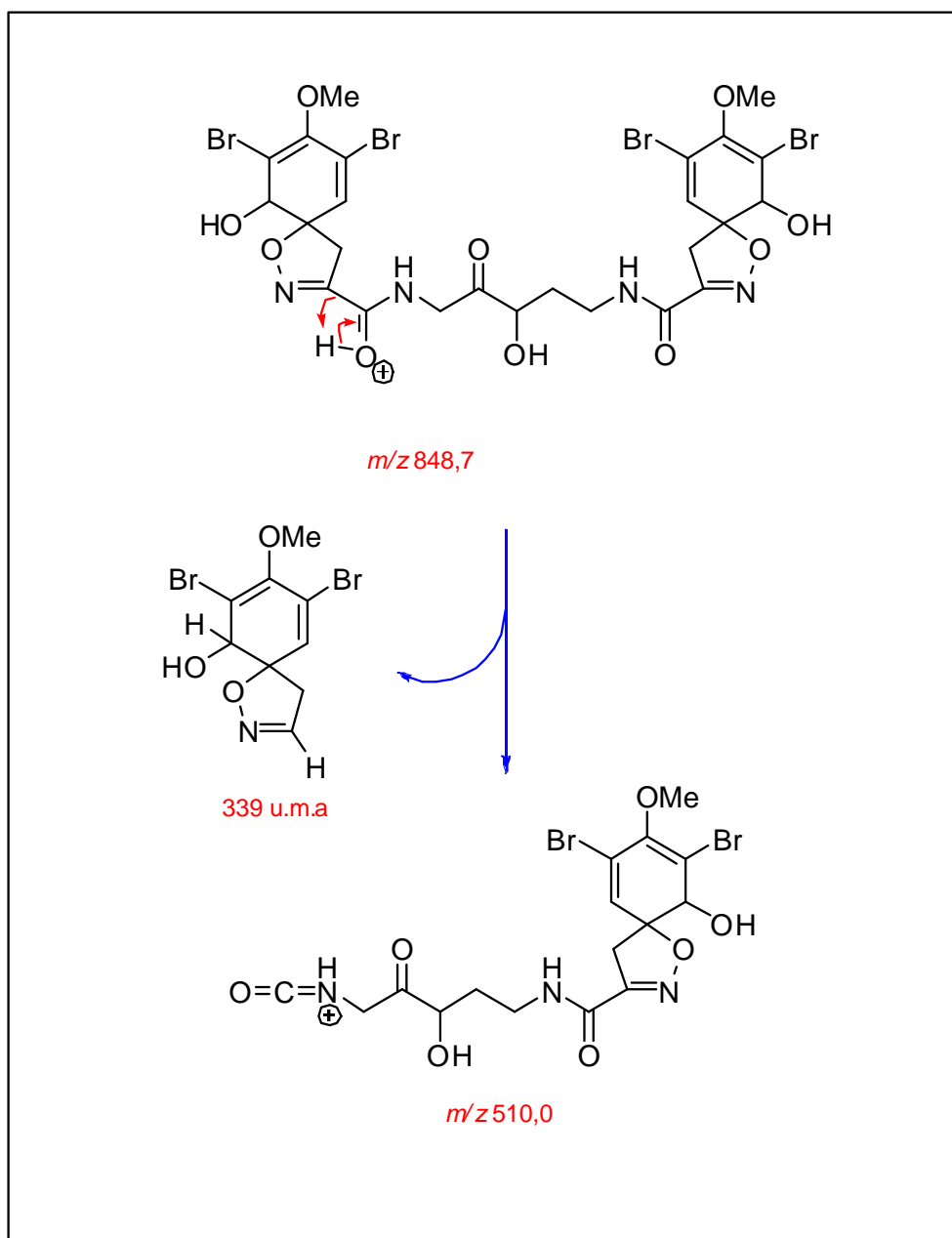


Figura 33. Possível caminho de fragmentação para o íon fragmento m/z 510,0 do composto caissarina C.

Já o quinto composto com t_R de 13,6 minutos (**Figura 21**, pág. 64), apresentou um sinal no espectro de massas de m/z 855,0 (**figura 34**), referente a molécula cationizada com sódio, $[M+Na]^+$, o valor de m/z para a molécula protonada, $[M+H]^+$, pode ser verificado em outras frações descritas na **tabela 9** (página 127), seu valor de m/z é de 833,0.

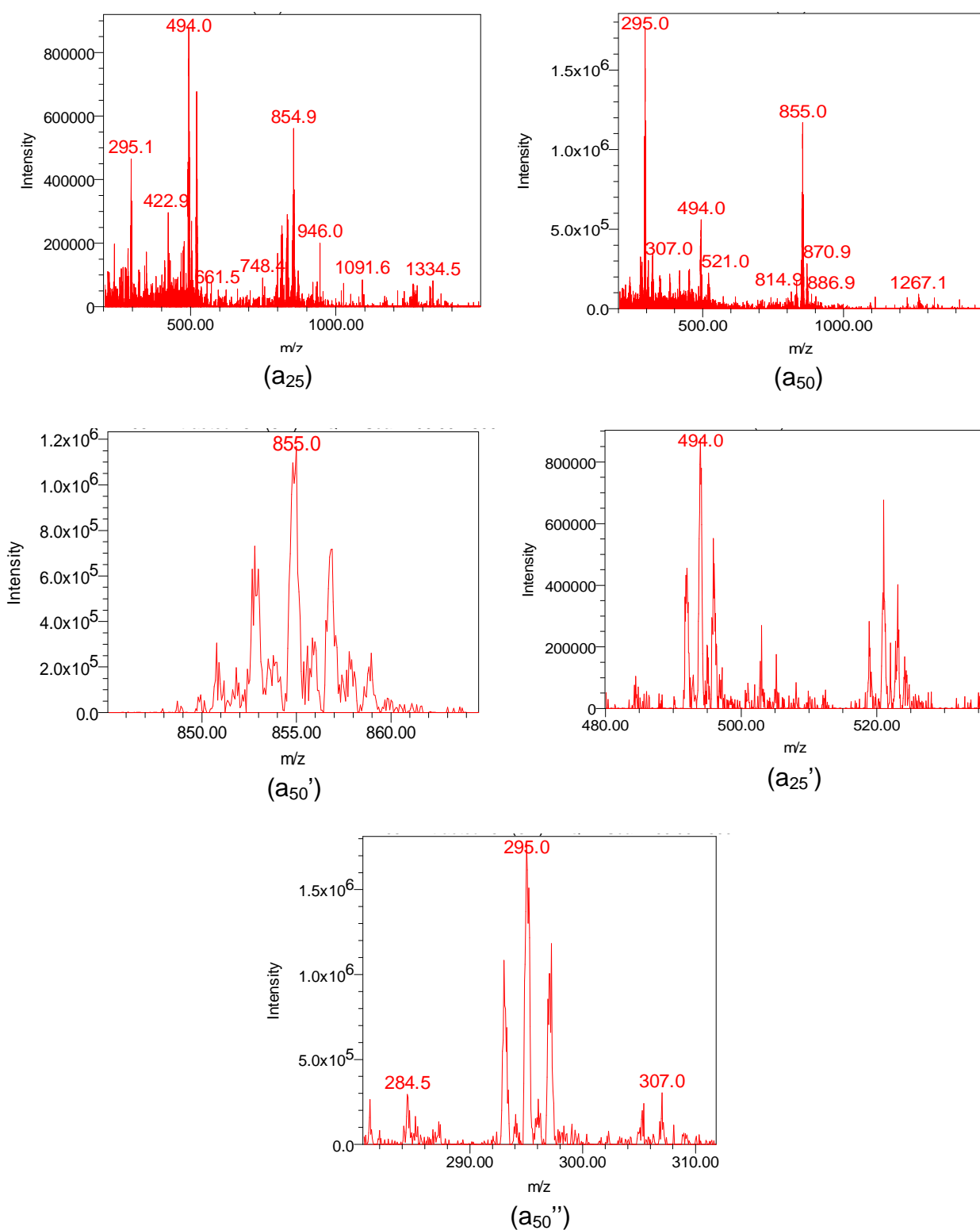


Figura 34. Espectros de massas na região do quinto pico cromatográfico ($t_R = 13,6$ min): (a₂₅, a₅₀) espectro de massas; (a₅₀') ampliação do íon pseudo-molecular; (a₂₅' , a₅₀'') ampliação do íon fragmento. Dados: a₂₅ = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 V e a₅₀ = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V. [M+Na]⁺: m/z 855,0.

Como este composto também não apresentou perfil químico igual ao dos padrões, as possíveis estruturas para este composto são apresentadas na **Figura 35**.

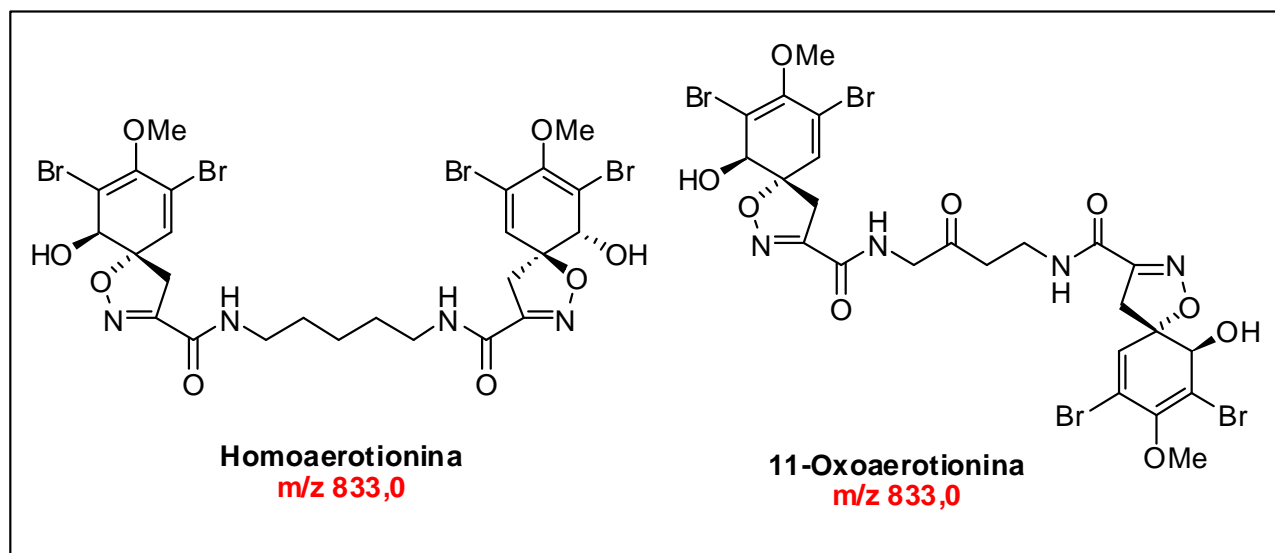


Figura 35. Possíveis estruturas para o composto com m/z 833,0.

A homoerotionina foi isolada a partir da esponja *Aplysina* sp. (Moody, K. et al., 1972) e a 11-oxoerotionina foi isolada a partir da esponja *Aplysina lacunosa* (Acosta, A. L.; Rodriguez A. D., 1992) e os compostos também foram isolados de uma amostra de *Aplysina fulva* (Ñunez et al., 2008).

Para estes compostos também foram observados íons fragmentos com valores de m/z de 521,1, 494,0 e 295,0 (**Figura 34**), que correspondem a perda de 312 u.m.a para o fragmento de m/z 521,1, 339 u.m.a para o fragmento de m/z 494,0 e 538 u.m.a para o fragmento de m/z 295,0. Foi possível sugerir um caminho de fragmentação para o íon fragmento de m/z 494,0 para o composto homoerotionina (**Figura 36**) e para a 11-oxoerotionina (**Figura 37**) e também para o íon fragmento m/z 521,1 formado a partir do composto homoerotionina na **Figura 38** e da 11-

oxoaerotionina na **Figura 39**. Por fim, o íon fragmento m/z 295,0 foi proposta a estrutura demonstrada na **Figura 25**.

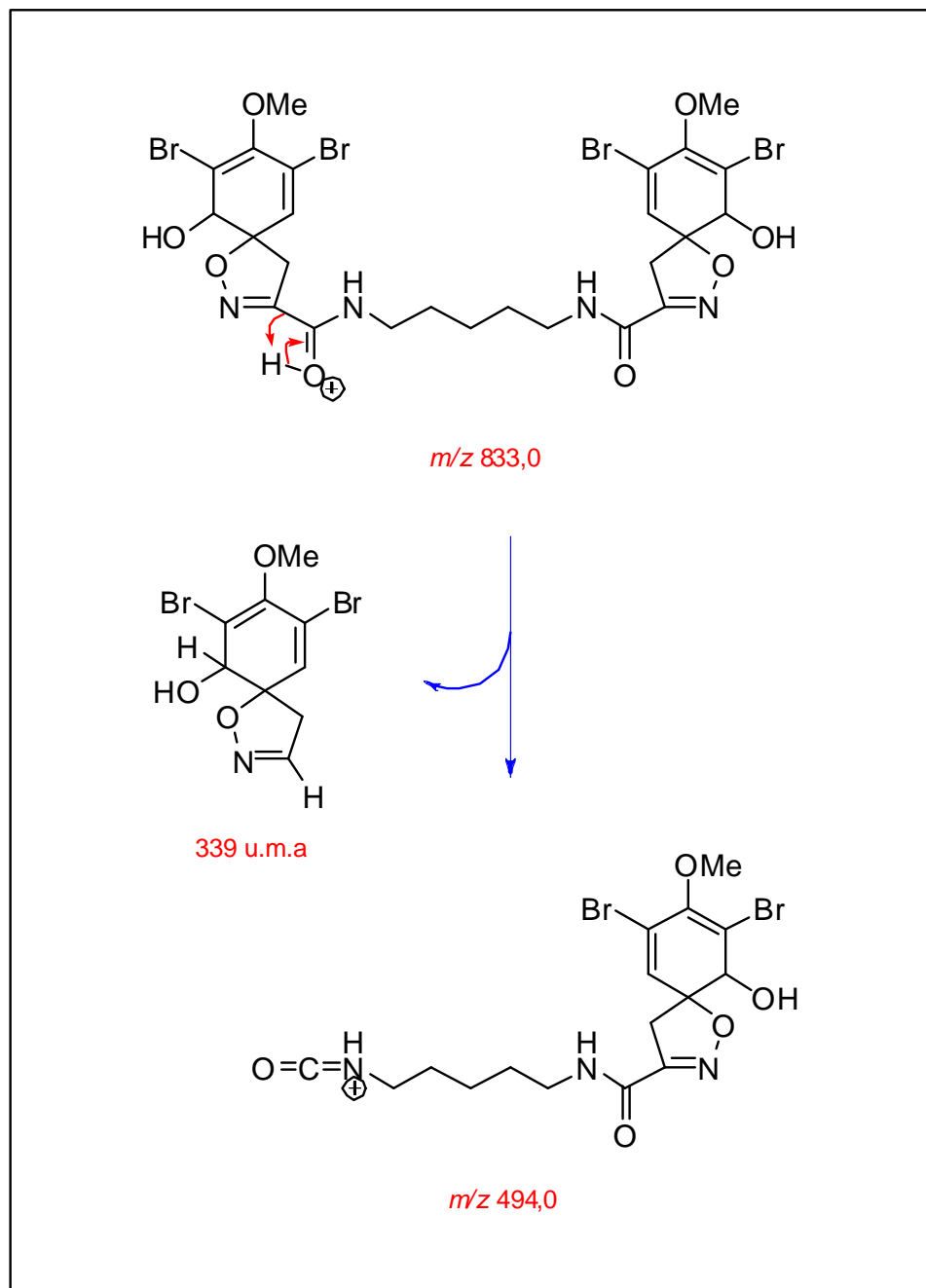


Figura 36. Possível caminho de fragmentação para o íon fragmento m/z 494,0 do composto homoaerotionina.

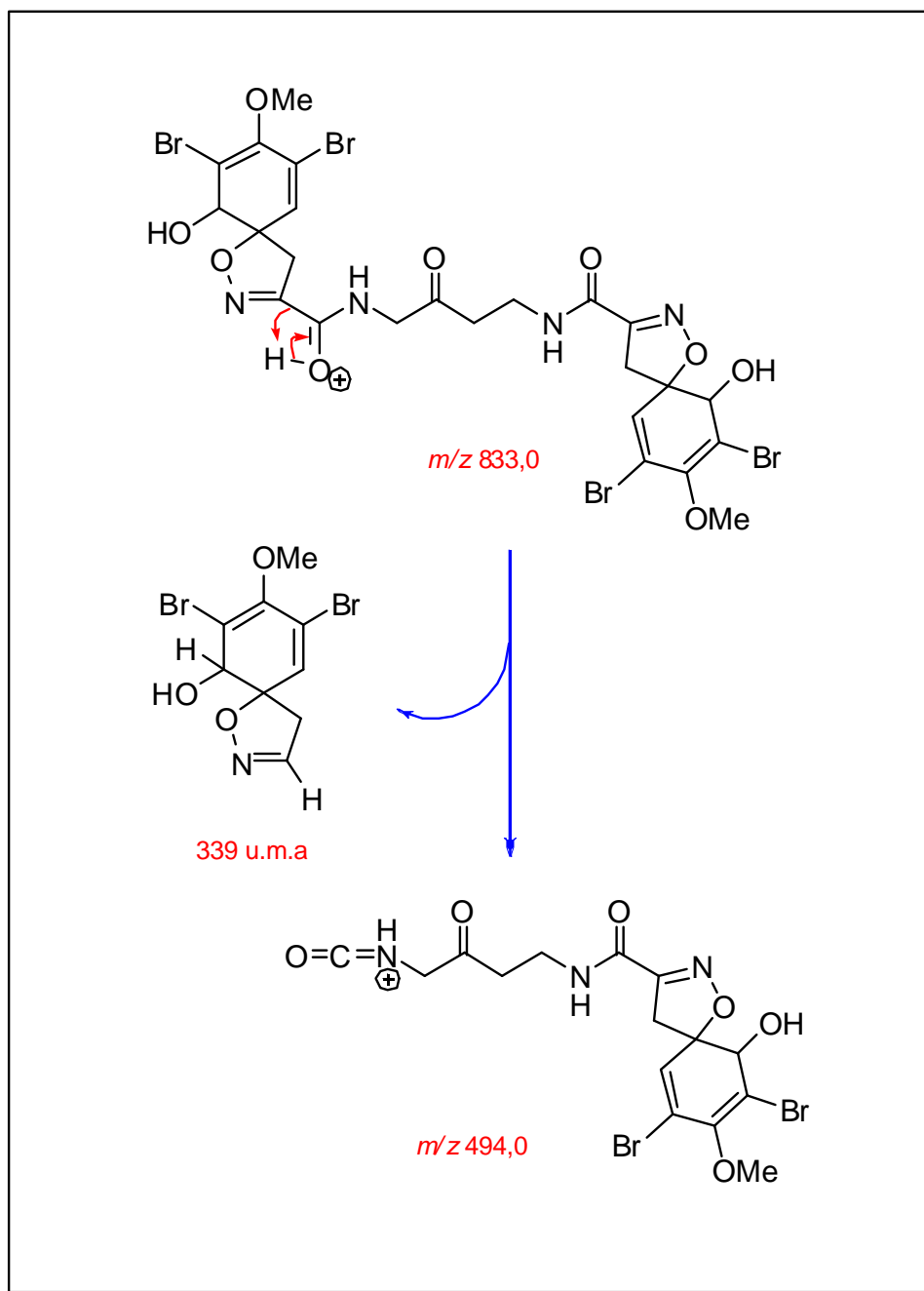


Figura 37. Possível caminho de fragmentação para o íon fragmento m/z 494,0 do composto 11-oxoaerotionina.

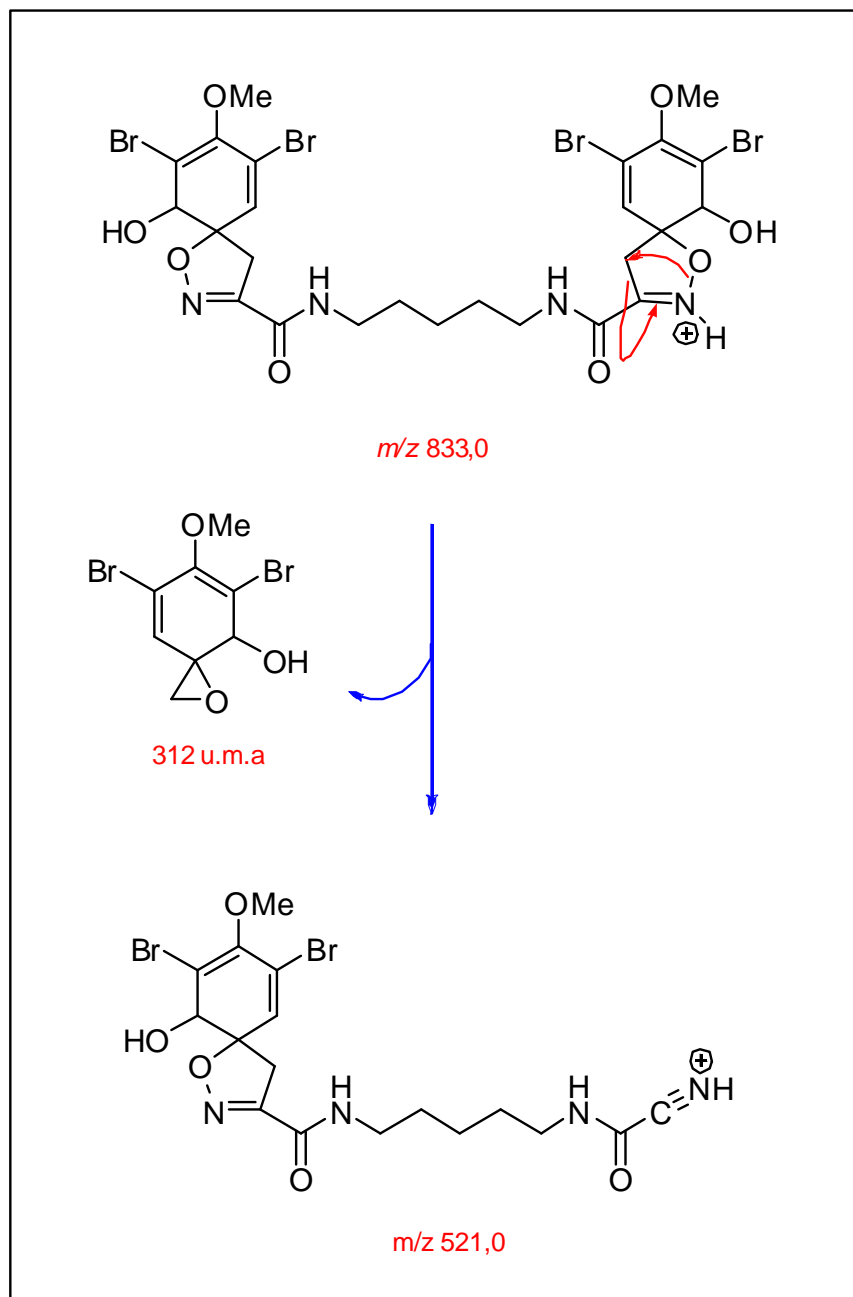


Figura 38. Possível caminho de fragmentação para o íon fragmento m/z 521,0 do composto homoaerotionina.

