UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Terpenos rearranjados da esponja *Darwinella* cf. *oxeata* com
potencial leishmanicida

MARÍA CAMILA ACEVEDO RAMÍREZ

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos

2015

MARÍA CAMILA ACEVEDO RAMÍREZ

Terpenos rearranjados da esponja *Darwinella* cf. *oxeata* com potencial
leishmanicida

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

Área de concentração:
Química orgânica e biológica

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

São Carlos

2015

A mis padres Obdulio y Rosalba por ayudarme a perseguir mis sueños.

“¡Pensar que este sol, este mismo sol, alumbró a Shakespeare!..

A Pasteur!..

¡A San Martín!

¡A Bach!

¡Contagiame!”

*-Mafalda
Quino*

“¡No corrás con los zapatos nuevos que los deshacés!

¡No saltés sobre el sofá que lo destrozás!

¡No te arrastrés por el piso que despedazás la ropa!

¡¡Decíme de qué te sirve ser niño, si no te dejan ejercer!!”

*-Miguelito
Quino*

AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas que me ajudaram desde o começo até o fim deste caminho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck, pela motivação, confiança, paciência, apoio e orientação na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Eduardo Hajdu (Museu Nacional – UFRJ) pela coleta e classificação da esponja estudada nesta dissertação.

Ao Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira e ao pessoal do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (Departamento de Química – UFSCar) pela obtenção dos espectros de RMN.

Ao Prof. Dr. André Tempone (Instituto Adolfo Lutz – São Paulo) pela realização dos bioensaios de atividade antiparasitária contra *Leishmania infantum*.

Ao pessoal da Central de Análises Químicas (CAQI – IQSC – USP), pela disponibilização da infraestrutura necessária para a obtenção dos espectros de ultravioleta, infravermelho e de massas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida.

Aos meus colegas de laboratório: Raquel, Mario, Karen, Julie, Everton, Lorena, Laura, Mirelle, Ariane e Marcos, pela amizade, convivência, ajuda no desenvolvimento das atividades experimentais do meu trabalho e todos os momentos bons e legais que compartilhei com todos e cada um de vocês.

Às técnicas e colegas do laboratório, Fabiana e Karin pela ajuda e orientação no uso dos equipamentos do laboratório e no desenvolvimento das atividades experimentais.

Aos meninos do Laboratório de Dinâmica (LabDin) da Engenharia Mecânica (EESC – USP), Rafa, Lucas, Diego, Kleber, Augusto, Jelder, Willians e Nozaki por me fazer parte da sua turma, pelos papos batidos durante os cafés da tarde, pelos melhores churrascos em que eu já estive, e por fazer do meu português mais fluente. Levo cada um de vocês no meu coração!

Ao Kleber e à Vivi, por me fazer sentir sempre em casa e parte da sua família. Sempre me senti muito aconchegada!

Ao meu amigo Juan (Chambers) pela sua simplicidade e alegria com que encara a vida. Obrigada pela bonita amizade e por ter posto em minhas mãos o anjinho peludo que tornou meus dias mais felizes.

Aos meus amigos e amigas na Colômbia pelo carinho. À Xime pelas boas fofocas e nossas conversas que sempre tinham um motivo para nos fazer reir. Ao Daniel por me plantar a curiosidade do mundo da pós-graduação. À Diana pelo carinho.

Ao Diego e à Carolina pela amizade, pelos bons momentos, pelas cervejas compartilhadas e pelas aventuras vividas.

Em especial, à minha família que sempre esteve perto de mim apesar da distância. Aos meus pais Obdulio e Rosalba pelo amor, confiança, apoio e tenacidade. Vocês são a minha motivação. À minha querida irmã, Diana, pelo amor, apoio, amizade, confiança e paciência. À minha tia Ofelia, pelo carinho, confiança e apoio que sempre me deu. Obrigada por serem os melhores torcedores que já tive! Deus sempre abençoe vocês!

Em especial, ao Ricardo por me fazer tão feliz. Obrigada pelo amor, pelos momentos vividos, por ser meu companheiro de caminhada, meu amigo e cúmplice, por todos os conselhos e motivação constante. Obrigada por teu apoio nos momentos mais difíceis e por sempre sorrir nos momentos mais felizes. Você roubou um pedaço do meu coração!

À Deus por tudo.

RESUMO

O extrato metanólico da esponja *Darwinella* sp. coletada na costa do Rio do Janeiro, exibiu atividade leishmanicida. O extrato bruto foi particionado em três frações: fração hexânica, fração de AcOEt e fração XAD (extração da fração orgânica do extrato aquoso mediante mistura de resinas XAD-2, XAD-4 e XAD-7). Cada uma das frações foi avaliada em bioensaio atividade leishmanicida, mostrando que a fração AcOEt apresentou 100% da morte dos parasitas. A fração de AcOEt foi fracionada usando cromatografia por exclusão de tamanho (Sephadex® LH-20) e extrações em fase sólida (SPE) com diferentes colunas pré-empacotadas. Os compostos foram isolados e purificados por cromatografia de alta eficiência acoplada a detector ultravioleta (CLAE-UV). Sete compostos foram isolados, dos quais quatro deles foram identificados espectroscopicamente.

O membranolídeo, o éster metílico da oxeatamida A, a oxeatamida H e a oxeatina são diterpenos espongianos que possuem um esqueleto aplysulfurano nitrogenado, excetuando o membranolídeo. Tanto o éster metílico da oxeatamida A quanto a oxeatamida H, pertencem a uma série de compostos denominados de oxeatamidas. O membranolídeo, o éster metílico da oxeatamida A e a oxeatina foram avaliados em teste de atividade antiparasitária contra *Leishmania infantum*, porém nenhum deles apresentou atividade leishmanicida.

Palavras-chave: leishmania, esponja marinha, diterpenos espongianos, oxeatamidas, aplysulfurano.

Abstract

The sponge *Darwinella* sp. was collected in Rio de Janeiro's coast and its methanolic extract showed leishmanicidal activity. The crude extract was partitioned in three fractions: hexane, AcOEt and XAD fractions. This last one was obtained by resin adsorption (mixture of XAD-2, XAD-4 and XAD-7 resins) of organic constituents from the aqueous fraction and subsequent recovery by extraction from the resins mixture. All of three fractions were also tested in leishmanicidal bioassay. The AcOEt fraction promoted 100% of parasite death. This fraction was separated into less complex fractions by size exclusion chromatography (Sephadex® LH-20) and solid phase extractions (SPE). The compounds were isolated and purified by high-performance liquid chromatography (HPLC) combined with on-line UV detector. Seven substances were isolated, which four of them were spectroscopically identified.

The membranolid, the oxeatamide A methyl ester, the oxeatamide H and the oxeatins are spongian diterpenes with nitrogenous aplysulphurane skeleton, except for the membranolid. The oxeatamides are a series of nitrogenous aplysulphurane metabolites that includes the oxeatamide A methyl ester and the oxeatamide H. All of these compounds, except the oxeatamide H, were evaluated for antiprotozoal activity against *Leishmania infantum*. None of these compounds displayed leishmanicidal activity.

Keywords: leishmania, marine sponge, spongian diterpenes, oxeatamides, aplysulphurane.

SUMÁRIO

AGRADECIMIENTOS	i
RESUMO	iii
Abstract	iv
CAPÍTULO 1 - Introdução	1
CAPÍTULO 2 - Justificativa	8
CAPÍTULO 3 - Objetivos	9
3.1 Objetivo geral	9
3.2 Objetivos específicos	9
CAPÍTULO 4 - Parte experimental.....	10
4.1 Materiais, instrumentos e reagentes.....	10
4.1.1 Métodos cromatográficos	10
4.1.1.1 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	10
4.1.1.2 Cromatografia em coluna pré-empacotada	10
4.1.1.3 Cromatografia em coluna por exclusão de tamanho.....	11
4.1.1.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	11
4.1.2 Técnicas espectroscópicas e espectrométricas	12
4.1.2.1 Resonância Magnética Nuclear (RMN).....	12
4.1.2.2 Espectrometria de massas (EM)	13
4.1.2.3 Rotação óptica $[\alpha]_D$	13
4.1.2.4 Espectroscopia no ultravioleta	13
4.1.2.5 Espectroscopia no infravermelho.....	14
4.2 Procedimentos experimentais	14
4.2.1 Preparação do extrato bruto e partições da esponja <i>Darwinella</i> sp.....	14

4.2.2	Determinação da atividade leishmanicida <i>in vitro</i> e 50% da concentração efetiva (EC ₅₀)	16
4.2.2.1	Atividade leishmanicida	16
4.2.2.2	Manutenção do parasita	17
CAPÍTULO 5 -Estudo químico da esponja marinha <i>Darwinella</i> sp.....		18
5.1	Metabólitos secundários reportados das esponjas do gênero <i>Darwinella</i>	18
5.2	Estudo da fração enriquecida de AcOEt de <i>Darwinella</i> sp.	21
5.2.1	Isolamento dos constituintes da subfração E1A-34-1	22
5.2.2	Isolamento dos constituintes da subfração E1A-34-2	24
5.2.3	Isolamento dos constituintes da subfração E1A-34-3	26
5.2.4	Isolamento dos constituintes da subfração E1A-34-4	27
CAPÍTULO 6 - Determinação estrutural e avaliação biológica		29
6.1	Determinação estrutural do membranolídeo (51) (frações 33-E2 e 42-B)	29
6.2	Determinação estrutural do éster metílico da oxeatamida A (48) (frações 13-B4 e 23-D3)	36
6.3	Determinação estrutural da oxeatamida H (52) (fração 24-B).....	41
6.4	Determinação estrutural da oxeatina (53) (fração 25-A81)	45
6.5	Diterpenos espongianos e o esqueleto aplysulfurano	50
6.6	Biogênese de aplysulfuranos nitrogenados	51
6.7	Avaliação biológica	54
CAPÍTULO 7 - Conclusão		55
APÊNDICE A		56
REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Fármacos de primeira e segunda escolha para o tratamento da leishmaniose.	3
Figura 1.2 Produtos naturais marinhos (peptídeos e alcaloides) com atividade leishmanicida.	5
Figura 1.3 Produtos naturais marinhos (terpenos e policetídeos) com atividade leishmanicida.	6
Figura 1.4 Produtos naturais marinhos (esteróis, xantonas e purina) com atividade leishmanicida.	7
Figura 4.1 Esquema de metodologia geral de preparação do extrato bruto e das frações enriquecidas da esponja <i>Darwinella</i> sp.	15
Figura 5.1 Classificação taxonômica do gênero <i>Darwinella</i> . Fotografia de <i>Darwinella</i> sp. (amarela) no ambiente marinho.	18
Figura 5.2 Metabólitos secundários isolados de esponjas marinhas do gênero <i>Darwinella</i>	19
Figura 5.3 Metabólitos secundários isolados de esponjas marinhas do gênero <i>Darwinella</i>	19
Figura 5.4 Metabólitos secundários isolados de esponjas marinhas do gênero <i>Darwinella</i>	20
Figura 5.5 Perfis cromatográficos das frações E1A_3 (a) e E1A_4 (b).	21
Figura 5.6 Esquema de fracionamento do extrato AcOEt da esponja <i>Darwinella</i> sp. ...	22
Figura 5.7 Esquema de isolamento e purificação das frações de interesse de E1A_34_1 do extrato AcOEt da esponja <i>Darwinella</i> sp.	23
Figura 5.8 Esquema de isolamento e purificação das frações de interesse de E1A_34_2 do extrato AcOEt da esponja <i>Darwinella</i> sp.	25

Figura 5.9 Esquema de isolamento e purificação das frações de interesse de E1A_34_3 do extrato AcOEt da esponja <i>Darwinella</i> sp.	26
Figura 5.10 Esquema de isolamento e purificação das frações de interesse de E1A_34_4 do extrato AcOEt da esponja <i>Darwinella</i> sp.	27
Figura 6.1 Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC que estabelecem a estrutura do ciclohexano do membranolídeo (51).	31
Figura 6.2 Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC entre o ciclohexano, o éster alifático e o anel benzeno do membranolídeo (51).	32
Figura 6.3 Correlações observadas no mapa de contorno HMBC que consolidam o anel lactônico de cinco membros ligada ao anel benzeno do membranolídeo (51).	33
Figura 6.4 Conformação de cadeira do ciclohexano e relação 1,3-diaxial da metila C-18 e o anel benzeno e outras correlações observadas no espectro de COSY do membranolídeo (51).	34
Figura 6.5 Relaxação dipolar observada no experimento NOESY para determinação da configuração relativa do membranolídeo (51).	34
Figura 6.6 Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC para o ciclohexano e o anel benzeno do éster metílico da oxeatamida A (48).	37
Figura 6.7 Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC entre o ciclohexano, o ácido alifático e o anel benzeno do éster metílico da oxeatamida A (48).	38
Figura 6.8 Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC entre o anel benzeno, o éster alifático e a lactama do éster metílico da oxeatamida A (48).	39
Figura 6.9 Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC entre o ciclohexano, o ácido e o anel benzeno do composto 52	42
Figura 6.10 Correlações COSY e HMBC entre o anel benzeno e o anel de cinco membros da lactama do composto 52	43
Figura 6.11 Correlações COSY e HMBC observadas no ciclohexano do composto 53	46

Figura 6.12 Correlações COSY e HMBC observadas entre o anel benzeno e substituintes do composto 53	46
Figura 6.13 Correlações COSY e HMBC entre o anel benzeno, a lactama de seis membros e o éster metílico do composto 53	47
Figura 6.14 Proposta da estrutura química da oxeatina (fração 25-A81) (53).	48
Figura 6.15 Relaxação dipolar observada no experimento NOESY para determinação da configuração relativa do composto 53	49
Figura 6.16 Esqueletos de compostos diterpênicos isolados de esponjas do gênero <i>Darwinella</i>	50
Figura 6.17 Rearranjo de Wagner-Meerwein na formação do esqueleto aplysulfurano (KEYZERS; NORTHCOTE; ZUBKOV, 2004)	51
Figura 6.18 Aminoácidos (descarboxilados) como fonte do nitrogênio nas oxeatamidas.(WOJNAR, 2008).....	52
Figura 6.19 Mecanismo de formação do anel lactâmico com o anel furano e um derivado de amino ácido (EL SAYED et al., 1999).	52
Figura 6.20 Mecanismo proposto na formação do anel lactâmico mediado por oxigênio singlete (WOJNAR, 2008)	53
Figura 6.21 Rota alternativa da formação da lactama (cinco ou seis membros) nas oxeatamidas e compostos relacionados (WOJNAR, 2008).....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 5-1 Frações puras obtidas do extrato AcOEt da esponja <i>Darwinella</i> sp.	28
Tabela 6-1 Comparação de dados de RMN de ^1H e ^{13}C do membranolídeo (51) em CDCl_3	35
Tabela 6-2 Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C do éster metílico da oxeatamida A (48) em CDCl_3	40
Tabela 6-3 Dados de RMN de ^1H e ^{13}C e correlações COSY e HMBC do composto (52) em CDCl_3 (600 MHz).	44
Tabela 6-4 Dados de RMN de ^1H e ^{13}C e correlações COSY e HMBC do composto 25-A81 (53) em CDCl_3 (600 MHz).	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[α]_D	Rotação óptica específica
AcOEt	Acetato de etila
<i>c</i>	Concentração
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CE₅₀	50% da concentração efetiva
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-PDA-ELS-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo de diodos, detector evaporativo de espalhamento de luz e espectrômetro de massas.
CLAE-PDA-MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas.
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
d	Dubleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-<i>d</i>₆	Dimetilsulfóxido deuterado
ELSD	<i>Evaporating light scattering detector</i>
EM	Espectroscopia de massas
ESI-	<i>Negative electrospray ionisation</i>
ESI+	<i>Positive electrospray ionisation</i>
EtOH	Etanol
FTIR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
HRESIMS	<i>High-resolution electrospray ionisation mass spectrometry</i>
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum coherence</i>
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento em Hz

L-APRT	Fosforibosil transferase de <i>Leishmania tarentolae</i>
LC	Leishmaniose cutânea
LM	Leishmaniose mucosa
LV	Leishmaniose visceral
m	Multiplete
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MeCN	Acetonitrila
MeOH	Metanol
NOESY	<i>Nuclear Overhauser effect correlation spectroscopy</i>
PAM	Ácido fosfomolíbdico
PDA	<i>Photodiode array detector</i>
q	Quarteto
RMN-¹³C	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN-¹H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
s	Singleto
SbV	Antimonial pentavalente
SPE	<i>Solid phase extraction</i>
t	Triplete
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
XAD	Adsorvente polimérico (resina)
δ	Deslocamento químico
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda de máxima absorção

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma das doenças tropicais mais negligenciadas, fortemente associada à pobreza (DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE (DNDI), 2014). O impacto desta doença na saúde pública tem aumentado progressivamente e zonas endêmicas da leishmaniose aumentaram devido a uma maior migração humana (KOTB ELMAHALLAWY; AGIL, 2015). Na atualidade a leishmaniose é predominante em 98 países, nos quais mais de 58.000 casos de leishmaniose visceral (LV) e cerca de 220.000 casos de leishmaniose cutânea (LC) são observados por ano (ALVAR et al., 2012; KOTB ELMAHALLAWY; AGIL, 2015).

