UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

MARIO FERREIRA CONCEIÇÃO SANTOS

**Alcaloides guanidínicos da esponja marinha *Monanchora arbuscula*:
Isolamento, identificação e atividades biológicas**

Orientador: Roberto Gomes de Souza Berlinck

São Carlos-SP

2014

MARIO FERREIRA CONCEIÇÃO SANTOS

**Alcaloides guanidínicos da esponja marinha *Monanchora arbuscula*:
Isolamento, identificação e atividades biológicas**

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em ciências. Área de concentração: Química Orgânica e Biológica.

São Carlos-SP

2014

Dedico esta tese...

À minha mãe Maria Regina, à minha Irmã Roseana e a Josétima.

E à toda a minha família, tios, tias primos, primas...etc...

Agradeço.....

À Deus.

À minha mãe e toda minha família.

Ao Instituto de Química de São Carlos da USP pela disponibilidade do espaço físico para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck pela orientação e paciência.

Aos professores da banca examinadora que aceitaram o convite para avaliar a tese.

Ao Prof. Dr. Antonio Ferreira Pereira (Instituto de Microbiologia, UFRJ) pelos testes de atividade ATPásica.

Ao Dr. André Tempone (Instituto Adolfo Lutz) pela realização dos ensaios de atividade antiparasitária.

Ao Prof. Dr. Mozart Marins (Unidade de Biotecnologia, UNAERP) pela realização dos ensaios de atividade antifúngica.

Ao Prof^a. Clarice Arns (IB, UNICAMP) pela realização dos ensaios de atividade antiviral.

Ao Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira (DQ, UFSCar), aos Drs. David E. Williams e Raymond J. Andersen (University of British Columbia, Canada), à Dr. Miguel Agostinho e ao Msc. André Luiz Tognon da Central de Análises Químicas Instrumental-IQSC, pelas obtenções dos espectros de RMN.

Ao Prof. Daniel Cardoso (IQSC-USP) e ao Prof. Edson R. Filho (DQ-UFSCAR) pela obtenção dos espectros de alta resolução (HRMS) e MS/MS.

Aos Doutores Philip M. Harper e Patrick J. Murphy (School of Chemistry, Bangor University) pela síntese total da arbusculidina.

À Fabiana Rodrigues e à Karin Camargo pela convivência e colaboração no laboratório.

À Raquel Urano, Avelardo, Karen e a todos os colegas e amigos do laboratório de Química Orgânica de Sistemas Biológicos.

À Josétima pelo apoio nesses poucos meses em que nos conhecemos.

À CAPES pela bolsa concedida.

“Depende de você, lutar, trabalhar, acreditar que você pode e ir até o final.”

(Ayrton Senna)

"O insucesso é apenas uma oportunidade para recomeçar de novo com mais inteligência".

(Henry Ford)

Volume 1

Sumário

Lista de figuras	i
Lista de tabelas	vi
Lista de abreviaturas e símbolos	vii
Resumo	ix
Abstract	x
CAPÍTULO I. Alcaloides guanidínicos	1
1.1. Definição, propriedades e biogênese	1
1.2. Alcaloides guanidínicos isolados de invertebrados marinhos	2
1.3. Esponjas do gênero <i>Monanchora</i>	6
1.4. Referências	8
CAPÍTULO II. Objetivos	9
2.1. Objetivos gerais	9
2.2. Objetivos específicos:	9
CAPÍTULO III. Parte experimental	10
3.1. Materiais, instrumentos e reagentes utilizados	10
3.1.1. Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)	10
3.1.2. Cromatografia em coluna (CC)	10
3.1.3. Adsorventes poliméricos	10
3.1.4. Reagente utilizado	10
3.1.5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	10
3.1.6. Colunas para cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	11
3.1.7. Espectrometria de massas de alta resolução e MS/MS	11

3.1.8. Evaporação dos solventes	12
3.1.9. Solventes utilizados	12
3.1.10. Polarímetro	12
3.1.11. Ressonância Magnética Nuclear	12
3.2. Procedimentos utilizados nos bioensaios.....	13
3.2.1. Atividade antifúngica.....	13
3.2.1.1. Isolamento e identificação do fungo aflatoxinogênico <i>Aspergillus flavus</i>	13
3.2.1.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	13
3.2.1.3. Concentração Fungicida Mínima (CFM)	14
3.2.2. Atividade antiviral.....	14
3.2.2.1. Vírus e Cultivo Celular	14
3.2.2.2. Titulação Viral	14
3.2.2.3. Determinação da concentração máxima não tóxica para células	15
3.2.2.4. Ensaio Antiviral	15
3.2.2.5. Análise dos resultados dos testes de atividade antiviral	16
3.2.2.6. Ensaio da inibição da adsorção viral	17
3.2.2.7. Ensaio da inibição da penetração viral	17
3.2.2.8. Inibição da produção de partículas virais	17
3.2.2.9. Análise estatística	17
3.2.3. Atividade leishmanicida e triponossomicida	18
3.2.3.1. Alteração da permeabilidade da membrana de <i>Leishmania</i>	18
3.2.3.2. Modificação dos parâmetros bioenergéticos de <i>Leishmania infantum</i>	18
3.2.3.3. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial.....	18
3.2.3.4. Determinação da IC ₅₀ de compostos puros em promastigotas.	18
3.2.3.5. Atividade contra as tripomastigotas de <i>Trypanossoma cruzi</i>	19
3.2.3.6. Toxicidade <i>in vitro</i>	19
3.2.4. Atividade de inibição ATPásica	19
3.2.4.1. Cepas mutantes utilizadas	19

3.2.4.2. Condições de crescimento	20
3.2.4.3. Isolamento de membrana plasmática de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
3.2.4.4. Medida da atividade ATPásica da Pdr5p	20
3.2.4.5. Quimiossensibilização das substâncias purificadas	21
3.3. Fracionamento cromatográfico do extrato bruto de <i>M. arbuscula</i>	21
3.3.1. Desreplicação da fração Ma100H ₂ O	25
3.3.2. Desreplicação da fração Ma50%MeOH	27
3.3.3. Desreplicação da fração Ma100MeOH	29
3.4. Estratégias de separação	31
3.5. Referências.....	36
CAPÍTULO IV- Estudo químico da fração Ma100H₂O: crambescinas e derivados	38
4.1. Definição, propriedades e atividades biológicas das crambescinas	38
4.2. Estudo químico da fração Ma100H ₂ O	40
4.2.1. Identificação da arbusculidinina (1).....	43
4.3. Referências.....	50
CAPÍTULO V. Estudo químico da fração Ma50MeOH: crambescidinas e derivados	51
5.1. Definição, propriedades e atividades biológicas das crambescidinas.....	51
5.2. Estudo químico da fração Ma50MeOH	55
5.2.1. Fracionamento da fração Ma5Me-2	56
5.2.2. Isolamento dos constituintes químicos da subfração Ma5Me-3F	58
5.2.3. Identificação da fromiamicalina (2)	60
5.2.4. Isolamento dos constituintes químicos da subfração Ma5Me-3G.....	65
5.2.5. Identificação da crambescidina 800 (3).....	68
5.3. Referências.....	70
CAPÍTULO VI. Estudo químico da fração Ma50MeOH: ptilocaulinas, mirabilinas e derivados.....	72

6.1. Ptilocaulinas, mirabilinas e derivados.....	72
6.2. Estudo químico da subfração Ma5Me-4 obtida de Ma50MeOH	74
6.2.1. Identificação da arbusculidina (4)	76
6.3. Referências.....	81
CAPÍTULO VII. Estudo químico da fração Ma100MeOH: batzelladinas e derivados	82
7.1. Definição, propriedades e atividades biológicas das batzelladinas	82
7.2. Estudo químico da fração Ma100 MeOH	84
7.2.1. Isolamento da norbatzelladina L (5), batzelladina L (6), batzelladina F (7), e batzellamida A (8) a partir da fração Ma100Me-1	85
7.2.2. Identificação da batzellamida A (8)	90
7.2.3. Identificação da norbatzelladina L (5), da batzelladina L (6), e da batzelladina F (7)	101
7.2.4. Isolamento e identificação do Δ^{19} -hemibatzelladeno J (9), do Δ^{20} -hemibatzelladeno J (10), da hemibatzelladina J (11) e da batzelladina D (12)	110
7.2.5. Identificação da hemibatzelladina J (11)	115
7.2.6. Identificação do Δ^{19} -hemibatzelladeno J (9) e do Δ^{20} -hemibatzelladeno J (10).....	119
7.2.7. Identificação da batzelladina D (12).....	126
7.3. Referências.....	129
CAPÍTULO VIII. Atividades biológicas dos alcaloides majoritários isolados do extrato de <i>Monachora arbuscula</i>.....	130
8.1. Ensaio biológico	130
8.2. Atividade antiviral da norbatzelladina L (5) contra o Herpesvírus simplex	131
8.3. Atividade antifúngica da batzelladina L (6)	133
8.4. Atividades leishmanicida e triponossomicida	135
8.5. Atividade de inibição ATPásica	139
8.6. Referências.....	142
CAPÍTULO IX. Conclusões	145

Lista de figuras

Figura 1. Grupo guanidina presente nos diversos alcaloides guanidínicos.....	1
Figura 2. Pulchranina A e derivados.....	2
Figura 3. Rota biossintética da anatoxina-a (s) partir da arginina.	2
Figura 4. Tubastrina (1) e ortidinas (2-4).	3
Figura 5. Leptoclinidamina A (5) e aplisinopsina (6).	4
Figura 6. Oroidina (7), himenidina (8) e dispacamida B (9).	4
Figura 7. Alcaloides bromotirosínicos e peptídeos guanidínicos isolados de invertebrados marinhos.....	5
Figura 8. Alcaloides guanidínicos isolados de esponjas das ordens Poecilosclerida e Axinellida.	5
Figura 9. Detalhe da superfície da <i>Monanchora arbuscula</i> , fotografada no Farol da Barra, Salvador- BA por E. Hajdu, 1989.	6
Figura 10. Fluxograma de obtenção das frações MeOH e hexânica do extrato de <i>M. arbuscula</i>	22
Figura 11. Fluxograma de obtenção das frações: 100% H ₂ O, MeOH/H ₂ O 1/1 e 100% MeOH.	24
Figura 12. Cromatografia em camada delgada das frações Ma100H ₂ O, Ma50MeOH, Ma100MeOH do extrato bruto de <i>M. arbuscula</i>	24
Figura 13. Cromatograma HPLC-PDA-ELS-MS da fração Ma100H ₂ O. Coluna C ₈ -3, fluxo de 1mL/min., e um gradiente curto de 45:55 a 70:30 H ₂ O:MeOH em 0,1% de TFA durante 37min.: A -Cromatograma HPLC-ELSD; B -Cromatograma HPLC-PDA; C -Espectros no UV; D -Cromatograma HPLC-MS; E -Espectros de massas.....	26
Figura 14. Cromatograma HPLC-UV-ELSD da fração Ma50MeOH. Coluna C ₈ -3, fluxo de 1mL/min., e um gradiente curto de 40:60: a 30:70 H ₂ O:MeOH em 0,1% de TFA durante 37min.: A -Cromatograma HPLC-ELSD; B -Cromatograma HPLC-PDA em 210 nm; C -Cromatograma HPLC-PDA em 254 nm; D -Espectros no UV	27
Figura 15. Cromatograma HPLC-MS da fração Ma50MeOH. Coluna C ₈ -3, fluxo de 1mL/min., e um gradiente curto de 30:70 a 15:85 H ₂ O:MeOH em 0,1% de TFA durante 37min.: A -Cromatograma HPLC-MS; B -Espectros de massas.....	28
Figura 16. Cromatograma HPLC-MS da fração Ma100MeOH. Coluna C ₈ -3, fluxo de 1mL/min., e um gradiente curto de 40:60: a 30:70 H ₂ O:MeOH em 0,1% de TFA durante 37min.: A -Cromatograma HPLC-MS; B -Espectros de massas.....	30
Figura 17. Interferentes frequentemente encontrados em extratos brutos e/ou frações, subfrações de extrato de invertebrados marinhos.....	32
Figura 18. Metabólitos tipicamente presentes nas frações do extrato bruto de <i>M. arbuscula</i> .	33

Figura 19. Estrutura da sílica-gel derivatizada com grupos diol, utilizada para separação por cromatografia em coluna de frações do extrato de <i>M. arbuscula</i> .	33
Figura 20. Alcaloides guanidínicos da família das crambescinas.	38
Figura 21. Fluxograma do fracionamento da fração Ma100H ₂ O.	40
Figura 22. Cromatograma HPLC-UV da subfração MaH-3C, usando coluna Ph-3; 1mL/min., e gradiente 70:30 a 55:45 de H ₂ O:MeCN com 0,1%TFA durante 37 min.	41
Figura 23. Cromatograma HPLC- MS do composto 1 , usando coluna C ₈ -3; Fluxo 1mL/min., Eluente: gradiente de 80:20: a 0:100 H ₂ O:MeOH com 0,1% de TFA durante 35 min.	41
Figura 24. Fluxograma da purificação da subfração MaH-3C1.	42
Figura 25. Estrutura da arbusculidinina (1).	43
Figura 26. Subestruturas A e B do composto 1 .	44
Figura 27. Subestruturas C e D do composto 1 .	44
Figura 28. Correlações observadas no mapa de contorno gHMBC.	45
Figura 29. Correlações observadas no mapa de contorno ¹⁵ NlrHMQC.	45
Figura 30. Esquema da síntese da arbusculidinina (1).	46
Figura 31. Possível rota biossintética da arbusculidinina (1).	47
Figura 32. Comparação entre a crambescina A1 e a arbusculidinina (1).	48
Figura 33. Ptilomicalina A, alcaloide guanidínico pertencente à família das crambescidinas.	51
Figura 34. Alcaloides guanidínicos da família das crambescidinas.	52
Figura 35. Ptilomicalina A: alcaloide guanidínico pertencente à família das crambescidinas.	53
Figura 36. Ptilomicalina A alcaloide guanidínico pertencente à família das crambescidinas.	54
Figura 37. Fluxograma do fracionamento da fração Ma50MeOH.	55
Figura 38. Fluxograma do fracionamento da fração Ma5Me-2.	57
Figura 39. Fluxograma da obtenção do composto 2 .	58
Figura 40. Cromatograma HPLC-ELSD da fração Ma5Me-3F.	59
Figura 41. Cromatograma HPLC-MS e espectro de massas da fromiamicalina. Coluna C ₈ -3; Fluxo 1 mL/min.; Eluente: gradiente curto de 40:60 a 75:25, H ₂ O:MeOH com 0,1% de TFA durante 37min.	59
Figura 42. Estrutura da fromiamicalina.	60
Figura 43. Correlações essenciais observadas nos espectros gCOSY e gHMBC da fromiamicalina.	62
Figura 44. Íons fragmentos observados pela análise HRESIMS/MS da fromiamicalina.	63

Figura 45. Fluxograma da obtenção do composto 3	65
Figura 46. Cromatogramas HPLC-ELSD da fração Ma5Me-3G (A e B) e da crambescidina 800 (C). Condições de separação: coluna C ₈ -3; Fluxo 1 mL/min.: A -gradiente de 90:10: a 0:100 H ₂ O:MeOH com 0,1% de TFA durante 22 min.; B -gradiente curto de 40:60: a 30:70 H ₂ O:MeOH com 0,1% de TFA durante 37min.; C - gradiente de 90:10: a 0:100 H ₂ O:MeOH com 0,1% de TFA durante 22 min.....	67
Figura 47. Estrutura da crambescidina 800 (3).....	68
Figura 48. Alcaloides guanidínicos tricíclicos: ptilocaulinas, mirabilinas e netaminas.	73
Figura 49. Cromatograma HPLC-MS da fração subfração Ma5Me-4. Condições de análise: coluna C ₈ -3; Fluxo de 1mL/min.; gradiente curto de 50:50 a 70:30 H ₂ O/MeOH com 0,1% de TFA durante 37min: A -Cromatograma HPLC-MS; B -Espectros de massas.	74
Figura 50. Fluxograma da purificação da subfração Ma5Me-4D.	75
Figura 51. Estrutura da arbusculidina (4).	76
Figura 52. Subestruturas A e B da arbusculidina (4).....	77
Figura 53. Subestruturas C da arbusculidina (4).	77
Figura 54. Algumas correlações observadas no gCOSY e gHMBC.	78
Figura 55. Comparação entra a ptilocaulina e arbusculidina (4).....	79
Figura 56. Alcaloides guanidínicos da família das batzelladinas.	83
Figura 57. Fluxograma do fracionamento da fração Ma100MeOH.	84
Figura 58. Fluxograma de isolamento das batzelladinas nor-L (5) e L (6).	85
Figura 59. Fluxograma de isolamento da batzelladina F (7).	87
Figura 60. Fluxograma de isolamento da batzellamida A (8).	88
Figura 61. Cromatograma HPLC-UV-ELSD-MS da fração Ma1Me-1A7-A. Coluna Inertsil C ₈ -4; Fluxo: 0,8 mL/min.; Eluente: gradiente curto de 35:65: a 25:75 H ₂ O:MeOH com 0,1% de TFA durante 37 min. A -Detecção por ELSD; B -Cromatograma HPLC-UV; C - Cromatograma HPLC-MS.	89
Figura 62. Estrutura da batzellamida A (8).	90
Figura 63. Subestrutura A da batzellamida A (8).	91
Figura 64. Subestrutura B da batzellamida A (8).....	91
Figura 65. Subestrutura C da batzellamida A (8).	92
Figura 66. Algumas correlações observadas nos espectros gCOSY e gHMBC.	93
Figura 67. Correlações observadas no mapa de contorno ¹⁵ NlrHMQC (DMSO- <i>d</i> ₆)	93
Figura 68. Acoplamentos NOE observados para a batzellamida A (8).....	94

Figura 69. Comparação dos sinais de menor deslocamento química observados nos espectros de RMN de ^1H em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, $\text{MeOH}-d_4$ e $\text{DMSO}-d_6$, da batzellamida A (8).	96
Figura 70. Comparação estrutural entre a batzelladina L (6) e a batzellamida A (8).	97
Figura 71. Estrutura da norbatzelladina L (5).	101
Figura 72. Rearranjo de McLafferty observado para as batzelladinas.	102
Figura 73. Fragmentação por MS/MS da norbatzelladina L (5).	103
Figura 74. Estrutura da batzelladina L (6).	103
Figura 75. Fragmentação por MS/MS da batzelladina L (6).	104
Figura 76. Estrutura da batzelladina F (7).	105
Figura 77. Fragmentação por MS/MS da batzelladina F (7).	106
Figura 78. Cromatograma HPLC-UV da subfração Ma1Me-1A2A. Condições: coluna Inertsil C_8 -4; Fluxo de 0,8 mL/min.; Eluente: 80:20 $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$	110
Figura 79. Cromatograma HPLC-UV-MS da subfração Ma1Me-1A2A-1. Condições cromatográficas: coluna Inertsil C_8 -4; Fluxo de 0,8 mL/min.; Eluente: 80:20 $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$: A -Cromatograma HPLC-UV (detecção em λ_{max} 300 nm); B -Cromatograma HPLC-MS.	111
Figura 80. Cromatograma HPLC-UV-MS da subfração Ma1Me-1A2A-2. Condições cromatográficas: coluna Inertsil C_8 -4; Fluxo de 0,8 mL/min.; Eluente: 80:20 $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$: A -Cromatograma HPLC-UV (detecção em λ_{max} 300 nm); B -Cromatograma HPLC-MS.	111
Figura 81. Fluxograma do isolamento dos compostos Δ^{19} -hemibatzelladeno J (9), do Δ^{20} -hemibatzelladeno J (10) e da hemibatzelladina J (11).	113
Figura 82. Fluxograma do isolamento da hemibatzelladina J (12).	114
Figura 83. Estrutura da hemibatzelladina J (11).	115
Figura 84. Subestrutura A da hemibatzelladina J (11).	116
Figura 85. Subestrutura B da hemibatzelladina J (11).	116
Figura 86. Subestrutura C da hemibatzelladina J (11).	117
Figura 87. Correlações-chave da hemibatzelladina J (11) observadas nos espectros gCOSY e gHMBC	117
Figura 88. Comparação entre a batzelladina J e a hemibatzelladina J (11).	118
Figura 89. Acoplamentos NOE observados para a hemibatzelladina J (11).	118
Figura 90. Estruturas dos compostos 9 e 10	119
Figura 91. Correlações observadas no espectro gCOSY dos compostos 9 e 10	120
Figura 92. Correlações observadas no espectro gHMBC dos compostos 9 e 10	120
Figura 93. Correlações observadas no espectro gHMBC do composto 9	121

Figura 94. Correlações observadas no espectro gHMBC do composto 10	121
Figura 95. Comparação dos espectros de RMN de ^1H em $\text{MeOH-}d_4$ e $\text{DMSO-}d_6$, da mistura de alcaloides isoméricos 9 e 10	122
Figura 96. Acoplamentos NOE observado para os composto (9) e (10).	122
Figura 97. Estrutura da batzelladina D (12).	126
Figura 98. Fragmentação por MS/MS da batzelladina D (12).	127
Figura 99. Compostos utilizados nos testes biológicos.	130
Figura 100. Alcaloides guanidínicos e derivados da guanidina isolados da esponja <i>Monachora arbuscula</i> durante a execução do projeto.	146

Lista de tabelas

Tabela 1. Dados de RMN de ^{13}C / ^{15}N e ^1H da arbusculidina (1) em $\text{DMSO}-d_6$	49
Tabela 2. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da fromiamicalina (2) em $\text{MeOH}-d_4$ (J em Hz)	64
Tabela 3. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da crambescidina 800 (3) em $\text{MeOH}-d_4$	69
Tabela 4. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da arbusculidina (4) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (J em Hz).....	80
Tabela 5. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da batzellamida A (8) em $\text{MeOH}-d_4$ (J em Hz)	98
Tabela 6. Dados de RMN de $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ e ^1H da batzellamida A (8) em $\text{DMSO}-d_6$	99
Tabela 7. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da batzellamida A (8) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (J em Hz)	100
Tabela 8. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da norbatzelladina L (5) em $\text{MeOH}-d_4$	107
Tabela 9. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da batzelladina L (6) em $\text{MeOH}-d_4$ (J em Hz).....	108
Tabela 10. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da batzelladina F (7) em $\text{MeOH}-d_4$ (J em Hz).....	109
Tabela 11. Dados de RMN de ^{13}C (150 MHz) e ^1H (600 MHz) do Δ^{19} -hemibatzelladeno J (9) e do Δ^{20} -hemibatzelladeno J (10) em $\text{MeOH}-d_4$ (J em Hz).....	123
Tabela 12. Dados de RMN de ^{13}C (150 MHz) e ^1H (600 MHz) do Δ^{19} -hemibatzelladeno J (9) e do Δ^{20} -hemibatzelladeno J (10) em $\text{DMSO}-d_6$ (J em Hz).....	124
Tabela 13. Dados de RMN de $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ e ^1H da hemibatzelladina J (11) em $\text{DMSO}-d_6$	125
Tabela 14. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da batzelladina D (12) em $\text{MeOH}-d_4$ (J em Hz)	128
Tabela 15. Atividade antiviral do extrato bruto de <i>M. arbuscula</i> e da norbatzelladina L frente ao vírus HSV-1	132
Tabela 16. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (MFC) em $\mu\text{g/mL}$ contra <i>A.flavus</i> isolados de amendoim, <i>A.flavus</i> ATCC9643 (linhagem controle produtora de aflatoxinas).	134
Tabela 17. Atividades leishmanicida, triponossomicida e citotoxicidade dos alcaloides guanidínicos 5-7 e 12.....	137
Tabela 18. Atividades leishmanicida, triponossomicida e citotoxicidade da arbusculidina (1) sintética	138
Tabela 19. Atividade de inibição da ATPase e quimiossensibilização da norbatzelladina L (5), da batzelladina L (6) e da batzelladina D (12)	140

Lista de abreviaturas e símbolos

δ	deslocamento químico
μ	micro
MeCN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de Etila
C ₁₈	Sílica gel derivatizada com grupos octadecilsilil
C ₈	Sílica gel derivatizada com grupos octil
CC	Cromatografia em Coluna
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
HPLC-PDA-ELSD-MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detectores em Arranjo de Diodos, espalhamento de luz evaporativo e espectrômetro de massas
HPLC-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector em ultra violeta
d	dublete
DCM	diclorometano
dd	duplo dublete
ddd	duplo-duplo-dublete
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
ES	Electrospray
<i>g</i> COSY	Gradient Correlated Spectroscopy
<i>g</i> HMBC	Gradient Heteronuclear Multiple Bond Coherence
<i>g</i> HMQC	Gradient Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HEX	Hexano
<i>j</i>	constante de acoplamento

m	multiplete
m/z	relação massa carga
MeOH	Metanol
min.	minutos
MS	Mass Spetrometry
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
q	quarteto
RMN ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
t_1 ROESY	Transverse Rotating-frame Overhauser Enhancement Spectroscopy
s	singleto
t	tripleto
UV	Ultra Violeta

Resumo

Este trabalho descreve o isolamento e a determinação estrutural de doze alcaloides guanidínicos, bem como a avaliação das atividades biológicas dos alcaloides majoritários. Os alcaloides descritos foram isolados a partir do extrato bruto de esponja marinha *Monanchora arbuscula*, coletada em Cabo Frio, no litoral do Rio de Janeiro. A amostra de esponja foi seca em liofilizador e extraída com MeOH. O extrato MeOH foi particionado com hexano, obtendo-se um extrato MeOH rico em alcaloides. Esse extrato foi sucessivamente fracionado obtendo-se os compostos arbusculidinina (**1**) (inérita na literatura), fromiamicalina (**2**), crambescidina 800 (**3**), arbusculidina (**4**) (inérita na literatura), batzelladinas L (**6**), F (**7**), D (**12**), norbatzelladina L (**5**), batzellamida A (**8**) (inérita na literatura), hemibatzelladina J (**9**) (inérita na literatura), Δ^{19} -hemibatzelladeno J (**10**) (inérito na literatura), Δ^{20} -hemibatzelladeno J (**11**) (inérito na literatura). As estruturas foram determinadas por análise detalhada dos seus espectros de RMN e espectrometria de massas. As batzelladinas majoritárias isoladas neste trabalho foram avaliadas em diferentes testes biológicos de atividade antiviral, antifúngica, antiparasitária e de atividade ATPásica apresentando resultados promissores. A batzelladina L (**6**) apresentou potente atividade leishmanicida e antifúngica, enquanto que a norbatzelladina L (**5**) apresentou potente atividade tripanossomicida e antiviral.

Abstract

This work describes the isolation of twelve guanidine alkaloids and the biological activities of the major alkaloids. The alkaloids were isolated from the marine sponge *Monanchora arbuscula*, collected in Cabo Frio, Rio de Janeiro. The sponge sample freeze-dried, and extracted with MeOH. The MeOH extract was defatted with hexane, providing an alkaloids-rich extract. The extract was exhaustively fractionated to yield arbusculidinine (1), fromiamycalin (2), crambescidin 800 (3), arbusculidine (4), batzelladines L (6), F (7), D (12), norbatzelladine L (5), batzellamide A (8), J hemibatzelladine (9), Δ^{19} -hemibatzelladene J (10), Δ^{20} -hemibatzelladene J (11). Their structures were established by analysis of NMR and MS data. The major compounds isolated were submitted to several biological assays as antiviral, antifungal, antiparasitic and inhibition of ATPase activity. Batzelladine L (6) showed potent leishmanicidal and antifungal activity, while norbatzelladine L (5) showed powerful antiviral and antitripanosomal activity.

CAPÍTULO I. Alcaloides guanidínicos

1.1. Definição, propriedades e biogênese

Os alcaloides guanidínicos apresentam diferentes arranjos policíclicos e acíclicos, sendo que a presença do núcleo guanidina torna estas substâncias peculiares frente às suas propriedades químicas. O grupo guanidina apresenta pKa igual a 12, e imprime um caráter fortemente básico e hidrofílico a estes metabólitos. Essas características tornam essa classe de compostos extremamente difíceis de serem separados quando em misturas (BERLINCK, 1994).

Figura 1. Grupo guanidina presente nos diversos alcaloides guanidínicos.

É possível que a pulchranina A e derivados (**Figura 2**), ou o aminoácido arginina (**Figura 3**), sejam os precursores biossintéticos destas substâncias, formando alcaloides nos quais o grupo guanidina participa de sistemas penta ou tricíclicos, bem como formando grupos guanidínicos livres (HEMSCHEIDT *et al.*, 1995; GUZII *et al.*, 2013; MAKARIEVA *et al.*, 2013),

Figura 2. Pulchranina A e derivados.

Figura 3. Rota biossintética da anatoxina-a (s) partir da arginina.

Os alcaloides guanidínicos são isolados a partir dos mais variados tipos de organismos, de origem terrestre quanto marinha, como plantas, micro-organismos e invertebrados marinhos e apresentam potentes atividades biológicas (BERLINCK, TRINDADE-SILVA e SANTOS, 2012).

1.2. Alcaloides guanidínicos isolados de invertebrados marinhos

No ambiente marinho estes metabólitos são produzidos e/ou acumulados por uma grande variedade de invertebrados (EBADA e PROKSCH, 2011). Frequentemente estes metabólitos apresentam várias atividades farmacológicas, tais como

antimicrobiana, antiproliferativa, analgésica e propriedades anticoagulantes (BERLINCK, TRINDADE-SILVA e SANTOS, 2012).

A tubastrina (1) isolada do coral *Tubastraea aurea* exibiu atividade contra o vírus Herpes simplex e o vírus da estomatite vesicular. A tubastrina pode estar envolvida na biossíntese das ortidinas A (2), C (3) e E (4) isoladas da ascídia *Aplidium orthium*. As ortidinas apresentam atividade anti-inflamatória, com IC₅₀ que varia de 10-36 µM, associada com a inibição da produção de superóxido por neutrófilos humanos (EBADA e PROKSCH, 2011).

Figura 4. Tubastrina (1) e ortidinas (2-4).

As leptoclinidaminas e aplisinopsinas apresentam porção indólica e em uma porção um grupo guanidina. A leptoclinidamina A (5), isolada da acídia *Leptoclinides durus*, a aplisinopsina (6), isolada inicialmente de esponjas do gênero *Aplysinopsis*, são atualmente alvo de muitos estudos farmacológicos, pois exibem citotoxicidade, atividade antiplasmodial e antimicrobiana (CARROL e AVEY, 2009).

Figura 5. Leptoclinidamina A (5) e aplisinopsina (6).

Vários alcaloides guanidínicos foram isolados de esponjas marinhas pertencentes aos generos *Axinella* e *Agelas*. Por exemplo, a oroidina (7) apresenta atividade antimalárica contra *Plasmodium falciparum* com $IC_{50} = 1,2 \mu\text{g/mL}$. A himenidina (8) é antagonista de receptores serotoninérgicos inibindo a enzima cdk5/p25 com $IC_{50} = 4,0 \text{ mM}$. A dispacamida B (9) apresenta atividade parasitaria contra *Plasmodium falciparum* com $IC_{50} = 1,34 \mu\text{M}$ (SCALA *et al.*, 210).

(7) $R_1 = R_2 = \text{Br}$

(8) $R_1 = \text{Br}, R_2 = \text{H}$

(9) $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{Br}$

Figura 6. Oroidina (7), himenidina (8) e dispacamida B (9).

Derivados bromotirosínicos com grupos guanidínicos foram isolados de esponjas da família Aplysinidae. Por exemplo, a purealidina A (10) apresenta citotoxicidade *in vitro* contra células de leucemia L1210 com $IC_{50} = 2,1 \mu\text{M}$ (ARAKI *et al.*, 2008; TABUDRAVU *et al.*, 2002). Peptídeos guanidínicos apresentam potente atividade anticâncer, como a discodermina G (11), que exibe atividade antiproliferativa

contra as células de leucemia P388 com $IC_{50} = 0,23 \mu M$ (RYU, MATSUNAGA e FUSETANI, 1994).

Figura 7. Alcaloides bromotirosínicos e peptídeos guanidínicos isolados de invertebrados marinhos.

Esponjas das ordens Poecilosclerida e Axinellida, acumulam uma grande diversidade de alcaloides guanidínicos cíclicos e acíclicos incomuns, como a netamina A (12), o ácido crambescidínico (13), a crambescina A1(14) e a batzelladina K (15). Os gêneros de esponjas incluem *Crambe*, *Discorhabdella*, *Lithochela*, *Batzella*, *Ptilocaulis* e *Monanchora* (GROS *et al.*, 2014).

Figura 8. Alcaloides guanidínicos isolados de esponjas das ordens Poecilosclerida e Axinellida.

1.3. Esponjas do gênero *Monanchora*

As esponjas do gênero *Monanchora* possuem 14 espécies identificadas, incluindo *Monanchora arbuscula*.