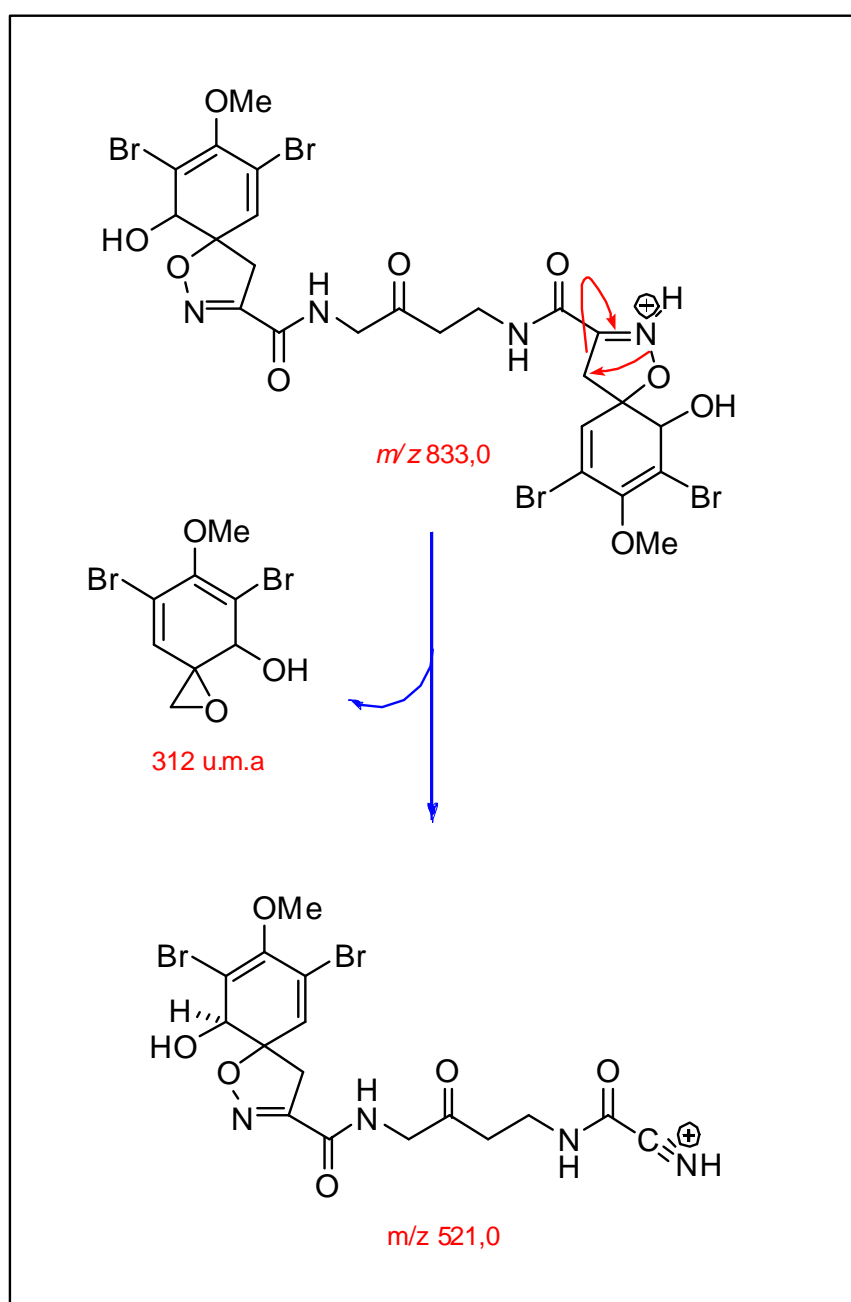
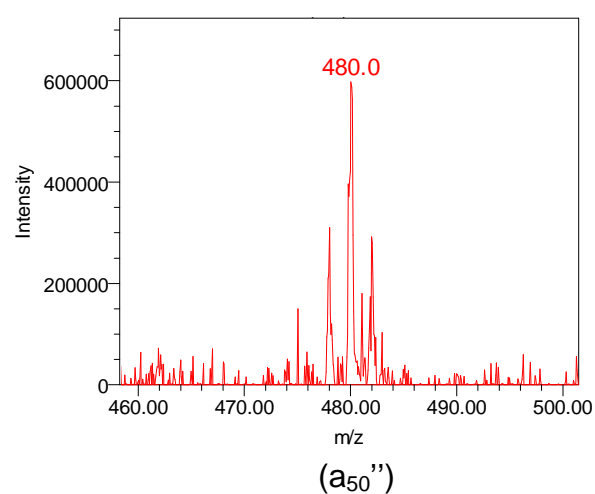
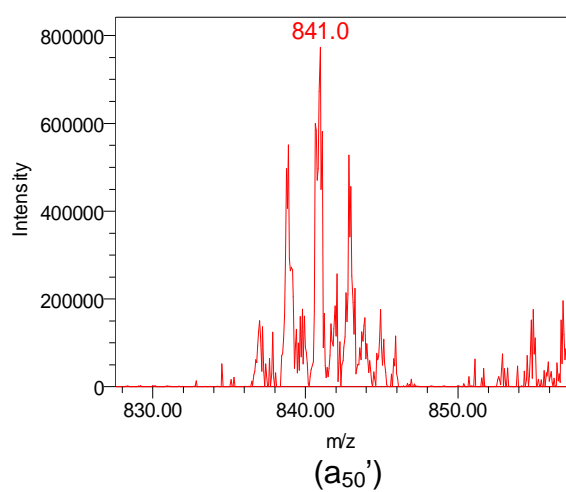
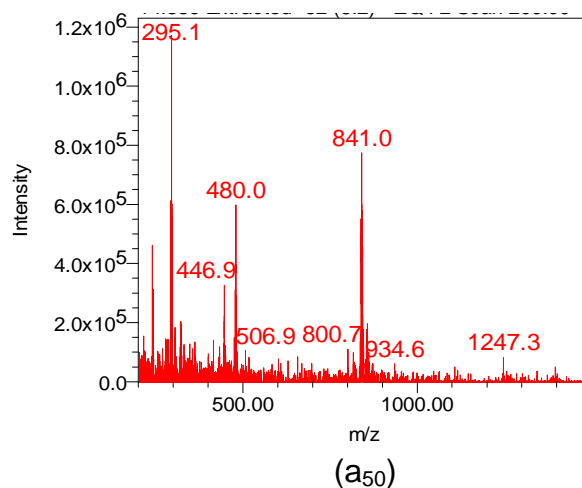
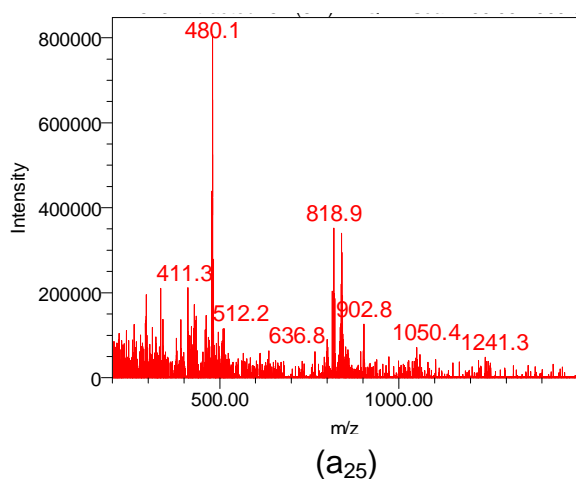


Figura 39. Possível caminho de fragmentação para o íon fragmento m/z 521,0 do composto 11-oxoaerotionina.

O sexto composto com t_R de 14,1 minutos (**Figura 21, pág. 64**), apresentou um sinal no espectro de massas de m/z 818,9, o qual refere-se a molécula protonada, $[M+H]^+$ e um outro sinal de m/z 841,0, referente a molécula cationizada com sódio, $[M+Na]^+$ (**Figura 40**).



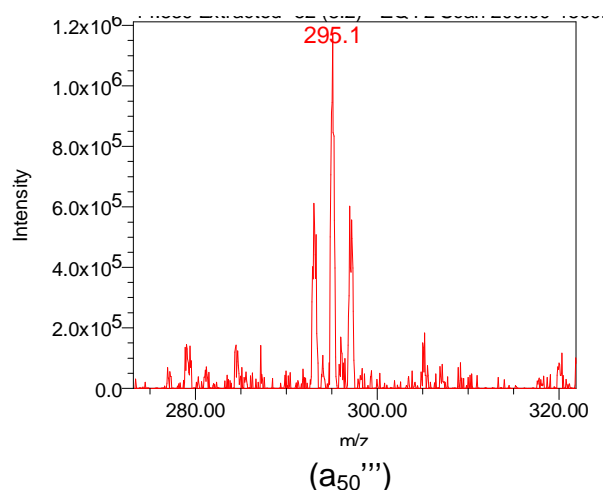


Figura 40. Espectros de massas na região do sexto pico cromatográfico ($t_R = 14,1$ min): (a_{25} , a_{50}) espectro de massas; (a_{50}') ampliação do íon pseudo-molecular; (a_{50}'' , a_{50}''') ampliação do íon fragmento. Dados: a_{25} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 V e a_{50} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V. $[M+H]^+$: m/z 818,9; $[M+Na]^+$: m/z 841,0.

Foi realizada a comparação dos dados desta fração com os dos compostos-padrões, esta comparação está descrita na **tabela 6**.

Tabela 6 – Dados comparativos de t_R , espectro de UV e espectros de massas do composto aerotionina e do composto 6 da fração BA07ES-52-8:2

Valores	t_R	Absorções (nm)	$[M+H]^+$ ¹ e $[M+Na]^+$ ²	Íons fragmentos
Aerotionina	14,1	229,5; 282,6	818,8 ¹	479,8; 295,0
Composto 6	14,1	226,0; 282,7	818,9 ¹ ; 841,0 ²	480,0; 295,1

¹ $[M + H]^+$: molécula protonada correspondente ao pico observado no espectro de massas.

² $[M + Na]^+$: molécula cationizada com sódio correspondente ao pico observado no espectro de massas.

A análise dos dados obtidos permitiu analisar que os valores de t_R , absorções no UV e valores de m/z foram praticamente iguais, sendo assim, pode-se confirmar que o sexto composto presente na região dos picos cromatográficos é a aerotionina, já isolada anteriormente de esponjas do gênero *Aplysina* (Ñunez *et al.*, 2008).

Para este composto foi observado íons fragmentos com valores de m/z de 480, e 295,1 (**Figura 40**), que correspondem à perda de 339 u.m.a para o fragmento de m/z 480,0 e 524 u.m.a para o fragmento de m/z 295,1, sendo possível sugerir o seguinte mecanismo de fragmentação para o íon fragmento de m/z 480,0 (**Figura 41**). Para o íon fragmento m/z 295,0 já foi descrito anteriormente o possível íon fragmento.

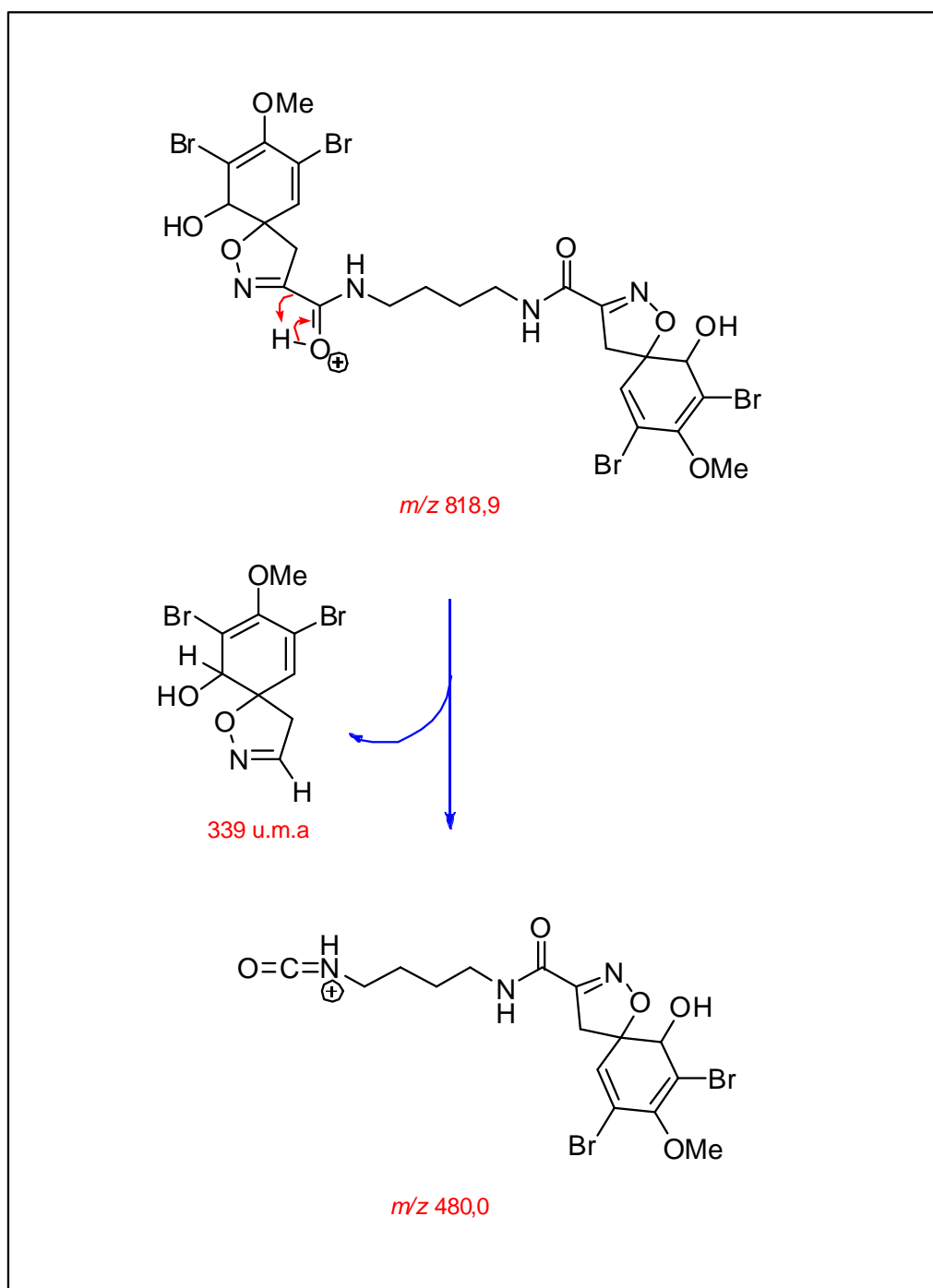


Figura 41. Possível caminho de fragmentação para o íon fragmento m/z 480,0.

Para os compostos com t_R 12,9; 13,1; 13,6 e 14,1 minutos observou-se que estes apresentaram íons fragmentos com m/z 496,0, 510,0, 494,0 e 480,0 correspondentes a perda de 339 u.m.a.. Isto é um indicativo de que estes compostos possuem similaridade estrutural. Ou seja, é bem possível que as possíveis

estruturas dos compostos detectados nestes picos (exceto a aerotionina, que foi confirmada) sejam exatamente as descritas anteriormente, e que todas sofram o mesmo caminho de fragmentação, com perda do fragmento 7,9-dibromo-8-metoxi-1-oxa-2-azaspiro [4,5] deca-2,7,9-trien-6-ol de massa 339 u.m.a. Tais resultados indicam que a otimização dos parâmetros de análise por espectrômetro de massas foi bem sucedida, uma vez que compostos com fragmentos estruturais idênticos sofrem fragmentações idênticas.

Por fim, o sétimo composto com t_R de 15,1 minutos, apresentou um “sinal septeto” indicando a presença de 6 átomos de bromo na estrutura do composto. Este apresentou um sinal no espectro de massas de m/z 1136,8 (**Figura 42**), o qual se refere a molécula cationizada com sódio, $[M+Na]^+$. Já o valor de m/z para a molécula protonada, $[M+H]^+$, pode ser verificado em outras frações descritas na **Tabela 9 (página 127)**, seu valor de m/z é de 1114,8.

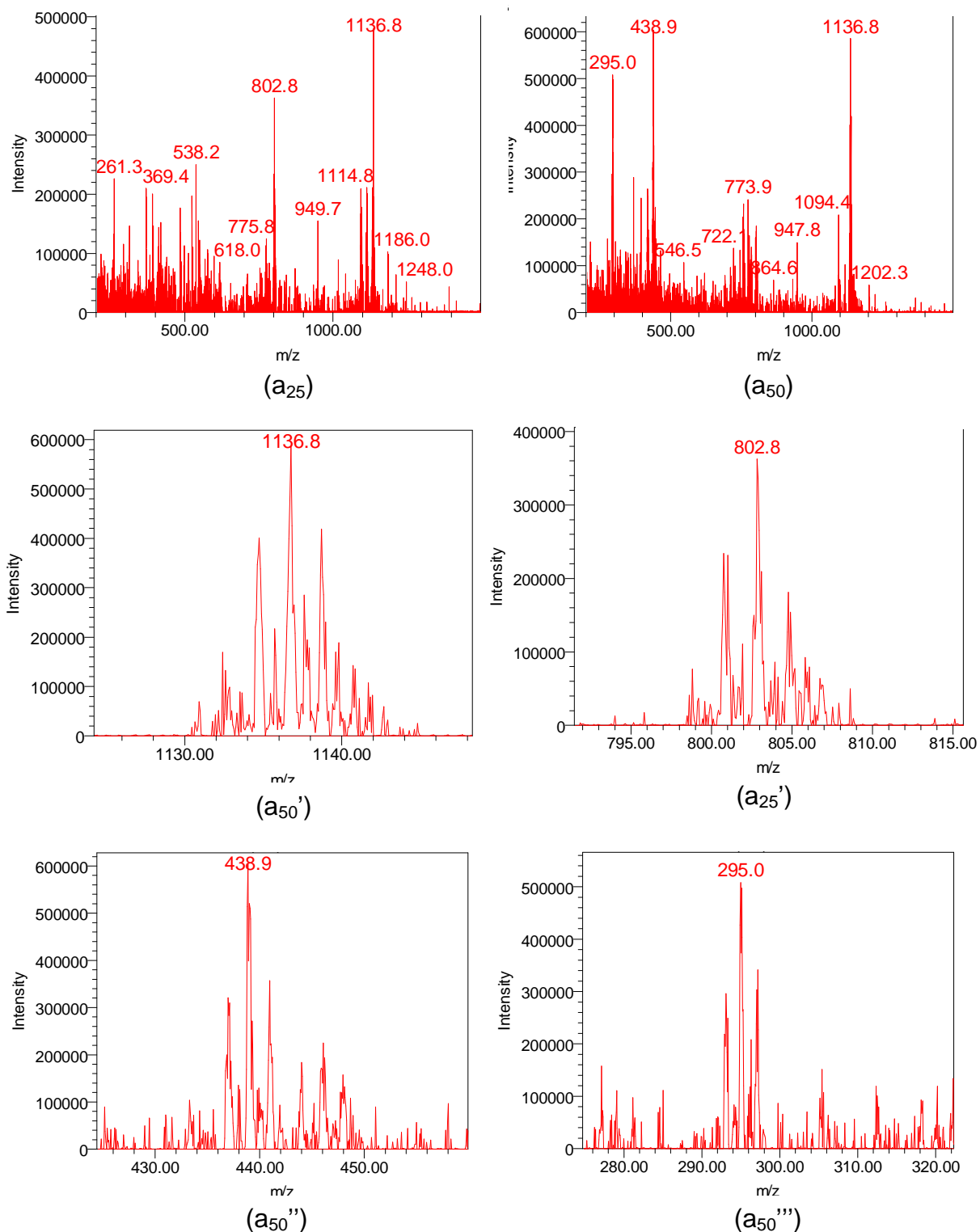


Figura 42. Espectros de massas na região do sétimo pico cromatográfico ($t_R = 15,1$ min): (a_{25} , a_{50}) espectro de massas; (a_{50}') ampliação do íon pseudo-molecular; (a_{25}' , a_{50}'' , a_{50}''') ampliação do íon fragmento Dados: a_{25} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 V e a_{50} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V. $[M+Na]^+$: m/z 1136,8.

Foi realizada a comparação dos dados desta fração com os dos compostos-padrões, esta comparação esta descrita na **tabela 7**.

Tabela 7 – Dados comparativos de t_R , espectro de UV e espectros de massas do composto fistularina-3 e do composto 7 da fração BA07ES-52-8:2

Valores	t_R	Absorções (nm)	$[M+H]^+$ ¹ e $[M+Na]^+$ ²	Íons fragmentos
Fistularina-3	15,1	222.4; 284.6	1136.9 ²	802.9; 439.1; 295.2
Composto 7	15,1	222.6; 284.8	1114.8 ¹ ; 1136.8 ²	802.8; 438.9; 295.0

¹ $[M + H]^+$: molécula protonada correspondente ao pico observado no espectro de massas.

² $[M + Na]^+$: molécula cationizada com sódio correspondente ao pico observado no espectro de massas.

Através da análise dos dados apresentados pode-se observar que os valores de t_R , absorções no UV e valores de m/z foram praticamente iguais a fistularina-3. Sendo assim, pôde-se confirmar que o sétimo composto presente na região dos picos cromatográficos é a fistularina-3, isolada inúmeras vezes, a partir de esponjas da Ordem Verongida como, *Aiolochoia crassa* (Gao, H.; Kelly, M; Hamann, M. T., 1999), *Aplysina fistularis* (Compagnone *et al.*, 1999), *Verungula gigantea* (Ciminiello *et al.*, 2000), *Aplysina caissara* (Saeki *et al.*, 2002) e *Aplysina fulva* (Nuñez *et al.*, 2008).

Para este composto também foram observados íons fragmentos com valores de m/z de 802,8, 438,9 e 295,0 (**Figura 42**), que correspondem às perdas de 312 u.m.a para o fragmento de m/z 802,9, 676 u.m.a para o fragmento de m/z 438,9 e 820 u.m.a para o fragmento de m/z 295,0. Para estes íons fragmentos não foi possível propor nenhum mecanismo de fragmentação. Somente foi sugerido um

possível íon fragmento de m/z 438,9 demonstrado na **Figura 43** e para o íon fragmento de m/z 295,0 a estrutura já foi proposta anteriormente (**Figura 25**).

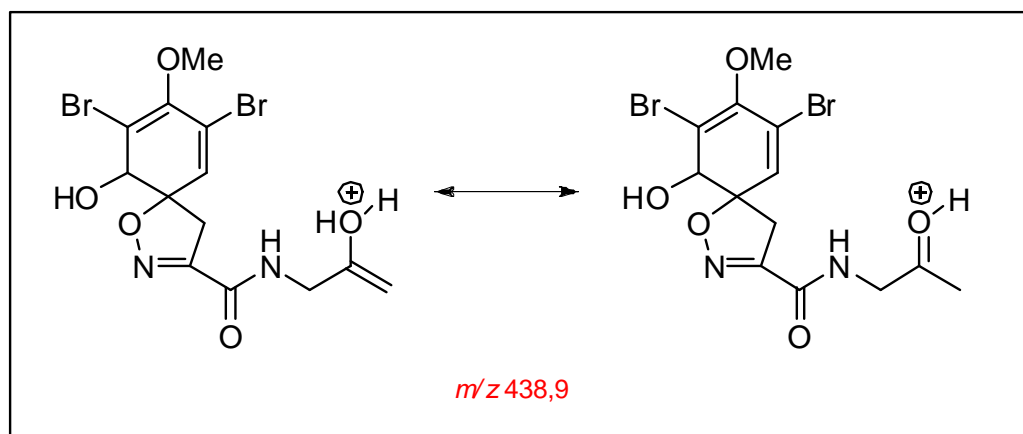


Figura 43. Possível estrutura do íon fragmento m/z 439.8.

A fração BA07ES-91-MeOH 100% oriunda da esponja da *Aplysina* sp. apresentou um único composto majoritário com o valor de t_R de 15,1 minutos (**Figura 44**). A amostra apresentou bom grau de pureza e com o intuito de se comprovar que este composto realmente se trata da fistularina-3 foi obtido o seu espectro de RMN- 1 H (**Figuras 45 e 46**).

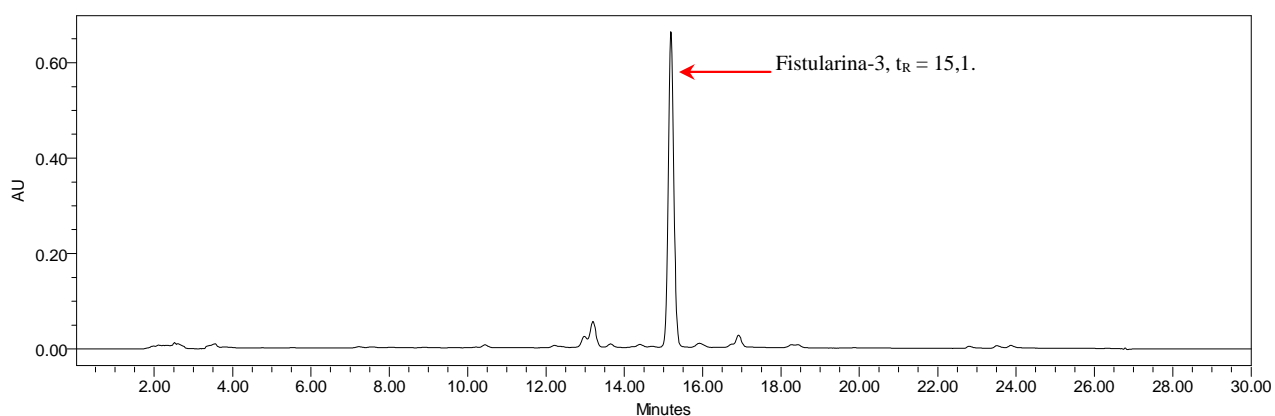


Figura 44. Cromatograma com detecção UV ($\lambda = 280\text{nm}$) da amostra BA07ES-91-MeOH 100%.