Podem-se identificar quatro manifestações da leishmaniose. A leishmaniose cutânea (LC) (causada por *L. mexicana* e *L. braziliensis* nas Américas e por *L. major*, *L. donovani*, *L. tropica* e *L. aethiopica* no Velho Mundo) e a leishmaniose mucosa (LM) (causada por *L. braziliensis*, *L. panamensis* e *L. guyanensis*) são as formas mais comuns da leishmaniose, afetando principalmente a pele (LC) do rosto, braços e pernas bem como as mucosas do nariz, boca e garganta (LM), provocando lesões destrutivas no rosto (KOTB ELMAHALLAWY; AGIL, 2015). A leishmaniose visceral (LV), conhecida também como *kala-azar* ou febre negra na Índia, é mortal se não for tratada adequada e oportunamente (DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE (DNDI), 2014). A LV, causada por *L. donovani* e *L. chagasi* em América, e por *L. infantum* na Europa (KOTB ELMAHALLAWY; AGIL, 2015), é uma infecção sistêmica na qual os parasitas proliferam principalmente em tecidos nos quais as células do sistema de fagócitos mononucleares (macrófagos) são mais abundantes, principalmente no fígado e baço, produzindo em consequência hepatomegalia e esplenomegalia. As células da medula óssea podem ser infectadas e desenvolver-se pancitopénia e imunossupressão, fazendo com que o paciente seja mais suscetível a outras infecções (READY, 2014). Os casos de leishmaniose pós-kala-azar dermal (LPKD) apresentam-se como uma seqüela da LV em pacientes aparentemente curados ou em pacientes sem histórico de LV (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2012; KOTB ELMAHALLAWY; AGIL, 2015). Porém a LPKD também pode se tratar

de um tipo de reservatório assintomático de leishmaniose (DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE (DNDI), 2014; KHAN et al., 2014).

Poucas alternativas para o tratamento da leishmaniose surgiram nas últimas décadas, razão pela qual os fármacos utilizados há sessenta anos continuam em uso, embora possuam alta toxicidade, alto risco de desenvolvimento de resistência, preços inatingíveis para as populações mais pobres e longos períodos de tratamento sob monitoramento clínico (FREITAS-JUNIOR et al., 2012).

Por cerca de sessenta anos, os fármacos de primeira escolha, tem sido os antimoniais pentavalentes (SbV) (antimoniato de meglumina **(1)** e estibogluconato de sódio **(2)**) para o tratamento da LV e LC, embora apresentem eficácia variável, precisando de administração cautelosa sob acompanhamento clínico e laboratorial por ser cardiotoxico, nefrotóxico e hepatotóxico (FREITAS-JUNIOR et al., 2012; DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE (DNDI), 2014).

A anfotericina B **(3)** é um antifúngico sistêmico que possui uma alta atividade leishmanicida e é usado como fármaco de segunda escolha quando a terapia com SbV para a LV não funciona ou não existem outras alternativas disponíveis. Porém, o tratamento deve ser realizado no hospital sob monitoramento renal devido à alta nefrotoxicidade (DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE (DNDI), 2014). A formulação liposomal da anfotericina B **(3)** (AmBisome®), permitiu melhorar a biodisponibilidade do fármaco e a efetividade com 94% de cura na Ásia (DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE (DNDI), 2014), assim como reduzir sua toxicidade. No entanto seu alto custo e a necessidade de rede de frio faz com que seu uso seja limitado (FREITAS-JUNIOR et al., 2012).

A miltefosina **(4)** é o fármaco leishmanicida mais recente no mercado de administração oral, porém, de alto custo. Além disso, está relacionado com alto risco de desenvolver resistência, sendo contraindicado durante a gravidez devido a sua teratogenicidade (DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE (DNDI), 2014).

A paromomicina **(5)** é utilizada como formulação parenteral de baixo custo para LV que precisa de uma administração intramuscular dolorosa durante três semanas (DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE (DNDI), 2014). Pode ser

Figura 1.1 Fármacos de primeira e segunda escolha para o tratamento da leishmaniose.

utilizada como fármaco de segunda escolha, tanto como monoterapia ou terapia combinada junto com os SbV. Contudo, os resultados de efetividade parecem depender da espécie de *Leishmania* e da localização geográfica (KOTB ELMAHALLAWY; AGIL, 2015)

Assim, na atualidade diferentes grupos acadêmicos têm focado pesquisas para o descobrimento de novos metabólitos secundários derivados de organismos marinhos que possam apresentar atividade antiprotozoária contra os parasitas da malária, da doença de Chagas ou *Leishmania*. Entre os compostos isolados, identificados e testados, encontram-se peptídeos, alcaloides, terpenoides, policetídeos em maior quantidade, enquanto xantonas, purinas e esteróis são os menos reportados (TEMPONE et al., 2011).

Os peptídeos são uma classe de metabólitos secundários que abrangem diferentes tipos de estruturas lineares ou cíclicas. As almiramidas A, B e C (**6-8**) são peptídeos lineares isolados da cianobactéria *Lyngbya majuscula* que mostraram ter uma boa atividade contra as amastigotas de *Leishmania* (L.) *donovani*. Porém, só as almiramidas B e C apresentaram atividade significativa, com CE₅₀ de 2.4 e 1.9 µM, respectivamente (SANCHEZ et al., 2010). A viridamida A (**9**) isolada também de uma cianobactéria marinha (*Oscillatoria nigroviridis*), apresentou atividade contra amastigotas de *L. (L.) mexicana* com CE₅₀ de 1.5 µM (SIMMONS et al., 2008). A valinomicina (**10**) é um depsipeptídeo cíclico produzido por *Streptomyces* sp. isolado das esponjas marinhas *Axinella polypoides* e *Aplysina aerophoba* coletadas no Mediterrâneo. Este depsipeptídeo exibiu atividade leishmanicida contra promastigotas de *L. (L.) major* com um 50% da concentração efetiva, CE₅₀ < 0.10 µM (PIMENTEL-ELARDO et al., 2010).

A mirabilina B (**11**) foi isolada da esponja *Monanchora unguifera*, um alcaloide guanidínico com CE₅₀ de 17 µg/mL contra promastigotas e amastigotas de *L. (L.) donovani* (HUA et al., 2004). A manzamina A (**12**), isolada da esponja *Acanthostrongylophora* sp. (RAO et al., 2004) e o alcaloide da série das piridoacridonas (**13**) (COPP et al., 2003), foram testados contra promastigotas de *L. (L.) donovani*, sendo os alcaloides conhecidos mais potentes leishmanicidas, com CE₅₀ de 0.9 e 0.78 µg/mL, respectivamente. Os alcaloides bromopirrólicos longamida B (**14**) e dibromopalau'amina (**15**) isolados de esponjas marinhas dos gêneros *Axinella* e *Agelas*, inibiram o crescimento de amastigotas axênicos de *L. (L.) donovani* (CE₅₀ 3.85 e 1.09 µg/mL, respectivamente) (SCALA et al., 2010).

Figura 1.2 Produtos naturais marinhos (peptídeos e alcalóides) com atividade leishmanicida.

O plakortido P (16) isolado da esponja *Plakortis angulospiculatus*, é o policetídeo da sua família com maior efetividade antileishmania (CE₅₀ 1.9 µg/mL), promovendo morte de 100% dos promastigotas de *L. (L.) chagasi* (KOSSUGA et al., 2008). O gracilioéter B (17), outro policetídeo, isolado da esponja *Agellas gracilis*,

inibiu só o 68% do crescimento de promastigotas de *L. (L.) major* a uma concentração de 10 µg/mL (UEOKA et al., 2009). A coibacina A (**18**), foi isolada da cianobactéria cf. *Oscillatoria* sp., exibiu atividade potente contra amastigotas axênicos de *L. donovani* (CE₅₀ 2.4 µM) e foi a menos citotóxica do grupo de coibacinas (BALUNAS et al., 2012).

Uma série de terpenoides com atividade antileishmania foram isolados de esponjas *Spongia* sp. e *Ircinia* sp.. Destes, a 11-β-acetoxi-espongi-12-en-16-ona (**19**) foi o leishmanicida mais potente contra *L. (L.) donovani* com uma CE₅₀ de 0.75 µg/mL, cuja CE₅₀ é comparável com a do fármaco miltefosina (CE₅₀ de 0.20 µg/mL). Não obstante, este composto mostrou ser igualmente tóxico para células de mamíferos, indicando sua baixa seletividade (ORHAN et al., 2010). Da esponja marinha brasileira *Callyspongia* sp. isolou-se o meroterpenoide isoakaterpina (**20**) que inibiu a enzima adenina fosforibosil transferase de *Leishmania tarentolae* (L-APRT) com CE₅₀ de 1.05 µM, sendo o inibidor conhecido mais potente desta enzima (GRAY et al., 2006). A cristaxenicina A (**21**), isolada da gorgonácea *Acanthoprimnoa cristata*, é um diterpeno que pertence ao tipo de xenicanos, compostos que possuem um anel dihidropirano

Figura 1.3 Produtos naturais marinhos (terpenos e policetídeos) com atividade leishmanicida.

fundido com um anel de nove membros. Este novo xenicano apresentou excelente CE_{50} (0.088 μ M) contra promastigotas de *L. amazonensis* e baixa citotoxicidade em células P388 e HeLa (CE_{50} 4.7 e 2.1 μ M, respectivamente) (ISHIGAMI et al., 2012).

Por fim, os esteróis halistanol A (**22**) e a série dos ácidos norsélicos A-E (**23-27**), a xantonas chaetoxantona B e C (**28-29**) e a purina agelasina D (**30**), mostraram ter atividade leishmanicida *in vitro* contra diferentes espécies de *Leishmania* (PONTIUS et al., 2008; MA et al., 2009; VIK et al., 2009).

Figura 1.4 Produtos naturais marinhos (esteróis, xantonas e purina) com atividade leishmanicida.

CAPÍTULO 2

JUSTIFICATIVA

O interesse nos produtos naturais marinhos tem aumentado nos últimos anos devido à abrangente diversidade química e estrutural que é observada nos metabólitos secundários isolados de invertebrados marinhos (principalmente esponjas marinhas), micro-organismos marinhos, e em menor proporção de algas marinhas. A descoberta de novas classes químicas e de compostos inéditos tem incentivado a pesquisa para se focar neste tipo de substâncias que possam servir como potenciais protótipos para desenvolvimento de fármacos.

O presente trabalho é motivado pela análise da esponja marinha *Darwinella* sp., coletada no litoral do Rio de Janeiro e cujo extrato bruto apresentou atividade leishmanicida. Dando continuidade aos trabalhos realizados no Grupo de Química Orgânica de Sistemas Biológicos (QOSBio), do Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP), na descoberta de novos metabólitos secundários de origem marinha com atividade biológica, foi realizado o estudo químico das frações obtidas do extrato bruto da esponja *Darwinella* sp. que mostrou ter atividade leishmanicida.

A informação obtida neste trabalho também é um aporte valioso para a quimiotaxonomía das esponjas do gênero *Darwinella*, já que a análise das substâncias isoladas de *Darwinella* sp. permitem propor que trata-se da espécie *Darwinella* cf. *oxeata*, também presente em outros ecossistemas (Nova Zelândia).

Assim, é evidente que o estudo químico destes e outro tipo de organismos oriundos de ambientes marinhos, é de importância já que auxilia na identificação, classificação e caracterização dos mesmos.

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este projeto objetivou a busca, isolamento e identificação de metabólitos secundários de invertebrados marinhos com atividade leishmanicida.

3.2 Objetivos específicos

- Preparo de frações enriquecidas (frações hexânica, de acetato de etila e metanólica) a partir do extrato bruto de invertebrados marinhos selecionados.
- Avaliação das frações enriquecidas e subfrações em ensaios biológicos, focando o trabalho nas frações com maior atividade leishmanicida.
- Isolamento e purificação dos compostos presentes nas frações ativas.
- Determinação estrutural dos compostos isolados.
- Avaliação da atividade leishmanicida dos compostos isolados.

CAPÍTULO 4

PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Materiais, instrumentos e reagentes.

4.1.1 Métodos cromatográficos

4.1.1.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Para análise qualitativa dos extratos e frações foram utilizadas cromatofolhas de sílica-gel 60 sobre poliéster com indicador ultravioleta F₂₅₄, 20x20 cm (Sigma-Aldrich®). A revelação das cromatofolhas foi feita sob luz ultravioleta (UV) com lâmpada Spectroline (modelo ENF-240 C/FE) nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm. Após, foram borrifadas com soluções reveladoras, para determinar grupos funcionais e/o classe dos compostos presentes nas amostras. As soluções reveladoras usadas foram:

- Solução de 20% de ácido fosfomolibdico (PMA) em EtOH P.A. (Quimex), aquecendo a placa de cromatofolha em estufa a 120° C para identificação de substâncias redutoras.
- Solução Dragendorff. Solução A: 0,85 g de nitrato de bismuto em 10,0 mL de ácido acético glacial e 10,0 mL de água; solução B: 8,00 g de iodeto de potássio dissolvido em 20,0 mL de água; mistura-se 1:1 das soluções A e B resultando em uma solução estoque. Utiliza-se uma mistura de 1,0 mL da solução estoque com 2,0 mL de ácido acético glacial e 10,0 mL de água para identificação de alcaloides.

–

4.1.1.2 Cromatografia em coluna pré-empacotada

Dependendo da polaridade das amostras em análise, foram realizadas cromatografias em colunas pré-empacotadas (marca Waters Sep-Pak® e Phenomenex Strata®) de diferentes tamanhos (2,0 g, 5,0 g e 10,0 g) com diferentes fases estacionárias (sílica-gel derivatizada com grupos octadesilano – C₁₈ – ou cianopropila).

4.1.1.3 Cromatografia em coluna por exclusão de tamanho

Para as separações por exclusão de tamanho foi utilizada uma coluna de vidro com dimensões de 170,0 cm de comprimento e 2,0 cm de diâmetro interno. O material utilizado como fase estacionária foi Sephadex® LH-20 (Pharmacia Biotech®) e a eluição foi realizada com MeOH grau cromatográfico.

4.1.1.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para as separações feitas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizaram-se dois sistemas Waters®, um deles de injeção manual e o outro de injeção automática. O primeiro deles está equipado com duas bombas (modelo Pump 600), um degaseificador em linha, um módulo de controle (Controller 600) e um detector espectrofotométrico UV-Visível com detecção em dois comprimentos de onda (UV/Vis Detector 2487).

O sistema de injeção automático equipado com um módulo de separação (Alliance 2695) acoplado a um módulo espectrofotométrico UV-Visível com detector de arranjo de diodos (*Photodiode Array Detector* - PDA 2996) que permitiu observar as análises em uma faixa de comprimento de onda entre 200 a 800 nm; também acoplado a um detector evaporativo de espalhamento de luz (*Evaporative Light Scattering Module* - ELSD 2424) e detector espectrométrico de massas (ZQ Mass Detector).

Todas as frações orgânicas após separação em modo normal foram concentradas e secas em evaporador rotativo. As frações aquosas obtidas por separação em modo reverso foram secas em sistema de centrifuga a vácuo Savant (SpeedVac® Plus SC 210).

Durante as separações e dependendo das características de cada amostra (polaridade, complexidade, quantidade), foram utilizadas diferentes colunas:

Analíticas: Coluna C18 X-Terra® (Waters 125 Å/5 µm - 250 x 4,6 mm)
Coluna C18 Inertsil® ODS-3 (GL Sciences 125 Å/5 µm - 250 x 4,6 mm)
Coluna C18 Inertsil® ODS-4 (GL Sciences 125 Å/5 µm - 250 x 4,6 mm)
Coluna C18 InertSustain® (GL Sciences 125 Å/5 µm - 250 x 4,6 mm)
Coluna C8 Inertsil® (GL Sciences 125 Å/5 µm - 250 x 4,6 mm)

Semipreparativas: Coluna C18 Delta-Pak™ SP (Waters 300 Å/15 µm - 300 x 7,8 mm)
Coluna C18 ODS-2 SP (GL Sciences 125 Å/5 µm - 250 x 7,6 o 10 mm)

Nas cromatografias de alta eficiência (CLAE) foram utilizados solventes de grau cromatográfico (J.T Baker, Malinckrodt) filtrados e degaseificados. A água utilizada foi destilada e purificada em sistema Millipore Milli-Q®, equipado com resina de troca iônica e membrana de 0,22 µm.

4.1.2 Técnicas espectroscópicas e espectrométricas

4.1.2.1 Resonância Magnética Nuclear (RMN)

Para a obtenção dos espectros de resonância magnética nuclear utilizaram-se:

- Equipamento da marca Bruker, 14,1 Tesla (600 MHz para frequência do hidrogênio), equipado com trocador automático de amostra, cryo-sonda TCI ($^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$) de 5 mm com ATMA® (*Automatic Tunning Matching*) e gradiente de campo em z, sonda BBI de 5 mm com ATMA®, gradiente de campo em z, unidade de temperatura variável, unidade geradora de gradiente de campo, unidade cryo-fit® e unidade LC-SPE acoplado.
- Equipamento da marca Bruker, 9,4 Tesla (400 MHz para frequência do hidrogênio), equipado com seis (6) sondas: duas (2) sondas de 2,5 mm BBO (*Broad Band Observe*) e BBI (*Broadband Inverse Detection*), duas (2) sondas de 5 mm BBO e BBI, uma (1) sonda de 4 mm HRMAS (*High Resolution Magic Angle Spinning*) para amostras heterogêneas e uma (1) sonda de 5 mm BBI com ATMA®; unidade de temperatura variável, unidade geradora de gradiente de campo e trocador automático de amostra.

Os equipamentos foram operados sob a supervisão do Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (DQ-UFSCar).

As amostras foram preparadas com solventes deuterados de marca Cambridge Isotopes: dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6) e clorofórmio deuterado (CDCl_3). Foi

utilizado tetrametilsilano (TMS) como padrão de referência interna em todas as amostras.

Parâmetros de aquisição e processamento encontram-se especificados em cada um dos espectros e mapas de contorno obtidos (Apêndice A).