A esponja *Monanchora arbuscula* é uma esponja marinha da ordem Poecilosclerida, conhecida por apresentar uma grande variedade de alcaloides guanidínicos policíclicos, estruturalmente incomuns como as crambrescicinas. Essa classe de produtos naturais marinhos é considerada como um marcador quimiotaxonômico da família Crambeidae, à qual pertence à esponja *Monanchora arbuscula* (BONDU *et al.*, 2012).

Figura 9. Detalhe da superfície da *Monanchora arbuscula*, fotografada no Farol da Barra, Salvador- BA por E. Hajdu, 1989.

M. arbuscula (Duchassaing & Michelotti, 1864) apresenta forma incrustante, espessa e maciça ou ereta e ramificada. Apresenta coloração laranja, salmão ou vermelha alaranjada, com canais esbranquiçados em vida, e salmão ou creme após a

sua fixação. Essa esponja se encontra amplamente distribuída, principalmente nos mares do Caribe e Brasil. (CHANG, WHITTAKER e BEWLEY, 2003).

Os alcaloides guanidínicos e derivados constituem um importante grupo de produtos naturais marinhos com grande diversidade estrutural e potentes atividades farmacológicas, como antimicrobiana, antiviral, citotoxicidade e atividades inibitórias de diferentes sistemas enzimáticos. Justifica-se, assim, o interesse da investigação desta classe de substâncias.

1.4. Referências

- BERLINCK, R. G. S.; TRINDADE-SILVA, A. E.; SANTOS, M. F. C. The chemistry and biology of organic guanidine derivatives. **Natural Products Reports**, v. 29, p. 1382-1406, 2012.
- BERLINCK, R.G.S. chromatographic approach to polar compounds isolation of hydrophilic constituents of the marine sponge *Crambe crambe*. **Quimica nova** (nota técnica), v.17, p. 167-170, 1994.
- BONDU, S.; GENTA-JOUE, G.; LEIRÒS, M.; VALE, C.; GUIGONIS, J-M.; BOTANA, L. M.; THOMAS, O. P. Additional bioactive guanidine alkaloids from the Mediterranean sponge *Crambe crambe*. **RSC Advances**, v. 2, p.2828–2835, 2012.
- CARROLL, A.R.; AVERY, V.M. Leptoclinidamines A-C, indole alkaloids from the Australian ascidian *leptoclinides durus*. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 696-699, 2009.
- EBADA, S.S.; PROKSCH, P. Chemical and pharmacological significance of natural guanidines from marine invertebrates. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 11, p.225-246, 2011.
- GROS, E.; AL-MOURABIT, A.; MARTIN, M-T.; SORRES, J.; VACELET, J.;FREDERICH, M.; AKNIN, M.; KASHMAN, Y.; GAUVIN-BIALECKI, A. Netamines H-N, Tricyclic Alkaloids from the marine sponge *Biemna laboutei* and Their Antimalarial Activity. **Journal of Natural Products**, v. 77, p. 818–823, 2014.
- GUZII, A. G.; MAKARIEVA, T. N.; KOROLKOVA, Y. V.; ANDREEV, Y. A.; MOSHAROVA, I. V.; TABAKMAHER, K. M.; DENISENKO, V. A.; DMITRENOKA, P. S.; OGURTSOVA, E. K.; ANTONOV, A.S.; LEEC, H-S.; GRISHIN, E. V. Pulchranin A, isolated from the far-eastern marine sponge, *Monanchora pulchra*: the first marine non-peptide inhibitor of TRPV-1 channels. **Tetrahedron Letters**, v. 54, p. 1247-1250, 2013.
- HEMSCHEIDT, T.; BURGOYNE, D. L.; MOORE, R. E. Biosynthesis of anatoxin-a(s). (2S, 4S)-4-hydroxyarginine as an Intermediate. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, v. 24, p. 2473-2670, 1995
- MAKARIEVA, T. N.; OGURTSOVA, E. K.; KOROLKOVA, Y. V.; ANDREEV, Y. A.; MOSHAROVA, I. V.; TABAKMAHER, K. M.; GUZII, A. G.; DENISENKO, V. A.; DMITRENOK, P. S.; LEE, H. S.; GRISHIN, E. V.; STONIK, V. A. Pulchranins B and C, new acyclic guanidine alkaloids from the far-eastern marine sponge *Monanchora pulchra*. **Natural Products Communications**, v. 9, p. 1229-1232, 2013.
- RYU, G.; MATSUNAGA, S.; FUSEYANI, N. Discodermins F-H, Cytotoxic and Antimicrobial tetradecapeptides from the marine sponge *Discodermia tiiensis*: structure revision of discodermins A-D1. **Tetrahedron**, v. 50, p. 13409-13416, 1994.
- 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, p. 2162-2174, 2010.

CAPÍTULO II. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Este projeto objetivou a investigação de alcaloides guanidínicos minoritários, bem como a avaliação farmacológica dos alcaloides majoritários presentes no extrato bruto da esponja *Monanchora arbuscula*.

2.2. Objetivos específicos:

- Isolamento dos alcaloides guanidínicos do extrato bruto da esponja *M. arbuscula*;
- Determinação estrutural dos alcaloides isolados;
- Avaliação da atividade biológica das substâncias isoladas em bioensaios de atividade itripanossomicida, leishmanicida, antifúngica e atividade de inibição da ATPase.

CAPÍTULO III. Parte experimental

3.1. Materiais, instrumentos e reagentes utilizados

3.1.1. Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)

As análises em CCDC foram feitas em placas de sílica gel 60 em suporte de poliestireno da FLUKA analytical. As revelações foram efetuadas por observação sob radiação UV nos comprimentos de onda 254 nm e 360 nm, e aplicação do reagente de Dragendoff (5 g de Carbonato de bismuto, 25 g de Iodeto de potássio, 12 mL de Ácido clorídrico conc., 100 mL de Água destilada).

3.1.2. Cromatografia em coluna (CC)

A cromatografia em coluna foi feita usando sílica gel derivatizada com grupos diol em modo normal, ou em fase reversa com sílica gel derivatizada com grupos octadecilsilano.

3.1.3. Adsorventes poliméricos

Para extração de metabólitos presentes no meio aquoso foram usadas as resinas poliméricas não iônicas XAD-4 e XAD-7 da Amberlite®.

3.1.4. Reagente utilizado

Para acidificação da fase móvel do HPLC, utilizou-se ácido trifluoracético da Sigma-Aldrich® e ácido fórmico da Panreac®.

3.1.5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

- **Analítica**

Utilizou-se um equipamento de cromatografia líquida Waters acoplado com detectores de arranjo de diodos, espalhamento de luz evaporativo e espectrômetro de massas (HPLC-PDA- ELSD-MS). Esse equipamento é composto por um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Separation module - Waters® 2695), acoplados aos detectores Photodiode Array Detector (Waters® 2996), Evaporative Light Scattering Detector (Waters® 2424) e espectrômetro de massas com analisador hexapolo Micromass ZQ (Waters®).

- **Semipreparativo**

O sistema de HPLC semipreparativo é composto por uma bomba gradiente quaternário (Pump controller, Waters® 600) e um detector UV (Dual λ Absorbance Detector, Waters® 2487).

- **Preparativo**

O sistema de HPLC preparativo é composto por uma bomba gradiente quaternário (Pump controller, Waters® 2535) e um detector UV (Dual λ Absorbance Detector, Waters® 2489).

3.1.6. Colunas para cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

- **Analíticas**

C₈-3 Inertsil, 5 μ m 4,6 x 250 mm

Ph-3 Inertsil, 5 μ m 4,6 x 250 mm

C₈-4 Inertsil, 5 μ m 4,6 x 250 mm

- **Semipreparativas**

C₁₈-4 InertSustain, 5 μ m 10 x 250 mm

- **Preparativa**

C₈-4 Inertsil, 5 μ m 14 x 250 mm

3.1.7. Espectrometria de massas de alta resolução e MS/MS

Os compostos puros foram analisados nos seguintes espectrômetros de massas de alta resolução:

- Espectrômetro de alta resolução LTQ Orbitrap velos da Thermo Scientific com fonte de ionização eletrospray em modo positivo.

As amostras foram diluídas em MeOH com 0,1% de ácido fórmico e os espectros massas e MS/MS foram obtidos por inserção direta.

3.1.8. Evaporação dos solventes

As frações obtidas foram concentradas e/ou secas usando-se:

- Rotaevaporadores Fisatom sob pressão reduzida.
- Sistema de centrífuga a vácuo ThermoSavant, SpeedVac®Plus SC210A.

3.1.9. Solventes utilizados

Não deuterados; Merck, Synth e Mallinckrodt P. A. e Panreac grau HPLC;
deuterados: Cambridge Isotope Laboratories.

3.1.10. Polarímetro

Para análise da rotação óptica, foram utilizados os polarímetros da Perkin Elmer, modelo 241MC e da Jasco P-1010 com luz de sódio (589 nm). As análises foram feitas à temperatura ambiente

3.1.11. Ressonância Magnética Nuclear

As frações foram solubilizadas no solvente deuterado adequado, utilizando-se TMS como padrão de referência interna. Os espectros de RMN uni e bidimensionais foram obtidos utilizando os seguintes equipamentos:

Equipamento Bruker DRX (9,4 T), operado a 400,35 MHz na frequência do hidrogênio e a 100,10 MHz na frequência do carbono, obtidos sob a supervisão do Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira do DQ - UFSCar.

Equipamento Bruker, modelo AVANCEIII, operado a 600,00 MHz na frequência do hidrogênio e a e a 150,00 MHz na frequência do carbono, obtidos sob a supervisão do Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira do DQ - UFSCar.

Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Marca Agilent Technologies Modelo: 500/54 Premium Shielded, operando a 400,00 ou 500,00 MHz para o núcleo de ^1H , em 100,00 e 125,00 para o núcleo de ^{13}C , obtidos na central analítica do IQSC-USP.

Equipamento Bruker AV-600, operado a 600,00 MHz na frequência do hidrogênio e a 150,00 MHz na frequência do carbono com uma criosonda CPTCI de 5 mm, realizados no departamento de Química e Ciências da Terra e do Oceano da Universidade de British Columbia, Vancouver-Canadá.

3.2. Procedimentos utilizados nos bioensaios

3.2.1. Atividade antifúngica

3.2.1.1. Isolamento e identificação do fungo aflatoxinogênico *Aspergillus flavus*

O fungo patogênico usado nesse bioensaio foi isolado a partir de cinquenta amostras de amendoins comprados no comércio a varejo, na cidade de Ribeirão Preto, Brasil, de junho a julho de 2012. Foi utilizado o meio de cultura Czapeck para o isolamento dos patógenos (SHAPIRA *et al.*, 1996). A técnica de análise por PCR foi empregada para confirmar a identidade das colônias isoladas e identificar cepas produtoras de aflatoxinas (WHITE *et al.*, 1990). Cepas de *A. flavus* produtoras de aflatoxinas e as não produtoras foram compradas pela Fundação André Tosello, Campinas, Brasil, e utilizadas como controle nos ensaios. Essas cepas foram mantidas em meio Sabouraud a 35 °C.

3.2.1.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A suscetibilidade das diferentes linhagens de *Aspergillus flavus* foi estabelecida pela medida da concentração inibitória mínima (CIM) em diferentes concentrações (250-1,9 µg/mL) do produto natural isolado, utilizando o procedimento de microdiluição M38-A. Esse procedimento foi estabelecido pelo Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais em 2008.

Uma solução estoque de esporos foi preparada para cada linhagem após o crescimento em meio Sabouraud, a 35 °C durante 5-7 dias. Soluções de esporos com 70-72% de transmitância e diluído 50 vezes, foram distribuídas nos poços de microplacas e incubadas a 35 °C durante 7 dias.

Os ensaios foram realizados em triplicata, com experimentos independentes. Os controles negativos para o crescimento e os testes de esterilidade foram incluídos para cada ensaio e cepas, bem como os controles negativos para cada solvente

utilizado. As CIMs foram definidas como a menor concentração das amostras que promoveram a inibição total das linhagens. Como controle positivo foi utilizado cercobin 70 %, dissolvido em DMSO a 10%, em concentrações que variaram de 250 a 0,9 µg /mL.

3.2.1.3. Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A concentração fungicida mínima (CFM) do produto natural e do controle cercobin foram determinados a partir dos resultados dos ensaios de CFM. Uma alíquota de 50 µL dos respectivos poços em que as concentrações testadas apresentaram inibição foi semeada em duplicata na superfície das placas contendo ágar Sabouraud dextrose, e incubadas com *Aspergillus flavus* a 35 °C durante 24 horas. A CFM foi considerada como a mais baixa concentração de amostra que não permitiu o desenvolvimento de fungos na superfície do meio de cultura após incubação.

3.2.2. Atividade antiviral

3.2.2.1. Vírus e Cultivo Celular

Para avaliar a atividade antiviral foi utilizado o vírus da Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1) cepa Kos. Para este ensaio, foram utilizadas células VERO (de macaco verde Africano - ATCC CCL 81) para o cultivo celular. As linhagens celulares foram semeadas em culturas de monocamada, utilizando Meio Essencial Mínimo (MEM) de Eagle suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS). As células foram transferidas com diluições de 1:2 até 1:1 de acordo com os procedimentos convencionais, usando 0,05 % de tripsina com EDTA a 0,02%. Nas preparações em que o vírus foi utilizado juntamente com as células, foi usado o meio sem FBS.

3.2.2.2. Titulação Viral

As titulações virais foram realizadas de acordo com as seguintes metodologias: Diluições sequenciais na base 10 foram colocadas em volumes de 50 µL/compartimento, utilizando quatro repetições em microplacas de cultivos celulares. Foram adicionados 50 µL de células a uma concentração de 1,5 a 3,0 x 10⁴ células/compartimento. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. As leituras foram feitas 24, 48 e 72 horas após a inoculação em busca do Efeito

Citopático (ECP) característico. Os títulos virais foram calculados com base no método de Spearman & Karber (LORENZ & BÖGEL, 1973).

3.2.2.3. Determinação da concentração máxima não tóxica para células

Para a determinação das concentrações utilizadas nos testes antivirais foi necessário determinar a concentração máxima não tóxica para as células a serem infectadas, pois a substância deve ser ativa somente contra o vírus para diminuir a toxicidade celular. A determinação da concentração citotóxica foi realizada através de ensaio colorimétrico utilizando a sulforodamina B (SRB). As células foram cultivadas em placas de 96 poços e adicionado 100 µL do extrato diluído em DMSO puro, na concentração de 0,1 mg/mL. Esta solução estoque foi diluída com meio de cultura para se chegar nas concentrações de inoculação de 250, 25, 2,5 e 0,25 µg/mL. O volume final no compartimento foi de 200 µL de meio. Após 72 horas, as células foram fixadas com 50 µL de ácido tricloroacético (TCA) 50% a 4°C, e as placas foram incubadas por 1 hora a 4°C. Em seguida, foram lavadas por quatro vezes com água destilada para remoção de resíduos. As placas foram submetidas à secagem à temperatura ambiente (SKEHAN e FRIEDMAN, 1985).

Após a secagem as células foram coradas por 30 minutos com sulforodamina (SRB) a 0,4% em 1% de ácido acético. Após este período, o excesso de corante foi removido por inversão e as células foram lavadas com ácido acético 1% por 3 vezes. Após secagem das placas o corante ligado à proteína foi solubilizado com Trisbase 10 µM, pH 10,5 durante 5 minutos em um agitador de placas ou em ultrassom. A leitura da absorbância em 560 nm foi realizada em leitor de ELISA.

3.2.2.4. Ensaio Antiviral

Para determinar a atividade antiviral foi realizada a titulação dos vírus. Foram adicionados 50 µL de células em concentração de 1,5 a 3,0 x 10⁴ células/poços na presença dos extratos na concentração máxima não tóxica com quatro repetições. A adição do vírus foi feita em diluições sequenciais na base 10. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. A leitura foi realizada em busca do efeito citopático (ECP) característico. Os títulos virais foram calculados com base no método de Spearman & Karber (LORENZ & BÖGEL, 1973).

Os extratos ativos foram avaliados em curva concentração x resposta na qual as células foram cultivadas em placas de 96 poços. Após 24 horas, foram adicionados 50 µL do extrato diluído em 4 diferentes concentrações. Após 1 hora foi adicionado 100 TCID₅₀/mL (Dose infecciosa de Culturas de Tecidos) sendo o volume final de 200 µL do vírus. Após 72 horas, as placas foram avaliadas microscopicamente para a avaliação do Efeito Citopático (ECP). Para quantificar a atividade viral foi realizado o ensaio colorimétrico do MTT. O ensaio do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltertrazolim brometo) consiste na adição de 20 µL de MTT (5 µg/mL), a cada poço e as células permaneceram no escuro, a 37°C, por quatro horas. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi dissolvido com 150 µL de dimetil sulfóxido. A leitura foi feita em leitor de ELISA no comprimento de onda de 570 nm (MOSMANN, 1983).

3.2.2.5. Análise dos Resultados dos testes de atividade antiviral

O efeito antiviral foi calculado pelo método de Spearman & Karber. A porcentagem de inibição (PI) foi calculada através da formula: $PI = (1 - T/C) \times 100$, onde T é o antilog dos títulos virais tratados (com extrato) e C é o antilog do título viral controle (sem extrato). A PI foi considerada positiva quando igual ou maior que 90%.

A concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀) e o IC₅₀ foram calculados a partir das curvas de concentração x efeito. Os resultados foram obtidos em triplicata. A concentração citotóxica para 50% das células foi calculada como $[(A - B)/A] \times 100$, onde A e B são as absorbância em 540 nm de células não tratada e de células tratadas, respectivamente.

O IC₅₀ foi calculado como $[(A - B) \times 100 / (C - B)]$, onde A, B e C indicam a absorbância dos extratos/ frações controles, vírus e células, respectivamente. Cada valor de IC₅₀ obtido foi definido como a concentração eficaz que reduziu a absorbância de células infectadas para 50 % quando comparado com os controles das células e do vírus. O CC₅₀ e o IC₅₀ para cada composto foram determinados a partir das curvas de dose-efeito das titulações virais. O CC₅₀ e IC₅₀ são a média de três ensaios com cinco concentrações dentro da gama de inibição dos compostos. O índice terapêutico (isto é, o índice seletivo) foi definido como CC₅₀/IC₅₀.

3.2.2.6. Ensaio da inibição da Adsorção viral

Este ensaio foi realizado utilizando uma titulação viral, da seguinte forma: inicialmente adicionou-se 100 µL de extrato ou composto puro na concentração máxima não tóxica. A suspensão foi incubada por 1 h a 4 °C. Após este período retirou-se os extratos e adicionou-se o vírus nas diferentes diluições, os quais foram incubados por mais 2 horas a 4 °C. Em seguida lavou-se com meio de cultura e adicionou-se 150 µL de meio, o qual foi incubado por 73 horas e em seguida foram realizadas leituras do título viral.

3.2.2.7. Ensaio da inibição da Penetração viral

Inicialmente, adicionou-se 50 µL do vírus nas diferentes diluições, os quais foram incubados por 2 h a 4 °C. Após este período, adicionou-se o composto na concentração máxima não tóxica, sendo incubado por 10 min a 37 °C. Após essa etapa, lavou-se com PBS (pH= 3), adicionou-se 150 µL de meio, incubando-se por 72 horas realizando-se em seguida, leituras do título viral.

3.2.2.8. Inibição da produção de partículas virais

As células mantidas em placas de 24 poços foram infectadas com 100 DI do vírus. Em seguida, incubou-se por 1 h a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂. Após esse período, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos e incubadas por 20 h à 37°C. As células foram, então, lisadas por 3 ciclos de congelamento e descongelamento. O sobrenadante foi titulado e comparado com o controle para verificar a inibição da formação de partícula viral.

3.2.2.9. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ s.e.m. Os efeitos estatisticamente diferentes dos extratos testados na inibição da replicação do vírus foram comparados com o grupo controle pelo teste t de Student, com $p \leq 0,05$ para o resultado significativo.

3.2.3. Atividade leishmanicida e triponossomicida

3.2.3.1. Alteração da permeabilidade da membrana de *Leishmania*.

A permeabilidade da membrana de *Leishmania* foi avaliada na presença dos compostos isolados mais ativos. Formas promastigotas de *Leishmania infantum* foram lavadas em meio Hanks-Glc e incubados em 50 mL de SYTOX green por 30 minutos. O aumento na intensidade de fluorescência devido à ligação do marcador de fluorescência ao DNA do parasita foi medido utilizando-se um espectrofluorímetro de placas com os filtros de excitação de 485 nm e emissão de 520 nm. A leitura foi normalizada subtraindo-se a fluorescência basal do grupo não tratado com os compostos (grupo controle). A permeabilização máxima foi obtida na presença do detergente Triton X-100 a 0,05% (CHICHARRO *et al.*, 2001).

3.2.3.2. Modificação dos parâmetros bioenergéticos de *Leishmania infantum*

O potencial de membrana de *L. infantum* foi avaliado na presença dos compostos isolados que apresentaram maior seletividade contra o parasita, utilizando-se o marcador fluorescente bis-(1,3-dietiltiobarbitúrico) trimetino oxonol (bisoxonol) (BAXTER *et al.*, 2002, CHICHARRO *et al.*, 2001). O aumento na fluorescência foi correlacionado com a despolarização da membrana. Os promastigotas foram incubados com o marcador fluorescente bisoxonol 0,2 mM e, logo após, os compostos isolados foram adicionados separadamente, com intervalos de leitura a cada 15 minutos. As leituras foram realizadas em espectrofluorímetro com os filtros de emissão de 544 nm e emissão de 584 nm. A despolarização máxima foi obtida na presença de valinomicina a 0,5 mM.

3.2.3.3. Avaliação do Potencial de Membrana Mitocondrial.

As alterações do potencial de membrana mitocondrial foram avaliadas na presença dos compostos ativos isolados através do fluoróforo rodamina 123, medindo-se sua emissão a 535 nm em um espectrofotômetro de placas (RATHA *et al.*, 2006).

3.2.3.4. Determinação da IC₅₀ de compostos puros em promastigotas.

A concentração máxima para reduzir 50% das promastigotas dos compostos isolados foi determinada utilizando-se promastigotas de *Leishmania infantum*, na

concentração de 1×10^6 /poço em placas de 96 poços contendo meio M-199 e as amostras de compostos puros. Após um período de 24-48 horas, a viabilidade dos promastigotas foi verificada pela atividade oxidativa mitocondrial utilizando o ensaio com MTT (TADA *et al.*, 1986) em 570 nm. Utilizou-se os fármacos pentamidina e anfotericina B como controles do ensaio (TEMPONE *et al.*, 2004).

3.2.3.5. Atividade contra as tripomastigotas de *Trypanossoma cruzi*

Tripomastigotas de *T. cruzi* foram contadas em uma câmara de Neubauer e semeadas em uma concentração de 1×10^6 células por poço em microplacas de 96 poços. Os compostos testados foram incubados em concentrações de até 100 ng/mL durante 24 h a 37 °C numa incubadora umidificada com 5% de CO₂, utilizando benznidazol como fármaco padrão. A viabilidade das tripomastigotas de *T. cruzi* foi indicada pela conversão celular do MTT sal de tetrazólio solúvel em formazano insolúvel pelas enzimas mitocondriais. A extração de formazano foi realizada com 10% (v/v) de dodecil sulfato de sódio durante 18 h (100 µL/poço) a 24 °C.

3.2.3.6. Toxicidade *in vitro*.

A toxicidade das substâncias puras foi avaliada em células de mamíferos LLCMK2 em placas de 96 poços com a adição de 4×10^4 células/poço e incubação por 48 horas (TEMPONE *et al.*, 2005). A viabilidade foi determinada pelo método do MTT (TADA *et al.*, 1986) O índice de seletividade (IS) foi avaliado através da seguinte fórmula:

$$IS = \text{Toxicidade (IC}_{50} \text{ em LLCMK2)} / \text{IC}_{50} \text{ em amastigotas intracelulares}$$

3.2.4. Atividade de inibição ATPásica

3.2.4.1. Cepas mutantes utilizadas

As cepas mutantes foram obtidas por Decottignes e colaboradores (1998). A cepa AD 1234567 (hipersensível a fluconazol) é uma cepa da qual foram deletados os seis mais importantes genes relacionados com o fenótipo de multirresistência (YOR1, SQN2, PDR5, YCF1, PDR10, PDR11). Também foi deletado o gene PDR3 que participa da regulação gênica da expressão dos transportadores.

Já a cepa AD 124567, hiper-resistente a fluconazol, sofreu deleção dos mesmos genes que a AD 1234567, exceto o gene que codifica a proteína Pdr5p. Além disso, foi feita uma mutação de ganho de função no gene PDR', levando a uma maior expressão da Pdr5p.

3.2.4.2. Condições de crescimento

De acordo com o procedimento a ser realizado, as cepas mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, AD1234567 e AD124567, foram crescidas em meio de cultura YPD (extrato de levedura, peptona e dextrose), contendo dextrose 2 %, extrato de levedura 1 % e peptona 2 %, por aproximadamente 17 horas, até um crescimento correspondente a 1,0 de densidade ótica a 600 nm, que corresponde a aproximadamente metade da fase exponencial de crescimento.

3.2.4.3. Isolamento de membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae*

O isolamento de membrana plasmática foi realizado como descrito previamente por Goffeau e Dufour (1988), com algumas alterações. Após o crescimento, as células foram lavadas com solução de azida sódica a 10 mM e mantidas em gelo. Uma digestão química da parede celular foi realizada a 37 °C por 1 hora com Liticase® (Sigma), na proporção de 2,5 µg de enzima para cada unidade de densidade ótica obtida após o crescimento da levedura. Em seguida, a fração mitocondrial foi eliminada por centrifugação a 20000 g durante 30 minutos e a fração bruta de membrana plasmática foi obtida por centrifugação a 27000 g por 45 minutos. As alíquotas obtidas foram armazenadas a -70 °C. A medida da concentração de proteínas foi realizada pelo método descrito por Bradford (1976), utilizando-se soro de albumina bovina (BSA) como solução padrão. As preparações de membrana obtidas das cepas geneticamente modificadas de *S.cerevisiae* mencionadas anteriormente, foram empregadas nos ensaios de avaliação do efeito dos extratos sobre a atividade ATPásica da Pdr5p.

3.2.4.4. Medida da atividade ATPásica da Pdr5p

A atividade ATPásica foi realizada pela incubação da preparação de membranas plasmáticas (13,0 µg/mL) a 37 °C em um volume final de 0,2 mL de um meio de reação padrão contendo ATP-Na 3 mM, MgCl₂ 4 mM, EGTA 1 mM e Tris-HCl 100 mM, em pH 7,5, além dos inibidores enzimáticos azida sódica 1 mM e KNO₃ 50

mM. Adicionaram-se os compostos purificados em diversas concentrações com o objetivo de se obter ao final uma curva dose-resposta. A reação foi disparada pela adição da preparação de membranas, e paralisada após 60 minutos pela adição de dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% (v/v), seguindo o método descrito por Dulley (1965), na proporção de 1:2 em relação ao meio de reação. O fosfato inorgânico liberado pela hidrólise do ATP foi medido por um método colorimétrico, conforme a metodologia descrita por Fiske & Subarow (1925), a qual consiste na adição do reagente de Fiske (fiske e molibdato de amônio na proporção 1:5), adicionado após o término da reação, na proporção de 1:2 em relação ao meio. Após 15 minutos o fosfato inorgânico liberado foi medido em espectrofotômetro a 660 nm.

3.2.4.5. Quimiossensibilização das substâncias purificadas

Foi utilizado o "spot test" descrito anteriormente por Rangel e colaboradores. (2010). Nesse ensaio, foram empregadas placas de 6 poços, sendo que para cada poço foram transferidos 3 mL de meio YPD fundido contendo os compostos a serem testados (concentrações finais 50, 10 e 5 μ M), associados ou não a fluconazol (120 μ g/mL). Em seguida, foram preparadas cinco diluições seriadas na proporção 1:5 a partir de uma suspensão celular da cepa AD124567 a 0,1 de DO. Após a completa solidificação do YPD, foram transferidas para cada poço alíquotas de 5 μ L de cada diluição de modo que todos contenham 5 "spots". Foram realizados controles contendo apenas o meio YPD e o mesmo suplementado com fluconazol (120 μ g/mL), DMSO a 0,5%, fluconazol (120 μ g/mL) + DMSO (5%), FK506 (10 μ M) e fluconazol (120 μ g/mL) + FK506 (10 μ M).

3.3. Fracionamento cromatográfico do extrato bruto de *M. arbuscula*

A esponja *M. arbuscula* foi coletada em Cabo Frio, no litoral do Rio de Janeiro, em abril de 2011. O extrato bruto desta esponja apresentou potente atividade antiviral.

A amostra congelada da esponja *M. arbuscula* foi seca em liofilizador por uma semana, fornecendo 360 g de material. O total do material obtido foi macerado e extraído em 2 litros de MeOH. Após filtração, o solvente foi evaporado até o volume reduzido de 500 mL. Foram adicionados 50 mL de H₂O ao extrato MeOH. O extrato

metanólico foi desengordurado por partição líquido-líquido com hexano. Após evaporação dos solventes, foram obtidos dois extratos: o extrato metanólico e o extrato hexânico, de acordo com o fluxograma mostrado na **Figura 10**.

Figura 10. Fluxograma de obtenção das frações MeOH e hexânica do extrato de *M. arbuscula*.

O extrato MeOH apresentou elevada concentração de alcaloides (detectado por CCDC; revelada com Dragendorff). Este extrato foi fracionado por cromatografia em coluna utilizando-se 10 g de sílica derivatizada com grupos octadecilsilano (C₁₈), e um gradiente de MeOH/H₂O na eluição dos componentes. Ao final da separação, três frações foram obtidas: 100% H₂O, MeOH/H₂O 1/1 (denominada Ma50MeOH) e 100% MeOH (denominada Ma100MeOH).

Essa metodologia foi usada para separar os alcaloides guanidínicos dos sais inorgânicos presentes no extrato bruto, e também para separar esses alcaloides em dois grupos com polaridades diferentes.

Para remover os sais da fração 100% H₂O e posteriormente verificar a presença de alcaloides através da avaliação por CCDC com Dragendorff, a fração 100% H₂O foi submetida a uma extração com uma mistura de adsorventes poliméricos não iônicos XAD-4 e XAD-7. A resina XAD-4 é um adsorvente para moléculas hidrofóbicas presentes em solventes polares, com característica de adsorver compostos orgânicos

de baixo peso molecular (DAIGNAULT *et al.*, 1988). Já a resina XAD-7 é um adsorvente que remove compostos moderadamente polares do meio aquoso (DAIGNAULT *et al.*, 1988).

A fração 100% H_2O (1,2 g) foi dissolvida em 1 litro de H_2O deionizada e distribuída em frações de 200 mL em 5 Erlenmeyers de 500 mL. Em seguida, foram adicionados 3 g de XAD-4 e 3 g de XAD-7 a cada frasco contendo a fração 100% H_2O dissolvida, e deixada sob agitação por 24 horas. Após esse período, procedeu-se à filtração das resinas em funil de Büchner. Em seguida foi realizada a extração das resinas com uma mistura 1:1 de MeOH/acetona e MeOH. As duas frações resultantes foram reunidas e evaporadas até secura. Foram obtidos 300 mg da fração que foi nomeada Ma100 H_2O (**Figura 11**).

As frações **Ma100 H_2O** , **Ma50MeOH** e **Ma100MeOH** tiveram, inicialmente, seus perfis cromatográficos avaliados por cromatografia em camada delgada (CCDC), e foram revelados com Dragendoff de maneira a se verificar quais frações apresentavam alcaloides guanidínicos e direcionar o desenvolvimento do trabalho (**Figura 12**).

Todas as frações analisadas apresentaram compostos com resposta positiva ao teste com o revelador Dragendoff. Sendo assim, as frações foram submetidas a um processo de desreplicação por HPLC-UV-ELSD- MS para conhecer melhor sua natureza química, e traçar estratégias de separação em bancada (fase estacionária da coluna aberta, eluentes), e por HPLC (detector, fase estacionária da coluna, método de isolamento), (SILVA *et al.*, 2010). Esse procedimento foi realizado para a obtenção dos metabólitos secundários minoritários inéditos e o rápido isolamento dos metabólitos conhecidos e majoritários, os quais poderiam ser os responsáveis pela atividade antiviral observada no extrato, enviando-os para diferentes bioensaios.

Figura 11. Fluxograma de obtenção das frações: 100% H₂O, MeOH/H₂O 1/1 e 100% MeOH.

