UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

"Metabólitos Secundários Biologicamente Ativos Isolados de Esponjas Marinhas e do fungo *Beauveria felina* de Origem Marinha"

Simone Possedente de Lira

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

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

São Carlos-SP
2007

Dedico este trabalho aos meus pais Armando e Christina, aos meus irmãos Patrícia (*in memoriam*) e Maurício e ao meu marido Rogério.

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

A vocês, que estão ao meu lado sempre.

Volume 1

Sumário

Índice de Figuras.....	iii
Índice de Esquemas.....	v
Índice de Tabelas.....	vi
Lista de Símbolos e Abreviaturas.....	vii
Resumo.....	ix
Abstract.....	x
Agradecimentos.....	xi
 Capítulo 1- Introdução à Química de Produtos Naturais.....	 1
1.1. Produtos Naturais.....	1
1.2. Produtos Naturais Marinhos	2
1.3. Objetivos	8
Capítulo 2- Parte Experimental	10
2.1. Técnicas Espectroscópicas	10
2.1.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	10
2.1.2. Ultravioleta-Visível (UV-Vis)	10
2.1.3. Infravermelho (IV)	10
2.1.4. Espectrometria de Massas (EM)	11
2.1.5. Rotação Ótica $[\alpha]_D$	11
2.2. Técnicas Cromatográficas	11
2.2.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	11
2.2.2. Cromatografia em Coluna pré-empacotada	12
2.2.3. Cromatografia em Coluna	12
2.2.4. Cromatografia de baixa pressão em coluna do tipo Lobar	12
2.2.5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	12
2.2.6. Solventes	13
2.3. Protocolos dos bioensaios	13
2.3.1. Ensaios de inibição enzimática de Adenina Fosforribosil Transferase de <i>Leishmania tarentolae</i>	13
2.3.2. Ensaios de inibição na forma promastigota do protozoário <i>Leishmania chagasi</i>	14
2.3.3. Atividade antimicobacteriana <i>in vitro</i>	15
2.3.4. Atividade anti-proliferativa contra células tumorais humanas	16

Capítulo 3 Investigação de extratos de esponjas marinhas com atividade inibitória à enzima adenina fosforribosil transferase de <i>Leishmania tarentolae</i>	17
3.1. Introdução	17
3.1.1. Leishmanioses	17
3.1.2. Produtos naturais ativos contra <i>Leishmania</i> sp.	19
3.2. Parte experimental	24
3.2.1. Isolamento dos compostos químicos da esponja <i>Petromica ciocalyptoides</i>	24
3.2.2. Isolamento dos compostos químicos da esponja <i>Topsentia ophiraphidites</i>	32
3.2.3. Isolamento dos compostos químicos da esponja <i>Callyspongia</i> sp.	36
3.3. Resultados e Discussão	40
3.3.1. Estudo químico da esponja <i>Petromica ciocalyptoides</i>	41
3.3.2. Estudo químico da esponja <i>Topsentia ophiraphidites</i>	42
3.3.2.1. Determinação estrutural dos compostos PcS2d e PcS8e2, isolados da esponja <i>Petromica ciocalyptoides</i> , e To2e isolada da esponja <i>Topsentia ophiraphidites</i> .	43
3.3.4. Estudo químico da esponja do gênero <i>Callyspongia</i> sp	51
3.3.5. Determinação estrutural dos compostos Ca6f2a, Ca6f2b e Ca6f3 isolados da esponja do gênero <i>Callyspongia</i> .	52
Capítulo 4- Isolamento de dois derivados cumarínicos da esponja marinha <i>Axinella cf. corrugata</i>	70
4.1. Introdução	70
4.2. Estudo da esponja <i>Axinella cf. corrugata</i>	73
4.3. Resultados e discussão	76
Capítulo 5- Estudo químico de dois extratos brutos de duas linhagens do fungo <i>Beauveria felina</i>, isolado da alga marinha <i>Caulerpa</i> sp.	85
5.1. Introdução	85
5.1.1. Produtos Naturais de Microrganismos	85
5.1.2. Produtos Naturais de fungos derivados de ambientes marinhos	87
5.1.3. Destruxinas	87
5.2. Estudo químico do extrato bruto do fungo <i>Beauveria felina</i> , isolado da alga marinha <i>Caulerpa</i> sp.	90
5.2.1. Estudo do extrato bruto do fungo <i>Beauveria felina</i> AcSS13E	90
5.2.2. Estudo do extrato bruto isolado do fungo <i>Beauveria felina</i> AcSS8E	95
5.3. Análise das estereoquímicas absolutas das amostras F13E6-P2 e F13E6-P3	100
5.4. Resultados e Discussão	103

5.4.1. Determinação estrutural dos compostos obtidos a partir dos extratos F13E e F8E do fungo <i>Beauveria felina</i>	105
5.5. Estudo das estereoquímicas absolutas das amostras F13E6-P2 e F13E6-P3.....	126
Capítulo 6- Conclusões	135
Capítulo 7- Referências Bibliográficas	142
7.1. Referências bibliográficas para o capítulo 1	142
7.2. Referências bibliográficas para o capítulo 2	145
7.3. Referências bibliográficas para o capítulo 3	145
7.4. Referências bibliográficas para o capítulo 4	148
7.5. Referências bibliográficas para o capítulo 5	149

Índice de Figuras

Figura 1.1. Número de produtos naturais marinhos isolados.	5
Figura 1.2. Distribuição de Produtos Naturais Marinhos por filos	6
Figura 1.3. Distribuição dos produtos naturais marinhos isolados em 2004, segundo sua atividade biológica	7
Figura 3.1. Foto da esponja <i>Petromica ciocalyptoides</i>	41
Figura 3.2. Foto da esponja <i>Topsentia ophiraphidites</i>	42
Figura 3.3. Esquema de correlações observado no espectro de RMN do tipo COSY para o composto PcS2d.....	44
Figura 3.4. Esquema de correlações observado no espectro de RMN do tipo HMBC para o composto PcS2d.....	45
Figura 3.5. Esquema de reação de dessulfatação do trissulfato de halistanol (45) seguido de sua acetilação, de maneira a obter o produto peracetilado (47), Aoki et al (2002).....	47
Figura 3.6. Foto da esponja <i>Callyspongia sp</i>	51
Figura 3.7. Taxonomia da esponja <i>Callyspongia sp</i>	51
Figura 3.8. Correlações observadas nos espectros de RMN- ¹ H, COSY e HMBC (CD ₃ OD, 600 MHz) para parte do composto ilhabelanol.....	52
Figura 3.9. Comparação dos dados de RMN de ¹ H e ¹³ C de compostos encontrados na literatura [adociaquinol (DMSO- <i>d</i> ₆), adociassulfato (CD ₃ OD), zonarol e isoazonarol], com parte da estrutura do composto ilhabelanol (CD ₃ OD).....	53

Figura 3.10. Correlações observadas nos espectros de RMN- ¹ H, COSY e HMBC (CD ₃ OD, 600 MHz) para parte do composto ilhabelanol.....	55
Figura 3.11. Comparação dos dados de RMN de ¹ H e ¹³ C de compostos encontrados na literatura adociaquinol (DMSO- <i>d</i> ₆), adociassulfato (CD ₃ OD), com partes da estrutura do composto ilhabelanol (CD ₃ OD).....	56
Figura 3.12. Esquema de correlações observadas no espectro NOESY para ilhabelanol	57
Figura 3.13. Valores de deslocamentos químicos observados no espectro de RMN- ¹³ C (CD ₃ OD, 150 MHz) para o composto ilhabreno.....	60
Figura 3.14. Esquema de correlações observadas nos espectros HMBC, TOCSY/COSY e NOESY para ilhabreno	61
Figura 3.15. Sub-estruturas do composto Ca6f3 e suas correlações obseravadas nos espectros de RMN mono e bidimensionais.....	65
Figura 3.16. Diferenças entre isoakaterpina (Ca6f3) e akaterpina (Fukami, et al., 1997).....	67
Figura 4.1. Foto da esponja <i>Axinella corrugata</i>	76
Figura 4.2. Taxonomia da esponja <i>Axinella corrugata</i>	76
Figura 4.3. Esquema das principais correlações observadas para a fração AcAE-4C nos espectros de RMN bidimensionais COSY e HMBC.....	78
Figura 4.4. Estrutura do composto AcAE-4C, éster metílico do ácido carboxílico.....	79
Figura 4.5. Estrutura do composto AcAE-4E, éster etílico do ácido 4-carboxi esculétínico.....	80
Figura 4.6. Síntese total de AcAE-4E.....	82
Figura 5.1. Cromatograma da fração F13E-6.....	92
Figura 5.2. Cromatograma da fração F13E-7.....	93
Figura 5.3. Cromatograma da fração F13E-8.....	94
Figura 5.4. Cromatograma da fração F8E-3.....	97
Figura 5.5. Cromatograma da fração F8E-4.....	98
Figura 5.6. Cromatograma da fração F8E-5.....	99
Figura 5.7. Cromatograma da fração F8E-6.....	100
Figura 5.8. Foto do fungo <i>Beauveria felina</i>	104
Figura 5.9. Taxonomia do fungo <i>Beauveria felina</i>	104

Figura 5.10. Esquema de correlações observadas nos espectros de RMN do tipo COSY e HMBC para o ácido 2-hidroxi-4-metilpentanóico, da pseudodestruixina C (F13E6-P3).....	107
Figura 5.11. Esquema de correlações observadas nos espectros de RMN do tipo COSY e HMBC para o resíduo do aminoácido fenilalanina, da pseudodestruixina C (F13E6-P3).....	107
Figura 5.12. Esquema de correlações observadas nos espectros de RMN do tipo COSY e HMBC para os resíduos dos dois aminoácidos de <i>N</i> -Me-valina, da pseudodestruixina C (F13E6-P3).....	108
Figura 5.13. Esquema de correlações observadas nos espectros de RMN do tipo COSY e HMBC para o resíduo do aminoácido β -Me-prolina, da pseudodestruixina C (F13E6-P3).....	108
Figura 5.14. Esquema de correlações observadas nos espectros de RMN do tipo COSY e HMBC para o resíduo do aminoácido β -alanina, da pseudodestruixina C (F13E6-P3).....	108
Figura 5.15. Correlações observadas no espectro HMBC entre os aminoácidos, da fração F13E6-P3.....	109
Figura 5.16. Cromatograma do Padrão (<i>L</i>)-prolina derivatizado com reagente de Marfey.....	128
Figura 5.17. Cromatograma do Padrão (<i>L</i>)-(<i>D</i>)- <i>N</i> -Me-valina derivatizado com reagente de Marfey.....	129
Figura 5.18. Cromatograma do Padrão (<i>L</i>)-fenilalanina derivatizado com reagente de Marfey.....	130
Figura 5.19. Cromatograma da fração F13E6-P2 hidrolisada e derivatizada com reagente de Marfey.....	131
Figura 5.20. Cromatograma da fração F13E6-P3 hidrolisada e derivatizada com reagente de Marfey.....	132

Índice de Esquemas

Esquema 3.1. Fluxograma do estudo químico da esponja <i>Petromica ciocalyptoides</i>	25
Esquema 3.2. Fluxograma do estudo da fração PcS2.....	27
Esquema 3.3. Fluxograma do estudo da fração PcS8.....	28

Esquema 3.4. Fluxograma do estudo químico da esponja <i>Topsentia ophiraphidites</i>	33
Esquema 3.5. Fluxograma do estudo químico da fração To2.....	35
Esquema 3.6. Fluxograma do estudo do extrato bruto da esponja <i>Callyspongia</i> sp.....	36
Esquema 3.7. Fluxograma do estudo químico da fração Ca4.....	37
Esquema 3.8. Fluxograma do estudo químico da fração Ca6 da esponja <i>Callyspongia</i> sp.....	38
Esquema 4.1. Fluxograma do estudo químico da esponja <i>Axinella corrugata</i>	74
Esquema 5.1. Fluxograma do estudo do extrato bruto F13E de <i>Beauveria felina</i>	91
Esquema 5.2. Fluxograma do estudo do extrato bruto F8E de <i>Beauveria felina</i>	96
Esquema 5.3. Reação de derivatização dos aminoácidos (L) ou (D), com reagente de Marfey-(L).....	127

Índice de Tabelas

Tabela 3.1. Dados de RMN- ¹ H (400 MHz) e ¹³ C (100 MHz) de PcS2d em MeOH- <i>d</i> ₄ e de RMN- ¹³ C do trissulfato de halistanol (45) (25 MHz) em MeOH- <i>d</i> ₄ (Fusetani et al., 1981).....	46
Tabela 3.2. Dados de RMN- ¹ H (CD ₃ OD, 600 MHz) e ¹³ C (CD ₃ OD, 150 MHz) de ilhabelanol (Ca6f2a).....	58
Tabela 3.3. Dados de RMN- ¹ H (CD ₃ OD, 600 MHz) e ¹³ C (CD ₃ OD, 150 MHz) de ilhabreno (Ca6f2b).....	62
Tabela 3.4. Dados de RMN- ¹ H (600MHz) e ¹³ C (150 MHz) de Ca6f3 (isoakaterpina) e de akaterpina (400 MHz e 100 MHz) em CD ₃ OD (Fukami, et al 1997).....	66
Tabela 4.1. Dados de deslocamentos químicos de RMN- ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (125 MHz) e correlações à longa distância da fração AcAE-4C em DMSO- <i>d</i> ₆	78
Tabela 4.2. Dados de deslocamentos químicos de RMN- ¹ H (500 MHz) e ¹³ C (125 MHz) para as frações AcAE-4C e AcAE-4E em DMSO- <i>d</i> ₆	81
Tabela 5.1. Dados de RMN- ¹³ C (125 MHz em CDCl ₃) de F13E6-P2 e de [Phe ³ , N-Me-Val ⁵] destruxina B (150 MHz, em CDCl ₃), (Kim et al., 2002).....	113
Tabela 5.2. Dados de RMN- ¹³ C (100 MHz em DMSO- <i>d</i> ₆) de F13E8-P3 e de roseotoxina B (125 MHz, em CDCl ₃), (Tsunoo et al., 1997).....	116
Tabela 5.3. Dados de RMN- ¹³ C (100 MHz em DMSO- <i>d</i> ₆) de F13E8-P2 e de cloroidrina da destruxina E (100 MHz, em CDCl ₃), (Gupta et al., 1989).....	119
Tabela 5.4. Dados de RMN- ¹ H e ¹³ C (500 MHz e 125 MHz, em MeCN/DMSO- <i>d</i> ₆ -5:1) de [β-Me-Pro] cloroidrina da destruxina E.....	122

Tabela 5.5. Dados de RMN-¹³C (125 MHz em 3:1 MeCN-*d*₃/DMSO-*d*₆) de F8E3-P4 e de roseocardina (125 MHz, em CDCl₃), (Tsunoo et al., 1997).....124

Tabela 6.1. Compostos isolados de extratos de fungos e invertebrados marinhos durante o presente projeto de doutorado.....137

Lista de Símbolos e Abreviaturas

APRT - Adenina Fosforribosil Transferase

Lt-APRT - Adenina Fosforribosil Transferase isolada de *Leishmania tarantolae*

X-PRT - xantina-fosforribosil-transferase

Hs-APRT – adenina fosforribosil transferase de *Homo sapiens*

HG-PRT - hipoxantina-guaniafosforribosil-transferase

CE₅₀ – 50% da concentração efetiva

ED₅₀ – 50% da dose efetiva

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

CIM - Concentração Inibitória Mínima

RMN-¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN-¹³C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

HMBC – Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation

HSQC – Heteronuclear Single-Quantum Coherence

TOCSY – Total Correlation Spectroscopy

COSY - Correlation Spectroscopy

NOESY – Nuclear Overhauser Effect Correlation Spectroscopy

ROESY – Rotating Frame Spectroscopy

DEPT – Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

EM – Espectrometria de Massas

ESIEM – Espectrometria de Massas em modo spray de elétrons

FAB – Fast Atom Bombardement

IV - infravermelho

UV - ultravioleta

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

PDA – Photodiode Array Detector

J – constante de acoplamento

δ - deslocamento químico

s - singleto

d - dubleto

t - tripleto

q - quarteto

m - multiplete

$[\alpha]_D$ – rotação ótica específica

c - concentração

DOPA - dihidroxifenilalanina

SARS – severe acute respiratory syndrome

AIDS - Síndrome da Imune Deficiência Adquirida

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

AZT - azidotimidina

Resumo

Neste trabalho descreve-se a investigação química de quatro extratos de esponjas e duas linhagens fungos de origem marinha oriundos da costa do Brasil.

Os extratos de três esponjas (*Petromica ciocalyptoides*, *Topsentia ophiraphidites* e *Callyspongia* sp.) apresentaram atividade inibitória à enzima adenina fosforribosil transferase de *Leishmania tarentolae* (L-APRT). A partir desses extratos foram isolados quatro compostos. O composto conhecido como sulfato de halistanol, isolado das esponjas *P. ciocalyptoides* e *T. ophiraphidites*, e outros três compostos inéditos ilhabelanol, ilhabreno e isoakaterpina, isolados da esponja *Callyspongia* sp. Todos os compostos apresentaram inibição a L-APRT em concentrações da ordem de μM .

A partir do extrato bruto da esponja *Axinella* cf. *corrugata* foram isolados dois derivados cumarínicos, o éster metílico do ácido 4-carboxi-esculetínico e o éster etílico do ácido 4-carboxi-esculetínico, provavelmente artefatos de isolamento. O extrato bruto da esponja *Axinella* cf. *corrugata* apresentou atividade citotóxica, mas os compostos puros não apresentaram esta atividade. O éster etílico do ácido 4-carboxi-esculetínico apresentou atividade *in vitro* contra o vírus da SARS.

Os extratos brutos obtidos a partir de duas linhagens do fungo *Beauveria felina*, isolado da alga *Caulerpa* sp., apresentaram atividades antituberculose contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv e citotóxica contra as linhagens de células de câncer MCF-7 (mama), HCT-8 (cólon) e B16 (melanoma). O fracionamento químico dos extratos brutos levou ao isolamento de dois compostos inéditos a pseudodestruxina C e a cloroidrina β -Me-Pro da destruxina E, e seis compostos conhecidos (Phe³, N-Val⁵) destruxina B, a cloroidrina da destruxina E, a roseotoxina B, a roseocardina, a isariina e a isariina B. Os depsipeptídeos pseudodestruxina C, a (Phe³, N-Val⁵) destruxina B e a roseotoxina B, foram testadas quanto a sua atividade nos bioensaios antituberculose contra *Mycobacterium tuberculosis* H37 Rv e citotóxica contra as linhagens de células de câncer SF 295 (sistema nervoso), MDA-MB 435 (mama), HCT8 (cólon) e HL60 (leucemia). Somente o composto roseotoxina B apresentou atividade moderada citotóxica *in vitro* para quatro linhagens de células.

Abstract

In this work we report the chemical investigation of bioactive crude extracts obtained from four sponges and two fungal strains of marine origin. The crude extracts of three sponges species (*Petromica ciocalyptoides*, *Topsentia ophiraphidites* and *Callyspongia* sp.) displayed inhibitory activity towards the enzyme adenine fosforribosyl transferase of *Leishmania tarentolae* (L-APRT). Four compounds have been isolated from these extracts: the known halistanol sulfate was isolated of sponges *P. ciocalyptoides* and *T. ophiraphidites*, while the novel ilhabelanol, ilhabrene and isoakaterpin have been isolated from the sponge *Callyspongia* sp. All compounds exhibited inhibition of L-APRT at μM concentrations.

Two coumarin derivatives have been isolated from the crude extract of the sponge *Axinella* cf. *corrugata*, probably as artifacts of isolation: esculetin-4-carboxylic acid methyl ester and esculetin-4-carboxylic acid ethyl ester. While the crude extract of the sponge *Axinella* cf. *corrugata* presented cytotoxic activity, the pure compounds were inactive in these assays. The esculetin-4-carboxylic acid ethyl ester was found to be an *in vitro* inhibitor of SARS virus.

The crude extract obtained of a marine-derived *Beauveria felina* strain, isolated from the alga *Caulerpa* sp., displayed antituberculosis activity against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and cytotoxic activity against MCF-7 (breast), HCT-8 (colon) and B16 (murine melanoma) cancer cell lines. Chemical fractionation of the crude extract led to the isolation of two new cyclodepsipeptides pseudodestruxin C and [β -Me-Pro] destruxin E chlorohydrin, and of the known destruxin E chlorohydrin, [Phe³, N-Me-Val⁵] destruxin B, roseotoxin B, roseocardin, isariin and isariin B. The depsipeptides [Phe³, N-Me-Val⁵] destruxin B and rosetoxin B, have been tested against *M. tuberculosis* H37 Rv and in cytotoxicity bioassays against SF 295 (human CNS) MDA-MB435 (human breast) HCT8 (colon) and HL60 (leukemia) cancer cell lines. Only roseotoxin B displayed moderate cytotoxicity against the cancer cell lines.

Agradecimentos

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

- Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck, pela amizade, compreensão, dedicação e principalmente por ter me ensinado muito nesses últimos anos.
- Aos Profs. Dr. Eduardo Hajdu (Museu Nacional- UFRJ) e Dra. Solange Peixinho (Departamento de Zoologia – UFBA) pelo apoio logístico na Bahia e pela classificação das esponjas estudadas nesta tese.
- À Dra. Lara D. Sette (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas -UNICAMP) pela identificação do fungo *Beauveria felina*.
- Aos profs. Dr. Otávio Thiemann e Dr. Glaucius Oliva (Instituto de Física de São Carlos - USP) pela realização dos bioensaios de inibição da atividade enzimática da L-APRT.
- Ao Prof. Dr. Célio Lopes Silva (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP) pela realização dos bioensaios de atividade antituberculose.
- Aos Profs. Manoel Odorico de Moraes e Cláudia do Ó Pessoa (Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará), pela realização dos bioensaios de atividade citotóxica.
- Ao Dr. André Tempone (Instituto Adolfo Lutz – São Paulo) pela realização dos bioensaios de inibição do protozoário *Leishmania chagasi*.
- Aos Profs. Dr. Raymond J. Andersen (University of British Columbia, Canadá) e Chris M. Ireland (University of Utah, EUA) por suas valiosas contribuições para a realização desta tese;
- Aos Profs. Dr. Antonio Gilberto Ferreira (Departamento de Química - UFSCAR), Dr. Gil V. J. da Silva e Virgínia H. B. Glass (Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP) pela obtenção de espectros de RMN.

- Ao Prof. Dr. Brent R. Copp (University of Auckland, Nova Zelândia) pela obtenção dos espectros de massas.
- Aos Profs. Dr. Tim R. Brockson (Departamento de Química - UFSCar) e Dr. Luiz Carlos Dias (Instituto de Química - UNICAMP) pela disponibilização de polarímetros para obtenção de medidas de rotação específica.
- À Aline M. Vita-Marques pela obtenção dos extratos dos fungos analisados neste trabalho, bem como à Profa. Sandra Sponchiado (Instituto de Química – UNESP, Araraquara) pelo apoio na realização dos estudos de micologia marinha.
- À profa. Dra. Mirna H. R. Seleglim (Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva - UFSCAR) pelos trabalhos desenvolvidos em conjunto, e principalmente pela amizade.
- Aos Profs. Eleonora Trajano e Álvaro E. Migotto (CEBIMar-USP), pela disponibilização da infraestrutura necessária para o isolamento de linhagens de fungos a partir de amostras de invertebrados e algas marinhas.
- À Dra. Niede A. J. Cardoso Furtado (UNIFRAN), pela contribuição nos experimentos de determinação absoluta.
- À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro;
- Ao Instituto de Química de São Carlos pela infra-estrutura disponibilizada;
- Aos técnicos da Central Analítica, Silvana, Mauro e Paulo pela obtenção dos espectros de RMN, IV e UV;
- Às bibliotecárias do IQSC;
- À Silvia e Andréia da seção de pós-graduação;
- Aos amigos e colegas do Grupo de Química de Produtos Naturais, Miriam, Suzi, Fábio, Renata, Michelli, Raquel, Eli, Stella, Marília, Juliana, Camila e Milene;

- Às amigas Mirna e Miriam, por estarem sempre dispostas a me ajudar;
- Aos amigos Maria Fernanda, Ricardo, Priscila, Leandro, Kelly, Eliana, Janildo, Eduardo, Patrícia, Thelma e Fabiana;
- Aos meus amigos de São Paulo, sempre presentes, Keyla, Richard, Família Lapa: Walter, Doroti, Marcos, Paulo, Mônica, Alexandre e Paula, Cristiane, Mariana e Luciana;
- Aos amigos queridos de Rio Claro, sem ordem de importância, todos são especiais: Elissena, Sardinha, Renata, Luiz, Fabiana, Allan, Manuella, Adriana, Matheus, Xandão, Manuel, André, Ana Paula, Tadeu, Rene, Gabi, Psicose, Gheorge, Aninha, Flávio-TG, Marcos-Índio, Bola, Bethe, Lingüiça, Lícia, Moreno, Andrezinho, Bigato, Ellen, Maurício, Elisângela, Pedro, Elivania, Rose e Dirceu.
- A minha sogra D. Lourdes, meu sogro Sr. Arlindo e meus cunhados Rosana, Mário, Rodrigo, Alice, que estão sempre torcendo por mim.

Capítulo 1

Introdução à Química de Produtos Naturais

1.1. Produtos Naturais

Há milênios a população humana tem conhecimentos sobre os benefícios da utilização de extratos de plantas e animais para os mais diversos fins, tais como remédios, cosméticos, corantes e outros. Muitos destes produtos naturais são utilizados até hoje. Por exemplo, em documentos datados de 5.000 aC são descritas as propriedades da papoula (*Papaver somniferum*), cujo princípio ativo é a morfina (**1**), que é utilizada até hoje como analgésico em pacientes em estágios avançados de câncer.

No entanto, os isolamentos das primeiras substâncias puras do Reino vegetal começam a ocorrer no século XVIII, como por exemplo, o isolamento da própria morfina (**1**) em 1806, da quinina (**2**) e da estriquinina (**3**) em 1820 (Grabley et al., 1999; Valle et al., 1978; Pinto et al., 2002).

(1) morfina

(2) quinina

(3) estriquinina

A partir do século XX, muitos avanços ocorreram na área de produtos naturais. Dentre outros, podemos citar a disponibilidade de carbono radioativo (^{14}C) para estudos de biossíntese, a introdução de métodos espectroscópicos para análise estrutural e técnicas cromatográficas que permitiu isolar e identificar compostos mais complexos em quantidades menores de massa e menos tempo (Pinto et al., 2002).

1.2. Produtos Naturais Marinhos

Os produtos naturais de organismos marinhos também são conhecidos desde épocas remotas (Kelecom, 1986, 1988, 1999; Scheuer, 1988). Antigas civilizações chinesas usavam algas marinhas como vermífugos e também tinham conhecimento sobre os peixes tóxicos, como o *Tetraodon stellatus*, que concentra em seus tecidos a toxina tetrodotoxina (**4**) (Halstead, 1965). Há, ainda, registros de organismos tóxicos como peixes, moluscos, equinodermas e águas vivas, que eram de conhecimento das civilizações Babilônicas, Assírias, Persas, Indianas, Helênicas e Romanas (Kelecom, 1999).

(4) tetrodotoxina

Os trabalhos científicos com produtos naturais marinhos tiveram início de forma esporádica no início do século XX, com o isolamento de esteróides de esponjas e de outros animais marinhos, de carotenóides presentes em diversos invertebrados marinhos e dos estudos da toxina dos peixes da família Tetraodontidae (Dorée, 1909; Henze, 1909; Lederer, 1938; Tahara, 1910).

Mas, historicamente considera-se que a química de produtos naturais marinhos teve seu início com o isolamento dos nucleosídeos espongotimidina (**5**) e espongouridina (**6**) a partir da esponja *Cryptotethya crypta*, por Bergmann e seus colaboradores (Bergmann, 1949; Bergmann e Burke, 1955; Bergmann e Feeney, 1950, 1951; Bergmann et al, 1957; Stempien, 1960).

O estudo de análogos sintéticos desses nucleosídeos levou ao desenvolvimento dos agentes antiviral Ara-A (**7**) e anticancerígeno Ara-C (**8**). Estes compostos foram os primeiros produtos naturais marinhos a atingir o mercado para uso clínico. O Ara-C é produzido sinteticamente e distribuído como Cytosar U[®] enquanto o Ara-A é obtido através da cultura de bactéria terrestre *Streptomyces antibioticus* e distribuído como Vira A[®]. Outros nucleosídeos também foram obtidos a partir desses estudos, como o acyclovir (**9**) e o AZT (**10**), que foi o primeiro medicamento utilizado no tratamento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida - AIDS (Munro et al., 1993; König et al., 1996; McConnell et al., 1994; Newman et al., 2000; Pettit et al., 2001).

(5) espongotimidina $R=CH_3$
(6) espongouridina $R=H$

(7) Ara-A

(8) Ara-C

(9) acyclovir

(10) AZT

Outros compostos promissores de origem marinha e que se encontram em fase clínica de testes são: a briostatina (11) isolada do briozoário *Bugula neritina*, a ecteinascidina 743 (12) isolada do tunicado *Ecteinascidia turbinata* e a aplidina (13) isolada do tunicado *Aplidium albicans*, que apresentaram atividades anticancerígenas (Wright et al., 2000). Outros exemplos de protótipos de fármacos isolados de organismos marinhos são: o esteroide antiasmático contignasterol (14) e o diterpeno antiinflamatório pseudopterosina A (15). As pseudopterosinas são comercializadas como substâncias ativas de uma linha de cremes faciais, Resilience, da Estée Lauder®. A partir de estudos com o contignasterol e com as pseudopterosinas, foram desenvolvidos derivados semi-sintéticos que se encontram em testes clínicos. (Wright et al., 2000; Look et al., 1986; Roussis et al., 1990).

(11) briostatina

(12) ecteinascidina

(13) aplidina

(14) contignasterol

(15) pseudopterosina A

Foi somente a partir da segunda guerra mundial que a pesquisa com produtos naturais marinhos cresceu de forma significativa, principalmente devido aos avanços tecnológicos dos equipamentos de mergulho, facilitando o até então difícil acesso aos ambientes submarinos, juntamente com os avanços na área de instrumentação para separações e identificações de compostos (Mc Connell et al., 1994; Dietzmann et al., 1997; Faulkner, D.J. 2000 a).

Muitos compostos isolados de ambientes marinhos possuem estruturas químicas únicas e bem diferentes daquelas encontradas em fontes naturais terrestres, apresentando as mais diversas atividades biológicas. Esse fato motiva as pesquisas que levam ao desenvolvimento de novos métodos de isolamento e de síntese orgânica, bem como a importância ecológica e atividade farmacológica dos compostos isolados. Conseqüentemente, o interesse pela busca de novos compostos de origem marinha tem crescido nas últimas décadas, como exemplifica a **Figura 1.1** (Blunt et al., 2003, 2004, 2005 e 2006).

Figura 1.1. Número de produtos naturais marinhos isolados, por quinquênio (Fonte: Blunt et al., 2003, 2004, 2005 e 2006).

Segundo a base de dados bibliográfica MARINLIT, cerca de 17.000 metabólitos secundários de origem marinha foram descritos até de 2006. A maioria destes compostos foram isolados de esponjas (38%), celenterados (21%) e microrganismos e fitoplâncton (15%), segundo mostra a **Figura 1.2** (Blunt et al., 2003, 2004, 2005 e 2006).