4.1.2.2 Espectrometria de massas (EM)

Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos em um sistema cromatográfico de marca Waters® com um sistema de controle Alliance (Waters® 2695), com modo de ionização por electrospray (ESI+ e ESI-) e com detector espectrofotométrico de massas (Waters® Micromass ZQ 2000), disponível no nosso laboratório.

Os compostos puros foram analisados em espectrômetro de massas de alta resolução (HRMS) LTQ Orbitrap Velos da Thermo Scientific com modo de ionização por electrospray em modo positivo por injeção direta. As amostras foram diluídas em MeOH. Os espectros foram obtidos na Central de Análises Químicas (CAQI) do Instituto de Química (IQSC).

4.1.2.3 Rotação óptica $[\alpha]_D$

As medidas de rotação óptica foram obtidas para as substâncias puras em um polarímetro digital P-2000 da JASCO que opera no comprimento de onda de 589 nm fornecido por uma lâmpada de sódio (raia D do Na). As amostras foram solubilizadas em MeOH.

4.1.2.4 Espectroscopia no ultravioleta

Os espectros no ultravioleta (UV) de compostos puros foram obtidos em um espectrofotômetro de UV marca Shimadzu, modelo UV-1800. As amostras foram diluídas em MeOH.

4.1.2.5 Espectroscopia no infravermelho

Para as análises no infravermelho foi usado um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) de marca Shimadzu, modelo IRAffinity 1. As amostras foram solubilizadas em MeOH e aplicadas em pastilhas de silício.

4.2 Procedimentos experimentais

4.2.1 Preparação do extrato bruto e partições da esponja *Darwinella* sp.

Foram realizadas duas coletas da esponja *Darwinella* sp. A primeira foi realizada em 2011 na Enseada 3, Ilha Papagaios em Cabo Frio no litoral do Rio de Janeiro. A segunda coleta foi em 2015 na Ilha Comprida e Ilha dos Papagaios em Cabo Frio, no Rio de Janeiro.

O material biológico da primeira coleta foi liofilizado e preservado a -20° C. O material biológico da segunda coleta foi preservado em EtOH durante uma semana, e realizado o processo de extração em seguida.

Para a preparação do extrato bruto (Figura 4.1) foram utilizados 145,0 g de material biológico liofilizado da primeira coleta, triturados com MeOH em liquificador. A matriz biológica foi extraída com o mesmo solvente em banho de ultrassom durante 30 minutos, e posteriormente filtrada a vácuo, utilizando-se uma camada de Celite® em funil de Büchner. Foram realizadas mais duas extrações, como descritas anteriormente. O extrato obtido das três extrações foi concentrado em evaporador rotativo até um volume aproximado de 500 mL. Após, foi realizada a partição com *n*-hexano (três vezes, 500 mL cada uma), obtendo-se a fração hexânica e a fração metanólica. A fração hexânica foi evaporada até a secura e pesada. A fração metanólica foi evaporada até remoção completa do MeOH, diluída em quantidade suficiente de água deionizada para completar um volume de 500 mL para realizar uma partição com AcOEt (três vezes, 500 mL cada uma). Após a partição, a fração AcOEt foi evaporada até secura e pesada. A fração aquosa foi submetida à extração com uma mistura de resinas Amberlite® XAD-2, XAD-4 e XAD-7, em proporção 1:1:1, durante uma noite com agitação constante (Shaker Innova, 130 rpm, 20° C). Após, recuperou-se a mistura das resinas

Figura 4.1 Esquema de metodologia geral de preparação do extrato bruto e das frações enriquecidas da esponja *Darwinella* sp.

por filtração e o sobrenadante aquoso foi descartado. Realizaram-se duas extrações da resina com 500 mL de MeOH em banho de ultrassom durante 15 minutos, cada uma. A resina filtrada e recuperada foi extraída mais duas vezes com 500 mL de uma mistura de MeOH:acetona (1:1) em banho de ultrassom por 15 minutos, cada uma. Por último, a resina foi filtrada e recuperada. A solução metanólica e a solução da mistura MeOH:acetona foram agrupadas, evaporadas até secar e pesadas.

As frações do extrato bruto (hexânica, AcOEt e XAD-MeOH:acetona) foram enviadas para bioensaio de atividade leishmanicida, realizados no Instituto Adolfo Lutz em São Paulo, no Laboratório de Novos Fármacos-Doenças Negligenciadas (ND-ND-Lab), sob a coordenação do Prof. Dr. André Tempone.

4.2.2 Determinação da atividade leishmanicida *in vitro* e concentração inibitória média (IC₅₀)

4.2.2.1 Atividade leishmanicida

Extratos, sub-frações e substâncias puras foram testadas para determinação da atividade leishmanicida.

A atividade leishmanicida foi avaliada contra promastigotas e amastigotas de *Leishmania (L.) infantum*.

No bioensaio com promastigotas foi usada pentamidina como padrão positivo e as amostras dissolveram-se em dimetilsulfóxido (DMSO) ou MeOH. As amostras foram adicionadas ao meio de cultura em uma concentração de 500 µg/mL e incubadas junto com os parasitas durante 24 a 48 horas a 24° C. A IC₅₀ das substâncias puras determinou-se usando promastigotas na concentração de 1x10⁶ /poço em placas de 96 poços contendo meio de cultura M-199. Após um período entre 24 e 48 horas, verificou-se a viabilidade dos promastigotas por microscopia óptica conferindo-se a morfologia dos parasitas, como também pela atividade oxidativa mitocondrial com o método colorimétrico MTT, medido em $\lambda_{\text{máx}}$ 570 nm.

No bioensaio com amastigotas, foram usados macrófagos peritoneais de camundongos fêmeas BALB/c e o fármaco glucantime® como padrão. Os macrófagos foram infectados com amastigotas em uma relação 10:1 (amastigota/macrófago) e incubados junto com os extratos, frações ou substâncias puras a 37° C durante 120 horas. A IC₅₀ foi determinada por contagem do número de amastigotas por macrófago de 500 macrófagos/poço. Utilizou-se como controle macrófagos não tratados (100% infectados).

4.2.2.2 Manutenção do parasita

Os parasitas de *Leishmania* (L.) *infantum* (MHOM/BR/1972/LD), foram mantidos em hamsters dourados infectados. Cerca de 60-70 dias após a infecção, foram obtidos os amastigotas a partir dos baços triturados dos hamsters e separadas por centrifugação diferencial. Os promastigotas isolados foram mantidos em meio de cultura M-199 suplementado com 10% (v/v) de soro de vitela e 0,25% (v/v) de hemina a 24° C.

CAPÍTULO 5

ESTUDO QUÍMICO DA ESPONJA MARINHA *Darwinella* sp.

5.1 Metabólitos secundários reportados das esponjas do gênero *Darwinella*.

Concorde a base de dados WoRMS (World Register of Marine Species), existem registradas dezessete espécies reportadas do gênero *Darwinella*.

Figura 5.1 Classificação taxonômica do gênero *Darwinella*. Fotografia de *Darwinella* sp. (amarela) no ambiente marinho.

Classe Demospongiae

Ordem Dendroceratida

Família Darwinellidae

Gênero *Darwinella*

Cortesia: Eduardo Hadju

A aplysulfurina (31) foi isolada da esponja *Darwinella oxeata* (coletada nas costas orientais da Austrália) por Karuso e colaboradores em 1984 (KARUSO et al., 1984). A esponja foi identificada erroneamente como *Aplysilla sulphurea* e reclassificada anos depois pelo mesmo grupo. Compostos correlatos da aplysulfurina (31), as tetrahidrosulfurinas 1, 2 e 3 (32-34), também foram isoladas de *D. oxeata* coletada nas costas de Nova Zelândia. O ambliofurano (35), a aplysulfurina (31) e a tetrahidrosulfurina 1 (32) foram isoladas de *Darwinella* sp. (KARUSO et al., 1986a). A primeira porfirina reportada de uma esponja, o 13²,17³-ciclofeoforbídeo (36), foi isolado de *D. oxeata* (KARUSO et al., 1986b).

Figura 5.3 Metabólitos secundários isolados de esponjas marinhas do gênero *Darwinella*.

Os halisulfatos 8, 9 e 10 (**37-39**) são sesterterpenos sulfatados e foram isolados da esponja *D. australensis* (MAKARIEVA et al., 2003), e cuja presença já foi reportada em uma esponja marinha taxonomicamente diferente pertencente à família Halichondriidae (KERNAN; FAULKNER, 1988).

Figura 5.2 Metabólitos secundários isolados de esponjas marinhas do gênero *Darwinella*.

As oxeatamidas A, B, C, D, E, F e G (**40-46**), a iso-oxeatamida A (**47**) e o éster metílico da oxeatamida A (**48**), são diterpenoides espongianos aromáticos, isolados mais recentemente de *D. oxeata* (WOJNAR et al., 2014). Os membranolídeos C e D (**49, 50**) foram isolados da mesma esponja (DOWLE, 2008), e já tinham sido reportados da esponja *D. membranosa* (ANKISETTY et al., 2004).

Figura 5.4 Metabólitos secundários isolados de esponjas marinhas do gênero *Darwinella*.

5.2 Estudo da fração enriquecida de AcOEt de *Darwinella* sp.

A fração AcOEt do extrato metanólico de *Darwinella* sp. induziu a morte de 100% dos amastigotas de *Leishmania infantum*. Esta fração foi submetida à separação por cromatografia de permeação em gel (Sephadex® LH-20) e eluição isocrática com MeOH. As frações obtidas foram analisadas por CCD (eluente CH₂Cl₂:MeOH 9,5:0,5; reveladores lâmpada UV, $\lambda = 254$ nm e PMA) e reunidas por similaridade cromatográfica, resultando em seis frações (Figura 5.6).

Todas as novas sub-frações foram avaliadas no teste de atividade leishmanicida, dentre as quais as sub-frações E1A_3, E1A_4, E1A_5 e E1A_6 apresentaram atividade. Após análise destas frações por CLAE-PDA-MS (Coluna X-terra C18, gradiente H₂O:MeOH:MeCN 80:10:10 até H₂O:MeOH:MeCN 0:55:55 com 0,1% de ácido fórmico, em 22 minutos, fluxo de 1 mL/min), observou-se semelhança cromatográfica das frações E1A_3 e E1A_4 (Figura 5.5).

Figura 5.5 Perfis cromatográficos das frações E1A_3 (a) e E1A_4 (b).

Condições de análise: coluna X-terra C18, eluição em gradiente H₂O:MeOH:MeCN 80:10:10 até H₂O:MeOH:MeCN 0:55:55 com 0,1% de ácido fórmico em 22 minutos e fluxo de 1 mL/min. Detector UV, $\lambda_{\text{máx}} = 254$ nm.

Devido à complexidade da fração reunida, denominada E1A_34, foi necessário realizar uma extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction* – SPE), utilizando-se uma coluna pré-empacotada Sep Pak® de sílica-gel derivatizada com grupos octadecil – C18 (10 g Waters®) e eluição em gradiente H₂O:MeOH (6:4, 1:1, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9 e 100% MeOH). Obtiveram-se seis novas frações e foram analisadas por CLAE-PDA-ELS-MS (Coluna ODS-3, gradiente H₂O:MeOH 90:10 até 100% de MeOH com 0,1% de ácido fórmico em 20 minutos mais 15 minutos de MeOH 100% com 0,1% de ácido fórmico, fluxo de 1 mL/min) (Figura 5.6). Todas apresentaram compostos de interesse, embora algumas com perfis cromatográficos complexos.

Figura 5.6 Esquema de fracionamento do extrato AcOEt da esponja *Darwinella* sp.

5.2.1 Isolamento dos constituintes da subfração E1A-34-1

A fração E1A_34_1 (153,4 mg) foi separada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV), utilizando-se uma coluna ODS-2 semipreparativa e eluição isocrática de 76% de MeOH em H₂O com 0,1% de ácido fórmico e fluxo de 2 mL/min, monitorando-se em comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}} = 245$ nm. Foram obtidas cinco frações, dentre as quais a fração E1A_34_13 apresentou um composto majoritário. Utilizou-se uma coluna Inertsil® C8-4 com eluição em gradiente de MeOH:H₂O 70:30 até MeOH:H₂O 75:25 com 0,1% de ácido fórmico, em 15 minutos e fluxo de 0,8 mL/min,

monitorando-se a separação em comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}} = 245 \text{ nm}$. Foram assim obtidas as frações E1A_34_13_A e E1A_34_13_B. Após análise por RMN de ^1H de cada uma destas frações, foi necessário realizar uma repurificação de cada uma delas por CLAE-UV (Figura 5.7).

Figura 5.7 Esquema de isolamento e purificação das frações de interesse de E1A_34_1 do extrato AcOEt da esponja *Darwinella* sp.

Realizou-se uma separação por CLAE-UV utilizando-se uma coluna Inertsil® C8-4, com eluição isocrática de 35% de MeCN em H₂O, fluxo de 1 mL/min, monitorando-se em comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}} = 293 \text{ nm}$ que resultou no isolamento da fração E1A_34_13_A2.

Para a purificação da fração E1A_34_13_B, utilizou-se separação por CLAE-UV com coluna Inertsil® ODS-4 e eluição isocrática com 45% de MeCN em H₂O, fluxo de 1 mL/min, monitorando-se a separação em comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}} = 297 \text{ nm}$, obtendo-se a fração E1A_34_13_B4.

5.2.2 Isolamento dos constituintes da subfração E1A-34-2

A fração E1A_34_2 foi separada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV), utilizando-se uma coluna Inertsil® ODS-3 e eluição em gradiente de MeOH:H₂O 80:20 até MeOH:H₂O 88:12 com 0,1% de ácido fórmico, durante 25 minutos e fluxo de 1 mL/min, monitorando-se em comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}} = 245$ nm. Foram obtidas cinco frações, dentre as quais as frações E1A_34_23, E1A_34_24 e E1A_34_25 apresentaram os picos mais intensos (Figura 5.8).

A fração E1A_34_23 foi separada por CLAE-UV, utilizando-se uma coluna Inertsil® ODS-3 e eluição isocrática com MeOH:MeCN:H₂O 20:40:40 com 0,1% de ácido fórmico e fluxo de 1 mL/min, monitorando-se a separação em comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}} = 245$ nm, resultando na obtenção de quatro frações. Desta separação resultou na obtenção das frações E1A_34_23_B e E1A_34_23_D. A primeira foi re-purificada por CLAE-UV utilizando-se uma coluna Inertsil® C8-4 e eluição isocrática com MeCN:H₂O 35:65 com 0,1% de ácido fórmico e fluxo de 1 mL/min, obtendo-se fração pura E1A_34_23_B2.

A fração E1A_34_23_D foi separada por CLAE-UV utilizando-se uma coluna Delta-Pak™ C18 semipreparativa, eluição isocrática com MeCN:H₂O 55:45 com 0,1% de ácido fórmico, e fluxo de 1,8 mL/min, monitorando-se a separação em comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}} = 245$ nm. Foram obtidas três frações, das quais, somente a fração E1A_34_23_D3 apresentou quantidade e pureza suficientes para realizar experimentos de RMN de ¹H.

Para a separação da fração E1A_34_24 por CLAE-UV, utilizou-se uma coluna X-terra® e eluição isocrática com MeCN:H₂O 40:60 com 0,1% de ácido fórmico, fluxo de 1 mL/min e monitorando-se a separação em comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}} = 250$ nm, levando à obtenção de nove frações. Desta primeira separação, isolou-se a fração pura E1A_34_24_B, e as frações E1A_34_24_D e E1A_34_24_E, ainda impuras.

Para a purificação por CLAE-UV do composto presente na amostra E1A_34_24_D, utilizou-se uma coluna Inertsil® ODS-4 e eluição isocrática com MeCN:H₂O 40:60 com 0,1% de ácido fórmico, fluxo de 1 mL/min, monitorando-se em dois comprimentos de onda $\lambda_{\text{máx}} = 254$ nm e $\lambda_{\text{máx}} = 320$ nm, resultando no isolamento das frações puras E1A_34_24_D4 e E1A_34_24_D5.

A fração E1A_34_24_E foi purificada por CLAE-UV utilizando-se uma coluna X-terra® e eluição isocrática com MeOH:H₂O 55:45 com 0,1% de ácido fórmico, fluxo de 1 mL/min e monitorando em comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}} = 250$ nm, resultando no isolamento da fração pura E1A_34_24_E3.

Figura 5.8 Esquema de isolamento e purificação das frações de interesse de E1A_34_2 do extrato AcOEt da esponja *Darwinella* sp.

A fração E1A_34_25 foi separada por CLAE-UV utilizando-se uma coluna X-terra, eluição isocrática MeCN:H₂O 50:50 com 0,1% de ácido fórmico, com fluxo de 1 mL/min e monitoramento em comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}} = 250$ nm. A fração obtida foi purificada utilizando-se uma coluna X-terra®, eluição isocrática com MeOH:H₂O 70:30 com 0,1% de ácido fórmico, com fluxo de 1 mL/min e monitorando-se a separação em comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}} = 270$ nm, obtendo-se a fração pura E1A_34_25_A81.