- 1) Fração **Ma100H₂O**
- 2) Fração **Ma50MeOH**
- 3) Fração **Ma100MeOH**

Figura 12. Cromatografia em camada delgada das frações Ma100H₂O, Ma50MeOH, Ma100MeOH do extrato bruto de *M. arbuscula*.

3.3.1. Desreplicação da fração Ma100H₂O

A fração **Ma100H₂O** foi analisada por HPLC-UV-ELSD-MS (**Figuras 13**), e apresentou cromatogramas com picos que apresentaram espectros de UV com comprimento de onda entre 220-300 nm, indicando que essa fração possuía compostos com duplas ligações conjugadas e/ou aromatizados.

Os picos cromatográficos da referida fração apresentaram espectros de massas com sinais de íons quase moleculares $[M+H]^+$ entre m/z 200-360, correspondente à família de alcaloides guanidínicos crambescinas e/ou netaminas (BONDU *et al.*, 2012; GROS *et al.*, 2014).

Entretanto, não foi encontrado no Dictionary of Natural Productss nenhum metabólito dentro do universo de alcaloides guanidínicos e derivados da guanidina com espectros de UV e massas moleculares correspondentes aos espetros de UV e massas observadas para os picos nos cromatogramas obtidos por HPLC-PDA-ELSD-MS. Esses resultados indicaram que os alcaloides guanidínicos e derivados da guanidina desta fração fossem inéditos. A partir desta fração foi isolado um metabólito inédito derivado das crambescinas, a arbuscolidinina com $[M+H]^+$ em m/z 262,0 Da, cuja identificação é apresentada e discutida no **CAPÍTULO IV**.

Figura 13. Cromatograma HPLC-PDA-ELS-MS da fração Ma100H₂O. Coluna C₈-3, fluxo de 1mL/min., e um gradiente curto de 45:55 a 70:30 H₂O:MeOH em 0,1% de TFA durante 37min.: **A**-Cromatograma HPLC-ELSD; **B**-Cromatograma HPLC-PDA; **C**-Espectros no UV; **D**-Cromatograma HPLC-MS; **E**-Espectros de massas.

3.3.2. Desrepliação da fração Ma50MeOH

As análises por HPLC-PDA-ELSD-MS da fração **Ma50MeOH** apresentou picos majoritários com baixa absorção no UV, com espectros apresentando comprimento de onda máximo em 200 nm e detecção por ELSD (**Figura 14**). Também foram observados componentes minoritários com espectro de UV apresentando comprimentos de onda entre 215-330 nm.

Figura 14. Cromatograma HPLC-UV-ELSD da fração Ma50MeOH. Coluna C₈-3, fluxo de 1mL/min., e um gradiente curto de 40:60: a 30:70 H₂O:MeOH em 0,1% de TFA durante 37min.: **A**-Cromatograma HPLC-ELSD; **B**-Cromatograma HPLC-PDA em 210 nm; **C**- Cromatograma HPLC-PDA em 254 nm; **D**-Espectros no UV

Os espectros de massas (**Figura 15**), dos picos majoritários apresentaram íons $[M+2H]^{2+}$ m/z entre 313-415 Da, indicando que a fração era composta majoritariamente por moléculas conhecidas, quando comparados com as massas obtidas no Dictionary of Natural Productss. Essas massas corresponderam a alcaloides guanidínicos pertencentes à família das batzelladinas e crambescidinas. Além disso, foram observados picos minoritários com espectros de massas indicando íons $[M+H]^+$ em m/z entre 240-250,0 Da, não conhecidos na literatura. Os espectros de massas indicaram que esses compostos guanidínicos são derivados das netaminas (JARES-ERIJMAN, SAKAI e RINEHART, 1991; GROS *et al.*, 2014).

Os compostos majoritários que compõem a fração puderam ser isolados em quantidade suficiente para serem enviados a diversos bioensaios.

Figura 15. Cromatograma HPLC-MS da fração Ma50MeOH. Coluna C₈-3, fluxo de 1mL/min., e um gradiente curto de 30:70 a 15:85 H₂O:MeOH em 0,1% de TFA durante 37min.: **A**-Cromatograma HPLC-MS; **B**-Espectros de massas.

Uma informação que indica ser esta uma fração de interesse para fracionamento de alcaloides guanidínicos ou correlatos é a presença de metabólitos minoritários que mostraram serem inéditos quando os seus espectros de massas foram comparados com os da literatura. Assim foram isolados três metabólitos a partir desta fração. As estruturas de dois destes metabólitos correspondem com as estruturas das crambescidinas e de derivados conhecidos, com $[M+2H]^{2+}$ m/z em

392,0 e 401,0 Da, discutidas no **CAPÍTULO V**. A estrutura do outro metabólito isolado com $[M+H]^+$ em m/z 242,0 é inédita na literatura. Seu esqueleto básico mostrou-se semelhante ao das ptilocaulinas, netaminas e derivados, discutidas no **CAPÍTULO VI**.

3.3.3. Desreplicação da fração Ma100MeOH

A fração **Ma100MeOH** foi analisada por HPLC-UV-ELSD-MS e, semelhantemente à fração **Ma50MeOH**, apresentou picos majoritários com baixa absorção no UV em comprimentos de onda acima de 210 nm. A análise por ELSD indicou picos facilmente detectáveis. Foi possível ainda observar metabólitos secundários com espectros de UV apresentando $\lambda_{\max}$ entre 220-300 nm.

O cromatograma obtido por HPLC-MS (**Figura 16**), da fração Ma100MeOH apresentou picos com espectros de massas apresentando $[M+2H]^{2+}$ em m/z 313,0; 320,0 e 327,0 Da, que corresponderam a alcaloides guanidínicos da família das batzelladinas, identificados como batzelladina F, norbatzelladina L e batzelladina L, respectivamente (HUA *et al.*, 2007). Esses mesmos compostos foram também observados na fração Ma50MeOH, o que indicou que esses alcaloides são os componentes majoritários do extrato bruto de *M. arbuscula*.

Também foi observada a presença de alcaloides minoritários com picos apresentando espectros de massas com $[M+2H]^{2+}$ entre m/z 400-600 Da. Essas massas observadas para os compostos majoritários não apresentaram correspondentes na literatura, sugerindo que tais alcaloides fossem inéditos. Estes dados indicaram que essa fração seria uma fonte em potencial de metabolitos secundários inéditos.

A identificação dos compostos majoritários e minoritários isolados dessa fração são discutidas no **CAPÍTULO VII**. As atividades biológicas apresentadas pelos componentes majoritários, identificados como pertencentes aos alcaloides guanidínicos da família das batzelladinas, são discutidas no **CAPÍTULO VIII**.

Figura 16. Cromatograma HPLC-MS da fração Ma100MeOH. Coluna C₈-3, fluxo de 1mL/min., e um gradiente curto de 40:60: a 30:70 H₂O:MeOH em 0,1% de TFA durante 37min.: **A**-Cromatograma HPLC-MS; **B**-Espectros de massas.

Após a desreplicação das três frações brutas, foi possível conhecer a composição aproximada das mesmas, identificando os compostos majoritários e verificando que essas frações são fontes de metabolitos secundários minoritários possivelmente inéditos. Além disso, foi possível traçar as estratégias necessárias para isolar essa classe de compostos que, segundo relatos da literatura são extremamente difíceis de isolar (BERLINCK, 1994). Muitos desses compostos apresentam um caráter anfipático e são em séries homólogas, nas quais as diferenças podem ser de apenas duas ou uma unidade CH₂.

3.4. Estratégias de separação

Para a otimização das estratégias de separação, foram considerados os perfis cromatográficos de HPLC-UV-ELSD-MS obtidos para as frações **Ma100H₂O**, **Ma50MeOH** e **Ma100MeOH**. Dessa forma foi possível definir a melhor metodologia de separação na bancada, permitindo uma seleção adequada de fases estacionárias e eluentes a serem empregados nas separações por CC. Além disso, foi possível definir as estratégias necessárias para as separações por HPLC serem mais eficientes, levando em consideração o tipo de detector a ser utilizado, as fases estacionárias das colunas de HPLC, bem como eluentes e métodos de isolamentos.

Essas as amostras apresentaram interferentes que poderiam prejudicar o processo de separação como, por exemplo, os biocromos, pigmentos betacarotenóides presentes em toda fauna marinha, principalmente em esponjas (VILLELA, 1945). A clorofila presente nas cianobactérias associadas às esponjas, e os nucleosídeos que restaram mesmo após fracionamento com sílica gel derivatizada com grupos octadecilsilanos (C₁₈) também foram considerados potenciais interferentes (**Figura 17**). Desta maneira, optou-se por fazer uma separação em coluna de Sephadex-LH20 como primeira etapa de separação para eliminar interferentes presentes nestas três frações.

A Sephadex-LH20 é uma fase estacionária efetua a separação de acordo com a massa molecular das moléculas. A velocidade de deslocamento de compostos de menor massa molecular é menor, pois estas atravessam pelo interior das partículas da fase estacionária. Compostos de maior massa molecular apresentam maior velocidade de deslocamento dentro da coluna, eluindo mais rapidamente. Assim, foi possível realizar uma separação dos alcaloides guanidínicos de maior massa molecular daqueles de menor massa molecular, devido ao perfil heterogêneo das frações obtidas a partir do fracionamento da fração MeOH do extrato bruto da esponja *M. arbuscula* que apresentou compostos com massas moleculares entre 200-830 Da.

Outra característica da Sephadex-LH20 é reter compostos altamente conjugados. Portanto, essa fase estacionária é eficaz para separar os alcaloides dos pigmentos betacarotenoides e clorofila (**Figura 17**).

Figura 17. Interferentes frequentemente encontrados em extratos brutos e/ou frações, subfrações de extrato de invertebrados marinhos.

Após a separação com a coluna de Sephadex–LH20, as frações obtidas foram submetidas a diversas separações subsequentes por cromatografia em coluna e/ou HPLC. A estratégia de separação foi estabelecida levando-se em conta as características de cada amostra. A separação em bancada foi realizada para separar os alcaloides com grupos polares daqueles mais apolares, ou seja, batzelladinas das crambescidinas (**Figura 18**).

Figura 18. Metabólitos tipicamente presentes nas frações do extrato bruto de *M. arbuscula*.

A fase estacionária utilizada para cromatografia em bancada foi a sílica gel derivatizada com grupos diol. A escolha da sílica diol em detrimento à sílica gel (**Figura 19**) se justifica pelo fato das amostras serem compostas por alcaloides, moléculas que possuem caráter básico. Em contato com a sílica gel, fase estacionária com caráter ácido, tais alcaloides poderiam sofrer adsorção irreversível, levando à perda de massa das frações, comprometendo a identificação de possíveis compostos inéticos minoritários a serem isolados.

Figura 19. Estrutura da sílica-gel derivatizada com grupos diol, utilizada para separação por cromatografia em coluna de frações do extrato de *M. arbuscula*.

Nas separações por HPLC, utilizou-se detector de espalhamento de luz (ELSD) para separar os compostos majoritários dos minoritários, pois durante a análise de desreplicação dos alcaloides presentes no extrato de *M. arbuscula*, verificou-se que esses compostos apresentam fraca absorção no UV. Outra vantagem de se usar o ELSD para isolar os componentes majoritários é que esse detector é mais sensível para moléculas maior massa molecular (URANO, RODRIGUES, BERLINCK, 2012), como de fato se observou para os componentes majoritários do extrato bruto de *M. arbuscula*.

Todavia o uso deste detector apresenta algumas desvantagens, como o fato de ser destrutivo, sendo também necessário um divisor de fluxo onde ocorre a perda de $\frac{1}{4}$ de massa da fração utilizada na separação. Outra desvantagem é a baixa sensibilidade apresentada pelo detector, que pode dificultar a separação dos componentes minoritários das frações que tem baixa absorção no UV. Neste caso, a separação monitorada em λ_{max} 210 nm no detector de UV é mais adequada. O uso do detector UV foi imprescindível, possibilitando isolar alguns componentes minoritários, e até mesmo majoritários do extrato bruto de *M. arbuscula*.

As colunas de HPLC para a separação e purificação dos alcaloides de *M. arbuscula* foram de sílica gel derivatizada com grupos octila (C_8) e fenila (Ph). Essas colunas são menos hidrofóbicas em relação às tradicionais C_{18} . Esse detalhe motivou a escolha dessas colunas, uma vez que como evidenciado pela desreplicação, os metabolitos que compõem as frações **Ma100H₂O**, **Ma50MeOH** e **Ma100MeOH** são, em sua maioria, compostos que possuem altos tempos de retenção em colunas C_{18} pelo fato de apresentarem longas cadeias alifáticas. A hidrofobicidade apresentada pela coluna C_{18} e os grupos silanóis residuais presentes nestas colunas de HPLC, tornam o uso de colunas com esta fase estacionária para o isolamento dos alcaloides guanidínicos e derivados da guanidinas extremamente difícil. Onde se observa maior formação de caudas nos picos do que quando se utiliza colunas C_8 e/ou Ph (MALDANER, COLLINS, JARDIM, 2010). A coluna C_{18} só foi utilizada nos casos de purificação final de alguns metabólitos minoritários.

Os eluentes usados na separação por HPLC com as colunas C₈ e/ou Ph foram MeOH e/ou MeCN, dependendo da composição das frações. O solvente MeOH foi usado na maioria das vezes, pelo fato de apresentar menor força de eluição com relação à MeCN. O uso de MeOH mostrou ser eficiente para a separação de grupos de compostos homólogos, pois para separação desses compostos é necessário um equilíbrio perfeito entre o analito, a fase estacionária e a fase móvel.

Para tentar promover esse equilíbrio, a separação em modo gradiente foi preferida com relação à separação isocrática em alguns casos. O método gradiente usado foi sempre o gradiente curto, onde a variação entre as proporções inicial e final do solvente orgânico situou-se entre 30% a 40%, em detrimento ao gradiente exploratório onde a variação fica em torno de 80 a 95 %. Esta pequena variação entre as proporções finais e iniciais influencia de maneira diferente a eluição de compostos de uma série homóloga, promovendo melhor separação. O uso de gradiente curto se mostrou eficiente e possibilitou o isolamento de muitos compostos que serão discutidos nos capítulos a seguir.

3.5. Referências

- BONDU, S.; GENTA-JOUE, G.; LEIRÒS, M.; VALE, C.; GUIGONIS, J-M.; BOTANA, L. M.; THOMAS, O. P. Additional bioactive guanidine alkaloids from the Mediterranean sponge *Crambe crambe*. **RSC Advances**, v. 2, p.2828–2835, 2012.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-54, 1976.
- CHICHARRO, C. N-terminal fatty acid substitution increases the leishmanicidal activity of CA (1-7) M (2-9), a cecropin-melittin hybrid peptide. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 2441, 2001.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. (2008) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA
- DECOTTIGNIES, A.; GRANT, A. M.; NICHOLS, J. W.; WET, H.; MCINTOSH, D.B.; GOFFEAU, A. ATPase and multidrug transport activities of the overexpressed yeast ABC protein Yor1p. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p.12612-22, 1998.
- DULLEY, J. Determination of inorganic phosphate in the presence of detergents or protein. **Analytical Biochemistry**, v.67, p. 91-96, 1965.
- FISKE, C. H.; SUBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 66, p. 375-400, 1925.
- GOFFEAU, A.; DUFOUR, J. P. Plasma membrane ATPase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Methods in Enzymology**, v. 157: p.528-533, 1988.
- GROS, E.; AL-MOURABIT, A.; MARTIN, M-T.; SORRES, J.; VACELET, J.; FREDERICH, M.; AKNIN, M.; KASHMAN, Y.; GAUVIN-BIALECKI, A. Netamines H-N, tricyclic alkaloids from the marine sponge *Biemna laboutei* and their antimalarial activity. **Journal of Natural Products**, v. 77, p. 818–823, 2014.
- HUA, H-M.; PENG, J.; DUNBAR, D. C.; SCHINAZI, R. F.; ANDREWS, A. G. DE C.; CUEVAS, C.; GARCIA-FERNANDEZ, L. F. KELLY, M.; HAMANN, M. T. Batzelladine alkaloids from the caribbean sponge *Monanchora unguifera* and the significant activities against HIV-1 and AIDS opportunistic infections pathogens. **Tetrahedron**, v. 63, p. 11179–11188, 2007.
- JARES-ERIJMAN, E. A.; SAKAI, R.; RINEHART, K. L. Crambescidins: new antiviral and cytotoxic compounds from the sponge *Crambe crambe*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 56, p. 5712–5715, 1991.
- LORENZ, R.J.; BÖGEL, K. Methods of calculation in laboratory techniques in rabies. Kaplan Mm and koprowsky H (Eds). **World Health Organization**. Geneva. p. 321-355, 1973.

MALDANER; L.; COLLINS; C. H.; JARDIM. I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química. Nova**, v.33, p. 1559-1568, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p. 55, 1983.

RATHA, J.; MAJUMDAR, K.N.; MANDAL, S.K.; BERA, R.; SARKAR, C.; SAHA, B.; MANDAL, C.; SAHA, K.D; BHADRA, R. A sphingolipid rich lipid fraction isolated from attenuated *Leishmania donovani* promastigote induces apoptosis in mouse and human melanoma cells in vitro. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 290, p. 113, 2006.

SHAPIRA R, PASTER N, EYAL O, MENASHEROV M, METT A, SALOMON R. Detection of aflatoxigenic molds in grains by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p.3270-3273, 1996.

SILVA, M. M.; BERGAMASCO, J.; LIRA, S. P.; LOPES, Norberto P.; HAJDU, E.; PEIXINHO, S.; BERLINCK, R. G. S. dereplication of bromotyrosine-derived metabolites by LC-PDA-MS and analysis of the chemical profile of 14 *Aplysina* Sponge specimens from the brazilian coastline. **Australian Journal of Chemistry**, v.63, p.886-894, 2010.

SKEHAN; P.; FRIEDMAN, S. J. Growth, Cancer, and the cell cycle the molecular, cellular, and developmental biology. Published by Humana Press, 1985.

TADA, H.; SHIHO, O.; KUROSHIMA, K-I.; KOYAMA, M.; TSUKAMOTO, K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. **Journal of Immunological Methods**, p. 93, v.157, 1986.

TEMPONE, A. G.; SILVA, A. C. M. P. da; BRANDT, C. A.; MARTINEZ, F. S.; BORBOREMA, S. E. T.; SILVEIRA, M. A. B. da; de ANDRADE, H. F. JR. Synthesis and antileishmanial activities of novel 3-substituted quinolines. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 49, p. 1076, 2005.

TEMPONE, A.G.; PEREZ, D.; RATH, S.; VILARINHO, A.L.; MORTARA, R.A.; de ANDRADE, H.F.JR. Targeting *Leishmania* (L.) *chagasi* amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, p. 60. 2004.

URANO, R. P. M.; RODRIGUES, F. T.; BERLINCK, R. G. S. Utilização de detecção por espalhamento de luz evaporativo para a análise de produtos naturais. **Química Nova**, v. 35, p.1198-1208, 2012.

VILLELA, G. G. Biocromos (pigmentos) de invertebrados marinhos: briozoários. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1948.

WHITE T, BURNS T, LEE S, TAYLOR J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Academic Press, San Diego, California.

CAPÍTULO IV- Estudo químico da fração Ma100H₂O: crambescinas e derivados

4.1. Definição, propriedades e atividades biológicas das crambescinas

Os alcaloides guanidínicos monocíclicos e bicíclicos de esponjas da ordem Poecilosclerida podem ser divididos em três grupos: crambescinas A, crambescinas B e crambescinas C, isolados a partir da esponja *Crambe crambe* (BERLINCK, *et al.*, 1992; JARES-ERIJMAN *et al.*, 1993).

Figura 20. Alcaloides guanidínicos da família das crambescinas.

O grupo das crambescinas A são alcaloides guanidínicos bicíclicos formados por um anel pirrolidínico e por um esqueleto estrutural (5,6,8b)-triazaperhidroacenaftileno condensados entre si. O grupo das crambescinas B são bicíclicos caracterizados por um esqueleto básico (5,6,8b)-triazaperhidroacenaftileno espiroaminal, ou seja, espiro-fundidos com anéis oxaciclopentano. Já o grupo das crambescinas C são caracterizados por uma cadeia lateral linear 3-hidroxipropila ligada ao esqueleto estrutural (5,6,8b)-triazaperhidroacenaftileno (BONDU *et al.*, 2012). Esses compostos são caracterizados também pela presença de duas cadeias alifáticas laterais, uma cadeia alifática superior e outra que se inicia a partir de um éster e termina com um grupo guanidina (BONDU *et al.*, 2012).

Essa família de alcaloides guanidínicos está entre as mais difíceis de separar por cromatografia em coluna ou por HPLC pelo fato desses metabólitos se apresentarem como misturas complexas de homólogos. (BONDU *et al.*, 2012). Esse grupo de alcaloides guanidínicos apresentam atividades neurotóxicas e/ou neurorreguladoras, dentre outras atividades biológicas (BERLINCK *et al.*, 1993; MARTÍN *et al.*, 2013).

4.2. Estudo químico da fração Ma100H₂O

A fração Ma100H₂O foi fracionada por cromatografia em Sephadex LH-20, usando-se MeOH como eluente. Foram obtidas dez frações (**Figura 21**).

Figura 21. Fluxograma do fracionamento da fração Ma100H₂O.

Todas as frações obtidas a partir desta separação foram analisadas por HPLC-PDA-ELSD-MS. A fração MaH-3 foi fracionada por HPLC-UV semipreparativo utilizando-se um gradiente de 45:55 a 75:25 de H₂O:MeOH com 0,1%TFA durante 37 min., em coluna C₈-3 com fluxo de 1mL/min. Esta separação levou à obtenção de três subfrações: MaH-3A (28,2 mg), MaH-3B (5,8 mg) e MaH-3C (3,5 mg). A subfração MaH-3C foi purificada utilizando-se 70:30 a 55:45 de H₂O:MeCN com 0,1%TFA

durante 37 min., utilizando-se coluna de sílica derivatizada com grupos fenila (Ph-3) com fluxo de 1mL/minuto. (**Figura 22**).

Figura 22. Cromatograma HPLC-UV da subfração MaH-3C, usando coluna Ph-3; 1mL/min., e gradiente 70:30 a 55:45 de H₂O:MeCN com 0,1%TFA durante 37 min.

A separação levou à obtenção de um composto presente na subfração MaH-3C1 (**Figura 23 e 24**). A pureza deste composto foi confirmada através da sua análise por HPLC-MS.

Figura 23. Cromatograma HPLC- MS do composto **1**, usando coluna C₈-3; fluxo 1mL/min., eluente: gradiente de 80:20: a 0:100 H₂O:MeOH com 0,1% de TFA durante 35 min.

Figura 24. Fluxograma da purificação da subfração MaH-3C1.

4.2.1. Identificação da arbusculidinina (1)

A arbusculidinina (1) (**Figura 25**) foi isolada com o aspecto de um óleo amarelado. O seu espectro de massas de alta resolução em modo electrospray positivo HRESIMS apresentou um íon quase molecular $[M+H]^+$ em m/z 262.2247 (calcd para $C_{16}H_{28}N_3$, 262.2283), com 5 não saturações.

Figura 25. Estrutura da arbusculidinina (1).

O espectro RMN de 1H de **1** (**Tabela 1**) apresentou: dois sinais largos e de baixa intensidade, de hidrogênios do tipo NH em δ_H 8,99 e 8,33; um sinal de hidrogênio de carbono sp^2 em δ_H 7,00 (s, H-7), três sinais de hidrogênios com multiplicidade tripleto em δ_H 4,11 (t; 2H; 7,5 Hz), δ_H 3,18 (t; 2H; 7,9 Hz), δ_H 2,66 (t; 2H; 7,7 Hz), e dois hidrogênios com multiplicidade quinteto em δ_H 2,17 (q; 2H; 7,9 Hz), δ_H 1,63 (q; 2H; 6,9 Hz), que correspondem a hidrogênios metilênicos. Também foi possível verificar a presença de um singlete intenso e largo em δ_H 1,22, que corresponde a vários hidrogênios metilênicos de uma cadeia alifática, bem como uma metila com multiplicidade tripleto em δ_H 0,84 (t; 3H; 6,7 Hz).

O espectro RMN de ^{13}C (**Tabela 1**) apresentou três sinais característicos de carbono sp^2 em δ_C 178,6 (C-8); 163,8 (C-6) e 106,1 (C-7). Além disso, observou-se um sinal de carbono guanidínico em δ_C 154,0 (C-1). Com esses dados, foi possível estabelecer que o composto em estudo possui três duplas ligações, das quais uma δ_C 178,6 (C-8), apresenta um carbono sp^2 em dupla ligação com um átomo de nitrogênio.

Assim, foi possível identificar duas subestruturas (**Figura 26**), bem como onze carbonos metilênicos em δ_C 52,0; 38,0; 31,3; 31,2; 28,8; 28,7; 28,6; 28,5; 27,5; 22,0; 20,0 e uma metila em δ_C 14,0.

Figura 26. Subestruturas **A** e **B** do composto **1**.

A partir dessas informações, foi possível estabelecer que o composto **1** apresenta duas ligações duplas (uma C=C e uma C=N), uma insaturação do carbono guanidínico e dois ciclos.

A presença de dois prótons NH observados no RMN de ^1H indica que a molécula está naturalmente protonada provavelmente devido à utilização do ácido trifluoroacético (TFA) durante o processo de isolamento.

A análise das correlações observadas no mapa de contorno $g\text{HSQC}$ possibilitou atribuir cada hidrogênio ao seu respectivo carbono. No espectro $g\text{COSY}$ foram observadas correlações entre o sinal do hidrogênio em δ_{H} 2,17 (q, H-4) com os sinais em δ_{H} 4,11 (t, H-3) e δ_{H} 3,18 (t, H-5), e entre os hidrogênios observados no sinal em δ_{H} 1,22 (m, H-12 a H-18) com os hidrogênios em δ_{H} 2,66 (t, H-11) e 0,84 (t, H-19). Dessa forma, foi possível estabelecer as subestruturas **C** e **D** (**Figura 27**).

Figura 27. Subestruturas **C** e **D** do composto **1**.

As correlações observadas no espectro $g\text{HMBC}$ possibilitaram posicionar a cadeia alifática na estrutura do composto **1**, verificando-se correlações entre o

hidrogênio em δ_H 2,66 (t, H-11) com os carbonos em δ_C 106,1 (C-7) e δ_C 178,6 (C-8), entre o hidrogênio em δ_H 4,11 (t, H-3) com δ_C 154,0 (C-1), e entre os hidrogênios em δ_H 3,18 (t, H-5) com o carbono em δ_C 106,1 (C-7). Tais correlações, além de várias outras observadas no mapa de contorno gHMBC, possibilitaram estabelecer a estrutura da arbusculidinina (**1**) (**Figura 28**).

Figura 28. Correlações observadas no mapa de contorno gHMBC.

As posições dos nitrogênios na molécula foram confirmadas com base nas correlações observadas no espectro ^{15}N IrHMQC, entre o nitrogênio em δ_N (-215,6, N-2) com os hidrogênios em δ_H 7,00 (s, H-7), δ_H 2,17 (q, H-4) e δ_H 3,18 (t, H-5), bem como entre o nitrogênio em δ_N (-129,7, N-9) com o hidrogênio em δ_H 2,66 (t, H-11) (**Figura 29**).

Figura 29. Correlações observadas no mapa de contorno ^{15}N IrHMQC.

A estrutura da arbusculidinina é sem precedentes na literatura. Com o objetivo de confirmar a estrutura da arbusculidinina e obter uma quantidade maior de massa

para avaliar as atividades biológicas deste composto em diferentes bioensaios, o grupo do professor Patrick J. Murphy (School of Chemistry, Bangor University, Bangor-UK) realizou a síntese da arbusculidinina. A síntese foi realizada em três etapas utilizando os reagentes de acordo com o esquema abaixo (**Figura 30**).

Figura 30. Esquema da síntese da arbusculidinina (**1**).

Reagentes e condições: Etapa 1: $\text{CO}(\text{OCF}_3)_2$, NaH, Et_2O , 2-undecanona, 5 °C, 48 h, 34%; Etapa 2: cloreto de guanidina, *t*-BuOK, $\text{F}_3\text{CCH}_2\text{OH}$, 30 min., então **v**, r.t., 48 h, 26%; Ph_3P , imidazol, I_2 , CH_2Cl_2 , - 18 °C, 6 h, 67%.

As etapas 1 e 2 tiveram rendimento de 34% (4,29 g de **iii**) e 26% (905,0 mg de **v**) respectivamente. A formação do produto final arbusculidinina (**1**), teve um rendimento de 67% (823,0 mg), superior ao das outras etapas. Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e espectros de HRESIM do composto sintético são indistinguíveis daqueles observados para o composto natural.

O presente composto se relaciona biossinteticamente com os alcaloides guanidínicos do grupo das crambescinas A. Existe a possibilidade, de a pulchranina A, e/ou possíveis derivados serem os precursores biossintéticos da arbusculidinina (**1**) de acordo com a proposta apresentada no esquema da Figura 31.

Figura 31. Possível rota biossintética da arbusculidina (1).

Como as crambescinas A, a arbusculidinina é um alcaloide bicíclico. Porém, o anel pirrolidínico das crambescinas A, tornou-se aqui um anel do tipo 2-aminopirimidínico. A arbusculidinina não possui o grupo alquiléster guanidina que é observado no grupo das crambescinas A (**Figura 32**), sendo este composto o primeiro dentro de um possível novo grupo de metabólitos.

Figura 32. Comparação entre a crambescina A1 e a arbusculidinina (1).

Tabela 1. Dados de RMN de ^{13}C / ^{15}N e ^1H da arbusculidina (1) em DMSO- d_6

Posição	^{13}C (150 MHz)	^1H (J em Hz, 600 MHz)
1	154,0,	-
2	-215,6 ^a	
3	51,9	4,11(t, 7,5)
4	20,0	2,24 (qui., 7,5)
5	31,2	3,18 (t; 7,8)
6	163,8	-
7	106,1	7,00 (s)
8	178,5	-
9	-129,7 ^a	8,99 (s) NH
10	-	8,33 (s) NH
11	37,3	2,66 (t, 7,5)
12	27,5	1,63 (qui, 6.9)
13	27,5	1,24 (m)
14	28,8	1,24 (m)
15	28,7	1,24 (m)
16	28,6	1,24 (m)
17	28,5	1,24 (m)
18	22,0	1,24 (m)
19	14,0	0,84 (t, 6,7)

^aAs atribuições de ^{15}N foram feitas com base nas correlações observadas em ^{15}N IrHMQC.

4.3. Referências

- BERLINCK, R. G. S.; BRAEKMAN, J. C.; DALOZE, D.; BRUNO, I.; RICCIO, R.; FERRI, S.; SPAMPINATO, S.; SPERONI, E. Polycyclic guanidine alkaloids from the marine sponge *Crambe crambe* and Ca⁺⁺ channel blocker activity of crambescidin 816. **Journal of Natural Products**, v. 56, p.1007-1015, 1993.
- BERLINCK, R. G. S.; BRAEKMAN, J. C.; DALOZE, D. Crambines C1 and C2: two further ichthyotoxic guanidine alkaloids from the sponge *Crambe crambe*. **Journal of Natural Products**, v. 55, p. 528-532, 1992.
- BONDU, S.; GENTA-JOUE, G.; LEIRÒS, M.; VALE, C.; GUIGONIS, J-M.; BOTANA, L. M.; THOMAS, O. P. Additional bioactive guanidine alkaloids from the Mediterranean sponge *Crambe crambe*. **RSC Advances**, v. 2, p.2828–2835, 2012.
- JARES-ERIJMAN, E. A.; INGRUM, A.; SUN, F.; RINEHAR, K. L. On the structures of crambescins B and C1. **Journal of Natural Productss**, v. 56, p. 2186-2188, 1993.
- MARTÍN, V.; VALE, C.; BONDU, S.; THOMAS, O. P.; VIEYTES, M. R.; BOTANA, L. M. Differential effects of crambescins and crambescidin 816 in voltage-gated sodium, potassium and calcium channels in neurons chemical. **Research in toxicology**, v. 26, p. 169–178, 2013.

CAPÍTULO V- Estudo químico da fração Ma50MeOH: crambescidinas e derivados

5.1. Definição, propriedades e atividades biológicas das crambescidinas

As ptilomicalinas e crambescidinas são alcaloides guanidínicos pentacíclicos complexos que apresentam um núcleo heterocíclico pentacíclico composto de um esqueleto básico (5,6,8b)-triazaperhidroacenaftaleno espiro-fundidos com anéis oxaciclopentano (ou oxacicloheptano), e oxaciclohexano (JARES-ERIJMANM, SAKAI e RINEHART, 1991; BERLINCK *et al.*, 1993; TAVARES *et al.*, 1994; BRAEKMAN *et al.*, 2000; BENSEMOUN *et al.*, 2007; MAKARIEVA, *et al.*, 2012). As crambescidinas foram isoladas a partir de uma grande variedade de esponjas marinhas como *Ptilocaulis spiculifer*, *Crambe crambe* e *Monanchora arbuscula* entre outras. O primeiro composto isolado do grupo das crambescidinas foi a ptilomicalina A (**Figura 33**), (KASHMAN e SHULAMIT, 1989; ARON *et al.*, 2005; BENSEMOUN *et al.*, 2007).