Figura 1.2. Distribuição de Produtos Naturais Marinhos por filos (Fonte: Blunt et al., 2003, 2004, 2005 e 2006).

Muitos compostos marinhos isolados de animais invertebrados, algas, fungos e bactérias, demonstraram ter diversas atividades biológicas, tais como anticancerígena, antibacteriana, anticoagulante, antifúngica, antimalária, antituberculose, antiviral, antiinflamatória, dentre outras (Mayer et al., 2004; Blunt et al., 2005, Blunt et al., 2006). Destas, as mais encontradas nos compostos isolados são as atividades anticancerígenas e antibióticas (**Figura 1.3**).

Figura 1.3. Distribuição dos produtos naturais marinhos isolados em 2004, segundo sua atividade biológica (Fonte: Blunt et al., 2006).

Algumas das atividades ecológicas mais comumente atribuídas aos produtos naturais marinhos são: a mediação na reprodução, inclusive como feromônios sexuais; defesa contra potenciais predadores; defesa contra patógenos; inibição da bioincrustação, e; competidores de substrato (McClintock et al., 2001). Por exemplo, a briostatina (**11**) isolada do briozoário *Bugula neritina*, desempenha uma função inibidora do ciclo celular, impedindo a proliferação de organismos estranhos para sua proteção (Hung et al., 1996).

A viabilidade do desenvolvimento comercial de um produto como fármaco é um fator limitante na área de produtos naturais e depende de vários fatores. Dentre eles sua obtenção em grande escala, sua atividade *in vivo* e sua seletividade. Os requerimentos são rigorosos e poucos chegam até as etapas finais dos testes clínicos em humanos (Mc Connell et al., 1994; Cragg et al., 1997; Faulkner et al., 2000 b).

A dificuldade de cultivo de macroorganismos marinhos ou síntese de moléculas complexas em grande escala também é um dos fatores limitantes no desenvolvimento de fármacos de origem marinha. No entanto, várias substâncias com atividade biológica isoladas de invertebrados marinhos são possivelmente biossintetizadas por

microrganismos associados e, assim, passíveis de cultura em larga escala, caso seja possível se isolar, crescer o microrganismo e produzir o(s) composto(s) ativo(s) em meio artificial. Como por exemplo, para a própria briostatina já citada anteriormente, há estudos mostrando que na realidade é a bactéria *Candidatus endobugula sertula* que é responsável pela produção do composto ativo. Além de possível, a produção de microrganismos em larga escala, a identificação e seqüenciamento do gene responsável pela biossíntese do composto o torna mais viável para sua comercialização (Haygood et al., 1997; Davidson et al., 2001).

A costa brasileira com aproximadamente 8.000 Km de extensão, possui uma fauna marinha praticamente desconhecida e inexplorada e representa uma fonte promissora e de grande potencial para descoberta de novos metabólitos secundários farmacologicamente ativos (Berlinck et al., 2004).

O nosso país, bem como outros países tropicais, enfrenta sérios problemas na área de saúde. Hospitais com atendimento precários e terapias de alto custo e nem sempre acessíveis a todos são problemas comumente encontrados. Em vista desses problemas, se torna necessário cada vez mais o empenho de pesquisadores brasileiros no isolamento de novas substâncias químicas ativas e que possam desenvolver metodologias de síntese, que torne viável economicamente a produção de novos fármacos e compreendam os mecanismos de ação biológica dessas substâncias a fim de minimizar sua toxicidade.

1.3. Objetivos

O Grupo de Química Orgânica de Produtos Naturais do Instituto de Química de São Carlos (GQOPN) desenvolve atividades de pesquisas que objetivam o isolamento, a identificação e síntese de produtos naturais biologicamente ativos provenientes de invertebrados e de microorganismos marinhos. A pesquisa do grupo é fortemente direcionada à descoberta de novos compostos orgânicos que apresentem atividades biológicas, com potencial de desenvolvimento farmacológico (http://www.iqsc.usp.br/iqsc/grupos_pesquisa/dfq/qopn/).

Dando continuidade aos estudos do Grupo de Química Orgânica de Produtos Naturais do Instituto de Química de São Carlos, coordenado pelo Prof. Dr. Roberto Berlinck, no âmbito do projeto temático “Produtos Naturais de Invertebrados Marinhos: Potenciais Agentes Quimioterápicos Anti-Proliferativos, Antibióticos, e Contra Doenças Tropicais” e do projeto regular “Estabelecimento de Condições para o Isolamento e

Crescimento de Linhagens de Fungos Marinhos para a Produção de Metabólitos Secundários”, esse projeto tem por objetivos:

- 1- selecionar extratos de invertebrados e fungos marinhos, baseando-se em testes de atividade biológicas;
- 2- isolar e identificar as substâncias ativas presentes em extratos selecionados;
- 3- avaliar as atividades biológicas das substâncias puras nos referidos bioensaios.

Capítulo 2

Parte Experimental

2.1. Técnicas Espectroscópicas

2.1.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram obtidos utilizando-se os seguintes aparelhos: Bruker AC 200 (4,7 Tesla), operando a 200,1 MHz na frequência do hidrogênio (^1H) e a 50,3 MHz na frequência do Carbono (^{13}C) no IQSC- USP; Bruker DRX 400 (9,4 Tesla), operando a 400,35 MHz na frequência do hidrogênio (^1H) e a 100,10 MHz na frequência do Carbono (^{13}C) no DQ- UFSCar; Bruker DRX 500 (11,75 Tesla), operando a 500,13 MHz na frequência do hidrogênio (^1H) e a 125,76 MHz na frequência do Carbono (^{13}C) na FFCLRP; Varian INOVA operando a 500 MHz na frequência do hidrogênio (^1H) e 125 MHz na frequência do carbono (^{13}C) e Bruker DRX500 (11,7 T), operando a 500 MHz na frequência do hidrogênio (^1H) e 125 MHz na frequência do carbono (^{13}C) ambos do Departamento de Química medicinal- Universidade Utah - EUA.

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

2.1.2. Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

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

2.1.3. Infravermelho (IV)

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos em um espectrofotômetro FTIR Bomem modelo MB-102 (IQSC- USP). As amostras foram

dissolvidas em pequena quantidade de solvente volátil apropriado e aplicadas sob forma de filme em disco de silício, evaporando o solvente sob vácuo em dessecador.

2.1.4. Espectrometria de Massas (EM)

Os espectros de massas foram obtidos por bombardeamento rápido de átomos (HRFABMS), por impacto de elétrons (EIMS), ionização química (CIMS) ou eletrospray. Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos em um espectômetro VG-7070 operando a 70 eV. Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos operando-se com resolução nominal 5000- 10000. Foi utilizado como interno: perfluorquerosene, 3-nitrobenzil álcool ou polietilenoglicol.

2.1.5. Rotação Ótica $[\alpha]_D$

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

2.2. Técnicas Cromatográficas

2.2.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

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

- a- Solução de 0,2 g de ninidrina em 100 mL de EtOH P.A. (Quimex), aquecendo-se a placa em seguida por 5 minutos em estufa à 120° C, para identificação qualitativa de aminoácidos e aminas primárias;
- b- Solução de 20% de ácido fosfomolibdico em EtOH P. A. (Quimex), aquecendo-se em seguida por 5 minutos em estufa à 120° C, para identificação qualitativa de substâncias redutoras;

- c- Solução Dragendorff. (solução A: 0,85 g de nitrato básico de bismuto em 10 mL de ácido acético glacial e solução B: 40 mL de água; 8 g de iodeto de potássio dissolvido em 20 mL de água; misturar 1:1 de soluções A e B e utilizar a mistura de 1 mL da solução estoque com 2 mL de ácido acético glacial e 10 mL de água), para identificação qualitativa de alcalóides, principalmente.

2.2.2. Cromatografia em Coluna pré-empacotada

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

2.2.3. Cromatografia em Coluna

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

2.2.4. Cromatografia de baixa pressão em coluna do tipo Lobar

Para cromatografia em coluna do tipo Lobar, foram utilizadas as colunas de tamanho A (240-10) LiChroprep RP-18 (40-63 μm) ou de tamanho B (310-25) LiChroprep RP-18 (40-63 μm). A coluna foi acoplada a uma bomba peristáltica Pharmacia Biotech (Pump P-1). Os eluentes utilizados foram de grau cromatográfico. As frações obtidas a partir da cromatografia foram coletadas utilizando-se um coletor de frações Bio Rad modelo 2110.

2.2.5. Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (CLAD)

Os equipamentos utilizados nas cromatografias de alto desempenho (CLAD) consistiam em um sistema Waters® com duas bombas modelo Pump 600, um degaseificador Degasser em linha, um detector espectrofotométrico UV-Visível com leitura em dois comprimentos de onda, modelo 2487, um registrador modelo 746 e um sistema de controle Controller 600. E também um outro sistema Waters® igual ao primeiro, porém com detector de arranjo de fotodiodos (“Photodiode Array Detector”), que nos permitiu observar entre os comprimentos de ondas de 200 a 800 nm.

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

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

2.2.6. Solventes

Os solventes utilizados em CCD, Sephadex LH-20 e Sep-Pak foram todos de grau analítico (Quimex). Nas cromatografias líquida de alto desempenho (CLAD) e cromatografia do tipo Lobar foram utilizados solventes grau cromatográfico (J.T. Baker, Mallinckrodt, etc). A água utilizada em todas as cromatografias foi destilada e purificada em um sistema Milli-Q Millipore equipado com resina de troca iônica e filtro biológico.

2.3. Protocolos dos bioensaios

2.3.1. Ensaios de inibição enzimática de Adenina Fosforribosil Transferase de *Leishmania tarentolae*

O procedimento utilizado durante os ensaios enzimáticos da APRT, corresponde a uma adaptação do método apresentado na literatura (Tuttle, 1980). Experimentos de cinética enzimática e inibição foram realizados em espectrofotômetro. A formação de AMP e GMP foi monitorada espectrofotometricamente em 245 e 257,5 nm respectivamente, utilizando como coeficiente de extinção os valores de 3020 ± 40 e $5340 \pm 50 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, em volume final de reação de 1 mL.

Para a determinação da velocidade inicial de reação, adenina, hipoxantina ou guanina foram utilizados como substratos em concentração fixa contra diferentes concentrações de Mg_2PRPP e vice versa. Para a medição de velocidade inicial da reação reversa, tanto MgAMP ou MgGMP foram utilizados substrato em concentração fixa contra diferentes concentrações de MgPP_i ou inibidores e vice versa.

2.3.2. Ensaios de inibição na forma promastigota do protozoário *Leishmania chagasi*

Os animais utilizados nos bioensaios foram hamsteres dourados (*Mesocricetus auratus*) fornecidos pelo biotério do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo e mantidos em caixas esterilizadas com material absorvente, recebendo água e alimento *ad libitum*. Os hamsteres foram infectados a cada mês com amastigotas provenientes de baço para manutenção da cepa de *Leishmania (L.) chagasi*. Todos os procedimentos realizados nos ensaios foram previamente aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz.

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

Para verificar a efetividade do composto em *Leishmania (L.) chagasi*, realizou-se a determinação da Concentração Efetiva 50% (CE_{50}) em diferentes concentrações (150 $\mu\text{g/mL}$ a 0,073 $\mu\text{g/mL}$), utilizando-se ainda o isotiocianato de pentamidina (EUROFARMA) como fármaco padrão. O composto foi previamente dissolvido em

DMSO e posteriormente diluído em meio M 199, sendo incubado por um período de 48 horas com 1×10^6 promastigotas/poço (previamente contados em hemocitômetro-Neubauer) em placas de 96 poços (triplicata). A viabilidade dos promastigotas foi verificada através de microscópio óptico e através do ensaio com MTT (Tada et al., 1986). Basicamente, o MTT (5 mg/mL) foi dissolvido em tampão fosfato-salina (PBS), esterilizado em membranas de 0,22 μm e adicionado à 20 μL /poço. A placa foi novamente incubada por 4 h a 24°C. A extração da formazana foi realizada através da adição (100 μL /poço) de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% em HCl 0,01M por um período de 18 h. A densidade óptica dos poços foi verificada em um espectrofotômetro Multiskan MS (UNISCIENCE) em 570 nm. Poços sem a adição de fármacos e com DMSO foram utilizados como controle de viabilidade do ensaio. A Concentração Efetiva 50% (CE₅₀) foi analisada pelo software Graph Pad Prism 3.0, através de uma curva sigmóide dose-resposta, com base em pelo menos, dois ensaios distintos.

2.3.3. Atividade antimicobacteriana *in vitro*

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

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

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

2.3.4. Atividade anti-proliferativa contra células tumorais humanas

A citotoxicidade dos extratos e substâncias puras foi avaliada pelo método da sulforodamina B. Foram utilizadas 4 placas de 96 cavidades por experimento, uma para cada linhagem celular testada (MCF-7, B16 e HCT-8) e uma placa controle com as três linhagens. As células foram plaqueadas nas seguintes concentrações: HCT-8 e B16 $0,4 \times 10^5$ cél/mL, e MCF-7, $0,1 \times 10^6$ cél/mL. Após 24 horas de incubação, a placa controle foi fixada em ácido tricloroacético 50% gelado, e nas demais placas foram incubados os extratos na dose de 125 μ g/mL. As amostras foram testadas em duplicata. O etoposídeo (500 μ g/mL) e o paclitaxel (150 μ g/mL) foram utilizados como padrões com ação anti-proliferativa. Estas placas foram fixadas após 48 horas de incubação com as drogas. Todas as placas foram coradas com sulforodamina B e lidas em espectrofotômetro de placa no comprimento de onda de 540 nm. O percentual de crescimento celular (%G) foi calculado comparando a absorbância do teste com o controle (100%), tempo-zero (0%) e padrões, paclitaxel e etoposídeo, (-100%). As frações foram classificadas em: sem atividade (não tabuladas), com pouca atividade (aquelas que induziram inibição de até 50% do crescimento celular), com atividade moderada (aquelas que induziram inibição entre 50% e 75% do crescimento celular), e com muita atividade (aquelas que induziram inibição maior que 75% do crescimento celular) para cada linhagem celular testada.

Capítulo 3

Investigação de extratos de esponjas marinhas com atividade inibitória à enzima adenina fosforribosil transferase de *Leishmania tarentolae*

3.1. Introdução

3.1.1. Leishmanioses

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários parasitas da ordem Kinetoplastida. Essas doenças são consideradas grandes problemas de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento (Gramiccia et al., 2005; Davis et al., 2004). De acordo com a Organização Mundial da Saúde, há ocorrências das doenças no mundo todo, mas são consideradas endêmica em 88 países, com cerca de 12 milhões de pessoas afetadas mundialmente. As leishmanioses podem se manifestar clinicamente de três formas: visceral, mucocutânea e cutânea. Estima-se que há ocorrência de 1,5 a 2,0 milhões de novos casos anuais, dos quais, somente 600.000 são oficialmente registrados. Desses novos casos:

- 90% da Leishmaniose visceral ocorrem em cinco países (Brasil, Bangladesh, Índia, Nepal e Sudão);
- 90% da Leishmaniose mucocutânea ocorrem em três países (Brasil, Bolívia e Peru);
- 90% da Leishmaniose cutânea ocorrem em seis países (Brasil, Afeganistão, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria) e corresponde ao maior tipo de manifestação da doença de 1,0 -1,5 milhões de casos (WHO, 2000).

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

As formas de tratamento têm se baseado no uso de antimônios pentavalentes, como o antimonato de *N*-metil glucamina (Glucantime[®]) e o estibogluconato de sódio (Pentostam[®] da Glaxo ou Solustibosan[®] da Bayer) (Mardsen e Arruda, 1987; McGreevy e Marsden, 1986; Rath et al, 2003; Croft et al., 2003; Croft et al., 2005). A duração da terapia e a resposta clínica variam dependendo da região e da interação patógeno-hospedeiro. Na prática, a aplicação de altas doses destes medicamentos por

prolongados períodos é comum. Isto se deve, em parte, a rápida eliminação destes compostos da corrente sangüínea. Em casos de recidiva e nas infecções por *L. aethiopica* ou leishmanioses viscerais, indica-se o emprego da anfotericina B **(16)** (Fungizon®) (Geary et al., 1989; McGreevy e Marsden, 1986). A anfotericina B apresenta efeitos colaterais indesejados e até graves, necessitando ser ministrada em hospitais, o que representa uma dificuldade adicional no tratamento em se considerando as condições de saúde pública prevalentes nas regiões endêmicas. Esta terapia tem se mostrado pouco eficiente em diversos casos. Em pacientes resistentes ao Glucantime e ao Fungizon, não se identificam alternativas eficazes. Tende-se a repetir o tratamento, com doses nos limites da tolerância ou a utilizar o isotionato de pentamidina **(17)** como uma última alternativa (Marsden e Arruda, 1987; Rath et al., 2003; Croft et al., 2003). Aliado a baixa eficácia de tratamento, observam-se também diversas reações de toxicidade que vão desde náusea, vômitos, mialgia e até, nos casos mais graves, o choque, alterações eletrocardiográficas, hipersensibilidade e trombose venosa. A toxicidade é particularmente severa no tratamento de crianças e idosos ou indivíduos portadores de infecções oportunistas secundárias.

Estas características indesejáveis, associadas ao aparecimento de formas resistentes de *Leishmania* (Geary et al., 1989), têm aumentado a necessidade do desenvolvimento de drogas antileishmanióticas mais eficazes e menos tóxicas ao paciente.

3.1.2. Produtos naturais ativos contra *Leishmania* sp.

Os produtos naturais têm se mostrado com grande potencial na busca de novos compostos ativos, que possam ser alternativas de protótipos para os tratamentos mais eficazes e baratos e menos tóxicos.

A grande maioria dos produtos naturais ativos contra *Leishmania* spp., é de origem vegetal. Em revisão bibliográfica, Chan-Bacab e Peña-Rodriguez (2001) listam 97 compostos de origem vegetal ativos contra *Leishmania* spp., exibindo diferentes modos de ação. Estes incluem quinonas, chalconas, flavonóides, derivados de acetogeninas, um derivado poliacetilênico, alcalóides quinolínicos e isoquinolínicos, alcalóides indólicos e derivados, iridóides, mono-, sesqui-, di- e triterpenos, bem como saponinas triterpênicas (Chan-Bacab e Peña-Rodriguez, 2001).

Poucos trabalhos reportam o isolamento de produtos naturais marinhos ativos contra *Leishmania* spp.: os peróxidos cíclicos **18** - **21** da esponja *Plakortis* aff. *angulospiculatus* (Compagnone et al., 1998), a ilimaquinona (**22**), isolada de várias esponjas da Ordem Dactyloceratida (Rangel et al., 1997), e uma glicoproteína isolada da esponja *Pachymastima johnstonii* (Le Pape, 2000).

(18)

(19)

(20)

(21)

(22)

Uma série de alcalóides piridoacridínicos relacionados à ascididemina foram testados *in vitro* quanto à sua atividade antileishmaniose. Os compostos de **24** a **31** apresentaram pronunciada atividade contra a forma promastigota de *Leishmania donovani* com IC_{50} entre 0,78 e 8,7 $\mu\text{g/mL}$ e os compostos **23** e **32-34** atividade moderada com IC_{50} entre 37,0 e 85,0 $\mu\text{g/mL}$ (Copp et al., 2003).

(23)

(24) R: CH₂(25) R: CH=CH·N(CH₃)₂(26) R: CH₂CH₂·NH(CH₃)₂+Cl (27) R: S-CH₂CH₃(28) R: S-C₆H₅-CH₃(29) R: NH₂

(30)

(31)

(32) R: CH₃(33) R: CH=CH-N(CH₃)₂

(34)

Alguns alcalóides do tipo manzamina isolados de esponjas da Indonésia foram testados *in vitro* e comparados com dois medicamentos empregados na terapia da leishmaniose (a anfotericina B e a pentamidina), quanto à sua atividade contra a forma promastigota de *Leishmania donovani*. Os compostos a seguir se destacaram pela sua atividade inibitória: 12, 34-oxamanzamina A **35** (IC₅₀=14 µg/mL), manzamina A **36** (IC₅₀=0,9 µg/mL), 8- hidroximanzamina A **37** (IC₅₀=6,2 µg/mL), 6- deoximanzamina X **38** (IC₅₀=3,2 µg/mL), manzamina E **39** (IC₅₀=3,8 µg/mL), manzamina F **40** (IC₅₀=4,2 µg/mL), manzamina X **41** (IC₅₀=5,7 µg/mL), anfotericina B **16** (IC₅₀=0,06 µg/mL), pentamidina **17** (IC₅₀=2,1 µg/mL) e des-*N*-metilxestomanzamina A **42** (IC₅₀=35 µg/mL) (Rao et al., 2003).

A abordagem moderna para o desenvolvimento de fármacos antiparasitários explora enzimas únicas ao metabolismo do parasita ou que possuam diferenças de especificidade catalítica entre a enzima do parasita e a do hospedeiro. Estas enzimas podem ser empregadas como alvo no desenvolvimento de inibidores da cadeia metabólica, sem com isso afetar o hospedeiro. Para tanto, torna se indispensável a determinação da estrutura tridimensional da enzima, a caracterização do mecanismo de catálise e identificação do sítio catalítico, bem como de domínios reguladores presentes na mesma (Kubinyi, 1998). Análises filogenéticas mostram que os protozoários parasitas formam clades relativamente profundas, tendo divergido do restante da linhagem eucariota em um ancestral primitivo (Hollar et al., 1998; Maslov et al., 1999). Esta observação é uma evidência adicional que mesmo enzimas homólogas entre o hospedeiro e os parasitas podem ter divergido suficientemente permitindo o seu uso como alvos em abordagens de quimioterapia. Um estudo dessa magnitude requer o desenvolvimento de proteínas mutantes, resistentes a inibidores ou com

características cinéticas alteradas a fim de permitirem elucidar o mecanismo catalítico e os aminoácidos envolvidos no sítio catalítico. O primeiro composto desenvolvido desta forma foi o anti-hipertensivo Captopril®, um inibidor da enzima conversora da angiotensina. O acúmulo de dados referentes a estruturas cristalográficas e cinética de diversas enzimas levou ao desenho de vários compostos adicionais para o emprego clínico (Kubinyi, 1998).

Objetivando a descoberta de novas substâncias ativas contra leishmanioses, o grupo do professor Glaucius Oliva (IFSC-USP, São Carlos) desenvolveu um bioensaio que utiliza a PRTase adenina fosforribosil transferase (APRT) isolada de *Leishmania tarentolae* como um sistema modelo para testar a capacidade inibitória de produtos naturais. Assim, são testados extratos ou compostos puros, e o bioensaio é monitorado espectrofotometricamente (Tuttle e Krenitsky, 1980).

Até o momento foram relatados dois compostos isolados de plantas brasileiras que apresentaram atividade inibitória à L-APRT: a isopimpinellina **(43)** e a skimmianina **(44)**, (Napolitano et al., 2003 a e 2003b).

A isopimpinellina, isolada da planta *Adiscanthus fusciflorus* (Rutaceae) e coletada em Manaus, na floresta Amazônica, apresentou 50% de inibição enzimática da L-APRT a uma concentração de 50 µg/mL. Já a skimmianina, isolada da mesma planta, apresentou 68% de atividade inibitória em uma concentração de 50 µg/mL (Napolitano et al., 2003 a e 2003b).

(43) **(44)**

Considerando que os produtos naturais marinhos têm se mostrado de grande potencial para descoberta de novas substâncias bioativas, e tendo o Brasil uma grande e inexplorada biodiversidade marinha, é evidente a importância de se aprofundar a investigação de produtos naturais de organismos marinhos oriundos da costa do Brasil. Doenças como a leishmaniose representam um grande problema para o nosso país, bem como para outros países tropicais em desenvolvimento. Esses problemas estão

relacionados principalmente à falta de saneamento básico, com as terapias de alto custo nem sempre acessíveis a todas as classes sociais, bem como a toxicidade de medicamentos atualmente disponíveis, ou seja, a falta de novas opções de fármacos mais baratos e menos tóxicos. Em vista dessas deficiências, se torna cada vez maior a necessidade de pesquisadores que se empenhem na descoberta de novas substâncias químicas ativas contra a leishmaniose.

3.2. Parte experimental

3.2.1. Isolamento dos compostos químicos da esponja *Petromica ciocalyptoides*

Uma amostra da esponja *Petromica ciocalyptoides* foi coletada em 1999 na Bahia de Todos os Santos (Salvador, BA). Esse animal foi congelado e armazenado a -20°C . Uma alíquota do extrato bruto deste animal apresentou 99,21 % de inibição da L-APRT a uma dose de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

O trabalho de isolamento do composto ativo do extrato da esponja *Petromica ciocalyptoides* foi monitorado por bioensaio, de acordo com o procedimento sumarizado no **Esquema 3.1**.

Esquema 3.1. Fluxograma do estudo químico da esponja *Petromica ciocalyptoides*.

m- massa da fração.

B- porcentagem de atividade (em 50 µg/mL) no bioensaio da L-APRT.

A esponja foi liofilizada, triturada em MeOH e extraída mais duas vezes com o mesmo solvente. O extrato bruto foi filtrado e concentrado. Realizamos uma partição da suspensão MeOH-aquosa (com 300 mL de metanol, tendo 5 % de água) com n-hexano (300 mL de hexano, repetindo-se por três vezes), obtendo-se duas frações: a fração hexânica e a fração aquosa-metanólica.

Como a fração aquosa-metanólica apresentou maior atividade inibitória à L-APRT (65,92 %), essa fração foi submetida a uma separação cromatográfica de permeação em gel de Sephadex LH-20 com eluição isocrática de MeOH. As frações separadas foram analisadas por CCD (eluente: CH₂Cl₂/MeOH 7:3 e reveladores: lâmpada UV e ácido fosfomolibdico) e reunidas de acordo com sua similaridade cromatográfica, resultando em oito frações que foram submetidas ao bioensaio.

Das oito frações avaliadas no bioensaio de inibição da L-APRT, três apresentaram atividade acima de 50% e foram purificadas. São elas [seguidas de suas respectivas massas (m) e porcentagem de inibição enzimática da L-APRT (B)]: **PcS1** (m= 0,020 g e B= 76,20 %), **PcS2** (m= 0,774 g e B= 55,88 %) e **PcS8** (m= 0,720 g e B= 64,30 %).

Purificação da fração PcS1

Ao purificarmos a fração **PcS1** por HPLC em uma coluna C₁₈ (eluentes: MeOH e água 9:1), grande parte do material se perdeu por não termos detectado sinais no detector de ultravioleta. Assim, chegamos a conclusão que a separação por HPLC com detector de UV não ser a melhor opção para separação e isolamento desses compostos, pelo fato destes compostos não apresentarem absorção no UV ou apresentarem uma absorção muito baixa, de pequena intensidade e próxima a 200 nm. Prosseguimos com as separações das frações **PcS8** e **PcS2**, que se mostraram ativas no bioensaio e com massa suficiente para prosseguir o trabalho.

Fração PcS2

A fração **PcS2** (0,774 g) apresentou um composto majoritário por CCD (eluentes: CH₂Cl₂/MeOH 7:3 e reveladores: lâmpada UV e ácido fosfomolibdico) e 55,9 % de inibição da L-APRT. Metade desta fração foi submetida a uma cromatografia em coluna LiChroprep-Lobar de fase reversa C₁₈ com gradiente de MeOH em H₂O, como mostra o **Esquema 3.2**.

Esquema 3.2. Fluxograma do estudo da fração **PcS2**.

Após análise por CCD das frações obtidas (eluente: CH₂Cl₂/MeOH 7:3 e reveladores: lâmpada UV e ácido fosfomolibdico), estas foram reunidas em seis frações que foram submetidas ao bioensaio da L-APRT. Dentre as seis frações avaliadas em bioensaio, duas demonstraram ter atividade significativa: as frações **PcS2c** (m= 0,025 g e B= 96,6 %) e **PcS2d** (m= 0,154 g e B= 98,13 %).

A fração **PcS2d** demonstrou estar com bom grau de pureza por CCD. Sendo assim, foi analisada por EM, RMN e IV demonstrando ser o composto já conhecido na literatura como trissulfato de halistanol (Fusetani et al, 1981). A análise espectroscópica do trissulfato de halistanol é discutida no item 3.3.2.1 (página 43).

Hidrólise da fração PcS2d

Realizamos uma reação de hidrólise com 10 mg da amostra **PcS2d**, segundo procedimento descrito por Aoki et al (2002). A amostra foi dissolvida em 1 mL de dioxano e 1 mL de solução 10% de ácido sulfúrico (H_2SO_4) em um sistema de refluxo, aquecida a 140°C por três horas. O meio reacional foi então neutralizado com solução saturada de bicarbonato de sódio (NaHCO_3), e evaporado.

A amostra seca foi dissolvida em H_2O e submetida à cromatografia de fase reversa numa coluna Sep-Pak[®] C₁₈ (5 g) com gradiente de eluição de MeOH em H_2O para retirada do Na_2SO_4 . A fração contendo um composto majoritário, observado por CCD (eluente: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95:5 e reveladores: lâmpada UV e ácido fosfomolibdico) foi purificada por cromatografia em coluna Sep-Pak[®] de sílica gel (5 g) num gradiente de B em A, onde A foi uma mistura de CH_2Cl_2 95: 5 hexano e B foi i-PrOH. Após análise por CCD (eluente: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 95: 5 e reveladores: lâmpada UV e ácido fosfomolibdico), obtivemos sete frações. A sexta e sétima frações demonstraram ser o composto dessulfatado e foram reunidas por apresentarem similaridade cromatográfica.

Acetilação da fração PcS2d dessulfatada

A amostra **PcS2d-dessulfatada** (6,7 mg) foi transferida para um reator com MeOH e seca. A amostra foi dissolvida em 0,5 mL de piridina e em seguida adicionamos 0,5 mL de anidrido acético. A reação foi mantida sob agitação magnética por uma noite. Após a reação, os reagentes foram evaporados e o produto purificado por cromatografia em coluna Sep-Pak[®] de sílica gel (2 g, Waters) com um gradiente de B em A, onde A foi hexano e B foi uma mistura de CH_2Cl_2 -AcOEt 9:2. Após análise por CCD (eluente: 7A:3B e reveladores: lâmpada UV e ácido fosfomolibdico), a amostra **PcS2d dessulfatada e acetilada** teve seus espectros de RMN e EM obtidos e analisados. Pela análise do seu espectro de massas de alta resolução, concluímos ser **PcS2d** de fato o trissulfato de halistanol (Fusetani et al, 1981). Tais resultados são apresentados e discutidos no item 3.3.2.1 (página 43).

Purificação da fração PcS2c

A fração **PcS2c** também apresentou significativa atividade biológica (B= 96,6 %). Após várias tentativas de purificações desta fração por cromatografias em coluna C₁₈ do tipo Sep-Pak, a sua análise por RMN-¹H (MeOH-*d*₄, 400 MHz) sugeriu que a amostra estava aparentemente com bom grau de pureza.

Analisando os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C de **PcS2c**, verificamos a sua similaridade com o trissulfato de halistanol (PcS2d), observando sinais que indicaram a presença de grupos sulfato e de grupos hidroxila adicionais. Todavia, observamos que os espectros de RMN bidimensionais apresentaram sinais de impurezas que dificultaram a interpretação dos dados da amostra **PcS2c**. Sendo assim, resolvemos proceder com a mesma estratégia aplicada ao trissulfato de halistanol, ou seja, analisar seu derivado peracetilado. Dividimos a amostra **PcS2c** (m= 20,0 mg) em três partes. Um terço da amostra foi preservado; com outro 1/3 da amostra fizemos uma reação de dessulfatação e com o outro 1/3 fizemos uma reação de acetilação.