5.2.3 Isolamento dos constituintes da subfração E1A-34-3

A fração E1A_34_3 (190,2 mg) foi separada por CLAE-UV, utilizando-se uma coluna Delta-Pak^{TM} semipreparativa e eluição em gradiente MeCN:H₂O 80:20 até MeCN:H₂O 90:10, 0,1% de ácido fórmico e fluxo de 1,5 mL/min durante 30 minutos e monitorando-se em comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}} = 245$ nm, resultando na obtenção de cinco frações, dentre as quais a fração E1A_34_33 apresentou picos de interesse. Para a separação por CLAE-UV desta última fração utilizou-se uma coluna Delta-Pak^{TM} semipreparativa e eluição isocrática com MeCN:H₂O 65:35, 0,1% de ácido fórmico e fluxo de 1,5 mL/min, monitorando-se em comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}} = 254$ nm. Foram obtidas seis frações. A fração E1A_34_33_E foi purificada por CLAE-UV em uma coluna X-terra® e eluição isocrática com MeCN:H₂O 45:55 com 0,1% de ácido fórmico e fluxo de 1,2 mL/min, monitorando-se a separação em comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}} = 310$ nm. Foi obtida a fração pura E1A_34_33_E2 (Figura 5.9).

Figura 5.9 Esquema de isolamento e purificação das frações de interesse de E1A_34_3 do extrato AcOEt da esponja *Darwinella* sp.

5.2.4 Isolamento dos constituintes da subfração E1A-34-4

A fração E1A_34_4 (132,0 mg) foi separada por CLAE-UV utilizando-se coluna ODS-2 SP e uma eluição isocrática H₂O:MeCN 40:60 com 0,1% de ácido fórmico, fluxo de 1,5 mL/min e monitorando-se a separação em comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}} = 255$ nm. Foram obtidas cinco frações, dentre as quais a fração E1A_34_42 foi purificada por CLAE-UV utilizando-se uma coluna X-terra® e eluição isocrática com MeOH:H₂O 50:50 com 0,1% de ácido fórmico, fluxo de 1 mL/min, monitorando-se em comprimento de onda de $\lambda_{\text{máx}} = 260$ nm. Foi obtida a fração pura E1A_34_42_B.

A fração E1A_34_43 foi purificada por CLAE-UV, utilizando-se coluna X-terra® e eluição isocrática com MeCN:H₂O 46:54 com 0,1% de ácido fórmico e fluxo de 1 mL/min, monitorando-se a separação em comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}} = 208$ nm, resultando na obtenção de nove frações. Destas, a fração E1A_34_43_F apresentou menor complexidade, e foi submetida a uma purificação utilizando-se uma coluna Inertsil® ODS-4 e eluição isocrática com MeCN:H₂O 58:42 com 0,1% de ácido fórmico, fluxo de 1 mL/min, monitorando-se em comprimento de onda $\lambda_{\text{máx}} = 210$ nm, obtendo-se a fração pura E1A_34_43_F2 (Figura 5.10).

Figura 5.10 Esquema de isolamento e purificação das frações de interesse de E1A_34_4 do extrato AcOEt da esponja *Darwinella* sp.

Na tabela 5.1, apresenta-se a quantidade e o rendimento das frações puras obtidas do extrato AcOEt da esponja *Darwinella* sp. Assim, como o código abreviado da fração para facilitar a identificação das mesmas.

Tabela 5-1 Frações puras obtidas do extrato AcOEt da esponja *Darwinella* sp.

Fração pura	Código	Massa (mg)	Rendimento (%)
E1A_34_13_A2 ^a	13-A2	4,0	0,003
E1A_34_13_B4 (48)	13-B4	0,5	0,0003
E1A_34_23_B2 ^a	23-B2	4,4	0,003
E1A_34_23_D3 (48)	23-D3	1,6	0,001
E1A_34_24_B (52)	24-B	1,4	0,001
E1A_34_24_D4 ^b	24-D4	0,7	0,0005
E1A_34_24_D5 ^a	24-D5	0,4	0,0003
E1A_34_24_E3 ^a	24-E3	1,2	0,0008
E1A_34_25_A81 (53)	25-A81	1,7	0,001
E1A_34_33_E2 (51)	33-E2	9,6	0,006
E1A_34_42_B (51)	42-B	1,2	0,0008
E1A_34_43_F2 ^a	43-F2	0,2	0,000003

^a Análise em andamento

^b Composto degradado durante experimentos de RMN

CAPÍTULO 6

DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA

Durante a análise dos dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C , UV e infravermelho, e dados espectrométricos das frações puras descritas no capítulo 5, observou-se que algumas delas correspondem à mesma estrutura química.

6.1 Determinação estrutural do membranolídeo (**51**) (frações 33-E2 e 42-B)

A elucidação estrutural do membranolídeo (**51**), um composto diterpênico presente nas frações puras e idênticas 33-E2 e 42-B, foi realizada pela análise dos dados espectroscópicos de RMN- ^1H , RMN- ^{13}C , HSQC, COSY, HMBC e NOESY (Figuras A.1 - A.11), infravermelho, rotação óptica e ultravioleta, espectrometria de massas e pela comparação com dados da literatura.

O composto **51**, apresentou-se como um sólido amorfo incolor nas frações 33-E2 e 42-B com rotação óptica $[\alpha]_{\text{D}}$ -46,87 (c 1.5 em MeOH) e $[\alpha]_{\text{D}}$ -19,21 (c 0,6 em MeOH), respectivamente. Os espectros de massas de alta resolução (HRESIMS) em modo positivo de 33-E2 e 42-B indicaram a fórmula $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_4$. No caso de 33-E2 (Figura A.12), observou-se um sinal em m/z 367,18518 (100%) correspondente à molécula cationizada $[\text{M}+\text{Na}]^+$ e outro sinal em m/z 345,20370 (25%) correspondente à molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$. No espectro de massas de 42-B (Figura A.13) só observa-se o sinal em m/z 345,20340 (100%) da molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$. O cálculo do índice de deficiência de hidrogênio (IDH) indicou que a estrutura apresenta oito insaturações.

Nos espectros de absorção no infravermelho de 33-E2 e 42-B (Figuras A.14 e A.15) observam-se bandas fortes de estiramento $\text{C}=\text{O}$ (1756 e 1733 cm^{-1}) e duas bandas de intensidade média de estiramento $\text{C}-\text{O}$ (1228 e 1093 cm^{-1}) sugerindo a presença de grupos ésteres. Também se observam bandas intensas de estiramento $\text{C}-\text{H}$ (2985 - 2874 cm^{-1}) e bandas de absorção média de dobramento de CH_3 e de CH_2 (1479 e 1358 cm^{-1}).

Por fim, nota-se uma banda de estiramento fraca de dupla ligação C=C em aromáticos (1591 cm^{-1}). Nos espectros no UV de 33-E2 e 42-B (Figuras A.16 e A.17), observam-se uma banda intensa em 207 nm correspondendo a uma transição eletrônica $\pi \rightarrow \pi^*$ (consistente com a presença de insaturações, neste caso de grupos carbonílicos) e uma banda fraca em 238 nm.

A análise conjunta dos espectros de RMN- ^1H , RMN- ^{13}C e mapa de contorno HSQC tanto de 33-E2 quanto de 42-B, permitiu verificar a presença de dois carbonos carbonílicos C-6 (δ_{C} 173,6) e C-15 (δ_{C} 170,6), seis carbonos aromáticos C-8 (δ_{C} 142,2), C-9 (δ_{C} 148,4), C-13 (δ_{C} 145,9), C-14 (δ_{C} 124,9), dos quais dois carbonos têm ligação com hidrogênio: HC-11 em δ_{C} 132,8 (δ_{H} 7,79; d, 5,6 Hz) e HC-12 em δ_{C} 120,2 (δ_{H} 7,28; d, 5,5 Hz). Pela multiplicidade dos sinais destes prótons e pelos valores das suas constantes de acoplamento, pode-se deduzir que eles estão em posição *orto* com relação ao outro indicando um anel benzeno 1,2,3,4-tetrassubstituído.

Observaram-se três singletos de metila: H₃C-18 em δ_{H} 0,49 (δ_{C} 27,9) com um deslocamento químico incomummente baixo para este tipo de hidrogênios; H₃C-19 em δ_{H} 0,95 (δ_{C} 32,5) e H₃C-20 em δ_{H} 1,37 (δ_{C} 32,6) e uma metila dubleto H₃C-17 em δ_{H} 1,75 (d, 4,7 Hz; δ_{C} 17,7), sugerindo a ligação desta metila com um carbono terciário. Observou-se um singlete de metoxila H₃C-6OMe em δ_{H} 3,66 (δ_{C} 51,9). Também cinco carbonos metilênicos: H₂C-1 em δ_{C} 41,0 (δ_{Ha} 2,26; bd, 9,5 Hz; δ_{Hb} 1,49; m), H₂C-2 em δ_{C} 20,1 (δ_{Ha} 1,80; m; δ_{Hb} 1,71; m), H₂C-3 em δ_{C} 39,5 (δ_{H} 1,32; m), H₂C-5 em δ_{C} 51,2 (δ_{Ha} 2,06; d, 9,4 Hz; δ_{Hb} 1,55; d, 9,4 Hz) e H₂C-16 em δ_{C} 68,2 (δ_{H} 5,18; bs). Por fim, só um carbono metínico HC-7 em δ_{C} 40,7 (δ_{H} 4,60; q, 4,7 Hz) e dois carbonos quaternários C-4 em δ_{C} 31,8 e C-10 em δ_{C} 39,7 foram observados.

No mapa de contorno homonuclear COSY, observaram-se correlações geminais entre os hidrogênios metilênicos CH_{2a}-1 e CH_{2b}-1 e os hidrogênios metilênicos CH_{2a}-2 e CH_{2b}-2. Também, observaram-se correlações vicinais entre os sistemas de spin metilênicos CH₂-1 e CH₂-2, e entre CH₂-2 e CH₂-3. Pode-se deduzir então, a interconexão entre os carbonos metilênicos H₂C-1, H₂C-2 e H₂C-3. Observou-se uma correlação fraca entre os hidrogênios metílicos CH₃-18 e os hidrogênios metilênicos H₂C-5. A correlação entre os prótons aromáticos CH-11 e CH-12, confirmou sua relação vicinal no anel benzeno. Uma última correlação entre os sistemas de spin do próton metínico CH-7 e os prótons metílicos CH₃-17 é observada.

No mapa de contorno heteronuclear HMBC observou-se que os prótons metílicos CH₃-18 e CH₃-19 correlacionam com os carbonos metilênicos H₂C-5 e H₂C-3 e o carbono quaternário C-4. Os prótons CH₃-18 correlacionam com o carbono H₃C-19, e vice-versa, indicando uma posição geminal destas metilas e sugerindo sua ligação ao carbono quaternário C-4, ligando assim este último aos carbonos metilênicos H₂C-3 e H₂C-5. Observou-se também correlações dos prótons metilênicos CH₂-5a e CH₂-1 com o carbono quaternário C-10 e dos hidrogênios CH₂-1 com o carbono metílico H₃C-20. Os prótons da metila CH₃-20 correlacionam com o carbono quaternário C-10 e o carbono metínico H₂C-5. Assim, foi possível estabelecer ligações entre os carbonos metilênicos H₂C-1 e H₂C-5 com o carbono quaternário C-10, e ligar por fim a metila H₃C-10 também ao carbono C-10. Desta maneira é possível fechar uma subestrutura cíclica de seis membros 1,3-disubstituída (Figura 6.1).

Figura 6.1 Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC que estabelecem a estrutura do ciclohexano do membranolídeo (**51**).

Os hidrogênios metílicos CH₃-20 e o próton metilênico CH₂-5b também correlacionam com o carbono aromático C-9. O próton aromático CH-11 correlaciona com o carbono quaternário C-10 do ciclohexano, concluindo assim que o carbono C-10 deve estar ligado com o carbono aromático C-9, em posição *orto* ao próton CH-11. Por outro lado, o próton metínico CH-7 correlaciona com o carbono aromático C-9, sugerindo ligação deste carbono metínico a um carbono aromático posição *orto* ao carbono C-9. Aliás, os hidrogênios CH-7 também correlacionam com os carbonos aromáticos C-8 e C-14 e com o carbono carbonílico C-6. Pelo padrão de multiplicidade dos sinais dos hidrogênios metílicos CH₃-17 (dubleto) e do próton metínico CH-7

(quarteto), é possível deduzir a conexão entre estes dois carbonos. A correlação observada no mapa de contorno HMBC entre os prótons metílicos CH₃-17 com o carbono HC-7, permitiu verificar isto. Estes prótons metílicos, a sua vez, também correlacionam com o carbono aromático C-8, permitindo assim conectar o carbono HC-7 ao carbono aromático C-8. Os hidrogênios CH₃-17 também correlacionam com a carbonila C-6, mostrando assim a ligação entre o carbono HC-7 com a carbonila C-6. Por fim, os hidrogênios da metoxila CH₃-6OMe só correlacionam com a carbonila C-6, fechando desta maneira um éster alifático como o segundo substituinte do anel benzeno (Figura 6.2).

Figura 6.2 Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC entre o ciclohexano, o éster alifático e o anel benzeno do membranolídeo (**51**).

O alto deslocamento químico dos prótons metilênicos CH₂-16 sugere que este carbono poderia estar ligado a um heteroátomo. Observaram-se correlações no mapa de contorno HMBC destes prótons com os carbonos aromáticos C-13 e C-14 e com o carbono carbonílico C-15. Nem o próton aromático CH-11 nem o CH-12 correlacionam com a carbonila C-15, e estando as posições *orto* e *meta* com relação ao carbono HC-11 atribuídas (o ciclohexano e a cadeia com o éster, respectivamente), só restou a posição *meta* com relação ao carbono HC-12 (carbono aromático C-14) para ligar o carbono carbonílico. Assim, o carbono metínico H₂C-16 pôde ser ligado ao último carbono aromático C-13 e completar a substituição do anel benzeno.

Como calculado, a estrutura contém oito insaturações, uma delas o anel de ciclohexano, quatro mais do anel benzeno e duas das carbonilas, faltando assim uma insaturação que pode corresponder a um ciclo de cinco membros fechado por um oxigênio entre o carbono da carbonila C-15 e o carbono metínico H₂C-16, explicando o desblindamento tanto do carbono quanto dos seus prótons (Figura 6.3).

Figura 6.3 Correlações observadas no mapa de contorno HMBC que consolidam o anel lactônico de cinco membros ligada ao anel benzeno do membranolídeo (**51**).

A comparação dos dados espectroscópicos descritos anteriormente com os dados do membranolídeo (**51**) (MOLINSKI; FAULKNER, 1987; ANKISSETTY et al., 2004) auxiliaram na determinação estrutural.

Para explicar o deslocamento químico da metila CH₃-18 foi necessária a análise e comparação de dados reportados na literatura para compostos com esqueleto aplysulfurano. Sabe-se que esta metila possui um deslocamento químico incomunmente baixo (δ_H 0,49; δ_C 27,9) embora não esteja perto de um grupo eletro-doador fazendo com que a metila fique tão blindada. Este fenômeno, explica-se quando o ciclohexano é desenhado na conformação de cadeira e leva-se em conta que o substituinte axial do carbono quaternário C-4 será afetado pelo efeito de anisotropia magnética do substituinte benzeno em axial no carbono C-10. Este deslocamento é típico das metilas axiais em C-4 em sistemas (1',3',3'-trimetilciclohexil)-benzenos (WENKERT et al., 1965; IRELAND et al., 1970; SHAPIRO et al., 1971; MOLINSKI; FAULKNER, 1987). Aliás, a conformação de cadeira também poderia explicar correlações observadas no mapa de contorno COSY entre hidrogênios a três carbonos de distância (Figura 6.4).

Figura 6.4 Conformação de cadeira do ciclohexano e relação 1,3-diaxial da metila C-18 e o anel benzeno e outras correlações observadas no mapa de contorno COSY do membranolídeo (**51**).

Por outro lado, a análise do espectro do experimento NOESY, permitiu estabelecer a configuração relativa do carbono metínico HC-7 como $7R^*$, já que se observou a relaxação dipolar entre o próton CH-7 e o próton metilênico CH₂-5a. O hidrogênio HC-7 também mostrou tal relaxação com os prótons metílicos CH₃-20, sugerindo que esta metila deveria estar saindo do plano assim como o hidrogênio CH-7, e fazer com que o carbono quaternário C-10 adote uma configuração relativa como $10S^*$ (Figura 6.5).

Previamente o membranolídeo (**51**) exibiu leve atividade antibacteriana (MOLINSKI; FAULKNER, 1987).

Figura 6.5 Acoplamentos dipolares observados no experimento NOESY para determinação da configuração relativa do membranolídeo (**51**).

Tabela 6-1 Comparação de dados de RMN de ^1H e ^{13}C do membranolídeo (**51**) em CDCl_3 .

Posição	$\delta^{13}\text{C}^a$ (HSQC)	$\delta^1\text{H}^a$ m (J/Hz)	$\delta^{13}\text{C}^b$ (RMN- ^{13}C)	$\delta^1\text{H}^b$ m (J/Hz)
1	41,0	2,26 d (14,1) 1,49 m	40,8	2,29 br d (--) ^c 1,45 m ^c
2	20,1	180 m 1,71 m	19,9	1,80 m ^c 1,65 m ^c
3	39,5	1,32 m	39,4	1,32 m ^c 1,26 m ^c
4	31,8		31,6	
5	51,2	2,06 d (14,1) 1,55 d (14,1)	50,8	2,08 br d (14) 1,53 d (14)
6	173,6		173,7	
7	40,7	4,60 q (7,1)	40,4	4,61 q (7)
8	142,2		141,7	
9	148,4		147,9	
10	39,7		39,2	
11	132,8	7,79 d (8,4)	132,9	7,81 d (8,3)
12	120,2	7,28 d (8,4)	120,0	7,31 d (8,3)
13	145,9		145,8	
14	124,9		124,5	
15	170,6		170,8	
16	68,2	5,18 s	68,3	5,21 s
17	17,7	1,75 d (7,1)	17,6	1,75 d (7)
18	27,9	0,49 s	27,3	0,47 s
19	32,5	0,95 s	32,6	0,94 s
20	32,6	1,37 s	32,6	1,37 s
6-OMe	51,9	3,66 s	52,0	3,68 s

^a Dados experimentais 33-E2, 600 MHz

^b Dados da literatura (MOLINSKI; FAULKNER, 1987)

^c Dados da literatura (ANKISETTY et al., 2004)

(51) Membranolídeo

6.2 Determinação estrutural do éster metílico da oxeatamida A (48) (frações 13-B4 e 23-D3)

O éster metílico da oxeatamida A (48) encontrou-se presente nas frações 13-B4 e 23-D3. A determinação estrutural foi realizada pela análise dos dados espectroscópicos de RMN-¹H, RMN-¹³C, HSQC, COSY e HMBC (Figuras A.18 - A.32), infravermelho, rotação óptica e ultravioleta, espectrometria de massas e pela comparação com dados da literatura.