Figura 33. Ptilomicalina A, alcaloide guanidínico pertencente à família das crambescidinas.

A ptilomicalina A foi inicialmente isolada da esponja marinha *Hemimyscale* sp., coletada no mar vermelho e de uma esponja caribenha identificada como *Ptilocaulis spiculifer*. A ptilomicalina A e outros alcaloides guanidínicos pertencentes à família das Crambescidinas, como a crambescidina 800, 815, 830 e as monanchodinas A, B, C e D entre outras foram isoladas das esponjas *Crambe crambe*, *Monanchora arbuscula* e *Monanchora* sp.

Figura 34. Alcaloides guanidínicos da família das crambescidinas.

A grande variedade de atividades biológicas apresentadas por essa família se deve à sua estrutura química peculiar. Citotóxica contra várias células tumorais, atividade antifúngica contra *Candida albicans*, atividade antiviral contra o vírus do Herpes e o HIV, entre outras atividades (JARES-ERIJMAN *et al.*, 1991; ARON *et al.*, 2004; RUBIOLO *et al.*, 2014). Muitos desses compostos estão passando por fases de desenvolvimento para obtenção de possíveis agentes anti-cancêr (JARES-ERIJMAN *et al.*, 1991; DALISAY *et al.*, 2004; ARON *et al.*, 2005; MAKARIEVA *et al.*, 2012; TABAKMAKHER *et al.*, 2013).

Tais alcaloides apresentam um grupo espermidina em sua estrutura no final da cadeia alifática (PALAGIANO *et al.*, 1995; MAKARIEVA *et al.*, 2012). O núcleo

pentacíclico e a cadeia alifática substituída pela espermidina ou derivados foram nomeados por OHTANI *et al.*, como navio e âncora, respectivamente (**Figura 35**). (OHTANI *et al.*, 1992; TABAKMAKHER *et al.*, 2013).

Figura 35. Ptilomicalina A: alcaloide guanidínico pertencente à família das crambescidinas.

Relatos na literatura discutem o impacto do tamanho da cadeia alifática nas atividades biológicas observadas para esta classe de alcaloides (ARON *et al.*, 2005). Experimentos mais aprofundados acerca das atividades biológicas realizadas por Aron *et al.*, mostrou que a presença da cadeia alifática central nas crambescidinas exerce grande influencia no potencial bioativo desses compostos. Entretanto, há pouca compreensão de como a natureza da cadeia alifática influencia nas atividades biológicas (ARON *et al.*, 2005). Uma razão para a falta de estudos sistemáticos nesta área é a incapacidade para remover a cadeia a partir de uma modificação estrutural dessas moléculas sem destruir os núcleos guanidínicos constituindo-se, assim, um desafio a ser superado (ARON *et al.*, 2005).

Quanto à biossíntese desta classe de alcaloides, considera-se que a pulchranina A, B ou C são provavelmente precursores biossintéticos de uma série de alcaloides guanidínicos como as batzelladinas e crambescidinas (**Figura 36**). Segundo a literatura, a pulchranina A seria o precursor biossintético da parte barco

(GUZII *et al.*, 2013). Já a parte ancora tem como precursores biossintéticos um ω -ácido graxo e uma espermidina (MAKARIEVA, *et al.*, 2012).

Figura 36. Ptilomicalina A alcaloide guanidínico pertencente à família das crambescidinas.

5.2. Estudo químico da fração Ma50MeOH

A fração Ma50MeOH foi analisada por HPLC-UV-ELSD-MS, verificando-se a presença de crambescidinas e derivados, ptilocaulinas. Sendo assim, essa fração foi fracionada por cromatografia em Sephadex LH-20, usando-se MeOH como eluente. Foram obtidas cinco frações da separação da fração Ma50MeOH (**Figura 37**).

Figura 37. Fluxograma do fracionamento da fração Ma50MeOH.

O rendimento desta separação foi de 98%. As frações obtidas foram analisadas por HPLC-PDA-ELSD-MS. As frações **Ma5Me-2** e **Ma5Me-4** apresentaram picos com espectros de massas que indicaram a presença de alcaloides guanidínicos das

classes das crambescidinas, ptilomicalinas e derivados na fração Ma5Me-2 e ptilocaulinas e derivados na fração Ma5Me-4.

5.2.1. Fracionamento da fração Ma5Me-2

A fração Ma5Me-2 foi separada por cromatografia em coluna de sílica gel derivatizada com grupos diol como fase estacionária. Esta separação forneceu sete subfrações (**Figura 38**). As subfrações Ma5Me-3F e Ma5Me-3G tiveram seus perfis analisados por HPLC-PDA-ELSD-MS, apresentando picos com $[M+H]^+$ entre m/z 784-830,0 Da, indicando a presença de alcaloides guanidínicos da família das crambescidinas. Já as demais frações, apresentaram picos com $[M+H]^+$ entre m/z 600-700,0 Da, indicando a presença de alcaloides guanidínicos da família das batzelladinas.

Figura 38. Fluxograma do fracionamento da fração Ma5Me-2.

5.2.2. Isolamento dos constituintes químicos da subfração Ma5Me-3F

Figura 39. Fluxograma da obtenção do composto 2.

A amostra Ma5Me-3F (**Figura 40**), foi fracionada por HPLC-ELSD semipreparativo, utilizando-se um gradiente de 55:75 a 65:25 MeOH em 0,1%TFA, durante 37 min., e uma coluna C₈-3 e fluxo de 1 mL/min., resultando no isolamento de um composto com [M+H]⁺ em *m/z* 783 (**Figura 41**). Esse composto possui massa correspondente à de compostos da classe das crambescidinas correspondendo, especificamente, ao composto conhecido como fromiamicalina.

Figura 40. Cromatograma HPLC-ELSD da fração Ma5Me-3F.

Figura 41. Cromatograma HPLC-MS e espectro de massas da fromiamicalina. Coluna C₈-3; Fluxo 1 mL/min.; Eluente: gradiente curto de 40:60 a 75:25, H₂O:MeOH com 0,1% de TFA durante 37min.

5.2.3. Identificação da fromiamicalina (2)

O composto **2** [α]_D = -13,0° (c. 0,05 MeOH) (**Figura 42**), foi isolada na forma de um óleo. O espectro de massas HRESI-MS desse composto apresentou um sinal em m/z 783,60809 (100%), correspondendo ao aduto protonado $[M+H]^+$. Também foi observado um sinal em m/z 897,60046 (85%), que corresponde ao aduto formado com o ácido trifluoroacético $[M+TFA]^+$.

Figura 42. Estrutura da fromiamicalina.

O espectro RMN de 1H de **2** apresentou sinais característicos de estruturas da família das crambescidinas. Foram observados sinais de hidrogênios de metilas em δ_H 1,08 (d; 3H; 6,24 Hz), δ_H 0,84 (t; 3H; 7,2 Hz) e dois hidrogênios de carbono sp^2 em δ_H 5,71 (m; 1H) e δ_H 5,50 (dt; 1H; 10,9 Hz). Também foram observados vários sinais de hidrogênios oximetilênicos, oximetínicos e de hidrogênios metilênicos ligados a nitrogênio na região entre δ_H 4,5 e 2,5, bem como hidrogênios metilênicos de uma cadeia alifática longa em δ_H 1,22. Esses dados correspondem a alguns sinais que indicam que o referido composto é um composto da família das crambescidinas.

O espectro RMN de ^{13}C confirmou a presença de todos os grupos observados no espectro de hidrogênio: duas metilas em δ_C (9,4 e 17,9), e dois carbonos sp^2 em δ_C 132,9 e em δ_C 129,8. Também foram observados vários sinais de carbonos oximetilênicos, oximetínicos, metilênicos e metínicos, além de evidenciar a presença de uma carbonila de éster na molécula em δ_C 168,7, um carbono de amidina em δ_C 164,7 e um carbono guanidínico em δ_C 148,0.

O padrão observado no espectro de hidrogênio e carbono é semelhante ao da família das crambescidinas, que apresenta um núcleo guanidínico pentacíclico, formado por

uma parte guanidina tricíclica, como indicado pelo deslocamento em δ_c 148,0, espiro fundida aos anéis oxacicloheptano e oxaciclohexano, na parte barco. A parte âncora da molécula é formada por uma cadeia polimetilênica, como observado no espectro de RMN de 1H (δ_H 1,22), ligada a uma amidina (δ_c 164,7).

O espectro de massas HRESI MS/MS, do composto **2** apresentou íons característicos em m/z 696,5466 (30%), foi observado o íon fragmento correspondendo à perda de um grupo aminohidroxibutil $[M+H-C_4H_9NO]^+$ e em m/z 386,24417 (80%) o íon fragmento que indica a presença de um sistema guanidínico pentacíclico na molécula.

Com esses dados foi possível determinar o tamanho da cadeia lateral pela diferença da massa molar protonada m/z 783,60809 (100%), $[M+H]$ com íon fragmento em m/z 386,24417 $[M+H-C_{23}H_{46}N_3O_2]^+$ que resulta em uma massa que corresponde aos grupos oxipolimetilênico ($C_{15}H_{30}O$, cadeia lateral), aminohidroxibutil (C_4H_9NO) e amidina ($C_4H_6N_2$). Além disso, foi observado também o íon fragmento m/z 765,60077(100%), indicando perda de água $[M+H-H_2O]$ (**Figura 44**).

A partir da análise do mapa de contorno $gHMBC$, foi possível posicionar os grupos oxipolimetilênico, aminohidroxibutil, amidina e o núcleo guanidínico pentacíclico a partir das correlações observadas dos hidrogênios em δ_H 4,34 (m, H-13) e δ_H 4,13 (m, H-23) com o carbono em δ_c 168,8 (C-22), dos hidrogênios em δ_H 3,36 (dd, H-42) e δ_H 3,60 (m) com os carbonos em δ_c 38,5 (C-39) e δ_c 164,7 (C-38). Muitas outras correlações confirmaram a posição dos grupos aminohidroxibutil e amidina são apresentadas na figura 43.

Figura 43. Correlações essenciais observadas nos espectros *g*COSY e *g*HMBC da fromiamicalina.

A análise desses dados e comparação com a literatura (PALAGIANO, *et al.*, 1995), possibilitou identificar o composto como sendo a fromiamicalina. A fromiamicalina foi isolada pela primeira vez da estrela-do-mar *Fromia monilis*. Este composto apresenta uma potente atividade citotóxica com CC_{50} de 0,11 μ g/mL. Nosso estudo é o primeiro relato do isolamento da fromiamicalina a partir da esponja marinha *Monanchora arbuscula*, indicando que provavelmente a estrela-do-mar se alimenta de esponjas a partir das quais captura o alcaloide.

Figura 44. Íons fragmentos observados pela análise HRESI MS/MS da fromiamicalina.

Tabela 2. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da fromiamicalina (**2**) em $\text{MeOH}-d_4$ (J em Hz)

Posição	$^{13}\text{C}^*$	$^1\text{H}^*$	$^{13}\text{C}^\#$	$^1\text{H}^\#$
1	9,4	0,85 (t, 7,2)	10,8	0,89 (t; 7,3)
2	25,6	1,50 (m)	30,6	1,48 (m); 1,58 (m)
3	70,8	4,41 (dl, 10,4)	72,3	4,45 (dl; 10,3)
4	132,9	5,50 (dt, 10,9 Hz)	134,3	5,55 (dt; 10,5 Hz)
5	129,8	5,71 (m)	131,3	5,75 (m)
6	23,0	2,40 (m); 2,15(m)	24,4	2,04 (dd; 13,4 e 5,7); 2,41 (m)
7	36,9	2,34 (m)	38,1	2,41(m)
8	83,7	-	85,1	-
9	36,4	2,64 (dd, 12,9 e 4,8); 149 (m)	37,8	2,68 (dd); 145 (t)
10	54,1	4,04 (m)	55,5	4,08 (m)
11	26,1	2,33 (m); 1,65 (m)	31,5	2,32 (m); 1,60 (m)
12	29,3	2,49 (m); 181 (m)	27,6	2,38 (m); 185 (m)
13	52,6	4,34 (m)	54,0	4,38 (m)
14	49,9	3,02 (d, 5,8)	50,7	3,12 (d; 5,0)
15	80,7	-	82,1	-
16	31,3	1,80 (m); 1,50 (m)	32,6	1,75 (m); 1,55 (m)
17	18,0	1,83 (m)	19,5	1,87 (m); 1,95 (m)
18	31,2	1,80 (m); 1,53 (m)	33,0	1,32 (m); 1,72 (m)
19	66,9	3,80 (m)	68,4	3,89 (m)
20	20,6	1,09 (d, 6,2)	21,8	1,13 (d; 6,3)
21	149,0	-	150,1	-
22	168,8	-	170,2	-
23	66,9	4,13 (m)	66,5	4,17 (t; 6,6)
24	31,2	162 (m)	29,6	1,63 (m)
25	30,0	1,30(m)	27,0	1,32(m)
26	29,0	1,30 (m)	30,1	1,32(m)
27	29,0	1,30 (m)	30,1	1,32 (m)
28	29,0	1,30 (m)	30,1	132 (m)
29	29,0	1,30 (m)	30,1	1,32 (m)
30	29,0	1,30(m)	30,1	1,32(m)
31	29,0	1,30(m)	30,1	1,32(m)
32	29,0	1,30 (m)	30,1	1,32(m)
33	29,0	1,30(m)	30,1	1,32(m)
34	29,0	1,30 (m)	30,1	1,32(m)
35	29,0	1,30 (m)	30,1	1,32 (m)
36	30,1	2,30 (m)	30,6	2,10 (m)
37	31,3	2,47 (m); 2,48 (m)	32,8	2,80 (m); 2,52 (m)
38	164,8	-	166,2	-
39	38,5	3,58(m); 3,54(m);	47,8	3,54 (m); 3,61 (m)
40	18,5	2,05 (m)	19,8	2,10 (m)
41	38,5	3,38 (m)	39,9	3,42 (m); 3,64 (m)
42	54,1	3,36 (dd, 14,5 e 2,6); 3,60 (m)	58,5	3,42 (dd, 14,0 e 3,5); 3,64(dd, 14,0 e 10,0)
43	66,9	3,84 (m)	67,1	4,08 (m)
44	36,9	1,88 (m)	32,6	1,88 (m); 178 (m)
45	36,4	3,11 (m)	38,4	3,16 (m)

*Isolada, ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz); #Dados da literatura (PALAGIANO, *et al.*, 1995), ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125MHz)

5.2.4. Isolamento dos constituintes químicos da subfração Ma5Me-3G

Figura 45. Fluxograma da obtenção do composto 3.

A subfração **Ma5Me-3G** foi fracionada por HPLC-ELSD semipreparativo, utilizando-se um gradiente de 40:60: a 30:70 H₂O:MeOH com 0,1%TFA durante 37 min., e uma coluna C₈-3, resultando no isolamento de um composto com [M+2H]²⁺ em *m/z* 401 (subfração Ma5Me-3G4). Essa massa corresponde à massa do composto conhecido como crambescidina 800. A crambescidina 800 teve sua estrutura confirmada após a análise de seus dados espectroscópicos como RMN de ¹H, ¹³C e espectrometria de massas, e comparação com dados da literatura (JARES-ERIJMAN *et al.*, 1991).

O cromatograma de isolamento da crambescidina 800 está ilustrado na figura 46. A partir de um gradiente exploratório em HPLC-ELSD foi possível ajustar um gradiente curto para encontrar o método que conseguisse separar o composto majoritário dos minoritários, sendo possível o isolamento da crambescidina 800. Entretanto, não foi possível isolar compostos minoritários com uma quantidade de massa razoável e pureza adequada para sua completa identificação.

Figura 46. Cromatogramas HPLC-ELSD da fração Ma5Me-3G (A e B) e da crambescidina 800 (C). Condições de separação: coluna C₈-3; Fluxo 1 mL/min.: A- gradiente de 90:10: a 0:100 H₂O:MeOH com 0,1% de TFA durante 22 min.; B- gradiente curto de 40:60: a 30:70 H₂O:MeOH com 0,1% de TFA durante 37min.; C- gradiente de 90:10: a 0:100 H₂O:MeOH com 0,1% de TFA durante 22 min.

5.2.5. Identificação da crambescidina 800 (3)

A crambescidina 800 (**3**) foi isolada na forma de um óleo. Seu espectro de massas ESI no modo positivo obtido por LC-MS apresentou um sinal em m/z 401,4 (100%), correspondendo ao aduto $[M+2H]^{2+}$ e um pico em m/z 801,1 (28%), correspondendo ao íon $[M+H]^+$.

Figura 47. Estrutura da crambescidina 800 (**3**).

O espectro RMN de 1H de **3** apresentou dois hidrogênios ligados a carbono sp^2 em δ_H 5,70 (m) e δ_H 5,49 (d; 1H; 10,9 Hz), vários sinais de hidrogênios entre δ_H 1,50 e 4,50, que correspondem a hidrogênios metínicos e metilênicos. Também, foi observado um sinal intenso em δ_H 1,38 (s), que corresponde a vários hidrogênios de uma cadeia metilênica, bem como duas metilas, em δ_H 0,84 (t; 3H; 7,1 Hz) e em δ_H 1,00 (d; 3H; 6,0 Hz).

O espectro RMN de ^{13}C do composto **3** apresentou uma carbonila de éster em δ_C 176,1, uma carbonila de amida em δ_C 168,7, um carbono guanidínico em δ_C 148,8 e dois carbonos sp^2 em δ_C 132,9 e em δ_C 129,8.

O padrão observado no espectro de hidrogênio e carbono é semelhante ao da fromiamicalina. Entretanto, foi observada a ausência do carbono de amidina no espectro de RMN de ^{13}C do composto **3**. A comparação dos dados de RMN de 1H e ^{13}C do composto **3** com dados da literatura (JARES-ERIJMAN *et al.*, 1991) indicou que se tratava da crambescidina 800, um alcaloide guanidínico muito comumente isolado de esponjas da família Crambeidae.

Tabela 3. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da crambescidina 800 (**3**) em $\text{MeOH-}d_4$

Posição	$^{13}\text{C}^*$	$^1\text{H}^*$ (J em Hz)	$^{13}\text{C}^\#$
1	10,8	0,84 (t, 7,2)	9,4
2	30,2	1,47 (m); 1,57 (m)	26,2
3	72,2	4,41 (dl, 9,5)	72,2
4	134,3	5,50 (dl, 10,9)	133,0
5	131,2	5,70 (tl, 8,0)	129,3
6	24,4	2,17 (m); 241 (m)	23,0
7	34,1	1,99 (m); 2,37(m)	36,5
8	85,1	-	83,6
9	37,6	1,52(m); 2,63 (dd, 5,0; 12,0)	37,1
10	55,5	4,05 (m)	54,1
11	30,6	1,60 (m); 2,30 (m)	30,2
12	26,6	1,82 (m); 2,33 (m)	28,2
13	54,2	4,34(m)	52,5
14	68,3	3,02 (d, 5,0)	49,4
15	82,0	-	80,6
16	36,7	1,99 (m)	32,8
17	21,8	1,24 (d, 6,24)	18,1
18	19,3	1,69 (m); 1,50 (m)	32,1
19	30,2	1,73 (m); 182 (m)	70,9
20	68,6	3,9 (m)	20,4
21	20,3	1,08 (d, 6,18)	151,3
22	150,2	-	168,6
23	169,9	-	65,1
24	67,0	4,14 (m)	29,3
25	30,5	1,65 (m)	29,3
26	30,4	1,46 (m)	29,3
27	30,7	1,81 (m)	29,3
28	30,7	1,35 (m)	29,3
29	30,7	1,35 (m)	29,3
30	30,7	1,35 (m)	29,3
31	30,7	1,35 (m)	29,3
32	30,7	1,35 (m)	29,3
33	30,8	1,35 (m)	29,3
34	30,8	1,82 (m)	29,3
35	31,4	1,82 (m)	29,3
36	32,7	1,50 (m)	29,3
37	33,0	2,33 (m)	25,6
38	177,5	-	32,8
39	43,8	3,6 (m); 3,4 (m)	176,0
40	26,5	1,84 (m)	42,5
41	50,8	2,65 (m)	25,3
42	54,8	3,6 (m); 3,4 (m)	36,5
43	27,4	1,60 (m)	53,4
44	26,5	1,15 (m)	67,0
45	38,4	2,49 (m)	32,3

*Isolada, ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz); #Dados da literatura (JARES-ERIJMAN *et al.*, 1991), ^{13}C (125MHz)

5.3. Referências

- ARON, Z. D.; PIETRASZKIEWICZ, H.; OVERMAN, L. E.; VALERIOTE, F.; CUEVAS, C. Synthesis and anticancer activity of side chain analogs of the crambescidin alkaloids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.14, p. 3445-3449, 2004.
- ARON, Z. D.; OVERMAN, L. E. Total synthesis and properties of the crambescidin core zwitterionic acid and crambescidin 359. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, p. 3380-3390, 2005.
- BENSEMHOUN, J.; BOMBARDA, I.; AKNIN, M.; VACELET, J.; GAYDOU, E. M. Ptilomycalin D, a polycyclic guanidine alkaloid from the marine sponge *Monanchora dianchora*. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 2033–2035, 2007.
- BENSEMHOUN, J.; BOMBARDA, I.; AKNIN, M.; VACELET, J.; GAYDOU, E. M. Ptilomycalin D, a polycyclic guanidine alkaloid from the marine sponge *Monanchora dianchora*. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 2033–2035, 2007.
- BRAEKMAN, J. C.; DALOZE, D.; TAVARES, R.; HAJDU, E.; VAN SOEST, R. W. M. Novel polycyclic guanidine alkaloids from two marine sponges of the genus *Monanchora*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p.193-196, 2000.
- BERLINCK, R. G. S.; BRAEKMAN, J. C.; DALOZE, D.; BRUNO, I.; RICCIO, R.; FERRI, S.; SPAMPINATO, S.; SPERONI, E. Polycyclic guanidine alkaloids from the marine sponge *Crambe crambe* and Ca⁺⁺ channel blocker activity of crambescidin 816. **Journal of Natural Products**, v. 56, p.1007-1015, 1993.
- DALISAY, D. S.; SALUDES, J. P.; MOLINSKI, T. F. Ptilomycalin A inhibits laccase and melanization in *Cryptococcus neoformans*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, p. 6654-7, 2011.
- JARES-ERIJMAN, E. A.; SAKAI, R.; RINEHART, K. L. Crambescidins: new antiviral and cytotoxic compounds from the sponge *Crambe crambe*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 56, p. 5712–5715, 1991.
- GUZII, A. G.; MAKARIEVA, T. N.; KOROLKOVA, Y. V.; ANDREEV, Y. A.; MOSHAROVA, I. V.; TABAKMAHER, K. M.; DENISENKO, V. A.; DMITRENOKA, P. S.; OGURTSOVA, E. K.; ANTONOV, A.S.; LEE, H-S.; GRISHIN, E. V. Pulchranin A, isolated from the far-eastern marine sponge, *Monanchora pulchra*: the first marine non-peptide inhibitor of TRPV-1 channels. **Tetrahedron Letters**, v. 54, p. 1247-1250, 2013.
- KASHMAN, Y.; SHULAMIT, H. Ptilomycalin A: A novel polycyclic guanidine alkaloid of marine. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, p. 8925-8926, 1989.
- MAKARIEVA, T. N.; OGURTSOVA, E. K.; KOROLKOVA, Y. V.; ANDREEV, Y. A.; MOSHAROVA, I. V.; TABAKMAHER, K. M.; GUZII, A. G.; DENISENKO, V. A.; DMITRENOK, P. S.; LEE, H. S.; GRISHIN, E. V.; STONIK, V. A. Pulchranins B and C, new acyclic guanidine alkaloids from the Far-Eastern marine sponge *Monanchora pulchra*. **Natural Products Communications**, v. 8, p. 1229-1232, 2013.

MAKARIEVA, T. N.; TABAKMAHERA, K. M.; GUZIIA, A. G.; ENISENKO, V. A.; DMITRENOKA, P. S.; KUZMICH, A. S.; LEEB, H-S.; STONIK, V. A. Monanchomycalins A and B, unusual guanidine alkaloids from the sponge *Monanchora pulchra*. **Tetrahedron Letters**, v. 53, p. 4228-4231, 2012

OHTANI, I.; KUSUMI, T.; KAKISAWA, H.; KASHMAN, Y.; HIRSH, S. Structure and chemical properties of ptilomycalin A. *Journal of The American Chemical Society*, v. 114, p.8472-8479, 1992.

PALAGIANO, E.; MARINO, S. DE; MINALE, L.; RICCIO, R.; ZOLLO, F.; IORIZZI, M.; CARRÉ, J. B.; DEBITUS, C.; LUCARAIN, L.; PROVOST, J. Ptilomycalin A, crambescidin 800 and related new highly cytotoxic guanidine alkaloids from the starfishes *Fromia monilis* and *Celerina heffernani*. **Tetrahedron**, v. 5, p. 3675-3682, 1995.

RUBIOLO, J. A.; TERNON, E.; LÓPEZ-ALONSO, H.; THOMAS, O. P.; VEGA, F. V.; VIEYTES, M. R.; BOTANA, L. M. Crambescidin-816 Acts as a Fungicidal with More Potency than Crambescidin-800 and -830, Inducing Cell Cycle Arrest, Increased Cell Size and Apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Marine drugs**, v.11, p. 4419-4434, 2013.

TABAKMAKHER, K. M.; DENISENKO, V. A.; GUZII, A. G.; DMITRENOK, P. S.; DYSHLOVOY, S. A.; LEE, H. S.; MAKARIEVA, T. N. Monanchomycalin C, a new pentacyclic guanidine alkaloid from the far-eastern marine sponge *Monanchora pulchra*. **Natural Products Communications**, v. 8, p. 1399-1402, 2013.

TAVARES, R.; DALOZE, D.; BRAEKMAN, J. C.; HAJDU, E.; MURICY, G. VAN SOEST, R. W. M. Isolation of crambescidin 800 from *Monanchora arbuscula* (Porifera). **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 22, p. 645-646, 1994.

CAPÍTULO VI- Estudo químico da fração Ma50MeOH: ptilocaulinas, mirabilinas e derivados

6.1. Ptilocaulinas, mirabilinas e derivados

As ptilocaulinas, mirabilinas e netaminas são alcaloides guanidínicos tricíclicos, apresentando como esqueleto básico uma estrutura (5,6,8b)-triazaperhidroacenaftileno. Esses compostos foram isolados exclusivamente de seis esponjas da ordem Poecilosclerida (*Monanchora arbuscula*, *Mananchora unguifera*, *Arenochalina mirabilis*, *Batzella* sp., e *Biemma laboutei*), e também de uma esponja da ordem Axinellida, *Ptilocaulis spiculifer* (GROS *et al.*, 2014). Essa família de compostos apresenta uma grande variedade de derivados, sendo as principais diferenças entre os metabólitos dessa subclasse: a) a extensão da cadeia alifática lateral, que pode variar desde seu tamanho até a hibridização dos carbonos que formam a cadeia carbônica; b) oxidações que podem ocorrer por toda a molécula, chegando a formar compostos poli-insaturados (YU, POCHAPSKY e SNIDER, 2008); c) hidroxilação que ocorre exclusivamente no anel substituído oela cadeia alquila.

Estes alcaloides foram isolados pela primeira vez a partir das esponjas marinhas *Batzella* spp., e *Ptilocaulis spiculifer* (HARBOUR *et al.*, 1981; TAVARES e BRAEKMAN, 1995; PATIL, *et al.*, 1997; SOREK *et al.*, 2006). O núcleo guanidínico forma um núcleo 2-aminotetrahidropirimidínico.

O primeiro metabólito isolado dessa família de alcaloides guanidínicos foi a ptilocaulina (**Figura 48**), a partir da esponja *Ptilocaulis spiculifer*. A ptilocaulina apresentou potente atividade antimicrobiana *in vitro*, bem como atividade citotóxica *in vitro* contra células de leucemia murina L1210, contra adenocarcinomas do cólon e mamários, melanomas, leucemias, fibroblastos e células linfoides, com um IC₅₀ de 0,05 µg/mL. Essa atividade é comparável com a de muitos medicamentos usados contra o câncer. Entretanto, a ptilocaulina apresentou toxicidade *in vivo* de 50 a 25 mg/kg em camundongos com o tumor L1210 (RUBEN *et al.*, 1989).

As mirabilinas e netaminas (**Figura 48**) apresentam esqueleto básico (5,6,8b)-triazaperhidroacenaphtileno oxidado, contendo um anel pirimidínico, deixando, assim,

de ser alcaloides guanidínicos para se tornarem alcaloides pirimidínicos (GROS *et al.*, 2014).

Figura 48. Alcaloides guanidínicos tricíclicos: ptilocaulinas, mirabilinas e netaminas.

As mirabilinas e ptilocaulinas são relativamente apolares, geralmente isoladas de frações eluídas em colunas de fase reversa contendo de baixa a média porcentagem de água, muito provavelmente devido ao esqueleto tricíclico e cadeias alifáticas que estes compostos apresentam (CAPON, MILLER e ROONEY, 2001; SOREK *et al.*, 2006). Esses metabólitos apresentam atividades biológicas como a inibição do vírus HIV, citotoxicidade, atividades antifúngica e antimicrobiana entre outras. (HUA *et al.*, 2004).

6.2. Estudo químico da subfração Ma5Me-4 obtida de Ma50MeOH

A subfração Ma5Me-4 foi obtida a partir da separação da fração Ma50MeOH por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (**Figura 49**). A análise da subfração Ma5Me-4 por LC-PDA-ELSD-MS, apresentou sinais $[M+H]^+$ com m/z entre 240-250 Da, e espectros de UV característicos de alcaloides pirimidínicos substituídos por um grupo amina (GROS *et al.*, 2014).

Figura 49. Cromatograma HPLC-MS da fração subfração Ma5Me-4. Condições de análise: coluna C₈-3; Fluxo de 1mL/min.; gradiente curto de 50:50 a 70:30 H₂O/MeOH com 0,1% de TFA durante 37min: **A**-Cromatograma HPLC-MS; **B**-Espectros de massas.

O fracionamento da subfração Ma5Me-4 foi realizado por HPLC-UV semipreparativo, utilizando coluna C₈-3 como fase estacionária. Foram obtidas seis subfrações. A subfração Ma5Me-4D teve seu perfil analisado por LC-MS, apresentando vários picos $[M+H]^+$ com m/z entre 200-260. Os espectros no UV dos picos detectados apresentaram várias bandas, indicando tratar-se de compostos altamente conjugados como pirimidinas da classe das mirabilinas e/ou netaminas (GROS *et al.*, 2014). Essa subfração foi então purificada em HPLC-UV semipreparativo, utilizando um gradiente de 50:50 a 30:70 H₂O:MeOH com 0,1%TFA durante 37 minutos em uma coluna C₈-3, resultando no isolamento da arbusculidina

(4) (Figura 50), posteriormente identificada através da análise dos espectros de massas, RMN de ^1H e ^{13}C mono e bidimensionais.

Figura 50. Fluxograma da purificação da subfração Ma5Me-4D.

Figura 52. Subestruturas **A** e **B** da arbusculidina (**4**).

O espectro RMN de ^{13}C apresentou sinais de carbonos sp^2 em δ_{C} 183,0, 146,7, 145,6, 145,4, 123,5, 121,0, 130,4, sendo que o carbono em δ_{C} 183,0 (C-3) indica a presença de um carbono sp^2 ligado a nitrogênio. Além disso, observou-se um sinal de carbono guanidínico em δ_{C} 164,0 (C-1) através das correlações do gHMBC com o hidrogênio em δ_{H} 3,10 (m, H-4) (**Figura 54**), indicando haver três átomos de nitrogênio na molécula que é característico do grupo guanidínico. O que possibilitando estabelecer a subestrutura observada na figura 53.

Figura 53. Subestruturas **C** da arbusculidina (**4**).

Com esses dados, foi possível estabelecer que o composto em estudo apresentou um grupo butila, um grupo metila uma cadeia de dois metilenos e um anel aromático na molécula. Portanto, o composto **4** apresentou uma ligação dupla, uma insaturação do carbono guanidínico, um anel aromático e dois ciclos.