Com 1/3 da fração **PcS2c** realizamos sua acetilação, sem previamente a dessulfatar, visto que, diferentemente da fração PcS2d, a fração **PcS2c** apresentou grupos funcionais do tipo CH-OH e CH₂-OH, podendo ser acetilada. A amostra **PcS2c** (m= 6,6 mg) foi transferida para um reator e seca. A amostra foi dissolvida em 0,5 mL de piridina e em seguida foi adicionado 0,5 mL de anidrido acético, deixando-se a reação por uma noite com agitação magnética. Após a reação, a fração foi evaporada e purificada, inicialmente por cromatografia em modo reverso em coluna Sep-Pak[®] de sílica gel derivatizada com grupos fenila (1 g, Phenomenex) com gradiente de eluição de MeOH em água. Como a purificação não foi satisfatória, repurificamos a amostra por cromatografia em coluna Sep-Pak[®] C₁₈ (1 g, Phenomenex) com gradiente de eluição de MeOH em H₂O. Estando ainda impura e com apenas 3,0 mg de massa, realizamos uma outra purificação por HPLC, utilizando-se de uma coluna de sílica derivatizada com grupos fenila [Prodigy 5 µ, Phenyl-3 (PH-3) 100Å, de dimensões 250 x 4,6 mm, da marca Phenomenex[®]] com MeOH-H₂O 8:2, monitorando-se em 190 nm já que a amostra não apresentou absorção no UV.

Após a purificação obtivemos seis frações. Destas somente duas apresentaram massa acima de 1,0 mg: as frações **PcS2c-P1** (m= 1,2 mg) e **PcS2c-P2** (m= 1,0 mg). Estas foram submetidas a análises por RMN-¹H, verificamos que o produto se

concentrou na fração **PcS2c-P1**. Tendo em vista a pequena massa de produto obtido, e estando ainda impura e com grande quantidade do catalisador utilizado na reação de derivatização (DMAP), decidimos mudar de estratégia para proceder à purificação e caracterização da amostra **PcS2c**.

Já a amostra dessulfatada e acetilada foi submetida a duas etapas de purificação, mas ainda apresentou os sinais referentes à presença do catalisador utilizado na reação, a *N,N*-dimetil-4-aminopiridina.

Encontrando-se ainda significativamente contaminada, e em baixa quantidade, não demos continuidade à purificação da amostra **PcS2c1** dessulfatada e acetilada. Preferimos tentar empregar outra técnica de derivatização com o restante de amostra ainda disponível (cerca de 7 mg), de maneira a introduzir um cromóforo no composto, sem que fosse necessário o uso de DMAP. Além disso, introduzindo um (ou mais de um) grupo benzóico no composto majoritário da fração **PcS2c1**, estaríamos introduzindo um cromóforo que absorve em comprimento de onda acima de 280 nm com significativa absorvidade molar, de maneira a facilitar a purificação do produto derivatizado por HPLC. Para tanto, tentamos desenvolver uma metodologia de derivatização com 5,0 mg do cloreto do ácido benzóico com amostra dissolvida em DMSO, em um reator durante uma noite. No entanto a amostra perdeu suas características, provavelmente sofrendo degradação e decidimos não investir mais tempo na tentativa de purificar essa amostra.

Purificação da fração PcS8

Após a separação cromatográfica de permeação em gel de Sephadex LH-20 da fração aquosa-metanólica, a fração **PcS8** (m= 0,720 g e B= 64,3 %) que se mostrou ativa no bioensaio da L-APRT foi submetida a outras separações cromatográficas como sumariza o **Esquema 3.3**.

Esquema 3.3. Fluxograma do estudo da fração **PcS8**.

A fração **PcS8** foi submetida a uma cromatografia em coluna do tipo Sep Pak[®] com fase estacionária RP-C₁₈ (10 g, Waters) e gradiente de eluição de MeOH em água. Após análise por CCD (eluente: CH₂Cl₂/MeOH 7:3 e reveladores: lâmpada UV e ácido fosfomolibdico), obtivemos nove frações que foram submetidas ao bioensaio. Das nove frações obtidas, sete apresentaram atividade inibitória da enzima L-APRT acima de 80

%. Assim sendo, analisamos as frações por CCD e RMN-¹H e decidimos reunir devido a sua similaridade, as frações **PcS8e**, **PcS8f** e **PcS8g**.

A fração reunida e renomeada **PcS8e** (m= 0,136 g) foi submetida a uma cromatografia em coluna do tipo Sep Pak[®] com fase estacionária RP-C₁₈ (Phenomenex[®], 5 g) e gradiente de eluição MeOH em H₂O. Após análise por CCD (eluente: CH₂Cl₂/MeOH 7:3 e reveladores: lâmpada UV e ácido fosfomolibdico), obteve-se quatro frações as quais foram submetidas ao bioensaio da L-APRT.

Duas frações com atividade inibitória acima de 98% foram obtidas: as frações **PcS8e1** e **PcS8e2**, que apresentaram um bom grau de pureza. A fração **PcS8e2** foi também identificada como sendo o trissulfato de halistanol, apesar de estar ainda ligeiramente impura. A fração **PcS8e1** foi parcialmente identificada e, por ainda apresentar impurezas, será futuramente purificada.

Na investigação química dessa da esponja *Petromica ciocaliptyodes* foram isolados quatro compostos (**PcS2d**, **PcS2c**, **PcS8e1** e **PcS8e2**) inibidores da L-APRT. Os compostos **PcS2d** e **PcS8e2** foram identificados como sendo o **trissulfato de halistanol**. Sua análise espectroscópica é discutida no item **3.3.2.1** (página 50). O composto **PcS8e1** ainda impuro será futuramente purificado e identificado.

3.2.2. Isolamento dos compostos químicos da esponja *Topsentia ophiraphidites*

No ano de 2004 foi coletada uma amostra da esponja *Topsentia ophiraphidites* em Salvador (BA). Esse animal foi congelado e armazenado a -20° C. Uma alíquota do extrato bruto deste animal apresentou 87,5 % de inibição da L-APRT.

O trabalho de isolamento químico do extrato da esponja *Topsentia ophiraphidites* foi realizado de acordo com o procedimento sumarizado no **Esquema 3.4**.

Esquema 3.4. Fluxograma do estudo químico da esponja *Topsentia ophiraphidites*.

m- massa da fração.

B- porcentagem de atividade (em 50 µg/mL) no bioensaio da L-APRT.

O animal (m= 574,7 g) foi liofilizado, em seguida foi triturado em MeOH e extraído mais duas vezes com o mesmo solvente. O extrato bruto foi filtrado e concentrado. Realizamos uma partição com n-hexano (300 mL de hexano, repetindo-se por três vezes), obtendo-se duas frações: a fração hexânica e a fração aquosa-metanólica. A fração aquosa-metanólica foi seca e ressuspensa somente em água. Esta fração (300 mL) foi submetida a outra partição com AcOEt (300 mL, repetindo-se por três vezes), obtendo-se duas frações: a fração AcOEt e a fração aquosa.

A fração aquosa apresentou atividade inibitória à L-APRT e foi submetida a uma separação cromatográfica em coluna de permeação em gel de Sephadex LH-20 com eluição isocrática de MeOH. Após a separação cromatográfica, as frações foram analisadas por CCD (eluente: CH₂Cl₂/MeOH 8:2 e reveladores: lâmpada UV e ácido fosfomolibdico) e reunidas de acordo com sua similaridade cromatográfica, resultando em oito frações que foram submetidas ao bioensaio.

Das oito frações avaliadas no bioensaio de inibição da L-APRT, duas apresentaram atividade acima de 50% e perfis químicos semelhantes e foram reunidas. As frações **To2** (m= 0,211 g e B= 100,0 %) e **To3** (m= 0,083 g e B= 95,0 %) reunidas e renomeadas **To2**, foi submetida à cromatografia em coluna do tipo Sep Pak® com fase estacionária RP-C₁₈ (10 g, Waters) e gradiente de eluição MeOH em H₂O, como sumariza o **Esquema 3.5**.

Esquema 3.5. Fluxograma do estudo químico da fração **To2**.

m- massa da fração.

B- porcentagem de atividade (em 50 µg/mL) no bioensaio da L-APRT.

Após a separação cromatográfica em coluna C₁₈, as frações foram analisadas por CCD (eluente: CH₂Cl₂/MeOH 8:2 e reveladores: lâmpada UV e ácido fosfomolibdico) e reunidas de acordo com sua similaridade cromatográfica em oito frações que foram submetidas ao bioensaio.

Ao analisarmos a fração **To2e** por CCD verificamos estar com bom grau de pureza, e a submetemos à análise espectroscópica de RMN e EM. Concluímos tratar-se do mesmo composto isolado no estudo da esponja anterior *Petromica ciocalyptoides*, ou seja, o composto trissulfato de halistanol.

3.2.3. Isolamento dos compostos químicos da esponja *Callyspongia sp.*

A esponja foi coletada em São Sebastião no ano de 1997, e conservada em etanol a -20°C . A parte inicial do trabalho de fracionamento cromatográfico do extrato da esponja *Callyspongia sp.* foi realizado de acordo com o procedimento sumarizado no **Esquema 3.6**.

Esquema 3.6. Fluxograma do estudo do extrato bruto da esponja *Callyspongia sp.*

m- massa da fração.

B- porcentagem de atividade (em 50 µg/mL) no bioensaio da L-APRT.

O animal (massa úmida 15,25 g) foi triturado, extraído com MeOH, os extratos EtOH e MeOH foram filtrados, reunidos e evaporados. Após a evaporação, o extrato bruto (de massa 350,0 mg) foi submetido à cromatografia em coluna do tipo Sep-Pak® de fase normal com fase estacionária de sílica gel derivatizada com grupos cianopropila (10 g, Waters) e um gradiente de eluição utilizando como solventes apolares: hexano/CH₂Cl₂ (1:1) e solventes polares: AcOEt/MeOH (1:1). Obtivemos seis frações que foram reunidas por sua similaridade após análise por CCD (eluente: CH₂Cl₂/MeOH 9:1 e reveladores: lâmpada UV e ácido fosfomolibdico) e submetidas ao bioensaio. Das seis frações obtidas, três apresentaram porcentagem de inibição maior

a 50%. As frações **Ca3** (m= 40,6 mg e B= 61,54 %), **Ca4** (m= 35,5 mg e B= 93,85 %) e **Ca6** (m= 212,0 mg e B= 60,0 %). Analisando ainda as placas de CCD e seus espectros de RMN-¹H, pudemos concluir que as frações **Ca4** e **Ca6** apresentaram melhor grau de pureza e demos prioridade ao seu estudo.

Purificação da fração Ca4

Por apresentar uma atividade inibitória de 93%, a fração **Ca4** foi submetida à purificação por HPLC-UV, onde obtivemos dois picos majoritários, ambos sem atividade, o que nos levou a concluir que esse método de separação não é o melhor nesse caso. Com os 15 mg restantes desta fração realizamos uma cromatografia em coluna do tipo Sep Pak[®] com fase estacionária RP-C₁₈ (5 g) e gradiente de eluição MeOH em H₂O, resultando em cinco frações que foram reunidas após análise por CCD (eluente: CH₂Cl₂/MeOH 9:1 e reveladores: lâmpada UV e ácido fosfomolibdico) e submetidas ao bioensaio, como mostra o **esquema 3.7**.

Esquema 3.7. Fluxograma do estudo químico da fração **Ca4**.

m- massa da fração.

Essa separação cromatográfica demonstrou ser adequada na purificação do composto ativo. Todavia, estando esta fração ainda impura e com uma massa muito pequena, demos maior enfoque ao estudo dos constituintes ativos da fração **Ca6**.

Purificação da fração Ca6

A fração **Ca6** (m= 212,0 mg e B= 60,0 %) que se mostrou ativa no bioensaio da L-APRT foi submetida a separações cromatográficas como sumariza o **esquema 3.8**.

Esquema 3.8. Fluxograma do estudo químico da fração **Ca6** da esponja *Callyspongia sp.*
m- massa da fração.

B- porcentagem de atividade (em 50 µg/mL) no bioensaio da L-APRT.

a- condições: coluna de sílica-gel derivatizada com grupos C₁₈ (CSC- Inertsil 150 Å/ODS 2 de 5 µm, de dimensões 25 x 0,94 cm); eluição isocrática de 75:25 de MeCN- solução 0,1 M NaClO₄; e fluxo de 2 mL/min; detector de índice de refração.

b- coluna do tipo Sep-Pak[®] RP-C₁₈ (Waters, 2 g) eluindo 25 mL de H₂O e em seguida 50 mL de MeOH

c- coluna de dimensões 32 cm x 0,4 cm, com eluição isocrática de MeOH

Por apresentar atividade inibitória de 60%, submetemos a fração **Ca6** à cromatografia em coluna do tipo Sep Pak[®] com fase estacionária RP-C₁₈ (10 g, Waters) e gradiente de eluição de MeOH em H₂O, resultando em nove frações, que foram avaliadas em bioensaio. Das nove frações obtidas, quatro frações apresentaram porcentagem de inibição acima de 50%. Porém dessas quatro, três apresentam massa abaixo de 3,0 mg (**Ca6d** de m= 2,0 mg e B= 72,73 %), (**Ca6e** de m= 2,5 mg e B= 92,73 %) e (**Ca6g** de m= 0,3 mg e B= 90,91 %) e somente uma acima de 10,0 mg (**Ca6f** de m= 13,4 mg e B= 100,0 %). Ao analisarmos melhor a fração **Ca6f**, verificamos ainda estar na forma de mistura. A fração **Ca6f** foi submetida a uma cromatografia em coluna igual a do tipo Sep Pak[®] com fase estacionária RP-C₁₈ (2 g, Phenomenex) e gradiente de eluição MeOH em H₂O. Após análise por CCD (eluente: CH₂Cl₂/MeOH 8:2 e reveladores: lâmpada UV e ácido fosfomolibdico), obtivemos quatro frações as quais foram submetidas ao bioensaio da L-APRT.

Com essa separação pudemos verificar que essa cromatografia foi eficiente na purificação da fração ativa (**Ca6f**), onde se obteve duas frações ativas a **Ca6f2** e **Ca6f3**. A fração **Ca6f2** mostrou ser uma mistura de dois compostos. Devido a sua pequena quantidade de massa, nosso colaborador Prof. Raymond J. Andersen se propôs a finalizar a separação desta mistura e adquirir de seus dados espectroscópicos a 600 MHz (disponível na University of British Columbia) para a determinação estrutural das substâncias presentes nesta fração.

A mistura contida na fração **Ca6f2** foi separada por nossos colaboradores por HPLC com detector de índice de refração, utilizando-se de uma coluna de sílica-gel derivatizada com grupos C₁₈ (CSC- Inertsil 150 Å/ODS 2 de 5 µm, de dimensões 25 x 0,94 cm), eluição isocrática de 75:25 de MeCN- solução 0,1 M NaClO₄ e fluxo de 2 mL/min. Após a separação as amostras se apresentaram contaminadas com NaClO₄ e octadecilsilano (ODS) e foram purificadas em uma coluna do tipo Sep-Pak[®] (Waters, 2 g) eluindo 25 mL de H₂O e em seguida 50 mL de MeOH. Por fim, as amostras foram purificadas por cromatografia em uma pequena coluna de permeação em gel de Sephadex LH-20 (dimensões 32 cm x 0,4 cm) com eluição isocrática de MeOH. Os dois compostos puros e ativos (**Ca6f2a**, m= 0,7 mg e **Ca6f2b**, m= 0,3 mg) tiveram suas estruturas determinadas como sendo dois compostos inéditos na literatura e nomeados por nós como ilhabelanol e ilhabreno, respectivamente, em homenagem ao local de coleta da esponja, Ilhabela (litoral Norte de São Paulo).

Ao analisarmos a fração **Ca6f3** (m= 3,0 mg), verificamos estar com bom grau de pureza e foi submetida à análise espectroscópica por EM e RMN. Pela análise do espectro de massas de alta resolução concluímos ser **Ca6f3** um isômero do composto conhecido na literatura com akaterpina (Fukami et al., 1997) e nomeado por nós como isoakaterpina.

3.3. Resultados e Discussão

Entre os anos de 1995 a 2004 foram coletados 439 invertebrados marinhos e seus extratos foram testados quanto a sua inibição à enzima adenina fosforribosil transferase, desenvolvido pelo grupo do professores Glaucius Oliva e Otávio Thiemann, do Instituto de Física da USP de São Carlos.

Dos 439 extratos testados, apenas 12 extratos de invertebrados marinhos (sendo oito diferentes, dentre eles) apresentaram atividade inibidora à enzima L-APRT em uma concentração de 50 µg/ mL (**Gráfico 3.1**).

Gráfico 3.1. Atividade de extratos brutos de invertebrados marinhos frente à inibição da enzima L-APRT (APRT de *Leishmania tarentolae*).

Os extratos **SS95-3** e **SS97-2** se referem a extratos da mesma espécie de invertebrado, a ascídia *Polysyncraton ametystheum*, coletada em duas diferentes épocas (1995 e 1997). Ambos extratos apresentaram um perfil de atividade bastante semelhante. O extrato bruto **SS97-18** é de um briozoário, do gênero *Bugula*. Todos os outros extratos ativos contra L-APRT são de esponjas marinhas: **SS97-23** *Callyspongia* sp., **BA99ES-55** *Pseudoaxinella reticulata*, **BA99ES-67** esponja da ordem Dendroceratida, **BA99ES-75** *Ptilocaulis walpersi*, **BA99ES-103** *Petromica*

ciocalyptoides e quatro extratos **BA04ES-16**, **BA04ES-41**, **BA04ES-46** e **BA04ES-61** que se referem a mesma espécie de esponja, *Topsentia ophiraphidites*.

Dos oito extratos dos invertebrados marinhos que apresentaram atividade, sete tiveram seus estudos iniciados, exceto o extrato bruto **SS97-18** (de um briozoário) que já havia sido extraído em um estudo com outro objetivo. Então, dos sete extratos restantes, finalizamos o estudo de quatro invertebrados. Os dois extratos **BA99ES-55** (*Pseudoaxinella reticulata*) e **BA99ES-67** (esponja da ordem Dendroceratida), tiveram seus estudos interrompidos porque seus compostos apresentaram absorção no UV no mesmo comprimento de onda utilizado no bioensaio, podendo interferir no resultado gerando “falsos positivos”. Os extratos **SS95-3** e **SS97-2** referentes à ascídia *Polysyncraton ametystheum* não tiveram sua investigação química finalizada por apresentar frações extremamente complexas e possivelmente com diversos compostos que apresentavam atividades, o que ocasionava a dispersão das atividades no decorrer das separações. O extrato referente a esponja *Ptilocaulis walpersi*, teve seus compostos ativos isolados e parcialmente caracterizados (não apresentados nessa tese).

Portanto, dentre os extratos que apresentaram atividade inibitória à L-APRT três esponjas marinhas tiveram seus extratos investigados e seus compostos ativos isolados. São as esponjas: *Petromica ciocalyptoides*, *Topsentia ophiraphidites* e *Callyspongia* sp.

3.3.1. Estudo químico da esponja *Petromica ciocalyptoides*

A esponja *Petromica ciocalyptoides* (**Figura 3.1**) foi descrita pela primeira vez por van Soest & Zea (1986) e sua classificação é apresentada na **Figura 3.2**. Essa espécie pode apresentar cor amarela clara a branca e possuir consistência macia e levemente quebradiça.

Figura 3.1. Foto da esponja *Petromica ciocalyptoides* (Hajdu e Muricy).

Encontra-se de 4 a 34 m de profundidade, abrigada do embate de ondas. Habita substratos rochosos horizontais ou sub-horizontais, geralmente com sua parte inferior enterrada na areia. Sua distribuição se restringe ao Atlântico Central (Caribe), Brasil: Rio de Janeiro (Arraial do Cabo, Búzios), Bahia (Salvador) e Pernambuco (Fernando de Noronha).

Filo: Porifera
Classe: Demospongiae
Subclasse: Ceractinomorpha
Ordem: Halichondrida
Família: Halichondriidae
Espécie: *Petromica ciocalyptoides*

Figura 3.2. Taxonomia da esponja *Petromica ciocalyptoides*.

O extrato bruto da esponja *Petromica ciocalyptoides* (**BA99ES-103**) apresentou 99,2 % de atividade inibitória à enzima L-APRT em uma concentração de 50 µg/mL. O isolamento biomonitorado de seus compostos ativos levou a obtenção de dois compostos puros: **PcS2d** e **PcS8e2**, ambos demonstraram ser esteróis polihidroxilados sulfatados.

3.3.2. Estudo químico da esponja *Topsentia ophiraphidites*

A esponja *Topsentia ophiraphidites* (**Figura 3.3**) foi descrita pela primeira vez por deLaubenfels (1934) e sua classificação é apresentada na **Figura 3.4**. Essa espécie pode ser encontrada de 20 a 180 m de profundidade.

Figura 3.3. Foto da esponja *Topsentia ophiraphidites* (Hajdu e Muricy).

Sua distribuição se restringe ao Atlântico Central (Caribe), Brasil: Rio de Janeiro (Arraial do Cabo, Búzios), Bahia (Salvador) e Pernambuco (Fernando de Noronha e Tamandaré) e Maranhão.

Filo: Porifera
Classe: Demospongiae
Subclasse: Ceractinomorpha
Ordem: Halichondrida
Família: Halichondriidae
Espécie: *Topsentia ophiraphidites*

Figura 3.4. Taxonomia da esponja *Topsentia ophiraphidites*.

O extrato bruto da esponja *Topsentia ophiraphidites* (**BA04ES-16**) apresentou 87,3 % de atividade inibitória à enzima L-APRT em uma concentração de 50 µg/mL. O isolamento biomonitorado de seu composto ativo levou a obtenção da fração ativa **To2e**, a qual também foi identificada como sendo um esteroide polihidroxiado sulfatado.

3.3.2.1. Determinação estrutural dos compostos PcS2d e PcS8e2, isolados da esponja *Petromica ciocalyptoides*, e To2e isolada da esponja *Topsentia ophiraphidites*.

As frações **PcS2d**, **PcS8e2** e **To2e** demonstraram ser o mesmo composto, conhecido na literatura como trissulfato de halistanol (Fusetani et al., 1981).

A fração **PcS2d** foi obtida como um sólido amorfo bege opticamente ativo com $[\alpha]_D^{29,4} = + 9,97^\circ$ (c 0,084, MeOH) e apresentou em seu espectro de absorção no infravermelho (filme em disco de silício) as seguintes bandas (**V.2, Figura 3.1**):

- 3433,3 cm⁻¹, de deformação axial de O-H;
- 2868,5 e 2954,0 cm⁻¹, de deformação axial de C-H alifático;
- 1661,28 cm⁻¹, de deformação angular de C=C ou de C=N;
- 1247,6 e 1211,7 cm⁻¹, típicas de vibrações simétrica e assimétrica de grupos sulfato

O seu espectro no ultravioleta em MeOH não apresentou absorção entre 200 e 400 nm.

O conjunto de espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (V.2, Figuras 3.2 e 3.3) e bidimensionais do composto **PcS2d** demonstrou que a amostra é um esterol sulfatado.

O espectro de RMN- ^1H de **PcS2d** (V.2, Figura 3.2, indica, dois sinais de hidrogênios alargados em δ 4,80 (1H) e 4,75 (1H), um sinal de hidrogênio em carbono oxigenado em δ 4,19 (1H), sinais de hidrogênios entre os deslocamentos δ 2,4 e 0,5, típicos de esqueleto terpênico do tipo esteroidal, além de sinais de hidrogênios entre δ 4,0 e 3,0 que demonstraram ser de impurezas presentes na amostra.

No espectro de RMN- ^{13}C de **PcS2d** (V.2, Figura 3.3) pudemos distinguir 29 sinais de carbonos.

As atribuições dos sinais de hidrogênios ligados aos seus respectivos carbonos pôde ser realizada pela análise do espectro de HMQC de **PcS2d** (V.2, Figura 3.4).

A análise do espectro COSY ^1H - ^1H de **PcS2D** (V.2, Figura 3.5) permitiu-nos construir 4 seqüências de hidrogênios acoplados entre si, como ilustradas a Figura 3.3.

Figura 3.3. Esquema de correlações observado no espectro de RMN do tipo COSY para o composto **PcS2d**.

Estas sub-estruturas puderam ser conectadas observando-se acoplamentos à longa distância no espectro HMBC (V.2, Figuras 3.6a, 3.6b e 3.6c) de **PcS2d**, como indicado na Figura 3.4.

Figura 3.4. Esquema de correlações observado no espectro de RMN do tipo HMBC para o composto **PcS2d**.

Com as conexões entre os anéis A, B, C e D estabelecidas, bem como com o ponto de conexão da cadeia C-20 a C-29, fizemos uma busca na literatura, utilizando a base de dados bibliográfica MARINLIT, que permite a busca de sub-estruturas com o programa ChemFinder. Dentre as estruturas que encontramos com grupos sulfato nas posições 2, 3 e 6 do sistema tetracíclico hexadecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantreno, a estrutura que apresentou dados de RMN- ^{13}C com melhor concordância com os dados de RMN- ^{13}C da substância **PcS2d** foi o trissulfato de halistanol (**45**), como pode ser verificado na **Tabela 3.1** (Fusetani et al., 1981).

Tabela 3.1. Dados de RMN- ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de **PcS2d** em $\text{MeOH-}d_4$ e de RMN- ^{13}C do trissulfato de halistanol (**45**) (25 MHz) em $\text{MeOH-}d_4$ (Fusetani et al., 1981).

	PcS2d		45
Posição	$\delta^{13}\text{C}^a$	$\delta^1\text{H}$ (mult, <i>J</i> em Hz)	$\delta^{13}\text{C}$
CH_2 -1	39,2	2,11 (dl, 14,3) 1,46 (m)	40,1
CH-2	75,7	4,75 (sl)	75,5
CH-3	75,8	4,80 (sl)	75,5
CH_2 -4	25,1	2,29 (dl, 14,5) 1,78 (tl, 14,4)	25,1
CH-5	45,4	1,62 (m)	45,4
CH-6	78,8	4,19 (dt, 4,4 e 10,9)	78,8
CH_2 -7	40,1	2,36 (dl, 10,2) 1,04 (m)	39,2
CH-8	35,2	1,53 (m)	35,2
CH-9	55,8	0,73 (m)	55,9
C-10	37,7		37,7
CH_2 -11	21,9	1,33 (m)	21,9
CH_2 -12	41,1	2,01 (dl, 12,4) 1,15 (m)	41,2
C-13	43,8		43,8
CH-14	57,3	1,16 (m)	57,4
CH_2 -15	25,2	1,61 (m) 1,11 (d, 6,3)	25,1
CH_2 -16	29,2	1,86 (m) 1,64 (m)	29,2
CH-17	57,6	1,13 (m)	57,7
CH_3 -18	12,5	0,69 (s)	12,5
CH_3 -19	15,3	0,83 (s)	15,3
CH-20	37,7	1,38 (m)	37,7
CH_3 -21	19,6	0,95 (d, 7,4)	19,5
CH_2 -22	36,6	1,58 (m) 0,90 (m)	36,6
CH_2 -23	29,2	0,86 (m)	29,2
CH_2 -24	45,4	0,99 (m)	45,4
CH-25	34,1		34,1
CH_3 -26	27,8	0,85 (s)	27,8
CH_3 -27	27,8	0,85 (s)	27,8
CH_3 -28	15,0	0,83 (d, 6,7)	15,0
CH_3 -29	27,8	0,85 (s)	27,8

^aAtribuições por detecção inversa (HMQC)

No espectro de massas da amostra **PcS2d** (V.2, **Figura 3.7**) observamos um pico de íon-molecular de intensidade muito pequena em m/z 709, que corresponderia ao adulto de sódio protonado do trissulfato de halistanol (**45**).

Como não foi possível obtermos um espectro de massas adequado que confirmasse de maneira inequívoca nossa proposta estrutural da amostra **PcS2d**, e de maneira a verificarmos a importância dos grupos sulfato do trissulfato de halistanol (**PcS2d**) em sua atividade biológica, realizamos uma reação de hidrólise com 10 mg da amostra **PcS2d**, **Figura 3.5**.

Figura 3.5. Esquema de reação de dessulfatação do trissulfato de halistanol (**45**) seguido de sua acetilação, de maneira a obter o produto peracetilado (**47**), Aoki et al (2002).

O espectro de RMN- ^{13}C da amostra obtida (V.2, **Figura 3.8**) após a reação de dessulfatação e purificação do produto obtido por cromatografia em coluna de fase reversa C_{18} e por cromatografia em coluna de sílica gel, indicou que ocorreu a dessulfatação dos grupos hidroxila, uma vez que o deslocamento químico dos carbonos oximetílicos, antes observados entre δ 75 e 79, agora são observados entre δ 67 e 70.

A reação de dessulfatação forneceu o composto **46** o qual não foi caracterizado e sim diretamente submetido à reação de acetilação após sua purificação. O composto peracetilado **47** forneceu espectro de massas em modo impacto de elétrons (V.2, **Figuras 3.9a, 3.9b e 3.9c**) que indicou picos em m/z 574 $[M]^+$, m/z 514 $[M-AcOH]^+$, m/z

454 $[M - 2AcOH]^+$, m/z 412 $[M - 2AcOH - H_2CCO]^+$ e m/z 394 $[M - 3AcOH]^+$, que confirmaram a estrutura proposta para o esterol trissulfatado isolado de *P. ciocalyptoides*. Uma medida de massa exata sobre o sinal em m/z 574 do espectro de massas de **47** forneceu um valor de 574,42324 (calculado: 574,42334, Δmu 0,1 ppm), que confirmou a estrutura proposta. Sendo assim, o principal constituinte ativo, inibidor da enzima L-APRT, isolado de *P. ciocalyptoides* demonstrou ser o trissulfato de halistanol (**36**).

O composto **PcS8e2**, obtido a partir do fracionamento cromatográfico biomonitorado do extrato bruto de *P. ciocalyptoides* foi também identificado como sendo o trissulfato de halistanol, apesar de estar ainda ligeiramente impuro como pôde ser observados nos espectros de RMN de 1H e ^{13}C (V.2, Figuras 3.10 e 3.11). O composto **To2e**, obtido a partir do fracionamento cromatográfico biomonitorado do extrato bruto de *T. ophiraphidites* foi também identificado como sendo o trissulfato de halistanol, como pode ser observado nos espectros de RMN de 1H e ^{13}C (V.2, Figuras 3.12 e 3.13).

Este esterol trissulfatado foi originalmente isolado da esponja *Halichondria* cf. *moorei* (Fusetani et al., 1981), e subseqüentemente de outras esponjas (Kanazawa et al., 1992; Sperry and Crews, 1997; Yang et al., 2003).