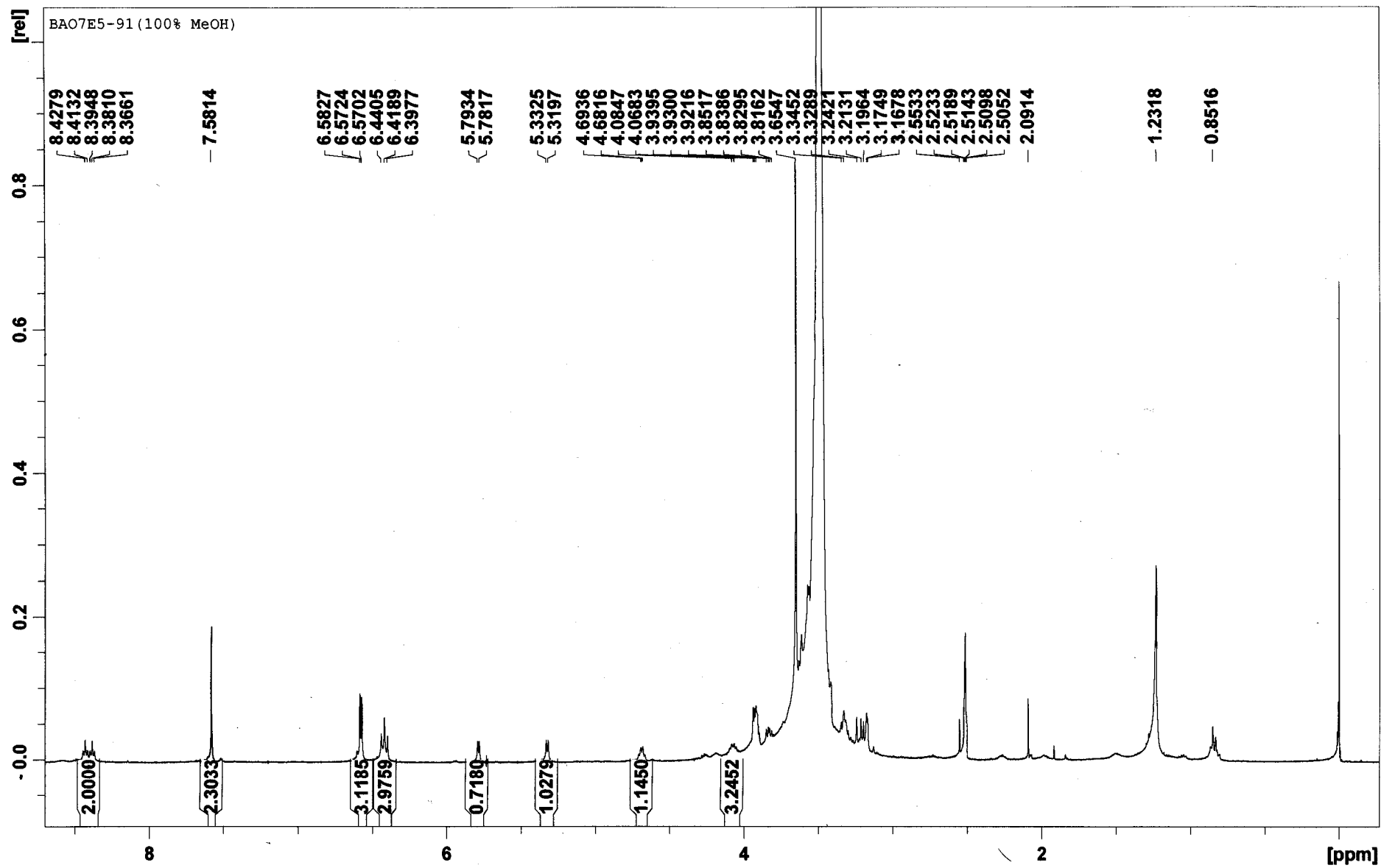


Figura 45. Espectro de RMN-¹H da fração BA07ES-91-MeOH 100% (DMSO-*d*₆, 400 MHz).

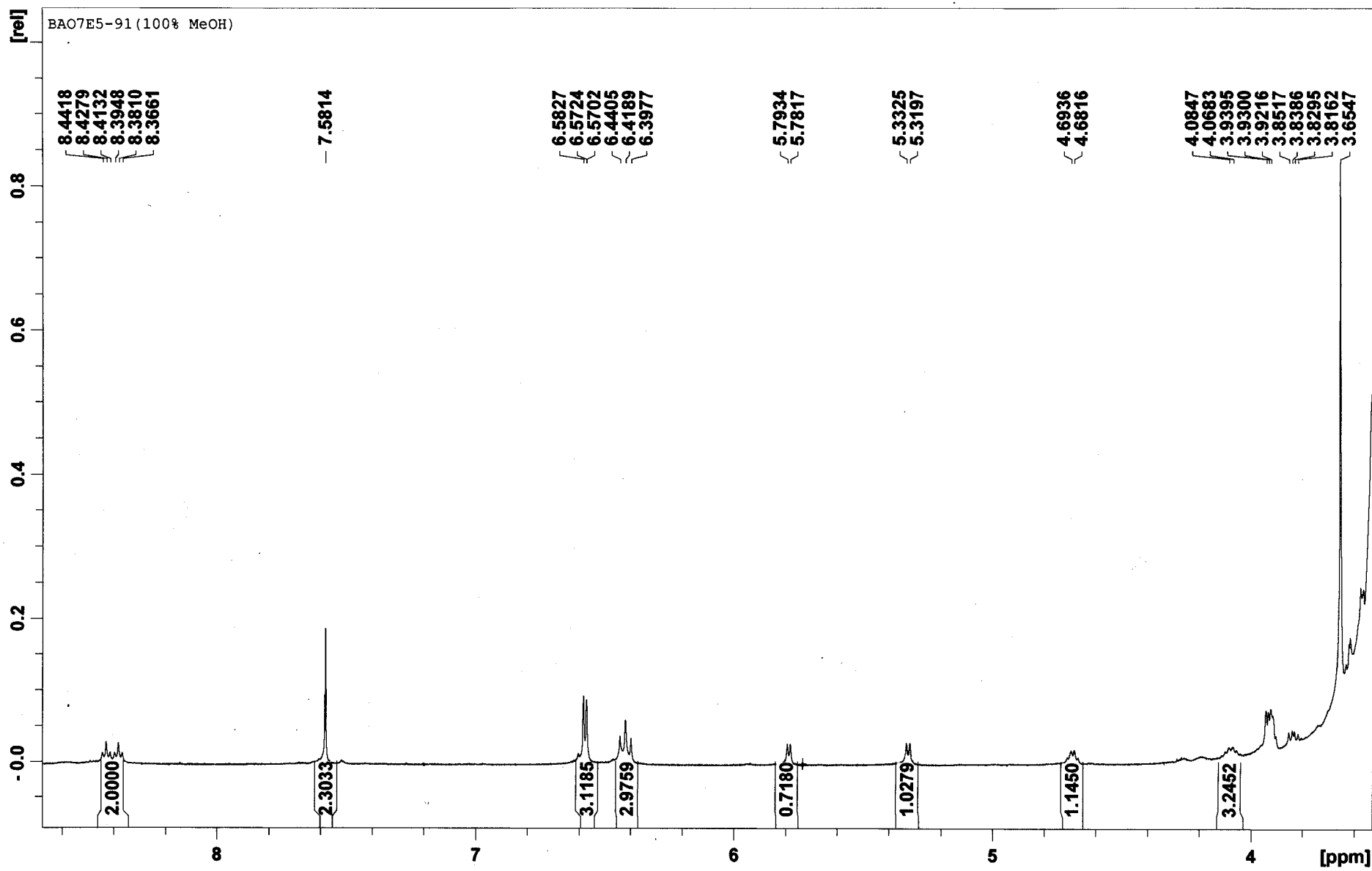


Figura 46. Expansão do espectro de RMN-¹H da fração BA07E5-91-MeOH 100% (DMSO-d₆, 400 MHz).

Como este composto (fistularina-3, **Figura 47**) foi isolado anteriormente por Gao e colaboradores (1999) a partir da esponja *Aiolochoxia crassa*, a identificação foi feita por comparação direta dos espectros de RMN-¹H (**Tabela 8**).

Tabela 8 – Dados comparativos de RMN-¹H da fração BA07ES-91-MeOH 100% e da fistularina-3.

	BA07ES-91-MeOH 100% (400MHz, DMSO-d ₆)	Fistularina-3 (Gao, <i>et al.</i> , 1999) (DMSO-d ₆)
9-NH	8,42 (t)	8,43 (t)
9'-NH	8,38 (t)	8,39 (t)
15, 15'-H	7, 58 (s)	7,57 (s)
5, 5'-H	6,57 (d)	6,58 (s); 6,56 (s)
1,1'-OH	6,42 (d); 6,40 (d)	6,39; 6,37 (d)
17-OH	5,78 (d)	5,75 (d)
11-OH	5,31 (d)	5,29 (d)
17-H	4,68 (q)	4,68 (m)
11-H	4,06 (se)	4,06 (m)
1,1'-H	3,93 (d); 3,92 (d)	3,93; 3,91 (d)
12-H	-----	3,89 (m)
12-H	3,83 (m)	3,82 (m)
3,3'-OCH ₃	sobreposto pelo sinal do solvente	3,64 (s)
7-H	sobreposto pelo sinal do solvente	3,61 (d)
7'-H	sobreposto pelo sinal do solvente	3,59 (oculto por outro sinal)
10-H	sobreposto pelo sinal do solvente	3,47 (m)
18-2H	-----	3,33 (d)
10-H	-----	3,29 (m)
7-H	3,22 (d)	3,24 (d)
7-H	3,18 (d)	3,19 (t)
7'-H	-----	3,15 (oculto por outro sinal)

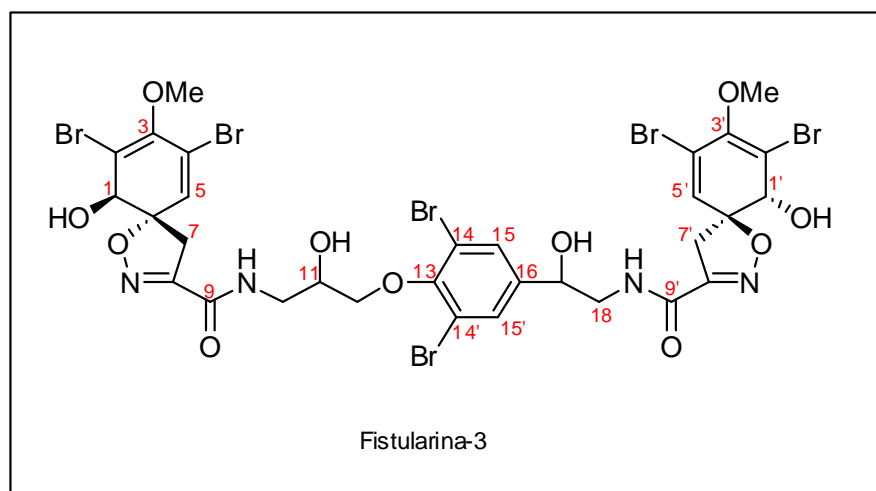


Figura 47. Estrutura da fistularina-3.

Através da análise dos valores de deslocamento químico da literatura, observou-se que foram atribuídos três valores para o hidrogênio 7 o que é muito estranho já que existem somente 2 hidrogênios 7.

Já a análise dos dados da fração BA07ES-52-1:1 apresentou os mesmos compostos da fração BA07ES-52-8:2. Isto pôde ser confirmado através da análise dos cromatogramas, absorções no UV e espectros de massas descritos nas **Figuras 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55 e 56 (pág. 97-106)**.

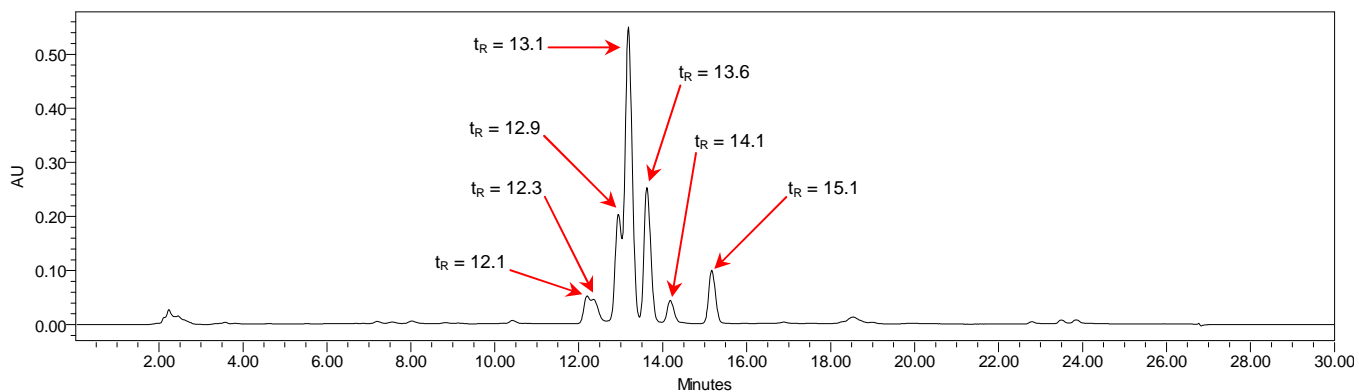
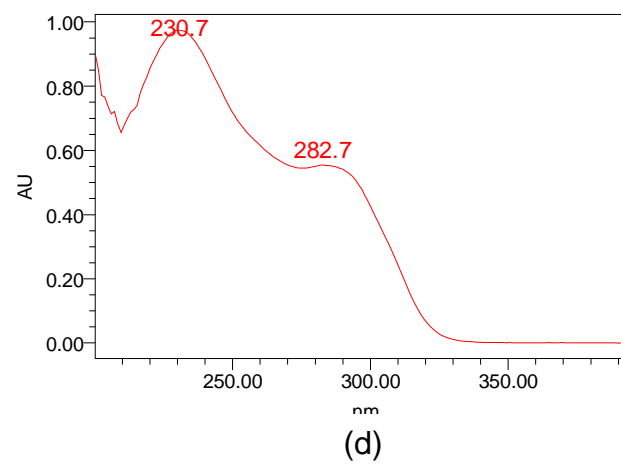
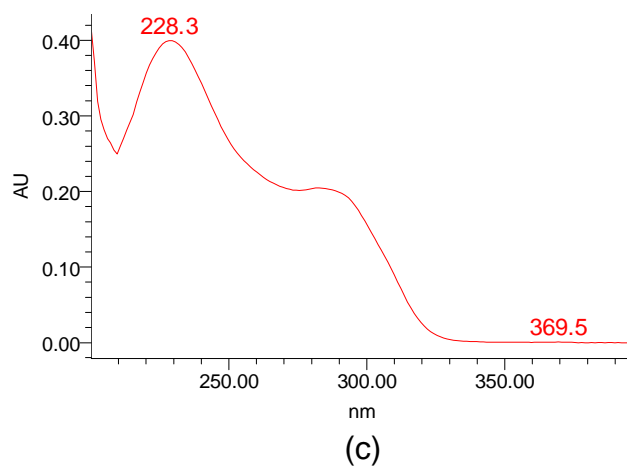
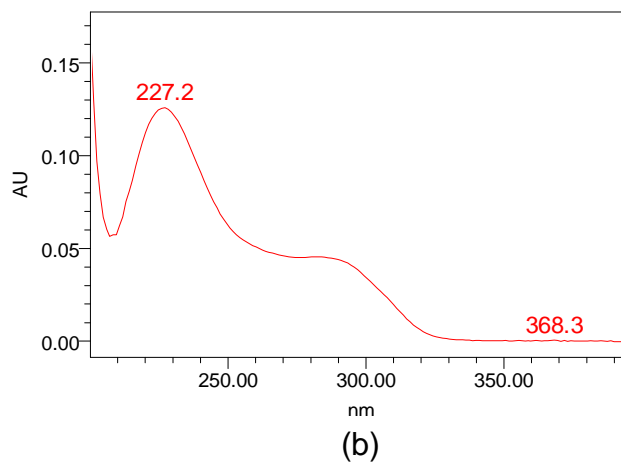
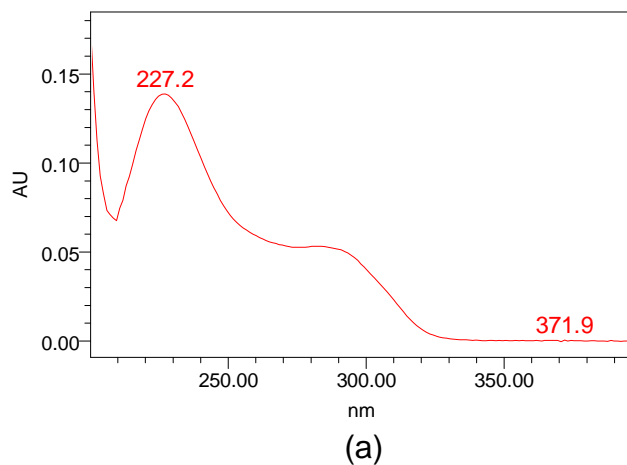


Figura 48. Cromatograma com detecção UV ($\lambda = 280\text{nm}$) da amostra BA07ES-52-1:1.



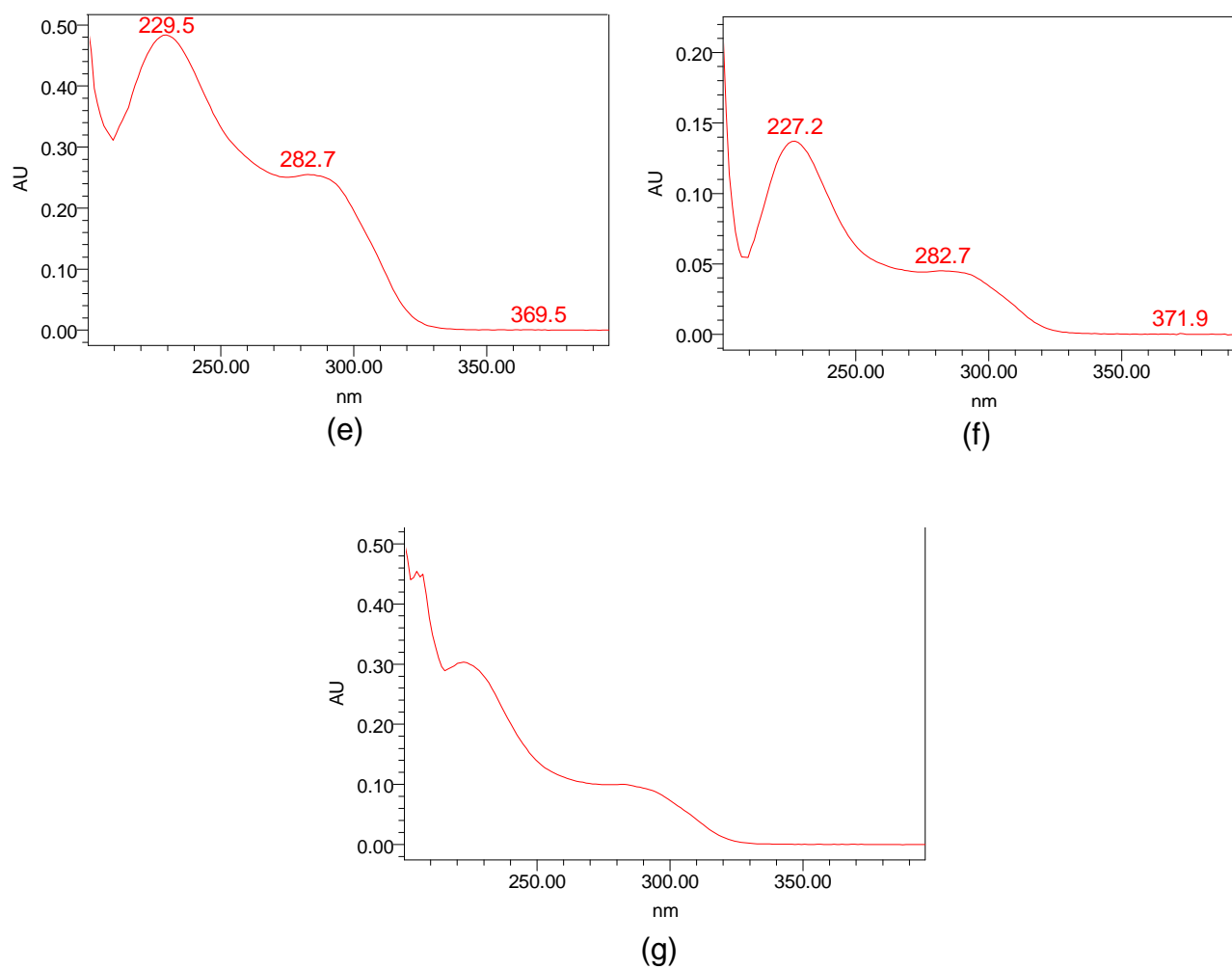


Figura 49. Espectros UV na região dos picos cromatográficos: (a) pico com t_R de 12,1 min; (b) pico com t_R de 12,3 min; (c) pico com t_R de 12,9 min; (d) pico com t_R de 13,1 min; (e) pico com t_R de 13,6 min; (f) pico com t_R de 14,1 min; (g) pico com t_R de 15,1 min;

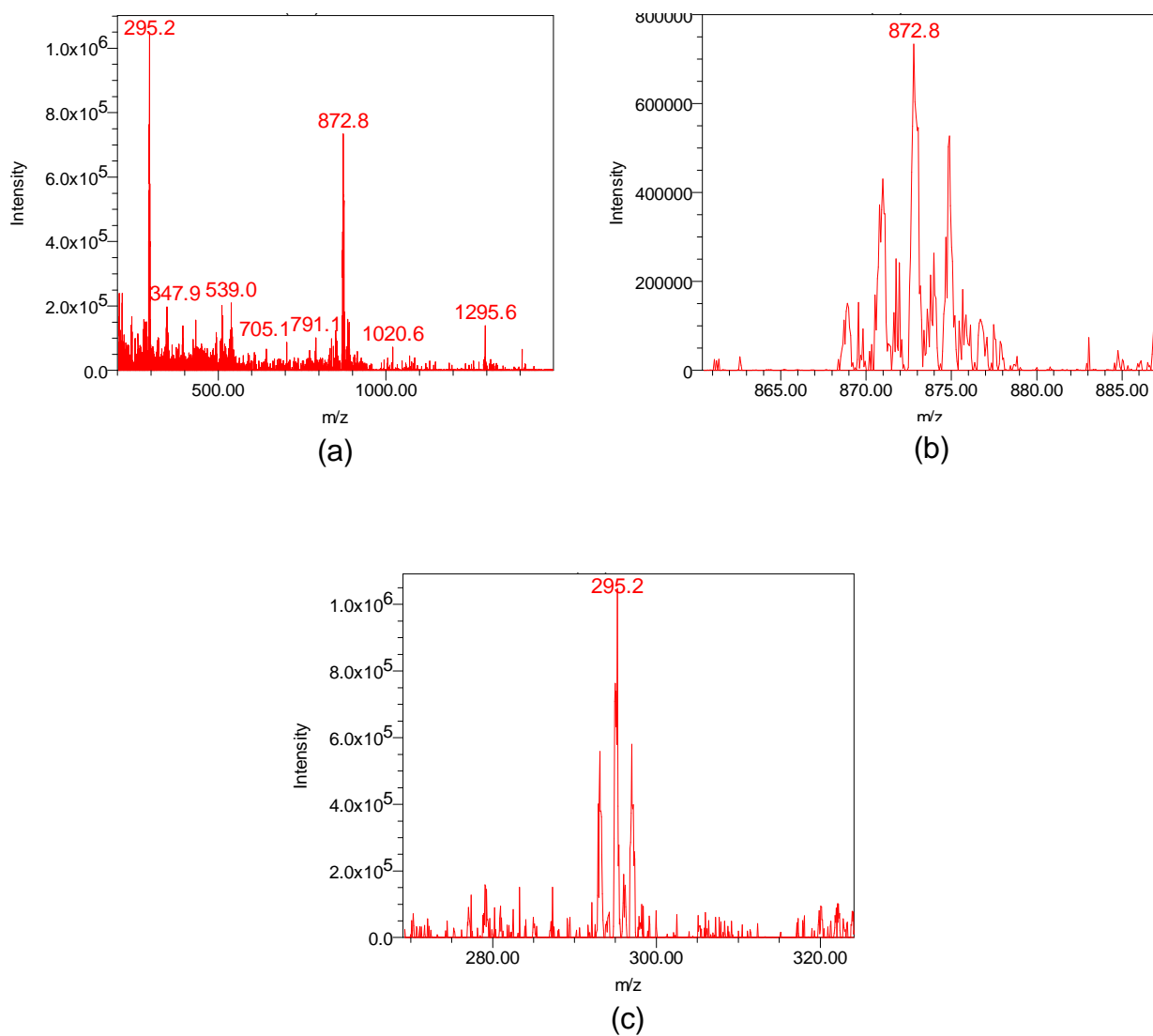


Figura 50. Espectros de massas na região do primeiro pico cromatográfico ($t_R = 12,1$ min): (a) espectro de massas; (b) ampliação do íon pseudo-molecular; (c) ampliação do íon fragmento. Condições: cone de voltagem de ionização do massas de 50 V.

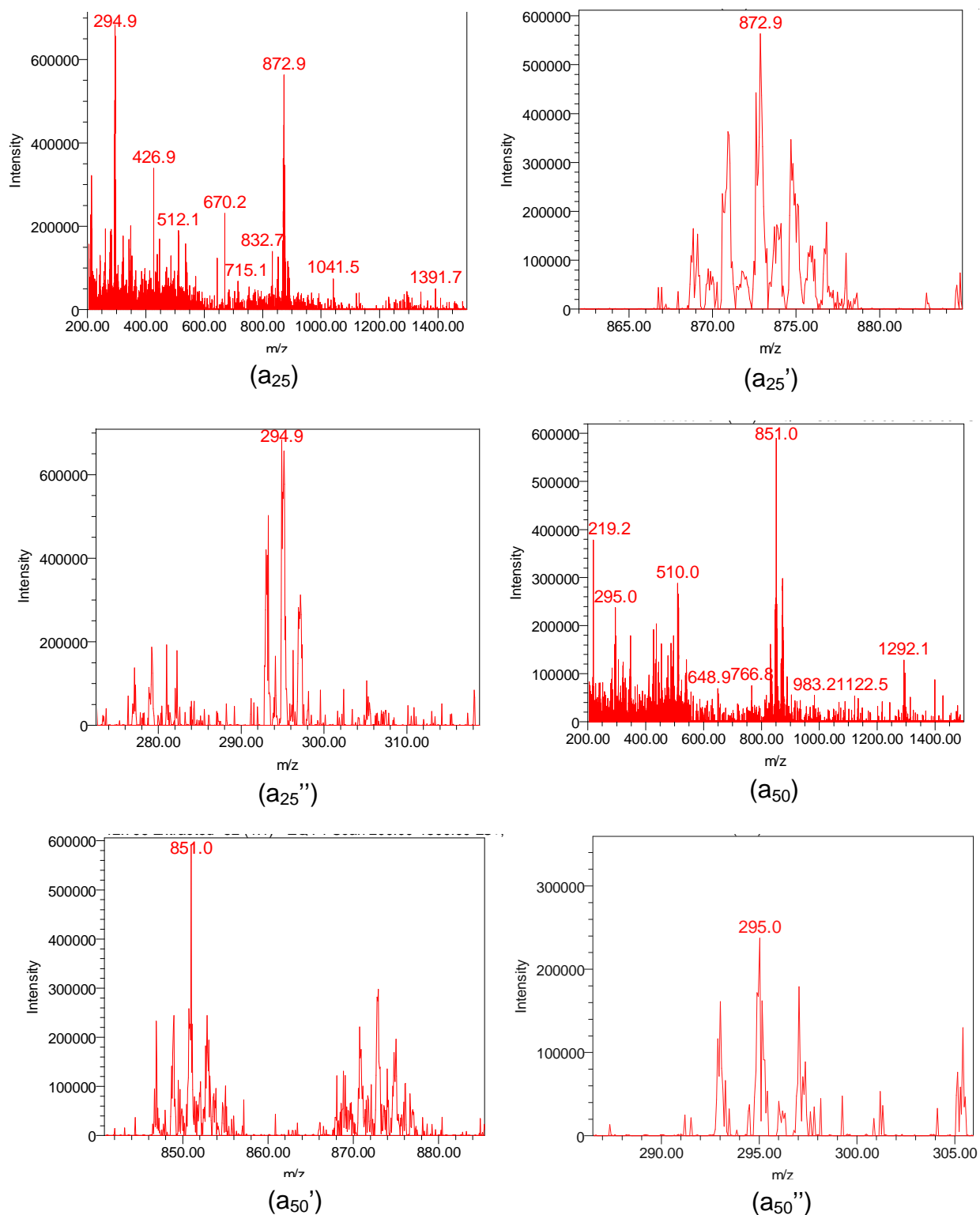


Figura 51. Espectros de massas na região do segundo pico cromatográfico ($t_R = 12,3$ min): (a₂₅, a₅₀) espectro de massas; (a₂₅', a₅₀') ampliação do íon pseudo-molecular; (a₂₅'', a₅₀'') ampliação do íon fragmento. Dados: a₂₅ = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 V e a₅₀ = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V. [M+H]⁺: m/z 851,0; [M+Na]⁺: m/z 872,9.