A análise do espectro gHMBC indicou que os hidrogênios da metila em δ_{H} 2,43 (s, H-1'') apresentaram correlação com o carbono em δ_{C} 121,0 (C-6), indicando que a

metila se encontra ligada na posição 7. A partir das correlações entre δ_H 3,18 (m, H-1') com os carbonos em δ_C 146,7 (C-8a) e δ_C 145,6 (C-7), foi possível posicionar o grupo butila ligado a C-8. Foram observadas também correlações entre os hidrogênios em δ_H 3,10 (m, H-4) e δ_H 3,03 (m, H-5) com os carbonos em δ_C 164,0 (C-1) e δ_C 183,0 (C-3), respectivamente.

Figura 54. Algumas correlações observadas no gCOSY e gHMBC.

A arbusculidina (**4**) isolada neste trabalho apresenta um esqueleto igual ao das ptilocaulinas, mirabilinas e netaminas (**Figura 55**). Muito provavelmente oxidações deram origem a um anel aromático em sua estrutura, fazendo com que a molécula não possua nenhum centro estereogênico, fato este um tanto incomum, uma vez que todas as moléculas isoladas desta família possuem dois ou mais centros quirais. (HARBOUR *et al.*, 1981; TAVARES e BRAEKMAN, 1995; PATIL, *et al.*, 1997; SOREK *et al.*, 2006).

Figura 55. Comparação entra a ptilocaulina e arbusculidina (4).

A presença desse anel aromático na molécula a torna inédita quando comparada com os demais compostos da mesma família, sendo a primeira molécula isolada dentro de um possível novo grupo de metabólitos pertencentes a esta família, pois esta estrutura não tem correspondente na literatura.

Tabela 4. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da arbusculidina (**4**) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (J em Hz)

Posição	^{13}C (150 MHz)	^1H (600 MHz)
1	-	-
2	164,0	-
3		-
3a	183,0	-
4	33,3	3,10 (m)
5	28,2	3,03 (m)
5a	145,4	-
6	121,0	6,86 (s)
7	145,6	-
8	130,4	-
8a	146,7	-
9	123,5	-
1'	26,3	3,18 (m),
2'	32,6	1,71 (m)
3'	23,7	1,56 (sexteto, 7,3)
4'	14,6	0,97 (t, 7,3)
1'''	21,1	2,43 (s)

6.3. Referências

- CAPON, R. J.; MILLER, M.; ROONEY, F. Mirabilin G: A new alkaloid from a southern Australian marine sponge, *Clathria* Species. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 643–644, 2001.
- GROS, E.; AL-MOURABIT, A.; MARTIN, M-T.; SORRES, J.; VACELET, J.; FREDERICH, M.; AKNIN, M.; KASHMAN, Y.; GAUVIN-BIALECKI, A. Netamines H–N, tricyclic alkaloids from the marine sponge *Biemna laboutei* and their antimalarial activity. **Journal of Natural Products**, v. 77, p. 818–823, 2014.
- HARBOUR, G. C.; TYMIAK, A. A.; RINEHART JUNIOR, K. L. Ptilocaulin and isoptilocaulin, antimicrobial and cytotoxic cyclic guanidines from the caribbean sponge *Ptilocaulis* aff. *P. spiculifer* (Lamarck, 1814). **Journal of the American Chemical Society**, v.103, p. 5604-5606, 1981.
- PATIL, A. D.; FREYER, A. J.; OFFEN, P.; BEAN, M. F.; JOHNSON, R.K. Three new tricyclic guanidine alkaloids from the sponge *Batzella* sp. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 704-707, 1997.
- RUBEN, R. L.; SNIDER, B. B.; HOBBS, F. W. JR.; CONFALONE, P. N.; DUSAK, B. A. Cytotoxicity of synthetic racemic ptilocaulin: a novel cyclic guanidine. **Invest New Drugs**, v.7, p.147-54, 1989.
- SOREK, H.; RUDI, A.; GUETA, S.; REYES, F.; MARTIN, M. J.; AKNIN, M.; GAYDOU, E.; VACELET J.; KASHMAN, Y. Netamines A–G: seven new tricyclic guanidine alkaloids from the marine sponge *Biemna laboutei*. **Tetrahedron**, v. 62, p. 8838–8843, 2006.
- TAVARES, R.; BRAEKMAN, D, C. 8b-hydroxyptilocaulin, a new guanidine alkaloid from the sponge *Monanchora arbuscula*. **Journal of Natural Products**, v. 58, p. 1139-1 142, 1995.
- YU, M.; POCHAPSKY, S. S.; SNIDER, B. B. Synthesis of 7-epineoptilocaulin, mirabilin B, and isoptilocaulin. A unified biosynthetic proposal for the ptilocaulin and batzelladine alkaloids. Synthesis and structure revision of netamines E and G. **Journal of Organic Chemistry**, v. 73, p. 9065–9074, 2008.

CAPÍTULO VII. Estudo químico da fração Ma100MeOH: batzelladinas e derivados

7.1. Definição, propriedades e atividades biológicas das batzelladinas

As batzelladinas constituem uma família de alcaloides guanidínicos, isolados pela primeira vez da esponja Caribenha *Batzella* sp., (GALLIMORE *et al.*, 2005). São genericamente formados por unidades guanidínicas bicíclicas mistas (batzelladina A) e/ou tricíclicas (batzelladina F), usualmente, mais nem sempre, interligados por uma unidade de éster alquílico. Em alguns compostos, têm-se o esqueleto estrutural (5,6,8b)-triazaperhidroacenaftaleno livre ou ligado a um grupo guanidina por uma cadeia conectada através de uma grupo éster (batzelladina K e batzelladina C, respectivamente) (PATIL *et al.*, 1997; HUA *et al.*, 2007). As batzelladinas apresentam potentes atividades biológicas (PATIL *et al.*, 1997; BEWLEY *et al.*, 2004; HUA *et al.*, 2007; LAVILLE *et al.*, 2009; TAKISHIMA *et al.*, 2009; AHMED *et al.*, 2013).

A batzelladina A inibe de maneira competitiva a ligação da proteína do envelope de HIV gp 120 ao receptor da célula CD4+ humana com afinidade micromolar. A síndrome da imunodeficiência adquirida está associada com o declínio progressivo no número de células CD4+, o que por sua vez leva à deficiência do sistema imunológico e, finalmente, à morte, daí a importância de se descobrir substâncias com este perfil de atividade (PATIL *et al.*, 1997; SNIDER e BUSUYEK, 1999; HUA *et al.*, 2007; LAVILLE *et al.*, 2009; TAKISHIMA *et al.*, 2009).

Figura 56. Alcaloides guanidínicos da família das batzelladinas.

7.2. Estudo químico da fração Ma100 MeOH

A Fração **Ma100MeOH** foi fracionada por cromatografia em Sephadex LH-20, usando-se MeOH como eluente. Foram obtidas quatro frações (**Figura 57**). As frações obtidas a partir desta separação foram analisadas por HPLC-PDA-ELSD-MS. A análise da fração Ma100Me-1 apresentou picos com $[M+H]^+$ m/z entre 400-700 Da, indicando a presença de alcaloides guanidínicos da família das batzelladinas. O posterior fracionamento desta fração por HPLC levou ao isolamento de 8 alcaloides guanidínicos.

Figura 57. Fluxograma do fracionamento da fração Ma100MeOH.

7.2.1. Isolamento da norbatzelladina L (5), batzelladina L (6), batzelladina F (7), e batzellamida A (8) a partir da fração Ma100Me-1

A subfração Ma100Me-1, obtida a partir da fração 100% MeOH, foi separada utilizando-se HPLC-ELSD (eluente: gradiente de 30:70 a 25:75 H₂O:MeOH com 0,1%TFA durante 20 minutos, deixando-se 5 minutos em 75:25 MeOH com 0,1%TFA; coluna: Inertsil C₈-3 (5 µm 4,6 x 250 mm); fluxo: 1mL/min., resultando em seis frações. A partir destas frações foram isoladas a norbatzelladina L (5) e a batzelladina L (6) (Figura 58).

Figura 58. Fluxograma de isolamento das batzelladinas nor-L (5) e L (6).

A subfração Ma100Me-1A foi fracionada por HPLC-UV monitorando-se em λ_{max} 205 nm, utilizando-se 40:60 de H₂O:MeOH com 0,1%TFA durante 80 min., em uma coluna Inertsil C₈-4 preparativa (5 μ m 14 x 250 mm), com fluxo de 8 mL/min, resultando em sete subfrações. Destas, a subfração Ma100Me-1A3 foi purificada por HPLC-UV monitorando-se em λ_{max} 205 nm utilizando-se um gradiente de 40:60 a 25:75 de H₂O:MeOH com 0,1%TFA durante 37 minutos, e coluna Inertsil C₈-4 preparativa com fluxo de 8 mL/min., resultando no isolamento da batzelladina F (**7**) (**Figura 59**).

A batzellamida A (**8**), apresentando um esqueleto de carbono inédito na literatura foi isolada a partir da subfração Ma1Me-1A7, purificada por HPLC-UV, monitorando-se em λ_{max} 205 nm e utilizando-se 45:55 H₂O:MeOH-0,1%TFA durante 30 minutos em uma coluna Inertsil C₈-4 analítica com fluxo de 0,8 mL/min. A fração resultante (**Figura 61**) foi repurificada por HPLC-UV em Coluna InertSustain C₁₈, com fluxo de 2,0 mL/min., e 45:55 H₂O: MeCN com 0,05%TFA como eluente em uma corrida cromatográfica de 62 minutos. Tal purificação permitiu a obtenção da batzellamida A (**8**) (**Figura 60**).

Figura 60. Fluxograma de isolamento da batzellamida A (8).

Figura 61. Cromatograma HPLC-UV-ELSD-MS da fração Ma1Me-1A7-A. Coluna Inertsil C₈-4; Fluxo: 0,8 mL/min.; Eluente: gradiente curto de 35:65: a 25:75 H₂O:MeOH com 0,1% de TFA durante 37 min. **A**-Detecção por ELSD; **B**-Cromatograma HPLC-UV; **C**-Cromatograma HPLC-MS.

7.2.2. Identificação da batzellamida A (8)

A batzellamida A (**8**) [α]_D = -9,5° (c. 1,0 MeOH) (**Figura 62**), foi isolado na forma de um sólido incolor. O seu espectro de massas de alta resolução HRESIMS no modo positivo apresentou um sinal de íon molecular protonado [M+H]⁺ em m/z 541,38786, correspondente à fórmula molecular C₃₀H₄₉N₆O₃, com grau de insaturação igual a dez, indicando.

Devido à complexidade de seus espectros de RMN, foi necessária a aquisição de três conjuntos de dados de RMN, obtidos em MeOH-*d*₄ (**Tabela 5**), DMSO-*d*₆ (**Tabela 6**) e C₅D₅N (**Tabela 7**).

Figura 62. Estrutura da batzellamida A (**8**).

Nos espectros de RMN de ¹³C e ¹H obtidos em MeOH-*d*₄, foi possível verificar a presença de um grupo metínico em δ_H 4,98 / δ_C 73,8 (CH-18), acoplado a um grupo metila em δ_H 1,27 / δ_C 20,7 (CH₃-19), um grupo metileno em δ_H 1,61 e 1,53 / δ_C 36,8 (CH₂-17) pertencente a uma cadeia alquila. O grupo em δ_H 4,98 / δ_C 73,8 (CH-18) também mostrou estar acoplado a uma carbonila de éster em δ_C 170,0 (C-20) no espectro gHMBC.

A análise do mapa de contorno gCOSY, indicou observadas correlações entre os hidrogênios (CH₃-19)/CH-18; CH-18/CH₂-17, do metileno CH₂-17 com a cadeia alquila, e finalmente desta com o metileno em δ_H 1,59 e 1,53 / δ_C 35,8 (CH₂-11), levando à construção da subestrutura **A** (**Figura 63**).

Figura 63. Subestrutura **A** da batzellamida A (**8**).

A presença de seis átomos de nitrogênio indicada pela fórmula molecular sugere a presença de dois núcleos guanidínicos como sinais no espectro de ^{13}C em δ_{C} 150,6 e 151,1. Os dois grupos guanidínicos encontram-se em sistemas tricíclicos confirmados pela análise dos espectros *g*COSY e *g*HMBC. A construção de sistema guanidínico tricíclico da subestrutura **B** foi possível pela análise cuidadosa dos espectros de *g*COSY e *g*HMBC, observando-se correlações sequenciais a partir do grupo metila CH_3 -30 (δ_{H} 1,36 / δ_{C} 17,7), com o hidrogênio na posição CH-29 (δ_{H} 4,00 / δ_{C} 50,7), por sua vez conectados a CH-21 (δ_{H} 3,23 / δ_{C} 44,8/44,5), CH-22 (δ_{H} 4,14 / δ_{C} 58,0), CH_2 -23 (δ_{H} 2,38 e 1,68 / δ_{C} 29,1), CH_2 -24 (δ_{H} 2,31 e 1,80 / δ_{C} 31,2), CH-25 (δ_{H} 3,88 / δ_{C} 57,0) e CH_2 -26 (δ_{H} 2,92 e 2,72 / δ_{C} 38,1).

O grupo guanidina foi posicionado no sistema tricíclico observando-se correlações no espectro *g*HMBC entre o hidrogênio da metila CH_3 -30 (δ_{H} 1,36), com o carbono em δ_{C} 151,1, bem como entre os hidrogênios do metileno CH_2 -26 (δ_{H} 2,92 e 2,72) com o carbono de amida em δ_{C} 169,3. Indicando a presença da amida no sistema guanidínico tricíclico, e a construção da subestrutura **B** (**Figura 64**).

Figura 64. Subestrutura **B** da batzellamida A (**8**).

O outro sistema guanidínico tricíclico foi construído observando-se correlações no espectro *g*COSY entre o grupo metila CH₃-1 (δ_H 1,25 / δ_C 20,5), com o hidrogênio na posição CH-2 (δ_H 3,54/ δ_C 47,2), dando sequência a um sistema de spin constituído por CH₂-3 (δ_H 2,21 e 1,25/ δ_C 36,7), CH-4 (δ_H 3,73 / δ_C 57,4), CH₂-5 (δ_H 2,22 e 1,67 / δ_C 31,0), CH₂-6 (δ_H 2,22 e 1,67/ δ_C 31,0), CH-7 (δ_H 3,73 / δ_C 57,4), CH₂-8 (δ_H 2,25 e 1,22/ δ_C 34,7) e CH-9 (δ_H 3,41 / δ_C 51,5). O grupo guanidina foi posicionado pela correlação observada no *g*HMBC entre o hidrogênio da metila em CH₃-1 (δ_H 1,25), com o carbono em δ_C 151,1 o que possibilitou a construção da subestrutura **C** (Figura 65).

Figura 65. Subestrutura **C** da batzellamida A (**8**).

As três subestruturas foram conectadas entre si pela análise de correlações observadas no espectro *g*HMBC. O hidrogênio em CH-9 (δ_H 3,41 / δ_C 51,5) se correlaciona com o carbono em δ_C 35,8 (C-11), indicando que a subestrutura **C** está ligada na posição 11 do grupo alquiléster (subestrutura **A**). Já a subestrutura **B** demonstrou estar ligada na posição 20 da subestrutura **A**, como evidenciado pela correlação entre o hidrogênio em CH-22 (δ_H 4,14), com o carbono de carbonila de éster em δ_C 170,0 (C-20), sendo possível, assim, estabelecer a estrutura da batzellamida A (Figura 66).

Figura 66. Algumas correlações observadas no $g\text{COSY}$ e $g\text{HMBC}$.

No espectro ^{15}N lrHMQC obtido em $\text{DMSO}-d_6$ foi possível observar correlações entre os nitrogênios em δN (-293,0, N-10a, N-28a) com os hidrogênios em δH 1,17 (d, H-1, H-30) entre o nitrogênio em δN (-282,0, N-9a) com o hidrogênio em δH 1,24 (m, H-11) (**Figura 67**).

Figura 67. Correlações observadas no mapa de contorno ^{15}N lrHMQC ($\text{DMSO}-d_6$).

A estereoquímica relativa da batzellamida A foi estabelecida pela análise do seu espectro $t\text{ROESY}$, no qual foram observados os acoplamentos dipolares, por um lado entre H-29 e H-21 bem como entre H-21 e H-22, e por outro lado entre CH_3 -30 e H-25, indicando que estes hidrogênios se situam em uma mesma face do sistema guanidínico tricíclico (subestrutura **B**). Para o sistema tricíclico da subestrutura **A**, o

espectro de *t*ROESY mostrou acoplamentos dipolares entre H-2 (δ_H 3,54) e H-4 (δ_H 3,73) e H-9 (δ_H 3,41), bem como entre o H-9 e H-7 (δ_H 3,73). Os mesmos acoplamentos dipolares foram observados no espectro de *t*ROESY quando obtidos em DMSO- d_6 e C_5D_5N .

Figura 68. Acoplamentos NOE observados para a batzellamida A (8).

Os dados de RMN obtidos em outros solventes foram de grande importância para a confirmação da estrutura da batzelladina A, sendo possível em alguns casos obter o valor de deslocamento e a multiplicidade dos sinais de hidrogênios, que, nos espectros obtidos em MeOH- d_4 , ficaram sobrepostos e/ou ausentes como no caso dos hidrogênios NH.

De forma geral, o conjunto dos dados de RMN registrados com DMSO- d_6 foi semelhante ao obtido em MeOH- d_4 . As diferenças encontradas entre os dois conjuntos de espectros foram observadas com relação ao aspecto e multiplicidades dos sinais. Tais diferenças indicam que possivelmente exista um equilíbrio conformacional da batzelladina A depende do solvente deuterado no qual a amostra é solubilizada. Vários sinais de ^{13}C apareceram duplicados nos espectros de RMN de ^{13}C registrados em MeOH- d_4 , DMSO- d_6 e C_5D_5N , sugerindo a existência de algum equilíbrio dinâmico em solução.

O uso de DMSO- d_6 permitiu obter informações sobre os grupos N-H presentes na batzellamida A. No espectro de RMN de 1H (DMSO- d_6) observou-se dois hidrogênios ligados a nitrogênio (NH), em δ_H 10,08 e 9,79. A análise dos espectros ^{15}N HSQC (DMSO- d_6) e ^{15}N lrHMQC (DMSO- d_6) permitiu atribuir os valores de δ_N -296 (N-9a), δ_N -293 (N-10a), δ_N -243 (N-27a) e δ_N -282 (N-28a) aos átomos de nitrogênio.

Os espectros de RMN registrados em C_5D_5N apresentaram perfis diferentes dos espectros registrados em $MeOH-d_4$ e $DMSO-d_6$, com diferenças significativas de valores de deslocamentos químico e multiplicidade dos sinais. Os sinais de RMN de 1H na posição CH_2-11 (δ_H 1,94 m e 1,00 ddd) indicou a presença de hidrogênios diastereotópicos, com menor deslocamento químico e com uma multiplicidade definida em um deles. Já nos espectros registrados em $MeOH-d_4$ e $DMSO-d_6$ observou-se diferentes valores para CH_2-11 (δ_H 1,59 m e 1,53 m, e em δ_H 1,24 m, respectivamente) (**Figura 69**). O espectro registrado em C_5D_5N também apresentou dois hidrogênios ligados a nitrogênio (NH) em δ_H (10,08 e 9,79).

Essa análise demonstra a impropriedade da escolha do solvente deuterado adequado para a obtenção do conjunto de espectros de RMN. Para a maioria dos alcaloides guanidínicos isolados neste trabalho, a melhor escolha é o $MeOH-d_4$, pois fornece sinais com melhor resolução e com poucas sobreposições.

Figura 69. Comparação dos sinais de menor deslocamento química observados nos espectros de RMN de ^1H em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, $\text{MeOH-}d_4$ e $\text{DMSO-}d_6$, da batzellamida A (**8**).

Características estruturais únicas da batzellamida A incluem a presença da carbonila C-27 e a ausência da cadeia lateral conectada ao carbono 27. A batzellamida A constitui o primeiro exemplo de batzelladina sem a cadeia lateral em C-27, fato que não somente a torna estruturalmente única, mas ilustra a flexibilidade e a versatilidade da rota biossintética de formação destes alcaloides, quando comparada, por exemplo, à batzelladina L (**Figura 70**).

Figura 70. Comparação estrutural entre a batzelladina L (**6**) e a batzellamida A (**8**).

Tabela 5. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da batzellamida A (**8**) em $\text{MeOH-}d_4$ (J em Hz)

Posição	^{13}C (150 MHz)	^1H (600 MHz)
1	20,5	1,25 (d, 6,4)
2	47,2	3,54 (ddq, 2,9, 6,3, 9,6)
3	36,7	2,21 (m); 1,25 (m)
4	57,4/57,5	3,73 (m)
5	31,0	2,22 (m); 1,67 (m)
6	31,0	2,22 (m); 1,67 (m)
7	57,4	3,73 (m)
8	34,7	2,25 (m); 1,22 (m)
9	51,5	3,41 (m)
10	150,6	-
11	35,8	1,59 (m); 1,53 (m)
12	30,4	1,27 (m)
13	30,5	1,27 (m)
14	30,5	1,27 (m)
15	30,5	1,27 (m)
16	30,3	1,27 (m)
17	36,8	1,61 (m); 1,53 (m)
18	73,9/73,8	4,98 (m)
19	20,7	1,27 (d, 6,4)
20	171,0/170,0	-
21	44,8/44,5	3,23 (dd, 5,0, 7,0)
22	58,2/57,9	4,14 (m)
23	29,2/29,0	2,38 (ddd, 12,0, 6,3, 6,2); 1,68 (m)
24	31,2	2,31 (ddd, 12,0, 6,0, 5,8); 1,80 (dddd, 12,0, 12,0, 11,6, 6,0, 6,0)
25	57,0	3,88 (m)
26	38,1	2,92 (ddd, 3,3, 3,3, 13,3); 2,72 (ddd, 16,7, 14,0, 2,1)
27	169,3	-
28	151,1	-
29	50,7	4,00 (m)
30	17,6/17,7	1,36 (d, 6,7)

Tabela 6. Dados de RMN de $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ e ^1H da batzellamida A (**8**) em $\text{DMSO}-d_6$

Posição	^{13}C (150 MHz)	^1H (600 MHz, <i>J</i> em Hz)
1	19,8	1,17 (d, 6,2)
2	45,3	3,45 (m)
3	34,0	1,45 (m); 1,32 (m)
4	55,6	3,65 (m)
5	29,5	2,10 (m); 1,57 (m)
6	29,5	2,10 (m); 1,57 (m)
7	55,5	3,65 (m)
8	32,9	2,16 (m); 1,15 (m)
9	49,5	3,32 (m)
N-9a	-282,0	-
10	149,2	-
N-10a	-293,0	-
11	28,7	1,24 (m)
12	24,5	1,24 (m)
13	28,6	1,24 (m)
14	29,5	1,24 (m)
15	29,6	1,24 (m)
16	24,7	1,24 (m)
17	34,9	2,15 (m); 1,17 (m)
18	71,6	4,86 (tq, 6,3 e 7,0)
19	19,8	1,17 (d, 6,3)
20	168,5	-
21	43,0/42,6	3,20 (dd, 8,0, 3,6)
22	55,9	4,06 (m)
23	27,5	2,27 (ddd, 12,3, 6,1, 6,0); 1,45 (m)
24	29,6	2,18 (m); 1,67 (m)
25	54,8/54,7	3,75 (m)
26	36,8	2,81 (dd, 16,4; 3,8); 2,74 (bdd, 16,3; 13,5)
27	168,4	-
N-27a	-282,0	-
28	148,5	-
N-28a	-293,0	-
29	48,5/48,4	3,93 (m)
30	16,8	1,22 (d, 6,4)
N-H	-	10,08 (s)
N-H	-	9,79 (s)

Tabela 7. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da batzellamida A (**8**) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ (J em Hz)

Posição	^{13}C (150 MHz)	^1H (600 MHz)
1	20,4	1,17 (d, 6,2)
2	46,2	3,30 (m)
3	36,0	1,41 (m); 1,39 (m)
4	56,3	3,34 (m)
5	30,5	1,90 (m)
6	30,5	1,90 (m)
7	56,3	3,34 (m)
8	35,0	1,79 (m); 1,45 (m)
9	50,8	3,21 (m)
10	150,5	-
11	34,0	1,94 (m); 1,00 (ddd, 1,5, 11,4, 22,8)
12	30,0	1,24 (m)
13	29,6	1,24 (m)
14	29,8	1,24 (m)
15	29,7	1,24 (m)
16	25,9/25,8	1,24 (m)
17	36,2/36,1	1,58 (m); 1,42 (m)
18	73,0	5,00 (m)
19	20,3	1,22 (d, 6,4)
20	169,2	
21	43,8/43,6	3,23 (m)
22	57,3/57,0	4,03 (m)
23	28,8	2,28 (m)
24	30,8	2,14 (m); 1,61 (m)
25	56,2/56,1	3,90 (m)
26	38,1	2,93 (bd, 16,3); 2,58 (bdd, 14,8, 14,5)
27	169,1	-
28	151,0	-
29	50,1/50,0	4,00 (m)
30	17,5	1,49 (d, 6,7)
NH	-	10,08
NH	-	9,79

7.2.3. Identificação da norbatzelladina L (5), da batzelladina L (6), e da batzelladina F (7)

A norbatzelladina L (5) [α]_D = -0,6° (c. 0,4 MeOH), (**Figura 71**), foi isolada na forma de um óleo incolor. O espectro de massas HRESIMS no modo positivo desse composto, apresentou sinal de íon molecular protonado [M+H]⁺ em m/z 639,52886 (35%), e um sinal em m/z 320,26819 (100%), correspondendo ao aduto [M+2H]²⁺.

Figura 71. Estrutura do composto 5 (norbatzelladina L).

O espectro RMN de ¹H de 5 apresentou um hidrogênio oximetínico em δ_H 4,98 (m) e vários hidrogênios metínicos com sinais multipletos entre δ_H 3,08 e 3,94, bem como sinais de hidrogênios metilênicos multipletos entre δ_H 1,30 e 2,50. Além disso, foram observados sinais de três grupos metilas em δ_H 1,28 (d; 3H; 6,6 Hz), δ_H 1,24 (d; 3H; 6,4 Hz), δ_H 1,24 (d; 3H; 6,4 Hz) e em δ_H 0,9 (t; 3H; 7,0 Hz).

Esse padrão de espectro de RMN ¹H e ¹³C é muito semelhante ao das batzelladinas. Esses compostos são caracterizados por possuírem dois sistemas guanidínicos tricíclicos e duas cadeias alquila, uma central e outra lateral.

O espectro RMN de ¹³C apresentou uma carbonila de éster em δ_C 170,1, dois carbonos guanidínicos em δ_C 151,3 e 150,9, um carbono oximetínico em δ_C 73,2 e nove sinais de carbonos metínicos entre δ_C 45,4 e 57,8. A fragmentação MS/MS do íon molecular protonado [M+H]⁺ do espectro HRESI MS foi utilizada para determinação dos comprimentos das duas cadeias alquila. A análise por MS/MS indicou a presença de dois picos característicos, em m/z 304,27466 (100%), e em m/z

336,26437 (24%), correspondem ao fragmento da ligação da carbonila de éster oriundo de um rearranjo de McLafferty (NIBBERING, 2004) (**Figura 72**).

Figura 72. Rearranjo de McLafferty observado para as batzelladinas.

A partir da análise do fragmento com massa m/z 336,26437, foi possível estabelecer que este possui um fragmento contendo o núcleo guanidínico **B** conectado a uma cadeia lateral de oito carbonos. Já a análise do fragmento em m/z 304,27466,

indicou que este possui núcleo guanidínico tricíclico **A** conectado a uma cadeia de nove carbonos (**Figura 73**).

Figura 73. Fragmentação por MS/MS da norbatzelladina L (**5**).

A análise dos espectros bidimensionais *g*HSQC, *g*COSY, *g*HMBC e a comparação com dados da literatura (LAVILLE *et al.*, 2009), confirmou que o composto **5** corresponde à norbatzelladina L.

A batzelladina L (**6**) $[\alpha]_D = +19^\circ$ (c. 0,03 MeOH) (**Figura 74**) foi isolada na forma de um óleo incolor e apresentou espectros de RMN de ^1H e ^{13}C com o mesmo perfil de **5**. O espectro RMN ^1H de **6** apresentou um hidrogênio oximetínico em δ_{H} 4,97 m, vários hidrogênios multipletos entre δ_{H} 3,08 e 3,95, que correspondem a hidrogênios metínicos, além de hidrogênios de grupos metileno entre δ_{H} 1,30 e 2,50. Além disso, foram observados sinais de três metilas dubleto em δ_{H} 1,28 (d; 3H; 6,8 Hz), δ_{H} 1,27 (d; 3H; 6,6 Hz), δ_{H} 1,24 (d; 3H; 6,3 Hz) e uma metila triplete em δ_{H} 0,90 (t; 3H; 7,0 Hz). O espectro RMN de ^{13}C de **6** apresentou uma carbonila de éster em δ_{C} 170,1, dois carbonos guanidínicos em δ_{C} 151,8 e 151,3, um carbono oximetínico em δ_{C} 73,6 e nove sinais de carbonos metínicos entre δ_{C} 45,8 e 57,9.

Figura 74. Estrutura da batzelladina L (**6**).

A diferença entre a norbatzelladina L (**5**) e a batzelladina L (**6**) foi observada no espectro de massas HRESIMS no modo positivo. O espectro de massas do composto **6** apresentou um sinal em m/z 327,27634 (100%), correspondendo ao íon molecular diprotonado $[M+2H]^{2+}$, um sinal em m/z 653,54504 (7%), correspondendo ao aduto $[M+H]^+$ e um sinal em m/z 767,53766 (14%), correspondendo a um aduto formado com o ácido trifluoroacético $[M+TFA]^+$.

Dessa forma, verificou-se que a diferença entre os compostos **5** e **6** é de apenas uma unidade de CH_2 . O composto **7** também foi submetido à análise por HRESI MS/MS. Foi observada a presença de dois picos característicos em m/z 304,427487 (100%), e m/z 350,28033 (24%), resultando de um rearranjo de McLafferty (**Figura 72**). A análise do fragmento em m/z 350,28033 foi possível estabelecer apresentava o núcleo guanidínico tricíclico **B** ligado a uma cadeia lateral de nove carbonos. Já a análise do fragmento em m/z 304, 427487, indicou que este apresentava o núcleo guanidínico tricíclico **A** ligado a nove carbonos correspondentes à cadeia central da batzelladina L (**6**) (**Figura 75**).

Figura 75. Fragmentação por MS/MS da batzelladina L (**6**).

A análise dos espectros bidimensionais $gHSQC$, $gCOSY$, $gHMBC$ e a comparação com dados da literatura (HUA *et al.*, 2007), confirmou que o composto **6** corresponde à batzelladina L.

A batzelladina F (**7**) $[\alpha]_D = -4^\circ$ (c. 0,07 MeOH), (**Figura 76**) foi isolada na forma de um óleo incolor e apresentou espectros de RMN de 1H e ^{13}C com o mesmo perfil da norbatzelladina L (**5**) e da batzelladina L (**6**). O espectro RMN 1H de **7** apresentou um hidrogênio oximetínico em δ_H 4,97 (sexteto; 3H; 6,6 Hz), vários hidrogênios

metínicos multipletos entre δ_H 3,08 e 3,95, além de hidrogênios metilênicos multipletos entre δ_H 1,30 e 2,50. Tal como para as batzelladinas L e nor-L, foram observados sinais de três metilas dubleto em δ_H 1,29 (d; 3H; 6,6 Hz), δ_H 1,28 (d; 3H; 6,4 Hz), δ_H 1,25 (d; 3H; 6,4 Hz), e uma metila triplete em δ_H 0,91 (t; 3H; 6,6 Hz). O espectro RMN de ^{13}C da batzelladina F (**7**) apresentou uma carbonila de éster em δ_C 169,9, dois carbonos guanidínicos em δ_C 150,1 e 149,6, um carbono carbinólico em δ_C 71,9 e nove sinais de carbono metínico entre δ_C 57,0 e 45,0. Foram observados também carbonos de quatro metilas em δ_C (22,2; 19,3; 19,0; 13,0), e vários carbonos metilênicos entre δ_C 35,0 - 24,0.

Figura 76. Estrutura da batzelladina F (**7**).

A diferença entre a norbatzelladina L (**5**) a batzelladina L (**6**) e a batzelladina F (**7**) foi observada no espectro de massas HRESIMS. O espectro de massas do composto **7** apresentou um sinal em m/z 313,26041 (100%), correspondendo ao aduto $[M+2H]^{2+}$, um sinal em m/z 625,51306 (15%), $[M+H]^+$ e outro em m/z 739,50562 (40%), correspondendo a um aduto formado com o ácido trifluoroacético $[M+TFA]^+$.