O trissulfato de halistanol (**45**) isolado da esponja *Halichondria* cf. *moorei* inibiu o crescimento de fungos e de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas não especificadas (Fusetani et al., 1981; Kanazawa et al., 1992). Substâncias análogas foram posteriormente isoladas da esponja *Pseudaxinissa digitata*, e apresentaram inibição atividade citoprotetiva contra o vírus HIV em concentrações da ordem de μM (Bifulco et al., 1994). Outro esterol sulfatado foi isolado da esponja *Pachastrella* sp. e apresentou atividade inibidora da enzima conversora da endotelina (Patil et al., 1996). Ainda outros esteróis sulfatados foram isolados da esponja *Petrosia strongylata*, e apresentaram atividade inibidora da enzima timidina fosforilase em concentrações da ordem de μM (Aoki et al., 2002). O próprio trissulfato de halistanol (**45**) apresentou atividades hemolítica (Moni et al., 1992), inibidora da enzima PP60(V-SRC) do tipo tirosina-quinase (Slate et al., 1994), atividade anti-incrustante contra larvas da craca *Balanus amphitrite* com dose de inibição de 2,9 $\mu g/mL$ (Tsukamoto et al., 1997).

(48)
sulfato de halistanol F

(49)
sulfato de halistanol G

(50)
dissulfato de halistanol B

(51)
lembesterol A

(52)
lembesterol B

No nosso caso, o trissulfato de halistanol (**45**) isolado de *Petromica ciocalyptoides* apresentou atividade inibidora da enzima adenina fosforribosil transferase de maneira dose-dependente, com inibição de 92% em uma concentração de 25 µg/mL ou IC₅₀ de 2,87 µg/mL.

O trissulfato de halistanol (**45**) não apresentou atividade inibitória frente às outras PRTases: a hipoxantina-guaniafosforribosil-transferase (HGPRT), xantina-fosforribosil-transferase (XPRT) e H-APRT (adenina-fosforribosil-transferase de *Homo sapiens*).

Como é bem conhecido o fato de compostos sulfatados apresentarem diversas atividades biológicas devido a presença de seus grupos sulfato, o composto, após sua

hidrólise, foi avaliado quanto sua atividade biológica. O trissulfato de halistanol dessulfatado (**47**) deixou de apresentar atividade enzimática à L-APRT, na ausência de seus grupos sulfatos.

O composto trissulfato de halistanol foi avaliado ainda quanto sua atividade antiprotozoária, tendo sido testado diretamente na forma promastigota do protozoário *Leishmania chagasi* e não apresentou atividade biológica neste bioensaio.

Este é o primeiro isolamento de um esterol sulfatado a partir de esponjas coletadas da costa do Brasil (*Petromica ciocalyptoides* e *Topsentia ophiraphidites*). Tendo em vista o isolamento do trissulfato do halistanol de espécies de esponjas não relacionadas taxonomicamente, tudo indica ser este um metabólito relativamente comum em esponjas marinhas, que apesar de não ser um composto inédito apresenta uma excelente atividade biológica no bioensaio da L-APRT.

3.3.4. Estudo químico da esponja do gênero *Callyspongia* sp

A esponja do gênero *Callyspongia* (**Figura 3.6**) foi descrita pela primeira vez por Duchassaing e Michelotti (1864) e sua classificação é apresentada na **Figura 3.7**. Essa espécie pode apresentar cor laranja, creme, marrom clara, rosa ou violeta. A espécie é encontrada em cavidades e nas faces inferiores de pedras, protegidas da luz. Sua distribuição se restringe ao Caribe (Curaçao, Bonaire, Jamaica, Bahamas), Brasil: Rio de Janeiro (Arraial do Cabo), Bahia (Salvador) e São Paulo (Ilhabela, São Sebastião).

Figura 3.6. Foto da esponja *Callyspongia* sp (Hajdu e Muricy).

Filo: Porifera
Classe: Demospongiae
Subclasse: Ceractinomorpha
Ordem: Haplosclerida
Família: Callyspongiidae
Gênero: *Callyspongia*

Figura 3.7. Taxonomia da esponja *Callyspongia* sp.

O extrato bruto da esponja do gênero *Callyspongia* (**SS97-23**) apresentou 61,1 % de atividade inibitória à enzima L-APRT em uma concentração de 50 µg/ mL. O isolamento biomonitorado de seus compostos ativos levou a obtenção de 3 substâncias inéditas: o ilhabelanol (**Ca6f2a**), o ilhabreno (**Ca6f2b**) e a isoakaterpina (**Ca6f3**).

3.3.5. Determinação estrutural dos compostos ilabelanol (**Ca6f2a**), ilhabreno (**Ca6f2b**) e isoakaterpina (**Ca6f3**), isolados da esponja do gênero *Callyspongia*.

O ilabelanol (fração **Ca6f2a**) foi obtido como um sólido amorfo incolor opticamente ativo com $[\alpha]_D^{22} = -26^\circ$ ($c = 0,28$, MeOH) e apresentou em seu espectro de massas de alta resolução (**V.2, Figura 3.14**) em modo spray de elétrons (HRESIMS) positivo um pico de íon pseudo-molecular $[M+Na]^+$ em m/z 763,2892 (valor calculado 763,2902) indicando a fórmula molecular $C_{36}H_{54}Na_3O_9S_2$.

Seu espectro de RMN- 1H (**V.2, Figura 3.15**) apresentou sinais típicos de um sistema aromático 1,2,4- trissubstituído, do tipo hidroquinona [δ_H 7,06 (H-5', dd, $J = 8,8$ e $2,4$ Hz), 7,30 (H-3', d, $J = 2,4$ Hz) e 7,37 (H-6', d, $J = 8,8$ Hz)] o qual demonstrou pelos espectros COSY (**V.2, Figura 3.16**) e HMBC (**V.2, Figura 3.17**) estar ligado através de um grupo metilênico [δ_H 2,73 (H-1, dl, $J = 16,0$ Hz) e 2,90 (H-1, dd, $J = 16,0$ e $9,4$ Hz)] a um sistema insaturado, como mostra a **figura 3.8**.

Figura 3.8. Correlações observadas nos espectros de RMN- 1H , COSY e HMBC (CD_3OD , 600 MHz) para parte do composto **ilabelanol**.

Uma busca na literatura indicou que existem compostos com dados de RMN- 1H e ^{13}C similares a este fragmento do ilabelanol (**Ca6f2a**). São os compostos: adociaquinol (**53**) e o adociassulfato 12 (**54**), isolados da esponja *Haliclona* sp (West and Faulkner, 2006). Os isômeros zonarol (**55**) e isozonarol (**56**) isolados da alga marrom *Dictyopteris zonarioides* (Fenical and Sims, 1973) também apresentam esse fragmento em parte de sua estrutura. No entanto, seus dados de RMN de 1H e ^{13}C não foram reportados para comparação com o nosso fragmento (**Figura 3.9**).

Figura 3.9. Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C de compostos encontrados na literatura [adociaquinol ($\text{DMSO}-d_6$), adociassulfato (CD_3OD), zonarol e isoazonarol], com parte da estrutura do composto ilhabanol (CD_3OD).

Comparando este fragmento do composto ilhabanol com os encontrados na literatura, podemos notar que os valores de deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C do

composto adociassulfato (**53**) são praticamente idênticos aos valores de deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C do ilhabelanol, sugerindo muito provavelmente a presença dos grupos sulfatos substituídos na posição 1' e 4' no anel.

A análise dos espectros de RMN do tipo COSY e HMBC (V.2, Figuras 3.16, 3.17, respectivamente) indicou que a parte terpênica do ilhabelanol consiste de dois sistemas bicíclicos do tipo drimano, ligados entre si através de um grupo metilênico. As correlações observadas ^1H - ^{13}C à longa distância no espectro HMBC e ^1H - ^1H do espectro de COSY permitiu a construção completa de seu esqueleto de carbono (Figura 3.10), bem como nos permitiu a comparação dos valores de RMN- ^1H e de ^{13}C com os modelos das estruturas adociaquinol (**53**) e o adociassulfato 12 (**54**), como mostra a Figura 3.11.

A posição do grupo hidroxila e da dupla ligação foram estabelecidas pela análise de seu espectro de HMBC, que indicou correlações entre os hidrogênios benzílicos e o metino C-2 [δ_{C} 56,4 (d)] e o carbono olefínico C-3 [δ_{C} 137,1 (s)], indicando a localização da dupla ligação entre C-3 e C-4. Esta atribuição foi confirmada pela observação de correlações à longa distância entre o grupo metila vinílico [δ_{H} 1,43 (CH_3 -24, sl)] e C-2 [δ_{C} 56,4 (d)], entre H-2 [δ_{H} 2,41 (1H, dl, $J = 8,9$ Hz)] e C-3 [δ_{C} 137,1 (s)], de correlações HMBC recíprocas entre H-4 [δ_{H} 5,33] e C-24 [δ_{C} 23,0] e C-4 [δ_{C} 123,0 (d); δ_{H} 1,43 (CH -24, sl)], bem como de correlações COSY ^1H - ^1H entre os hidrogênios alílicos [δ_{H} 1,97 (CH_2 -5, m)] e H-4 em [δ_{H} 5,33]. Correlações à longa distância observadas entre CH_2 -13 [δ_{H} 1,25 e δ_{H} 1,33], CH_2 -16 [δ_{H} 1,45 e δ_{H} 1,75], CH_2 -17 [δ_{H} 1,47 e δ_{H} 1,60], e o grupo metila CH_3 -27 [δ_{H} 1,13], com o grupo carbinólico indicaram a localização deste em C-15 [δ_{C} 74,2].

Figura 3.10. Correlações observadas nos espectros de RMN- ^1H , COSY e HMBC (CD_3OD , 600 MHz) para parte do composto **ilhabelanol (57)**.

Figura 3.11. Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C de compostos encontrados na literatura adociaquinol ($\text{DMSO}-d_6$), adociassulfato (CD_3OD), com partes da estrutura do composto ilhabelanol (CD_3OD).

As estereoquímicas relativas dos dois sistemas decalina do ilhabelanol foram estabelecidas pela análise do espectro bidimensional NOESY (V.2, **Figura 3.19**). Observou-se correlações entre H-1 [δ_H 2,90] e CH₃-25 [δ_H 0,96], e CH₂-12 [δ_H 1,72], que indicaram orientação 1,3-diaxial entre C-12 e Me-25, e uma relação 1,2-*cis* entre C-1 e C-25. Correlações NOESY observadas entre H-2 [δ_H 2,41] e o próton axial H-8^a [δ_H 1,23] e H-6 [δ_H 1,36], e entre H-6 e a metila equatorial CH₃-26 [δ_H 0,95] confirmaram a estereoquímica relativa de C-2 e a junção cíclica *trans* entre os anéis C e D.

Foram observados ainda correlações NOESY entre H-14 [δ_H 0,71] e H-18 [δ_H 0,90], indicando que estes dois hidrogênios apresentam relação 1,3 diaxial. O deslocamento químico de ¹³C de Me-28 [δ_C 16,0] demonstrou que este está na posição axial, estabilizando a junção *trans* entre os anéis A e B e *cis* em relação a C-13, como mostra a **Figura 3.12**.

Figura 3.12. Esquema de correlações observadas no espectro NOESY para ilhabelanol (57).

A partir dos dados obtidos da interpretação dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C (V.2, **Figura 3.18**) e bidimensionais foi possível construir a **tabela 3.2**.

Tabela 3.2. Dados de RMN-¹H (CD₃OD, 600 MHz) e ¹³C (CD₃OD, 150 MHz) de ilhabelanol (**Ca6f2a**).

Carbono	δ _C ppm (mult.)	δ _H ppm (int., mult., J/Hz)	correlações HMBC	acoplamentos COSY
1	28,1 (t)	2,73 (1H, d, 16,0) 2,90 (1H, dd, 16,1, 9,4)	C-2, C-3, C-7, C-1', C-2', C-3'	H-2
2	56,4 (d)	2,41 (1H, dl, 8,9)	C-3	H-1, H-4, H-5, H-24
3	137,1 (s)			
4	123,0 (d)	5,33 (1H, sl)	C-24	H-2, H-5, H-24
5	24,4 (t)	1,97 (2H, m)	C-6, C-7	H-2, H-2, H-6
6	54,0 (d)	1,36 (1H, m)	C-2, C-5, C-7, C-11, C-25	H-5
7	38,3 (s)			
8	40,9 (t)	1,23 (1H, m) 1,95 (1H, m)	C-6, C-10	H-9
9	20,1 (t)	1,47 (1H, m)	C-8	H-8, H-10
10	38,4 (t)	1,00 (1H, m) 1,85 (1H, m)	C-8, C-6	H-9
11	37,9 (s)			
12	37,7 (t)	1,27 (1H, m) 1,72 (1H, m)	C-14	H-13
13	20,8 (t)	1,25 (1H, m) 1,33 (1H, m)	C-11, C-14, C-15, C-27,	H-14, H-12
14	61,6 (d)	0,71 (1H, m)	C-12, C-19, C-28	H-13
15	74,2 (s)			
16	43,3 (t)	1,45 (1H, m) 1,75 (1H, m)	C-15, C-17, C-18	H-17
17	19,8 (t)	1,47 (1H, m) 1,60 (1H, m)	C-15, C-16, C-18, C-19	H-16, H-18
18	57,6 (d)	0,90 (1H, m)	C-14, C-17, C-19, C-23, C-28, C-30	H-17
19	40,6 (s)			
20	40,8 (t)	0,94 (1H, m) 1,73 (1H, m)	C-18	H-21
21	19,5 (t)	1,46 (1H, m) 1,64 (1H, m)		H-20, H-22
22	43,5 (t)	1,21 (1H, m) 1,40 (1H, m)	C-18	H-21
23	34,4 (s)			
24	23,0 (q)	1,43 (3H, sl)	C-2, C-3, C-4	H-2, H-4
25	15,6 (q)	0,96 (3H, s)	C-2, C-6, C-7, C-8	
26	29,6 (q)	0,95 (3H, s)	C-6, C-10, C-11	
27	31,2 (q)	1,13 (3H, s)	C-14, C-15, C-16	
28	16,0 (q)	0,99 (3H, s)	C-14, C-18, C-19, C-20,	
29	34,2 (q)	0,88 (3H, s)	C-18, C-19, C-22, C-23, C-30	
30	22,4 (q)	0,85 (3H, s)	C-18, C-22, C-23, C-29	
1'	148,8 (s)			
2'	139,3 (s)			
3'	123,3 (d)	7,30 (1H, d, 2,4)	C-1, C-1', C-4', C-5'	H-5'
4'	150,9 (s)			
5'	120,1 (d)	7,06 (1H, dd, 8,8, 2,4)	C-1', C-3'	H-3', H-6'
6'	123,6 (d)	7,37 (1H, d, 8,8)	C-1', C-2', C-4'	H-5'

Desta maneira foi possível estabelecer a estrutura completa de ilhabelanol (**57**) com sua estereoquímica relativa.

O ilhabreno (**Ca6f2b**) foi obtido como um sólido amorfo incolor opticamente ativo com $[\alpha]_D^{22} = -15^\circ$ ($c = 0,12$, MeOH) e apresentou em seu espectro de massas de alta resolução (V.2, **Figura 3.20**) em modo spray de elétrons (HRESIMS) positivo um pico de íon pseudo-molecular $[M+Na]^+$ em m/z 677,2170 (valor calculado 677,2171) indicando a fórmula molecular $C_{31}H_{44}Na_2O_8S_2$.

A análise dos dados de RMN- ^{13}C do ilhabreno indicaram 28 sinais de carbono (V.2, **Figura 3.22**). Outros 3 sinais foram detectados através da análise de HSQC e HMBC [δ_C 27,3 (Me-25, q), δ_C 33,4 (C-16, t) e δ_C 37,3 (C-11, s)]. O espectro de RMN- ^{13}C indicou a presença da hidroquinona [δ_C 119,9 (C-5', d), 123,2 (C-3', d), 123,5 (C-6', d), 137,7 (C-2', s), 149,1 (C-1', s) e 150,7 (C-4', s)], bem como de duas duplas ligações exocíclicas [δ_C 151,5 (C-15, s), 149,2 (C-3, s), 109,6 (C-23, t) e 108,9 (C-20, t)], requerendo a presença de um sistema tricíclico para satisfazer a fórmula molecular estabelecida por EM, como mostra a **figura 3.13**.

Figura 3.13. Valores de deslocamentos químicos observados no espectro de RMN- ^{13}C (CD_3OD , 150 MHz) para o composto **ilhabreno (58)**.

Devido à pequena quantidade de massa isolada do ilhabreno (0,3 mg), os espectros de HMBC mostraram ser pouco informativos. No entanto, foram observadas importantes correlações para os grupos metila [δ_H 0,80, 0,85, 0,90 e 0,92], para os dois grupos metilenos exocíclicos [δ_H 4,54 e 4,78 para o CH₂- 23 e δ_H 4,63 e 4,69 para o CH₂- 20] e para o metileno benzílico [δ_H 2,92 (2H, H-1, d, $J = 7,1$ Hz)], como mostra a **figura 3.14**.

Em conjunto com as correlações estabelecidas pela análise dos espectros TOCSY e COSY, permitiram estabelecer a estrutura planar de ilhabreno. Correlações nOe observadas no espectro NOESY entre H-12 [δ 1,63] e CH₃-21 [δ 0,80]; CH₃-21 [δ 0,80] e H-1 [δ 2,92], entre H-2 [δ 2,29] e H-6 [δ 1,32] estabelecido pela configuração relativa de C-2, C-6, C-7 e C-11 do sistema decalina como sendo *trans*.

As principais correlações observadas de ilhabelanol nos espectros de HMBC e COSY (V.2, **Figuras 3.23 e 3.24**, respectivamente) são apresentadas na **figura 3.14**.

Figura 3.14. Esquema de correlações observadas nos espectros HMBC, TOCSY/COSY e NOESY para **ilhabreno (58)**.

A partir dos dados obtidos nos espectros de RMN ¹-H (V.2, **Figura 3.21**) e ¹³-C (V.2, **Figura 3.22**) e os bidimensionais foi possível construir a **tabela 3.3**.

Tabela 3.3. Dados de RMN-¹H (CD₃OD, 600 MHz) e ¹³C (CD₃OD, 150 MHz) de ilhabreno (**Ca6f2b**).

Posição do Carbono	δ _C ppm (mult.)	δ _H ppm (int., mult., J/Hz)	Correlações HMBC	acoplamentos COSY
1	25,2 (t)	2,92 (2H, d, 7,1)	C-3, C-2, C-1', C-2', C-3'	H-2
2	57,5 (d)	2,29 (1H, tl, 6,7)	C-6, C-3, C-7, C-1, C-20, C-21, C-2'	H-1
3	149,2 (s)			
4	39,6 (t)	2,04 (1H, m) 2,33 (1H, dt, 12,7, 2,6)	C-6, C-3, C-2, C-20	H-5
5	25,6 (t)	1,39 (1H, m) 1,75 (1H, m)	C-6	H-4, H-6
6	59,3 (d)	1,32 (1H, m)	C-7, C-11	H-5
7	41,1 (s)			
8	40,6 (t)	1,30 (1H, m) 1,88 (1H, dl, 11,8)	C-7	H-9
9	20,5 (t)	1,46 (2H, m)	C-10	H-8, H-10
10	38,8 (t)	1,04 (1H, td, 13,5, 4,8) 1,74 (1H, m)	C-6, C-8, C-9	H-9
11	37,3 (s)			
12	32,6 (t)	0,85 (1H, m) 1,63 (1H, m)		H-13
13	22,2 (t)	1,30 (1H, m) 1,37 (1H, m)		H-12, H-14
14	56,5 (d)	1,62 (1H, m)	C-15, C-19, C-23	H-13
15	151,5 (s)			
16	33,4 (t)	2,06 (2H, m)	C-15, C-17, C-18	H-17
17	25,0 (t)	1,55 (2H, m)		H-16, H-18
18	37,6 (t)	1,23 (1H, m) 1,53 (1H, m)	C-17, C-24	H-17
19	36,0 (s)			
20	108,9 (t)	4,63 (1H, sl) 4,69 (1H, sl)	C-2, C-4	
21	16,2 (q)	0,80 (3H, s)	C-2, C-6, C-7, C-8	
22	30,0 (q)	0,90 (3H, s)	C-6, C-10, C-11, C-12	
23	109,6 (t)	4,54 (1H, sl) 4,78 (1H, sl)	C-14, C-16	
24	29,1 (q)	0,92 (3H, s)	C-14, C-18, C-19, C-25	
25	27,3 (q)	0,85 (3H, s)	C-14, C-18, C-19, C-24	
1'	149,1 (s)			
2'	137,7 (s)			
3'	123,2 (d)	7,12 (1H, d, 2,8)	C-1', C-2', C-4'	H-5'
4'	150,7 (s)			
5'	119,9 (d)	7,04 (1H, dd, 8,9, 2,8)	C-1'	H-3', H-6'
6'	123,5 (d)	7,34 (1H, d, 8,9)	C-1', C-4'	H-5'

Desta maneira foi possível estabelecer a estrutura completa de ilhabreno (**58**) com sua estereoquímica relativa, exceção feita ao carbono C-14, uma vez que não foram observadas correlações para o metino H-14 no espectro NOESY.

O composto isoakaterpina (**Ca6f3**) foi obtido como um sólido amorfo incolor opticamente ativo com $[\alpha]_D^{22} = + 37^\circ$ ($c = 0,48$, MeOH) e apresentou em seu espectro de massas de alta resolução (**V.2, Figura 3.25**) em modo spray de elétrons (HRESIMS) positivo um pico de íon pseudo-molecular $[M+Na]^+$ em m/z 745,2798 (valor calculado 745,2797) indicando a fórmula molecular $C_{36}H_{52}Na_3O_8S_2$.

Após a análise de todos os espectros de RMN e EM, concluímos que o composto **Ca6f3** é um isômero da akaterpina, isolado da esponja *Callyspongia* sp. (Fukami et al., 1997), tendo sido nomeado por nós como isoakaterpina.

Foram observados no espectro de RMN- 1H (**V.2, Figura 3.26**) sinais de hidrogênios vinílicos em δ 7,37 (d, 8,9 Hz), 7,08 (dd, 8,9 Hz e 2,8 Hz), 7,31 (d, 2,8 Hz), 5,38 (sl), 4,83 (sl) e 4,72 (sl). Sinais de ^{13}C nos espectros de RMN- ^{13}C (**V.2, Figura 3.27**) e DEPT indicaram a presença de carbonos sp^2 do tipo quaternários em δ 154,0, 150,3, 150,1, 147,6, 135,4, do tipo CH em 125,1, 123,4, 120,5 e 118,2 e do tipo CH_2 em δ 108,7. A análise do espectro de HMQC permitiu-nos atribuir sem ambigüidades os sinais dos hidrogênios vinílicos aos seus respectivos carbonos sp^2 .

Também observa-se nos espectros de RMN- 1H e RMN- ^{13}C a presença de seis grupos metila, dos quais quatro são metila singleto em δ 0,86 (28,3), 0,97 (28,6), 1,03 (24,3) e 1,00 (25,1) e duas são metilas dubleto em δ 0,84 (d, 6,6 Hz) e 1,15 (d, 6,9 Hz). Os espectros de HMBC não apresentam muitas correlações de hidrogênios outros que não dos grupos metila e de hidrogênios vinílicos. Pela análise dos espectros de correlação 1H - 1H (COSY) e 1H - ^{13}C HMBC (**V.2, Figuras 3.28 e 3.29**), foi possível observar a presença de um sistema aromático 1,2,4-trissubstituído. Após observadas as correlações nos espectros de RMN mono e bidimensionais foi possível montar as sub-estruturas presentes no composto **Ca6f3**, como indicado na **figura 3.15**.

Figura 3.15. Sub-estruturas do composto isoakaterpina (**Ca6f3**) observadas nos espectros de RMN mono e bidimensional.

São observadas poucas correlações através de carbonos quaternários, tanto sp^2 quanto sp^3 , o que dificulta a interconexão de sub-unidades estruturais. Uma busca na literatura indicou que existem triterpenos com dados de RMN- ^1H e ^{13}C similares aos da amostra **Ca6f3**: a akaterpina (**59**) isolada da esponja *Callyspongia* sp. (Fukami et al., 1997) e o toxiusol (**60**) isolado da esponja *Toxiclona toxius* (Isaacs et al., 1993).

A partir dos dados espectroscópicos obtidos do composto **Ca6f3** foi possível construir uma tabela (**Tabela 3.4**) e compará-los com os dados obtidos na literatura da akaterpina.

Tabela 3.4. Dados de RMN-¹H (600MHz) e ¹³C (150 MHz) de **Ca6f3** (isoakaterpina) e de akaterpina (400 MHz e 100 MHz) em CD₃OD (Fukami et al 1997).

Posição do Carbono	Ca6f3- Isoakaterpina		Akaterpina	
	$\delta^{13}\text{C}$ (mult.)	$\delta^1\text{H}$ (int., mult., J em Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (mult.)	$\delta^1\text{H}$ (int., mult., J/Hz)
1	37,3 (t)	2,38 (1H, d, 14,1) 3,30 (1H, d, 14,1)	37,3 (t)	2,40 (1H, d) 3,32 (1H, d)
2	43,3 (s)		43,1 (s)	
3	38,7 (d)	1,65 (1H, m)	38,6 (d)	1,65 (1H, m)
4	26,4 (t)	1,20 (1H, m) 1,97 (1H, m)	26,2 (t)	1,20 (1H, m) 1,96 (1H, m)
5	28,6 (t)	1,37 (1H, m) 2,00 (1H, m)	28,3 (t)	1,46 (1H, m) 1,98 (1H, m)
6	43,7 (s)		44,1 (s)	
7	46,8 (d)	1,60 (1H, m)	47,0 (d)	1,68 (1H, m)
8	22,3 (t)	1,91 (1H, m) 2,17 (1H, m)	22,4 (t)	1,99 (1H, m) 2,20 (1H, m)
9	25,7 (t)	1,60 (1H, m) 1,86 (1H, m)	25,7 (t)	1,65 (2H, m)
10	34,3 (t)	2,16 (1H, m) 2,33 (1H, td, 13,0, 6,4)	34,0 (t)	2,18 (1H, m) 2,32 (1H, ddd)
11	154,0 (s)		153,4 (s)	
12	38,0 (t)	0,76 (1H, td, 13,0, 2,8) 1,87 (1H, m)	36,4 (t)	1,04 (1H, m) 2,13 (1H, ddd)
13	25,1 (t)	0,91 (1H, m) 1,30 (1H, m)	30,2 (t)	1,15 (2H, m)
14	43,2 (s)		37,6 (s)	
15	46,4 (d)	1,24 (1H, m)	34,6 (d)	1,47 (1H, m)
16	32,6 (t)	1,40 (1H, m) 1,50 (1H, m)	32,7 (t)	1,77 (1H, ddd) 1,84 (1H, ddd)
17	31,4 (t)	1,07 (1H, dd, 12,4, 3,9) 1,80 (1H, m)	117,4 (d)	5,47 (1H, ddd)
18	45,3 (d)	1,60 (1H, m)	147,4 (s)	
19	147,6 (s)		41,0 (d)	2,23 (1H, m)
20	118,2 (d)	5,38 (1H, sl)	28,9 (t)	0,98 (1H, m) 1,68 (1H, m)
21	24,4 (t)	2,01 (1H, m) 2,10 (1H, m)	23,3 (t)	1,57 (2H, m)
22	33,0 (t)	1,12 (1H, m) 1,39 (1H, m)	42,2 (t)	1,20 (1H, m) 1,42 (1H, m)
23	32,7 (s)		37,1 (s)	
24	16,7 (q)	1,15 (3H, d, 6,9)	16,5 (q)	1,15 (3H, d)
25	25,1 (q)	1,00 (3H, s)	25,2 (q)	1,03 (3H, s)
26	108,7 (t)	4,72 (1H, sl) 4,83 (1H, sl)	109,4 (t)	4,73 (1H, br s) 4,76 (1H, br s)
27	17,0 (q)	0,84 (3H, d, 6,6)	15,6 (q)	0,86 (3H, d)
28	24,3 (q)	1,03 (3H, s)	16,8 (q)	0,59 (3H, s)
29	28,6 (q)	0,97 (3H, s)	30,3 (q)	1,06 (3H, s)
30	28,3 (q)	0,86 (3H, s)	29,5 (q)	1,04 (3H, s)
1'	150,1 (s)		150,1 (s)	
2'	135,4 (s)		135,2 (s)	
3'	125,1 (d)	7,31 (1H, d, 2,8)	125,1 (d)	7,30 (1H, d, 2,4)
4'	150,3 (s)		149,9 (s)	
5'	120,5 (d)	7,08 (1H, dd, 8,9, 2,8)	120,4 (d)	7,09 (1H dd, 8,5, 2,4)
6'	123,4 (d)	7,37 (1H, d, 8,9)	123,2 (d)	7,38 (1H, d, 8,5 Hz)

A análise espectroscópica detalhada do composto **Ca6f3** indicou ser um isômero de dupla ligação em $\Delta^{19,20}$ enquanto que a akaterpina apresentou a dupla endocíclica em $\Delta^{17,18}$ (**Figura 3.16**).

Figura 3.16. Diferenças entre **isoakaterpina** (Ca6f3) e **akaterpina** (Fukami et al., 1997)

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C sugerem a que os anéis do sistema decalina C/D estão ligados em posição *cis*. Todavia a sobreposição dos sinais H-7 e H-18 no espectro 2D NOESY adquiridos em CD_3OD não nos permite uma confirmação exata das configurações relativas para os anéis A/B e C/D. Então o espectro foi readquirido em uma mistura de solventes $\text{CD}_3\text{OD}/\text{C}_6\text{D}_6$ (4:1) e assim foi possível confirmar as configurações relativas para os dois sistemas decalinos.

Foram observadas no espectro NOESY correlações entre H-7 [δ 1,60] com os H-1 [δ 2,38] e H-12 [δ 0,76] e a Me-24 [δ 1,15], confirmando que C-1, C-12, C-24 e H-7 estão todos no mesmo plano do sistema de anéis C/D, bem como também ocorre com akaterpina (Fukami et al., 1997; Kawai et al., 1999).

Adicionalmente são observadas correlações entre H-13 [δ 1,30] e H-18 [δ 1,60], com H-18 e C-13 estão em axial e no mesmo plano do sistema de anéis A/B. O

deslocamento químico da Me-27 [δ 17,0] está em orientação axial, e o C-13 em *trans*. Comparando os valores de deslocamentos químicos para o sistema de anéis A/B de isoakaterpina com compostos epi-agelasina C **61** (Hattori et al., 1997), 13-hidroxi- 14-enta-halimadieno- ácido 1-oico **63** (Abdel-Kader et al., 2002), podemos confirmar a configuração relativa para os carbonos C-14, C-15 e C-18 no sistema de anéis A/B.

Os compostos isolados ilhabelanol e isoakaterpina fazem parte da família merohexaprenóides que tem sido isoladas de esponjas marinhas. Nessa pequena família de compostos são conhecidos: akaterpina (**59**) (Fukami et al., 1997), toxiusol (**60**) (Isaacs et al., 1993), shaagrockol C (**62**) (Isaacs et al., 1992) e adociassulfato 4 (**64**) (West and Faulkner, 2006).

(61)
epi-agelasina C

(62)
shaagrockol C

(63)
13-hidroxi-1, ácido
14-enta-halimadieno-18-oico

(64)
adociassulfato 4

Uma busca na literatura nos mostrou que os três compostos por nós isolados, da esponja *Callyspongia sp.*, são inéditos e foram nomeados por nós como ilhabelanol (**Ca6f2a**) e ilhabreno (**Ca6f2b**) e isoakaterpina (**Ca6f3**).