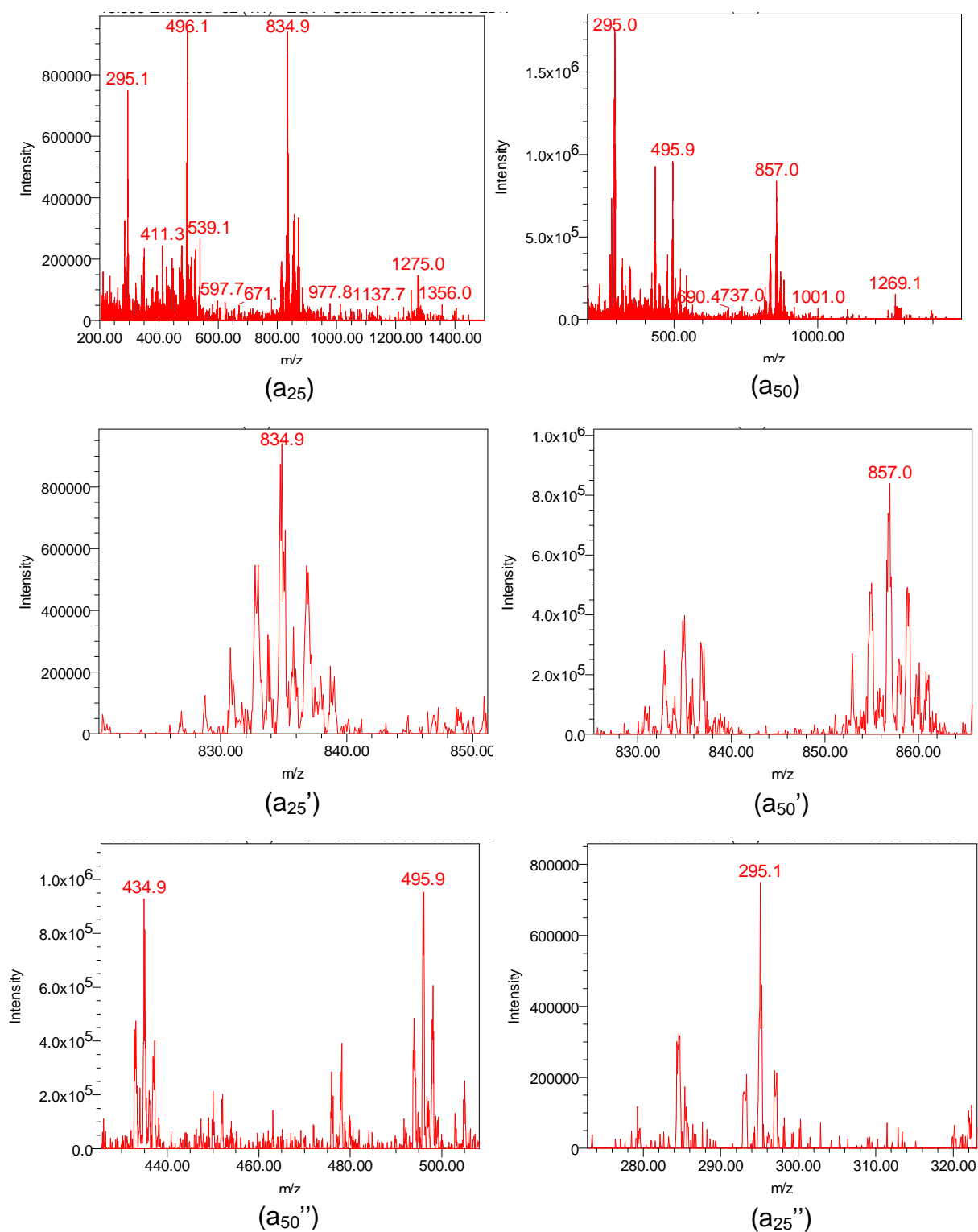


Figura 52. Espectros de massas na região do terceiro pico cromatográfico ($t_R = 12,9$ min): (a₂₅, a₅₀) espectro de massas; (a₂₅', a₅₀') ampliação do íon pseudo-molecular; (a₂₅'', a₅₀'') ampliação do íon fragmento. Dados: a₂₅ = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 V e a₅₀ = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V. [M+H]⁺: m/z 834,9; [M+Na]⁺: m/z 857,0.

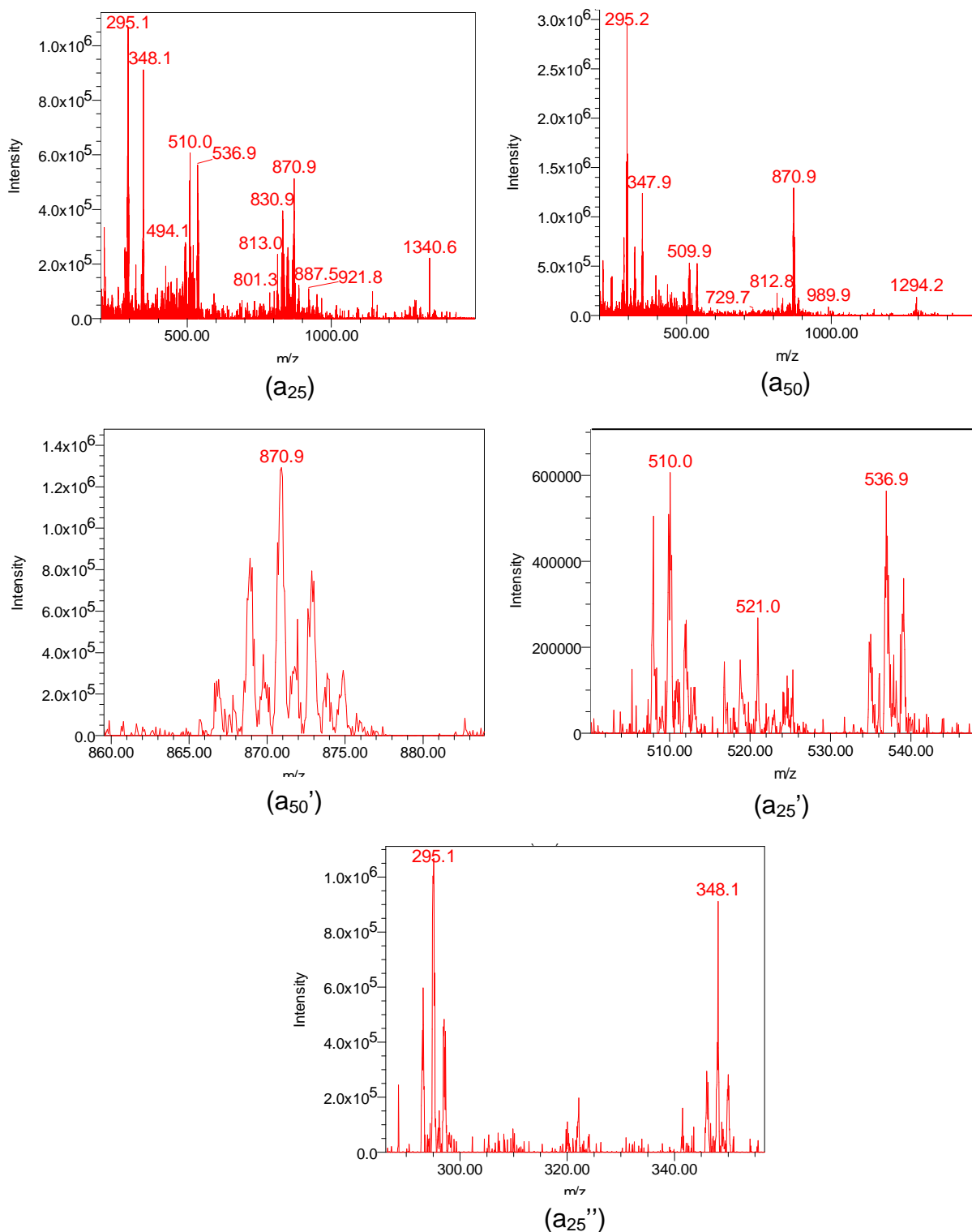


Figura 53. Espectros de massas na região do quarto pico cromatográfico ($t_R = 13,1$ min): (a₂₅, a₅₀) espectro de massas; (a₅₀') ampliação do íon pseudo-molecular; (a₂₅', a₂₅'') ampliação do íon fragmento. Dados: a₂₅ = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 V e a₅₀ = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V.

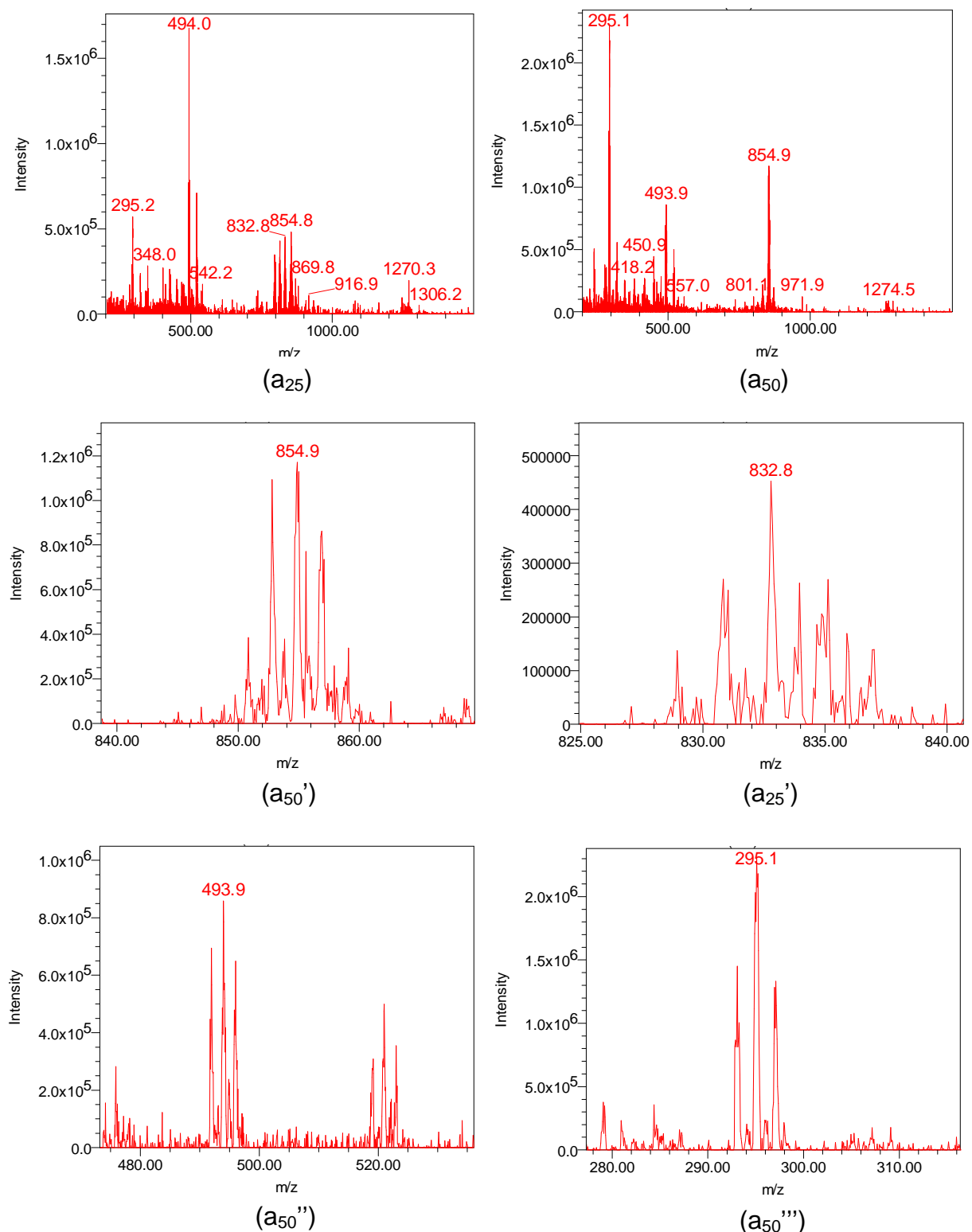
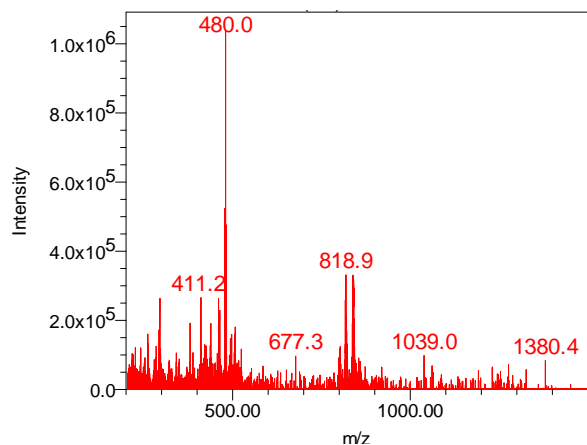
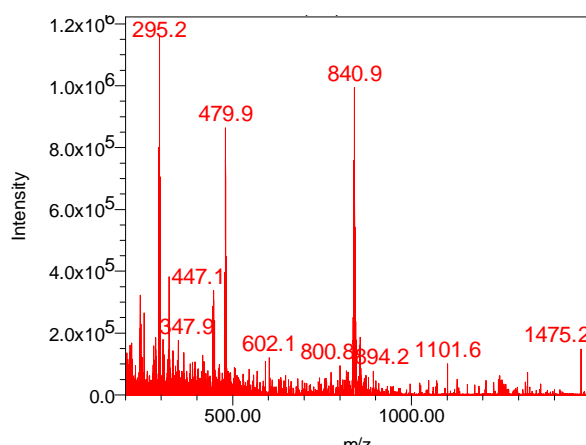


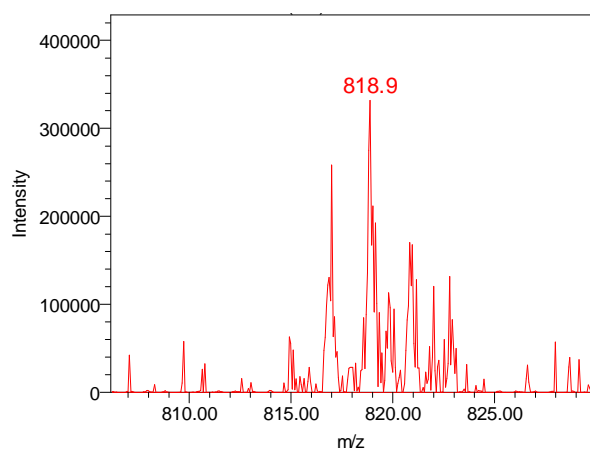
Figura 54. Espectros de massas na região do quinto pico cromatográfico ($t_R = 13,6$ min): (a₂₅, a₅₀) espectro de massas; (a_{25'}, a_{50'}) ampliação do íon pseudo-molecular; (a_{50''}, a_{50'''}) ampliação do íon fragmento. Dados: a₂₅ = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 V e a₅₀ = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V. [M+H]⁺: m/z 832,8; [M+Na]⁺: m/z 854,9.



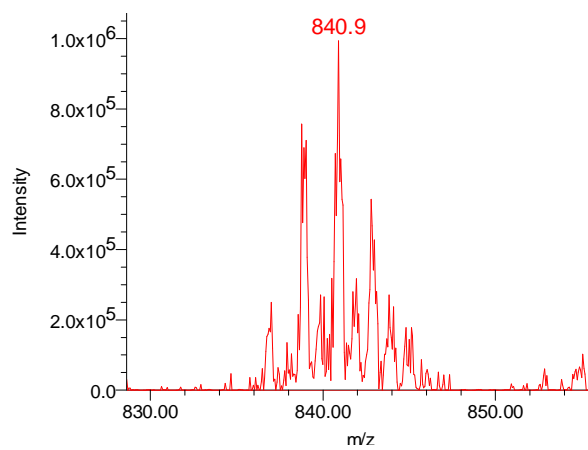
(a₂₅)



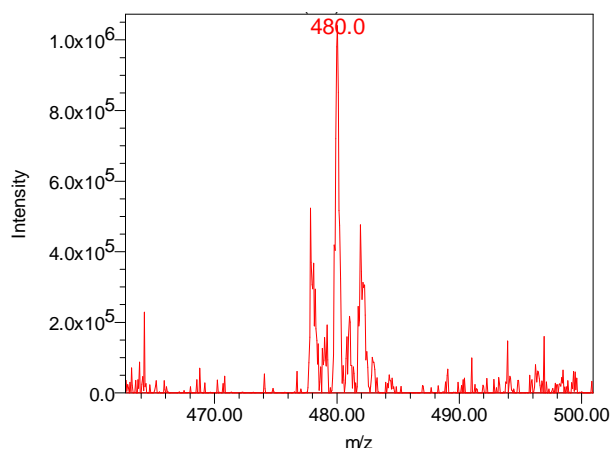
(a₅₀)



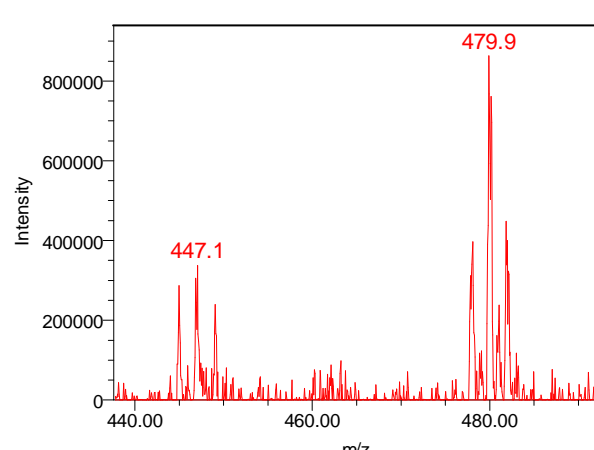
(a₂₅')



(a₅₀')



(a₂₅'')



(a₅₀'')

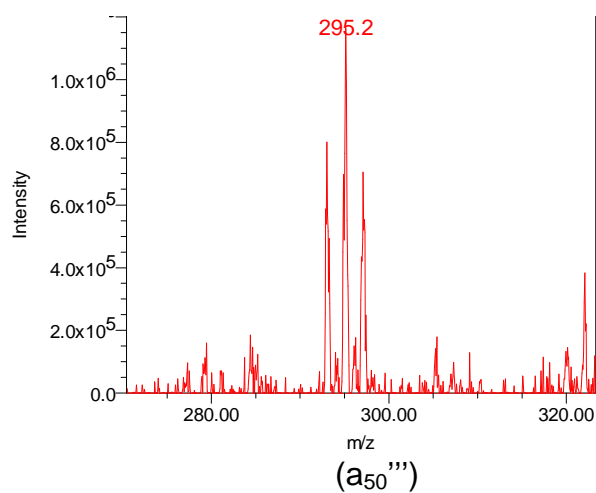


Figura 55. Espectros de massas na região do sexto pico cromatográfico ($t_R = 14,1$ min): (a_{25} , a_{50}) espectro de massas; (a_{25}' , a_{50}') ampliação do íon pseudo-molecular; (a_{25}'' , a_{50}'' , a_{50}''') ampliação do íon fragmento. Dados: a_{25} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 V e a_{50} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V. $[M+H]^+$: m/z 818,9; $[M+Na]^+$: m/z 840,9.

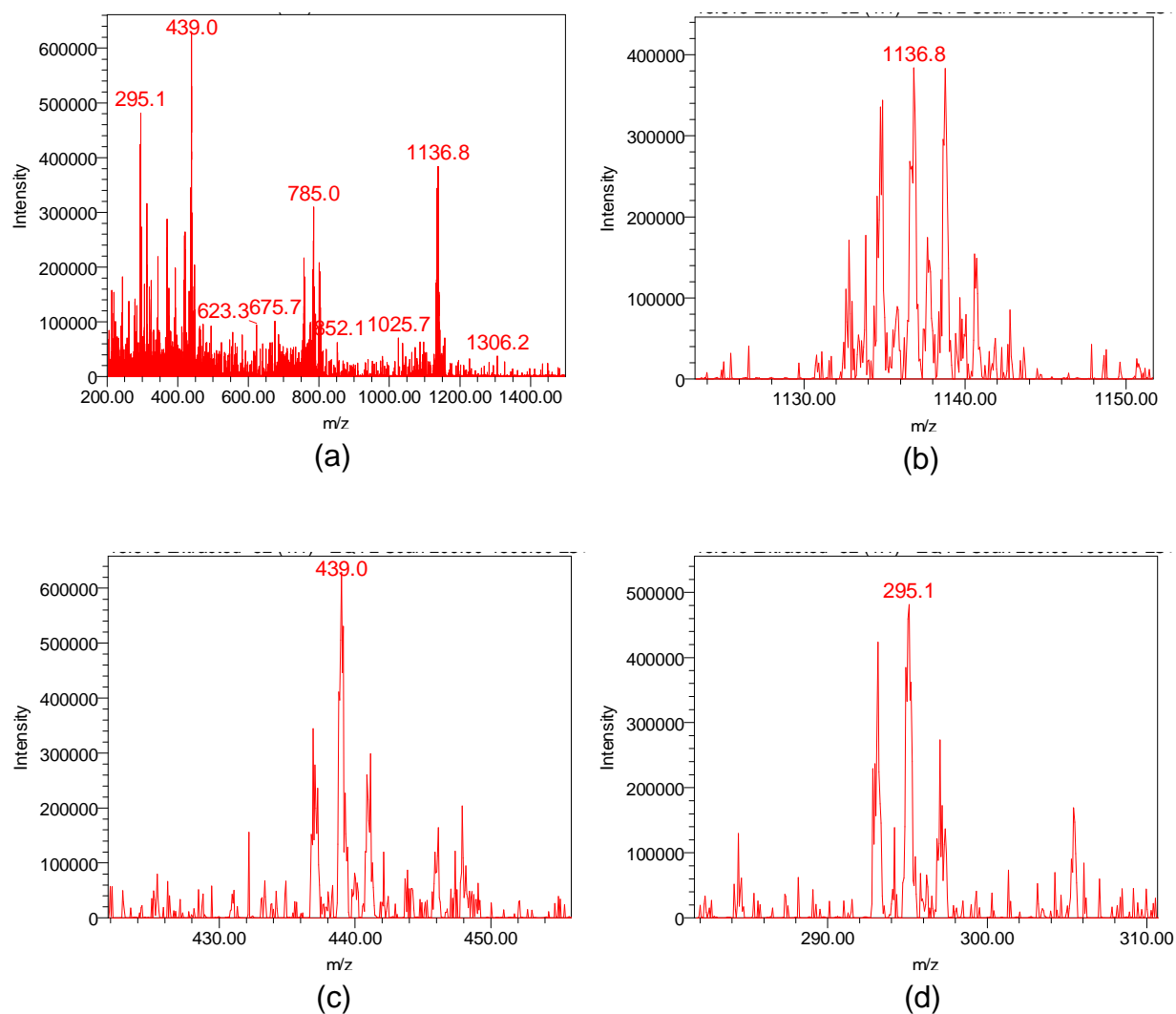


Figura 56. Espectros de massas na região do sétimo pico cromatográfico ($t_R = 15,1$ min): (a) espectro de massas; (b) ampliação do íon pseudo-molecular; (c, d) ampliação do íon fragmento. Condições: cone de voltagem de ionização do massas de 50 V.

Já a fração BA07ES-52-MeOH 100% apresentou cinco dos sete compostos presentes na fração BA07ES-52-8:2. Isto pôde ser confirmado através da análise dos cromatogramas, absorções no UV e espectros de massas descritos nas **Figuras 57, 58, 59, 60, 61, 62 e 63 (pág. 108-115)**.