Dessa forma, a diferença entre o a batzelladina F (**7**) e a norbatzelladina L (**5**) é de apenas uma unidade CH_2 . Já a diferença entre a batzelladina F (**7**) e a batzelladina L (**6**) são de duas unidades de CH_2 . A amostra do composto **7** foi submetida à análise por HRESI MS/MS, para determinar o tamanho da cadeia alifática entre os núcleos guanidínicos tricíclicos e o tamanho da cadeia alifática lateral. O íon protonado em m/z 625,51306 (15%) $[M+H]^+$ foi fragmentado, sendo observada a presença de dois sinais característicos em m/z 304,27505 (100%), e m/z 322, 28564 (45%), resultantes de um rearranjo de McLafferty (**Figura 72**).

A análise do fragmento em m/z 322,28564 demonstrou que este possuía o núcleo tricíclico B conectado a uma cadeia lateral de sete carbonos. Já a análise do fragmento em m/z 304,27505 indicou que este possuía o núcleo tricíclico A conectado a uma cadeia alifática de nove carbonos (**Figura 77**).

Figura 77. Fragmentação por MS/MS da batzelladina F (**7**).

A análise dos espectros bidimensionais $gHSQC$, $gCOSY$, $gNOESY$, $tROESY$, $gHMBC$ e revisão da literatura (COHEN e OVERMAN, 2001), confirmou que o composto **7** corresponde à batzelladina F.

Tabela 8. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da norbatzelladina L (5) em $\text{MeOH-}d_4$

Posição	$^{13}\text{C}^*$	$^1\text{H}^*$ (J em Hz)	$^{13}\text{C}^\#$	$^1\text{H}^\#$ (J em Hz)
1	20,7	1,28 (d, 6,5)	20,7	1,28 (d, 6,5)
2	47,3	3,55 (m)	47,3	3,55 (m)
3	39,6	2,25 (m); 1,26 (m)	36,9	2,25 (m); 1,26 (m)
4	57,6	3,75 (m)	57,9	3,75 (m)
5	31,1	2,23 (m); 1,69 (m)	31,1	2,23 (m); 1,69 (m)
6	31,0	2,21 (m); 1,69 (m)	31,0	2,21 (m); 1,69 (m)
7	57,5	3,75 (m)	57,5	3,75 (m)
8	34,8	2,27 (m); 1,24 (m)	34,8	2,27 (m); 1,24 (m)
9	51,6	3,43 (m)	51,6	3,43 (m)
10	151,1	-	151,6	-
11	35,9	1,57 (m)	35,9	1,57 (m)
12	26,2	1,34 (m)	26,2	1,34 (m)
13	30,5	1,34 (m)	30,5	1,34 (m)
14	30,5	1,34 (m)	30,5	1,34 (m)
15	30,5	1,34 (m)	30,5	1,34 (m)
16	26,6	1,34 (m)	26,6	1,34 (m)
17	36,7	1,63 (m)	26,7	1,63 (m)
18	73,4	4,98 (m)	73,4	4,98 (m)
19	20,4	1,26 (d, 6,2 Hz)	20,4	1,26 (d, 6,2 Hz)
20	170,3	-	170,3	-
21	45,6	3,10 (dd, 4,5 e 3,5)	45,6	3,10 (dd, 4,5 e 3,5)
22	58,0	3,95 (m)	58,0	3,95 (m)
23	29,2	2,23 (m); 1,65 (m)	29,2	2,23 (m); 1,65 (m)
24	31,4	2,20 (m); 1,64 (m)	31,4	2,20 (m); 1,64 (m)
25	57,3	3,55 (m)	57,3	3,55 (m)
26	34,2	2,36 (ddd, 12,5, 4,7 e 6,4); 1,42 (m)	34,2	2,36 (ddd, 12,5, 4,7 e 2,0); 1,45 (m)
27	53,2	3,54 (m)	53,2	3,54 (m)
28	151,5	-	151,5	-
29	49,9	3,85 (m)	49,9	3,85 (m)
30	18,5	1,26 (d, 6,2)	18,5	1,26 (d, 6,2)
31	37,0	1,63 (m); 153 (m)	37,0	1,63 (m); 156 (m)
32	26,2	1,34 (m)	26,2	1,34 (m)
33	30,5	1,34 (m)	30,5	1,34 (m)
34	30,5	1,34 (m)	30,5	1,34 (m)
35	30,5	1,34 (m)	30,5	1,34 (m)
36	33,0	1,34 (m)	33,0	1,34 (m)
37	23,7	1,38 (m)	23,7	1,38 (m)
38	14,4	0,90 (t, 7,1)	14,4	0,90 (t, 7,1)

*Isolada, ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz); #Dados da literatura (LAVILLE *et al.*, 2009), ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz)

Tabela 9. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da batzelladina L (**6**) em $\text{MeOH-}d_4$ (J em Hz)

Posição	$^{13}\text{C}^*$	$^1\text{H}^*$	$^{13}\text{C}^\#$	$^1\text{H}^\#$
1	20,8	1,26 (d, 6,4)	20,8	1,26 (d, 6,4)
2	47,3	3,54 (m)	47,3	3,54 (m)
3	37,0	2,22 (m); 1,25 (m)	37,0	2,22 (m); 1,25 (m)
4	57,5	3,74 (m)	57,5	3,74 (m)
5	31,1	2,22 (m); 1,67 (m)	31,1	2,22 (m); 1,67 (m)
6	31,1	2,22 (m); 1,67 (m)	31,1	2,22 (m); 1,67 (m)
7	57,4	3,74 (m)	57,4	3,74 (m)
8	34,8	2,24 (m); 1,23 (m)	34,8	2,24 (m); 1,23 (m)
9	51,6	3,41 (m)	51,6	3,41 (m)
10	151,1	-	151,1	-
11	35,9	1,60 (m); 1,48 (m)	35,9	1,60 (m)
12	26,2	1,33 (m)	26,2	1,33 (m)
13	30,5	1,33 (m)	30,5	1,33 (m)
14	30,5	1,33 (m)	30,5	1,33 (m)
15	30,5	1,33 (m)	30,5	1,33 (m)
16	26,5	1,33 (m)	26,5	1,33 (m)
17	36,8	1,60 (m); 1,54 (m)	36,8	1,60 (m); 1,54 (m)
18	73,4	4,97 (m)	73,4	4,97 (m)
19	20,5	1,24 (d, 6,4)	20,5	1,24 (d, 6,4)
20	170,4	-	170,4	-
21	45,6	3,08 (t, 4,0)	45,6	3,08 (dd, 4,5 e 3,5)
22	57,9	3,96 (m)	57,9	3,96 (m)
23	29,2	2,23 (m); 1,62 (m)	29,2	2,23 (m); 1,62 (m)
24	31,4	2,20 (m); 1,64 (m)	31,4	2,20 (m); 1,64 (m)
25	57,3	3,54 (m)	57,3	3,54 (m)
26	34,2	2,34 (m); 1,42 (m)	34,2	2,34 (m); 1,42 (m)
27	53,2	3,54 (m)	53,2	3,54 (m)
28	151,5	-	151,5	-
29	49,9	3,84 (m)	49,9	3,84 (m)
30	18,6	1,28 (d, 6,4)	18,6	1,28 (d, 6,2)
31	37,0	1,64(m); 154 (m)	37,0	1,63 (m); 154 (m)
32	26,2	1,33 (m)	26,2	1,33 (m)
33	30,5	1,33 (m)	30,5	1,33 (m)
34	30,5	1,33 (m)	30,5	1,33 (m)
35	30,5	1,33 (m)	30,5	1,33 (m)
36	30,5	1,33 (m)	30,5	1,33 (m)
37	33,0	1,33 (m)	23,7	1,33 (m)
38	23,7	1,33 (m)	14,5	0,90 (t, 7,1)
39	14,5	0,9 (t, 7,0)	20,8	1,26 (d, 6,4)

*Isolada, ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz); #Dados da literatura (HUA *et al.*, 2007), ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz)

Tabela 10. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da batzelladina F (7) em $\text{MeOH-}d_4$ (J em Hz)

Posição	$^{13}\text{C}^*$	$^1\text{H}^*$	$^{13}\text{C}^\#$	$^1\text{H}^\#$
1	20,7	1,28 (d, 6,9)	20,7	1,26 (d, 6,4)
2	47,5	3,55 (m)	47,2	3,54 (m)
3	37,0	2,26 (m); 1,39(m)	36,9	2,20 (m); 1,25 (m)
4	58,1	3,74 (m)	57,5	3,72 (m)
5	31,6	2,23 (m); 1,61 (m)	31,6	2,20 (m); 1,67 (m)
6	31,6	2,22 (m); 1,61 (m)	31,6	2,20 (m); 1,67(m)
7	57,6	3,74 (m)	57,4	3,72 (m)
8	34,4	2,26 (m); 1,29 (m)	34,8	2,28 (m); 1,21 (m)
9	51,8	3,41 (m)	51,6	3,40 (m)
10	151,3	-	151,2	-
11	36,0	1,62 (m), 1,53 (m)	35,8	1,60 (m);154 (m)
12	26,4	1,34 (m)	26,2	1,30 (m)
13	30,8	1,34 (m)	30,5	1,30 (m)
14	30,8	1,34 (m)	30,5	1,30 (m)
15	30,8	1,34 (m)	30,5	1,30 (m)
16	26,7	1,34 (m)	26,5	1,30 (m)
17	36,1	1,62 (m), 1,53 (m)	36,7	1,60 (m);1,54 (m)
18	73,6	4,97 septeto (6,3)	73,3	4,97 (m)
19	20,9	1,25 (d, 6,4)	20,5	1,24 (d, 6,2)
20	170,5	-	170,3	-
21	45,8	3,08 (dd, 4,1 e 3,4)	45,6	3,06 (dd, 4,6 e 3,3)
22	56,5	3,95 (m)	57,9	3,94 (m)
23	30,8	2,23 (m); 1,63 (m)	29,2	2,24 (m); 1,62 (m)
24	31,3	2,21 (m); 1,64 (m)	31,4	2,18 (m); 1,63 (m)
25	56,1	3,55 (m)	57,3	3,52 (m)
26	34,2	2,36 (ddd, 12,8, 3,0 e 5,6); 1,40 (m)	34,2	2,34 (m); 1,42 (m)
27	55,9	3,54 (m)	53,2	3,53 (m)
28	151,8	-	151,6	-
29	50,1	3,85 (m)	49,9	3,82 (m)
30	17,0	1,27 (d, 6,3)	18,5	1,27 (d, 6,2)
31	37,1	1,63 (m); 153 (m)	36,9	1,64 (m); 154 (m)
32	30,6	1,34 (m)	30,5	1,33 (m)
33	30,6	1,34 (m)	30,5	1,30 (m)
34	30,6	1,34 (m)	30,5	1,30 (m)
35	31,7	1,34 (m)	33,0	1,30 (m)
36	23,9	1,34 (m)	23,7	1,30 (m)
37	14,6	0,90 (t, 7,0)	14,5	0,90 (t, 7,0)

*Isolada, ^1H (500 MHz) e ^{13}C (100 MHz); #Dados da literatura (COHEN e OVERMAN, 2001), ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz)

7.2.4. Isolamento e identificação do Δ^{19} -hemibatzelladeno J (9), do Δ^{20} -hemibatzelladeno J (10), da hemibatzelladina J (11) e da batzelladina D (12)

Os compostos Δ^{19} -hemibatzelladeno J (9), Δ^{20} -hemibatzelladeno J (10), e hemibatzelladina J (11) foram isolados da subfração Ma100Me-1A. Esta foi fracionada por HPLC-UV ($\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$) monitorando-se em λ_{max} 205 nm, utilizando-se 60% de MeOH com 0,1%TFA durante 80 min., em uma coluna Inertsil C₈-4 preparativa com fluxo de 8 mL/min., resultando em sete frações. A subfração Ma1Me-1A2 foi purificada por HPLC-UV utilizando-se um gradiente de 40:60 a 25:75 de $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ com 0,1%TFA, durante 37 min., em coluna Inertsil C₈-4 analítica com fluxo de 0,8 mL/min., obtendo-se duas subfrações. A subfração Ma1Me-1A2A (**Figura 78**), foi então purificada por HPLC-UV ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$), utilizando-se 80:20 $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ com 0,1%TFA durante 20 minutos, em coluna Inertsil C₈-4 analítica, com fluxo de 0,8 mL/min. Foram obtidas duas subfrações que foram posteriormente purificadas.

Figura 78. Cromatograma HPLC-UV da subfração Ma1Me-1A2A. Condições: coluna Inertsil C₈-4; Fluxo de 0,8 mL/min.; Eluente: 80:20 $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$.

A subfração Ma1Me-1A2A-1 (**Figura 79**), foi purificada por HPLC-UV (λ_{max} 300 nm), utilizando-se 45:55 $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ com 0,05%TFA durante 47 min., em coluna InertSustain C₁₈, com fluxo de 2,0 mL/min., resultando da mistura de isômeros Δ^{19} -hemibatzelladeno J (9) e Δ^{20} -hemibatzelladeno J (10) (**Figura 82**).

Já a subfração Ma1Me-1A2A-2 (**Figura 80**), foi purificada por HPLC-UV (λ_{max} 300 nm) utilizando-se 45:55 $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ com 0,05%TFA durante 60 minutos, em coluna InertSustain C₁₈ com fluxo de 2,0 mL/min. Esta purificação nos permitiu obter a hemibatzelladina J (11) (**Figura 81**).

Figura 79. Cromatograma HPLC-UV-MS da subfração Ma1Me-1A2A-1. Condições cromatográficas: coluna Inertsil C₈-4; Fluxo de 0,8 mL/min.; Eluente: 80:20 H₂O/MeOH: **A**-Cromatograma HPLC-UV (detecção em λ_{max} 300 nm); **B**-Cromatograma HPLC-MS.

Figura 80. Cromatograma HPLC-UV-MS da subfração Ma1Me-1A2A-2. Condições cromatográficas: coluna Inertsil C₈-4; Fluxo de 0,8 mL/min.; Eluente: 80:20 H₂O/MeOH: **A**-Cromatograma HPLC-UV (detecção em λ_{max} 300 nm); **B**-Cromatograma HPLC-MS.

A batzelladina D (**12**) foi isolada a partir da subfração Ma100Me-1A que foi fracionada por HPLC-UV, utilizando-se uma coluna Inertsil C₈-4 preparativa com fluxo de 8 mL/min., 60% de MeOH com 0,1% TFA durante 80 min., monitorando-se em λ_{max} 205 nm. Obtiveram-se sete frações, das quais a subfração Ma1Me-1A1 foi purificada por HPLC-UV, utilizando-se coluna Inertsil C₈-4 preparativa, um gradiente de 40:60 a 25:75 de H₂O:MeOH com 0,1% TFA durante 37 min., com fluxo de 8 mL/min., monitorando-se em λ_{max} 205 nm. Tal procedimento resultou no isolamento da batzelladina D (**12**) (**Figura 82**).

Figura 81. Fluxograma do isolamento dos compostos Δ^{19} -hemibatzelladeno J (9), do Δ^{20} -hemibatzelladeno J (10) e da hemibatzelladina J (11).

Figura 82. Fluxograma do isolamento da batzelladina (12).

7.2.5. Identificação da hemibatzelladina J (11)

A hemibatzelladina J (11) [α]_D = -5,8° (c. 0,6 MeOH) (**Figura 83**), foi isolada como sólido incolor. Seu espectro de massas de alta resolução HRESIMS no modo positivo apresentou um sinal de íon molecular protonado [M+H]⁺ em m/z 449,3238, correspondente à fórmula molecular C₂₃H₄₀N₆O₃ com grau de insaturação igual a sete.

Figura 83. Estrutura da hemibatzelladina J (11).

A análise dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C, bem como dos espectros de gHSQC, gCOSY e gHMBC, indicou semelhança com as batzelladinas D e J (GALLIMORE *et al.*, 2005).

Nos espectros de RMN de ¹H e ¹³C, foram observados dois grupos metilênicos desblindados CH₂-2 (δ_H 3,11 dt / δ_C 40,2) e CH₂-5 (δ_H 4,10 m / δ_C 63,5) característicos de grupos metilênicos ligados a nitrogênio e oxigênio respectivamente. Foi possível também identificar a presença de dois grupos guanidinas em C -1 (δ_C 156,7) e C-14 (δ_C 147,2), um carbono de grupo éster C-6 (δ_C 164,6), uma metila CH₃-16 (δ_H 1,25 m / δ_C 24,0), um grupo metilênico ligado a hidroxila em CH-23 (δ_H 3,36 m / δ_C 60,6) e três grupos metínicos em CH-13 (δ_H 3,52 m / δ_C 51,4), CH-11 (δ_H 3,83 ddd / δ_C 56,7) e CH-15 (δ_H 4,42 dd / δ_C 46,5). Além disso, foram observados vários outros grupos metilênicos entre δ_H 3,00 e 1,00, indicando haver na molécula duas cadeias alifáticas, bem como sinais de carbono do tipo sp², C-7 (em δ_C 100,4) e C-8 (em δ_C 148,7), uma de carbonila de éster δ_C 164,6 (C-6), além de um grupo NH-13a (δ_H 8,75 s).

A análise dos espectros gCOSY e gHMBC indicou a presença de um grupo guanidina ligada a um grupo éster através de uma cadeia de quatro grupos metilenos. Observou-se correlações gCOSY entre os hidrogênios das posições CH₂-2/CH₂-3 e CH₂-3/CH₂-4, bem como correlações gHMBC entre os hidrogênios CH₂-2 (δ_H 3,11 dt /

δ_c 40,2) e CH₂-5 (δ_H 4,10m / δ_c 63,5) com os carbonos C-1 (δ_c 156,7) e C-6 (δ_c 164,6) respectivamente (**Figura 84**)

Figura 84. Subestrutura **A** da hemibatzelladina J (**11**).

As correlações sequenciais observadas no espectro *g*COSY entre os hidrogênios CH₂-17/CH₂-18 até CH₂-22/CH₂-23 indicou as atribuições de uma cadeia alifática com uma hidroxila na sua extremidade, em CH₂-23 (δ_H 3,36 m / δ_c 60,6) (**Figura 85**).

Figura 85. Subestrutura **B** da hemibatzelladina J (**11**).

O outro grupo guanidina foi posicionado na estrutura da hemibatzelladina J pela análise dos espectros *g*COSY e *g*HMBC. No espectro *g*COSY foram observadas correlações sequenciais entre CH₂-9, CH₂-10 (δ_H 2,23 m e 161m / δ_c 28,6), CH-11 (δ_H 3,83 dddd / δ_c 56,7), CH₂-12 (δ_H 2,32 e 1,40 / δ_c 31,2) e CH-13 (δ_H 3,52 m / δ_c 51,4). O grupo metínico CH-13 foi posicionado entre o grupo metilênico CH₂-12 (δ_H 4,42, bdd, 10,2, 3,4 Hz), e o grupo NH-13a da guanidina.

O hidrogênio NH-13a (δ_H 8,75) apresentou correlações *g*HMBC com C-8 (δ_c 148,7), CH₂-12, CH-13 e com o carbono de guanidina C-14 (δ_c 147,2). Já o grupo metínico em CH-15, mostrou uma correlação *g*HMBC com o carbono de guanidina C-14 e com C-8 (**Figura 86**).

Figura 86. Subestrutura **C** da hemibatzelladina J (**11**).

A análise detalhada do espectro *g*HMBC permitiu posicionar o grupo guanidina alquiléster observando-se correlações entre o hidrogênio CH-15 (δ_{H} 4,42 dd/ δ_{C} 46,5) e o carbono C-8 (δ_{C} 164,6). Já a cadeia alifática com o grupo álcool terminal, foi posicionada observando-se correlação entre o hidrogênio CH₂-17 (δ_{H} 1,61 m e 1,48 m/ δ_{C} 34,1) e o carbono CH-13 (δ_{C} 51,4), (**Figura 87**).

Figura 87. Correlações-chave da hemibatzelladina J (**11**) observadas nos espectros *g*COSY e *g*HMBC.

Desta forma foi possível determinar a estrutura da hemibatzelladina J (**11**), uma vez que corresponde à metade da batzelladina J (**Figura 88**).

Figura 88. Comparação entre a batzelladina J e a hemibatzelladina J (11).

A análise do espectro *t*ROESY da hemibatzelladina J (11) permitiu-nos verificar que esta apresenta uma estereoquímica relativa idêntica à da batzelladina J, uma vez que foi observada correlação NOE entre os hidrogênios CH-13 (δ_{H} 3.83 dddd/ δ_{C} 56.7) e CH-11 (δ_{H} 3,52 m/ 51,4).

Figura 89. Acoplamentos NOE observados para a hemibatzelladina J (11).

7.2.6. Identificação do Δ^{19} -hemibatzelladeno **9** e do Δ^{20} -hemibatzelladeno **10**

Os compostos **9** e **10** [α]_D = +3,9° (c. 0,4 MeOH) (**Figura 90**), foram isolados como uma mistura inseparável de isômeros. O espectro de massas de alta resolução HRESIMS no modo positivo desta mistura de alcaloides isoméricos apresentou um sinal de íon molecular protonado [M+H]⁺ em m/z 447,3084, correspondente à fórmula molecular C₂₃H₃₈N₆O₃.

A comparação dos espectros de RMN de ¹H, ¹³C e de massas dos compostos **9** e **10** com os dados de RMN e de massas da hemibatzelladina **J** (**11**), indicou que **9** e **10** são análogos insaturados da hemibatzelladina **J** (**11**). Foi necessária a aquisição de dois conjuntos de dados de RMN para uma identificação segura desta mistura de dois alcaloides. Os espectros foram obtidos em MeOH-*d*₄ (**Tabela 5**) e DMSO-*d*₆ (**Tabela 6**).

Figura 90. Estruturas dos compostos **9** e **10**.

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C registrados em MeOH-*d*₄ apresentou grande semelhança aos espectros da hemibatzelladina **J** (**11**). Foi observada a presença de ligações duplas com geometria Z, evidenciada pelo valor da constante de acoplamento ($J = 7,2$ Hz) entre os hidrogênios vinílicos. Para o composto **9**, foram observados valores de dupla ligação em C-19 (δ_H 5,47 / δ_C 131,8) e C-20 (δ_H 5,45 / δ_C

127,8), e para o composto **10** em C-20 (δ_H 5,47 / δ_C 131,7) e C-21 (δ_H 5,41 / δ_C 129,3).

No espectro *g*COSY observou-se correlações sequenciais entre CH₂-2 (δ_H 3,21 t / δ_C 42,0), CH₂-3 (δ_H 1,67 m / δ_C 26,6), CH₄-4 (δ_H 1,75 m / δ_C 27,0) e CH₂-5 (δ_H 4,20 m / δ_C 65,0), atribuídos ao fragmento guanidina alquiléster, observado na hembatzelladina J (**11**). Também observou-se correlações no espectro *g*COSY que indicaram a presença de uma cadeia alifática insaturada, bem como correlações do sistema guanidínico tricíclico com insaturações nas posições 7 e 8, como observado anteriormente para a hemibatzelladina J (**11**) (**Figura 91**).

Figura 91. Correlações observadas no espectro *g*COSY dos compostos **9** e **10**.

No espectro *g*HMBC observou-se correlações do hidrogênio metínico em CH-15 (δ_H 4,51 d / δ_C 48,5) com os carbonos C-8 (δ_C 149,6) com o carbono da guanidina C-14 (δ_C 149,2), (**Figura 92**).

Figura 92. Correlações observadas no espectro *g*HMBC dos compostos **9** e **10**.

A posição das duplas ligações foi estabelecida por correlações observadas no espectro gHMBC. O composto **9** apresentou correlações entre o hidrogênio CH₂-17 (δ_H 1,50 / δ_C 25,9) o carbono sp² em CH-19 (δ_H 5,47 / δ_C 131,8), bem como entre o hidrogênio CH₂-22 (δ_H 1,58 / δ_C 33,4), e o carbono sp² em CH-20 (δ_H 5,45 / δ_C 127,8) (Figura 93).

Figura 93. Correlações observadas no espectro gHMBC do composto **9**.

Já para o composto **10**, foi observada correlação entre o hidrogênio CH₂-23 (δ_H 3,54 m / δ_C 62,5) e o carbono sp² CH₂-21 (δ_H 5,41 / δ_C 129,3), sendo a dupla ligação posicionada nas posições 20 e 21.

Figura 94. Correlações observadas no espectro gHMBC do composto **10**.

Os espectros de RMN-¹H das hemibatzelladinas registrados em MeOH-*d*₄ e DMSO-*d*₆ apresentaram pequenas diferenças. No espectro de RMN de ¹H registrado

em DMSO- d_6 verificou-se a sobreposição de duas metilas. Já no espectro registrado em MeOH- d_4 , estes sinais se apresentam como um único dubleto largo (**Figura 95**).

Figura 95. Comparação dos espectros de RMN de ^1H em MeOH- d_4 e DMSO- d_6 , da mistura de alcaloides isoméricos **9** e **10**.

A análise do espectro $t\text{ROESY}$ e comparação com os dados de hemibatzelladina J (**11**) possibilitou determinar a estereoquímica relativa dos compostos **9** e **10**. Observou-se correlação NOE entre os hidrogênios CH-13 (δ_{H} 3,61 m / δ_{C} 53,2) e CH-11 (δ_{H} 3,86 m / δ_{C} 58,6).

Figura 96. Acoplamentos NOE observado para os composto (**9**) e (**10**).

Por apresentar uma estrutura igual à da hemibatzelladina J (**11**) diferenciando-se somente pela presença das duplas ligações, os compostos inéditos **9** e **10** foram nomeados de Δ^{19} -hemibatzelladeno J e Δ^{20} -hemibatzelladeno J, respectivamente.

Tabela 11. Dados de RMN de ^{13}C (150 MHz) e ^1H (600 MHz) do Δ^{19} -hemibatzelladeno **9** e do Δ^{20} -hemibatzelladeno **10** em $\text{MeOH-}d_4$ (J em Hz).

Posição	^{13}C (9)	^1H (9)	^{13}C (10)	^1H (10)
1	158,6	-	158,6	-
2	42,0	3,21 (t, 6,9)	42,0	3,21 (t, 6,9)
3	26,6	1,67 (m)	26,6	1,67 (m)
4	27,0	1,75 (m)	27,0	1,75 (m)
5	65,0	4,20 (m)	65,0	4,20 (m)
6	166,2	-	166,2	-
7	102,8	-	102,8	-
8	149,6	-	149,6	-
9	31,4	3,34 (m); 2,83 (m)	31,4	3,34 (m); 2,83 (m)
10	30,2	2,34 (m); 1,73 (m)	30,2	2,34 (m); 1,73 (m)
11	58,6	3,86 (m)	58,6	3,86 (m)
12	32,9	2,24 (t, 13,6); 1,55 (m)	32,9	2,24 (t, 13,6); 1,55 (m)
13	53,2	3,61 (m)	53,2	3,61 (m)
14	149,2	-	149,2	-
15	48,5	4,51 (d, 5,9)	48,5	4,51 (d, 5,9)
16	24,5	1,36 (d, 5,9)	24,5	1,36 (d, 5,9)
17	25,9	1,50 (m)	25,9	1,50 (m)
18	35,4	1,66 (m)	23,7	2,20 (m)
19	131,8	5,47 (m)	35,8	1,66 (m)
20	129,3	5,45 (m)	131,7	5,47 (m)
21	24,6	2,18 (m)	129,3	5,41 (m)
22	33,4	1,58 (m)	31,7	2,27 (q, 7,2)
23	62,5	3,55 (t, 6,1)	62,5	3,54 (t, 6,1)

Tabela 12. Dados de RMN de ^{13}C (150 MHz) e ^1H (600 MHz) do Δ^{19} -hemibatzelladeno **9** e do Δ^{20} -hemibatzelladeno **10** em $\text{DMSO}-d_6$ (J em Hz).

Posição	^{13}C (9)	^1H (9)	^{13}C (10)	^1H (10)
1	156,6	-	156,6	-
2	40,2	3,11 dd (13,1; 6,7)	40,2	3,11 dd (13,1; 6,7)
3	25,4	1,61 m	25,4	1,61 m
4	25,2	1,51 m	25,2	1,51 m
5	63,5	4,10 m	63,5	4,10 m
6	164,3	-	164,3	-
7	100,4	-	100,4	-
8	148,3	-	148,3	-
9	30,0	2,76 m; 3,16 ddd (18,1, 8,7, 8,2)	30,0	2,76 m; 3,16 ddd (18,1, 8,7, 8,2)
10	28,7	2,23 m; 16,2 m	28,7	2,23 m; 16,2 m
11	56,6	3,83 m	56,6	3,83 m
12	31,0	3,16 d (14,4); 1,44 m	31,0	3,16 d (14,4); 1,44 m
13	51,1	3,53 m	51,1	3,53 m
14	147,2	-	147,2	-
15	46,5	4,42 q (6,0)	46,5	4,42 q (6,0)
16	24,0	1,26 d (6,0)	24,0	1,27 d (6,0)
17	26,5	20,3 m	26,5	20,3 m
18	30,8	1,61 m	22,3	2,09 m
19	130,4	5,34 m	30,8	1,61 m
20	127,1	5,40 m	130,2	5,34 m
21	32,4	1,45 m	128,2	5,40 m
22	23,3	2,03 m	32,4	1,45 m
23	60,9	3,35 m	60,9	3,35 m

Tabela 13. Dados de RMN de $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ e ^1H da hemibatzelladina J (**11**) em $\text{DMSO}-d_6$.

Posição	^{13}C (150 MHz)	^1H (600 MHz, <i>J</i> em Hz)
1	156,7	-
2	40,2	3,11 (dt, 8,0, 8,0)
3	25,4	1,53 (m)
4	25,3	1,61 (m)
5	63,5	4,10 (m)
6	164,6	-
7	100,4	-
8	148,7	-
9	30,1	3,17 (dd, 14,9, 9,1); 2,73 (ddd, 17,5, 15,3, 5,7)
10	28,6	2,23 (ddd, 10,5, 10,1, 4,4); 1,61 (m)
11	56,7	3,83 (dddd, 14,0, 13,0, 8,0, 4,0)
12	31,2	2,32 (m); 1,40 (m)
13	51,4	3,52 (m)
14	147,2	-
15	46,5	4,42 (bdd, 10,2, 3,4)
16	24,0	1,25 (m)
17	34,1	1,61 (m); 1,48 (m)
18	24,8	1,29 (m)
19	25,4	1,53 (m)
20	24,3	1,32 (m)
21	24,8	1,29 (m)
22	32,4	1,39 (m)
23	60,6	3,36 (m)
NH-1a	- 295	7,56 (s)
NH-13a	- 285	8,75 (s)
NH-14a	- 293	8,41 (s)

cadeias alifáticas. Observou-se a presença de um pico característico em m/z 350,28052 (100%), que corresponde ao fragmento da ligação da carbonila de éster oriundo de um rearranjo de McLafferty (**Figura 72**). Assim, foi possível confirmar que este possui um núcleo guanidínico ligado a uma cadeia lateral de sete carbonos. (**Figura 98**).

Figura 98. Fragmentação por MS/MS da batzelladina D (**12**).

A análise dos espectros bidimensionais $gHSQC$, $gCOSY$, $gNOESY$, $gHMBC$ e revisão da literatura (COHEN, OVERMAN e SAKATA, 1999), confirmou que o composto **12** corresponde ao composto conhecido batzelladina D.

Tabela 14. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H da batzelladina D (**12**) em $\text{MeOH-}d_4$ (J em Hz).