O composto isoakaterpina (Ca6f3) foi avaliado nos testes de inibição à enzima L-APRT e apresentou IC₅₀ de 1,05 µM. Os outros dois compostos, ilhabelanol e ilhabreno, isolados a partir de Ca6f2 apresentaram inibição da L-APRT de 93,5% a uma concentração de 50 µg/mL. Segundo nossos colaboradores Otávio Thiemann e Glaucius Oliva (IFSC-USP) que realizam esse bioensaio, os compostos isolados de *Callyspongia sp* são os mais potentes inibidores da L-APRT testados até o momento.

Capítulo 4

Isolamento de dois derivados cumarínicos da esponja marinha

Axinella cf corrugata

4.1. Produtos Naturais com atividade antiviral

Muitas das doenças infecciosas que afetam o ser humano e os animais são causadas por vírus. Por exemplo, a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) é uma doença pandêmica que tem como agente etiológico o vírus da imunodeficiência humana- HIV, (Peçanha et al., 2002; Melo et al., 2006).

No mundo inteiro, estima-se que 33,4 milhões de pessoas estão contaminadas com o vírus HIV. No Brasil, de 1980 até dezembro de 2002, foram registrados 257.771 casos da doença, com 113.840 óbitos conhecidos. Através de inquéritos sorológicos realizados pelo Ministério da Saúde, estima-se a existência de 536.000 brasileiros infectados pelo HIV. Sendo que, o fator que torna ainda mais difícil a terapia anti-HIV é a alta incidência de efeitos colaterais causados pelos fármacos atualmente disponíveis (Melo et al., 2006).

Os produtos naturais têm se mostrado com grande potencial na busca de novos compostos ativos, que possam ser alternativas de protótipos para os tratamentos mais eficazes.

Muitos produtos naturais têm apresentado atividade inibitória ao vírus HIV (HIV-RT), tais como: cumarinas, taninos, flavonóides, alcalóides, terpenos, polissacarídeos e outros (König et al., 1999).

Como por exemplo, a cumarina calanolida A (**65**), isolada da planta *Calophyllum lanigerum*, que apresentou potente atividade antiviral HIV-1-RT (IC₅₀ de 0,07 µM) e se encontra em fase clínica de estudo. Outro composto que apresentou atividade promissora e se encontra em fase de testes é o composto michelamina B (**66**), isolada da planta *Ancistrocladus korupensis* (König et al., 1999).

Muitos produtos naturais de origem marinha também apresentam atividade antiviral HIV-RT, dentre os quais os mais estudados tem sido extratos de esponjas, ascídias, algas e fungos (Roussis et al., 2003).

Como por exemplo, uma série de quinonas e hidroquinonas sesquiterpenóides, isolados da esponja *Dysidea sp.*, avarol (**67**), avarona E (**68**) e avarol F (**69**), também apresentaram atividade antiviral ao HIV-1-RT (König et al., 1999; Roussis et al., 2003).

Um outro composto, a illimaquinona (**70**) isolada da esponja *Smenospongia sp.*, apresentou potente atividade inibitória a HIV-1-RT ($IC_{50} = 15 \mu M$) (König et al., 1999).

(67)
avarol

(68)
avarona E

(69)
avarol F

(70)
illimaquinona

Uma série de hidroquinonas hexaprenóides isoladas da esponja *Toxiclona toxius* apresentaram atividade contra HIV-1-RT, dentre os quais o toxiusol (**60**) foi o mais potente inibidor (IC_{50} de 1,5 μM) (Roussis et al., 2003).

Compostos do tipo esteróis sulfatados também apresentam esse tipo de atividade. O esterol sulfatado ibisterol sulfato (**71**), isolado da esponja *Topsentia sp*, apresentou atividade anti HIV-1-RT (EC_{50} = 10 $\mu g/mL$). Compostos semelhantes a este o sulfato de ibisterol B (**72**) e C (**73**) apresentaram atividade HIV-1 com IC_{50} de 2,3 $\mu g/mL$ e 1,8 $\mu g/mL$, respectivamente. Outros compostos com grupos sulfatos em sua estrutura também apresentaram atividade antiviral HIV-1-RT, são o sulfato de halistanol (**45**) (IC_{50} de 0,4 $\mu g/mL$), sulfato de halistanol F (**48**) (EC_{50} de 3,0 $\mu g/mL$) e o sulfato de halistanol G (**49**) (EC_{50} de 6,0 $\mu g/mL$), (Roussis et al., 2003).

(71)
sulfato de ibisterol

(72) R = H sulfato de ibisterol B
(73) R = CH₃ sulfato de ibisterol C

Muitos compostos de diferentes fontes naturais têm apresentado atividades antivirais, o que reforça a importância em buscar por novos compostos promissores como agentes terapêuticos, principalmente por alternativas as formas resistentes ou mutagênicas das doenças, e mais eficazes e menos tóxicas aos organismos.

4.2. Estudo da esponja *Axinella cf. corrugata*

A esponja *Axinella corrugata* foi coletada em São Sebastião no ano de 1995, e conservada em EtOH a -20° C. Seu extrato bruto apresentou atividade citotóxica contra 2 linhagens de células tumorais, melanoma (B 16) e de mama (MCF 7).

O trabalho de isolamento químico do extrato da esponja *Axinella corrugata* foi realizado de acordo com o procedimento sumarizado no **Esquema 4.1**.

Esquema 4.1. Fluxograma do estudo químico da esponja *Axinella corrugata*.

m- massa da fração.

a- condições: coluna de sílica-gel derivatizada com grupos fenila [μBondapak, 125 Å, de dimensões 300 x 7,8 mm, marca Waters[®]], com MeOH-H₂O (0,1% TFA) 40:60, fluxo de 1 mL/minuto e λ_{max} 254 nm.

O animal (massa úmida 2,0 kg) foi triturado e extraído com MeOH (3 litros de MeOH, repetindo-se a extração por duas vezes). Os extratos EtOH e MeOH foram filtrados, reunidos e evaporados. O extrato seco foi ressuspensionado em água (500 mL) e AcOEt (500 mL, repetindo-se por três vezes), obtendo-se duas frações: a fração AcOEt e a fração aquosa.

A fração AcOEt (m= 0,573 g) foi submetida a uma separação cromatográfica em coluna de permeação em gel de Sephadex LH-20 com eluição isocrática de MeOH. Após a separação cromatográfica, as frações foram analisadas por CCD (eluente: CH₂Cl₂/MeOH 9:1 e reveladores: lâmpada UV e ácido fosfomolibdico) e reunidas de acordo com sua similaridade cromatográfica, resultando em quatro frações que foram analisadas por RMN-¹H e CCD.

A quarta fração (**AcAE4**) se mostrou interessante do ponto de vista químico (RMN-¹H e UV) e foi submetida a uma cromatografia em coluna Sep-Pak[®] de sílica gel (10 g, Waters) com gradiente de B em A, onde A foi CH₂Cl₂ e B foi uma mistura de AcOEt/MeOH 1:1. Após análise por CCD (eluente: CH₂Cl₂/MeOH 9:1; reveladores: lâmpada UV e ácido fosfomolibdico), obtivemos seis frações.

Das seis frações, duas **AcAE-4C** e **AcAE-4E** mostraram ser interessantes por análise de RMN-¹H e de HPLC-PDA, e foram purificadas em HPLC utilizando-se de uma coluna de sílica-gel derivatizada com grupos fenila [μ Bondapak, 125 Å, de dimensões 300 x 7,8 mm, marca Waters[®]], com MeOH-H₂O (0,1% TFA) 40:60 e fluxo de 1 mL/minuto e monitorando-se a separação em λ_{max} 254 nm.

Após sua purificação, a fração **AcAE-4C** (m= 3,9 mg) teve seus espectros obtidos e sua estrutura determinada como sendo o éster metílico do ácido 4-carboxi esculetínico.

A fração **AcAE-4E** (m= 4,5 mg) apresentou bom grau de pureza e teve seus espectros adquiridos e sua estrutura determinada como sendo o éster etílico do ácido 4-carboxi esculetínico.

4.3. Resultados e Discussão

A esponja *Axinella cf. corrugata* (**Figura 4.1**) foi descrita pela primeira vez por George & Wilson (1902) e sua classificação é apresentada na **Figura 4.2**. Essa espécie pode se apresentar de cor laranja viva a vermelha, tornando-se

Figura 4.1. Foto da esponja *Axinella corrugata* (Hajdu e Muricy).

Sua distribuição se restringe ao Caribe, Carolina do Norte (EUA) e no Brasil: Rio de Janeiro (Arraial do Cabo, Búzios), Bahia (Salvador) e Pernambuco (Tamandaré), São Paulo (Ilhabela e São Sebastião) e Santa Catarina (Ilha da Galé).

<p>Filo: Porifera Classe: Demospongiae Subclasse: Ceractinomorpha Ordem: Halichondrida Família: Axinellidae Espécie: <i>Axinella corrugata</i></p>
--

Figura 4.2. Taxonomia da esponja *Axinella corrugata*.

O extrato bruto da esponja *Axinella cf. corrugata* apresentou atividade citotóxica. Porém essa atividade foi “perdida” durante o processo de fracionamento cromatográfico do extrato bruto desta esponja. Mesmo assim, observando o padrão de absorção no UV referentes às frações semi purificadas demos continuidade com o trabalho de isolamento. A partir da investigação química do extrato dessa esponja foram obtidas duas fração: **AcAE-4C** e **AcAE-4E**.

Composto éster metílico do ácido 4-carboxi esculetínico (AcAE-4C)

A fração **AcAE-4C** foi obtida como um sólido vítreo verde e apresentou em seu espectro de absorção no infravermelho (filme em disco de silício) as seguintes bandas (**V.2, Figura 4.1**):

- a. $3364,5\text{-}3104,9\text{ cm}^{-1}$, muito largas atribuídos a grupos O-H com ligações hidrogênicas;
- b. $1709,8\text{ cm}^{-1}$ atribuídos a grupos C=O;
- c. $1621,0$ e $1563,9\text{ cm}^{-1}$ atribuídos a grupos C=C.

O seu espectro de absorção no ultravioleta em MeOH apresentou bandas em 207, 239, 271 e 375 nm, observado em cromatograma com detector de arranjo de diodos.

Seu espectro de RMN- ^1H (**V.2, Figura 4.2**) apresentou seis sinais singletos:

- dois sinais de hidrogênios fenólicos em δ 10,44 e 9,60 atribuídos a grupos O-H;
- três sinais em δ 7,46, 6,80 e 6,60 de hidrogênios aromáticos;
- um sinal em δ 3,92 referente aos hidrogênios de um grupo metila.

O espectro de RMN- ^{13}C (**V.2, Figura 4.3**) apresentou:

- sete sinais de carbonos sp^2 quaternários em δ 164,4, 159,9, 150,9, 148,8, 143,0, 142,5 e 107,0;
- três sinais de carbonos sp^2 do tipo CH em δ 113,5, 110,3 e 102,9;
- um sinal de carbono sp^3 do tipo metoxila em δ 53,0.

Os dados observados nos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY (^1H - ^1H) e HMBC (^1H - ^{13}C , mais comumente observados 2J e 3J), estão listados na **tabela 4.1**.

Tabela 4.1. Dados de deslocamentos químicos de RMN- ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) e correlações à longa distância da fração **AcAE-4C** em DMSO- d_6 .

Posição	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult, integral)	COSY	HMBC
2	160,0			
3	113,5	6,59 (s, 1H)		102,9; 107,0; 160,0 e 164,4
4	107,0			
5	102,9	6,80 (s, 1H)	7,46	107,0; 113,4; 143,0; 148,8 e 150,9
6	143,0	10,44 (s, 1H)		102,9; 143,0 e 150,9
7	150,9	9,60 (s, 1H)		110,3; 143,0 e 150,9
8	110,3	7,46 (s, 1H)	6,80	142,4; 143,0; 148,8 e 150,9
9	148,8			
10	142,5			
11	164,4			
12	53,0	3,91 (s, 3Hs)		164,4

Através da análise dos espectros de RMN bidimensionais do tipo COSY (V.2, **Figura 4.4**) e HMBC (V.2, **Figura 4.5**) observamos as correlações indicadas na **Figura 4.3**.

Figura 4.3. Esquema das principais correlações observadas para a fração **AcAE-4C** nos espectros de RMN bidimensionais COSY e HMBC.

O espectro de massas do éster metílico do ácido 4-carboxi esculetínico (**AcAE-4C**) (V.2, **Figura 4.6**) apresentou um pico de íon pseudo-molecular em m/z 495,0544 (TOF/ESI-MS), correspondente a uma massa duas vezes maior e com um átomo de sódio, do que a esperada para a estrutura, ou porque o composto apresentaria simetria interna ou se dimeriza quando ionizado.

Composto éster etílico do ácido 4-carboxi esculetínico (AcAE-4E)

A fração **AcAE-4E** foi obtida como um sólido vítreo verde e apresentou em seu espectro de absorção no infravermelho (filme em disco de silício) e no seu espectro de absorção no ultravioleta em MeOH as mesmas bandas observadas para as frações **AcAE-4C**. Os deslocamento químicos em seus espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C também foram os mesmos (V.2, **Figuras 4.7 e 4.8**), para o qual a única diferença estrutural com relação à **AcAE-4C** foi à presença de um grupo éster etílico em vez de éster metílico. Assim sendo a fração AcAE-4E foi determinada como sendo o éster etílico do ácido 4-esculetínico (**Figura 4.5**).

Figura 4.5. Estrutura do composto éster etílico do ácido 4-carboxi esculetínico (**AcAE-4E**)

Na **tabela 4.2** podemos comparar os valores de deslocamentos químicos observados para as duas frações isoladas.

Tabela 4.2. Dados de deslocamentos químicos de RMN- ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) para as frações **AcAE-4C** e **AcAE-4E** em DMSO- d_6 .

	Fração AcAE-4C		Fração AcAE-4E	
Posição	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult, integral)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult, integral, J em Hz)
2	160,0		160,0	
3	113,4	6,59 (s, 1H)	113,3	6,60 (s, 1H)
4	107,0		107,0	
5	102,9	6,80 (s, 1H)	102,9	6,77 (s, 1H)
6	143,0	10,44 (s, 1H)	143,0	10,45 (s, 1H)
7	150,9	9,60 (s, 1H)	150,9	9,60 (s, 1H)
8	110,3	7,46 (s, 1H)	110,2	7,50 (s, 1H)
9	148,8		148,8*	
10	142,5		142,8*	
11	164,4		163,9	
12	53,0	3,91 (s, 3Hs)	62,0	4,35 (q, 2H, 7 Hz)
13			13,7	1,33 (t, 3H, 7 Hz)

O composto **AcAE-4E** apresentou no seu espectro de massas um pico de íon pseudo-molecular em m/z 523,0843 (TOF/ESI-MS), correspondente também ao dobro de sua massa esperada, mais um átomo de sódio (**V.2, Figura 4.9**).

Considerando que no espectro de RMN ^{13}C do éster metílico do ácido carboxílico apresentou apenas 11 carbonos, podemos considerar duas hipóteses: ou o composto apresentaria simetria interna ou se dimeriza quando ionizado.

O fato de se obter sempre o dobro da massa esperada mais um átomo de sódio nos espectros de massas nos deixou em dúvida quanto à confirmação da estrutura proposta. Consequentemente, propusemos ao nosso colaborador Prof. Raymond J. Andersen (University of British Columbia, Canadá, onde obtivemos os espectros de massas), a realização da síntese do éster etílico do ácido 4-esculetínico. Este foi sintetizado a partir do 3-hidroxi-4-metoxibenzaldeído (**74**), o qual foi primeiramente submetido a uma oxidação de Baeyer-Villiger com ácido *meta*-cloroperbenzóico, de maneira a fornecer o éster 3-hidroxi-4-metoxifenílico do ácido fórmico (**75**), o qual foi condensado com o sal de sódio do oxaloacetato de etila (**76**), de maneira a fornecer o éster etílico (**77**) o qual foi finalmente desmetilado com tribrometo de boro, fornecendo o éster etílico do ácido 4-esculetínico (**78**) com um rendimento total de 27% (**Figura 4.6**).

Figura 4.6. Síntese total de AcAE-4E

O espectro de massas do produto de síntese apresentou exatamente o mesmo pico de íon pseudo-molecular dimérico do composto **AcAE-4E** quando obtido na presença de quantidade catalítica de NaCl. Provavelmente tanto o composto **AcAE-4C** (**Figura 4.4**) como o composto **AcAE-4E** (**Figura 4.5**) dimerizam quando ionizados, fornecendo os respectivos íons moleculares observados.

Os compostos isolados são derivados cumarínicos, mais especificamente da esculetina (**79**), isolados muito provavelmente como artefatos de isolamento de esterificação do ácido 4-esculetínico (**80**) com MeOH e EtOH. Fato interessante, o ácido 4-esculetínico (**80**) é desconhecido como produto natural. Uma busca bibliográfica detalhada realizada com as bases de dados SciFinder CASONLINE, MARINLIT e WEB of SCIENCE não forneceu nenhum artigo em que seja reportado esse composto como produto natural. Este foi obtido somente como produto de síntese em 1955, em trabalho que relata a descoberta de inibidores da DOPA descarboxilase (Hartman et al., 1955).

Além dos compostos isolados terem sido obtidos em rendimento muito baixo, também foram observados vários compostos correlatos minoritários nas análises por HPLC com detector de arranjo de fotodiodos, o que sugere uma origem microbiana para estas substâncias, embora a ocorrência de derivados cumarínicos isolados de fungos e bactérias não seja frequentemente observada (Chen et al., 2001; Pedras et al., 2005).

Os metabólitos comumente isolados de plantas são raramente isolados de esponjas marinhas. Apenas dois exemplos foram encontrados na literatura: derivados do resorcinol isolados da esponja *Haliclona* sp (Barrow et al., 1991) e o triptofol, um derivado auxínico, isolados da esponja *Ircinia spinulosa* (Erdogan et al., 2000).

Os compostos puros isolados foram testados novamente no bioensaio citotóxico, no qual seu extrato bruto havia apresentado atividade, no entanto as frações puras não apresentaram atividade. As duas frações puras foram testadas ainda quanto sua atividade contra o coronavírus SARS 3CL protease. O éster etílico do ácido 4-esculetínico demonstrou atividades *in vitro* com IC₅₀ de 46 μ M (Hamill et al., 2006). O composto ativo também foi avaliado quanto a sua citotoxicidade em células sadias (EC₅₀= 112 μ M) e demonstrou não ser tóxico a células saudáveis (tóxico à células IC₅₀ >800 μ M). Esses resultados de atividade biológica mostram que o composto é bastante

promissor como inibidor e a continuação desses estudos com suas propriedades antivirais são de grande importância.

Capítulo 5

Estudo químico de extratos brutos de duas linhagens do fungo *Beauveria felina*, isolado da alga marinha *Caulerpa* sp.

5.1. Introdução

5.1.1. Produtos Naturais de Microrganismos

Uma das propriedades mais importantes dos microrganismos, especialmente dos fungos, está associada à sua capacidade metabólica de produzir uma grande variedade de micromoléculas bioativas.

Diversos compostos de importância farmacológica em várias patologias foram obtidos a partir de fungos (Masurekar, 1992; Strobel e Daisy, 2003). Dentre os medicamentos de maior importância terapêutica destacam-se os antibióticos: penicilina (**81**) e cefalosporina (**82**), muito utilizado para o tratamento de infecções por microorganismos patogênicos, como, por exemplo, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Enteromorpha* sp. e *Escherichia coli* (Singh, 2004 part I; 2004 part II). E, mais recentemente, muitas outras substâncias com outras atividades farmacológicas foram produzidas a partir de metabólitos de fungos, como por exemplo, a (**83**) mevinolina (mevacor® = lovastatina), um agente redutor das taxas sanguíneas de colesterol (Caporale, 1995).

(81)
penicilina F

(82)
cefalosporina C

(83)
mevinolina

(84)
aflatoxina A

Além disso, representantes de diferentes gêneros de fungos filamentosos podem produzir importantes toxinas, conhecidas como micotoxinas. Estas constituem um problema de saúde pública já que podem provocar câncer de fígado a partir da ingestão de alimentos contaminados por espécies de fungos produtoras de aflatoxinas, por exemplo, a aflatoxina A **(84)** (Bennett, 1998; Demain, 2000; Donadio et al., 2002).

Os fungos podem produzir pigmentos de alto valor econômico (Mapari et al., 2005) e ainda destacam-se por produzir substâncias que podem ser utilizadas como agroquímicos naturais, tais como destruxinas (inseticidas) e estrobilurinas (fungicidas), além de várias outras fitotoxinas (herbicidas) (Pinto et al., 2002).

No caso das leveduras, podemos citar como exemplo linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, as quais realizam fermentação alcoólica de grande importância industrial.

Devido à resistência de diversos microrganismos patogênicos aos antibióticos tradicionais, diversos programas de triagem de produtos naturais de microrganismos vêm sendo desenvolvidos visando a descoberta de novos antibióticos eficazes contra microrganismos resistentes, não somente no meio acadêmico, mas principalmente pelas indústrias farmacêuticas multinacionais (Yarbrough et al., 1994; Shu, 1998).

Nos últimos anos renasceu o interesse no isolamento de produtos naturais bioativos isolados a partir de fungos por diversas razões, dentre as quais: a grande diversidade de fungos que podem ser facilmente coletadas; a grande diversidade das substâncias isoladas; a possibilidade de cultivo de fungos *in vitro* (meios de cultura) para a produção de substâncias em escala industrial a um custo muito mais reduzido do que a síntese química ou a repetida coleta de outra(s) fonte(s), como plantas e animais, por exemplo.

5.1.2. Produtos Naturais de fungos isolados do ambiente marinho

Microrganismos marinhos têm se tornado uma importante fonte de metabólitos farmacologicamente ativos (Liberra e Lindequist, 1995; Pietra, 1997; Fenical, 1997; Bernan et al., 1997; Holler et al., 2000; Fenical e Jensen, 2002; Bugni e Ireland, 2004).

Revisões recentes enfatizam a importância da pesquisa em microbiologia marinha como a principal porta ao acesso de novas substâncias bioativas de interesse para a indústria farmacêutica (Imada, 2005; Jensen et al., 2005; Moore et al., 2005; Fiedler et al., 2005). Os primeiros relatos de isolamento de fungos derivados de ambientes marinhos são da década de 70, mas poucos estudos foram realizados de fato até a década de 90, mais especificamente a partir de 1998 (Kelecom, 2002).

Os fungos derivados de ambientes marinhos podem ser obtidos a partir de diversas fontes, sendo que a maioria deles são isolados de esponjas e algas. Até 2002, foram relatados 273 novos produtos naturais isolados de fungos derivados de ambientes marinhos (Bugni e Ireland, 2004), sendo que muitos destes apresentam novos esqueletos de carbono, evidenciando ser uma promissora fonte para o desenvolvimento de novo fármacos.

De um modo geral, as atividades biológicas dos compostos isolados de fungos de origem marinha são principalmente antibióticas e anticancerígenas, mas outras atividades como inibição do ciclo celular, atividade antiviral, atividade neurogênica, inibição enzimática a fosfatase e kinase, atividades decompositoras, dentre outras, também foram observadas (Bugni e Ireland, 2004; Blunt et al., 2006).

5.1.3. Destruxinas

As destruxinas são hexadepsipeptídeos cíclicos compostos de um α -hidroxi ácido e cinco resíduos de aminoácidos. Individualmente, as destruxinas se diferem em seu grupo hidroxi-ácido, *N*-metilação e no grupo R dos seus aminoácidos. As configurações de seus aminoácidos são *S* e os hidroxi-ácidos são *R*.

O nome destruxinas deriva da palavra “destructor”, originalmente do fungo *Oospora destructor* (entomopatogênico) de onde estes metabólitos foram isolados pela primeira vez. Mais tarde, esta espécie de fungo foi renomeada *Metarrhizium anisopliae* (Metchnikoff). A grande maioria das destruxinas relatadas até o momento foi

isolada de culturas de *M. anisopliae*. Desde o primeiro relato da descoberta das destruxinas A (85) e B (87) (Kodaira, 1961), foram realizados um grande número de estudos com essa família de compostos (Pedras et al., 2002).

As destruxinas possuem diversas atividades biológicas. São mais conhecidas pela sua atividade inseticida e fitotóxica (Pedras et al., 2002). Todavia, outras atividades biológicas também foram observadas, como por exemplo: atividade citotóxica em células leucêmicas (L1210) e no tratamento de linfócitos do baço com as destruxinas A (85), A₂ (86), B (87), B₁ (88) e E (91) (Morel et al., 1983). A destruxina E (91) foi mais potente que destruxinas A (85) e B (87) na atividade antiproliferativa de células neoplásicas de mamíferos testadas *in vitro* com P388 (Morel et al., 1983; Odier et al., 1987, 1992). A destruxina B (87) e homodestruxina B (89) demonstraram ter efeito supressor do vírus da hepatite B e são potenciais candidatas para o desenvolvimento de novos agentes para o tratamento da hepatite B (Sun et al., 1994; Chen et al., 1995, 1997). A cloroidrina da destruxina A₄ (90) demonstrou atuar como indutoras da eritropoietina, um hormônio secretado pelo rim que estimula a medula óssea a elevar a produção de hemoglobina no sangue (Cai et al., 1998). As destruxinas A (85) e B (87) apresentam um efeito inotrópico positivo (ou seja, um aumento na força de contração do coração) e cronotrópico negativo (ou seja, diminuição de estímulos elétricos pelo coração) em tecidos cardíacos de ratos (Tsunoo et al., 1997; Tsunoo and Kamijo, 1999). A destruxina B (87) também demonstrou ser um inibidor reversível específico (dose-dependente) da ATPase tipo-vacuolar, mantendo a acidez na organela vacuolar (Muroi et al., 1994; Togashi et al., 1997; Bandani et al., 2001; Vázquez et al., 2005). E ainda, as destruxinas A (85), B (87) e E (91) demonstraram atividade inibitória de osteoclastos (células responsáveis pela reabsorção óssea, que se tornam mais ativas após os 40 anos), importantes na prevenção e tratamento da osteoporose (Nagai, 2002). Sendo assim, as destruxinas são compostos extremamente interessantes, tanto do ponto de vista estrutural como do ponto de vista de suas atividades biológicas, sendo consideradas uma das classes mais importantes de metabólitos secundários produzidos por fungos.

(85)
destruxina A

(86)
destruxina A₂

(87)
destruxina B

(88)
destruxina B₁

(89)
homodestruxina B

(90)
cloroidrina da destruxina A₄

(91)
destruxina E

5.2. Estudo químico do extrato bruto do fungo *Beauveria felina*, isolado da alga marinha *Caulerpa* sp.

5.2.1. Estudo do extrato bruto do fungo *Beauveria felina* AcSS13E

O fungo identificado como sendo *Beauveria felina*, codificado **AcSS13E**, foi obtido a partir de coleta realizada em abril de 2002, na Praia do Cabelo Gordo (Cebimar-USP, São Sebastião-SP), da superfície da alga *Caulerpa* sp. Esse fungo foi cultivado em meio MF (Kakeya et al., 1995), seu meio de cultura foi extraído com butanona, gerando o extrato bruto **AcSS13E** (renomeado **F13E**).

O trabalho de isolamento de linhagens de fungos a partir de amostras da alga *Caulerpa* sp., sua purificação microbiológica, crescimento em meio de cultura líquido, preparação dos extratos brutos e realização das análises químicas e biológicas destes extratos foi desenvolvida por uma ex-aluna do prof. Berlinck, Aline Maria de Vita, no decorrer do seu projeto de mestrado, e resultou na apresentação da dissertação intitulada "Isolamento, Atividade Biológica e Análise do Perfil Químico de Fungos Coletados no Litoral do Estado de São Paulo".

O trabalho de fracionamento cromatográfico do extrato fúngico de *Beauveria felina* (**F13E**) foi realizado de acordo com o procedimento sumarizado no **Esquema 5.1**.

Esquema 5.1. Fluxograma do estudo do extrato bruto **F13E** de *Beauveria felina*.

^a Condições: coluna de sílica-gel derivatizada com grupos fenila, Prodigy 5 µ, Phenyl-3 (PH-3) 100Å de dimensões 250 x 4,6 mm; eluentes MeCN-H₂O 45: 55; λ_{max} 246 nm.

^b Condições: coluna C₁₈ CSC- Inertsil 150 Å/ODS 2 de 5 µm, de dimensões 25 x 0,94 cm; eluentes MeCN-H₂O 45: 55; λ_{max} 256 nm.

^c Condições: coluna de sílica-gel derivatizada com grupos fenila, Prodigy 5 µ, Phenyl-3 (PH-3) 100Å de dimensões 250 x 4,6 mm; eluentes MeCN-H₂O 50: 50; λ_{max} 230 nm.

O extrato **F13E** (m = 1,346 g) foi submetido a uma cromatografia em coluna Sep-Pak[®] de sílica gel (10 g, Waters) em um gradiente de B em A, onde A foi CH₂Cl₂ e B foi uma mistura de AcOEt/MeOH 9:1. Após análise por CCD (eluente: CH₂Cl₂/MeOH 9:1; reveladores: lâmpada UV, Dragendorff e ácido fosfomolibdico), obtivemos dez frações que foram re-analisadas por RMN-¹H e selecionamos três frações para serem purificadas (destacadas no **Esquema 5.1**).

As três frações (**F13E6**, **F13E7**, **F13E8**) foram também analisadas por HPLC-PDA de maneira a otimizar as condições de separação de seus constituintes.

A fração **F13E6** foi separada utilizando-se de uma coluna de sílica-gel derivatizada com grupos fenila [Prodigy 5 μ , Phenyl-3 (PH-3), 100 Å, de dimensões 250 x 4,6 mm, marca Phenomenex®] com MeCN-H₂O 45:55, fluxo de 1 mL/minuto e monitorando-se a separação em λ_{max} 246 nm, como mostra a **Figura 5.1**.

Figura 5.1. Cromatograma da fração **F13E-6**. Condições: coluna de sílica-gel derivatizada com grupos fenila, Prodigy 5 μ , Phenyl-3 (PH-3) 100Å de dimensões 250 x 4,6 mm; eluentes MeCN-H₂O 45: 55; λ_{max} 246 nm.

Desta separação obtivemos duas frações: **F13E6-P2** ($m = 39,7$ mg e $t_R = 18,62$ minutos) e **F13E6-P3** ($m = 21,3$ mg e $t_R = 23,68$ minutos) que mostraram ser dois derivados das destruxinas: o composto conhecido na literatura [Phe³, N-Me-Val⁵]-destruxina B (Kim et al., 2002) e outro inédito, nomeado por nós como pseudodestruxina C, respectivamente.

Para a purificação da fração **F13E7** utilizamos uma coluna de fase estacionária C₁₈ (CSC- Inertsil 150 Å/ODS 2 de 5 μ m, de dimensões 25 x 0,94 cm) com MeCN-H₂O 45:55 e fluxo de 1 mL/minuto e monitorando-se a separação em λ_{max} 256 nm, como mostra a **Figura 5.2**.

Figura 5.2. Cromatograma da fração **F13E-7**. Condições: coluna C₁₈ CSC- Inertsil 150 Å/ODS 2 de 5 µm, de dimensões 25 x 0,94 cm; eluentes MeCN-H₂O 45: 55; λ_{max} 256 nm.

Desta separação obtivemos somente uma fração contendo peptídeo, **F13E7-P3** ($m = 3,2$ mg e t_R em 45,10 minutos), que mostrou também ser um derivado das destruxinas por análise de RMN-¹H. O composto **F13E7-P3** foi identificado como sendo o mesmo composto isolado na fração anterior **F13E6-P2**, ou seja, a [Phe³, N-Me-Val⁵] destruxina B. Os outros dois compostos referentes aos picos 1 e 2 no cromatograma, além de terem apresentado pequena massa após o isolamento, não apresentaram RMN de ¹H de interesse.