Estas análises confirmaram que a pré-purificação da fração AcOEt é desnecessária, pois a maioria dos compostos presentes na primeira fração (BA07ES-52-8:2) foram encontrados na fração intermediária (BA07ES-52-1:1) e na última (BA07ES-52-MeOH 100%). Isto foi observado para todas as frações oriundas da fração AcOEt dos 14 exemplares de esponjas estudadas (**Tabela 9, pág. 127**).

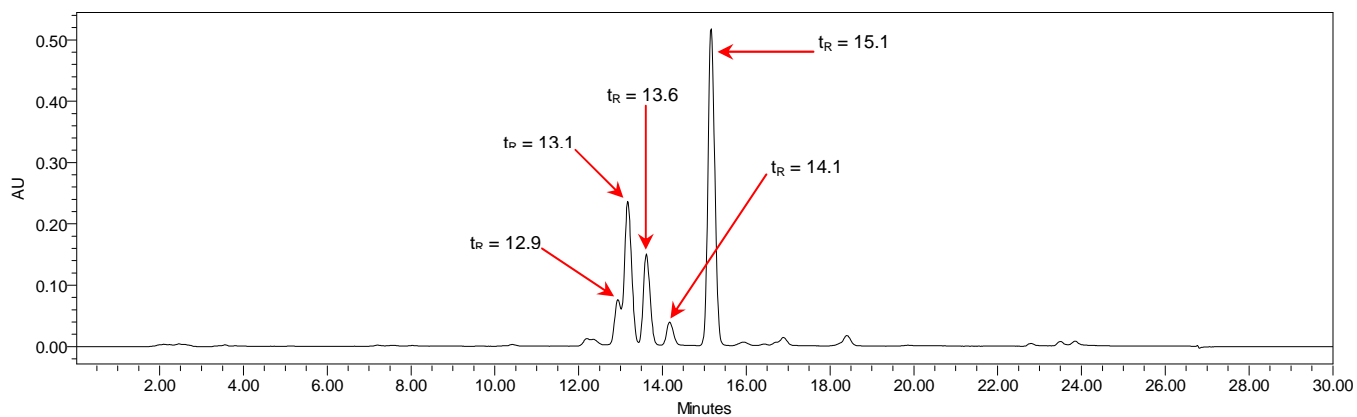
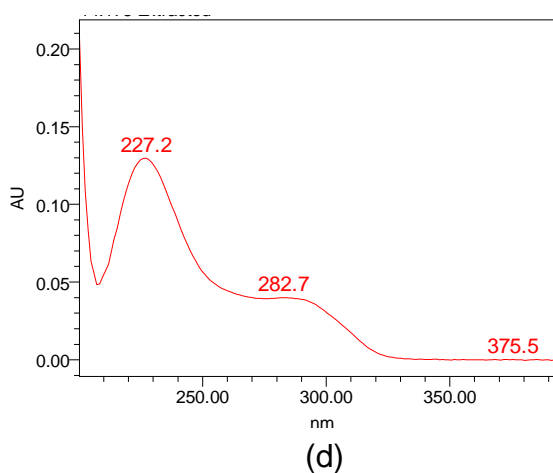
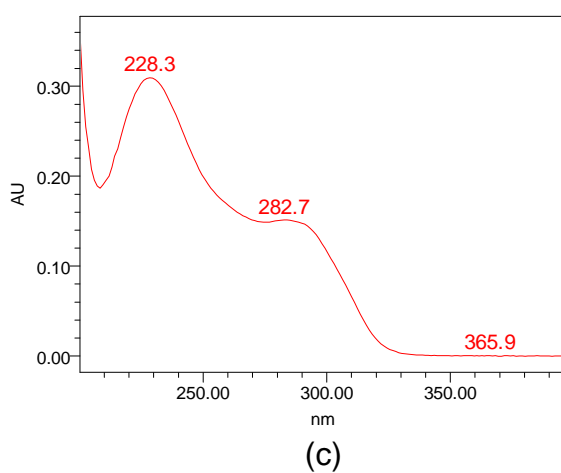
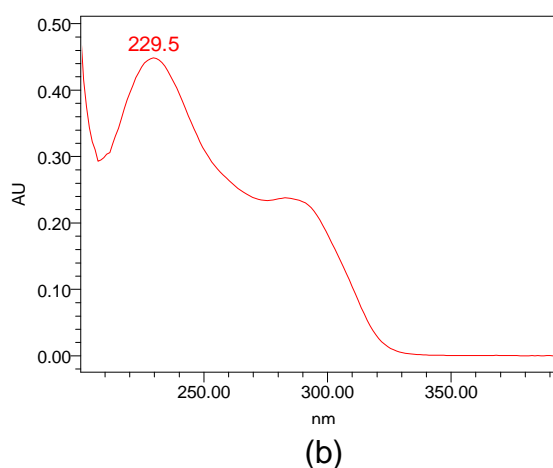
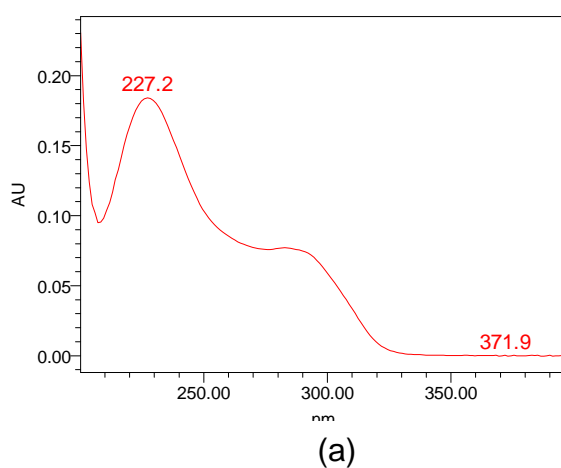
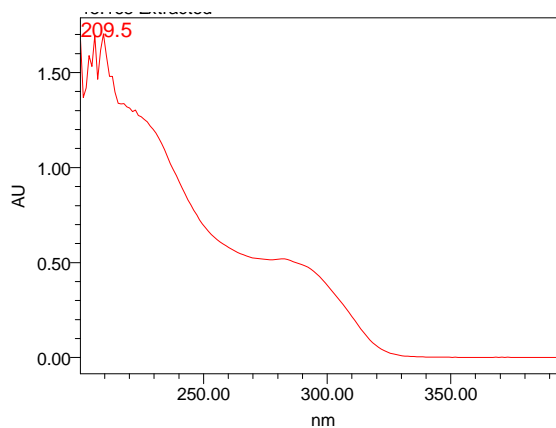


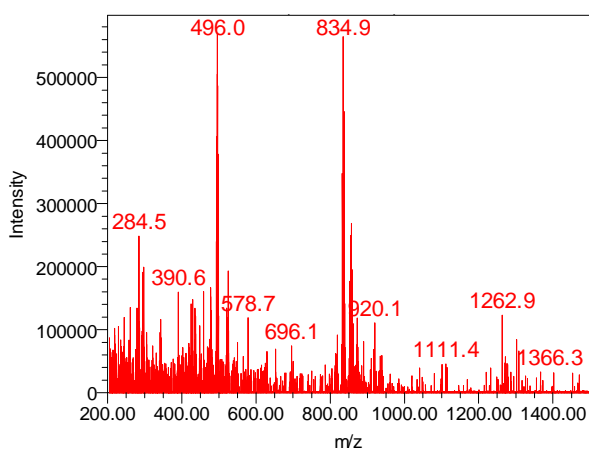
Figura 57. Cromatograma com detecção UV ($\lambda = 280\text{nm}$) da amostra BA07ES-52-MeOH 100%.



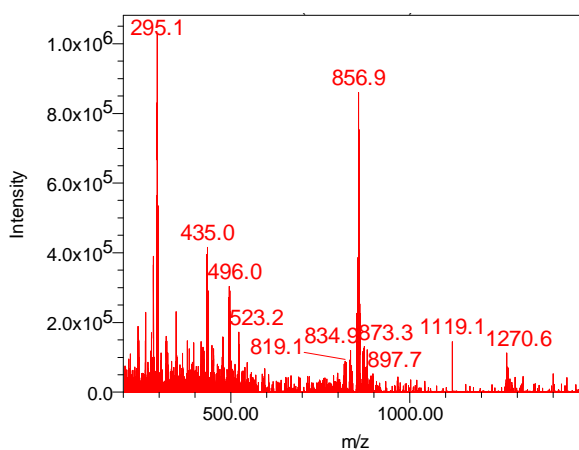


(e)

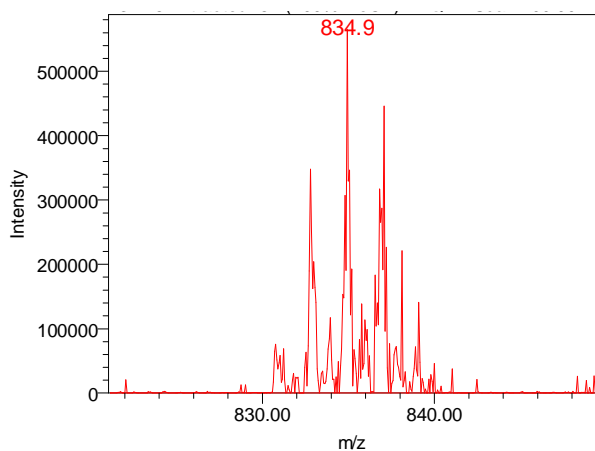
Figura 58. Espectros UV na região dos picos cromatográficos da fração BA07ES-92-8:2: (a) pico com t_R de 12,9 min; (b) pico com t_R de 13,1 min; (c) pico com t_R de 13,6 min; (d) pico com t_R de 14,1 min; (e) pico com t_R de 15,1 min;



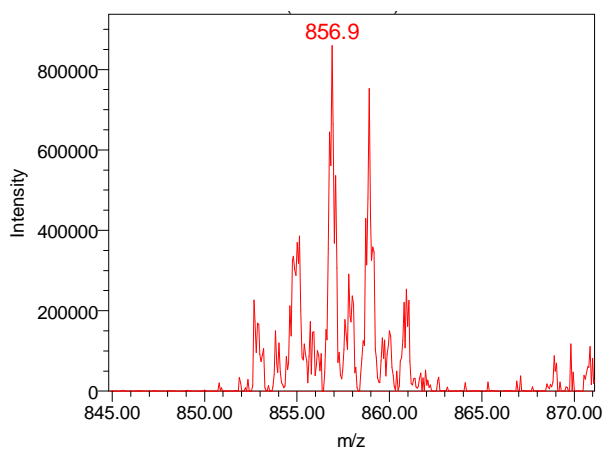
(a₂₅)



(a₅₀)



(a₂₅')



(a₅₀')

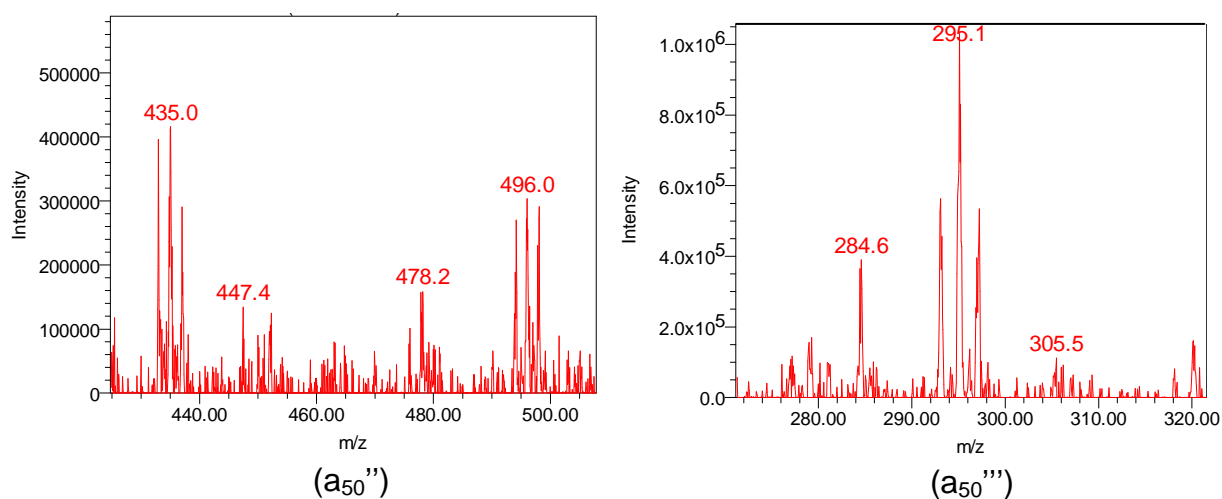


Figura 59. Espectros de massas na região do primeiro pico cromatográfico ($t_R = 12,9$ min): (a_{25} , a_{50}) espectro de massas; (a_{25}' , a_{50}') ampliação do íon pseudo-molecular; (a_{50}'' , a_{50}''') ampliação do íon fragmento Dados: a_{25} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 V e a_{50} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V. $[M+H]^+$: m/z 834,9; $[M+Na]^+$: m/z 856,9.

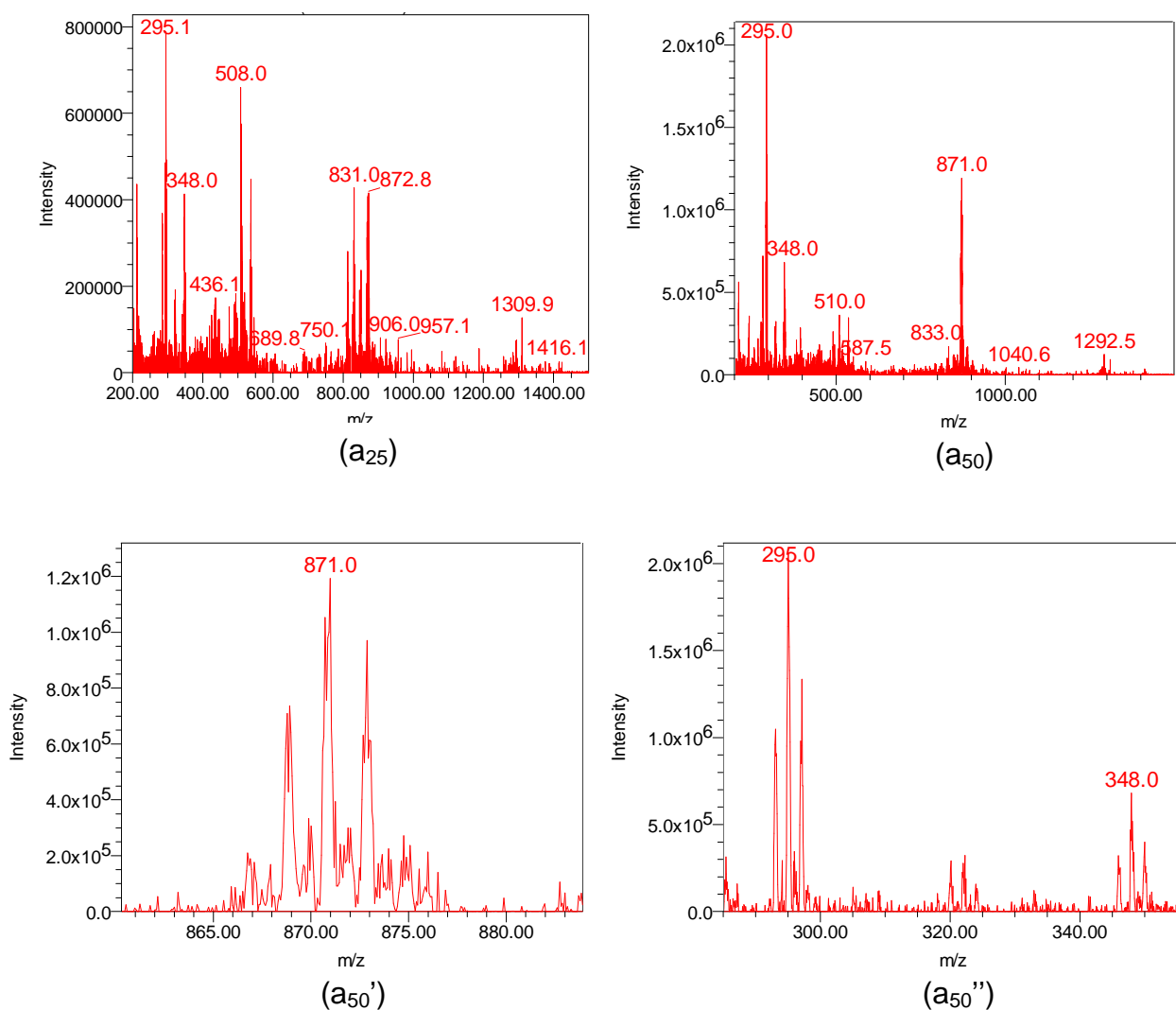


Figura 60. Espectros de massas na região do segundo pico cromatográfico ($t_R = 13,1$ min): (a₂₅, a₅₀) espectro de massas; (a_{50'}) ampliação do íon pseudo-molecular; (a_{50''}) ampliação do íon fragmento. Dados: a₂₅ = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 V e a₅₀ = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V.

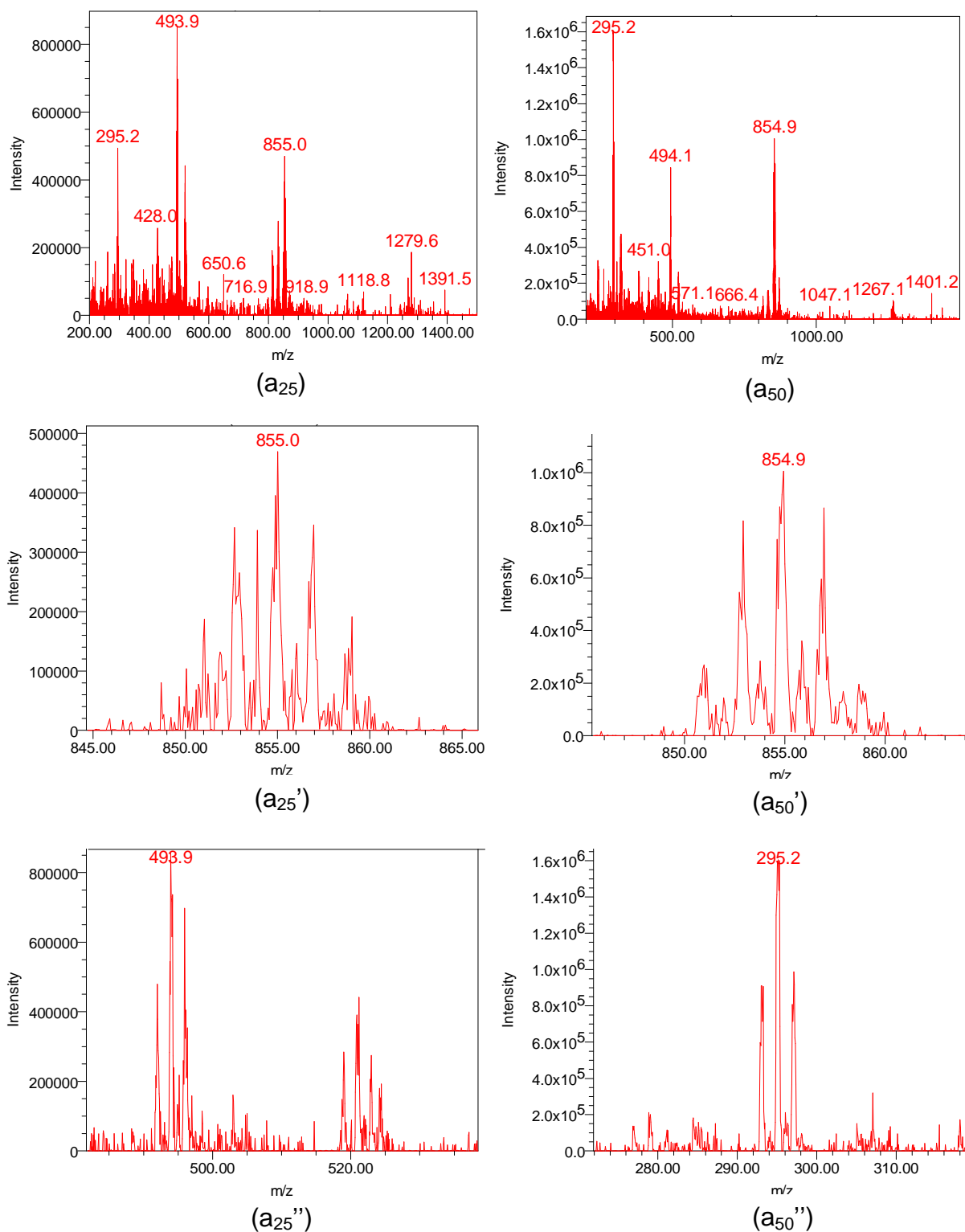


Figura 61. Espectros de massas na região do terceiro pico cromatográfico ($t_R = 13,6$ min): (a₂₅, a₅₀) espectro de massas; (a₂₅', a₅₀') ampliação do íon pseudo-molecular; (a₂₅'', a₅₀'') ampliação do íon fragmento. Dados: a₂₅ = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 V e a₅₀ = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V.