O composto 48, apresentou-se como um sólido amorfo incolor, com rotação óptica $[\alpha]_D -29.20$ (*c* 0,8 em MeOH) para 23-D3 comparado com $[\alpha]_D -62$ (*c* 0,05 em MeOH), reportado na literatura (WOJNAR et al., 2014). Os espectros de massas de alta resolução (HRESIMS) em modo positivo de 13-B4 e 23-D3 indicaram a fórmula C₂₃H₃₁O₅N. Nos espectros de massas de 13-B4 e de 23-D3 (Figuras A.33 e A.34.), observa-se um sinal em *m/z* 424,20721 (100%) correspondente à molécula cationizada [M+Na]⁺ e outro sinal em *m/z* 402,22562 (50%) correspondente à molécula protonada [M+H]⁺. O cálculo do índice de deficiência de hidrogênio (IDH) indicou que a estrutura apresenta nove insaturações.

No espectro de absorção no infravermelho de 23-D3 (Figura A.35) observam-se bandas fortes de estiramento C=O de éster e amida (1749 e 1694 cm⁻¹ respectivamente), uma banda forte de estiramento C-O (1218 cm⁻¹) confirmando um grupo funcional éster. Observam-se também bandas intensas de estiramento C-H (2949-2871 cm⁻¹) e bandas de absorção média de dobramento de CH₃ e de CH₂ (1457 cm⁻¹). Por fim, uma banda de estiramento fraca de dupla ligação C=C em aromáticos (1605 cm⁻¹) é observada. No espectro no UV de 23-D3 (Figura A.36), observa-se uma banda intensa em 208 nm correspondendo a uma transição eletrônica $\pi \rightarrow \pi^*$ correspondente à presença de insaturações, e uma banda de menor intensidade em 246 nm.

Alguns dos sinais discutidos anteriormente na determinação estrutural do membranolídeo (50) também são observados nos dados obtidos para o composto 48, por exemplo, a presença do anel benzeno e do ciclohexano 1,3-disubstituído.

A análise conjunta dos espectros de RMN-¹H, RMN-¹³C e mapa de contorno HSQC das frações puras 13-B4 e 23-D3, permitiu verificar a presença de três carbonos carbonílicos C-6 (δ_C 174,2), C-16 (δ_C 167,5) e C-23 (δ_C 169,6), seis carbonos

aromáticos C-8 (δ_C 137,8), C-9 (δ_C 150,0), C-13 (δ_C 129,8), C-14 (δ_C 142,3), dos quais dois carbonos têm ligação com hidrogênio: HC-11 em δ_C 126,8 (δ_H 7,57; d, 8,3 Hz) e HC-12 em δ_C 120,6 (δ_H 7,50; d, 8,2 Hz). Neste caso, a multiplicidade dos sinais destes prótons e os valores das suas constantes de acoplamento, também permitiram inferir posição *orto* dos hidrogênios, indicando que o anel benzeno também está 1,2,3,4-tetrasubstituído.

Também se observam três singletos de metila: H₃C-18 em δ_H 0,35 (δ_C 26,6), H₃C-19 em δ_H 0,89 (δ_C 32,8) e H₃C-20 em δ_H 1,41 (δ_C 32,9) e uma metila dubleto H₃C-17 em δ_H 1,47 (d, 7,4 Hz; δ_C 15,9). Igualmente, há um singlete de metoxila H₃C-23OMe em δ_H 3,59 (δ_C 51,9) e seis carbonos metilênicos: H₂C-1 em δ_C 40,4 (δ_{Ha} 2,31; bd, 14,6 Hz; δ_{Hb} 1,41; m), H₂C-2 em δ_C 19,7 (δ_{Ha} 1,77, m; δ_{Hb} 1,63, m), H₂C-3 em δ_C 39,9 (δ_H 1,27, m), H₂C-5 em δ_C 50,0 (δ_{Ha} 2,14, d, 13,8 Hz; δ_{Hb} 1,46, d, 14,6 Hz), H₂C-15 em δ_C 49,8 (δ_{Ha} 4,52, d, 16,8 Hz; δ_{Hb} 4,35, d, 16,7 Hz). O carbono metínico HC-7 em δ_C 41,1 (δ_H 4,46, m) e os dois carbonos quaternários C-4 em δ_C 31,4 e C-10 em δ_C 40,0 também são observados para o composto **48**.

De maneira semelhante ao membranolídeo, no mapa de contorno homonuclear COSY observaram-se correlações geminais e vicinais entre os prótons metilênicos CH₂-1, CH₂-2 e CH₂-3. No mapa de contorno heteronuclear HMBC também se observaram correlações entre os hidrogênios das metilas CH₃-18 e CH₃-19 com os carbonos H₂C-3, C-4 e H₂C-5 do ciclohexano, e correlações dos prótons da metila CH₃-20 com os carbonos H₂C-1, H₂C-5 e C-1 permitiram fechar a mesma subestrutura do ciclohexano (Figura 6.6).

Figura 6.6 Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC para o ciclohexano e o anel benzeno do éster metílico da oxeatamida A (**48**).

A correlação entre o próton aromático CH-11 e o carbono quaternário C-10, também é observada neste caso, assim como a dos prótons metílicos CH₃-20 com o carbono aromático C-9, confirmando de igual forma a primeira substituição do anel benzeno. A cadeia alifática, em posição *meta* ao hidrogênio CH-11 também é confirmada pelas correlações entre os hidrogênios metílicos CH₃-17 com os carbonos aromáticos C-8 e C-9, como a correlação entre o próton metínico CH-7 e o carbono C-14 do anel benzeno. Este último próton e a metila CH₃-17, também correlacionam com o carbono carbonílico C-6, porém, neste caso, não se observou nenhuma metoxila ligada à carbonila, deixando o ácido carboxílico livre (Figura 6.7).

Figura 6.7 Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC entre o ciclohexano, o ácido alifático e o anel benzeno do éster metílico da oxeatamida A (**48**).

As outras duas substituições no anel benzeno foram deduzidas pelo fato da mudança no deslocamento químico dos prótons aromáticos CH-11 (δ_H 7,50) e CH-12 (δ_H 7,57) em **48** com relação aos mesmos prótons do membranolídeo (**50**) (δ_H 7,79 e δ_H 7,28). O próton CH-12 correlaciona com o carbono carbonílico C-16, da mesma maneira que faz o próton CH-11, porém, com correlação mais fraca. Isto quer dizer, então, que a carbonila C-16 deve estar substituindo o anel benzeno no carbono C-13 para conseguir correlacionar com os prótons aromáticos. (Figura 6.8a).

Os deslocamentos químicos dos metilenos H₂C-15 (δ_C 49,8) e H₂C-22 (δ_C 43,1) sugerem que eles estejam ligados a um átomo de nitrogênio. Os hidrogênios metilênicos CH₂-15 correlacionam com os carbonos aromáticos C-14 e C-13 assim como com a carbonila C-16. Os prótons CH₂-22 não correlacionam com nenhum carbono aromático,

mas sim com a carbonila C-16 e com o carbono metínico H₂C-15. Estas correlações indicam que o carbono metilênico H₂C-15 está ligado ao carbono da posição C-14 do anel benzeno. O nitrogênio ligado à carbonila C-16 constitui conexão entre os metilenos H₂C-15 e H₂C-22, formando assim uma lactama de cinco membros. O nitrogênio está substituído pelo carbono metilênico H₂C-22, cujos prótons também correlacionam com mais um carbono carbonílico, C-23. Por fim, os hidrogênios da metoxila CH₃-23OMe correlacionam com a carbonila C-23, fechando assim este éster metílico ligado ao metileno CH₂-22 (Figura 6.8b)

Figura 6.8 Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC entre o anel benzeno, o éster alifático e a lactama do éster metílico da oxeatamida A (**48**).

A comparação dos dados espectroscópicos da literatura e de nossos dados experimentais auxiliaram na identificação das frações 13-B4 e 23-D3 como sendo o éster metílico da oxeatamida A (**48**) (WOJNAR et al., 2014). Na tabela 6.2, apresentam-se os dados reportados na literatura e os dados experimentais.

Tabela 6-2 Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C do éster metílico da oxeatamida A (**48**) em CDCl_3 .

Posição	$\delta^{13}\text{C}^a$ (HSQC)	$\delta^1\text{H}^a$ m (J/Hz)	$\delta^{13}\text{C}^b$ (RMN- ^{13}C)	$\delta^1\text{H}^b$ m (J/Hz)
1	40,4	2,31 d (14,6) 1,41 m	41,1	2,36 d (13,7) 1,47 m
2	19,7	1,77 m 1,63 m	20,1	1,83 m 1,68 m
3	39,9	1,27 m	39,9	1,34 dt (12,8; 4,1) 1,28 td (12,3; 3,9)
4	31,4		31,9	
5	50,0	2,14 d (13,8) 1,46 d (14,6)	50,9	2,07 d (13,8) 1,51 d (14,2)
6	174,2		175,4	
7	41,1	4,46 m	40,6	4,74 q (7,5)
8	137,8		134,7	
9	150,0		151,1	
10	40,0		39,8	
11	126,8	7,57 d (8,2)	127,8	7,64 d (8,3)
12	120,6	7,50 d (8,2)	122,8	7,71 d (8,3)
13	129,8		130,7	
14	142,3		142,0	
15	49,8	4,52 d (16,7) 4,35 d (16,7)	50,1	4,53 d (16,3) 4,33 d (16,3)
16	167,5		168,6	
17	15,9	1,47 d (7,4)	15,6	1,62 d (7,0)
18	26,6	0,35 s	27,4	0,41 s
19	32,8	0,89 s	33,1	0,92 s
20	32,9	1,41 s	33,0	1,46 s
22	43,1	4,38 d (18,5) 4,32 d (18,5)	43,6	4,39 d (17,7) 4,35 d (17,6)
23	169,6		169,8	
23-OMe	51,9	3,59 s	52,5	3,73 s

^a Dados experimentais 23-D3, 600 MHz

^b Dados da literatura (WOJNAR et al., 2014)

(48) Éster metílico da oxeatamida A

6.3 Determinação estrutural da oxeatamida H (52) (fração 24-B)

A determinação estrutural da oxeatamida H (**52**) foi realizada pela análise dos dados espectroscópicos de RMN-¹H, RMN-¹³C, HSQC, COSY, HMBC (Figuras A37 – A.41.), infravermelho, rotação óptica e ultravioleta, espectrometria de massas e pela comparação com dados da literatura.

O composto **52** apresentou-se como um sólido amorfo incolor, com rotação óptica $[\alpha]_D -38,77$ (c 0,7 em MeOH). Os espectros de massas de alta resolução (HRESIMS) em modo positivo de **52** indicaram a fórmula C₂₃H₂₉O₃N. Observou-se um sinal em m/z 366,20142 (73%) correspondente à molécula cationizada $[M+Na]^+$ e outro sinal em m/z 344,21988 (100%) correspondente à molécula protonada $[M+H]^+$ (Figura A.42). O cálculo do índice de deficiência de hidrogênio (IDH) indicou que a estrutura apresenta oito insaturações.

No espectro de absorção no infravermelho de **52** (Figura A.43) observam-se bandas fortes de estiramento C=O (1726 e 1682 cm⁻¹), a última provavelmente de amida. Observam-se também bandas intensas de estiramento C-H (2944-2869 cm⁻¹) e bandas de absorção média de dobramento de CH₃ e de CH₂ (1456 cm⁻¹). Uma banda de estiramento fraca de dupla ligação C=C em aromáticos (1608 cm⁻¹) também é observada. O espectro no UV (Figura A.44) mostra uma banda intensa em 206 nm que pode corresponder a uma transição eletrônica $\pi \rightarrow \pi^*$ devido à presença de insaturações.

A análise da informação espectroscópica de **52** junto com a informação do composto **48**, permitiu reconhecer que tanto os deslocamentos químicos dos carbonos e hidrogênios, quanto as correlações observadas entre os prótons (espectro de COSY) e entre os prótons e carbonos (espectro de HMBC) são muito semelhantes, embora, com uma pequena diferença na substituição do nitrogênio da lactama de cinco membros.

A análise conjunta dos espectros de RMN-¹H, RMN-¹³C e mapa de contorno HSQC do composto **52** permitiram verificar a presença de dois carbonos carbonílicos C-6 (δ_C 176,7) e C-16 (δ_C 168,6), seis carbonos aromáticos C-8 (δ_C 134,7), C-9 (δ_C 150,5), C-13 (δ_C 131,3), C-14 (δ_C 141,2) e dois carbonos que têm ligação com hidrogênio: HC-11 em δ_C 127,5 (δ_H 7,58; d , 8,2 Hz) e HC-12 em δ_C 122,1 (δ_H 7,63; d , 8,0 Hz). Assim como nos casos anteriores, a multiplicidade dos sinais destes prótons e

os valores das suas constantes de acoplamento, permitiram inferir a posição orto dos hidrogênios e a 1,2,3,4-tetrasubstituição do anel benzeno.

Observaram-se neste caso não três, mas quatro singletos de grupos metila: H₃C-18 em δ_H 0,38 (δ_C 27,1), H₃C-19 em δ_H 0,92 (δ_C 32,9) e H₃C-20 em δ_H 1,46 (δ_C 32,8) e a metila H₃C-22 cujos prótons encontram-se bem mais desblindados (δ_H 3,11, s, δ_C 29,4), cujo deslocamento químico deve corresponder a uma metila ligada a um átomo de nitrogênio, já que se fosse uma metoxila, o carbono devia estar ainda mais desblindado. A metila dubleto H₃C-17 em δ_H 1,62 (d, 7,3 Hz; δ_C 15,4) também é observada. São observados cinco carbonos metilênicos: H₂C-1 em δ_C 40,9 (δ_{Ha} 2,35; bd, 15,2 Hz; δ_{Hb} 1,44, m), H₂C-2 em δ_C 19,9 (δ_{Ha} 1,8, m; δ_{Hb} 1,67, m), H₂C-3 em δ_C 39,6 (δ_{Ha} 1,33, m; δ_{Hb} 1,26, m), H₂C-5 em δ_C 50,8 (δ_{Ha} 2,06, d, 14,3 Hz; δ_{Hb} 1,50, d, 14,2 Hz). O carbono metínico HC-7 em δ_C 40,6 (δ_H 4,73, q, 7,2 Hz) e os dois carbonos quaternários C-4 em δ_C 31,8 e C-10 em δ_C 39,7 também são observados para o composto **52**.

Nas figuras 6.9a e 6.9b, estão esquematizadas as correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC observadas para o composto **52** e já discutidas anteriormente para o éster metílico da oxeatamida A (**48**).

Figura 6.9 Correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC entre o ciclohexano, o ácido e o anel benzeno do composto **52**.

Tal como observado para o composto (**48**), os prótons aromáticos correlacionam com a carbonila em C-16, assim como os hidrogênios metínicos CH₂-15 correlacionam com esta carbonila e com o carbono aromático C-14. Como mencionado anteriormente,

ainda que os hidrogênios da metila CH_3 -22 encontram-se desblindados, o carbono metílico possui um deslocamento relativamente baixo para estar ligado a oxigênio. As únicas correlações desta metila com o carbono carbonílico C-16 e com o carbono metínico CH_2 -15, permitem ligar então a metila CH_3 -22 diretamente ao nitrogênio da lactama de cinco membros (Figura 6.10).

Ainda que o composto **52** possua o mesmo esqueleto de carbono das oxeatamidas, nenhuma destas apresenta o substituinte metílico no nitrogênio da lactama. Assim, o composto **52**, denominado por nós como oxeatamida H, é inédito na literatura.

Figura 6.10 Correlações COSY e HMBC entre o anel benzênico e o anel de cinco membros da lactama do composto **52**.

Tabela 6-3 Dados de RMN de ^1H e ^{13}C e correlações COSY e HMBC do composto **52** em CDCl_3 (600 MHz).

Posição	$\delta^{13}\text{C}$ (HSQC)	$\delta^1\text{H}$ m (J/Hz)	COSY	HMBC
1a	40,9	2,35 bd (15,2)	1b, 2a, 2b	4
1b		1,44 m	1a, 2a, 2b	
2a	19,9	1,81 m	1a, 1b, 2b, 3a, 3b	
2b		1,67 m	1a, 1b, 2a, 3a, 3b	
3a	39,6	1,33 m	2a, 2b, 3b	
3b		1,26 m	2a, 2b, 3a	
4	31,8			
5a	50,8	2,06 d (14,2)		10
5b		1,50 d (14,2)		4, 9
6	176,7			
7	40,6	4,73 q (7,2)	17	6, 8, 9, 14, 17
8	134,7			
9	150,5			
10	39,7			
11	127,5	7,58 d (8,2)	12	10, 13
12	122,1	7,63 d (8,2)	11	9, 14, 16*
13	131,3			
14	141,2			
15a	51,8	4,38 d (17,0)	15b	14, 16*
15b		4,22 d (17,0)	15a	
16	168,6			
17	15,4	1,62 d (7,3)	7	6, 7, 8
18	27,1	0,38 s		4, 5, 19
19	32,9	0,92 s		4
20	32,8	1,46 s		1, 5, 9, 10
22	29,4	3,11 s		15, 16

*Correlações fracas.