A fração **F13E8** foi separada utilizando-se uma coluna de sílica-gel derivatizada com grupos fenila [Prodigy 5 µ, Phenyl-3 (PH-3), 100 Å, de dimensões 250 x 4,6 mm, Phenomenex®], com MeCN-H₂O 50:50 e fluxo de 1 mL/minuto e monitorando-se a separação em λ_{max} 230 nm. Como mostra a **Figura 5.3**.

Figura 5.3. Cromatograma da fração **F13E-8**. Condições: coluna de sílica-gel derivatizada com grupos fenila, Prodigy 5 μ , Phenyl-3 (PH-3) 100Å de dimensões 250 x 4,6 mm; eluentes MeCN-H₂O 50: 50; λ_{max} 230 nm.

Desta separação obtivemos três frações com peptídeos modificados: **F13E8-P2** ($m = 4,5$ mg e t_R em 9,34 minutos), **F13E8-P3** ($m = 5,3$ mg e t_R em 11,29 minutos) e **F13E8-P5** ($m = 5,5$ mg e t_R em 20,90 minutos) que mostraram ser derivados das destruxinas por análise de RMN-¹H. O composto **F13E8-P2** foi identificado como sendo o composto conhecido na literatura como cloroidrina da destruxina E (Gupta et al., 1989). A fração **F13E8-P3** foi identificada como sendo um outro composto, também já conhecido na literatura, roseotoxina B (Engstrom et al., 1975; Springer et al., 1984). E o terceiro composto isolado **F13E8-P5** foi identificado como sendo os mesmos que **F13E6-P2** e **F13E7-P3**, ou seja, o composto [Phe³, N-Me-Val⁵] destruxina B. Os compostos referentes aos picos 4 e 6 apresentaram massa muito pequena ($m = 0,2$ mg) sendo assim, não prosseguimos com sua determinação estrutural.

5.2.2. Estudo do extrato bruto isolado do fungo *Beauveria felina* AcSS8E

Uma outra linhagem de fungo também identificado como sendo *Beauveria felina*, codificado **AcSS8E**, foi obtido a partir de coleta realizada em abril de 2002 na Praia do Cabelo Gordo (Cebimar-USP, São Sebastião-SP), da superfície da alga *Caulerpa* sp. Esse fungo foi cultivado em meio MF: 2% glicose, 1% amido solúvel, 2% soytone, 0,5% peptona, 0,3% extrato de carne, 0,5% extrato de levedura, 0,03% e 100 mL de água do mar esterilizada (Kakeya et al., 1995), seu meio de cultura foi extraído com butanona, gerando o extrato bruto **AcSS8E** (renomeado **F8E**).

O trabalho de isolamento químico do extrato fúngico de *Beauveria felina* (**F8E**) foi realizado de acordo com o procedimento sumarizado no **Esquema 5.2**.

Esquema 5.2. Fluxograma do estudo do extrato bruto **F8E** de *Beauveria felina*.

^a Condições: coluna de sílica-gel derivatizada com grupos fenila, Prodigy 5 μ , Phenyl-3 (PH-3) 100Å de dimensões 250 x 4,6 mm; eluentes MeCN-H₂O 45: 55 e ; λ_{max} 246 nm.

As quatro frações obtidas (**F8E-3**, **F8E-4**, **F8E-5** e **F8E-6**), mostraram ser interessantes pela análise de espectros de RMN-¹H, por CCD e também pela análise por HPLC-PDA.

As quatro frações foram purificadas por HPLC, utilizando-se uma coluna de sílica-gel derivatizada com grupos fenila, Prodigy 5 μ , Phenyl-3 (PH-3) 100Å de dimensões 250 x 4,6 mm da marca Phenomenex®, com MeCN-H₂O 45: 55 e fluxo de 1 mL/min. Esta condição foi a melhor encontrada dentre todas testadas para separar as frações destacadas no fluxograma (**F8E-3**, **F8E-4**, **F8E-5** e **F8E-6**).

A fração **F8E-3** foi separada e obtivemos seis frações. Das seis frações, quatro mostraram ser interessantes por análise de RMN- ^1H : **F8E3-P2**, **F8E3-P4**, **F8E3-P5** e **F8E3-P6**. A cromatografia foi monitorada em 246 nm e os tempos de retenção das frações interessantes foram: **P2** em 9,98 minutos, **P4** em 13,93 minutos, **P5** em 18,66 minutos e **P6** em 23,84 minutos, como mostra a **Figura 5.4**.

Figura 5.4. Cromatograma da fração **F8E-3**. Condições: coluna de sílica-gel derivatizada com grupos fenila, Prodigy 5 μ , Phenyl-3 (PH-3) 100Å de dimensões 250 x 4,6 mm; eluentes MeCN-H₂O 45: 55; λ_{max} 246 nm.

As frações **F8E3-P2** (m = 0,7 mg) e **F8E3-P4** (m = 1,2 mg) apresentaram pequena massa foram enviadas para nossos colaboradores nos EUA, professores Dr. Chris M e Dr Tim Bugni, para obtenção dos espectros mono e bidimensionais de RMN. As frações foram identificadas como sendo dois compostos conhecidos na literatura como roseotoxina B (Engstrom et al., 1975; Springer et al., 1984) e roseocardina (Tsunoo et al., 1997), respectivamente. As frações **F8E3-P5** (m = 8,5 mg) e **F8E3-P6** (m = 4,6 mg) apresentaram maior massa tiveram seus espectros mono e bidimensionais obtidos a 500 MHz em Ribeirão Preto-SP. A fração **F8E3-P5** foi identificada como sendo o composto conhecido na literatura como [Phe³, N-Me-Val⁵] destruxina B e a fração **F8E3-P6** como um composto inédito na literatura e nomeado por nós como pseudodestruxina C (mesmo composto **F13E6-P3**).

A fração **F8E-4** foi purificada por HPLC, obtendo-se seis frações. Das seis frações obtidas, duas mostraram ser interessantes por análise de RMN- ^1H , as frações: **F8E4-P3** e **F8E4-P6**. A cromatografia foi monitorada em 240 nm e os tempos de

retenção das frações interessantes foram: **P3** em 10,05 minutos e **P6** em 23,77 minutos, como a **Figura 5.5**.

Figura 5.5. Cromatograma da fração **F8E-4**. Condições: coluna de sílica-gel derivatizada com grupos fenila, Prodigy 5 μ , Phenyl-3 (PH-3) 100Å de dimensões 250 x 4,6 mm; eluentes MeCN-H₂O 45: 55; λ_{max} 240 nm.

Por terem apresentado pequena massa, as três frações, **F8E4-P3** ($m = 1,1$ mg) e **F8E4-P6** ($m = 0,7$ mg), foram enviadas ao nosso colaborador nos EUA para obtermos os espectros de RMN. Após analisarmos seus espectros identificamos a fração **F8E4-P3** como sendo a mesma isolada anteriormente **F8E3-P2**, ou seja, roseotoxina B. E a fração **F8E4-P6** foi identificada como sendo igual à fração **F8E3-P6**, ou seja, o composto inédito pseudodestruxina C.

A fração **F8E-5** foi purificada por HPLC nas mesmas condições e obtivemos seis frações. Das seis frações obtidas, duas mostraram ser interessantes por análise de RMN-¹H, as frações: **F8E5-P2** e **F8E5-P3**. A cromatografia foi monitorada em 214 nm e os tempos de retenção das frações interessantes foram: **P2** em 6,89 minutos e **P3** em 9,85 minutos, como mostra a **Figura 5.6**.

Figura 5.6. Cromatograma da fração **F8E-5**. Condições: coluna de sílica-gel derivatizada com grupos fenila, Prodigy 5 μ , Phenyl-3 (PH-3) 100Å de dimensões 250 x 4,6 mm; eluentes MeCN-H₂O 45: 55; λ_{max} 214 nm.

Por também terem apresentado pequena massa, as duas frações **F8E5-P2** ($m = 3,9$ mg) e **F8E5-P3** ($m = 0,6$ mg) foram enviadas ao nosso colaborador nos EUA para obtermos os espectros de RMN. A fração **F8E5-P2** foi determinada como sendo um composto inédito na literatura e nomeado por nós como β -Me-Pro destruxina E e a fração **F8E5-P3** como sendo novamente o composto roseotoxina B.

A fração **F8E-6** foi purificada por HPLC, obtendo-se dez frações. Das dez frações obtidas, três mostraram ser interessantes por análise de RMN-¹H, as frações: **F8E6-P2**, **F8E6-P5** e **F8E6-P9**. A cromatografia foi monitorada em 210 nm e os tempos de retenção das frações interessantes foram: **P2** em 6,83 minutos, **P5** em 14,13 minutos e **P9** em 31,57 minutos, como mostra a **Figura 5.7**.

Figura 5.7. Cromatograma da fração **F8E-6**. Condições: coluna de sílica-gel derivatizada com grupos fenila, Prodigy 5 μ , Phenyl-3 (PH-3) 100Å de dimensões 250 x 4,6 mm; eluentes MeCN-H₂O 45: 55; λ_{max} 210 nm.

A fração **F8E6-P2** ($m = 4,8$ mg) foi identificada como sendo um composto inédito e isolado por nós em outras frações, denominado cloroidrina da β -Me-Pro da destruxina E. A fração **F8E6-P5** ($m = 4,5$ mg) foi identificada como sendo um composto conhecido na literatura como isariina B (Deffieux et al., 1981) e a fração **F8E6-P9** ($m = 2,3$ mg) como outro composto, também já conhecido na literatura por isariina (Vining et al., 1962).

5.3. Análise das estereoquímicas absolutas das amostras **F13E6-P2** e **F13E6-P3**

Foram realizados estudos de estereoquímicas absolutas para os aminoácidos comuns, presentes nas destruxinas dos compostos **F13E6-P2** e **F13E6-P3** que apresentaram massa suficiente para realizar as reações de hidrólise e derivatização (por método de Marfey modificado). Os outros compostos, obtidos em menor quantidade, tiveram seus estudos de estereoquímica realizados pelo grupo do prof. Dr. Chris M. Ireland.

Inicialmente realizamos as reações de hidrólise com 1,0 mg de cada uma das duas amostras (**F13E6-P2** e **F13E6-P3**). As amostras (separadamente) dissolvidas em 0,5 mL de ácido clorídrico (HCl) 6 M, num sistema de refluxo, foram aquecidas a 105° C por 24 horas. Após esse período, as soluções ácidas foram evaporadas.

Após a reação de hidrólise, as duas amostras (**F13E6-P2** e **F13E6-P3**) e padrões dos aminoácidos (**L**)-Prolina, (**L**)-Fenilalanina e (**D**)-(**L**)-N-Me-Valina foram derivatizadas com reagente de Marfey [$N\alpha$ (2,4 dinitro-5 fluoro-fenil-L-alaninamida)], segundo procedimento descrito por Marfey e Ottesen (1984).

Adicionamos às amostras hidrolisadas e aos padrões, separadamente, 40 μL de água, 16 μL de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) 0,5 M e 80 μL de uma solução de reagente de Marfey em acetona (obedecendo a estequiometria 1,0 mol de aminoácido para 1,4 mol de reagente). As amostras foram mantidas em aquecimento de 40°C por 1 hora. Em seguida adicionamos as amostras 16 μL de ácido clorídrico (HCl) 0,5 M, evaporamos, ressolubilizamos cada amostra em metanol (grau HPLC) e as analisamos por HPLC-PDA.

Os padrões de aminoácidos derivatizados e as amostras hidrolisadas e derivatizadas foram separadamente analisados por HPLC-PDA, utilizando-se uma coluna de sílica-gel derivatizada com grupos fenila, [Prodigy 5 μ , Phenyl-3 (PH-3), 100 Å, de dimensões 250 x 4,6 mm, Phenomenex®], com gradiente de MeCN em sistema tampão (água, ácido fosfórico e trietilamina) e fluxo de 1 mL/minuto. Esta condição foi a melhor encontrada dentre todas testadas para analisar os padrões de aminoácidos e as destruxinas isoladas (**F13E6-P2** e **F13E6-P3**).

5.4. Resultados e Discussão

O trabalho de isolamento de linhagens de fungos a partir de amostras do ambiente marinho, sua purificação microbiológica, crescimento em meio de cultura líquido, preparação dos extratos brutos, realização das análises químicas e biológicas foi desenvolvida por uma ex-aluna do prof. Berlinck, Aline Maria de Vita, no decorrer do seu projeto de mestrado, que resultou na dissertação intitulada "Isolamento, Atividade Biológica e Análise do Perfil Químico de Fungos Coletados no Litoral do Estado de São Paulo", apresentada para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia em 05.05.2003, no Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

Os fungos foram isolados de diversas fontes (sedimentos, rochas submersas, cnidários, algas e esponjas) de duas regiões diferentes: São Sebastião-SP e Peruíbe-SP. Em Peruíbe-SP, foram coletadas amostras de algas, de rochas e de sedimentos marinhos. Em São Sebastião-SP, as amostras foram obtidas da superfície de rochas submersas pela água do mar, de sedimentos marinhos, da esponja *Tedania ignis*, do cnidário *Anemonia sargassensis*, das algas *Sargassum cymossum*, *Padina sp* e *Caulerpa sp*.

A partir destas amostras do ambiente marinho foram isoladas 57 linhagens de fungos. Essas linhagens foram crescidas em meio de cultura líquido, em modo estático e dinâmico (com agitação), resultando em 114 culturas que foram extraídas e trituradas em liquidificador com butanona (solvente imiscível com H₂O). O extrato orgânico foi concentrado e submetido à partição líquido-líquido (butanona/ água). A fração aquosa foi descartada e a fração orgânica deu origem aos extratos brutos. Esses extratos brutos de origem fúngica marinha foram evaporados e analisados química (HPLC, CCD e RMN-¹H) e biologicamente, em bioensaios de atividade citotóxica, antituberculose, antibacteriana e de inibição da enzima L-APRT.

Baseando-se nos resultados obtidos por Aline e na quantidade de massa dos extratos brutos, selecionamos os extratos brutos **AcSS13E** e **AcSS8E** para realizarmos o isolamento de seus compostos ativos.

Os dois extratos fúngicos selecionados foram investigados separadamente e simultaneamente. Enviamos amostras dos respectivos fungos para serem identificados no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, pelo grupo da Dra. Lara Durães Sette. As duas amostras foram identificadas como sendo da espécie *Beauveria felina* (**Figura 5.8**). Essa espécie foi descrita pela primeira vez por Hoog (1972) e sua classificação é apresentada na **Figura 5.9**.

Figura 5.8. Foto do fungo *Beauveria felina* (Raquel Urano).

Reino: Fungi
Subdivisão: Deuteromycotina
Classe: Hyphomycete
Família: Moniliaceae
Espécie: *Beauveria felina*

Figura 5.9. Taxonomia do fungo *Beauveria felina*.

Os extratos brutos **AcSS13E** e **AcSS8E** apresentaram atividades nos bioensaios antituberculose e de atividade citotóxica em linhagem de células de câncer de mama, cólon, sistema nervoso e leucemia.

5.4.1. Determinação estrutural dos compostos obtidos a partir dos extratos F13E e F8E de duas linhagens do fungo *Beauveria felina*

A partir do isolamento do extrato **F13E** do fungo *Beauveria felina* foram obtidas seis frações puras: **F13E6-P2** (m= 39,7 mg), **F13E6-P3** (m= 21,3 mg), **F13E7-P3** (m= 3,2 mg), **F13E8-P2** (m= 4,5 mg), **F13E8-P3** (m= 5,3 mg) e **F13E8-P5** (m= 5,5 mg).

E a partir do outro extrato fúngico **F8E**, também identificado como sendo *Beauveria felina*, foram obtidas onze frações puras: **F8E3-P2** (m= 0,7 mg), **F8E3-P4** (m= 1,2 mg), **F8E3-P5** (m= 8,5 mg), **F8E3-P6** (m= 4,6 mg), **F8E4-P3** (m= 1,1 mg), **F8E4-P6** (m= 0,7 mg), **F8E5-P2** (m= 3,9 mg), **F8E5-P3** (m= 0,8 mg), **F8E6-P2** (m= 4,8 mg), **F8E6-P5** (m= 4,5 mg) e **F8E6-P9** (m= 2,3 mg).

Os dois extratos fúngicos (**F13E** e **F8E**) foram investigados separadamente, pois ainda não era de nosso conhecimento que ambos eram da mesma espécie do fungo, *Beauveria felina*, porém de diferentes linhagens. Como vários compostos foram isolados repetidamente apresentaremos os resultados e discussões agrupando as frações que se referem aos mesmos compostos.

Compostos F13E6-P3, F8E3-P6 e F8E4-P6: pseudodestruxina C

Os compostos **F13E6-P3**, **F8E3-P6** e **F8E4-P6** demonstraram ser todos o mesmo composto inédito e por nós nomeado como pseudodestruxina C.

O composto **F13E6-P3** foi obtido como um sólido branco opticamente ativo com $[\alpha]_D^{27} = -119,20$ (c 0,0213, MeOH) e apresentou em seu espectro de absorção no infravermelho (disco de silício) as seguintes bandas (**V.2, Figura 5.1**):

- 3336,9 - 3275,7 cm^{-1} atribuídas a presença de grupos NH;
- 2963,6 - 2858,2 cm^{-1} atribuídas a grupos C-H alifáticos;
- 1713,9 cm^{-1} atribuídas a grupos carbonila de grupo éster;
- 1671,7- 1618,3 atribuídas a carbonila de grupos de amida secundária.

O seu espectro de absorção no ultravioleta em MeOH apresentou λ_{max} em 230 nm.

O conjunto de espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (V.2, Figuras 5.2 e 5.3) e bidimensionais do composto **F13E6-P3** demonstrou que a amostra é um derivado de peptídeo, mais precisamente uma destruxina com 5 resíduos de α -aminoácidos (dois resíduos do aminoácido *N*-Me-valina, um de β -Me-prolina, fenilalanina e β -alanina) e 1 resíduo de α -hidroxiácido (ácido 2-hidroxi 4-metilpentanóico).

Pudemos estabelecer a estrutura de **F13E6-P3** como sendo um derivado das destruxinas.

No espectro de RMN- ^{13}C e DEPT (V.2, Figuras 5.3 e 5.4) de **F13E6-P3** pudemos distinguir 36 sinais de carbonos:

- 6 sinais de carbonos carbonílicos com deslocamentos químicos em δ 170,5; 171,7; 172,5; 173,3; 175,2 e 175,6;
- 5 sinais de carbonos do tipo CH em δ 55,2; 59,1; 67,9; 69,3; 74,7 típicos de carbonos em posição α dos aminoácidos, sendo que o carbono α com deslocamento acima de 70 deve-se à presença do α -hidroxiácido;
- 1 sinal de carbono CH com hibridização sp^3 em δ 41,4 ligado ao carbono no anel da metil-prolina e 2 carbonos em deslocamentos químicos de δ 29,8 e 30,4 ligados aos carbonos em posição α dos aminoácidos *N*-Me-valina 1 e 2, e um outro sinal de carbono CH em δ 26,1 do ácido α -hidroxi-4-metilpentanóico;
- 6 sinais de carbonos aromáticos: 1 carbono quaternário em δ 138,1; dois pares de carbono do tipo CH aromáticos quimicamente equivalentes em δ 129,9 e 130,2, e; 1 carbono aromático do tipo CH em δ 128,4;
- 6 sinais de carbonos do tipo CH_2 : dois com deslocamentos químicos em δ 29,9 e 46,6 no anel da prolina; um em δ 36,0 ligado a um carbono carbonílico e seu vizinho em δ 36,9 que por sua vez está ligado ao NH na β -alanina; um em δ 30,4 ligado ao carbono quaternário do anel aromático da fenilalanina; e por último um em δ 39,9 ligado ao carbono α do α -hidroxiácido;
- 6 sinais de carbonos de grupo metila com deslocamentos químicos em δ 19,3; 19,4; 20,0; 20,4; 20,8 e 21,4;
- 1 sinal de carbono de grupo metila em δ 23,8 ligado ao anel da prolina;
- 2 sinais de carbonos de grupo metila em deslocamentos químicos δ 30,0 e 30,4, indicando que estão ligados a átomos de nitrogênio.

A completa elucidação da estrutura pseudodestruxina C (**F13E6-P3**) foi possível pela análise em conjunto dos espectros obtidos a partir da realização de vários experimentos de RMN mono- e bidimensionais: ^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC e HMBC (**V.2, Figuras 5.2, 5.3, 5.4, 5.5a e b, 5.6 e 5.7**, respectivamente).

Primeiramente procedemos à identificação de cada aminoácido pela análise do conjunto de espectros (**Figuras 5.10; 5.11; 5.12; 5.13 e 5.14**).

Figura 5.10. Esquema de correlações observadas nos espectros de RMN do tipo COSY e HMBC para o ácido 2-hidroxi-4-metilpentanóico, da **pseudodestruxina C (F13E6-P3)**.

Figura 5.11. Esquema de correlações observadas nos espectros de RMN do tipo COSY e HMBC para o resíduo do aminoácido fenilalanina, da **pseudodestruxina C (F13E6-P3)**.

Figura 5.12. Esquema de correlações observadas nos espectros de RMN do tipo COSY e HMBC para os resíduos dos dois aminoácidos de *N*-Me-valina, da **pseudodestruxina C (F13E6-P3)**.

Figura 5.13. Esquema de correlações observadas nos espectros de RMN do tipo COSY e HMBC para o resíduo do aminoácido β -Me-prolina, da **pseudodestruxina C (F13E6-P3)**.

Figura 5.14. Esquema de correlações observadas nos espectros de RMN do tipo COSY e HMBC para o resíduo do aminoácido β -alanina, da **pseudodestruxina C (F13E6-P3)**.

O espectro HMBC também nos permitiu observar as conexões entre os aminoácidos, ou seja, entre o hidrogênio α e o carbono da carbonila do aminoácido vizinho, finalizando sua determinação estrutural (**Figura 5.15**).

Figura 5.15. Correlações observadas no espectro HMBC entre os aminoácidos, da fração **F13E6-P3**.

O espectro de massas FAB positivo (**V.2, Figura 5.8**) do composto **F13E6-P3** apresentou o pico do íon pseudo-molecular $[M+H]^+$ em m/z 670,4149 (calculado 670,4179) que, em conjunto com os dados de RMN indicou uma fórmula molecular $C_{36}H_{55}N_5O_7$.

Desta maneira pudemos estabelecer a estrutura de **F13E6-P3 (92)** como um ciclodepsipeptídeo inédito.

(92)
F13E6P3

Compostos F13E6-P2, F13E7-P3, F13E8-P5 e F8E3-P5: [Phe³, N-Me-Val⁵] destruxina B

Os compostos **F13E6-P2**, **F13E7-P3**, **F13E8-P5** e **F8E3-P5** demonstraram ser todos o mesmo composto, conhecido na literatura como [Phe³, N-Me-Val⁵] destruxina B, (Kim et al., 2002).

Esse composto demonstrou ser um outro derivado das destruxinas, muito semelhante ao composto pseudodestruxina C. A diferença se refere à presença de um resíduo de prolina no lugar do resíduo β -metil-prolina.

O composto **F13E6-P2** foi obtido como um sólido branco opticamente ativo de $[\alpha]_D^{27} = -185,76$ ($c = 0,0085$, MeOH) e apresentou em seu espectro de absorção no infravermelho (**V.2, Figura 5.9**), filme em disco de silício, as seguintes bandas:

- 3350,5 - 3286,5 cm^{-1} atribuídas a presença de grupos NH;
- 2956,8 - 2875,0 cm^{-1} atribuídas a grupos C-H alifáticos;
- 1726,8 cm^{-1} atribuídas a grupo carbonila do tipo éster;
- 1675,9- 1616,6 atribuídas a carbonila de grupos de amida secundária.

O conjunto de espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (**V.2, Figuras 5.10 e 5.11**) e bidimensionais do composto **F13E6-P2** demonstrou que a amostra é um derivado de peptídeo, mais precisamente uma destruxina com 5 resíduos de α -aminoácidos (dois resíduos do aminoácido N-Me-valina, um de prolina, um de fenilalanina e um de β -alanina e 1 resíduo de α -hidroxiácido (ácido 2-hidroxi 4-metilpentanóico).

No espectro de RMN- ^{13}C (**V.2, Figuras 5.11**) de **F13E6-P2** pudemos distinguir 35 sinais de carbonos:

- 6 sinais de carbonos carbonílicos com deslocamentos químicos em δ 170,3; 170,1; 169,0; 172,4; 174,0 e 174,4;
- 5 sinais de carbonos do tipo CH em δ 54,2; 57,9; 61,3; 66,8 e 73,7 típicos de carbonos em posição α dos aminoácidos, sendo que o carbono α com deslocamento acima de 70 deve-se à presença do α -hidroxiácido;

- 2 carbonos em deslocamentos químicos em δ 28,1 e 28,0 ligados aos carbonos em posição α dos aminoácidos *N*-Me-valina 1 e 2, e um outro sinal de carbono CH em δ 25,1 do ácido α -hidroxi-4-metilpentanóico;
- 6 sinais de carbonos aromáticos: 1 carbono quaternário em δ 136,7; dois pares de carbono do tipo CH aromáticos quimicamente equivalentes em δ 129,1 e 129,1 e 1 carbono aromático do tipo CH em δ 127,6;
- 7 sinais de carbonos do tipo CH₂: três com deslocamentos químicos em δ 22,4; 32,7 e 47,5 no anel da prolina; dois em δ 35,7 e 35,9 no resíduo β -alanina; um em δ 35,4 ligado ao carbono quaternário do anel aromático da fenilalanina; e por último um em δ 39,1 ligado ao carbono α do α -hidroxiácido;
- 6 sinais de carbonos de grupo metila com deslocamentos químicos em δ 19,3; 19,9; 20,1; 20,6, 20,9 e 23,7;
- 2 sinais de carbonos de grupo metila em deslocamentos químicos δ 29,4 e 30,0, indicando que estão ligados a átomos de nitrogênio.

A presença de um resíduo de β -alanina justificou a ausência do 6º sinal de carbono- α no espectro de RMN-¹³C de **F13E6-P2**, pois os sinais dos carbonos metilênicos deste aminoácido situam-se em δ 30 e 40. Dois grupos *N*-metila foram observados, e puderam ser atribuídos aos dois resíduos de valina, pois apresentaram correlações à longa-distância no espectro HMBC com os respectivos carbonos- α de cada uma das valinas (δ 59,0 e 67,8). A atribuição dos grupos carbonila de cada um dos aminoácidos pôde ser realizada sem ambigüidade em se observando as correlações à longa distância entre os hidrogênios das cadeias laterais de cada um dos aminoácidos e um único grupo carbonila. E finalmente, as conexões entre os aminoácidos pôde ser feita em se observando correlações à longa distância entre os hidrogênios- α de cada um dos aminoácidos, com dois grupos carbonila: um do próprio aminoácido e outro do grupo ácido conectado ao próprio grupo amino. Sendo assim, foi possível estabelecer a estrutura de **F13E6-P2** como sendo a do ciclodepsipeptídio cíclico conhecido na literatura como [Phe³, *N*-Me-Val⁵] destruxina B, (Kim et al., 2002). Adicionalmente, observou-se correlações à longa distância entre os dois grupos *N*-metila e cada uma das carbonilas a estes conectados. Após a determinação estrutural deste composto foi possível construir a **Tabela 5.1** comparando os valores de

deslocamentos de ^{13}C do composto isolado **F13E6-P2 (93)** com os dados de ^{13}C do mesmo composto já isolado na literatura.

(93)

F13E6P2

(Phe³, N-MeVal⁵) destruxina B

(Kim, et al., 2002)

Tabela 5.1. Dados de RMN- ^{13}C (125 MHz em CDCl_3) de **F13E6-P2** e de $[\text{Phe}^3, \text{N-Me-Val}^5]$ destruxina B (150 MHz, em CDCl_3), (Kim et al., 2002).

	F13E6-P2	$[\text{Phe}^3, \text{N-Me Val}^5]$ destruxina B
Posição	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$
N-Me-valina 1		
$\alpha\text{-CH}$	57,9	57,5
$\beta\text{-CH}$	28,0	27,6
$\gamma_1\text{-CH}_3$	19,3	18,8
$\gamma_2\text{-CH}_3$	20,6	20,2
N-CH_3	30,0	29,6
C=O	170,1	169,7
N-Me-valina 2		
$\alpha\text{-CH}$	66,8	66,5
$\beta\text{-CH}$	28,1	27,7
$\gamma_1\text{-CH}_3$	19,9	19,5
$\gamma_2\text{-CH}_3$	20,1	19,7
N-CH_3	29,4	29,0
C=O	169,0	168,6
fenilalanina		
$\alpha\text{-CH}$	54,2	53,8
$\beta\text{-CH}_2$	35,4	35,0
C_1	136,7	136,3
C_2, C_6	129,1	128,7
C_3, C_5	129,1	128,7
C_4	127,6	127,2
C=O	174,0	173,6
β-alanina		
$\alpha\text{-CH}_2$	35,7	35,3
$\beta\text{-CH}_2$	35,9	35,5
NH		
C=O	174,4	174,0
prolina		
$\alpha\text{-CH}$	61,3	60,9
$\beta\text{-CH}_2$	32,7	32,2
$\gamma\text{-CH}_2$	22,4	22,0
$\delta\text{-CH}_2$	47,5	47,1
C=O	172,4	172,0
ácido 2-hidroxi 4-metilpentanóico		
$\alpha\text{-CH}$	73,7	73,3
$\beta\text{-CH}_2$	39,1	38,7
$\gamma\text{-CH}$	25,1	24,7
$\gamma_1\text{-CH}_3$	20,9	20,5
$\gamma_2\text{-CH}_3$	23,7	23,3
C=O	170,3	169,9

O espectro de massas FAB positivo (**V.2, Figura 5.12**) do composto **F13E6-P2** apresentou o pico do íon quase-molecular $[M+H]^+$ em m/z 656,4018 que, em conjunto com os dados de RMN indicou uma fórmula molecular $C_{35}H_{53}N_5O_7$. Desta maneira pudemos estabelecer a estrutura de **F13E6-P2** como um ciclodepsipeptídeo conhecido na literatura como $[Phe^3, N-Me-Val^5]$ destruxina B, (Kim et al., 2002).

Os espectros de RMN- 1H das amostras **F13E7-P3** (**V.2, Figura 5.13**), **F13E8-P5** (**V.2, Figura 5.14**) e **F8E3-P5** (**V.2, Figura 5.15**) apresentaram sinais de deslocamentos, integrais e multiplicidades idênticas ao composto **F13E6-P2**.

Compostos F13E8-P3, F8E3-P2, F8E4-P3 e F8E5-P3: roseotoxina B

Os compostos **F13E8-P3**, **F8E3-P2**, **F8E4-P3** e **F8E5-P3** demonstraram ser todos o mesmo e conhecido na literatura como roseotoxina B, (Engstrom et al., 1975; Springer et al., 1984).

O composto **F13E8-P3** foi obtido como um sólido amorfo de cor marrom claro opticamente ativo de $\alpha_{[D]}^{27} = -225,09$ ($c = 0,0053$, MeOH) e apresentou em seu espectro de absorção no infravermelho (filme em disco de silício) as seguintes bandas:

- 3353 -3291 cm^{-1} atribuídas a presença de grupos NH;
- 2962 -2874 cm^{-1} atribuídas a grupos C-H alifáticos;
- 1721 cm^{-1} atribuídas a grupo carbonila do tipo éster;
- 1675- 1635 atribuídas a carbonila de grupos de amida secundária.