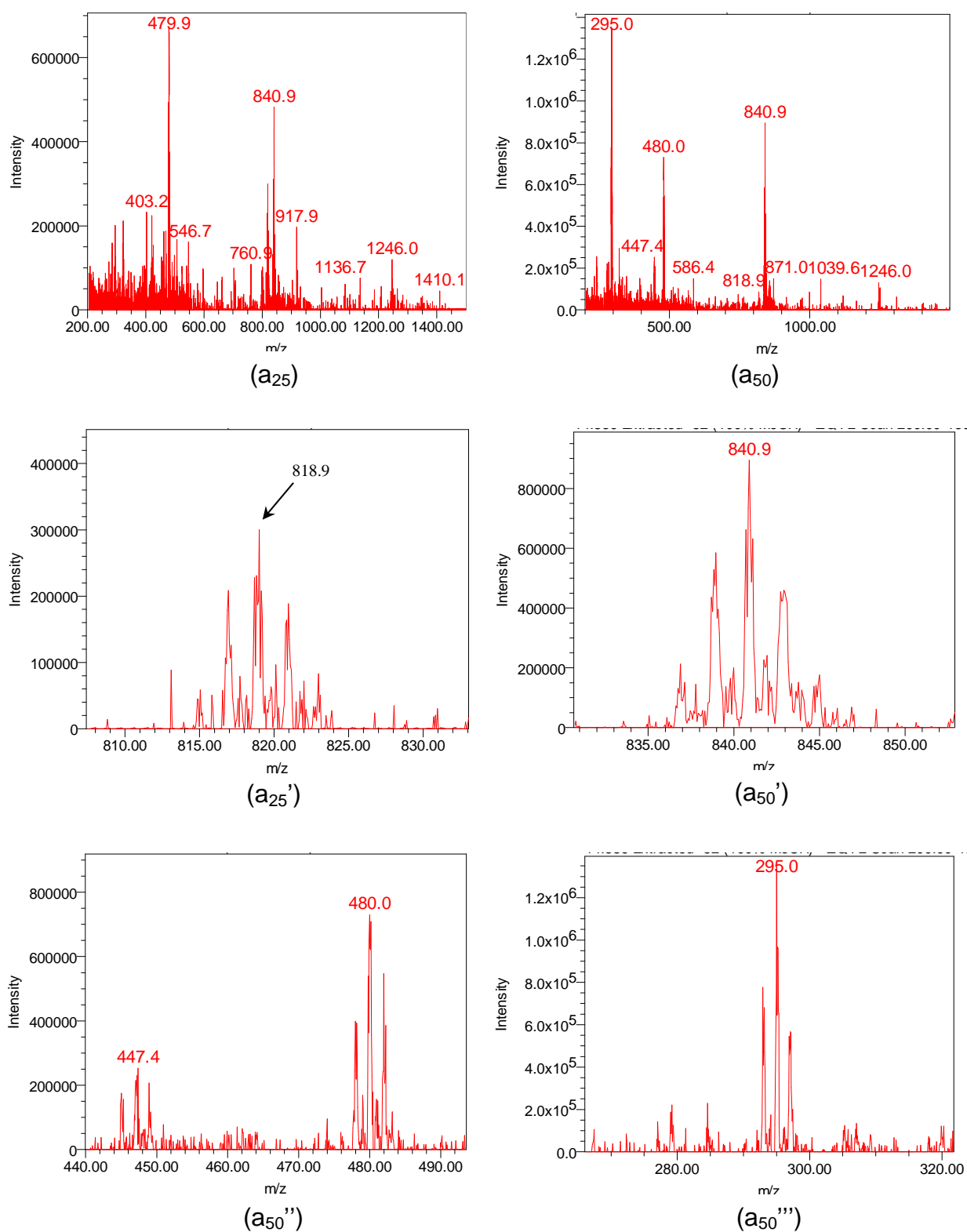
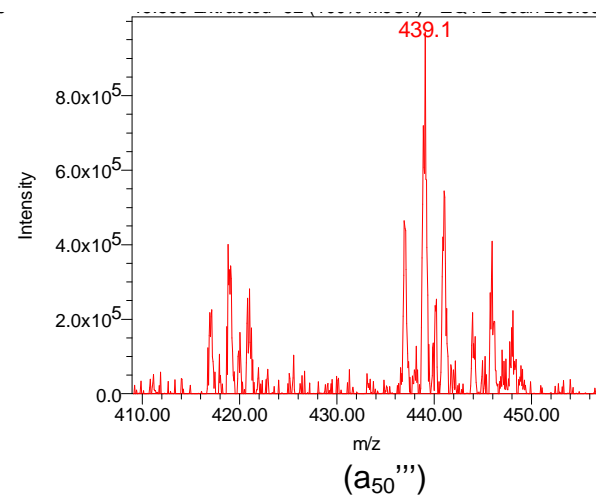
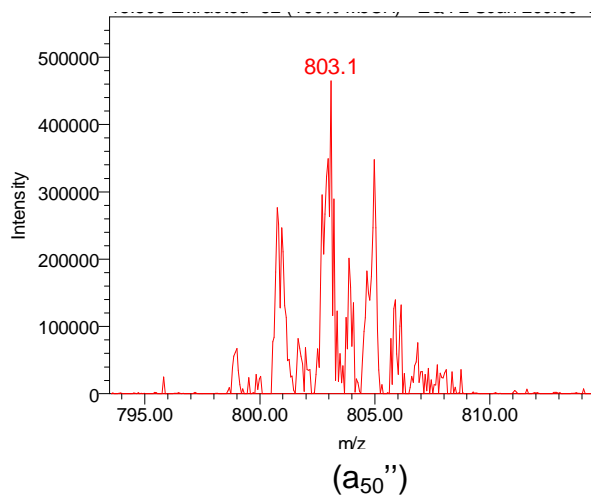
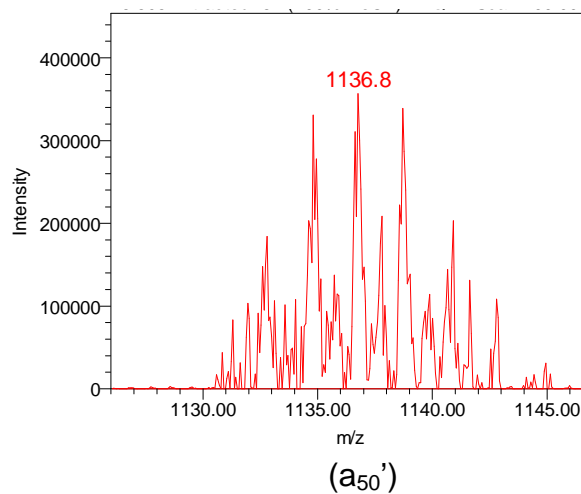
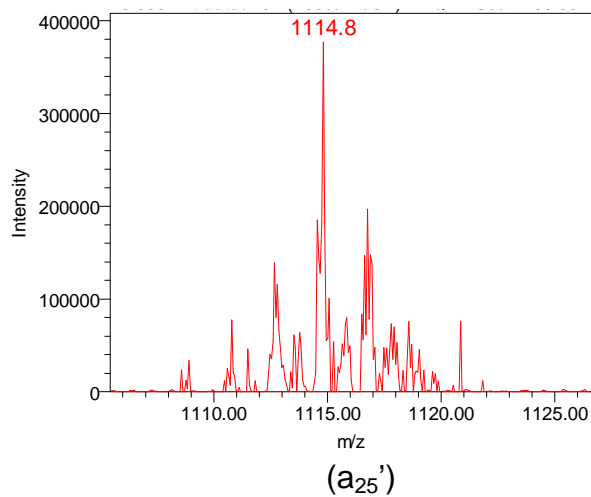
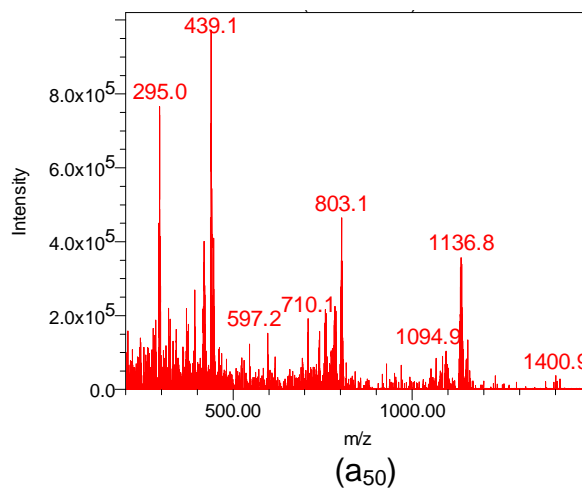
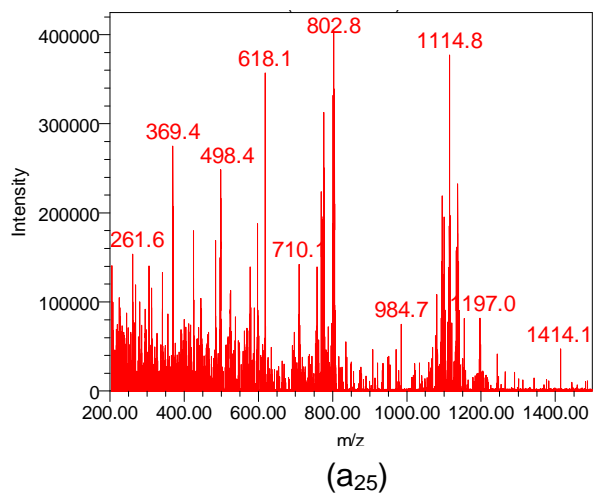


Figura 62. Espectros de massas na região do quarto pico cromatográfico ($t_R = 14,1$ min): (a₂₅, a₅₀) espectro de massas; (a₂₅, a₅₀) ampliação do íon pseudo-molecular; (a₅₀'', a₅₀'') ampliação do íon fragmento. Dados: a₂₅ = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 V e a₅₀ = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V: m/z 818,9; $[M+Na]^+$: m/z 840,9.



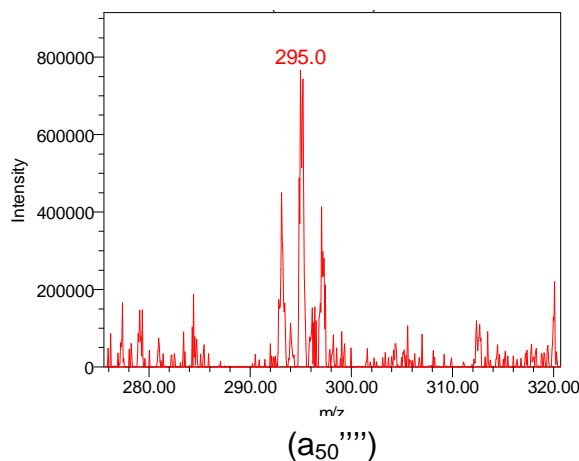


Figura 63. Espectros de massas na região do quinto pico cromatográfico ($t_R = 15,1$ min): (a_{25} , a_{50}) espectro de massas; (a_{25}' , a_{50}') ampliação do íon pseudo-molecular; (a_{50}'' , a_{50}''' , a_{50}'''') ampliação do íon fragmento. Dados: a_{25} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 V e a_{50} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V. $[M+H]^+$: m/z 1114,8; $[M+Na]^+$: m/z 1136,8.

Para as amostras BA07ES-92-8:2, BA07ES-92-1:1 e BA07ES-92-MeOH 100% (**Figuras 64, 65 e 66**), foram observados compostos com valores de t_R de 12,9; 13,1; 13,6; 14,1; 15,1 e 15,8 minutos, sendo que 12,9; 13,1; 13,6; 14,1 e 15,1 minutos são os mesmos compostos apresentados nas amostras BA07ES-52-8:2, 1:1 e MeOH 100% (**Figuras 21, 48 e 57**). Estes apresentam os mesmos t_R , bandas de absorção no UV e m/z do íon pseudo-molecular e dos íons fragmentos. Como os compostos presentes na fração BA07ES-92-8:2 também ocorrem nas outras duas frações (BA07ES-92-1:1 e BA07ES-92-MeOH 100%), com exceção de um ou outro composto serão apresentados as absorções no UV e os espectros de massas da primeira fração desta esponja (**Figuras 67, 68, 69, 70, 71, 72 e 73, pág. 116-125**), ou seja da fração BA07ES-92-8:2.

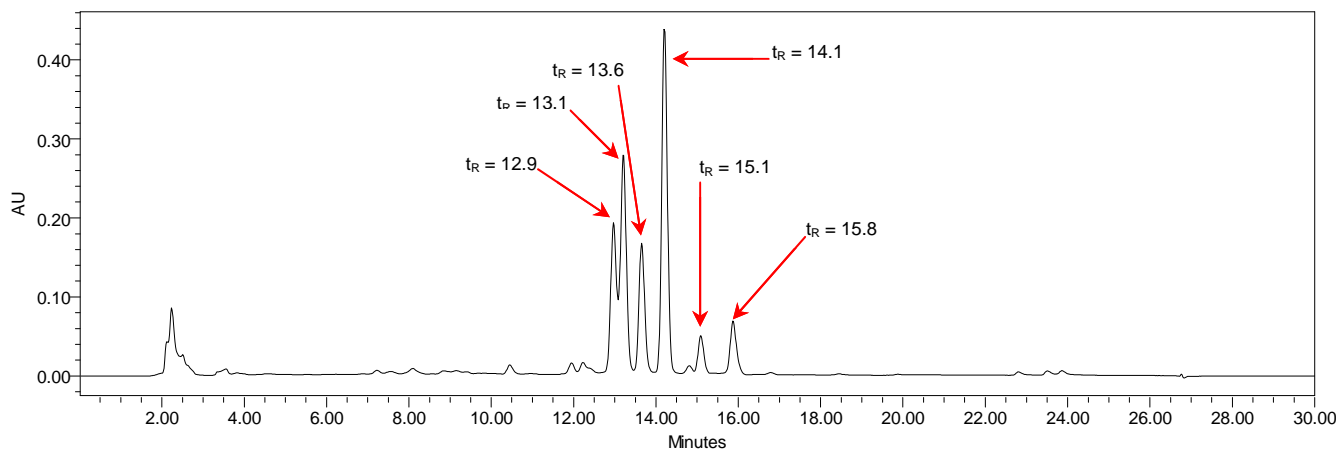


Figura 64. Cromatograma com detecção UV ($\lambda = 280\text{nm}$) da amostra BA07ES-92-1:1.

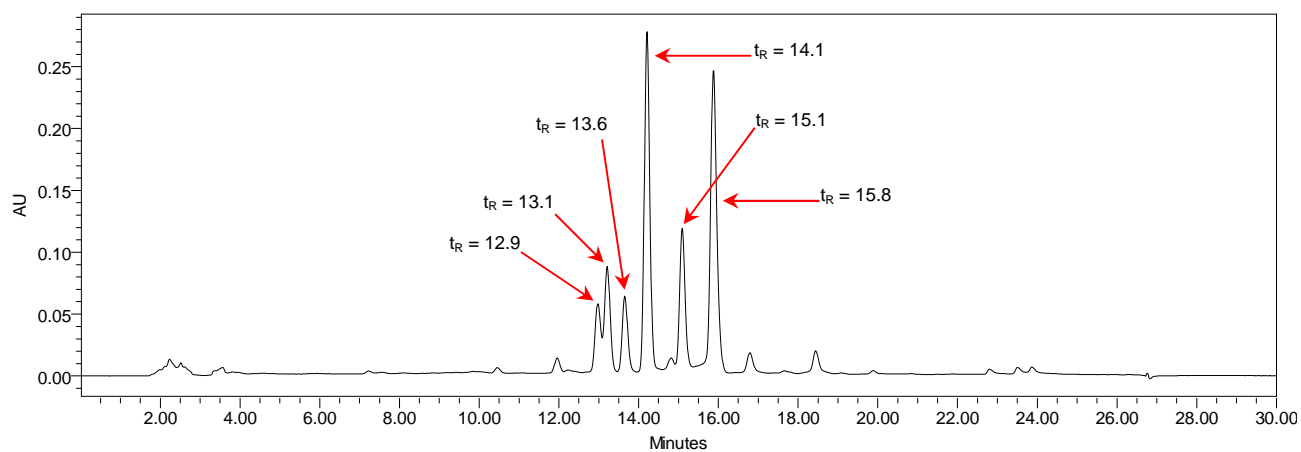


Figura 65. Cromatograma com detecção UV ($\lambda = 280\text{nm}$) da amostra BA07ES-92-MeOH 100%.

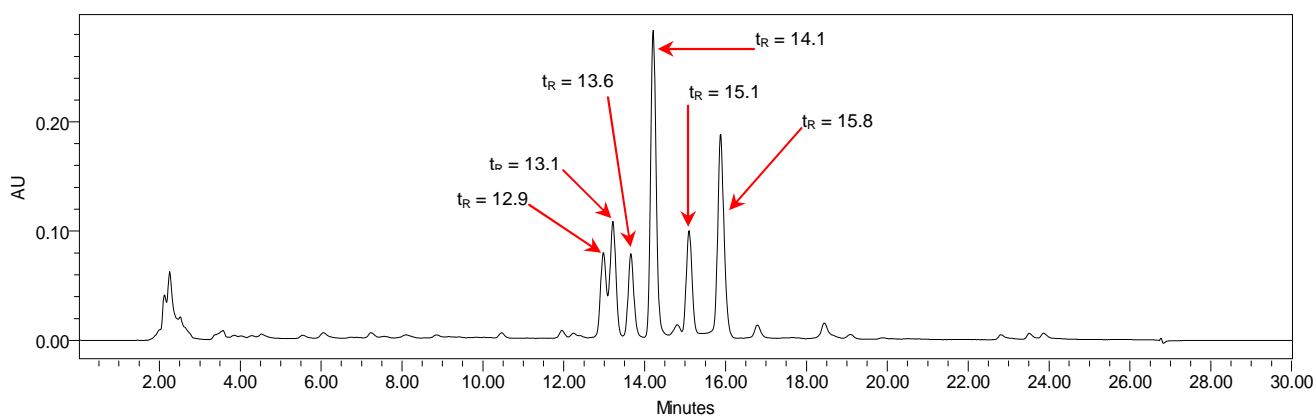


Figura 66. Cromatograma com detecção UV ($\lambda = 280\text{nm}$) da amostra BA07ES-92-8:2.

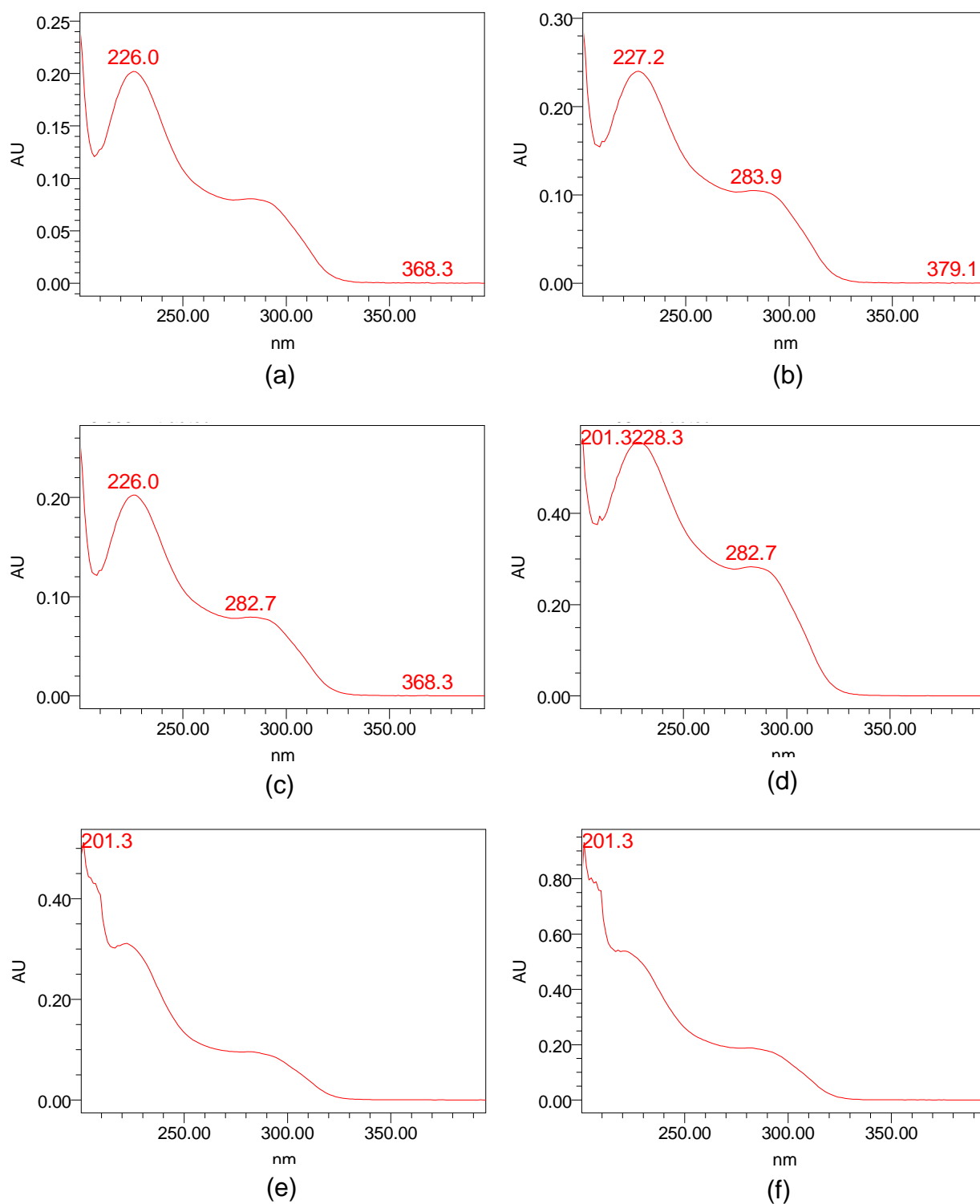
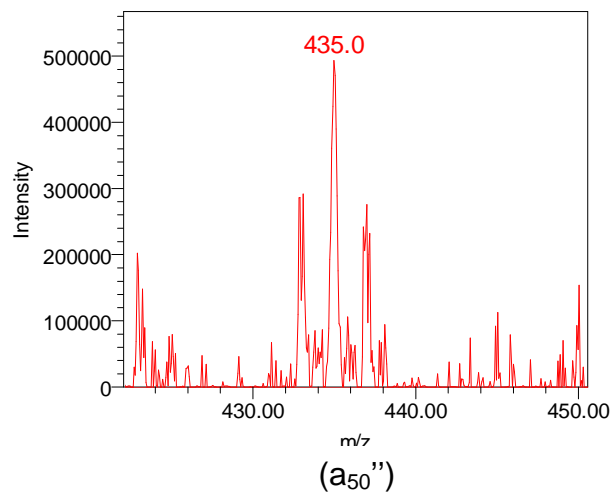
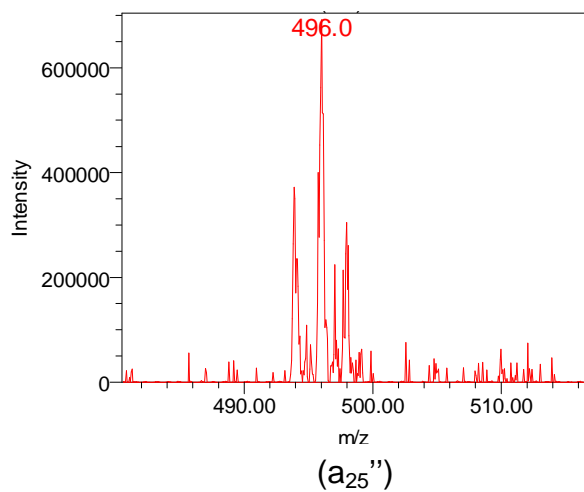
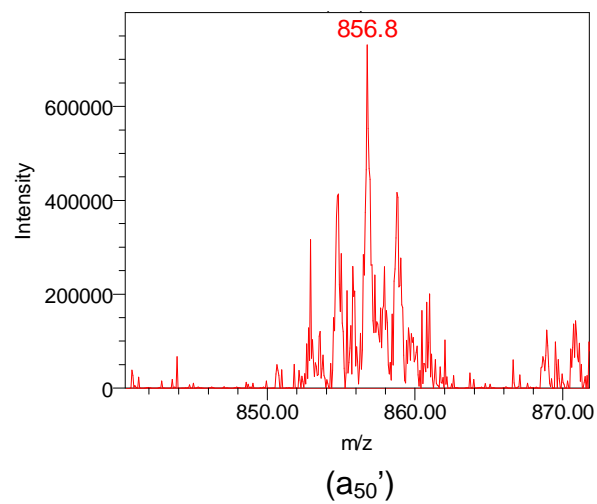
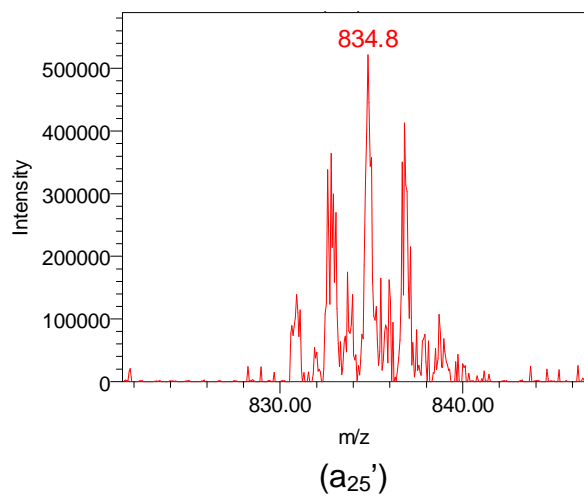
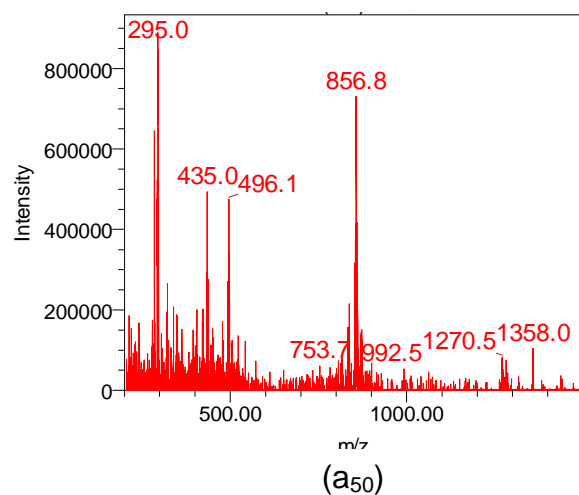
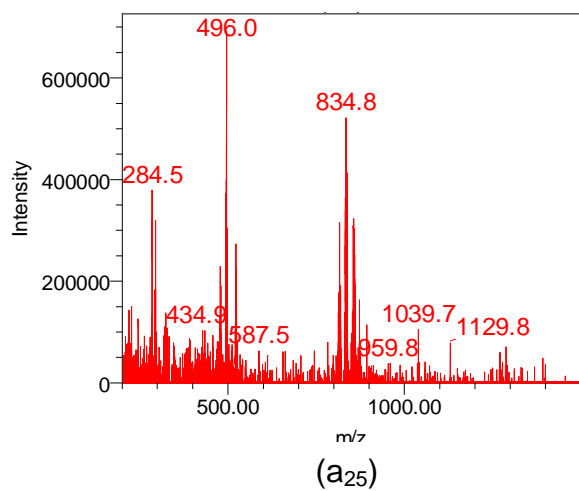


Figura 67. Espectros UV na região dos picos cromatográficos: (a) pico com t_R de 12,9 min; (b) pico com t_R de 13,1 min; (c) pico com t_R de 13,6 min; (d) pico com t_R de 14,1 min; (e) pico com t_R de 15,1 min; (f) pico com t_R de 15,8 min.



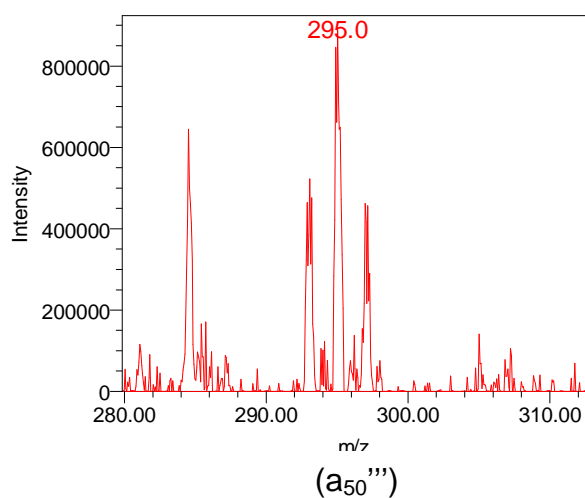


Figura 68. Espectros de massas na região do primeiro pico cromatográfico ($t_R = 12,9$ min): (a_{25} , a_{50}) espectro de massas; (a_{25}' , a_{50}') ampliação do íon pseudo-molecular; (a_{25}'' , a_{50}'' , a_{50}''') ampliação do íon fragmento. Dados: a_{25} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 V e a_{50} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V. $[M+H]^+$: m/z 834,8; $[M+Na]^+$: m/z 856,8.