Posição	$^{13}\text{C}^*$	$^1\text{H}^*$	$^{13}\text{C}^\#$	$^1\text{H}^\#$
1	158,6	-	158,7	-
2	42,3	3,25 (t, 6,7)	42,0	3,21 (t, 7,2)
3	26,7	1,70 (m)	26,6	1,69 (m)
4	29,4	1,78 (m)	27,0	1,75 (m)
5	65,3	4,23 (t, 6,9)	65,4	4,21 (t, 6,5)
6	170,6	-	170,6	-
7	45,4	3,18(dd, 4,3 e 3,3)	45,6	3,12 (dd, 4,0, 3,5)
8	57,6	3,99 (m)	57,7	3,93 (m)
9	29,5	163 (m); 225 (m)	29,3	1,60 (m); 2,24 (m)
10	31,6	145 (m); 235 (m)	31,4	1,41 (m); 2,35 (m)
11	58,1	-	57,3	-
12	34,5	146 (m); 235 (m)	34,2	1,42 (m); 2,35 (m)
13	53,5	3,58 (m)	53,2	3,54 (m)
14	151,4	-	151,5	-
15	50,1	3,90 (m)	49,8	3,83 (m)
16	18,7	1,31 (d, 6,8)	18,4	1,28 (d, 6,5)
17	37,0	160 (m); 166 (m)	37,0	1,55 (m); 164 (m)
18	26,4	1,33 (sl)	26,2	1,29 (sl)
19	30,7	1,33 (sl)	33,0	1,29 (sl)
20	30,7	1,33 (sl)	33,0	1,29 (sl)
21	30,7	1,33 (sl)	33,0	1,29 (sl)
22	30,7	1,33 (sl)	33,0	1,29 (sl)
23	30,7	1,33 (sl)	33,0	1,29 (sl)
24	23,9	1,33 (sl)	23,7	1,29 (sl)
25	14,7	0,93 (t, 7,0)	14,3	0,89 (t, 6,5)

*Isolada, ^1H (500 MHz) e ^{13}C (100 MHz); $^\#$ Dados da literatura (COHEN, OVERMAN e SAKATA, 1999), ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz)

7.3. Referências

- BEWLEY, C. A.; RAY, S.; COHEN, F.; COLLINS, S. K.; OVERMAN, L. E. Inhibition of HIV-1 envelope-mediated fusion by synthetic batzelladine analogues. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1319–1324, 2004.
- COHEN, F.; OVERMAN, L. E. Enantioselective total synthesis of batzelladine F: Structural revision and stereochemical definition. **Journal of the American Chemical Society**, v.123, p. 10782–10783, 2001.
- GALLIMORE, W. A.; KELLY, M.; SCHEUER, P. J. Alkaloids from the sponge *Monanchora unguifera*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1420-1423, 2005.
- HUA, H-M.; PENG, J.; DUNBAR, D. C.; SCHINAZI, R. F.; ANDREWS, A. G. DE C.; CUEVAS, C.; GARCIA-FERNANDEZ, L. F. KELLY, M.; HAMANN, M. T. Batzelladine alkaloids from the Caribbean sponge *Monanchora unguifera* and the significant activities against HIV-1 and AIDS opportunistic infections pathogens. **Tetrahedron**, v. 63, p. 11179–11188, 2007.
- LAVILLE, REMI.; THOMAS, O. P.; BERRUÉ, F.; MARQUEZ, D.; VACELET, J.; AMADE, P. Bioactive guanidine alkaloids from two caribbean marine sponges. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 1589–1594, 2009.
- COHEN, F.; OVERMAN, L. E.; SAKATA, S. K. L. Asymmetric Total Synthesis of Batzelladine D. **Organic Letters**, v.1, p. 253-265, 1999.
- NIBBERING, N. M. M. The mclafferty rearrangement: a personal recollection. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v.15, p.956–958, 2004.
- PATIL, A. D.; FREYER, A. J.; TAYLOR, P. B.; CARTÉ, B.; ZUBER, G.; JOHNSON, R. K.; FAULKNER, D. J. Batzelladines F–I, novel alkaloids from the sponge *Batzella* sp: Inducers of p56lck-CD4 dissociation. **Journal of Organic Chemistry**, v. 62, p. 1814–1819, 1997.
- SNIDER, B. B.; BUSUYEK, M. V. Revision of the stereochemistry of batzelladine F. Approaches to the tricyclic hydroxyguanidine moiety of batzelladines G, H, and I. **Journal of Natural Products**, v. 62, p.1707–1711, 1999.
- TAKISHIMA, S.; ISHIYAMA, A.; IWATSUKI, M.; OTOGURO, K.; YAMADA, H.; OMURA, S.; KOBAYASHI, H.; VAN SOEST, R. W. M.; MATSUNAGA, S. Merobatzelladines A and B, anti-infective tricyclic guanidines from a marine sponge *Monanchora* sp. **Organic letters**, v. 11, p. 2655-2658, 2009.

CAPÍTULO VIII- Atividades biológicas dos alcaloides majoritários isolados do extrato de *Monachora arbuscula*

8.1. Ensaios biológicos

As batzelladinas D (12), F (7), L (6) e norbatzelladina L (5) e a arbusculidinina (1) sintetizada foram testadas em diferentes bioensaios, de atividade antifúngica, leishmanicida, tripanossomicida, antiviral e de inibição ATPásica.

Figura 99. Compostos utilizados nos testes biológicos.

8.2. Atividade antiviral da norbatzelladina L (5) contra o Herpesvírus simplex

Os vírus da família herpesvírus estão disseminados por toda a natureza, sendo que cerca de 130 herpesvírus já foram descritos até o momento (PESSA, 2011). Em decorrência de sua alta disseminação, a erradicação desses vírus pode demandar altos investimentos.

Os herpesvírus são causadores da Herpes, associada a síndromes que afetam humanos na forma de alguns tipos de câncer e encefalites. O herpes é uma doença viral recorrente, geralmente benigna, afetando a mucosa da boca e/ou a região genital, mas pode causar complicações neurológicas, existindo medicamentos que tratam somente os sintomas (COWAN *et al.*, 2003; LOOKER *et al.*, 2005). Os vírus Herpes simplex 1 (HSV-1) e 2 (HSV-2) são os mais comuns. No Brasil, cerca de 640 mil novos casos de herpes genital são diagnosticados todos os anos (LANGENBERG *et al.*, 1999; SMITH *et al.*, 2002).

A infecção pelo vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1) é um grave problema de saúde pública. É crescente a incidência de resistência deste vírus a drogas em pacientes imunocomprometidos, o que sublinha a urgência de desenvolver novas alternativas de tratamento eficazes. As infecções podem se tornar crônicas e resultam em deficiência levando a um intenso sofrimento psicológico em longo prazo (COWAN *et al.*, 2003; KRAWCZYK *et al.*, 2013). Dentre os metabolitos testados e isolados de *Monanchora arbuscula*, a norbatzelladina L (5) apresentou uma excelente atividade antiviral contra o vírus do Herpes simplex 1 (HSV-1).

A norbatzelladina L (5), apresentou atividade antiviral contra o Herpes simplex 1 com uma percentagem de inibição (PI) de 90% (Tabela 15). O índice seletivo foi de 2,4, pois a concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀) foi maior que a concentração eficaz que reduziu 50 % das células infectadas (IC₅₀), indicando que a norbatzelladina L (5) é tóxica ao vírus do que para as células saudáveis.

Tabela 15. Atividade Antiviral do extrato bruto de *M. arbuscula* e da norbatzelladina L frente ao vírus HSV-1

Amostra	PI (%)	*CC ₅₀	*IC ₅₀	SI	Mecanismo
<i>Monanchora arbuscula</i>	99	50,53	459,2	0,1	Adsorção
norbatzelladine L (5)	90	165,4	72,94	2,4	Penetração

* CC₅₀ e IC₅₀ em µg/mL

A análise preliminar do mecanismo de ação da atividade antiviral indicou que a mesma acontece no primeiro passo do ciclo viral, durante o qual o mecanismo pode acontecer por adsorção ou penetração. As células sadias foram tratadas com norbatzelladina L (5) durante 1 hora e depois o vírus foi inoculado.

Foi observado que a norbatzelladina L (5), interfere no receptor da célula, impedindo que o vírus penetre nas células sadias. Apesar dos resultados promissores, será necessária a realização de mais experimentos para confirmar se de fato esse é o mecanismo pelo qual a norbatzelladina L (5) inibe a atividade viral do vírus HSV-1.

8.3. Atividade antifúngica da batzelladina L (6)

A procura por novos agentes antimicrobianos a partir de fontes naturais é intensa devido ao aumento da resistência dos micro-organismos patogênicos frente aos produtos sintéticos. Nos últimos anos têm sido observado um aumento acentuado de infecções fúngicas que contribuem para um aumento na taxa de mortalidade em pacientes imunocomprometidos (WHITE, MARR, BOWDEN, 1998). Fungos podem infectar plantas, animais e seres humanos, causando prejuízos e para a saúde pública (HEDAYATI *et al.*, 2007; GNONLONFIN *et al.*, 2013). O fungo *Aspergillus flavus* é um patógeno cosmopolita que se desenvolve em vários tipos substratos, como grãos de amendoim, soja e castanha-do-Brasil produzindo toxinas cancerígenas. Consumidas bovinos e suínos, grãos contaminados por *A. flavus* podem causar sérias doenças, levando a perdas econômicas consideráveis (GNONLONFIN *et al.*, 2013).

Em seres humanos o consumo de grãos contaminados por toxinas de *A. flavus* pode ocasionar uma série de sintomas como dor abdominal, vômitos, convulsões, danos no fígado e até morte. A inalação de esporos de *Aspergillus flavus* pode causar aspergilose, uma infecção fúngica nasossinusal que acomete principalmente indivíduos imunodeprimidos ou diabéticos. Esta infecção pode evoluir para uma forma mais agressiva, podendo provocar até morte do indivíduo (WILLIAMS *et al.*, 2004; KENSLER *et al.*, 2011; WU, SANTELLA, 2012).

A FAO e a OMS impuseram diretrizes regulatórias, para as quais a presença de aflatoxinas totais não pode passar de 20 ppb. Por isso, a descoberta e desenvolvimento de agentes antifúngicos é de extrema importância (YU *et al.*, 2005). A batzelladina L (6) apresentou concentração inibitória mínima (CIM) de inibição de *A. flavus* entre 1,9-7,8 mg/mL para todas as linhagens testadas (**Tabela 16**). As linhagens de *A. flavus* isoladas e codificadas como AF6 e AF7 apresentaram resistência ao cercobin, um agente antifúngico usado na agricultura. As CIMs do cercobin contra estas linhagens situaram-se entre 15 e > 250 µg/mL, respectivamente. Já as CIMs da batzelladina L (6) para linhagem AF6 foi de 3,9 mg/mL, enquanto que para a linhagem AF7 foi de 1,9 µg/mL. A batzelladina L mostrou ser um agente antifúngico eficaz contra as linhagens de *A. fluvus* AF6 e AF7, resistentes ao cercobin. A batzelladina L (6) (CIM = 7,8 µg/mL) apresentou atividade antifúngica tão potente

quanto à do que cercobin (CIM = 7,8 µg/mL) contra a linhagem controle de *A. flavus* produtora de aflatoxina (**Af ATCC 9643**).

A batzelladina L (**6**) mostrou ser um antifúngico mais eficiente do que o cercobin, apresentando valores de CIM e CFM menores do que a droga padrão para as linhagens de *A. flavus Af1 Af2 Af5 Af9*. Esses resultados indicam que a batzelladina L (**6**) é um potente antifúngico.

Tabela 16. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (MFC) em µg/mL contra *A.flavus* isolados de amendoim, *A.flavus* ATCC9643 (linhagem controle produtora de aflatoxinas).

Linhagem	cercobin (droga padrão)		batzelladina L (6)	
	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>Af1</i>	7,8	7,8	3,9	7,8
<i>Af2</i>	7,8	15,6	1,9	3,9
<i>Af3</i>	3,9	7,8	3,9	7,8
<i>Af4</i>	0,9	1,9	1,9	3,9
<i>Af5</i>	3,9	7,8	1,9	3,9
<i>Af6</i>	>15,6	ND	3,9	6,2
<i>Af7</i>	>25,0	ND	3,9	6,2
<i>Af8</i>	1,9	3,9	7,8	15,6
<i>Af9</i>	1,9	3,9	3,9	7,8
<i>Af10</i>	1,9	3,9	1,9	3,9
<i>Af ATCC 9643</i>	3,9	7,8	1,9	3,9

8.4. Atividades leishmanicida e triponossomicida

As leishmanioses são infecções causadas por parasitas do gênero *Leishmania*, transmitidos pela picada de mosquitos pertencentes à subfamília Phlebotominae. Os parasitas infectam células da linhagem fagocítica de seus hospedeiros vertebrados, cachorros e humanos. As leishmanioses se manifestadas na forma visceral, causada por *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*, na forma mucocutânea, causada por *L. braziliensis* e cutânea, causada por *L. tropica* e *L. major* (HALL e TITUS, 1995; ALEXANDER *et al.*, 1999).

A leishmaniose cutânea pode ser curada espontaneamente em alguns meses ou evoluir para as formas mucocutânea, cutânea difusa, recidivante ou leishmaniose dérmica pós calazar, a depender da espécie de *Leishmania* infectante (CROFT *et al.*, 2006). A forma visceral é mais agressiva e, na maioria dos casos, leva os pacientes a óbito quando não tratada adequadamente (ALEXANDER *et al.*, 1999). São registradas anualmente cerca de 5 milhões de casos de leishmaniose da forma visceral. No Brasil, dados do Ministério da Saúde mostram que em 19 anos de notificação (1984-2002) os casos chegaram a 50 mil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

Já a doença de Chagas é uma doença causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi*, transmitida através do barbeiro. O parasita apresenta-se na forma amastigota quando intracelular relacionada com a fase crônica da doença. A forma tripomastigota está associada à fase sanguínea da doença na sua fase aguda, sendo a forma infectante para os vertebrados e epimastigota quando no tubo digestivo do vetor. Os infectados com a doença de Chagas apresentam sérias complicações cardíacas como insuficiência cardíaca e digestivas, ocasionando alargamento anormal do colón e do esôfago. Observa-se o registro de aproximadamente 14.000 mortes por ano no mundo, sendo endêmica em 21 países da América Latina (NOGUEIRA *et al.*, 2011).

O controle da Leishmaniose e da doença de Chagas ainda é um problema, pois não existe um tratamento ou vacina eficaz, e os medicamentos que são usados no combate a estas doenças apresentam altos custos e são de alta toxicidade ao organismo hospedeiro (SINGH, 2005; BRAY *et al.*, 2003). Para o tratamento da

doença de Chagas em alguns casos resume-se ao uso do benznidazol (NOGUEIRA *et al.*, 2011).

A leishmaniose e a doença de Chagas afetam milhões de pessoas ao redor do mundo. Os tratamentos eficazes para estas doenças fazem uso de medicamentos que foram introduzidos há mais de 40 anos, são caros e apresentam severos efeitos colaterais. As leishmanioses e doenças de Chagas são consideradas endêmicas no Brasil, Bangladesh, Índia, Nepal, e toda America Latina. Estima-se uma incidência anual de 500 mil casos da leishmaniose visceral, enquanto que as formas cutâneas devem acometer cerca de dois milhões de pessoas por ano (WHO/TDR, 2005). Cerca de 8 milhões de pessoas estão infectadas pelo parasita da doença de Chagas no mundo.

A descoberta de metabólitos oriundos de fontes naturais, como esponjas marinhas, é uma alternativa importante para a descoberta de novos agentes antiparasíticos. Nos últimos anos muito esforços foram direcionados para o desenvolvimento de novas quimioterapias, com o propósito de eliminar ou minimizar a ocorrência da leishmaniose (CROFT e YARDLEY, 2002). A descoberta de novos protótipos de fármacos é de primordial importância para o desenvolvimento de novas formas de tratamento para a leishmaniose e doença de Chagas (GRAY *et al.*, 2006; KOSSUGA *et al.*, 2008; REIMÃO *et al.*, 2008).

As batzelladinas D (12), F (7), L (6) e norbatzelladina L (5), foram avaliadas contra *Leishmania (L.) infantum* e contra o parasita *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas.

Os resultados dos testes biológicos (**Tabela 17**) indicaram que as batzelladinas F (7), L (6) e norbatzelladina L (5) foram eficazes contra tripomastigotas de *T. cruzi*, enquanto que a batzelladina D (12) apresentou a atividade menos promissora considerando-se o valor de IC₅₀ para a ação da droga padrão benznidazol contra tripomastigotas de *T. cruzi*. As batzelladinas 5-7 e 12 foram aproximadamente 91 vezes, 189 vezes e 63 vezes mais eficazes *in vitro* do controle positivo, respectivamente.

Já os resultados para os testes de citotoxicidade com células de mamíferos saudáveis, mostraram que esses metabólitos apresentam uma toxicidade relativamente baixa (**Tabela 17**), podendo futuramente se tornarem modelos para a síntese e otimização de compostos com atividade antiparasitária.

Tabela 17. Atividades leishmanicida, triponossomicida e citotoxicidade dos alcaloides guanidínicos **5-7** e **12**.

Compostos	<i>L. (L.) infantum</i> IC ₅₀ (μM) (95% CI)	<i>T. cruzi</i> IC ₅₀ (μM) (95% CI)	Citotoxicidade IC ₅₀ (μM) (95% CI)
batzelladina D (12)	2,66 (2,21 - 3,21)	64,34 (31,98 - 129,4)	129,7 (118,4 - 142,2)
batzelladina F (7)	3,94 (3,36 - 4,61)	4,80 (4,42 - 5,20)	10,28 (8,52 - 12,39)
batzelladina L (6)	2,16* (1,96 - 2,39)	2,33* (2,06 - 2,64)	21,88 (19,89 - 24,05)
norbatzelladina L (5)	1,79* (1,58 - 2,05)	6,93* (5,69 - 8,43)	85,62 (76,01 - 96,47)

(95% CI = 95% intervalo de confiança; *Leishmania* (promastigotas) -pentamidina 0,38 μM (95% CI: 0,30-0,47 μM); *T. cruzi* (tripomastigotas)- benznidazol 40,70 μM (95% CI - 406,16 - 478,40 μM). * p<0.05 (comparação com o fármaco padrão). Viabilidade celular foi determinada usando ensaio de MTT. *p<0.05.

A arbusculidinina (**1**) sintética apresentou boa atividade contra as promastigotas de *L. infantum* e baixa atividade contra as tripomastigotas de *T. cruzi*. Entretanto, a arbusculidinina foi mais ativa do que o controle positivo benznidazol. Assim como as batzelladinas, a arbusculidinina (**1**) é promissora para servir de modelo para o desenvolvimento de fármacos com atividade antiparasitária, uma vez que sua síntese total já foi desenvolvida e requer reagentes de baixo custo.

Tabela 18. Atividades leishmanicida, triponossomicida e citotoxicidade da arbusculidinina (**1**) sintética.

Composto	<i>T. cruzi</i>	<i>L. infantum</i>	Citotoxicidade
	IC ₅₀ (μM) (95% CI)	IC ₅₀ (μM) (95% CI)	IC ₅₀ (μM) (95% CI)
arbusculidinina (1)	8,09 (6,83 - 9,60)	2,45 (2,28 - 2,63)	26,27 (23,67 - 29,15)

(95% CI = 95% intervalo de confiança; *Leishmania* (promastigotas) -pentamidina 0,38 μM (95% CI: 0,30-0,47 μM); *T. cruzi* (tripomastigotas)- benznidazol 40,70 μM (95% CI - 406,16 - 478,40 μM). $p < 0.05$ (comparação com o fármaco padrão). Viabilidade celular foi determinada usando ensaio de MTT.

8.5. Atividade de inibição ATPásica

A resistência a múltiplas drogas (MDR) é um fenômeno cada vez mais frequente nos tratamentos envolvendo agentes quimiotrópicos. A resistência a fármacos resulta em tratamentos contra o câncer e/ou micro-organismos patógenos pouco eficientes, levando a sérios problemas de saúde e de ordem econômica. O mecanismo da resistência a múltiplas drogas é um processo multifatorial, sendo caracterizado pela superexpressão de uma proteína da membrana plasmática identificada como glicoproteína P (Pgp), que funciona como uma bomba de efluxo que promove diminuição da concentração intracelular do fármaco usado como medicamento seja para células cancerosas e/ou micro-organismos patogênicos (BOUMENDJEL, *et al.*, 2002; HUBER, MARUIAMA e ALMEIDA, 2010).

A glicoproteína P (Pgp) está relacionada ao aumento da expressão de proteínas relacionada a superfamília ABC (ATP-binding cassette), com um mecanismo de transporte ATP-dependente, sendo que em muitas células e micro-organismos outras proteínas semelhantes à glicoproteína P (Pgp), estão envolvidas no mecanismo da resistência a múltiplas drogas. Dentre outras a Pdr5p (do inglês Pleiotropic Drug Resistance), da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que confere resistência a vários antibióticos e compostos citotóxicos (DECOTTIGNIES *et al.*, 1998; CONSEIL *et al.*, 2000).

Muitos estudos são realizados sobre a atividade ATPásica da Pdr5p, objetivando encontrar compostos que inibam a atividade ATPásica da proteína Pdr5p, pois é grande a necessidade da descoberta de compostos com grupos farmacofóricos capazes de modular a resistência e/ou quimiossensibilizar a expressão das proteínas e enzimas responsáveis pelo fenômeno de resistência a múltiplas drogas (MDR).

A batzelladina L (**6**) apresentou a melhor atividade de inibição da ATPase de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecida com a proteína (Pdr5p), responsável por expressar o fenótipo da multiresistência. A batzelladina L apresentou IC₅₀ menor do que a norbatzelladina L (**5**). A batzelladina D (**12**) apresentou o maior valor de IC₅₀ entre todos os compostos testados. Os valores de IC₅₀ indicam uma maior ou menor afinidade aos sítios de ligações dos fragmentos de membrana plasmática enriquecidas com a proteína (Pdr5p) (**Tabela 19**).

Tabela 19. Atividade de inibição da ATPase e quimiossensibilização da norbatzelladina L (**5**), da batzelladina L (**6**) e da batzelladina D (**12**).

Compostos	Atividade ATPásica (μM) [#]	Quimiossensibilização* (10μM de composto + fluconazol)
batzelladina D (12)	7,1	Ativo
batzelladina L (6)	2,6	Parcialmente ativo
norbatzelladina L (5)	3,7	Ativo

[#] Para realização desse experimento foi utilizado DMSO (solvente) e como controle o FK-506 (inibidor clássico da Pdr5p). ^{*} Para o experimento de Quimiossensibilização foi usado o fluconazol como antimicótico padrão e o micro-organismo utilizado foi a *Saccharomyces cerevisiae* resistente ao mesmo.

Analisando-se a quimiossensibilização, que é realizada com a célula intacta e funcional de *Saccharomyces cerevisiae*, percebe-se que a batzelladina D (**12**) e a norbatzelladina L (**5**), foram as que apresentaram melhor resultado. Na quimiossensibilização foram utilizadas 10 μM e 5 μM das batzelladinas isoladas junto com o antimicótico fluconazol, sendo utilizado também um controle somente com os compostos puros, que mostrou não ter ação alguma contra a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

O composto que melhor reverteu o fenótipo da multiresistência na quimiossensibilização foi a batzelladina D (**12**). A norbatzelladina L (**5**) inibiu igualmente o fenótipo responsável pela resistência a múltiplas drogas, na concentração de 10 μM. Já com 5 μM a reversão foi mínima, mostrando o efeito dependente da concentração do composto puro. Todos os compostos apresentaram

$IC_{50} < 10 \mu M$ e conseguiram reverter o fenótipo da multiresistência na concentração de $10 \mu M$.

Comparando-se as atividades de inibição de ATPase da batzelladina L (6) e da norbatzelladina L (5), percebe-se que quanto maior a cadeia de carbono lateral, maior a afinidade à proteína responsável pela expressão da resistência múltipla. Já para a reversão na quimiossensibilização se observa o contrário.

Sendo assim, o comprimento da cadeia lateral das batzelladinas L e norbatzelladina L pode ser em parte responsável pela ação inibitória observada, indicando que as substâncias se ligam no interior da célula ao sítio de hidrólise do ATP. Entretanto, uma cadeia muito longa pode interferir na entrada do composto na membrana celular, ocasionando uma menor reversão da resistência múltipla. Tal efeito pode ser observado na baixa quimiossensibilização da batzelladina L (6), substância com maior cadeia em relação à norbatzelladina L (5).

Os resultados da inibição da atividade ATPásica mostram que esses compostos são possíveis inibidores do fenótipo responsável pela expressão da resistência múltipla, responsável por fazer as células e os micro-organismos resistentes a diversos tipos de fármacos utilizados para o tratamento de diversas doenças como câncer e infecções.

8.6. Referências

- ALEXANDER, J., SATOSKAR A. R.; RUSSEL D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**, v. 112, p. 2993–3002, 1999.
- BERLINCK, R. G. S.; TRINDADE-SILVA, A. E. SANTOS, M. F. C. The chemistry and biology of organic guanidine derivatives. **Natural Products Reports**, v. 29, p. 1382-1406, 2012.
- BOUMENDJEL, A.; DI PIETRO, A.; DUMONTET, C.; BARRON, D. Recent advances in the discovery of flavonoids and analogs with high-affinity binding to p-glycoprotein responsible for cancer cell multidrug resistance. **Medicinal Research Reviews**, v. 22, p.512-529, 2002.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. (2007) **Manual de controle da leishmaniose tegumentar americana**. 2. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 182p.
- BRAY PG, BARRETT MP, WARD SA, KONING HP. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. **Trends Parasitol**, v. 19 p. 232–239, 2003.
- CONSEIL, G.; DECOTTIGNIES, A.; JAULT, J.M.; COMTE, G.; BARRON, D.; GOFFEAU, A.; DI PIETRO, A. Prenyl-flavonoids as potent inhibitors of the Pdr5p multidrug ABC transporter from *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemistry**, v. 39, p. 6910-6917, 2000.
- COWAN, F.M.; FRENCH, R. S.; MAYAUD, P.; GOPAL, R.; ROBINSON, N.J.; OLIVEIRA, S.A. Seroepidemiological study of herpes simplex virus types 1 and 2 in Brazil, Estonia, India, Morocco, and Sri Lanka. **Sexually Transmitted Infections**. v. 79, p. 286-90. 2003.
- CROFT, S. L., E YARDLEY V. Chemotherapy of *leishmaniasis*. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, p. 319–342, 2002.
- CROFT, S. L., SUNDAR, S. E FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in *leishmaniasis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, p. 111-26, 2006.
- DECOTTIGNIES, A.; GRANT, A. M.; NICHOLS, J. W.; DE WET, H.; MCINTOSH, D.; GOFFEAU, A. ATPase and multidrug transport activities of the overexpressed yeast ABC protein Yor1p. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p.12612-12622, 1998.
- GNONLONFIN G.J.; HELL, K.; ADJOVI, Y.; FANDOCHAN, P.; KOUDANDE, D.O.; MENSAH, G.A.; SANI, A.; BRIMER, L. A review on aflatoxin contamination and its implications in the developing world: a sub-Saharan African perspective. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, p. 349-65, 2013.
- GRAY, C. A. et al. Sulfated meroterpenoids from the Brazilian sponge *Callyspongia* sp. are inhibitors of the antileishmaniasis target adenosine phosphoribosyl transferase. **Journal of Organic Chemistry**, v.71, p. 8685, 2006.

HEDAYATI, M.T.; PASQUALOTTO, A.C.; WARN, P.A.; BOWYER, P.; DENNING, D.W. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Microbiology** (Reading, England), v. 153, p. 1677-1692, 2007.

HUBER, P. C.; MARUIAMA, C. H.; ALMEIDA, W. P. P-glycoprotein and multidrug resistance: structure-activity relationships of modulators. **Química Nova**, v. 33, p. 2148-2154, 2010.

KENSLER, T.W.; ROEBUCK, B.D.; WOGAN, G.N.; GROOPMAN, J.D. Aflatoxin: A 50-year odyssey of mechanistic and translational toxicology. **Toxicological Sciences**, 120, S28-S48, 2011.

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.; HAJDU, E.; BERLINCK, R. G. Antiparasitic, antineuroinflammatory, and cytotoxic polyketides from the marine sponge *Plakortis angulospiculatus* collected in Brazil. **Journal of Natural Products**, v.71, p.334-339, 2008.

KRAWCZYK, A.; ARND, M. A. E.; GROSSE-HOVEST, L.; WEICHERT, W.; GIEBEL, B.; DITTMER, U.; HENGEL, H.; JÄGERB, D.; SCHNEWEIS, K. E.; EIS-HÜBINGER, A. M.; ROGGENDORF, M.; KRAUSS, J.; HAUSEN, H. Z. Overcoming drug-resistant herpes simplex virus (HSV) infection by a humanized antibody. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, p. 6760-5, 2013.

LANGENBERG, A.G.; COREY, L.; ASHLEY, R.L.; LEONG, W.P.; STRAUS, S.E. A prospective study of new infections with herpes simplex virus type 1 and type 2. **The New England Journal of Medicine**. v. 341, p. 432-438. 1999.

LOOKER, K.J.; GARNETT, G.P. A systematic review of the epidemiology and interaction of herpes simplex virus types 1 and 2. **Sexually Transmitted Infections**. v.8, p.1103-1107. 2005

NOGUEIRA, A. J. M.; LIMA, M. E. F. DE; DA COSTA, J. B. N.; ALVES, E. S. S.; dos ANJOS, D. O.; VANNIER-SANTOS, M. A.; LANFREDI-RANGEL, A. Synthesis, characterization and study of activity inhibitory of new dialkylphosphoryl-hydrazones on the growth of trypanosomatids. **Química Nova**, v. 34, p. 1365-1369, 2011.

PESSA, L. F. C. Infecções pelos vírus da família herpesviridae no sistema nervoso central-aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais em pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

REIMÃO, J. Q. MIGOTTO, A. E.; KOSSUGA, M. H.; BERLINCK, R. G.; TEMPONE, A. G. Antiprotozoan activity of Brazilian marine cnidarian extracts and of a modified steroid from the octocoral *Carijoa riisei*. **Parasitology Research**, v. 103, p. 1445, 2008

SINGH, I. P.; BHARATE, S. B.; BHUTANI, K. K. Anti-HIV natural Products. **Current Science**, v. 89, p.269, 2005.

SMITH, J.S.; ROBINSON, J.N. Age-specific prevalence of infection with herpes simplex virus type 1 and 2: a global review. **The Journal of Infectious Diseases**. v.186, S3-S28, 2002.

WHITE, T.C.; MARR, K.A.; BOWDEN, R.A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, p. 382-402, 1998.

WHO/TDR. 2005. Making health research work for poor people. 17th Programme Report. Progress 2003-2004. **World Health Organization/ Tropical Disease Research**. **Genebra**, p.18-23.

WILLIAMS, J.H.; PHILLIPS, T.D.; JOLLY, P.E.; STILES, J.K.; JOLLY, C.M. Aggarwal D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, p. 1106-1122, 2004.

WU, H.C. Santella R. The role of aflatoxins in hepatocellular carcinoma. **Hepatitis monthly**, v.12, e7238, 2012.

YU, J.; CLEVELAND, T.E.; NIERMAN, W.C.; BENNETT, J.W. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and cropresistance to diseases. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 22, p. 194-202, 2005.

CAPÍTULO IX: Conclusões

O desenvolvimento deste projeto permitiu o isolamento de 12 compostos guanidínicos do extrato bruto *M. arbuscula*, a arbusculidinina (1) (inérita na literatura), a fromiamicalina (2), a crambescidina 800 (3), a arbusculidina (4) (inérita na literatura), as batzelladinas L (6), F (7), D (12), a norbatzelladina L (5), a batzellamida A A (8) (inérita na literatura), a hemibatzelladina J (9) (inérita na literatura), o Δ^{19} -hemibatzelladeno J (10) (inérita na literatura), o Δ^{20} -hemibatzelladeno J (11) (inérita na literatura). Este estudo possibilitou o isolamento de 6 compostos minoritários inéditos.

Esses resultados evidenciam a necessidade de um estudo cada vez aprofundado acerca do isolamento e identificação de metabolitos secundários minoritários, indicando que, apesar da esponja *Monachora arbuscula* ser extensamente estudada quanto à sua composição metabólica, ainda existem metabolitos secundários inéditos a serem estudados. Essa observação pode ser estendida aos mais diversos organismos e micro-organismos que são alvos de estudo da química de produtos naturais.

O isolamento de compostos bioativos como as batzelladinas, que apresentam uma variada gama de propriedades biológicas *in vitro*, sugere que as mesmas podem desempenhar uma função ecológica de competição, protegendo a esponja *Monachora arbuscula* de uma verdadeira "guerra química" envolvendo essas substâncias, que são extremamente tóxicas a alguns organismos e/ou micro-organismos.

Essas considerações são suportadas pelas atividades exibidas por esses compostos nos ensaios biológicos, especialmente no ensaio antifúngico frente às diferentes linhagens do fungo fitopatogênico *Aspergillus flavus*. Os resultados obtidos ratificam a importância do estudo, por parte dos químicos de produtos naturais, dos alcaloides guanidínicos e derivados da guanidina. Esses metabolitos são uma classe incomum de compostos, que exibem estruturas altamente complexas e diversas atividades biológicas, e que podem ser úteis na busca por novos fármacos potencialmente ativos para as mais diversas enfermidades que acometem o homem.

Figura 100. Alcaloides guanidínicos e derivados da guanidina isolados da esponja *Monachora arbuscula* durante a execução do projeto.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

MARIO FERREIRA CONCEIÇÃO SANTOS

**Alcaloides guanidínicos da esponja marinha *Monanchora arbuscula*:
Isolamento, identificação e atividades biológicas**

Orientador: Roberto Gomes Souza Berlinck

São Carlos SP

2014

MARIO FERREIRA CONCEIÇÃO SANTOS

**Alcaloides guanidínicos da esponja marinha *Monanchora arbuscula*:
Isolamento, identificação e atividades biológicas**

Tese apresentada ao instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em ciências. Área de concentração: Química orgânica e biológica.