O conjunto de espectros de RMN de 1H e ^{13}C (**V.2, Figuras 5.16 e 5.17**) e bidimensionais do composto **F13E8-P3** demonstrou que a amostra é um derivado de peptídeo, uma destruxina com 5 resíduos de α -aminoácidos (um resíduo do aminoácido *N*-Me-valina, um de *N*-Me-alanina, um de 3-Me-prolina, um de isoleucina, um de β -alanina e um resíduo de α -hidroxiácido (2- hidroxiácido). Sendo que neste resíduo de α -hidroxiácido identificamos a presença de um outro carbono do tipo sp^2 , com valores característicos de ^{13}C em δ 119,2 e seus respectivos 1H s em δ 5,23 e 5,18

Após a determinação estrutural deste composto foi possível construir a **Tabela 5.2** comparando os valores de deslocamentos de ^{13}C do composto isolado **F13E8-P3** com os dados de ^{13}C do mesmo composto já isolado na literatura da roseotoxina B.

Tabela 5.2. Dados de RMN- ^{13}C (100 MHz em DMSO- d_6) de **F13E8-P3** e de roseotoxina B (125 MHz, em CDCl_3), (Tsunoo et al., 1997).

	F13E8-P3	roseotoxina B
Posição	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$
isoleucina		
α -CH	52,7	53,4
β -CH	36,9	37,4
γ_1 -CH ₂	24,1	24,5
γ_2 -CH ₃	15,5	15,3
δ -CH ₃	11,4	11,2
C=O	173,4	173,5
N-Me-valina		
α -CH	57,3	58,0
β -CH	30,7	30,7
γ_1 -CH ₃	19,3	19,5
γ_2 -CH ₃	19,3	19,9
N-CH ₃	26,8	27,1
C=O	170,7	171,0
N-Me-alanina		
α -CH	55,1	55,5
β -CH ₃	15,3	15,1
N-CH ₃	27,9	28,0
C=O	169,1	169,6
β-alanina		
α -CH ₂	34,2	34,4
β -CH ₂	33,1	33,1
NH		
C=O	173,2	173,5
3-Me-prolina		
α -CH	44,9	45,0
β -CH ₂	30,4	30,7
γ -CH ₂	36,4	36,0
δ -CH	18,8	18,8
N-CH ₃	66,7	67,2
C=O	170,4	170,8
2-hidroxi-ácido		
α -CH	72,1	72,5
β -CH ₂	34,8	35,1
γ -CH	131,8	130,9
δ -CH ₂	119,5	119,8
C=O	168,8	169,0

A determinação estrutural do composto **roseotoxina B (94)** foi finalizada após análise dos dados obtidos no conjunto de espectros de RMN e EM, bem como a comparação com os dados obtidos na literatura.

(94)
F13E8P3

Os espectros de RMN- ^1H das amostras **F8E3-P2 (V.2, Figura 5.18)**, **F8E4-P3 (V.2, Figura 5.19)** e **F8E5-P3 (V.2, Figura 5.20)** apresentaram sinais de deslocamentos, integrais e multiplicidades idênticas ao composto **F13E8-P3**.

Composto F13E8-P2: cloroidrina da destruxina E

O composto **F13E8-P2** demonstrou ser o mesmo conhecido na literatura como cloroidrina da destruxina E (Gupta et al., 1989), e obtido como um sólido amorfo de cor marrom claro opticamente ativo de $\alpha_{[\text{D}]}^{20} = -199^\circ$ ($c = 0,45$, MeOH).

O conjunto de espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (V.2, Figuras 5.21 e 5.22) e bidimensionais do composto **F13E8-P2** demonstrou que a amostra é um outro derivado de destruxina com 5 resíduos de α -aminoácidos (isoleucina, *N*-Me-valina, *N*-Me-alanina, β -alanina e prolina) e 1 resíduo de α -hidroxiácido (ácido 5-cloro-2,4-di-hidroxi pentanóico).

As intensidades observadas dos íons pseudo-moleculares $[\text{M}+\text{H}]$ e $[\text{M}^{37}\text{Cl}+\text{H}]$ no espectro de massas do composto, indicam a presença de um átomo de cloro em sua estrutura molecular.

Após a determinação estrutural deste composto foi possível construir a **Tabela 5.3** comparando os valores de deslocamentos de ^{13}C do composto isolado **F13E8-P2** com os dados de ^{13}C do mesmo composto já isolado na literatura.

Tabela 5.3. Dados de RMN- ^{13}C (100 MHz em $\text{DMSO}-d_6$) de **F13E8-P2** e de cloroidrina da destruxina E (100 MHz, em CDCl_3), (Gupta et al., 1989).

	F13E8-P2	cloroidrina da destruxina E
Posição	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$
isoleucina		
α -CH	52,7	53,7
β -CH	36,9	37,3
γ_1 -CH ₂	23,9	24,3
γ_2 -CH ₃	15,3	15,3
δ -CH ₃	11,4	11,4
C=O	172,3	169,5
N-Me-valina		
α -CH	57,3	58,0
β -CH	26,8	27,2
γ_1 -CH ₃	19,0	19,5
γ_2 -CH ₃	19,3	20,0
N-CH ₃	30,7	30,9
C=O	170,7	170,7
N-Me-alanina		
α -CH	55,0	55,5
β -CH ₃	15,5	15,2
N-CH ₃	27,9	28,1
C=O	169,3	169,7
β-alanina		
α -CH ₂	34,4	34,9
β -CH ₂	33,1	33,1
NH		
C=O	173,5	173,6
prolina		
α -CH	66,8	61,2
β -CH ₂	30,4	29,1
γ -CH ₂	23,9	23,9
δ -CH ₂	44,8	46,6
C=O	170,4	171,0
ácido 5-cloro-2,4-di-hidroxi pentanóico		
α -CH	70,6	70,3
β -CH ₂	35,4	34,5
γ -CH	66,7	66,9
δ -CH ₂	49,6	49,8
C=O	169,0	173,4

Sendo assim, concluímos a determinação estrutural para o composto **F13E8-P2** como cloroidrina da destruxina E (**95**) (Gupta et al., 1989).

(95)
cloroidrina
da destruxina E

Composto F8E5-P2: cloroidrina da [β-Me-Pro] da destruxina E

O ciclodepsipeptídeo foi isolado como um sólido amorfo branco opticamente ativo com $\alpha_{[D]}^{25} = -0,2$ ($c = 0,09$, CHCl_3). O espectro de massas ESI (V.2, Figura 5.23) para o composto **F8E5-P2** apresentou o pico do íon pseudo-molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ apresentou m/z 644,3426 (calculado m/z 643,33) que, em conjunto com os dados de RMN indicou uma fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{ClN}_5\text{O}_8$.

Os dados de RMN- ^1H (V.2, Figura 5.24) demonstraram que a amostra é um outro derivado de destruxina, com cinco hidrogênios α entre δ 4,00 e 5,00, dois hidrogênios de amida em $\delta_{\text{N-H}}$ 8,06 e $\delta_{\text{N-H}}$ 6,90 e dois grupos *N*-metil em δ 3,20 e δ 2,63. Realizando uma busca na literatura observamos uma grande semelhança do composto também isolado por nós e descrito no item anterior, a cloroidrina da destruxina E.

A diferença entre os dois compostos é somente quanto a presença do resíduo β -Me-prolina com δ 1,09 (d, 7 Hz) e β -metino multiplete em δ 2,54, no lugar do resíduo de prolina.

Foram observados correlações no espectro ROESY entre o hidrogênio na posição α do resíduo do ácido pentanóico (δ 5,14, t, 7 Hz) e ambos hidrogênios em posição δ do resíduo do aminoácido β -Me-prolina (δ 3,83, m e δ 3,5, ddd). Analisando os espectros COSY foi possível observar as correlações entre os hidrogênios em posição α com os hidrogênios em δ . Os espectros HMBC mostraram correlações entre os hidrogênios α da β -Me-prolina e o hidrogênio da amida do resíduo isoleucina (δ

6,90, d, 9,0 Hz) com o carbono da carbonila em δ 169,1, confirmando que o resíduo isoleucina está vizinho a β -Me-prolina. Foram observados ainda correlações entre o hidrogênio α da *N*-Me-valina (δ 4,99, d, 11 Hz) com a metila do resíduo *N*-Me-alanina, bem como a correlação entre o hidrogênio α da *N*-Me-alanina (δ 5,18, t, 7 Hz) com o hidrogênio de amida de β -alanina (δ 8,05, d, 9,0 Hz), confirmando a sequência dos resíduos dos aminoácidos e do ácido α -hidroxi, para o composto isolado (**96**).

(**96**)
cloroidrina da (β -Me-Pro)
da destruxina E

Após a determinação estrutural deste composto observando os espectros de RMN¹³C (**V.2, Figura 5.25**), HSBC e HMBC, foi possível construir a **Tabela 5.4** com os valores de deslocamentos de ¹H e ¹³C do composto isolado **F8E5-P2** e nomeado por nós como cloroidrina da [β -Me-Pro] da destruxina E.

Tabela 5.4. Dados de RMN- ^1H e ^{13}C (500 MHz e 125 MHz, em MeCN/DMSO- d_6 -5:1) de cloridrina da [β -Me-Pro] da destruxina E.

Posição	^1H δ (mult., J in Hz) ^a	^{13}C δ
Ácido 5-cloro-2,4-di-hidroxi pentanóico		
α	5,14 t (7,0)	70,6
β, β'	2,07 ddd (7,0, 8,3, 13,8), 2,13 ddd (4,8, 7,0, 13,8)	35,2
γ	3,76 ddd (4,5, 4,8, 5,6, 8,3)	66,9
δ	3,61 dd (5,6, 11,2)	49,2
δ'	3,65dd (4,5, 11,2)	
C=O		170,6
β-alanina		
α, α'	3,01 m, 3,92 m	32,8
β, β'	2,46 ddd (2,0, 11,5, 18,0), 2,69 dd (4,5, 18,0)	34,2
N-H	8,05 (dl, 9,0)	
C=O		173,5
N-Me-alanina		
α	5,18 t (7,0)	55,1
β	1,23 d (7,0)	14,7
N-Me	2,63 s	27,4
C=O		169,1
N-Me-valina		
α	4,99 d (11,0)	57,5
β	2,27 dqq (11,0, 7,0, 7,0)	26,9
γ	0,90 d (7,0)	18,8
δ	0,93 d (7,0)	18,7
N-Me	3,20 s	30,4
C=O		170,6
Isoleucina		
α	4,83 dd (6,5, 9,5)	52,9
β	1,90 m	36,9
γ, γ'	1,31m, 1,49 m	24,0
δ, δ'	0,83 d (7,0)	10,7
ϵ, ϵ'	0,84 d (7,0)	14,7
N-H	6,90 d (9,0)	
C=O		173,5
β-Me-prolina		
α	4,04 d (2,0)	66,9
β	2,54 m	36,9
γ, γ'	1,70 ddd (3,9, 7,2, 12,8), 2,0 m	30,4
δ, δ'	3,83 ddd (3,9, 9,1, 9,1), 3,93 m	44,9
β -Me	1,09 d (7,0)	18,4
C=O		169,1

Composto F8E3-P4: roseocardina

O composto **F8E3-P4** demonstrou ser o mesmo conhecido na literatura como roseocardina (Tsunoo et al., 1997).

O composto **F8E3-P4** foi obtido como um sólido amorfo de cor marrom claro e seu conjunto de espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (V.2, Figuras 5.26 e 5.27) e bidimensionais do composto **F8E3-P4** demonstrou que a amostra é um derivado de peptídeo, mais precisamente uma destruxina com 5 resíduos de α -aminoácidos (isoleucina, *N*-Me-valina, *N*-Me-alanina, β -alanina e 3-Me-prolina) e 1 resíduo de α -hidroxiácido (ácido 2-hidroxi-isocapróico).

Após a determinação estrutural deste composto foi possível construir a Tabela 5.5 comparando os valores de deslocamentos de ^{13}C do composto isolado **F8E3-P4** com os dados de ^{13}C do mesmo composto já isolado na literatura.

Tabela 5.5. Dados de RMN- ^{13}C (125 MHz em 3:1 MeCN- d_3 /DMSO- d_6) de **F8E3-P4** e de roseocardina (125 MHz, em CDCl_3), (Tsunoo et al., 1997).

	F8E3-P4	roseocardina
Posição	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$
isoleucina		
α -CH	53,8	53,6
β -CH	37,5	37,4
γ_1 -CH ₂	24,9	24,5
γ_2 -CH ₃	15,6	15,0
δ -CH ₃	11,5	11,7
C=O	174,2	173,4
N-Me-valina		
α -CH	58,4	58,4
β -CH	31,3	30,7
γ_1 -CH ₃	19,5	19,5
γ_2 -CH ₃	19,7	19,8
N-CH ₃	27,7	27,3
C=O	171,6	171,0
N-Me-alanina		
α -CH	55,9	55,8
β -CH ₃	15,8	15,2
N-CH ₃	28,3	28,5
C=O	170,6	169,6
β-alanina		
α -CH ₂	34,9	34,0
β -CH ₂	33,8	33,5
NH		
C=O	174,4	173,7
3-Me-prolina		
α -CH	45,7	44,9
β -CH ₂	31,3	30,6
γ -CH ₂	37,7	35,7
δ -CH ₂	19,1	19,2
N-CH ₃	67,7	65,2
C=O	171,6	170,8
ácido 2-hidroxi - isocaproico		
α -CH	72,6	72,2
β -CH ₂	39,0	39,0
γ -CH	24,9	24,2
δ_1 -CH ₃	23,5	23,9
δ_2 -CH ₃	21,9	21,7
C=O	170,1	169,8

O espectro de massas de composto **F8E3-P4** apresentou um pico de íon pseudo-molecular $[M+H]^+$ em 608,3 (calculado 607,3) que, em conjunto com os dados de RMN, indicou uma fórmula molecular $C_{31}H_{53}N_5O_7$.

(97)
roseocardina
Tsunoo, et al., 1997

Compostos F8E6-P5: isariina e F8E6-P9: isariina B

Os compostos **F8E6-P5** e o **F8E6-P9** demonstraram ser os compostos conhecidos na literatura como isariina e isariina B, respectivamente (Deffieux et al., 1981; Vining et al., 1962).

Ambos foram identificados por análise LC-MS/MS (**V.2, Figuras 5.28 e 5.29**) com sendo dois derivados peptídicos, muito semelhantes entre si, com 5 resíduos de α -aminoácidos (glicina, leucina, alanina e dois resíduos de valina). O espectro de massas de composto isariina apresentou um pico de íon pseudo-molecular $[M+H]^+$ em 596,4027 (calculado 595,39) indicando uma fórmula molecular $C_{30}H_{53}N_5O_7$ e o espectro de massas de composto isariina B apresentou um pico de íon pseudo-molecular $[M+H]^+$ em 638,4433 (calculado 637,44) indicando uma fórmula molecular $C_{33}H_{59}N_5O_7$. A diferença se refere à presença ao tamanho da cadeia lateral do composto. O composto isariina apresentou oito carbonos do tipo CH_2 , enquanto a isariina B apresentou cinco carbonos do mesmo tipo.

(98)
isariina B

(99)
isariina

5.5. Estudo das esterequímicas absolutas das amostras F13E6-P2 e F13E6-P3

Conhecer o arranjo espacial dos grupos em uma molécula, ou seja, sua configuração absoluta é de grande importância, principalmente quando se trata de um composto que apresenta atividade biológica. Os isômeros dos compostos nem sempre apresentam a mesma ação biológica. Por exemplo, o isômero (*S*) da penicilina é um agente terapêutico potente para artrite crônica primária, enquanto o isômero (*R*) não tem ação terapêutica e é altamente tóxico. O medicamento anti-hipertensivo medildopa (Aldomet) também apresenta seu efeito exclusivamente pelo isômero (*S*).

A configuração absoluta de uma molécula pode ser determinada pela análise de raios X de Bijvoet, ou relacionando a configuração de uma molécula, através de reações estereoespecíficas, com uma outra molécula cuja configuração absoluta seja conhecida, de maneira que nenhuma ligação com o estereocentro seja quebrada, fazendo com que os grupos mantenham sua configuração inicial (Solomons, 2001).

Assim, realizamos uma reação de hidrólise com as destruxinas isoladas por nós em maior quantidade de massa (**F13E6-P2: [Phe³, N-Me-Val⁵] destruxina B** e **F13E6-P3: pseudodestruxina c**) para obter os seus aminoácidos individuais. Após a reação

de hidrólise, realizamos uma derivatização com reagente Marfey [*N*α (2,4 dinitro-5 fluoro-fenil-L-alaninamida)]. Sabendo que o reagente de Marfey possui sua configuração absoluta (*L*), foi possível determinarmos as configurações absolutas para os aminoácidos comuns (fenilalanina, prolina e *N*-Me-valina), comparando-se os tempos de retenção em HPLC dos aminoácidos provenientes da hidrólise e derivatização com o reagente de Marfey, com o tempo de retenção de aminoácidos padrões também derivatizados com o mesmo reagente, segundo mostra as possibilidades no **esquema 5.3**.

Esquema 5.3. Reação de derivatização dos aminoácidos (*L*) ou (*D*), com reagente de Marfey-(*L*).

A amostra derivatizada do aminoácido (*L*)-prolina utilizada como padrão foi analisada em HPLC e apresentou majoritariamente dois sinais de absorção no UV. O primeiro sinal refere-se ao aminoácido (*L*)-prolina derivatizada com reagente de Marfey no tempo de retenção de 17,32 minutos, e o outro sinal se refere ao reagente de Marfey em 18,23 minutos, como mostra a **figura 5.16**.

Figura 5.16. Cromatograma do Padrão (*L*)-prolina derivatizado com reagente de Marfey. Condições: coluna de sílica-gel derivatizada com grupos fenila, Prodigy 5 μ , Phenyl-3 (PH-3), 100Å, dimensões 250 x 4,6 mm; eluentes gradiente: MeCN-Tampão (água, ácido fosfórico e trietilamina); λ_{max} 320 nm.

A amostra derivatizada do aminoácido (*D*), (*L*)-N-Me-valina utilizada como padrão foi analisada em HPLC e apresentou majoritariamente três sinais de absorção no UV. O primeiro em 18,23 minutos refere-se ao reagente de Marfey e os outros dois referem-se aos padrões (*D*)-N-Me-valina e (*L*)-N-Me-valina nos tempos de retenção de 19,79 minutos e 20,23 minutos (não sabemos qual sinal se refere a cada configuração do padrão), como mostra a figura 5.17.

Figura 5.17. Cromatograma do Padrão (*L*)-(*D*)-N-Me-valina derivatizado com reagente de Marfey. Condições: coluna de sílica-gel derivatizada com grupos fenila, Prodigy 5 μ , Phenyl-3 (PH-3), 100Å, dimensões 250 x 4,6 mm; eluentes gradiente: MeCN-Tampão (água, ácido fosfórico e trietilamina); λ_{max} 340 nm.

A amostra derivatizada do aminoácido (*L*)-fenilalanina utilizada como padrão foi analisada em HPLC e apresentou majoritariamente dois sinais de absorção no UV. O primeiro em 18,23 minutos que se refere ao reagente de Marfey e o outro referente a (*L*)-fenilalanina no tempo de retenção de 20,25 minutos, como mostra a **figura 5.18**.

Figura 5.18. Cromatograma do Padrão (*L*)-fenilalanina derivatizado com reagente de Marfey. Condições: coluna de sílica-gel derivatizada com grupos fenila, Prodigy 5 μ , Phenyl-3 (PH-3), 100Å, dimensões 250 x 4,6 mm; eluentes gradiente: MeCN-Tampão (água, ácido fosfórico e trietilamina); λ_{max} 340 nm.

A amostra **F13E6-P2** (hidrolisada e derivatizada) foi analisada em HPLC e apresentou majoritariamente três sinais de absorção no UV. O primeiro referente à presença do aminoácido (L)-prolina (t_R = 17,32 minutos), o segundo ao reagente de Marfey (t_R = 18,23 minutos) e o terceiro a presença dos aminoácidos (L)-fenilalanina e coincidentemente (L)-*N*-Me-valina (t_R = 20,25 minutos), como mostra a **figura 5.19**. A amostra **F13E6-P2** possui os aminoácidos comuns: prolina, fenilalanina e *N*-Me-valina. Após serem analisados por HPLC-PDA concluímos que as configurações absolutas dos três aminoácidos prolina, fenilalanina e *N*-Me-valina são (L) por apresentarem exatamente o mesmo tempo de retenção de seus respectivos padrões.

Figura 5.19. Cromatograma da fração **F13E6-P2** hidrolisada e derivatizada com reagente de Marfey. Condições: coluna de sílica-gel derivatizada com grupos fenila, Prodigy 5 μ , Phenyl-3 (PH-3), 100Å, dimensões 250 x 4,6 mm; eluentes gradiente: MeCN-Tampão (água, ácido fosfórico e trietilamina); λ_{max} 320 nm.

A amostra **F13E6-P3** (hidrolisada e derivatizada) foi analisada em HPLC e apresentou majoritariamente dois sinais de absorção no UV. O primeiro referente ao reagente de Marfey ($t_R = 18,23$ minutos) e o segundo a presença dos aminoácidos (*L*)-fenilalanina e (*L*)-*N*-Me-valina ($t_R = 20,25$ minutos), como mostra a **figura 5.20**. A amostra **F13E6-P3** possui os aminoácidos comuns: fenilalanina e *N*-Me-valina. Após serem analisados por HPLC-PDA concluímos que a configuração absoluta dos aminoácidos fenilalanina e *N*-Me-valina são (*L*) por apresentarem exatamente os mesmos tempos de retenção dos seus respectivos padrões.

Figura 5.20. Cromatograma da fração **F13E6-P3** hidrolisada e derivatizada com reagente de Marfey. Condições: coluna de sílica-gel derivatizada com grupos fenila, Prodigy 5 μ , Phenyl-3 (PH-3), 100Å, dimensões 250 x 4,6 mm; eluentes gradiente: MeCN-Tampão (água, ácido fosfórico e trietilamina); $\lambda_{\max}$ 320 nm.

Após as reações de hidrólise, derivatizações e análises em HPLC-PDA pudemos concluir que os dois compostos **F13E6-P2: [Phe³, N-Me-Val⁵] destruxina B** e **F13E6-P3: pseudodestruxina c** possuem os aminoácidos comuns em configuração (L). Os demais aminoácidos comuns dessas estruturas e também para o composto roseotoxina B tiveram suas configurações determinadas pelo grupo do nosso colaborador Dr. Chris M. Ireland, utilizando-se da mesma metodologia de derivatização. Já o composto cloroidrina da β -Me-Pro da destruxina E teve sua configuração absoluta determinada por experimentos de RMN, com diversos parâmetros e medições de suas constantes de acoplamentos.

**cloroidrina da β -Me-Pro
da destruxina E**

pseudodestruxina c

roseotoxina B

**Phe³, N-Me-Val⁵
destruxina B**

* estereoquímica relativa

Os extratos brutos de *Beauveria felina* apresentaram atividades nos bioensaios de atividade antituberculose e de citotoxicidade em quatro linhagens de células de câncer: mama, cólon, sistema nervoso e leucemia. Os compostos puros majoritários, pseudodestruxina C (**92**), [Phe³, N-Me-Val⁵] destruxina B (**93**) e roseotoxina B (**94**) foram avaliados e não apresentaram atividade nos bioensaios de citotoxicidade e antituberculose. Somente o composto roseotoxina B (**94**) apresentou atividade citotóxica *in vitro* moderada, com IC₅₀ de 1,09, 1,30, 0,90 e 0,14 µg/mL, respectivamente, para as quatro linhagens de células.

Capítulo 6

Conclusões

Neste trabalho realizou-se a investigação química dos extratos de quatro esponjas e dois fungos de origem marinha oriundos da costa do Brasil. Os compostos isolados a partir desses extratos são listados na **tabela 6.1**. Estes extratos foram selecionados a partir das análises de atividades biológicas, de CCD, HPLC e RMN-¹H.

Os extratos de três esponjas (*Petromica ciocalyptoides*, *Topsentia ophiraphidites* e *Callyspongia* sp.) apresentaram atividade inibitória à enzima adenina fosforribosil transferase de *Leishmania tarentolae*. A partir desses extratos foram isolados 4 compostos. O trissulfato de halistanol, isolado das esponjas *P. ciocalyptoides* e *T. ophiraphidites*, o ilhabelanol, ilhabreno e isoakaterpina, isolados da esponja *Callyspongia* sp.

No decorrer do trabalho nos deparamos com diversas dificuldades, dentre elas o fato de que as substâncias ativas, em sua maioria, não apresentavam absorções no UV e conseqüentemente as frações finais nem sempre apresentaram bom grau de pureza por não terem sido purificadas em HPLC (com detector de UV). A análise dos compostos por cromatografia em camada delgada também pouco nos auxiliava uma vez que as manchas na placa não se apresentavam bem definidas, deixando dúvidas se o composto poderia estar realmente puro. Os espectros de massas obtidos foram em alguns casos pouco conclusivos, pela interferência dos grupos sulfatos presentes nos compostos isolados de *Petromica ciocalyptoides* e *Callyspongia* sp., que dificultavam a visualização do pico de íon molecular (ou pseudo-molecular). Tivemos então que realizar reações de hidrólise com objetivo de dessulfatar e às vezes acetilar as hidroxilas, quando presentes nos compostos ativos, para a obtenção de espectros de RMN e massas de melhor qualidade e mais confiáveis. Porém as purificações dos compostos após as reações foram tão difíceis quanto os isolamentos das mesmas.

Apesar de todas as dificuldades encontradas no decorrer deste trabalho, conseguimos isolar cinco compostos a partir de quatro extratos de esponjas marinhas que se mostraram inibidoras a enzima L-APRT e pela primeira vez um trabalho de isolamento exclusivamente biomonitorado foi realizado em nosso grupo de pesquisa. Além disso, os inibidores da L-APRT isolados são os primeiros de origem marinha que apresentaram essa atividade.

A partir do extrato bruto da esponja *Axinella cf. corrugata* foram obtidos dois compostos puros, o éster metílico do ácido 4-esculetínico e o éster etílico do ácido 4-esculetínico. A metodologia empregada no isolamento destes compostos se mostrou adequada obtendo-se os compostos puros em três etapas cromatográficas. No entanto, ambos compostos foram isolados em rendimento muito baixo. Também foram observados vários compostos correlatos minoritários nas análises por HPLC com detector de arranjo de diodos, o que sugere uma origem microbiana para estas substâncias. Além disso, compostos correlatos foram até o momento isolados somente a partir de plantas e microrganismos. Os dois derivados cumarínicos são provavelmente artefatos de isolamento do ácido 4-esculetínico, o qual é inédito como produto natural. O extrato bruto da esponja *Axinella cf. corrugata* apresentou atividade citotóxica, mas os compostos puros não apresentaram esta atividade. Os dois compostos puros foram testados ainda quanto sua atividade contra o vírus da SARS, na qual o éster etílico do ácido 4-esculetínico se apresentou ativo.

Dois extratos fúngicos, oriundos de diferentes linhagens da espécie *Beauveria felina*, isolados a partir da alga marinha *Caulerpa* sp. A metodologia empregada na separação dos compostos se mostrou simples, pois apenas com duas etapas cromatográficas obtivemos os compostos puros. Também alguns compostos foram isolados em rendimento muito baixo e só foi possível finalizar suas determinações estruturais pela disponibilidade de equipamentos de RMN de alta resolução por parte de nossos colaboradores. A partir desses dois extratos fúngicos foram isoladas 17 frações puras que após análise foram agrupadas em seis compostos conhecidos na literatura: [(Phe³, Val⁵) destruxina B, cloroidrina da destruxina E, roseotoxina B, roseocardina, isariina e isariina B] e dois inéditos (pseudodestruxina C e β -Me-Pro cloloidrina da destruxina E). Os extratos brutos de *Beauveria felina* apresentaram atividades nos bioensaios antituberculose e de citotoxicidade em linhagem de células de câncer. As frações puras avaliadas no bioensaio antituberculose não foram ativas. E somente o composto roseotoxina B apresentou atividade citotóxica *in vitro* para quatro linhagens de células: mama, colo, sistema nervoso e leucemia.

Finalmente, os resultados obtidos no presente trabalho mostram a importância do estudo dos organismos marinhos da costa brasileira, que possui uma biodiversidade rica e pouco conhecida cientificamente, como fonte de novos compostos biologicamente ativos.

Tabela 6.1. Compostos isolados de extratos de fungos e invertebrados marinhos durante o presente projeto de doutorado.

Estrutura	Fonte	Atividade Biológica	Classe Biogenética	Artigo
<p>sulfato de halistanol</p>	<p>Esponjas:</p> <p><i>Petromica ciocalyptoides</i></p> <p><i>Topsentia ophiraphidites</i></p>	Inibidor da L-APRT	esterol	Química Nova
<p>ilhabelanol</p> <p>inédito</p>	<p>Esponja:</p> <p><i>Callyspongia sp.</i></p>	Inibidor da L-APRT	meroterpeno	The Journal Organic Chemistry
<p>ilhabreno</p> <p>inédito</p>	<p>Esponja:</p> <p><i>Callyspongia sp.</i></p>	Inibidor da L-APRT	meroterpeno	The Journal Organic Chemistry

<p>isoakaterpina</p> <p>inédito</p>	<p>Esponja:</p> <p><i>Callyspongia</i> <i>sp.</i></p>	<p>Inibidor da L- APRT</p>	<p>meroterpeno</p>	<p>The Journal Organic Chemistry</p>
<p>pseudodestruxina C</p> <p>inédito</p>	<p>Fungo:</p> <p><i>Beauveria</i> <i>felina</i></p>		<p>ciclodepsipeptídeo</p>	<p>The Journal of Antibiotics</p>
<p>(Phe³, N-MeVal⁵) destruxina B</p>	<p>Fungo:</p> <p><i>Beauveria</i> <i>felina</i></p>		<p>ciclodepsipeptídeo</p>	<p>The Journal of Antibiotics</p>

<p>B-Me-Pro cloroidrina da destruxina E inédito</p>	<p>Fungo: <i>Beauveria felina</i></p>		ciclodepsipeptídeo	The Journal of Antibiotics
<p>cloroidrina da destruxina E</p>	<p>Fungo: <i>Beauveria felina</i></p>		ciclodepsipeptídeo	The Journal of Antibiotics
<p>isariina B</p>	<p>Fungo: <i>Beauveria felina</i></p>		ciclodepsipeptídeo	The Journal of Antibiotics

<p>roseotoxina B</p>	<p>Fungo:</p> <p><i>Beauveria felina</i></p>		<p>ciclodepsipeptídeo</p>	<p>The Journal of Antibiotics</p>
<p>isariina</p>	<p>Fungo:</p> <p><i>Beauveria felina</i></p>		<p>ciclodepsipeptídeo</p>	<p>The Journal of Antibiotics</p>
<p>roseocardina</p>	<p>Fungo:</p> <p><i>Beauveria felina</i></p>		<p>ciclodepsipeptídeo</p>	<p>The Journal of Antibiotics</p>

<p>R = Me, Et ésteres do ácido 4-esculetínico</p> <p>inédito</p>	<p>Esponja:</p> <p><i>Axinella</i> <i>corrugata</i> cf.</p>	<p>Antiviral contra da SARS vírus</p>	<p>Rota do ácido chiquímico</p>	<p>J. Braz. Chem. Soc.</p>
--	---	---	-------------------------------------	--------------------------------

Capítulo 7

Referências Bibliográficas

7.1. Referências bibliográficas para o capítulo 1

Berlinck, R. G. S.; Hajdu, E.; Rocha, R. M.; Oliveira, J. H. H. L.; Hernández, I. L. C.; Selegim, M. H. R.; Granato, A. C.; Almeida, E. V. R.; Nuñez, C. V.; Muricy, G.; Peixinho, S.; Pessoa, C. O.; Moraes, M. O.; Cavalcanti, B. C.; Nascimento, G. G. F.; Thiemann, O.; Silva, M.; Souza, A. O.; Minarini, P. R. R. (2004). Challenges and Rewards of Research in Marine Natural Products Chemistry in Brazil. *Journal Natural Products*, **67**, 510-522.