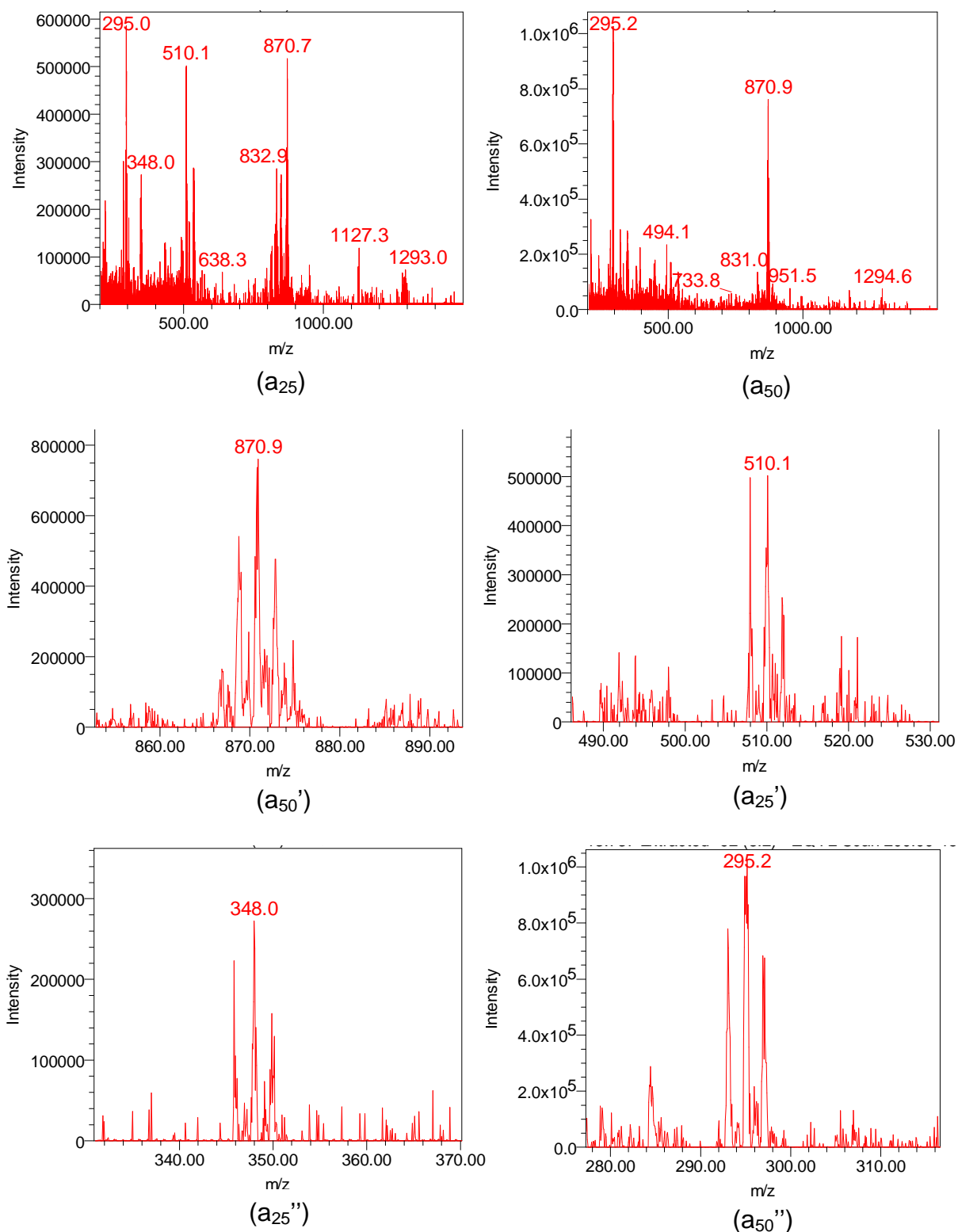


Figura 69. Espectros de massas na região do segundo pico cromatográfico ($t_R = 13,1$ min): (a₂₅, a₅₀) espectro de massas; (a₅₀') ampliação do íon pseudo-molecular; (a₂₅'', a₂₅'', a₅₀') ampliação do íon fragmento. Dados: a₂₅ = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 V e a₅₀ = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V.

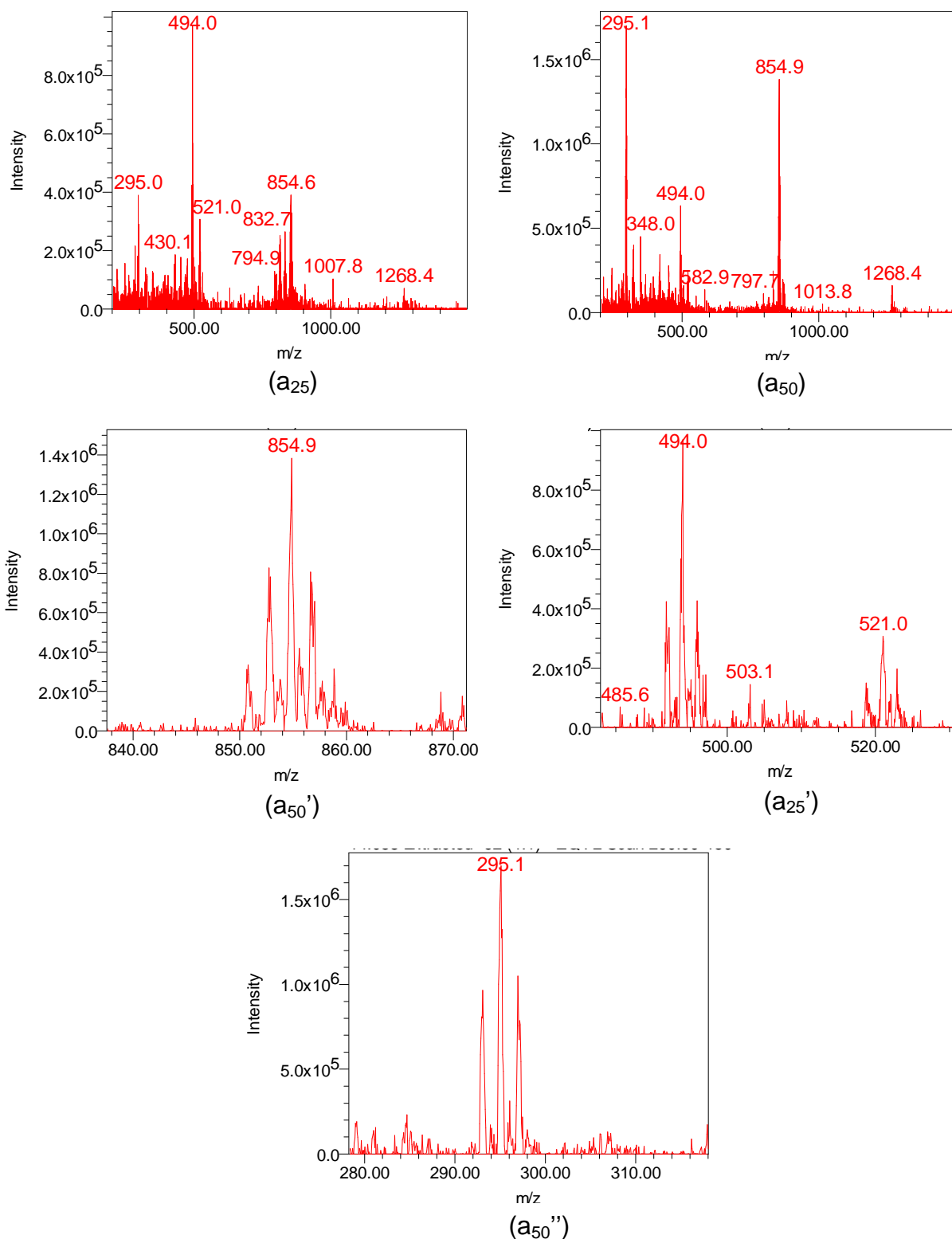
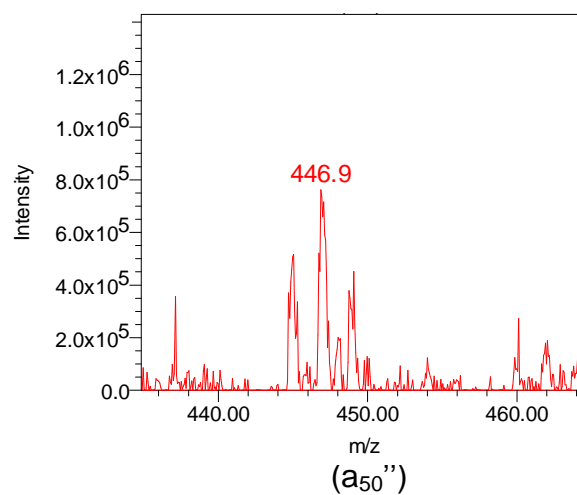
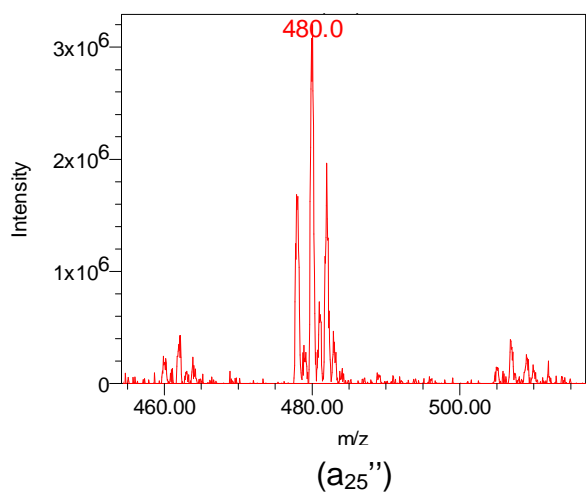
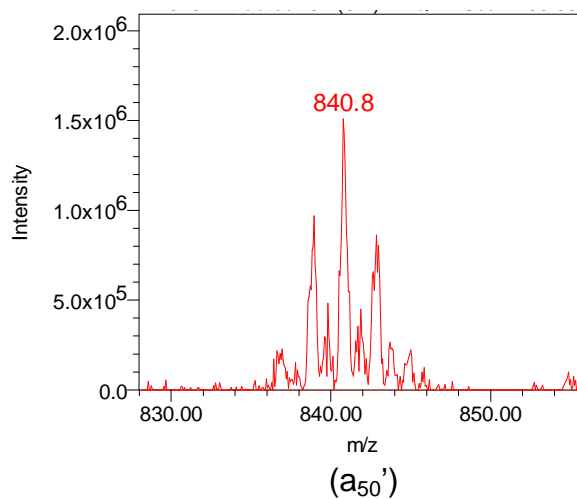
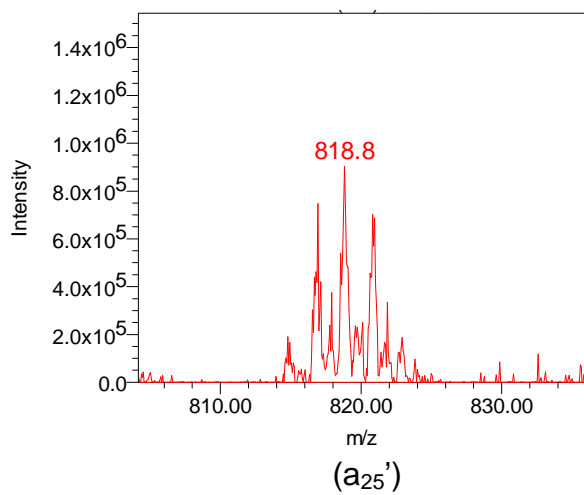
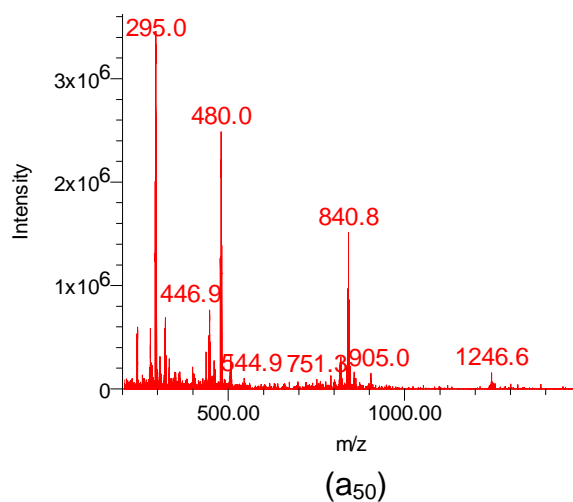
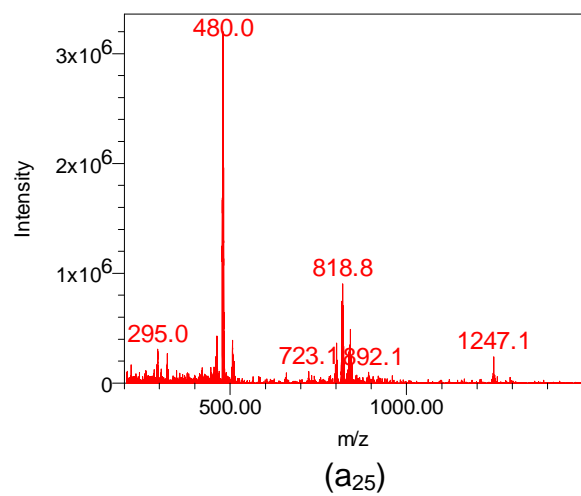


Figura 70. Espectros de massas na região do terceiro pico cromatográfico ($t_R = 13,6$ min): (a₂₅, a₅₀) espectro de massas; (a_{50'}) ampliação do íon pseudo-molecular; (a_{25'}, a_{50''}) ampliação do íon fragmento. Condições: Dados: a₂₅ = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas, 25 V e a₅₀ = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas, 50 V. [M+Na]⁺: m/z 854,7.



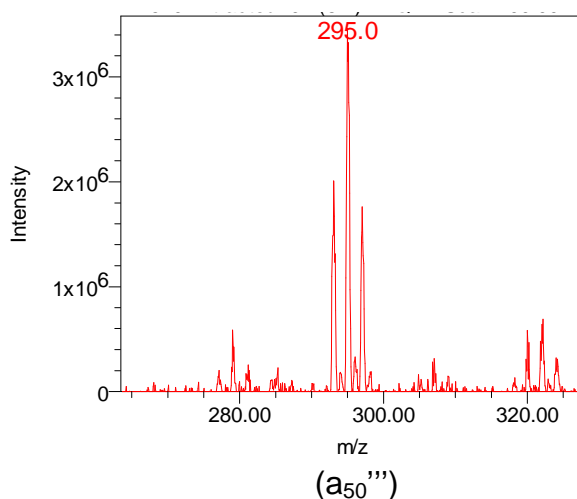
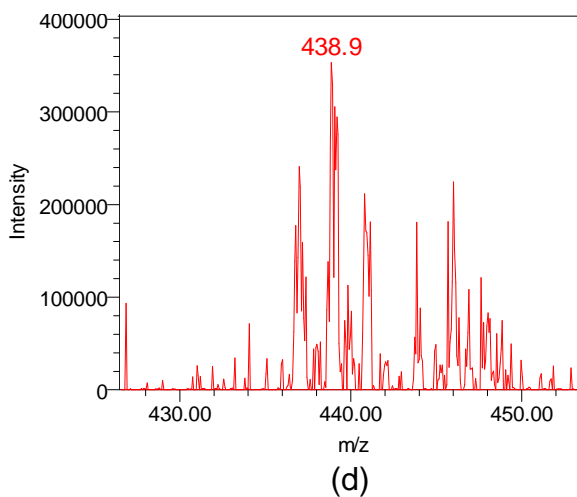
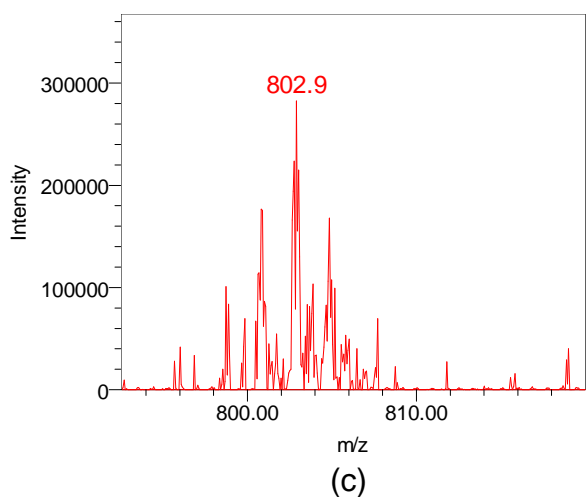
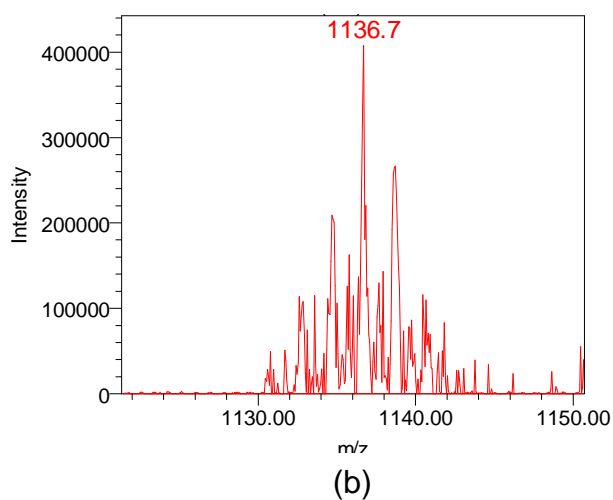
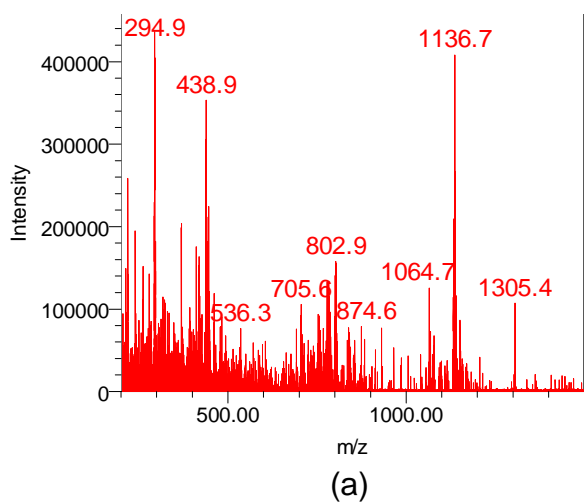


Figura 71. Espectros de massas na região do quarto pico cromatográfico ($t_R = 14,1$ min): (a_{25} , a_{50}) espectro de massas; (a_{25}' , a_{50}') ampliação do íon pseudo-molecular; (a_{25}'' , a_{50}'' , a_{50}''') ampliação do íon fragmento. Dados: a_{25} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas, 25 V e a_{50} = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas, 50 V. $[M+H]^+$: m/z 818,8; $[M+Na]^+$: m/z 840,8.



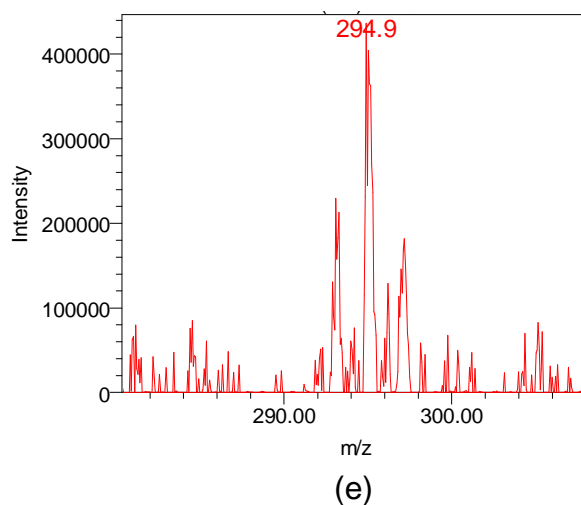


Figura 72. Espectros de massas na região do quinto pico cromatográfico ($t_R = 15,1$ min): (a) espectro de massas; (b) ampliação do íon pseudo-molecular; (c, d, e) ampliação do íon fragmento. Dados: cone de voltagem de ionização do massas 50 V. $[M+Na]^+$: m/z 1136,7.

Já o sexto composto com t_R de 15,8 minutos, apresentou um sinal no espectro de massas de m/z 1134,7 (**Figura 73**).

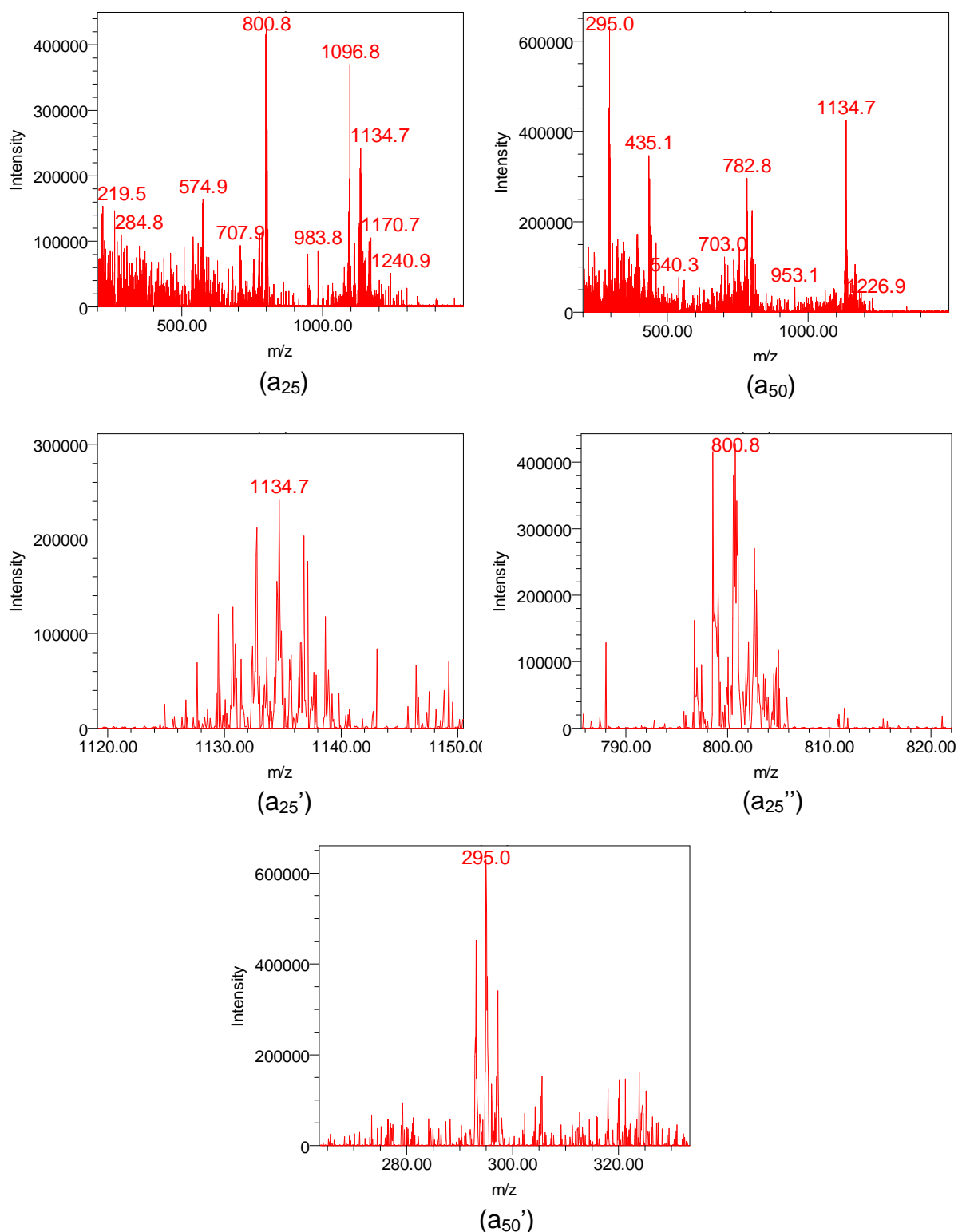


Figura 73. Espectros de massas na região do sexto pico cromatográfico ($t_R = 15,8$ min): (a₂₅, a₅₀) espectro de massas; (a₂₅') ampliação do íon pseudo-molecular; (a₂₅'', a₅₀') ampliação do íon fragmento. Dados: a₂₅ = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 25 V e a₅₀ = espectro observado no cone de voltagem de ionização do massas 50 V.

Como este composto também não apresentou perfil químico igual ao dos padrões e se esse valor for atribuído ao íon pseudo-molecular referente ao aduto de sódio, $[M+Na]^+$, então a possível estrutura para este composto é a 11-cetofistularina-3 (**Figura 74**). Esse composto foi anteriormente isolado a partir da esponja *Aplysina archeri* (Gunasekera, S. P, Cross, S. S., 1992) e também de *Aplysina fistularis* por uma ex-aluna de nosso grupo (Renata Cristina Gandolfi, resultados não publicados).

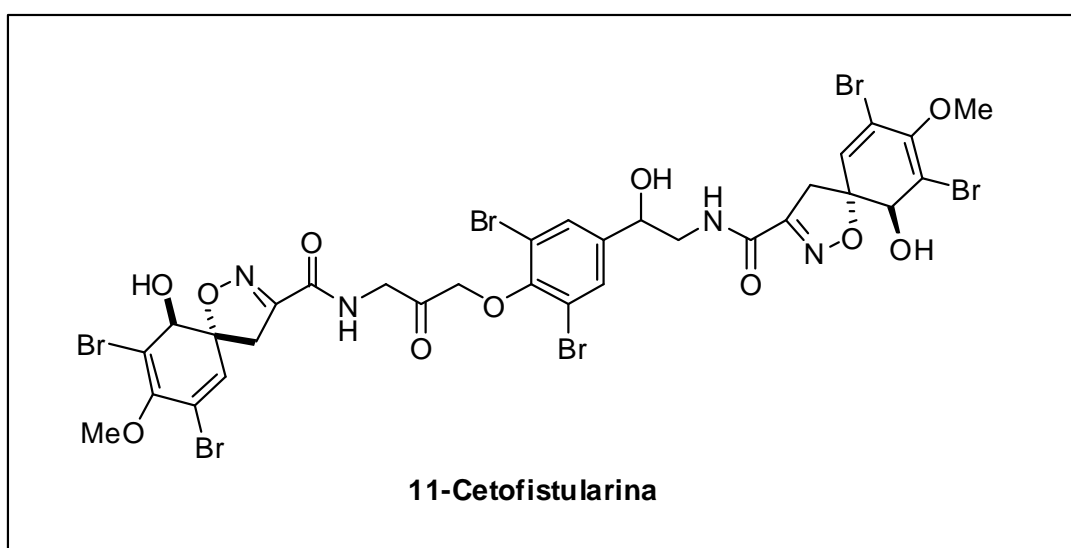


Figura 74. Possível estrutura para o composto com t_R 15,8 minutos.