(52) Oxeatamida H

6.4 Determinação estrutural da oxeatina (53) (fração 25-A81)

A elucidação estrutural da oxeatina (**53**) foi realizada pela análise dos dados espectroscópicos de RMN-¹H, RMN-¹³C, HSQC, COSY, HMBC e NOESY (Figuras A.45 – A.50), ultravioleta, espectrometria de massas e pela comparação com dados da literatura.

O composto **53** apresentou-se como um sólido amorfo incolor. O espectro de massas de alta resolução (HRESIMS) em modo positivo de **53** indicou a fórmula C₂₃H₃₁O₅N. No espectro (Figura A.51), observou-se um sinal em *m/z* 424,20743 (100%) correspondente à molécula cationizada [M+Na]⁺ e outro sinal em *m/z* 402,22580 (77%) correspondente à molécula protonada [M+H]⁺. O cálculo do índice de deficiência de hidrogênio (IDH) indicou que a estrutura apresenta nove insaturações. O espectro no UV de **53** (Figuras A.52) mostra uma banda intensa em 210 nm e uma banda de menor intensidade em 246 nm.

A análise conjunta dos espectros de RMN-¹H, RMN-¹³C e mapa de contorno HSQC da fração pura 25-A81, permitiu verificar a presença de três carbonos carbonílicos: em C-6 (δ_C 174,3), C-16 (δ_C 167,2) e C-23 (δ_C 178,8). Além disso, observam-se seis carbonos aromáticos C-8 (δ_C 138,9), C-9 (δ_C 151,7), C-13 (δ_C 125,5), C-14 (δ_C 136,2), e dois dos quais são substituídos com hidrogênio: HC-11 em δ_C 125,9 (δ_H 7,47; d, 8,7 Hz) e HC-12 em δ_C 128,5 (δ_H 7,80; d, 8,8 Hz). A constante de acoplamento destes prótons indica sua posição *orto* no anel benzeno, 1,2,3,4-tetrassubstituído.

São observados três singletos de metila: H₃C-18 em δ_H 0,52 (δ_C 27,8), H₃C-19 em δ_H 0,94 (δ_C 32,5) e H₃C-20 em δ_H 1,33 (δ_C 32,7) e uma metila dubleto H₃C-17 em δ_H 1,50 (d, 6,8 Hz; δ_C 16,9). Neste caso há um singlete de metoxila H₃C-16OMe em δ_H 3,88 (δ_C 52,2) e seis carbonos metilênicos: H₂C-1 em δ_C 40,0 (δ_{Ha} 2,20, bd, 15,4 Hz; δ_{Hb} 1,45, d, 10,1 Hz), H₂C-2 em δ_C 20,0 (δ_{Ha} 1,81, m; δ_{Hb} 1,68, m), H₂C-3 em δ_C 39,8 (δ_H 1,28, m), H₂C-5 em δ_C 50,2 (δ_{Ha} 2,06, d, 14,3 Hz; δ_{Hb} 1,55, d, 14,2 Hz), H₂C-15 em δ_C 49,9 (δ_{Ha} 5,05, d, 17,0 Hz; δ_{Hb} 4,98, d, 16,3 Hz) e H₂C-22 cujo deslocamento químico ainda não foi determinado (δ_{Ha} 4,70, d, 18,6 Hz; δ_{Hb} 3,80, d, 19,0 Hz). O carbono metínico HC-7 em δ_C 41,5 (δ_H 4,47; q, 6,8 Hz) e os dois carbonos quaternários C-4 em δ_C 31,7 e C-10 em δ_C 39,7 também são observados para o composto **53**.

De maneira semelhante, a análise dos dados espectroscópicos permitiu chegar à estrutura do ciclohexano 1,3-disubstituído, ligado ao anel benzeno em posição *orto* ao próton CH-11. As correlações observadas nos mapas de contorno COSY e HMBC são ilustradas na figura 6.11, enquanto o arranjo dos outros substituintes do anel aromático será discutido.

Figura 6.11 Correlações COSY e HMBC observadas no ciclohexano do composto **53**.

As correlações entre os hidrogênios aromáticos CH-11 e CH-12 e os carbonos aromáticos restantes, permitiram atribuir os carbonos no anel. O próton CH-11 apresenta uma correlação fraca com o carbono metínico HC-7, como já observado, está ligado ao carbono C-8 do anel aromático (Figura 6.12)

Figura 6.12 Correlações COSY e HMBC observadas entre o anel benzeno e substituintes do composto **53**.

O carbono carbonílico C-16 apresenta, neste caso, duas únicas correlações no espectro de HMBC: uma com o próton aromático CH-12 e outra com os hidrogênios da metoxila CH₃-16OMe. Assim, esta carbonila de éster metílico está ligada ao carbono aromático C-13. É esta a primeira diferença encontrada entre o composto **53** com o membranolídeo (**51**), o éster metílico da oxeatamida A (**48**) e o composto (**52**): não há um substituinte cíclico entre os carbonos C-13 e C-14 do anel benzeno.

Por outro lado, as correlações já observadas e discutidas entre o próton metínico CH-7 e os prótons metílicos CH₃-17 com os carbonos aromáticos C-8 e C-14, e com o carbono carbonílico C-6, também são observadas neste caso. A segunda diferença apresenta-se na correlação dos prótons metilênicos CH₂-15, que correlacionam tanto com os carbonos aromáticos C-8, C-13 e C-14, quanto com a carbonila C-6, indicando que o carbono metilênico CH₂-15. Como os hidrogênios CH₂-15 correlacionam com a carbonila C-6, este carbono metilênico deve estar ligado a nitrogênio para fechar um ciclo de seis membros (Figura 6.13).

Figura 6.13 Correlações COSY e HMBC entre o anel benzeno, a lactama de seis membros e o éster metílico do composto **53**.

Nos espectros apresentados neste trabalho, não foi possível identificar um carbono metilênico. Porém, um grupo metileno desblindado (δ_{Ha} 4,70, d, 18,6 Hz; δ_{Hb} 3,80, d, 19,0 Hz) indica que estes hidrogênios estão próximos de um heteroátomo e/ou grupo retirador de elétrons. Também se observou um sinal alargado de carbonila em δ_{C} 178,8, que pode estar ligado ao carbono metilênico, induzindo a desproteção destes hidrogênios. Sinais semelhantes foram observados nas dicetopiperazinas rodriguesina A e rodriguesina B, onde os hidrogênios do resíduo de glicina se observam em δ_{H} 3,55 e

δ_H 3,08 e o carbono carbonílico do resíduo β -amino ácido observa-se alargado e por volta de δ_C 168 (KOSSUGA et al., 2009).

Assim, o fragmento de 59 unidades de massa atômica estaria ligado ao nitrogênio da lactama, e corresponderia a um carbono metilênico CH_2 -22 e um carbono de carbonila C-23 de ácido. Como os experimentos para observar estas correlações estão em andamento para o composto **53**, apresenta-se uma proposta da possível estrutura química (Figura 6.14).

Figura 6.14 Proposta da estrutura química da oxeatina (fração 25-A81) **53**.

(53) Oxeatina

No experimento NOESY, foi possível observar a relaxação dipolar entre o próton aromático CH-11 e os prótons metínicos CH_2 -1a e CH_2 -2a. O hidrogênio metínico CH-7 também apresentou relaxação dipolar com os prótons CH_3 -20, assim como com o hidrogênio metilênico CH_2 -5a o que permite deduzir a configuração relativa do carbono metínico HC-7 como 7*R**. A configuração relativa do carbono C-10 seria então 10*S**, se a metila CH_3 -20 também sai do plano de igual maneira que o próton metínico CH-7 (Figura 6.15).

O composto **53**, denominado por nós de oxeatina é inédito e apresenta um novo esqueleto de carbono. Neste caso o anel benzeno está fundido com uma lactama de seis membros e em uma posição diferente à lactama de cinco membros observada nas oxeatamidas.

Figura 6.15 Relaxação dipolar observada no experimento NOESY para determinação da configuração relativa do composto **53**.

Tabela 6-4 Dados de RMN de ^1H e ^{13}C e correlações COSY e HMBC do composto **53** em CDCl_3 (600 MHz).

Posição	$\delta^{13}\text{C}$ (HSQC)	$\delta^1\text{H}$ m (J/Hz)	COSY	HMBC
1a	40,0	2,20 d (15,4)	1b, 2a, 2b	
1b		1,45 d (10,1)	1a, 2a, 2b	
2a	20,0	1,81 m	1a, 1b, 2b, 3a, 3b	3
2b		1,68 m	1a, 1b, 2a, 3a, 3b	
3a	39,8	1,28 m	2a, 2b, 3b	2, 4
3b			2a, 2b, 3a	
4	31,7			
5a	50,2	2,06 d (14,3)	5b	3, 19
5b		1,55 d (14,3)	5a	3, 9, 18, 19
6	174,3			
7	41,5	4,47 q (6,8)	17	6, 8, 9*, 14
8	138,9			
9	151,7			
10	39,7			
11	125,9	7,47 d (8,7)	12	8*, 10, 13, 14
12	128,5	7,80 d (8,7)	11	9, 8*, 11*, 14, 16
13	125,5			
14	136,2			
15a	49,9	5,05 d (17,0)	15b	6, 8, 13, 14
15b		4,98 d (17,0)	15a	
16	167,2			
17	16,9	1,50 d (6,8)	7	6, 8
18	27,8	0,52 s		3, 5, 19
19	32,5	0,94 s		3, 4, 5, 18
20	32,7	1,33 s		1, 5, 9
22a	()	4,70 d (18,6)		15, 16
22b		3,80 d (18,6)		
23	178,8			
16-OMe	52,2	3,88, s		16

*Correlações fracas.

6.5 Diterpenos espongianos e o esqueleto aplysulfurano

A designação do esqueleto espongiano tem sua origem nos primeiros metabólitos diterpênicos isolados da esponja marinha do gênero *Spongia* (KAZLAUSKAS et al., 1979). O termo *diterpenos espongianos* tem sido usado para descrever os metabólitos que possuem na sua estrutura o esqueleto de diterpeno espongiano (**54**) (KEYZERS; NORTHCOTE; DAVIES-COLEMAN, 2006). Compostos com este esqueleto diterpênico com frequência são altamente oxigenados em diferentes posições. Além disso, muitos destes compostos podem sofrer rearranjos no esqueleto de carbono. Até o momento, todos os compostos isolados de esponjas do gênero *Darwinella* apresentam um rearranjo específico do núcleo diterpênico espongiano que é conhecido como o esqueleto aplysulfurano (**55**) (KARUSO et al., 1984, 1986a; WOJNAR, 2008).

Figura 6.16 Esqueletos de compostos diterpênicos isolados de esponjas do gênero *Darwinella*.

Keyzers e colaboradores propuseram a biogênese do núcleo aplysulfurano (**55**), inicialmente sugerida por Karuso e colaboradores (KARUSO et al., 1984; MAYOL; PICCIALLI; SICA, 1986; KEYZERS; NORTHCOTE; ZUBKOV, 2004). O rearranjo

envolveria um deslocamento de Nametkin (deslocamento específico 1,2 de uma metila no rearranjo de Wagner-Meerwein) (SMITH; MARCH, 2007), da metila angular C17 do espongiario, seguida de uma clivagem oxidativa da ligação entre os carbonos C5 e C6, resultando na formação de esqueletos de aplysulfurano rearranjados (Figura 6.17).

Figura 6.17 Rearranjo de Wagner-Meerwein na formação do esqueleto aplysulfurano (KEYZERS; NORTHCOTE; ZUBKOV, 2004)

6.6 Biogênese de aplysulfuranos nitrogenados

Os compostos com o esqueleto aplysulfurano caracterizam-se por ser altamente oxigenados, como no caso do membranolídeo (**51**). Porém, as oxeatamidas, incluindo o éster metílico da oxeatamida A (**48**), já conhecido, e os compostos novos, a oxeatamida H (**52**) e a oxeatina (**53**) apresentam nitrogênios na sua estrutura. Esta parte nitrogenada, provavelmente proveem de um resíduo de amino ácido.

No caso da oxeatamida A (**40**), o nitrogênio é originário do amino ácido glicina, enquanto que na oxeatamida B (**41**), é de um resíduo de uma histidina descarboxilada (histamina). O isolamento da iso-oxeatamida A (**47**) e das oxeatamidas C-G (**42-46**) sustentam esta hipótese: os grupos nitrogenados das oxeatamidas D-G correspondem aos amino ácidos descarboxilados valina (2-metilpropan-1-amina), fenilalanina (2-

feniletilamina), isoleucina (2-metilbutan-1-amina) e leucina (3-metilbutan-1-amina), respectivamente. No caso da oxeatamida C, a parte nitrogenada pode ter outra origem mais difícil de determinar (DOWLE, 2008; WOJNAR, 2008).

Figura 6.18 Aminoácidos (descarboxilados) como fonte do nitrogênio nas oxeatamidas.(WOJNAR, 2008)

Para explicar a incorporação da parte nitrogenada no esqueleto aplysulfurano, têm-se três possíveis rotas biogenéticas. A primeira, proposta por El Sayed e colaboradores, baseia-se em um ataque nucleofílico da amina do amino ácido envolvido a qualquer um dos carbonos metínicos do anel D (furano) do aplysulfurano, formando um intermediário aldeído com posterior ciclização e oxidação levando ao derivado lactâmico correspondente (Figura 6.19) (EL SAYED et al., 1999).

Figura 6.19 Mecanismo de formação do anel lactâmico com o anel furano e um derivado de amino ácido (EL SAYED et al., 1999).

A segunda rota consiste na oxidação do anel furano com oxigênio singlete, formando um γ -hidroxi butenolídeo que, rearranjado leva à formação de um aldeído suscetível a reagir com a amina de um amino ácido. A subsequente redução da imina leva à formação da amida para formar a lactona de cinco membros (Figura 6.20) (WOJNAR, 2008).

Figura 6.20 Mecanismo proposto na formação do anel lactâmico mediado por oxigênio singlete (WOJNAR, 2008)

Por fim, uma terceira proposta leva em conta uma estrutura mais próxima dos aplysfuranos: a ausência do furano do anel D. Neste caso, o furano seria totalmente oxidado e o anel C seria aromatizado. Após o rearranjo se forma um aldeído que reagirá com o derivado do amino ácido, como mencionado anteriormente (Figura 6.21) (WOJNAR, 2008). Esta proposta permitiria explicar também a formação do anel lactâmico de seis membros observado na oxeatina (**53**), aqui isolado e identificado pela primeira vez.

Figura 6.21 Rota alternativa da formação da lactama (cinco ou seis membros) nas oxeatamidas e compostos relacionados (WOJNAR, 2008)

6.7 Avaliação biológica

Os compostos isolados, o membranolídeo (**51**), o éster metílico da oxeatamida A (**48**) e a oxeatamida H (**52**) foram testados no bioensaio de atividade leishmanicida contra os parasitas de *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi*. Dentre eles, só o membranolídeo (**51**) mostrou ter atividade leishmanicida contra promastigotas e contra tripomastigotas, além de mostrar uma baixa toxicidade (Tabela 6-5).

Tabela 6-5 Resultados avaliação biológica.

Composto	IC ₅₀ (μM) <i>T. cruzi</i> (tripomastigotas)	IC ₅₀ (μM) <i>L. Infantum</i> (promastigotas)	IC ₅₀ (μM) <i>L. Infantum</i> (amastigotas)	Toxicidade CC ₅₀ (μM) NCTC
Éster metílico oxeatamida. A	NA	NA	NA	>200
Oxeatamida H	NA	NA	NA	>200
Membranolídeo	29.16 (27.33 – 31.12)	41.23 (37.30 – 45.59)	NA	54.48 (46.58 – 63.72)

CAPÍTULO 7

CONCLUSÃO

O desenvolvimento deste trabalho permitiu o isolamento de 7 substâncias do extrato metanólico da esponja *Darwinella* sp que mostrou atividade leishmanicida. Foi possível a identificação e elucidação estrutural de quatro dos compostos. Dos compostos isolados, o membranolídeo (**51**) e o éster metílico da oxeatamida A (**48**) são conhecidos, enquanto a oxeatamida H (**52**) e a oxeatina (**53**) ainda não foram reportados na literatura.

O composto 24-B (**52**) pertence à série das oxeatamidas, já que a única diferença com seus homólogos é o substituinte no nitrogênio da lactama, que neste caso corresponde a uma metila. Pode-se nomear este composto de oxeatamida H.

O composto 25-A81 (**53**) é estruturalmente inédito, já que ainda não foram reportados compostos com esqueleto aplysulfurano que possuam uma lactama de seis membros. Este composto denominou-se de oxeatina. A configuração relativa deste composto foi determinada pela análise dos acoplamentos dipolares no experimento NOESY.

Tanto a oxeatamida H quanto a oxeatina não mostraram ter atividade leishmanicida contra parasitas de *L. infantum*, porém o membranolídeo exibiu atividade contra promastigotas de *L. infantum* e tripomastigotas de *T. cruzi*, assim como mostrou ter baixa toxicidade.