São Carlos-SP

2014

Volume 2

Sumário

Figura 4.1. Espectro no UV da arbusculidina (1)	1
Figura 4.2. Espectro de massas da arbusculidina (1)	2
Figura 4.3. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, BRUKER AV- 600 MHz) da arbusculidina (1)	3
Figura 4.4. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, BRUKER AV- 600 MHz) da arbusculidina (1)	4
Figura 4.5. Espectro <i>g</i> COSY ($\text{DMSO}-d_6$, BRUKER AV- 600 MHz) da arbusculidina (1)	5
Figura 4.6. Espectro <i>g</i> HSQC ($\text{DMSO}-d_6$, BRUKER AV- 600 MHz) da arbusculidina (1)	6
Figura 4.7. Espectro <i>g</i> HMBC ($\text{DMSO}-d_6$, BRUKER AV- 600 MHz) da arbusculidina (1)	7
Figura 4.8. Espectro ^{15}N lrHMQC ($\text{DMSO}-d_6$, BRUKER AV- 600 MHz) da arbusculidina (1)	8
Figura 4.9. Espectro de massas da arbusculidina (1) sintetizada	9
Figura 4.10. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, BRUKER-DRX, 400 MHz) da arbusculidina (1) sintetizada.....	10
Figura 4.11. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, BRUKER-DRX, 400 MHz) da arbusculidina (1) sintetizada.....	11
Figura 5.2. Espectro no UV da fromiamicalina (2)	12
Figura 5.3. Espectro de massas de alta resolução da fromiamicalina (2)	13
Figura 5.4. Espectro MS/MS de alta resolução do íon $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 783,60809 da fromiamicalina (2)	14
Figura 5.5. Espectro de RMN de ^1H ($\text{MeOH}-d_4$, BRUKER- AVANCEIII, 600 MHz) da fromiamicalina (2)	15
Figura 5.6. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{MeOH}-d_4$, BRUKER- AVANCEIII, 600 MHz) da fromiamicalina (2)	16
Figura 5.7. Espectro <i>g</i> COSY ($\text{MeOH}-d_4$, BRUKER- AVANCEIII, 600 MHz) da fromiamicalina (2)	17
Figura 5.8. Espectro <i>g</i> HSQC ($\text{MeOH}-d_4$, BRUKER- AVANCEIII, 600 MHz) da fromiamicalina (2)	18
Figura 5.9. Espectro <i>g</i> HMBC ($\text{MeOH}-d_4$, BRUKER- AVANCEIII, 600 MHz) da fromiamicalina (2)	19

Figura 5.10. Espectro no UV da crambescidina 800 (3)	20
Figura 5.11. Espectro de massas da crambescidina 800 (3)	21
Figura 5.12. Espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , BRUKER-DRX, 400 MHz) da crambescidina 800 (3)	22
Figura 5.13. Espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , BRUKER-DRX, 400 MHz) da crambescidina 800 (3)	23
Figura 6.1. Espectro no UV da arbusculidina (4)	24
Figura 6.2. Espectro de massas da arbusculidina (4)	25
Figura 6.3. Espectro de RMN de ^1H (Piridina- d_5 , BRUKER AV- 600 MHz) da arbusculidina (4)	26
Figura 6.4. Espectro de RMN de ^{13}C (Piridina- d_5 , BRUKER AV- 600 MHz) da arbusculidina (4)	27
Figura 6.5. Espectro gCOSY (Piridina- d_5 , BRUKER AV- 600 MHz) da arbusculidina (4)	28
Figura 6.6. Espectro gCOSY (Piridina- d_5 , BRUKER AV- 600 MHz) da arbusculidina (4)	29
Figura 6.7. Espectro gHSQC (Piridina- d_5 , BRUKER AV- 600 MHz) da arbusculidina (4)	30
Figura 6.8. Espectro gHMBC (Piridina- d_5 , BRUKER AV- 600 MHz) da arbusculidina (4)	31
Figura 7.1. Espectro de massas de alta resolução da norbatzelladina L (5)	32
Figura 7.2. Espectro MS/MS de alta resolução do íon $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 639,52886 da norbatzelladina L (5)	33
Figura 7.3. Espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , BRUKER-DRX, 400 MHz) da norbatzelladina L (5)	34
Figura 7.4. Espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , BRUKER-DRX, 400 MHz) da norbatzelladina (5)	35
Figura 7.5. Espectro gCOSY (MeOH- d_4 , BRUKER-DRX, 400 MHz) da norbatzelladina (5)	36
Figura 7.6. Espectro gHSQC (MeOH- d_4 , BRUKER-DRX, 400 MHz) da norbatzelladina (5)	37
Figura 7.7. Espectro gHMBC (MeOH- d_4 , BRUKER-DRX, 400 MHz) da norbatzelladina (5)	38
Figura 7.8. Espectro de massas de alta resolução da batzelladina L (6)	39

Figura 7.9. Espectro MS/MS de alta resolução do íon $[M+H]^+$ m/z 653,54504 da batzelladina L (6)	40
Figura 7.10. Espectro de RMN de 1H (MeOH- d_4 , BRUKER-DRX, 400 MHz) da batzelladina L (6)	41
Figura 7.11. Espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , BRUKER-DRX, 400 MHz) da batzelladina L (6)	42
Figura 7.12. Espectro gCOSY (MeOH- d_4 , BRUKER-DRX, 400 MHz) da batzelladina L (6)	43
Figura 7.13. Espectro gHSQC (MeOH- d_4 , BRUKER-DRX, 400 MHz) da batzelladina L (6)	44
Figura 7.14. Espectro gHMBC (MeOH- d_4 , BRUKER-DRX, 400 MHz) da batzelladina L (6)	45
Figura 7.15. Espectro de massas de alta resolução da batzelladina F (7)	46
Figura 7.16. Espectro MS/MS de alta resolução do íon $[M+H]^+$ m/z 625,51306 da batzelladina F (7)	47
Figura 7.17. Espectro de RMN de 1H (MeOH- d_4 , AGILENT- PREMIUN SHILD, 500 MHz) da batzelladina F (7)	48
Figura 7.18. Espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , AGILENT- PREMIUN SHILD, 500 MHz) da batzelladina F (7)	49
Figura 7.19. Espectro de DEPT (MeOH- d_4 , AGILENT- PREMIUN SHILD, 500 MHz) da batzelladina F (7)	50
Figura 7.20. Espectro gCOSY (MeOH- d_4 , AGILENT- PREMIUN SHILD, 500 MHz) da batzelladina F (7)	51
Figura 7.21. Espectro gHSQC (MeOH- d_4 , AGILENT- PREMIUN SHILD, 500 MHz) da batzelladina F (7)	52
Figura 7.22. Espectro gHMBC (MeOH- d_4 , AGILENT- PREMIUN SHILD, 500 MHz) da batzelladina F (7)	53
Figura 7.23. Espectro tROESY (MeOH- d_4 , AGILENT- PREMIUN SHILD, 500 MHz) da batzelladina F (7)	54
Figura 7.24. Espectro gNOESY (MeOH- d_4 , AGILENT- PREMIUN SHILD, 500 MHz) da batzelladina F (7)	55
Figura 7.25. Espectro no UV da batzellamida A (8)	56
Figura 7.26. Espectro de massas da batzellamida A (8)	57
Figura 7.27. Espectro de RMN de 1H (MeOH- d_4 , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (8)	58
Figura 7.28. Espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (8)	59

Figura 7.29. Espectro <i>g</i> COSY (MeOH- <i>d</i> ₄ , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (8)	60
Figura 7.30. Espectro <i>g</i> HSQC (MeOH- <i>d</i> ₄ , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (8)	61
Figura 7.31. Espectro <i>g</i> HMBC (MeOH- <i>d</i> ₄ , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (8)	62
Figura 7.32. Espectro <i>t</i> ROESY (MeOH- <i>d</i> ₄ , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (8)	63
Figura 7.33. Espectro ¹⁵ NlrHMQC (MeOH- <i>d</i> ₄ , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (8).....	64
Figura 7.34. Espectro de RMN de ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆ , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (8)	65
Figura 7.35. Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (DMSO- <i>d</i> ₆ , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (8).....	66
Figura 7.36. Espectro de RMN de ¹³ C (DMSO- <i>d</i> ₆ , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (8)	67
Figura 7.37. Espectro <i>g</i> COSY (DMSO- <i>d</i> ₆ , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (8)	68
Figura 7.38. Espectro <i>g</i> HSQC (DMSO- <i>d</i> ₆ , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (8)	69
Figura 7.39. Espectro <i>g</i> HMBC (DMSO- <i>d</i> ₆ , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (8)	70
Figura 7.40. Ampliação do Espectro <i>g</i> HMBC (DMSO- <i>d</i> ₆ , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (8)	71
Figura 7.41. Espectro <i>t</i> ROESY (DMSO- <i>d</i> ₆ , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (8)	72
Figura 7.42. Espectro ¹⁵ NHSQ (DMSO- <i>d</i> ₆ , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (8)	73
Figura 7.43. Espectro ¹⁵ NlrHMQC (DMSO- <i>d</i> ₆ , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (8).....	74
Figura 7.44. Espectro de RMN de ¹ H (Piridina- <i>d</i> ₅ , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (8)	75
Figura 7.45. Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (Piridina- <i>d</i> ₅ , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (8).....	76
Figura 7.46. Ampliação do espectro de RMN de ¹³ C (Piridina- <i>d</i> ₅ , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (8).....	77

Figura 7.47. Espectro gCOSY (Piridina- d_5 , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (8)	78
Figura 7.48. Espectro gHSQC (Piridina- d_5 , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (8)	79
Figura 7.49. Espectro gHMBC (Piridina- d_5 , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (8)	80
Figura 7.50. Ampliação do Espectro gHMBC (Piridina- d_5 , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (8)	81
Figura 7.51. Espectro tROESY (Piridina- d_5 , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (8)	82
Figura 7.52. Espectro ^{15}N HSQ (Piridina- d_5 , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (8)	83
Figura 7.53. Espectro ^{15}N lrHMQC (Piridina- d_5 , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (8)	84
Figura 7.54. Espectro no UV da Δ^{19} -hemibatzelladeno J (9) e Δ^{20} -hemibatzelladeno J (10)	85
Figura 7.55. Espectro de massas da Δ^{19} -hemibatzelladeno J (9) e Δ^{20} -hemibatzelladeno J (10)	86
Figura 7.56. Espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , BRUKER AV- 600 MHz) da Δ^{19} -hemibatzelladeno J (9) e Δ^{20} -hemibatzelladeno J (10)	87
Figura 7.57. Espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , BRUKER AV- 600 MHz) da Δ^{19} -hemibatzelladeno J (9) e Δ^{20} -hemibatzelladeno J (10)	88
Figura 7.58. Espectro gCOSY (MeOH- d_4 , BRUKER AV- 600 MHz) da Δ^{19} -hemibatzelladeno J (9) e Δ^{20} -hemibatzelladeno J (10)	89
Figura 7.59. Espectro gHSQC (MeOH- d_4 , BRUKER AV- 600 MHz) da Δ^{19} -hemibatzelladeno J (9) e Δ^{20} -hemibatzelladeno J (10)	90
Figura 7.60. Espectro gHMBC (MeOH- d_4 , BRUKER AV- 600 MHz) da Δ^{19} -hemibatzelladeno J (9) e Δ^{20} -hemibatzelladeno J (10)	91
Figura 7.61. Espectro tROESY (MeOH- d_4 , BRUKER AV- 600 MHz) da Δ^{19} -hemibatzelladeno J (9) e Δ^{20} -hemibatzelladeno J (10)	92
Figura 7.62. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , BRUKER AV- 600 MHz) da Δ^{19} -hemibatzelladeno J (9) e Δ^{20} -hemibatzelladeno J (10)	93
Figura 7.63. Ampliação do Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , BRUKER AV- 600 MHz) da Δ^{19} -hemibatzelladeno J (9) e Δ^{20} -hemibatzelladeno J (10)	94
Figura 7.64. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , BRUKER AV- 600 MHz) da Δ^{19} -hemibatzelladeno J (9) e Δ^{20} -hemibatzelladeno J (10)	95

Figura 7.65. Espectro $g\text{COSY}$ ($\text{DMSO}-d_6$, BRUKER AV- 600 MHz) da Δ^{19} -hemibatzelladeno J (9) e Δ^{20} -hemibatzelladeno J (10)	96
Figura 7.66. Espectro $g\text{HSQC}$ ($\text{DMSO}-d_6$, BRUKER AV- 600 MHz) da Δ^{19} -hemibatzelladeno J (9) e Δ^{20} -hemibatzelladeno J (10)	97
Figura 7.67. Espectro $g\text{HMBC}$ ($\text{DMSO}-d_6$, BRUKER AV- 600 MHz) da Δ^{19} -hemibatzelladeno J (9) e Δ^{20} -hemibatzelladeno J (10)	98
Figura 7.68. Espectro $t\text{ROESY}$ ($\text{DMSO}-d_6$, BRUKER AV- 600 MHz) da Δ^{19} -hemibatzelladeno J (9) e Δ^{20} -hemibatzelladeno J (10)	99
Figura 7.69. Espectro $^{15}\text{NHSQC}$ ($\text{DMSO}-d_6$, BRUKER AV- 600 MHz) da Δ^{19} -hemibatzelladeno J (9) e Δ^{20} -hemibatzelladeno J (10)	100
Figura 7.70. Espectro no UV da hemibatzelladina J (11).....	101
Figura 7.71. Espectro de massas da hemibatzelladina J (11)	102
Figura 7.72. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, BRUKER AV- 600 MHz) da hemibatzelladina J (11).....	103
Figura 7.73. Ampliação do espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, BRUKER AV- 600 MHz) da hemibatzelladina J (11)	104
Figura 7.74. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, BRUKER AV- 600 MHz) da hemibatzelladina J (11).....	105
Figura 7.75. Espectro $g\text{COSY}$ ($\text{DMSO}-d_6$, BRUKER AV- 600 MHz) da hemibatzelladina J (11).....	106
Figura 7.76. Espectro $g\text{HSQC}$ ($\text{DMSO}-d_6$, BRUKER AV- 600 MHz) da hemibatzelladina J (11).....	107
Figura 7.77. Espectro $g\text{HMBC}$ ($\text{DMSO}-d_6$, BRUKER AV- 600 MHz) da hemibatzelladina J (11).....	108
Figura 7.78. Ampliação do espectro $g\text{HMBC}$ ($\text{DMSO}-d_6$, BRUKER AV- 600 MHz) da hemibatzelladina J (11).....	109
Figura 7.79. Espectro $t\text{ROESY}$ ($\text{DMSO}-d_6$, BRUKER AV- 600 MHz) da hemibatzelladina J (11).....	110
Figura 7.80. Espectro $^{15}\text{NHSQC}$ ($\text{DMSO}-d_6$, BRUKER AV- 600 MHz) da hemibatzelladina J (11).....	111
Figura 7.81. Espectro $^{15}\text{NlrHMQC}$ ($\text{DMSO}-d_6$, BRUKER AV- 600 MHz) da hemibatzelladina J (11).....	112
Figura 7.82. Espectro de massas de alta resolução da batzelladina D (12)	113
Figura 7.83. Espectro MS/MS de alta resolução do íon $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 463,37274 da batzelladina D (12).....	114
Figura 7.84. Espectro de RMN de ^1H ($\text{MeOH}-d_4$, AGILENT- PREMIUN SHILD, 400 MHz) da batzelladina D (12)	115

Figura 7.85. Espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , AGILENT- PREMIUN SHILD, 400 MHz) da batzelladina D (12)	116
Figura 7.86. Espectro $g\text{COSY}$ (MeOH- d_4 , AGILENT- PREMIUN SHILD, 400 MHz) da batzelladina D (12).....	117
Figura 7.87. Espectro $g\text{HSQC}$ (MeOH- d_4 , AGILENT- PREMIUN SHILD, 400 MHz) da batzelladina D (12).....	118
Figura 7.88. Espectro $g\text{HMBC}$ (MeOH- d_4 , AGILENT- PREMIUN SHILD, 400 MHz) da batzelladina D (12).....	119
Figura 7.89. Espectro $g\text{NOESY}$ (MeOH- d_4 , AGILENT- PREMIUN SHILD, 400 MHz) da batzelladina D (12).....	120

Compostos isolados da esponja *Monanchora arbuscula* durante a execução do projeto

(11) Δ^{20} (Z)

Figura 4.1. Espectro no UV da arbusculidinina (1)

Figura 4.2. Espectro de massas da arbusculidinina (1)

Figura 4.3. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , BRUKER AV- 600 MHz) da arbusculidinina (1)

Figura 4.4. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , BRUKER AV- 600 MHz) da arbusculidina (1)

Figura 4.5. Espectro *g*COSY (DMSO-*d*₆, BRUKER AV- 600 MHz) da arbusculidinina (1)

Figura 4.6. Espectro *g*HSQC (DMSO-*d*₆, BRUKER AV- 600 MHz) da arbusculidinina (1)

Figura 4.7. Espectro *g*HMBC (DMSO-*d*₆, BRUKER AV- 600 MHz) da arbusculidina (1)

Figura 4.8. Espectro ^{15}N krHMQC (DMSO- d_6 , BRUKER AV- 600 MHz) da arbusculidina (1)

T: FTMS + p NSI Full ms [120.00-2000.00]

Figura 4.9. Espectro de massas da arbusculidinina (1) sintetizada

Figura 4.10. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, BRUKER-DRX, 400 MHz) da arbusculidinina (1) sintetizada

Supervisor Name PJM

PMH-265-16/24

15minDEPTQ.b DMSO {C:\Bruker\TopSpin3.2} PJM 17

Figura 4.11. Espectro de RMN de ^{13}C (DMSO- d_6 , BRUKER-DRX, 400 MHz) da arbusculidinina (**1**) sintetizada

Figura 5.1. Espectro no UV da fromiamicalina (2)

3 #11 RT: 0.41 AV: 1 NL: 6.43E8
T: FTMS + p ESI Full ms [450.00-900.00]

Figura 5.2. Espectro de massas de alta resolução da fromiamicalina (2)

MS2-784 #21 RT: 0.29 AV: 1 NL: 1.23E9
T: FTMS + p ESI Full ms2 784.00@cid35.00 [215.00-900.00]

Figura 5.3. Espectro MS/MS de alta resolução do íon $[M+H]^+$ m/z 783,60809 da fromiamicalina (2)

Figura 5.4. Espectro de RMN de ^1H ($\text{MeOH-}d_4$, BRUKER- AVANCEIII, 600 MHz) da fromiamicalina (2)

Figura 5.5. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{MeOH-}d_4$, BRUKER- AVANCEIII, 600 MHz) da fromiamicalina (2)

Figura 5.6. Espectro gCOSY (MeOH- d_4 , BRUKER- AVANCEIII, 600 MHz) da fromiamicalina (2)

Figura 5.8. Espectro gHMBC (MeOH-*d*₄, BRUKER- AVANCEIII, 600 MHz) da fromiamicalina (**2**)

Figura 5.9. Espectro no UV da crambescidina 800 (3)

Figura 5.10. Espectro de massas da crambescidina 800 (3)

Figura 5.11. Espectro de RMN de ^1H ($\text{MeOH-}d_4$, BRUKER-DRX, 400 MHz) da crambescidina 800 (3)

Figura 5.12. Espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , BRUKER-DRX, 400 MHz) da crambescidina 800 (**3**)

Figura 6.1. Espectro no UV da arbusculidina (4)

Figura 6.2. Espectro de massas da arbusculidina (4)

Figura 6.3. Espectro de RMN de ^1H (Piridina- d_5 , BRUKER AV- 600 MHz) da arbusculidina (4)

Figura 6.4. Espectro de RMN de ^{13}C (Piridina- d_5 , BRUKER AV- 600 MHz) da arbusculidina (**4**)

Figura 6.5. Espectro gCOSY (Piridina- d_5 , BRUKER AV- 600 MHz) da arbusculidina (4)

Figura 6.6. Espectro gCOSY (Piridina- d_5 , BRUKER AV- 600 MHz) da arbusculidina (**4**)

Figura 6.7. Espectro *g*HSQC (Piridina-*d*₅, BRUKER AV- 600 MHz) da arbusculidina (**4**)

Figura 6.8. Espectro gHMBC (Piridina-*d*₅, BRUKER AV- 600 MHz) da arbusculidina (4)

15 #37-41 RT: 1.49-1.66 AV: 5 NL: 3.47E7
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-800.00]

Figura 7.1. Espectro de massas de alta resolução da norbatzelladina L (5)

MS2-15 #16 RT: 0.22 AV: 1 NL: 2.65E8
F: FTMS + p ESI Full ms2 639.00@cid30.00 [175.00-800.00]

Figura 7.2. Espectro MS/MS de alta resolução do íon $[M+H]^+$ m/z 639,52886 da norbatzelladina L (5)

Figura 7.3. Espectro de RMN de ^1H (MeOH-d_4 , BRUKER-DRX, 400 MHz) da norbatzelladina L (5)

Figura 7.4. Espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , BRUKER-DRX, 400 MHz) da norbatzelladina (**5**)

Figura 7.5. Espectro gCOSY ($\text{MeOH-}d_4$, BRUKER-DRX, 400 MHz) da norbatzelladina (5)

Figura 7.6. Espectro gHSQC (MeOH-*d*₄, BRUKER-DRX, 400 MHz) da norbatzelladina (5)

Figura 7.7. Espectro gHMBC (MeOH- d_4 , BRUKER-DRX, 400 MHz) da norbatzelladina (5)

13 #6 RT: 0.20 AV: 1 NL: 1.28E9
F: FTMS + p ESI Full ms [100.00-800.00]

Figura 7.8. Espectro de massas de alta resolução da batzelladina L (6)

Figura 7.9. Espectro MS/MS de alta resolução do íon $[M+H]^+$ m/z 653,54504 da batzelladina L (**6**)

Figura 7.10. Espectro de RMN de ^1H ($\text{MeOH-}d_4$, BRUKER-DRX, 400 MHz) da batzelladina L (6)

Figura 7.11. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{MeOH-}d_4$, BRUKER-DRX, 400 MHz) da batzelladina L (6)

5)

Figura 7.13. Espectro $g\text{HSQC}$ ($\text{MeOH-}d_4$, BRUKER-DRX, 400 MHz) da batzelladina L (6)

Figura 7.14. Espectro gHMBC (MeOH-*d*₄, BRUKER-DRX, 400 MHz) da batzelladina L (6)

12 #7 RT: 0.24 AV: 1 NL: 1.54E9
F: FTMS + p ESI Full ms [100.00-800.00]

Figura 7.15. Espectro de massas de alta resolução da batzelladina F (7)

MS2-12 #12 RT: 0.16 AV: 1 NL: 3.60E8
F: FTMS + p ESI Full ms2 625.00@cid30.00 [170.00-800.00]

Figura 7.16. Espectro MS/MS de alta resolução do íon $[M+H]^+$ m/z 625,51306 da batzelladina F (7)

Figura 7.17. Espectro de RMN de ^1H ($\text{MeOH-}d_4$, AGILENT- PREMIUN SHILD, 500 MHz) da batzelladina F (7)

Figura 7.18. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{MeOH-}d_4$, AGILENT- PREMIUN SHILD, 500 MHz) da batzelladina F (7)

Figura 7.19. Espectro de DEPT (MeOH- d_4 , AGILENT- PREMIUN SHILD, 500 MHz) da batzelladina F (7)

Figura 7.20. Espectro gCOSY (MeOH-*d*₄, AGILENT- PREMIUN SHILD, 500 MHz) da batzelladina F (7)

Figura 7.21. Espectro *g*HSQC (MeOH-*d*₄, AGILENT- PREMIUN SHILD, 500 MHz) da batzelladina F (7)

Figura 7.22. Espectro gHMBC (MeOH-*d*₄, AGILENT- PREMIUN SHILD, 500 MHz) da batzelladina F (7)

Figura 7.23. Espectro *t*ROESY (MeOH-*d*₄, AGILENT- PREMIUN SHILD, 500 MHz) da batzelladina F (7)

Figura 7.24. Espectro gNOESY (MeOH- d_4 , AGILENT- PREMIUN SHILD, 500 MHz) da batzelladina F (7)

Figura 7.25. Espectro no UV da batzellamida A (8)

Figura 7.26. Espectro de massas da batzellamida A (8)

Figura 7.27. Espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (**8**)

Figura 7.28. Espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (**8**)

Figura 7.29. Espectro gCOSY (MeOH-*d*₄, BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (**8**)

Figura 7.30. Espectro gHSQC (MeOH- d_4 , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (**8**)

Figura 7.31. Espectro gHMBC (MeOH- d_4 , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (**8**)

Figura 7.32. Espectro *t*ROESY (MeOH-*d*₄, BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (**8**)

Figura 7.33. Espectro ^{15}N HMQC (MeOH- d_4 , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (**8**)

Figura 7.34. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (**8**)

Figura 7.35. Ampliação do espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (8)

Figura 7.36. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (**8**)

Figura 7.37. Espectro gCOSY (DMSO- d_6 , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (**8**)

Figura 7.38. Espectro *g*HSQC (DMSO-*d*₆, BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (**8**)

Figura 7.39. Espectro gHMBC (DMSO-*d*₆, BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (**8**)

Figura 7.40. Ampliação do Espectro gHMBC (DMSO- d_6 , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (**8**)

Figura 7.41. Espectro *t*ROESY (DMSO-*d*₆, BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (**8**)

Figura 7.42. Espectro $^{15}\text{NHSQ}$ (DMSO- d_6 , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (**8**)

Figura 7.43. Espectro ^{15}N HMQC (DMSO- d_6 , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (**8**)

Figura 7.44. Espectro de RMN de ^1H (Piridina- d_5 , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (**8**)

Figura 7.45. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (Piridina- d_5 , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (**8**)

Figura 7.46. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (Piridina- d_5 , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (8)

Figura 7.47. Espectro gCOSY (Piridina- d_5 , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (8)

Figura 7.48. Espectro gHSQC (Piridina- d_5 , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (**8**)

Figura 7.49. Espectro gHMBC (Piridina- d_5 , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (8)

Figura 7.50. Ampliação do Espectro gHMBC (Piridina- d_5 , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (**8**)

Figura 7.51. Espectro *t*ROESY (Piridina-*d*₅, BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (**8**)

Figura 7.52. Espectro $^{15}\text{NHSQ}$ (Piridina- d_5 , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (**8**)

Figura 7.53. Espectro ^{15}N HMQC (Piridina- d_5 , BRUKER AV- 600 MHz) da batzellamida A (**8**)

Figura 7.54. Espectro no UV da Δ^{19} -hemibatzelladeno J (9) e Δ^{20} -hemibatzelladeno J (10)

Figura 7.55. Espectro de massas da Δ^{19} -hemibatzelladeno J (9) e Δ^{20} -hemibatzelladeno J (10)

Figura 7.56. Espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , BRUKER AV- 600 MHz) da Δ^{19} -hemibatzelladeno J (**9**) e Δ^{20} -hemibatzelladeno J (**10**)

Figura 7.57. Espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , BRUKER AV- 600 MHz) da Δ^{19} -hemibatzelladeno J (**9**) e Δ^{20} -hemibatzelladeno J (**10**)

Figura 7.58. Espectro gCOSY (MeOH-*d*₄, BRUKER AV- 600 MHz) da Δ^{19} -hemibatzelladeno J (**9**) e Δ^{20} -hemibatzelladeno J (**10**)

Figura 7.59. Espectro gHSQC (MeOH- d_4 , BRUKER AV- 600 MHz) da Δ^{19} -hemibatzelladeno J (**9**) e Δ^{20} -hemibatzelladeno J (**10**)

Figura 7.60. Espectro gHMBC (MeOH-*d*₄, BRUKER AV- 600 MHz) da Δ^{19} -hemibatzelladeno J (**9**) e Δ^{20} -hemibatzelladeno J (**10**)

Figura 7.61. Espectro *t*ROESY (MeOH-*d*₄, BRUKER AV- 600 MHz) da Δ^{19} -hemibatzelladeno J (**9**) e Δ^{20} -hemibatzelladeno J (**10**)

Figura 7.62. Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , BRUKER AV- 600 MHz) da Δ^{19} -hemibatzelladeno J (**9**) e Δ^{20} -hemibatzelladeno J (**10**)

Figura 7.63. Ampliação do Espectro de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , BRUKER AV- 600 MHz) da Δ^{19} -hemibatzelladeno J (**9**) e Δ^{20} -hemibatzelladeno J (**10**)

Figura 7.64. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, BRUKER AV- 600 MHz) da Δ^{19} -hemibatzelladeno J (**9**) e Δ^{20} -hemibatzelladeno J (**10**)

Figura 7.65. Espectro gCOSY (DMSO-*d*₆, BRUKER AV- 600 MHz) da Δ^{19} -hemibatzelladeno J (9) e Δ^{20} -hemibatzelladeno J (10)

Figura 7.66. Espectro gHSQC (DMSO-*d*₆, BRUKER AV- 600 MHz) da Δ^{19} -hemibatzelladeno J (**9**) e Δ^{20} -hemibatzelladeno J (**10**)

Figura 7.67. Espectro gHMBC (DMSO-*d*₆, BRUKER AV- 600 MHz) da Δ^{19} -hemibatzelladeno J (**9**) e Δ^{20} -hemibatzelladeno J (**10**)

Figura 7.68. Espectro t ROESY (DMSO- d_6 , BRUKER AV- 600 MHz) da Δ^{19} -hemibatzelladeno J (**9**) e Δ^{20} -hemibatzelladeno J (**10**)

Figura 7.69. Espectro ^{15}N HSQC (DMSO- d_6 , BRUKER AV- 600 MHz) da Δ^{19} -hemibatzelladeno J (**9**) e Δ^{20} -hemibatzelladeno J (**10**)

Figura 7.70. Espectro no UV da hemibatzelladina J (11)

Figura 7.71. Espectro de massas da hemibatzelladina J (11)

Figura 7.72. Espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, BRUKER AV- 600 MHz) da hemibatzelladina J (11)

Figura 7.73. Ampliação do espectro de RMN de ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, BRUKER AV- 600 MHz) da hemibatzelladina J (**11**)

Figura 7.74. Espectro de RMN de ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, BRUKER AV- 600 MHz) da hemibatzelladina J (**11**)

Figura 7.75. Espectro gCOSY (DMSO- d_6 , BRUKER AV- 600 MHz) da hemibatzelladina J (11)

Figura 7.76. Espectro *g*HSQC (DMSO-*d*₆, BRUKER AV- 600 MHz) da hemibatzelladina J (**11**)

Figura 7.77. Espectro gHMBC (DMSO-*d*₆, BRUKER AV- 600 MHz) da hemibatzelladina J (**11**)

Figura 7.78. Ampliação do Espectro gHMBC (DMSO- d_6 , BRUKER AV- 600 MHz) da hemibatzelladina J (11)

Figura 7.79. Espectro *t*ROESY (DMSO-*d*₆, BRUKER AV- 600 MHz) da hemibatzelladina J (**11**)

Figura 7.80. Espectro ^{15}N HSQC (DMSO- d_6 , BRUKER AV- 600 MHz) da hemibatzelladina J (**11**)

Figura 7.81. Espectro ^{15}N HMQC (DMSO- d_6 , BRUKER AV- 600 MHz) da hemibatzelladina J (**11**)

Figura 7.82. Espectro de massas de alta resolução da batzelladina D (12)

MS2-14-02 #13 RT: 0.18 AV: 1 NL: 3.29E9

F: FTMS + p ESI Full ms2 463.00@cid24.00 [125.00-800.00]

Figura 7.83. Espectro MS/MS de alta resolução do íon $[M+H]^+$ m/z 463,37274 da batzelladina D (12)

Figura 7.84. Espectro de RMN de ^1H (MeOH- d_4 , AGILENT- PREMIUN SHILD, 400 MHz) da batzelladina D (**12**)

Figura 7.85. Espectro de RMN de ^{13}C (MeOH- d_4 , AGILENT- PREMIUN SHILD, 400 MHz) da batzelladina D (**12**)

Figura 7.87. Espectro gHSQC (MeOH- d_4 , AGILENT- PREMIUN SHILD, 400 MHz) da batzelladina D (12)

Figura 7.88. Espectro gHMBC (MeOH-*d*₄, AGILENT- PREMIUN SHILD, 400 MHz) da batzelladina D (**12**)

Figura 7.89. Espectro gNOESY (MeOH- d_4 , AGILENT- PREMIUN SHILD, 400 MHz) da batzelladina D (12)