Bergmann, W. (1949). Comparative Biochemical Studies on the Lipids of Marine Invertebrates, With Special Reference to the Sterols. *Journal of Marine Research*, **8** (2): 137-171.

Bergmann, W.; Feeney, R. J. (1950). The Isolation of a New Thymine Pentoside from Sponges. *Journal of the American Chemical Society*, **72** (6): 2809-2810.

Bergmann, W.; Feeney, R. J. (1951). Contributions to the Study of Marine Products. XXXII. The Nucleosides of Sponges. *Journal of Organic Chemistry*, **16** (6): 981-987.

Bergmann, W.; Burke, D. C. (1955). Contributions to the Study of Marine Products. XXXIX. The Nucleosides of Sponges: Spongothymidine and Spongouridine. *Journal of Organic Chemistry*, **20** (11): 1501-1507.

Bergmann, W.; Watkins, J. C.; Stempien, H. F. (1957). Contributions to the study of marine products. XIV. Sponge nucleic acids. *Journal Organic Chemistry*, **22**, 1308.

Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R. (2003). Marine Natural Products. *Natural Product Reports*, **20** (1): 1-48.

Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R. (2004). Marine Natural Products. *Natural Product Reports*, **21** (1): 1-49.

Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R. (2005). Marine Natural Products. *Natural Product Reports* **22** (1): 15-61.

Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Munro, M. H. G.; Norticote, P. T.; Prinsep, M.R. (2006). Marine Natural Products. *Natural Product Reports*, **23** (1): 26-78.

Cragg, G. M.; Newman, D. J.; Snader, K. M. (1997). Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products*, **60**, 52-60.

- Davidson, S. K.; Allen, S. W.; Lim, G. E.; Anderson, C. M.; Haygood, M. G. (2001). Evidence for the biosynthesis of bryostatins by the bacterial symbiont "*Candidatus Endobugula sertula*" of the bryozoan *Bugula neritina*. *Applied and Environmental Microbiology*, **67** (10), 4531-4537.
- Dietzmann, G. R. (1997). The marine environment as a discovery resource, in *High Throughput Screening*, edited by J.P. Devlin, Marcel Dekker, New York, p. 99.
- Dorée, C. (1909). The occurrence and distribution of cholesterol and allied compounds in the Animal Kingdom. *Biochemical Journal*, **4**: 72-106.
- Faulkner, D. J. (2000a) Marine Pharmacology, *Antonie van Leeuwenhoek*, **77**: 135-145.
- Faulkner, D. J. (2000b). Highlights of Marine Natural products Chemistry (1972-1999), *Natural Product Reports*, **17**, 1-6.
- Grabley, S.; Thiericke, R. (1999). The impact of natural products on drug discovery. *Drug Discovery from Nature*. Berlin, Springer-Verlag, p. 3-37.
- Halstead, B. W. (1965). Poisonous and Venomous Marine Animals of the World. *US Government Printing Office*, **1**, 4-5.
- Haygood, M. G.; Davidson, S. K. (1997). Small-subunit rRNA genes and in situ hybridization with oligonucleotides specific for the bacterial symbionts in the larvae of the bryozoan *Bugula neritina* and proposal of "*Candidatus endobugula sertula*". *Applied and Environmental Microbiology*, **63** (11): 4612-4616.
- Henze, M. (1909). Spongosterol, the cholesterol of *Suberites domuncula*. Hoppe-Seyler's Z. *Physiol. Chem.*, **55**: 427-432.
- Hung, D. T.; Jamison, T. F.; Schrieber, S. L. (1996). Understanding and controlling the cell cycle with natural products. *Chemistry & Biology*, **3** (8), 623-639.
- Kelecom, A. (1986). Utilização terapêutica de substâncias bioativas de origem marinha: do mito à realidade. Parte I. *Revista Brás. Farm.*, **67**, 77-104.
- Kelecom, A. (1988). Utilização terapêutica de substâncias bioativas de origem marinha: do mito à realidade. Parte II. *Revista Brás. Farm.*, **69**, n. 4, 53-70.
- Kelecom, A. (1999). Chemistry of Marine Natural products: Yesterday, today and tomorrow. *An. Acad. Bras. Ci.*, v. **71**, n.2, 249-263.
- König, G. M.; Wright, A. D. (1996). Marine Natural Products Research: current directions and future potential. *Planta Medica*, **62**, 193-211.

Köning, G. M.; Wright, A. D.; Franzblau, S. G. (2000) Assessment of antimycobacterial activity of series of mainly marine derived natural products. *Planta Medica*, **66**, 337-342.

Lederer, E. (1938). Recherchers sur les carotenoides des invertébrés. *Bull. Soc. Chem. Biol.*, **20**, 567-634.

Look, A. S.; Fenical, W.; Jacobs, R. S.; Clardy, J. (1986). The Pseudopterosins - Antiinflammatory and Analgesic Natural-Products from the Sea Whip *Pseudoptero-gorgia-Elisabethae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **83** (17), 6238-6240.

Mayer, A. M. S.; Hamann, M. T. (2004). Marine Pharmacology in 2000. *Marine Biotechnology*, **6**, 37-52.

McClintock, J. B.; Baker, B. J., eds.; In: Marine Chemical Ecology; CRC Press: New York, 2001.

Mc Connell, O. J.; Longley, R. E.; Koehn, F. E., (1994). The discovery of marine natural products With therapeutic potencial, in *The Discovery of Natural Products With Potential*, pp. 109-174.

Munro, M. H. G.; Blunt, J. W.; Lake, R. J.; Litaudon, M.; Battershill, C. N.; Page, M. J. (1993). From seabed to sickbed: What are the propects? In: Soest, R. W. M. Van; Kempen, T. M. G. Van; Braekman, J. C. *Sponges in time and space: Biology, Chemistry, Paleontology*. Amsterdam, Brookfield, 503p.

Valle, J. R. (1978). A Farmacologia no Brasil, Antecedentes e Perspectivas, Academia de Ciências do Estado de São Paulo: São Paulo.

Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M. (2000). The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Reports*, **17**: 3, 215-234.

Pettit, G. R.; Lippert, J. W.; Taylor, S. R.; Tan, R.; Willians, M. D. (2001). Synthesis of phakellistatin 11: A Micronesia (Chuuk) marine sponge cyclooctapeptide. *Journal Natural. Products*, **64** (7), 883-891.

Pinto, A. C.; Silva, D. H. S.; Bolzani, V. D.; Lopes, N. P.; Epifanio, R. D. (2002). Current status, challenges and trends on natural products in Brazil. *Quimica Nova*, **25**, 45-61, Suppl. 1.

Roussis, V.; Wu, Z.; Fenical, W.; Strobel S. A.; Vanduyne, G. D.; Clardy, J. (1990). New Antiinflammatory Pseudopterosins from the Marine Octocoral *Pseudoptero-gorgia elisabethae*. *J. Org. Chem*, **55** (16), 4916-4922.

Scheuer, P. J. (1988). Ethno-natural historical leads, *In Biomedical Importance of Marine Organisms*, edited by D.G. Fautin, California Academy of Sciences, San Francisco, pp. 37-40.

Stempien, M. F. (1960). The nucleic acids of sponges, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **90**: 910-912.

Tahara, Y. (1910). Uber das tetrodongift, *Biochemische Zeitschrift*, **30**, 255-275.

Wright, E. M. (2000). In: Biodiversity: New Leads for the Pharmaceutical and Agrochemical Industries

7.2. Referências bibliográficas para o capítulo 2

Tuttle, J. V.; Krenitsky, T. A. (1980). The APRT, was assayed by a modification of a protocol described previously by. *Biol.Chem*, **255** (3), 909-916.

7.3. Referências bibliográficas para o capítulo 3

Abdel-Kader, M.; Berger, J. M.; Slebodnick, C.; Hoch, J.; Malone, S.; Wisse, J. H.; Werkhoven Marga, C. M.; Mamber, S.; Kingston, D. G. (2002). Isolation and Absolute Configuration of *ent*-Halimane Diterpenoids from *Hymenaea courbaril* from the Suriname Rain Forest. *Journal Natural Products*, **65**, 11-15

Akita, H.; Nozawa, M.; Shimizu, H. (1998). Synthesis of decalin type chiral synthons based on enzymatic functionalisation and their application to the synthesis of (-)-ambrox and (+)-zonarol. *Tetrahedron: Asymetry*, **9**, 1789-1799.

Aoki, S., Naka, Y., Takuya, I., Furukawa, T., Rachmat, R., Akiyama, S.-I., Kobayashi, M. (2002). Lembehsterols A and B, novel sulfated sterols inhibiting thymidine phosphorylase, from the marine sponge *Petrosia strongylata*. *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 827-830.

Bifulco, G.; Bruno, I.; Minale, L.; Riccio, R. (1994). Novel HIV-Inhibitory Halistanol Sulfates F-H from a marine sponge, *Pseudoaxinissa digitata*. *J. Natural Products*, **57**, 164-167.

Castro, J. M.; Salido, S.; Altarejos, J.; Nogueros, M.; Sanchez, A. (2002). Synthesis of Ambroxol (R) from labdanolic acid. *Tetrahedron*, **58** (29), 5941-5949.

Chan-Bacab, M. J.; Peña-Rodriguez, L. M., (2001) Plant natural products with leishmanicidal activity, *Natural Product Reports*, **18**, 674-688.

Compagnone, R. S.; Piña, I. C.; Range, H. R.; Dagger, F.; Suárez, A. I.; Rami Reddy, M. V.; Faulkner, D. J. (1998). Antileishmanial cyclic peroxides from the Palauan sponge *Plakortis* aff. *angulospiculatus*, *Tetrahedron*, **54**, 3057-3068.

Copp, B. R.; Kayser, O.; Brun, R.; Kiderlen, A. F. (2003). Antiparasitic activity of marine pyridoacridone alkaloids related to the ascididemins. *Planta Medica*, **69** (6), 527-531.

Croft, S. L.; Coombs, G. H. (2003). Leishmaniasis- current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitology*, **19**, n.11, 502-508.

Croft, S. L.; Barret, M. P.; Urbina, J. A. (2005). Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends in Parasitology*, **21** (11), 508-512.

Davis, A. J.; Murray, H. W.; Handman, E. (2004). Drugs against leishmaniasis: a synergy of technology and partnerships. *Trends in Parasitology*, **20** (2), 73-76.

de Laubenfels, M. W. (1934). New sponges from the Puerto Rican deep. *Smithsonian Miscellaneous Collections*, Washington, **91** (17), 1-28.

Faulkner, D. J. (2000a). Marine Pharmacology, *Antonie van Leeuwenhoek*, **77**: 135-145.

Faulkner, D. J. (2000b). Highlights of Marine Natural Products Chemistry (1972-1999), *Natural Product Reports*, **17**, 1-6.

Faulkner, D. J. (2002). Marine Natural Products, *Natural Product Reports*, **16**, 1-48.

Fukami, A.; Ikeda, Y.; Kondo, S.; Naganawa, H.; Takeuchi, T.; Furuya, S.; Hirabayashi, S.; Hosaka, S.; Watanabe, Y.; Umezawa, K. (1997). Akaterpin, a novel bioactive triterpene from the marine sponge *Callyspongia* sp. *Tetrahedron Letters*, **38** (7): 1201-1202.

Fusetani, N.; Matsunaga, S.; Konosu, S. (1981). Bioactive Marine Metabolites II. Halistanol Sulfate, an Antimicrobial Novel Steroid Sulfate from the Marine Sponge *Halichondria* cf. *moorei* Berquist. *Tetrahedron Letters*, **22**, 1985-1988.

Geary, T. G.; Divo, A. A.; Jensen, J. B. (1989). Stage Specific Actions of Antimalarial-Drugs on *Plasmodium Falciparum* in Culture. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **40** (3), 240-244.

Gramiccia, M.; Gradoni, L. (2005). The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology*, **35** (11-12), 1169-1180.

Hattori, T.; Adachi, K.; Shizuri, Y. (1997). New agelasine compound from the marine sponge *Agelas mauritiana* as an antifouling substance against macroalgae. *Journal of Natural Products*, **60** (4), 411-413.

- Hollar, L.; Lukes, J.; Maslov, D. A. (1998). Monophyly of endosymbiont containing trypanosomatids: Phylogeny versus taxonomy. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **45** (3), 293-297.
- Isaacs, S.; Hizi, A.; Kashman, Y. (1993). Toxicols ac and toxiusol - new bioactive hexaprenoid hydroquinones from *Toxiclona-toxius*. *Tetrahedron* **49** (20), 4275-4282.
- Kanazawa, S.; Fusetani, N.; Matsunaga, S. (1992). Halistanol Sulfates A-E, New Steroid Sulfates, from a Marine Sponge, *Epipolasis* sp. *Tetrahedron*, **48** (26), 5467-5472.
- Le Pape, P.; Zidane, M.; Abdala, H.; Moré, M. T. (2000). A glycoprotein isolated from the sponge, *Pachymatisma johnstonii*, has anti-leishmanial activity *Cell Biol. Internat.*, **24**, 51-56.
- Maslov, D. A.; Nawathean, P.; Scheel, J. (1999). Partial kinetoplast-mitochondrial gene organization and expression in the respiratory deficient plant trypanosomatid *Phytomonas serpens*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, **99** (2): 207-221.
- Moni, R. W.; Willis, R. J.; Quinn, R. J. (1992). A Note of Cautin in the use of receptor-binding assays to screen marine organisms- The action of halistanol trisulphate on adenosine receptors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2**, 1631-1634.
- Napolitano, H. B.; Silva, M.; Ellena, J.; Rocha, W. C.; Vieira, P. C.; Thiemann, O.H. (2003). Redetermination of skimmianine: a new inhibitor against the *Leishmania* APRT enzyme. *Acta Crystallographica Section e-Structure Reports*, **59**, 1503-1505.
- Napolitano, H. B.; Silva, M.; Ellena, J.; Rocha, W. C.; Vieira, P. C.; Thiemann, O.H. (2003). Redetermination and comparative structural study of isopimpinellin: a new inhibitor against the *Leishmania* APRT enzyme. *Acta Crystallographica Section e-Structure Reports*, **59**, 1506-1508.
- Patil, A. D.; Freyer, A. J.; Breen, A.; Carte, B.; Johnson, R. K. (1996). Halistanol disulfate B, a novel sulfated sterol from the sponge *Pachastrella* sp. *J. Natural Products*, **59**, 606-608.
- Rangel, H. R.; Dagger, F.; Compagnone, R. S. (1997). Antiproliferative effect of illimaquinone on *Leishmania mexicana*, *Cell Biol. Internat.*, **21**, 337-339.
- Rao, K. V.; Santarsiero, B. D.; Mesecar, A. D.; Schinazi, R. F.; Tekwani, B. L.; Hamann, M. T. (2003). New manzamine alkaloids with activity against infectious and tropical parasitic diseases from an indonesian sponge. *Journal of Natural Products*, **66** (6): 823-828.

Rath, S., Trivelin, L. A., Imbrunito, T. R., Tomazela, D. M.; Jesus, M. N.; Marzal, P. C. (2003). Antimoniais empregados no tratamento da Leishmaniose: Estado da Arte. *Química Nova*, **26** (4), 550-555.

Slate, D. L.; Lee, R. H.; Rodriguez, J.; Crews, P. (1994). The Marine Natural Product, Halistanol Trisulfate, Inhibits PP60 (V-SRC) Protein- Tyrosine Kinase-Activy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **203**, 260-264.

Sperry, S.; Crews, P. (1997). Haliclostano sulfato e halistanol sulfato de um indo-Pacífico Haliclona esponja. *Journal of Natural Products* **60** (1): 29-32.

Tsukamoto, S.; Kato, H.; Hirota, H.; *et al.*(1997). Antifouling terpenos e esteróides contra larvas de mexilhões de esponjas marinhas. *Biofouling*, **11** (4): 283-291.

Tuttle, J. V., Krenitsky, T. A. (1980). O APRT, foi avaliado por uma modificação de um protocolo descrito anteriormente por. *Biol.Chem.* **255** (3), 909-916.

Van Soest, R. W. M.; Zea, S. (1986). A nova subclasse de esponja, *Monanthus ciocalyptoides* n. sp. (Porifera, Halichondriida) da região do Índico Ocidental. *Bulletin Zoologisch Museum, Universiteit van Amsterdam*, 10 (**24**): 201-205.

West, L. M.; Faulkner, D. J. (2006). Hexaprenóides hidroquinonas da esponja *Haliclona Aka adocia* sp. *Journal of Natural Products*, **69** (7): 1001-1004.

WHO (2000). World Health Organization.
<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>

Yang, S. W.; Buivich, A.; Chan, T. M.; Smith, M.; Lachowicz, J.; Pomponi, S. A.; Wright, A. E.; Mierzwa, R.; Patel, M.; Gullo, V.; Chu, M. (2003). A nova esterol sulfato, Sch 572423, de uma esponja marinha, *Topsentia* sp. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **13** (10): 1791-1794.

7.4. Referências bibliográficas para o capítulo 4

Barrow, R. A.; Capon, R. J. (1991). Alquil e Alkenil Resorcinóis de uma Esponja Marinha Australiana, *Haliclona* sp. (Haplosclerida, Halicionidae). *Aust J Chem*; **44**, 1393-1405.

Chen, H.; Walsh, C. T. (2001). Formação de coumarina na biossíntese de novobiocina: beta-hidroxilação do aminoácido da enzima tirosil-S-NovH por uma citocromo P450 NovI. *Chem Biol* ; **8**, 301-312.

Erdogan, I.; Sener, B.; Higa, T. (2000). Tryptophol, um ácido auxínico isolado da esponja marinha *Ircinia spinulosa*. *Biochem Syst Ecol*; **28**, 793-794.

George, W. C. ET Wilson, H. V. (1902). Esponjas de Beaufort (N.C.) porto e vizinhança. *Bulletin of the United States Bureau of Fisheries*, **36**, 130-179.

Hamill, P.; Hudson, D.; Kao, R. Y.; Chow, P.; Raj, M.; Xu, H.; Richer, M. J.; Jean, F. (2006). Development of a red-shifted fluorescence-based assay for SARS-coronavirus 3CL protease: Identification of a novel class of anti-SARS agents from the tropical marine sponge *Axinella corrugata*. *Biological Chemistry*, **387** (8), 1063-1074.

Hartman, W. J.; Akawie, R. I.; Clark, W. G. (1955). Competitive Inhibition of 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) Decarboxylase *in vitro*. *J Biol Chem*, **216**, 507-530.

König G.M., Matthée, G., Wright, A.D. (1999). HIV Reverse Transcriptase Inhibitors of Natural Origin. *Planta Medica*, **65**, 493-506.

Melo E.B., Bruni A.T., Ferreira M.M.C. (2006). Inibidores da HIV-Integrase: Potencial Abordagem Farmacológica para o Tratamento da Aids. *Química Nova*, Vol. **29**, No. 3, 555-562.

Peçanha, E. P.; Antunes, O. A. C.; Tanuri, A. (2002). *Química Nova*, **25**, 1108.

Pedras, M. S. C.; Chumala, P. B. (2005). Phomapyrones from blackleg causing phytopathogenic fungi: isolation, structure determination, biosyntheses and biological activity. *Phytochem*, **66**, 81–87.

Roussis, V., Tziveleka, L-A, Vagias, C. (2003). Natural Products with Anti-HIV Activity from Marine Organisms. *Current Topics Medicinal Chemistry*, **3**, 1512-1535.

http://www.aids.gov.br/final/biblioteca/bol_dezembro_2002/boletim.asp

7.5. Referências bibliográficas para o capítulo 5

Bandani, A. R.; Amiri, B.; Butt, T. M.; Gordon-Weeks, R. (2001). Effects of efrapeptin and destruxin, metabolites of entomogenous fungi, on the hydrolytic activity of a vacuolar type ATPase identified on the brush border membrane vesicles of *Galleria mellonella* midgut and on plant membrane bound hydrolytic enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1510**, 367–377.

Bennett, J. W. (1998). Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *Journal of Biotechnology*, **66**, 101-107.

Bernan, V. S.; Greenstein, M.; Maiese, W. M. (1997). Marine microorganisms as a source of new natural products. *Advances in Applied Microbiology*, **43**, 57-90.

Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R. (2005). Marine Natural Products. *Natural Product Reports* **22** (1), 15-61.

Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Munro, M. H. G.; Norticote, P. T.; Prinsep, M. R. (2006). Marine Natural Products. *Natural Product Reports*, **23** (1), 26-78.

Bugni, T. S.; Ireland, C. M. (2004). Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Natural Product Reports*, **21** (1), 143-163.

Cai, P. D.; Smith, B.; Katz, C.; Pearce, D.; Venables, D.; Houck, D. (1998). Destruxin-A4 chlorohydrin, a novel destruxin from fungus OS-F68576: isolation, structure determination, and biological activity as an inducer of erythropoietin. *Journal Natural Products*, **61**, 290–293.

Caporale, L. H. (1995). Chemical Ecology - A View from the Pharmaceutical-Industry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92** (1): 75-82.

Chen, H. C.; Yeh, S. F.; Ong, G.T.; Wu, S-H.; Sun, C-M.; Chou, C-K. (1995). The novel desmethyldestruxin B, from *Metarrhizium anisopliae*, that suppresses hepatitis B virus surface antigen production in human hepatoma cells. *J. Nat. Prod.* **58**, 527–531.

Chen H. C.; Chou, C-K.; Sun, C-M.; Yeh, S. F. (1997). Suppressive effects of destruxin B on hepatitis B virus surface antigen gene expression in human hepatoma cells. *Antiviral Res.* **34**, 137–144.

Davis, A. J.; Murray, H. W.; Handman, E. (2004). Drugs against leishmaniasis: a synergy of technology and partnerships. *Trends in Parasitology*, **20** (2), 73-76.

Deffieux, G.; Merlet, D.; Baute, R.; Bourgeois, G.; Baute, M. S.; Neveu, A. (1981). New insecticidal cyclodepsipeptides from the fungus *Isaria felina*. II. Structure elucidation of isariins B, C and D. *Journal Antibiotics*, **34**, 1266-1270.

Demain, A. L. (2000) Small bugs, big business: the economic power of the microbe. *Biotechnology Advances*, **18**, 499-514.

Donadio, S.; Monciardini, P.; Alduina, R.; Mazza, P.; Chiocchini, C.; Cavaleti, L.; Sosio, M.; Puglia, A. M. (2002) Microbial Technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. *Journal of Biotechnology*, **99**, 187-198.

Engstrom, G. W.; DeLance, J. V.; Richard, J. L.; Baetz, A. L. (1975). Purification and characterization of roseotoxin B, a toxic cyclodepsipeptide from *Trichothecium roseum*. *J Agric Food Chem*, **23**, 244–253.

Fenical, W. (1997). New pharmaceuticals from marine organisms. *Trends in Biotechnology* **15** (9): 339-341.

Fenical, W., Jensen, P. R., (2002). Secondary metabolites from marine fungi. In: Hyde, K. D. (ed.). Fungi in Marine Environments, *Fungal Diversity Research Series* **7**, pp. 293-315.

Fiedler, H-P.; Bruntner, C.; Bull, A. T., Ward, A. C., Goodfellow, M.; Potterat, O.; Puder, C.; Mihm G. (2005) Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites, *Antonie van Leeuwenhoek* **87**:37–42.

Gupta, S.; Roberts, D. W.; Renwick, J. A. A. (1989). Insecticidal cyclodepsipeptides from *Metarrhizium anisopliae*. *J Chem Soc Perkin Trans I*, 2347-2357.

Höller, U.; Wright, A. D.; Matthee, G. F.; Koning, G. M.; Draeger, S.; Aust, H-J.; Schulz, B. (2000). Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites. *Mycological Research* **104**: 1354-1365.

Imada, C. (2005) Enzyme inhibitors and other bioactive compounds from marine actinomycetes, *Antonie van Leeuwenhoek*, **87**:59–63.

Jensen, P.R.; Mincer, T.J.; Williams, P.G.; Fenical W. (2005) Marine actinomycete diversity and natural product discovery, *Antonie van Leeuwenhoek*, **87**:43–48

Takeya, H.; Takahashi, J.; Okada, G.; Osada, H. (1995). Epolactaene, a novel neurotoxic compound in human neuroblastoma cells, produced by a marine fungus. *Journal Antibiotics*, **48**: 7, 733-735.

Kelecom, A. Secondary metabolites from marine microorganisms. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, Rio de Janeiro, v. **74**, p. 151-170, 2002.

Kim, H. S.; Jung, M. H.; Ahn, S.; Lee, C. W.; Kim, S. N.; Ok, J. H. (2002). Structure elucidation of a new cyclic hexadepsipeptide from *Beauveria felina*. *Journal of Antibiotics*, **55** (6), 598-601.

Kodaira, Y. (1961). Toxic substances to insects, produced by *Aspergillus ochraceus* and *Oospora destructor*. *Agric. Biol. Chem.* **25**, pp. 261–262.

Liberra, K.; Lindequist, U. (1995). Marine fungi - a prolific resource of biologically-active natural-products. *Pharmazie* **50** (9): 583-588.

Mapari, S. A. S.; Nielsen, K. F.; Larsen, T. O.; Frisvad, J. C.; Meyer, A. S.; Thrane, U. (2005) Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. *Current Opinion in Biotechnology*, London, v. **16**, p. 231-238.

Marfey, P.; Ottesen, M. (1984). Determination of D-amino acids. I. Hydrolysis of DNP-L-Amino Acid Methyl Esters Carboxypeptidase-Y. *Carlsberg Res. Commun.* **49**, 585-590.

Masurekar, P. S. (1992). Biotechnology of Filamentous Fungi: Technology and Products; Finkelstein, D. B.; Ball, C., eds.; Butterworth-Heinemann: Boston, p. 241.

- Mayer, A. M. S.; Hamann, M. T. (2004). Marine Pharmacology in 2000. *Marine Biotechnology*, **6**, 37-52
- Moore, B. S.; Kalaitzis, J. A.; Xiang, L. (2005) Exploiting marine actinomycete biosynthetic pathways for drug discovery, *Antonie van Leeuwenhoek*, **87**:49–57.
- Morel, E.; Païs, M.; Turpin, M.; Guyot, M. (1983). Cytotoxicity of cyclodepsipeptides on murine lymphocytes and on L 1210 leukemia cells. *Biomed. Pharmacother.* **37**, pp. 184–185.
- Muroi, M.; Shiragami, N.; Takatsuki, A. (1994). Destruxin B, a specific and readily reversible inhibitor of vacuolar-type H⁺-translocating ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**, pp. 1358–1365.
- Nagai, K. (2002). Pharmaceutical composition containing derivative for prevention and treatment of osteoporosis. *PCT Int Appl*, 20 pp.
- Odier, F. P.; Vago, J. M.; Quiot, G. Devauchelle and J.P. Bureau. (1987). Cytometric study of the effects of destruxin E on mouse leukemia cells. *C. R. Acad. Sci., Ser. 3* 305 pp. 575–578.
- Odier, A. V.; Bureau, J. P. (1992). In vitro effect of fungal cyclodepsipeptides on leukemic cells: study of destruxins A, B and E. *Biol. Cell* **74**, pp. 267–271.
- Pedras, M. S.; Zaharia, L. I.; Ward, D. E. (2002).The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. *Phytochemistry* **59** (6): 579-596.
- Pietra, F. (1997). Secondary metabolites from marine microorganisms: bacteria, protozoa, algae and fungi: Achievements and prospects. *Natural Product Reports* **14** (5): 453-464.
- Pinto, A. C.; Silva, D. H. S.; Bolzani, V. D.; Lopes, N. P.; Epifanio, R. D. (2002). Current status, challenges and trends on natural products in Brazil. *Quimica Nova*, **25**, 45-61, Suppl. 1.
- Shu, Y. Z. (1998).Recent Natural Products Based Drug Development: a Pharmaceutical Industry Perspective. *Journal of Natural Products*, Cincinnati, v. **61**, 1053-1071.
- Singh, G. S. (2004). β -lactams in the new millennium. Part-I: Monobactams and carbapenems. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, Hilversum, v. **4**, p. 69-92.
- Singh, G. S. (2004). β -lactams in the new millennium. Part-II: Cephems, oxacephems, penams and sulbactam. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, Hilversum, v. **4**, p. 93-109.
- Springer, J. P.; Cole, R. J.;Dorner, J. W.; Cox, R. H.; Richard, J. L.; Barnes, C. L.; Helm, D. V. (1984). Structure and Conformation of Roseotoxin B. *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 2388-2392.

Strobel, G.; Daisy, B. (2003). Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. **67**, p. 491-502,

Sun, C. M.; Chen, H. C.; Yeh, S. F. (1994). Suppressive effects of metabolites from *Alternaria brassicae* on the hepatitis B surface antigen. *Planta Med.* **60**, pp. 87–88.

Togashi, K.; Kataoka, T.; Nagai K. (1997). Characterization of a series of vacuolar type H⁺-ATPase inhibitors on CTL-mediated cytotoxicity. *Immunol. Lett.* **55**, pp. 139–144.

Tsunoo, A.; Kamijo, M.; Taketomo, N.; Sato, Y.; Ajisaka, K. (1997). Roseocardin, a novel cardiotonic cyclodepsipeptide from *Trichothecium roseum* TT103. *J. Antibiot.* **50**, pp. 1007–1013.

Tsunoo, A.; Kamijo, M. (1999). Non-cyclic AMP-dependent, positive inotropic cyclodepsipeptides with negative chronotropy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **290**, pp. 1006–1012.

Vazquez, M. J.; Albarrán, M. I.; Espada, A.; Rivera-Sagredo, A.; Díez, E.; Hueso-Rodríguez, J. A. (2005). A new destruxin as inhibitor of vacuolar-type H⁺-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemistry & Biodiversity* **2** (1): 123-130.

Vining, L. C.; Taber, W. A. (1962). Isariin, a New Depsipeptide from *Isaria cretacea*. *Canadian Journal of Chemistry*, **40** (8): 1579.

Vita-Marques, A. M. (2003). Isolamento, atividade biológica e análise do perfil químico de fungos coletados no litoral do Estado de São Paulo-SP. Dissertação. Instituto de Biociências-Universidade de São Paulo, São Paulo.

Yarbrough, G. G.; Taylor, D. P.; Rowlands, R. T.; Crawford, M. S.; Lasure, L. L. (1994). Screening Microbial Metabolites for New Drugs – Theoretical and Practical Issues. *Journal of Antibiotics*, Tokyo, v. **46**, p. 535.