Embora não tenha sido possível realizar a determinação estrutural dos outros compostos, é importante que estudos químicos continuem sendo realizados em esponjas do gênero *Darwinella* para conseguirmos isolar em maior quantidade este tipo de compostos. A ocorrência de compostos similares permite auxiliar na identificação de espécies de esponjas, não somente pelas características biológicas e ecológicas, se não também pela informação química relacionada. Devido à semelhança física e química entre a nossa esponja, *Darwinella* sp. e a esponja coletada nas costas da Nova Zelândia, a *Darwinella oxeata*, pode-se supor que o espécimen coletado no litoral do Rio de Janeiro possivelmente corresponde à espécie *D. oxeata*. Não obstante são necessários estudos morfológicos e quimiotaxonômicos mais detalhados para isto ser confirmado.

APÊNDICE A

INFORMAÇÃO ESPECTROSCÓPICA E ESPECTROMÉTRICA

Figura A.1 Espectro de RMN- ¹ H do membranolídeo (51) (fração 33-E2), isolado da esponja <i>Darwinella</i> sp. (600 MHz, CDCl ₃).....	61
Figura A.2 Espectro de RMN- ¹ H do membranolídeo (51) (fração 42-B), isolado da esponja <i>Darwinella</i> sp. (600 MHz, CDCl ₃).....	62
Figura A.3 Espectro de RMN- ¹³ C do membranolídeo (51) (fração 33-E2), isolado da esponja <i>Darwinella</i> sp. (600 MHz, CDCl ₃).....	63
Figura A.4 Espectro de RMN- ¹³ C do membranolídeo (51) (fração 42-B), isolado da esponja <i>Darwinella</i> sp. (600 MHz, CDCl ₃).....	64
Figura A.5 Mapa de contorno COSY do membranolídeo (51) (fração 33-E2), isolado da esponja <i>Darwinella</i> sp. (600 MHz, CDCl ₃).....	65
Figura A.6 Mapa de contorno COSY do membranolídeo (51) (fração 42-B), isolado da esponja <i>Darwinella</i> sp. (600 MHz, CDCl ₃).....	66
Figura A.7 Mapa de contorno HSQC do membranolídeo (51) (fração 33-E2), isolado da esponja <i>Darwinella</i> sp. (600 MHz, CDCl ₃).....	67
Figura A.8 Mapa de contorno HSQC do membranolídeo (51) (fração 42-B), isolado da esponja <i>Darwinella</i> sp. (600 MHz, CDCl ₃).....	68
Figura A.9 Mapa de contorno HMBC do membranolídeo (51) (fração 33-E2), isolado da esponja <i>Darwinella</i> sp. (600 MHz, CDCl ₃).....	69
Figura A.10 Mapa de contorno HMBC do membranolídeo (51) (fração 42-B), isolado da esponja <i>Darwinella</i> sp. (600 MHz, CDCl ₃).....	70
Figura A.11 Mapa de contorno NOESY do membranolídeo (51) (fração 33-E2), isolado da esponja <i>Darwinella</i> sp. (600 MHz, CDCl ₃).....	71

Figura A.12 Espectro de massas do membranolídeo (51) (fração 33-E2), isolado da esponja <i>Darwinella</i> sp.	72
Figura A. 13 Espectro de massas do membranolídeo (51) (fração 42-B), isolado da esponja <i>Darwinella</i> sp.	72
Figura A.14 Espectro no infravermelho do membranolídeo (51) (fração 33-E2), isolado da esponja <i>Darwinella</i> sp.	73
Figura A.15 Espectro no infravermelho do membranolídeo (51) (fração 42-B), isolado da esponja <i>Darwinella</i> sp.	74
Figura A.16 Espectro no ultravioleta do membranolídeo (51) (fração 33-E2), isolado da esponja <i>Darwinella</i> sp.	75
Figura A.17 Espectro no ultravioleta do membranolídeo (51) (fração 42-B), isolado da esponja <i>Darwinella</i> sp.	75
Figura A.18 Espectro de RMN- ¹ H do éster metílico da oxeatamida A (48) (fração 23-D3), isolado da esponja <i>Darwinella</i> sp. (600 MHz, CDCl ₃).	76
Figura A.19 Espectro de RMN- ¹ H do éster metílico da oxeatamida A (48) (fração 23-D3), isolado da esponja <i>Darwinella</i> sp. (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	77
Figura A.20 Espectro de RMN- ¹ H do éster metílico da oxeatamida A (48) (fração 13-B4), isolado da esponja <i>Darwinella</i> sp. (600 MHz, CDCl ₃).	78
Figura A.21 Espectro de RMN- ¹³ C do éster metílico da oxeatamida A (48) (fração 23-D3), isolado da esponja <i>Darwinella</i> sp. (600 MHz, CDCl ₃).	79
Figura A.22 Espectro de RMN- ¹³ C do éster metílico da oxeatamida A (48) (fração 23-D3), isolado da esponja <i>Darwinella</i> sp. (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).....	80
Figura A.23 Espectro de RMN- ¹³ C do éster metílico da oxeatamida A (48) (fração 13-B4), isolado da esponja <i>Darwinella</i> sp. (600 MHz, CDCl ₃).	81
Figura A.24 Mapa de contorno COSY do éster metílico da oxeatamida A (48) (fração 23-D3), isolado da esponja <i>Darwinella</i> sp. (600 MHz, CDCl ₃).....	82

Figura A.25 Mapa de contorno COSY do éster metílico da oxeatamida A (48) (fração 23-D3), isolado da esponja <i>Darwinella</i> sp. (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	83
Figura A.26 Mapa de contorno COSY do éster metílico da oxeatamida A (48) (fração 13-B4), isolado da esponja <i>Darwinella</i> sp. (600 MHz, CDCl ₃).	84
Figura A.27 Mapa de contorno HSQC do éster metílico da oxeatamida A (48) (fração 23-D3), isolado da esponja <i>Darwinella</i> sp. (600 MHz, CDCl ₃).	85
Figura A.28 Mapa de contorno HSQC do éster metílico da oxeatamida A (48) (fração 23-D3), isolado da esponja <i>Darwinella</i> sp. (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	86
Figura A.29 Mapa de contorno HSQC do éster metílico da oxeatamida A (48) (fração 13-B4), isolado da esponja <i>Darwinella</i> sp. (600 MHz, CDCl ₃).	87
Figura A.30 Mapa de contorno HMBC do éster metílico da oxeatamida A (48) (fração 23-D3), isolado da esponja <i>Darwinella</i> sp. (600 MHz, CDCl ₃).	88
Figura A.31 Mapa de contorno HMBC do éster metílico da oxeatamida A (48) (fração 23-D3), isolado da esponja <i>Darwinella</i> sp. (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆).	89
Figura A.32 Mapa de contorno HMBC do éster metílico da oxeatamida A (48) (fração 13-B4), isolado da esponja <i>Darwinella</i> sp. (600 MHz, CDCl ₃).	90
Figura A.33 Espectro de massas do éster metílico da oxeatamida A (48) (fração 23-D3), isolado da esponja <i>Darwinella</i> sp.	91
Figura A.34 Espectro de massas do éster metílico da oxeatamida A (48) (fração 13-B4), isolado da esponja <i>Darwinella</i> sp.	91
Figura A.35 Espectro no infravermelho do éster metílico da oxeatamida A (48) (fração 23-D3), isolado da esponja <i>Darwinella</i> sp.	92
Figura A.36 Espectro no ultravioleta do éster metílico da oxeatamida A (48) (fração 23-D3), isolado da esponja <i>Darwinella</i> sp.	92
Figura A.37 Espectro de RMN- ¹ H da oxeatamida H (52) (fração 24-B), isolada da esponja <i>Darwinella</i> sp. (600 MHz, CDCl ₃).	93

Figura A.38 Espectro de RMN- ¹³ C da oxeatamida H (52) (fração 24-B), isolada da esponja <i>Darwinella</i> sp. (600 MHz, CDCl ₃).....	94
Figura A.39 Mapa de contorno COSY da oxeatamida H (52) (fração 24-B), isolada da esponja <i>Darwinella</i> sp. (600 MHz, CDCl ₃).....	95
Figura A.40 Mapa de contorno HSQC da oxeatamida H (52) (fração 24-B), isolada da esponja <i>Darwinella</i> sp. (600 MHz, CDCl ₃).....	96
Figura A.41 Mapa de contorno HMBC da oxeatamida H (52) (fração 24-B), isolada da esponja <i>Darwinella</i> sp. (600 MHz, CDCl ₃).....	97
Figura A.42 Espectro de massas da oxeatamida H (52) (fração 24-B), isolada da esponja <i>Darwinella</i> sp.	98
Figura A.43 Espectro no infravermelho da oxeatamida H (52) (fração 24-B), isolada da esponja <i>Darwinella</i> sp.	98
Figura A.44 Espectro no ultravioleta da oxeatamida H (52) (fração 24-B), isolada da esponja <i>Darwinella</i> sp.	99
Figura A.45 Espectro de RMN- ¹ H da oxeatina (53) (fração 25-A81), isolada da esponja <i>Darwinella</i> sp. (600 MHz, CDCl ₃).....	100
Figura A.46 Espectro de RMN- ¹³ C da oxeatina (53) (fração 25-A81), isolada da esponja <i>Darwinella</i> sp. (600 MHz, CDCl ₃).....	101
Figura A.47 Mapa de contorno COSY da oxeatina (53) (fração 25-A81), isolada da esponja <i>Darwinella</i> sp. (600 MHz, CDCl ₃).....	102
Figura A.48 Mapa de contorno HSQC da oxeatina (53) (fração 25-A81), isolada da esponja <i>Darwinella</i> sp. (600 MHz, CDCl ₃).....	103
Figura A.49 Mapa de contorno HMBC da oxeatina (53) (fração 25-A81), isolada da esponja <i>Darwinella</i> sp. (600 MHz, CDCl ₃).....	104
Figura A.50 Mapa de contorno NOESY da oxeatina (53) (fração 25-A81), isolada da esponja <i>Darwinella</i> sp. (600 MHz, CDCl ₃).....	105

Figura A.51 Espectro de massas da oxeatina (53) (fração 25-A81), isolada da esponja *Darwinella* sp. 106

Figura A.52 Espectro no ultravioleta da oxeatina (53) (fração 25-A81), isolada da esponja *Darwinella* sp. 106

Figura A.1 Espectro de RMN-¹H do membranólídeo (**51**) (fração 33-E2), isolado da esponja *Darwinella* sp. (600 MHz, CDCl₃).

Figura A.2 Espectro de RMN-¹H do membranólídeo (**51**) (fração 42-B), isolado da esponja *Darwinella* sp. (600 MHz, CDCl₃).

Figura A.3 Espectro de RMN- ^{13}C do membranólido (**51**) (fração 33-E2), isolado da esponja *Darwinella* sp. (600 MHz, CDCl_3).

Figura A.4 Espectro de RMN- ^{13}C do membranolídeo (**51**) (fração 42-B), isolado da esponja *Darwinella* sp. (600 MHz, CDCl_3).

Figura A.5 Mapa de contorno COSY do membranolídeo (**51**) (fração 33-E2), isolado da esponja *Darwinella* sp. (600 MHz, CDCl_3).

Figura A.6 Mapa de contorno COSY do membranolídeo (**51**) (fração 42-B), isolado da esponja *Darwinella* sp. (600 MHz, CDCl₃).

Figura A.7 Mapa de contorno HSQC do membranolídeo (**51**) (fração 33-E2), isolado da esponja *Darwinella* sp. (600 MHz, CDCl_3).

Figura A.8 Mapa de contorno HSQC do membranolídeo (**51**) (fração 42-B), isolado da esponja *Darwinella* sp. (600 MHz, CDCl₃).

Figura A.9 Mapa de contorno HMBC do membranolídeo (**51**) (fração 33-E2), isolado da esponja *Darwinella* sp. (600 MHz, CDCl₃).

Figura A.10 Mapa de contorno HMBC do membranolídeo (**51**) (fração 42-B), isolado da esponja *Darwinella* sp. (600 MHz, CDCl₃).

Figura A.11 Mapa de contorno NOESY do membranolídeo (**51**) (fração 33-E2), isolado da esponja *Darwinella* sp. (400 MHz, CDCl₃).

33_e2 #1 RT: 0,01 AV: 1 NL: 6,35E8
T: FTMS + p ESI Full ms [300,00-450,00]

Figura A.12 Espectro de massas do membranolídeo (**51**) (fração 33-E2), isolado da esponja *Darwinella* sp.

42_b #1 RT: 0,00 AV: 1 NL: 8,32E7
T: FTMS + p ESI Full ms [300,00-350,00]

Figura A. 13 Espectro de massas do membranolídeo (**51**) (fração 42-B), isolado da esponja *Darwinella* sp.

Figura A.14 Espectro no infravermelho do membranólídeo (**51**) (fração 33-E2), isolado da esponja *Darwinella* sp.

Figura A.15 Espectro no infravermelho do membranólídeo (**51**) (fração 42-B), isolado da esponja *Darwinella* sp.

Figura A.16 Espectro no ultravioleta do membranólídeo (**51**) (fração 33-E2), isolado da esponja *Darwinella* sp.

Figura A.17 Espectro no ultravioleta do membranólídeo (**51**) (fração 42-B), isolado da esponja *Darwinella* sp.

Figura A.18 Espectro de RMN-¹H do éster metílico da oxeatamida A (**48**) (fração 23-D3), isolado da esponja *Darwinella* sp. (600 MHz, CDCl₃).

Figura A.19 Espectro de RMN-¹H do éster metílico da oxeatamida A (**48**) (fração 23-D3), isolado da esponja *Darwinella* sp. (600 MHz, DMSO-*d*₆).

Figura A.20 Espectro de RMN-1H do éster metílico da oxetamida A (**48**) (fração 13-B4), isolado da esponja *Darwinella* sp. (600 MHz, CDCl₃).

23-D3 CDC13

Figura A.21 Espectro de RMN- ^{13}C do éster metílico da oxetamida A (**48**) (fração 23-D3), isolado da esponja *Darwinella* sp. (600 MHz, CDCl_3).

Figura A.22 Espectro de RMN- ^{13}C do éster metílico da oxeatamida A (**48**) (fração 23-D3), isolado da esponja *Darwinella* sp. (600 MHz, DMSO- d_6).

Figura A.23 Espectro de RMN- ^{13}C do éster metílico da oxeatamida A (**48**) (fração 13-B4), isolado da esponja *Darwinella* sp. (600 MHz, CDCl_3).

Figura A.24 Mapa de contorno COSY do éster metílico da oxoatamida A (**48**) (fração 23-D3), isolado da esponja *Darwinella* sp. (600 MHz, CDCl₃).

Figura A.25 Mapa de contorno COSY do éster metílico da oxeatamida A (**48**) (fração 23-D3), isolado da esponja *Darwinella* sp. (600 MHz, DMSO- d_6).

Figura A.26 Mapa de contorno COSY do éster metílico da oxetamida A (**48**) (fração 13-B4), isolado da esponja *Darwinella* sp. (600 MHz, CDCl₃).

Figura A.27 Mapa de contorno HSQC do éster metílico da oxetamida A (**48**) (fração 23-D3), isolado da esponja *Darwinella* sp. (600 MHz, CDCl₃).

Figura A.28 Mapa de contorno HSQC do éster metílico da oxeatamida A (**48**) (fração 23-D3), isolado da esponja *Darwinella* sp. (600 MHz, DMSO- d_6).

Figura A.29 Mapa de contorno HSQC do éster metílico da oxetamida A (**48**) (fração 13-B4), isolado da esponja *Darwinella* sp. (600 MHz, CDCl_3).

Figura A.30 Mapa de contorno HMBC do éster metílico da oxoatamida A (**48**) (fração 23-D3), isolado da esponja *Darwinella* sp. (600 MHz, CDCl₃).

Figura A.31 Mapa de contorno HMBC do éster metílico da oxeatamida A (**48**) (fração 23-D3), isolado da esponja *Darwinella* sp. (600 MHz, DMSO- d_6).

Figura A.32 Mapa de contorno HMBC do éster metílico da oxoatamida A (**48**) (fração 13-B4), isolado da esponja *Darwinella* sp. (600 MHz, CDCl₃).

23_d3 #1 RT: 0,01 AV: 1 NL: 1,13E8
T: FTMS + p ESI Full ms [300,00-450,00]

Figura A.33 Espectro de massas do éster metílico da oxeatamida A (**48**) (fração 23-D3), isolado da esponja *Darwinella* sp.

13_b4 #1 RT: 0,01 AV: 1 NL: 2,28E6
T: FTMS + p ESI Full ms [380,00-430,00]

Figura A.34 Espectro de massas do éster metílico da oxeatamida A (**48**) (fração 13-B4), isolado da esponja *Darwinella* sp.

Figura A.35 Espectro no infravermelho do éster metílico da oxoatamida A (**48**) (fração 23-D3), isolado da esponja *Darwinella* sp.

Figura A.36 Espectro no ultravioleta do éster metílico da oxoatamida A (**48**) (fração 23-D3), isolado da esponja *Darwinella* sp.

Figura A.37 Espectro de RMN-¹H da oxeatamida H (**52**) (fração 24-B), isolada da esponja *Darwinella* sp. (600 MHz, CDCl₃).

Figura A.38 Espectro de RMN-¹³C da oxeatamida H (**52**) (fração 24-B), isolada da esponja *Darwinella* sp. (600 MHz, CDCl₃).

Figura A.39 Mapa de contorno COSY da oxeatamida H (**52**) (fração 24-B), isolada da esponja *Darwinella* sp. (600 MHz, CDCl_3).