Para este composto também foram observados íons fragmentos com valores de m/z de 800.8 e 295.0 (**Figura 73**), esses valores levaram a perda de 312 u.m.a para o fragmento de m/z 800.8 e 818 u.m.a para o fragmento de m/z 295.0. Porém conseguiu-se somente sugerir uma estrutura possível para o íon fragmento de m/z 295.0, o qual já foi descrito anteriormente. (**Figura 25, pág. 69**).

Os dados de t_R e valores de m/z obtidos do espectros de massas das outras frações oriundas dos outros 12 exemplares de esponjas estão descritos na **Tabela 9**.

Tabela 9 - Relação de todas as frações acetato de etila, suas massas (mg), t_R e os valores de m/z dos derivados da dibromotirosina.

Continua

íon mais abundante		872.9 (Na ⁺) ¹ 851.0 (H ⁺) ²	872.9 (Na ⁺) ¹ 851.0 (H ⁺) ²	856.9 (Na ⁺) ¹ 834.9 (H ⁺) ²	870.7 (Na ⁺) ¹ 848.7 (H ⁺) ²	855.0 (Na ⁺) ¹ 833.0 (H ⁺) ²	841.0 (Na ⁺) ¹ 818.9 (H ⁺) ²	1136.8 (Na ⁺) ¹ 1114.8 (H ⁺) ²	1134.7 (Na ⁺) ¹
t_R (minutos)		12.1	12.3	12.9	13.1	13.6	14.1	15.1	15.8
BA07ES-09 (8:2)	159,9 mg	-----	-----	X ^{*/**}	X ^{**}	X ^{(1)**}	X ^{**}	X ^{*/**}	-----
BA07ES-09 (1:1)	15,4 mg	-----	-----	X ^{*/**}	X ^{**}	X ^{(1)**}	X ^{*/**}	X ^{**}	-----
BA07ES-09 (MeOH 100%)	80,4 mg	-----	-----	X ^{(0)*/(0)**}	X ^{**}	X ^{(1)**}	X ^{**}	X ^{*/**}	-----
BA07ES-20 (8:2)	81,5 mg	-----	-----	X ^{(2)*/(1,2)**}	-----	X ^{(1)*/(1)**}	X ^{(1)**}	X ^{(1,2)*/(1)**}	-----
BA07ES-20 (1:1)	19,5 mg	-----	-----	X ^{(1,2)*/(1,2)**}	-----	X ^{(1)*/(1)**}	X ^{(1)**}	X ^{(1,2)*/(1)**}	-----
BA07ES-20 (MeOH 100%)	93,3 mg	-----	-----	X ^{(1,2)*/(1)**}	-----	X ^{(1)*/(1)**}	X ^{(1)*}	X ^{(1,2)*/(1)**}	-----
BA07ES-33 (8:2)	121,7 mg	-----	-----	X ^{(1,2)*/(1)**}	X ^{(1)*/(1)**}	X ^{(1)*/(1)**}	X ^{(2)*/(1,2)**}	X ^{(1)**}	X ^{**}
BA07ES-33 (1:1)	76,9 mg	-----	-----	X ^{(1,2)*/(2)**}	X ^{(1)*/(1)**}	X ^{(1)*/(1)**}	X ^{(2)*/(1,2)**}	X ^{(1)**}	X ^{**}
BA07ES-33 (MeOH 100%)	135,4 mg	-----	-----	X ^{(1,2)*/(1,2)**}	X ^{(1)*/(1)**}	X ^{(1)*/(1)**}	X ^{(1,2)*}	X ^{(1)**}	X ^{*/**}
BA07ES-52 (8:2)	68,6 mg	X ^{**}	X ^{**}	X ^{*/**}	X ^{*/**}	X ^{(1)*/(1)**}	X ^{*/**}	X ^{*/**}	-----
BA07ES-52 (1:1)	23,5 mg	X ^{*/**}	X ^{*/**}	X ^{*/**}	X ^{*/**}	X ^{(1)*/(1)**}	X ^{*/**}	X ^{*/**}	-----
BA07ES-52 (MeOH 100%)	124,3 mg	-----	-----	X ^{*/**}	X ^{*/**}	X ^{(1)*/(1)**}	X ^{*/**}	X ^{*/**}	-----
BA07ES-67 (8:2)	124,6 mg	-----	-----	X ^{(1,2)*/(1)**}	X ^{(1)**}	X ^{(1,2)*/(1)**}	X ^{(1,2)*/(1,2)**}	X ^{(1)*/(1,2)**}	-----
BA07ES-67 (1:1)	9,1 mg	X ^{(1)**}	X ^{(1)**}	X ^{(2)*/(1)**}	X ^{(1,2)*/(1)**}	X ^{(1)*/(1)**}	X ^{(1,2)*/(1,2)**}	X ^{(1)**}	-----
BA07ES-67 (MeOH 100%)	74,4 mg	-----	-----	X ^{(2)*/(1)**}	-----	X ^{(1)*}	X ^{(1,2)*/(1,2)**}	X ^{(1)**}	-----
BA07ES-70 (8:2)	96,8 mg	X ^{(1)**}	X ^{(1)**}	X ^{(1,2)*/(1)**}	X ^{(1,2)*/(1)**}	X ^{(1)**}	X ^{(1,2)*/(1,2)**}	X ^{(1,2)*/(1)**}	-----
BA07ES-70 (1:1)	8,7 mg	X ^{(1)**}	X ^{(1)**}	X ^{(1)*/(2)**}	X ^{(1,2)*/(1)**}	X ^{(1)*/(1)**}	X ^{(1,2)*/(1,2)**}	X ^{(1,2)*/(1)**}	-----
BA07ES-70 (MeOH 100%)	55,1 mg	-----	-----	X ^{(1,2)*/(1)**}	X ^{(1)*/(1)**}	X ^{(1)*/(1)**}	X ^{(1,2)*/(1,2)**}	X ^{(1)*/(1)**}	-----
BA07ES-72 (8:2)	2,0 mg	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
BA07ES-72 (1:1)	8,5 mg	X ^{(1)**}	X ^{(1)**}	X ^{(2)*/(1)**}	X ^{(1,2)*/(1)**}	X ^{(1)*/(1)**}	X ^{(1)*/(1)**}	X ^{(1)*/(1)**}	-----
BA07ES-72 (MeOH 100%)	23,4 mg	X ^{(1)**}	X ^{(1)**}	X ^{(1,2)*/(1)**}	X ^{(1)*/(1)**}	X ^{(1)*/(1)**}	X ^{(2)*/(1)**}	X ^{(1)*/(1)**}	-----
BA07ES-82 (8:2)	79,5 mg	-----	-----	X ^{(1,2)*/(1)**}	X ^{(1)**}	X ^{(1)*/(1)**}	X ^{(1)*/(1)**}	X ^{(1)*/(1)**}	-----
BA07ES-82 (1:1)	2,8 mg	-----	-----	X ^{(1,2)*/(1)**}	X ^{(1)**}	X ^{(1)*/(1)**}	X ^{(1)*/(1)**}	X ^{(1)**}	-----

Tabela 9 - Relação de todas as frações acetato de etila, suas massas (mg), t_R e os valores de m/z dos derivados da dibromotirosina.

									Conclusão
BA07ES-82 (MeOH 100%)	131,2 mg	-----	-----	$X^{(2)^*/(1,2)^{**}}$	$X^{(1)^{**}}$	$X^{(1)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1)^*/(1)^{**}}$	-----
BA07ES-85 (8:2)	162,7 mg	$X^{(1,2)^*/(1,2)^{**}}$	$X^{(1,2)^*/(1,2)^{**}}$	$X^{(1,2)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1)^{**}}$	$X^{(1)^{**}}$	X^{**}
BA07ES-85 (1:1)	7,9 mg	$X^{(1,2)^*/(1,2)^{**}}$	$X^{(1,2)^*/(1,2)^{**}}$	$X^{(2)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1,2)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1)^{**}}$	$X^{(1)^{**}}$	
BA07ES-85 (MeOH 100%)	25,3 mg	-----	-----	$X^{(1)^{**}}$	$X^{(1)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1)^*/(1)^{**}}$	-----	$X^{(1)^*/(1)^{**}}$	X^{***}
BA07ES-90 (8:2)	53,8 mg	-----	-----	$X^{(2)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1,2)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1,2)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1)^{**}}$	X^{***}
BA07ES-90 (1:1)	8,4 mg	$X^{(1,2)^*/(1,2)^{**}}$	$X^{(1,2)^*/(1,2)^{**}}$	$X^{(2)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1,2)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1,2)^*/(1)^{**}}$	$X^{(2)^*/(1)^{**}}$	-----	-----
BA07ES-90 (MeOH 100%)	20,2 mg	-----	-----	$X^{(1,2)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1,2)^*/(2)^{**}}$	$X^{(1)^*/(1)^{**}}$	$X^{(2)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1)^{**}}$	X^{***}
BA07ES-91 (8:2)	118,5 mg	-----	-----	$X^{(1,2)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1)^*/(1)^{**}}$	-----	-----	$X^{(1,2)^*/(1)^{**}}$	-----
BA07ES-91 (1:1)	0,8 mg	-----	-----	$X^{(2)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1,2)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1)^{**}}$	-----	$X^{(1,2)^*/(1)^{**}}$	-----
BA07ES-91 (MeOH 100%)	23,3 mg	-----	-----	$X^{(1)^{**}}$	$X^{(1)^{**}}$	-----	-----	$X^{(1,2)^*/(1)^{**}}$	-----
BA07ES-92 (8:2)	88,7 mg	-----	-----	$X^{(1,2)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1,2)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1,2)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1)^*/(1)^{**}}$	X^{***}
BA07ES-92 (1:1)	6,3 mg	-----	-----	$X^{(2)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1,2)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1,2)^*/(1)^{**}}$	$X^{(2)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1)^{**}}$	X^{**}
BA07ES-92 (MeOH 100%)	29,3 mg	-----	-----	$X^{(1,2)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1)^*/(1)^{**}}$	$X^{(2)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1)^*/(1)^{**}}$	X^{**}
BA07ES-94 (8:2)	156,5 mg	-----	-----	$X^{(1,2)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1)^{**}}$	$X^{(1,2)^*/(1)^{**}}$	X^{**}
BA07ES-94 (1:1)	3,0 mg	-----	-----	$X^{(1,2)^*/(1,2)^{**}}$	$X^{(1,2)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1)^*/(1)^{**}}$	X^{***}
BA07ES-94 (MeOH 100%)	22,4 mg	-----	-----	$X^{(1)^{**}}$	$X^{(1)^*/(1)^{**}}$	-----	-----	$X^{(1)^*/(1)^{**}}$	X^{***}
BA07ES-108 (8:2)	185,0 mg	-----	-----	$X^{(1,2)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1)^{**}}$	$X^{(1)^{**}}$	X^{***}
BA07ES-108 (1:1)	4,8 mg	$X^{(1,2)^*/(1,2)^{**}}$	-----	$X^{(2)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1,2)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1)^{**}}$	X^{**}
BA07ES-108 (MeOH 100%)	28,6 mg	-----	-----	$X^{(1,2)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1)^*/(1)^{**}}$	$X^{(1)^{**}}$	$X^{(1)^*/(1)^{**}}$	X^{***}

* voltagem do cone de ionização 25 V; ** voltagem do cone de ionização 50 V

¹ [M+Na]⁺; ² [M+H]⁺;

Obs: frações oriundas da mesma esponja estão mesma cor na tabela.

Pode-se observar que os 14 exemplares de esponjas do gênero *Aplysina* apresentaram significativa similaridade química, pois praticamente todos os compostos observados nas frações oriundas da fração AcOEt foram observados em todas as amostras de esponjas. Isto comprova que estas esponjas apresentam um perfil químico muito semelhante o que confirma que estes metabólitos derivados da dibromotirosina podem auxiliar na identificação taxonômica dessas esponjas deste gênero, mas não podem ser considerados como marcadores taxonômicos devido à presença destes compostos em esponjas de outros gêneros e ordens (como discutido do **item 1.2.**).

5.6. Análise das 28 frações oriundas das frações aquosas

As 28 frações oriundas da fração aquosa foram analisadas em um sistema HPLC-PDA-MS(ESI) para avaliar a presença de derivados da dibromotirosina. A análise confirmou a presença de vários desses compostos em todas as frações analisadas.

Analisando o t_R e os valores das bandas de absorção dos compostos presentes em todas as frações, foram observados um perfil químico muito semelhante entre elas, indicando que essas esponjas do gênero *Aplysina* apresentam praticamente a mesma classe de metabólitos, os derivados da dibromotirosina.

Entretanto, apesar das amostras terem sido analisadas em um sistema HPLC-PDA-MS(ESI), os espectros de massas não apresentaram íons pseudo-moleculares que pudessem ser atribuídos aos picos cromatográficos de forma inequívoca, o que significa que as condições fixadas para as análises por MS(ESI) não foram adequadas para os compostos presentes nas frações aquosas, ou que

não foi possível a visualização adequada devido a pequena quantidade de metabólitos presentes nestas frações.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho descreveu o estudo do perfil químico de 14 espécimens de esponjas do gênero *Aplysina*, coletadas na Bahia de Todos os Santos, BA, no ano de 2007. O estudo utilizou-se da técnica hifenada, HPLC-PDA-MS(ESI) para a identificação de compostos já conhecidos. Foram otimizadas as condições de análise a serem empregadas, incluindo as condições cromatográficas e detecção por MS(ESI).

Os resultados obtidos demonstram claramente que as esponjas coletadas em regiões diferentes da Bahia de Todos os Santos apresentaram praticamente os mesmos metabólitos, ou seja, significativa similaridade química. Isto reforça o fato de que estes compostos, os derivados da dibromotirosina, podem ser utilizados como um parâmetro na identificação taxonômica dessas esponjas, mas não podem ser considerados como marcadores quimiotaxonômicos.

Também pôde-se confirmar que a utilização de ferramentas de desreplicação, ou seja, utilização de técnicas hifenadas [HPLC-PDA-MS(ESI)], busca na literatura (MarinLit) e utilização de padrões, permitiu com eficiência confirmar e/ou prever possíveis estruturas para os compostos presentes nas frações oriundas da fração AcOEt sem a necessidade de realizar o isolamento dos mesmos.

Para as amostras oriundas das frações aquosas seria necessário otimizar as condições de análise para se obter dados fidedignos os quais poderiam ser utilizados na busca de possíveis estruturas para os compostos presentes nessas frações. As análises permitiram apenas confirmar a presença desses derivados nas frações aquosas, através da análise das absorções típicas no espectro de UV.

O presente trabalho, portanto, apresenta uma contribuição muito importante nos estudos realizados com esponjas do gênero *Aplysina*, mostrando que estas contêm compostos derivados da dibromotirosina em seu metabolismo secundário. E que o perfil químico das espécies coletadas é indistinto. Ou seja, a classificação taxonômica em nível de espécie requer, necessariamente, a análise do esqueleto (espículas) das esponjas e possivelmente análises genômicas. Também, este é o primeiro trabalho sobre estudo do perfil químico dessas esponjas com a utilização de um sistema de desreplicação utilizando como técnica hifenada HPLC-PDA-MS(ESI).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMANN, B. L.; REGG, B. T.; COLOMBO, L.; STELLA, S.; COUTANT, J. E. Rapid analysis of antibiotic-containing mixtures from fermentation broths by using liquid chromatography electrospray ionization-mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight-mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 7, p. 1227-1237, 1996.

ACOSTA, AL.; RODRIGUEZ, AD. 11-Oxoaoerthionin: a cytotoxic antitumor bromotyrosine-derived alkaloid from the Caribbean marine sponge *Aplysina lacunose*. **Journal of Natural Products**, v. 55, p. 1007-1012, 1992.

ALVI, K. A.; PETERSON, J.; HOFMANN, B. Rapid identification of elaiophylin and geldanamycin in streptomyces fermentation broths using CPC coupled with a photodiode-array detector and LC-MS methodologies. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 80-84, 1995.

BRADSHAW, J.; BUTINA, D.; DUNN, A. J.; GREEN, R. H.; HAJEK, M.; JONES, M. M.; LINDON, J. C.; SIDEBOTTOM, P. J. A rapid and facile method for the dereplication of purified natural products. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1541-1544, 2001.

CARDELLINA, J. H.; MUNRO, M. H. G.; FULLER, R. W.; MANFREDI, K. P.; MCKEE, T. C.; TISCHLER, M.; BOKESCH, H. R.; GUSTAFSON, K. R.; BEUTLER, J. A.; BOYD, M. R. A chemical-screening strategy for the dereplication and prioritization of HIV-inhibitory aqueous natural-products extracts. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 7, p. 1123-1129, 1993.

CARNEY, J. R.; RINEHART, K. L. Biosynthesis of brominated tyrosine metabolites by *Aplysina fistularis*, **Journal of Natural Products** v. 58, n. 7, p. 971-985, 1995.

CHUNG, M. S.; KIM, N. C.; LONG, L.; SHAMON, L.; AHMAD, W. Y.; SAGRERO, N. L.; KARDONO, L. B. S.; KENNELLY, E. J.; PEZZUTO, J. M.; SOEJARTO, D. D.; KINGHORN, A. D. Dereplication of saccharide and polyol constituents of candidate sweet-tasting plants: Isolation of the sesquiterpene glycoside mukurozioside IIb as a sweet principle of *sapindus rarak*. **Phytochemical Analysis**, v. 8, n. 2, p. 49-54, 1997.

CIMINELLO, P.; FATTORUSSO, E.; FORINO, M.; MAGNO, S.; PANSINI, M. Chemistry of verongida sponges II. Constituents of Caribbean sponge *Aplysina Fistularis* forma *fulva*. **Journal of Natural Products**, v. 57, p. 705-712, 1994.

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

- CIMINIELLO, P.; FATTORUSSO, E.; MAGNO, S.; PANSINI, M. Chemistry of Verongida Sponges VI. Comparison of the Secondary Metabolic Composition of *Aplysina insularis* and *A. fulva*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 24, p. 105-107, 1996.
- COMPAGNONE, R. S.; AVILA, R.; SUÁREZ, A. I.; ABRAMS, O. V.; RANGEL, H. R.; ARVLO, F.; PIÑA, I. C.; MERENTES, E. 11-Deoxyfistularin-3, a new cytotoxic metabolite from the caribbean sponge *Aplysina fistularis insularis*. **Journal of Natural Products**, v. 62, 1443-1444, 1999.
- CONSTANT, H. L.; BEECHER, C. W. W. A method for the dereplication of natural product extracts using electrospray HPLC/MS. **Natural Product Letters**, v. 6, p. 193-196, 1995.
- DE LIRA, T. O.; BERLINCK, R. G. S.; NASCIMENTO, G. G. F.; HADJU, E. Further Dibromotyrosine-Derived Metabolites from the Marine Sponge *Aplysina caissara*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 7, p. 1233-1240, 2006.
- ERPENBECK, D.; VAN SOEST, R. W. M. Status and Perspective of Sponge Chemosystematics. **Marine Biotechnology**, v. 9, p. 2-19, 2007.
- GUNASEKERA, M.; GUNASEKERA S. P. Dihydroxyaerotherionin and aerophobin 1. Two new brominated tyrosine metabolites from deep water marine sponge *Verongula rigida*. **Journal of Natural Products**, v. 52, p. 753-756, 1989.
- GUNASEKERA, S. P.; CROSS, S.S. Fistularin-3 and ketofistularin-3. Feline leukemia virus active bromotyrosine metabolites from the marine sponge *Aplysina archeri*, **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 4, p. 509-512, 1992.
- HAJDU, E.; BERLINCK, R.G.S.; FREITAS, J.C. "Porifera". In: JOLY, C. A.; BICUDO, C. E. M. **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX**, 3: invertebrados marinhos. São Paulo: FAPESP, p. 19-31, 1999.
- HAO, E.; FROMONT, J.; JARDINE, D.; KARUSO, P. Natural products from sponges of the genus *Agelas*-on the trail of a [2+2]-photoaddition enzyme. **Molecules**, v. 6, p. 130-141, 2001.
- KELLY-BORGES, K. Sponges out of thier depth. **Nature**, v. 373, p. 284, 1995.
- KERNAN, M. R.; CAMBIE, R. C.; BERGQUIST, P. R. Chemistry, VII. 11, 19-dideoxyfistularin-3 and 11-hydroxyaerotherionin, bromotyrosine derivates from *Pseudoceratina durissima*. **Journal of Natural Products**, v. 53, p. 615-622, 1990.
- KREUTER, M.H.; ROBITZKI, A.; CHANG, S.; STEFFEN, R.; MICHAELINS, M.; KLJAJIC, Z. Production of the cytostatic agent aeropylsinin by the sponge *Verongia aerophoba* in *vitro* culture. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 101C, p. 183-187, 1992.

- LANG, G.; MAYHUDIN, N. A.; MITOVA, M. I.; SUN, L.; VAN DER SAR, S.; BLUNT, J. W.; COLE, A. L. J.; ELLIS, G.; LAATSCH, H.; MUNRO, M. H. G. Evolving trends in the dereplication of natural products extracts: new methodology for rapid, small-scale investigation of natural product extracts. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 1595-1599, 2008.
- LIRA, O. T.; BERLINCK, R. G. S.; NASCIMENTO, G. G. F.; HAJDU, E. Further dibromotyrosine-derived metabolites from the marine sponge *Aplysina caissara*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 7, p. 1233-1240, 2006.
- MOODY, K.; THOMSON, R.H.; FATTORUSSO, E.; MINALE, L.; SODANO, G. Aerothionin and homoaerothionin-two tetrabromo spirocyclohexadienylisoxazoles from Verongida sponges. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, p. 18-24, 1972.
- NIELSEN, K., F.; SMEDSGAARD, J. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardized liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. **Journal of Chromatography A**, v. 1002, p. 111-136, 2003.
- ÑUNEZ, C. V.; ALMEIDA, R. V. R.; GRANATO, A. C.; MARQUES, S. O.; SANTOS, K. O.; PEREIRA, F. R.; MACEDO, M. L.; FERREIRA, A. G.; HADJU, 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**, v. 36, p. 283-296, 2008.
- OLIVEIRA, M. F.; OLIVEIRA, J. H. H. L.; GALETTI, F. C. S.; SOUZA, A. O.; SILVA, C. L.; HAJDU, E.; PEIXINHO, S.; BERLINCK, R. G. S. Antimicrobial brominated metabolites from two species of marine sponges. **Planta Medica**, v. 72, p. 437-441, 2006.
- PEREIRA, F. R. Avaliação da variação do metabolismo secundário da esponjas marinha *Aplysina fulva* em função de sua distribuição geográfica. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
- ROGERS, E. W.; MOLINSKI, T. F. High polar spiroisoxazolines from the sponge *Aplysina fulva*. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 1191-1194, 2007.
- RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados**. 6. ed. São Paulo: Editora Roca, 1996. p. 72-93.
- SAEKI, B.M.; GRANATO, A.C.; BERLINCK, R.G.S.; MAGALHÃES, A.; SCHEFER A.B.; FERREIRA, A.G.; HAJDU, E. Two unprecedented dibromotyrosine-derived alkaloids from the brazilian endemic marine sponge *Aplysina caissara*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 796-799, 2002.
- SEDLOCK, D. M.; SUN, H. H.; SMITH, W. F.; KAWAOKA, K.; GILLUM, A. M.; COOPER, R. Rapid identification of teleocidins in fermentation broth using HPLC photodiode array and LC-MS methodology. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 45-52, 1992.

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

TATSIS, E. C.; BOEREN, S.; EXARCHOU, V.; TROGANIS, A. N.; VERVOORT J.; GEROTHANASSIS I. P. Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS. **Phytochemistry**, v. 68, p. 383-393, 2007.

TEEYAPANT, R.; WOERDENBAG, H.J.; KREIS, P.; HACKER, J.; WRAY, V.; WITTE, L. Antibiotic and cytotoxic activity of brominated compounds from the marine sponge *Verongia aerophoba*. **Z. Naturforsch.**, v. 48, p. 939-945, 1993.

TYMIAK, A. A.; RINEHART JUNIOR, K. L. Biosynthesis of dibromotyrosine-derived antimicrobial compounds by the marine sponge *Aplysina fistularis* (*Verongia aurea*), **Journal of the American Chemical Society**, v. 103, p. 6763-6765, 1981.

VAN SOEST, R. W. M.; ERPENBECK, D. Status and Perspective of Sponge Chemosystematics. **Marine Biotechnology**, v. 9, p.2-19, 2007.

VOGLER, B.; KLAIBER, I.; ROOS, G.; WALTER, C. U.; HILLER, W.; SANDOR, P.; KRAUS, W. Combination of LC-MS and LC-NMR as a tool for the structure determination of natural products. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 2, p. 175-178, 1998.

WOLF, D.; SIEMS, K. Burning the hay to find the needle-data mining strategies in natural product dereplication. **Chimia**, v. 61, n.6, p. 339-345, 2007.

ZHOU, S.; HAMBURGER, M. Application of liquid chromatography-atmospheric pressure ionization mass spectrometry in natural product analysis. Evaluation and optimization of electrospray and heated nebulizer interfaces. **Journal of Chromatography A**, v. 755, n. 2, p. 189-204, 1996.