Figura A.40 Mapa de contorno HSQC da oxeatamida H (**52**) (fração 24-B), isolada da esponja *Darwinella* sp. (600 MHz, CDCl₃).

Figura A.41 Mapa de contorno HMBC da oxeatamida H (**52**) (fração 24-B), isolada da esponja *Darwinella* sp. (600 MHz, CDCl₃).

24_b #1 RT: 0,00 AV: 1 NL: 8,22E7
T: FTMS + p ESI Full ms [320,00-380,00]

Figura A.42 Espectro de massas da oxoatamida H (**52**) (fração 24-B), isolada da esponja *Darwinella* sp.

Figura A.43 Espectro no infravermelho da oxoatamida H (**52**) (fração 24-B), isolada da esponja *Darwinella* sp.

Figura A.44 Espectro no ultravioleta da oxeatamida H (**52**) (fração 24-B), isolada da esponja *Darwinella* sp.

Figura A.45 Espectro de RMN- ^1H da oxeatina (**53**) (fração 25-A81), isolada da esponja *Darwinella* sp. (600 MHz, CDCl_3).

Figura A.46 Espectro de RMN-¹³C da oxeatina (**53**) (fração 25-A81), isolada da esponja *Darwinella* sp. (600 MHz, CDCl₃).

Figura A.47 Mapa de contorno COSY da oxeatina (**53**) (fração 25-A81), isolada da esponja *Darwinella* sp. (600 MHz, CDCl_3).

Figura A.48 Mapa de contorno HSQC da oxeatina (**53**) (fração 25-A81), isolada da esponja *Darwinella* sp. (600 MHz, CDCl₃).

Figura A.49 Mapa de contorno HMBC da oxeatina (**53**) (fração 25-A81), isolada da esponja *Darwinella* sp. (600 MHz, CDCl₃).

Figura A.50 Mapa de contorno NOESY da oxeatina (**53**) (fração 25-A81), isolada da esponja *Darwinella* sp. (600 MHz, CDCl_3)

25_a81 #1 RT: 0,01 AV: 1 NL: 1,05E8
T: FTMS + p ESI Full ms [300,00-450,00]

Figura A.51 Espectro de massas da oxeatina (**53**) (fração 25-A81), isolada da esponja *Darwinella* sp.

Figura A.52 Espectro no ultravioleta da oxeatina (**53**) (fração 25-A81), isolada da esponja *Darwinella* sp.

REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. 1 – 12, 2012. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0035671#pone-0035671-t013>>. Acesso em: 16 jul. 2014.

ANKISETTY, S.; AMSLER, C. D.; MCCLINTOCK, J. B.; BAKER, B. J. Further membranolid diterpenes from the antarctic sponge *Dendrilla membranosa*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 7, p. 1172–1174, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/np0340551>>. Acesso em: 8 out. 2015.

BALUNAS, M. J.; GROSSO, M. F.; VILLA, F. A.; ENGINE, N.; MCPHAIL, K. L.; TIDGEWELL, K.; PINEDA, L. M.; GERWICK, L.; SPADAFORA, C.; KYLE, D. E.; GERWICK, W. H. Coibacins A–D, antileishmanial marine cyanobacterial polyketides with intriguing biosynthetic origins. **Organic Letters**, v. 14, n. 15, p. 3878–3881, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/ol301607q>>. Acesso em: 2 nov. 2015.

COPP, B. R.; KAYSER, O.; BRUN, R.; KIDERLEN, A. F. Antiparasitic activity of marine pyridoacridone alkaloids related to the ascididemins. **Planta Medica**, v. 69, n. 6, p. 527–31, 2003. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/12865971>>. Acesso em: 3 nov. 2015.

DOWLE, K. O. **New nitrogenous spongian diterpenes from the new zealand marine sponge *Darwinella oxcata***. 2008. 120f. Thesis (Master in Chemistry). Victoria University of Wellington, Wellington, 2008.

DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE (DNDI). **Annual report 2014 partnerships to bridge innovation and access**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.dndi.org/flippable/annualreport2014/>>. Acesso em: 18 set. 2015.

EL SAYED, K. A.; MAYER, A. M. S.; KELLY, M.; HAMANN, M. T. The biocatalytic transformation of furan to amide in the bioactive marine natural product palinurin. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 64, n. 25, p. 9258–9260, 1999. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jo990539j>>. Acesso em: 10 nov. 2015.

FREITAS-JUNIOR, L. H.; CHATELAIN, E.; KIM, H. A.; SIQUEIRA-NETO, J. L. Visceral leishmaniasis treatment: what do we have, what do we need and how to deliver it? **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 11–19, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpddr.2012.01.003>>. Acesso em: 15 jul. 2015.

GRAY, C. A.; DE LIRA, S. P.; SILVA, M.; PIMENTA, E. F.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; HAJDU, E.; ANDERSEN, R. J.; BERLINCK, R. G. S. Sulfated meroterpenoids from the Brazilian sponge *Callyspongia* sp. are inhibitors of the antileishmaniasis target adenosine phosphoribosyl transferase. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 71, n. 23, p. 8685–90, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jo060295k>>. Acesso em: 3 nov. 2015.

HUA, H. M.; PENG, J.; FRONCZEK, F. R.; KELLY, M.; HAMANN, M. T. Crystallographic and NMR studies of anti-infective tricyclic guanidine alkaloids from the sponge *Monanchora unguifera*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 24, p. 6461–4, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089604007229>>. Acesso em: 3 nov. 2015.

IRELAND, R. E.; GRAND, P. S.; DICKERSON, R. E.; BORDNER, J.; RYDJESKI, D. R. Total synthesis of terpenes. XIV. Interpretation of the transmogrification of 4 β , 7 α -dimethyl-1 α -hydroxy-4 α -phenyl-4,5,6,7-tetrahydro-2-indanone by base. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 35, n. 3, p. 570–584, 1970. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jo00828a007>>. Acesso em: 11 set. 2015.

ISHIGAMI, S.-T.; GOTO, Y.; INOUE, N.; KAWAZU, S.-I.; MATSUMOTO, Y.; IMAHARA, Y.; TARUMI, M.; NAKAI, H.; FUSETANI, N.; NAKAO, Y. Cristaxenicin A, an antiprotozoal xenican diterpenoid from the deep sea gorgonian *Acanthoprimnoa cristata*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 77, n. 23, p. 10962–10966, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jo302109g>>. Acesso em: 2 nov. 2015.

KARUSO, P.; BERGQUIST, P.; CAMBIE, R.; BUCKLETON, J.; CLARK, G.; RICKARD, C. Terpenoid constituents of morphologically similar sponges in the family Aplysillidae. **Australian Journal of Chemistry**, v. 39, n. 10, p. 1643–1653, 1986a. Disponível em: <http://www.publish.csiro.au/view/journals/dsp_journal_fulltext.cfm?nid=51&f=CH9861643>. Acesso em: 8 out. 2015.

KARUSO, P.; BERGQUIST, P. R.; BUCKLETON, J. S.; CAMBIE, R. C.; CLARK, G. R.; RICKARD, C. E. F. 132,173-Cyclophorbide enol, the first porphyrin isolated from a sponge. **Tetrahedron Letters**, v. 27, n. 19, p. 2177–2178. 1986b. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040403900844809>>. Acesso em: 8 out. 2015.

KARUSO, P.; SKELTON, B.; TAYLOR, W.; WHITE, A. The constituents of marine sponges. I. The isolation from *Aplysilla Sulphurea* (Dendroceratida) of (1R*, 1'S*, 1'R*, 3R*)-1-acetoxy-4-ethyl-5-(1,3,3-trimethylcyclohexyl)-1,3-dihydroisobenzofuran-1'(4),3-carbolactone and the determination of its crystal structure. **Australian Journal of Chemistry**, v. 37, n. 5, p. 1081, 1984. Disponível em: <http://www.publish.csiro.au/view/journals/dsp_journal_fulltext.cfm?nid=51&f=CH9841081>. Acesso em: 8 out. 2015.

KAZLAUSKAS, R.; MURPHY, P.; WELLS, R.; NOACK, K.; OBERHANSLI, W.; SCHONHOLZER, P. A new series of diterpenes from australian *Spongia* species. **Australian Journal of Chemistry**, v. 32, n. 4, p. 867, 1979. Disponível em: <http://www.publish.csiro.au/view/journals/dsp_journal_fulltext.cfm?nid=51&f=CH9790867>. Acesso em: 10 out. 2015.

KERNAN, M. R.; FAULKNER, D. J. Sesterterpene sulfates from a sponge of the family Halichondriidae. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 53, n. 19, p. 4574–4578, 1988. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jo00254a030>>. Acesso em: 10 out. 2015.

KEYZERS, R. A.; NORTHCOTE, P. T.; DAVIES-COLEMAN, M. T. Spongian diterpenoids from marine sponges. **Natural Product Reports**, v. 23, n. 2, p. 321–334, 2006. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2006/np/b503531g>>. Acesso em: 23 nov. 2015.

KEYZERS, R. A.; NORTHCOTE, P. T.; ZUBKOV, O. A. Novel anti-inflammatory spongian diterpenes from the New Zealand marine sponge *Chelonaplysilla violacea*. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2004, n. 2, p. 419–425, 2004. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ejoc.200300551>>. Acesso em: 8 out. 2015.

KHAN, A. M.; DUTTA, P.; KHAN, S. A.; BARUAH, S. K.; RAJA, D.; KHOOND, K.; MAHANTA, J. Kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis, Assam, India. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 3, p. 487–489, 2014. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/20/3/13-0260_article>. Acesso em: 23 set. 2015.

KOSSUGA, M. H.; LIRA, S. P.; MCHUGH, S.; TORRES, Y. R.; LIMA, B. A.; GONÇALVES, R.; VELOSO, K.; FERREIRA, A. G.; ROCHA, R. M.; BERLINCK, R. G. S. Antibacterial modified diketopiperazines from two ascidians of the genus *Didemnum*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 4, p. 704–711, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532009000400014&lng=en&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 23 nov. 2015.

KOSSUGA, M. H.; NASCIMENTO, A. M.; REIMÃO, J. Q.; TEMPONE, A. G.; TANIWAKI, N. N.; VELOSO, K.; FERREIRA, A. G.; CAVALCANTI, B. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; MAYER, A. M. S.; HAJDU, E.; BERLINCK, R. G. S. Antiparasitic, antineuroinflammatory, and cytotoxic polyketides from the marine sponge *Plakortis angulospiculatus* collected in Brazil. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 3, p. 334–9, mar. 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/np0705256>>. Acesso em: 3 nov. 2015.

KOTB ELMAHALLAWY, E.; AGIL, A. Treatment of leishmaniasis: a review and assessment of recent research. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, n. 17, p. 2259–2275, 2015. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/ben/cpd/2015/00000021/00000017/art00013>>. Acesso em: 18 set. 2015.

MA, W. S.; MUTKA, T.; VESLEY, B.; AMSLER, M. O.; MCCLINTOCK, J. B.; AMSLER, C. D.; PERMAN, J. A.; SINGH, M. P.; MAIESE, W. M.; ZAWOROTKO, M. J.; KYLE, D. E.; BAKER, B. J. Norselic acids A-E, highly oxidized anti-infective steroids that deter mesograzers' predation, from the antarctic sponge *Crella* sp. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 10, p. 1842–6, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/np900382x>>. Acesso em: 3 nov. 2015.

MAKARIEVA, T. N.; RHO, J.-R. R.; LEE, H.-S. S.; SANTALOVA, E. A.; STONIK, V.; SHIN, J. New sesterterpene sulfates from the sponge *Darwinella australensis*. **Journal of natural products**, v. 66, n. 7, p. 1010–2, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/np030141p>>. Acesso em: 23 nov. 2015.

MAYOL, L.; PICCIALLI, V.; SICA, D. Metabolites from the marine sponge *Spongionella gracilis*. Three further nor-diterpenes, one of them based on a novel carbocyclic skeleton. **Tetrahedron**, v. 42, n. 19, p. 5369–5376, 1986. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040402001820871>>. Acesso em: 10 out. 2015.

MOLINSKI, T. F.; FAULKNER, D. J. Metabolites of the antarctic sponge *Dendrilla membranosa*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 52, n. 2, p. 296–298, 1987. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jo00378a031>>. Acesso em: 8 out. 2015.

ORHAN, I.; SENER, B.; KAISER, M.; BRUN, R.; TASDEMIR, D. Inhibitory activity of marine sponge-derived natural products against parasitic protozoa. **Marine Drugs**, v. 8, n. 1, p. 47–58, 2010. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1660-3397/8/1/47/htm>>. Acesso em: 3 nov. 2015.

PIMENTEL-ELARDO, S. M.; KOZYTSKA, S.; BUGNI, T. S.; IRELAND, C. M.; MOLL, H.; HENTSCHEL, U. Anti-parasitic compounds from *Streptomyces* sp. strains isolated from mediterranean sponges. **Marine Drugs**, v. 8, n. 2, p. 373–80, 2010. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1660-3397/8/2/373/htm>>. Acesso em: 3 nov. 2015.

PONTIUS, A.; KRICK, A.; KEHRAUS, S.; BRUN, R.; KÖNIG, G. M. Antiprotozoal activities of heterocyclic-substituted xanthenes from the marine-derived fungus *Chaetomium* sp. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 9, p. 1579–84, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/np800294q>>. Acesso em: 3 nov. 2015.

RAO, K. V.; KASANA, N.; WAHYUONO, S.; TEKWANI, B. L.; SCHINAZI, R. F.; HAMANN, M. T. Three new manzamine alkaloids from a common indonesian sponge and their activity against infectious and tropical parasitic diseases. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 8, p. 1314–1318, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/np0400095>>. Acesso em: 23 nov. 2015.

READY, P. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical Epidemiology**, v. 6, p. 147, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4014360&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 14 abr. 2015.

SANCHEZ, L. M.; LOPEZ, D.; VESELY, B. A.; DELLA TOGNA, G.; GERWICK, W. H.; KYLE, D. E.; LININGTON, R. G. Almiramides A-C: discovery and development of a new class of leishmaniasis lead compounds. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4187–97, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jm100265s>>. Acesso em: 3 nov. 2015.

SCALA, F.; FATTORUSSO, E.; MENNA, M.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O.; TIERNEY, M.; KAISER, M.; TASDEMIR, D. Bromopyrrole alkaloids as lead compounds against protozoan parasites. **Marine Drugs**, v. 8, n. 7, p. 2162–74, 2010. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1660-3397/8/7/2162/htm>>. Acesso em: 5 abr. 2014.

SHAPIRO, B. L.; GATTUSO, M. J.; HEPFINGER, N. F.; SHONE, R. L.; WHITE, W. L. Concerning the conformations of highly substituted cyclohexanones and derivatives. **Tetrahedron Letters**, v. 12, n. 3, p. 219–222, 1971. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040403901964020>>. Acesso em: 15 set. 2015.

SIMMONS, T. L.; ENGINE, N.; UREÑA, L. D.; ROMERO, L. I.; ORTEGA-BARRÍA, E.; GERWICK, L.; GERWICK, W. H. Viridamides A and B, lipodepsipeptides with antiprotozoal activity from the marine cyanobacterium *Oscillatoria nigro-viridis*. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 9, p. 1544–50, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/np800110e>>. Acesso em: 3 nov. 2015.

SMITH, M. B.; MARCH, J. **March's advanced organic chemistry**. 6th. ed. Hoboken. John Wiley, 2007. p. 1580-1585.

TEMPONE, A. G.; MARTINS DE OLIVEIRA, C.; BERLINCK, R. G. S.; OLIVEIRA, C. M.; BERLINCK, R. G. S. Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. **Planta Medica**, v. 77, n. 6, p. 572–85, 2011. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/21243582>>. Acesso em: 23 nov. 2015.

UEOKA, R.; NAKAO, Y.; KAWATSU, S.; YAEHASHI, J.; MATSUMOTO, Y.; MATSUNAGA, S.; FURIHATA, K.; VAN SOEST, R. W. M.; FUSETANI, N. Gracilioethers A-C, antimalarial metabolites from the marine sponge *Agelas gracilis*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 74, n. 11, p. 4203–7, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jo900380f>>. Acesso em: 3 nov. 2015.

VIK, A.; PROSZENYÁK, A.; VERMEERSCH, M.; COS, P.; MAES, L.; GUNDERSEN, L.-L. Screening of agelasine D and analogs for inhibitory activity against pathogenic protozoa; identification of hits for visceral leishmaniasis and Chagas disease. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 14, n. 1, p. 279–288, 2009. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/14/1/279>>. Acesso em: 3 nov. 2015.

WENKERT, E.; AFONSO, A.; BEAK, P.; CARNEY, R. W. J.; JEFFS, P. W.; MCCHESENEY, J. D. The proton magnetic resonance spectral characteristics of tricyclic diterpenic substances. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 30, n. 3, p. 713–722, 1965. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jo01014a014>>. Acesso em: 11 set. 2015.

WOJNAR, J. M. **Isolation of new secondary metabolites from new zealand marine invertebrates**. 2008. p. 280. These (Doctor of Philosophy in Chemistry). Victoria University of Wellington, Wellington, 2008.

WOJNAR, J. M.; DOWLE, K. O.; NORTHCOTE, P. T.; WOJNAR, J. M.; DOWLE, K. O.; NORTHCOTE, P. T. The oxeatamides: nitrogenous spongian diterpenes from the New Zealand marine sponge *Darwinella oxeata*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 77, n. 10, p. 2288–2295, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/np500549g>>. Acesso em: 23 nov. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Post-kala-azar dermal leishmaniasis: a manual for case management and control**. [s.l.: s.n.]. 2012. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/78608/1/9789241505215_eng.pdf>. Acesso em: 23 set. 2015.