UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

RENATA TORRES MATTOS PASCHOALINO DE SOUZA

**Alcaloides bromopirrólicos da Esponja Marinha *Dictyonella* sp. do Delta do Rio
Amazonas**

São Carlos
2018

Renata Torres Mattos Paschoalino de Souza

Alcaloides bromopirrólicos da Esponja Marinha *Dictyonella* sp. do Delta do Rio Amazonas

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck

São Carlos
2018

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck pela orientação, paciência e dedicação durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Antônio G. Ferreira (DQ-UFSCar) pela obtenção dos espectros de RMN.

Aos técnicos: Fabiana, Karin, André e Aldimar (IQSC-USP), pelo auxílio na obtenção de dados espectroscópicos.

À Prof. Dra. Andréa Dessen (UNICAMP) e sua aluna de mestrado Fernanda R. Costa pela realização do bioensaio de atividade antibacteriana.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida.

Aos colegas do Grupo de Química Orgânica de Sistemas Biológicos pela amizade e auxílio: Karen, Éverton, Ariane, Julie, Jairo, Vítor, Mirelle, Juliano, Laura, Fabiana, Karin, Juliana, Luciane e Darlon.

À minha família e à Sarah, por todo o apoio e força durante esse trajeto.

RESUMO

O presente projeto originou-se da coleta de dois gêneros de esponja (*Dictyonella* e *Agelas*) em expedição a bordo do Navio Cruzeiro do Sul (Marinha do Brasil). Esta região é submetida a um forte ciclo sazonal no padrão de dispersão da pluma do Rio Amazonas, provocando características ambientais únicas para a biossíntese de novas moléculas pelos organismos que habitam o local.

A separação do extrato aquoso da *Dictyonella* sp. através de várias etapas cromatográficas, levou ao isolamento e possibilitou a identificação de sete alcaloides bromopirrólicos: a himenidina (**16**), a clathrodina (**17**) e a monobromoisofaquelina (**20**) compostos já reportados na literatura. A 4-desbromooroidina (**28**), a 5-desbromo-seco-isofaquelina (**30**), a 4-desbromo-seco-isofaquelina (**31**) e a 5-bromopalau'amina (**32**) são compostos inéditos. Da esponja *Agelas sventres*, foi isolada a oroidina (**15**).

Palavras-chaves: Metabólitos secundários, esponja marinha, foz do Rio Amazonas, alcaloides bromopirrólicos.

Abstract

This project originated from the collection of sponges belonging to two genera (*Dictyonella* and *Agelas*), in an expedition of the Cruzeiro do Sul ship (Brazilian Navy) along the Amazon River mouth (Pará). This region is subject to a strong seasonal cycle related to the pattern of dispersion of the plume of the Amazon River that causes unique environmental characteristics for the biosynthesis of new molecules by the organisms that inhabit the place.

Extensive separation of the MeOH extract of the marine sponge *Dictyonella* sp. By several steps of chromatographic separation, led to the isolation and identification of seven bromopyrrole alkaloids: hymenidin (**16**), clathrocin (**17**) and monobromoisophakellin (**20**), compounds already reported in the literature. 4-Desbromooroidin (**28**), 5-debromo-seco-isophakellin (**30**), 4-debromo-seco-isophakellin (**31**) and 5-bromopalau'amine (**32**) are unprecedented. The purification of the sponge *Agelas sventres* extract led to the isolation of oroidin (**15**).

Keywords: Secondary metabolites, marine sponge, Amazon River mouth, bromopyrrolic alkaloids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esponja marinha <i>Agelas sventres</i> localizada nas Antilhas Holandesas....	15
Figura 2 - Expedição no Navio Cruzeiro do Sul da Marinha do Brasil à margem equatorial da Foz do Amazonas. (A) Navio Cruz do Sul no ancorado em Niterói. (B) Rede de porta sendo lançada. (C) Rede de porta com material biológico coletado. (D) Rodolitos e biota associada (e.g., esponjas marinhas).	19
Figura 3 - Fluxograma do trabalho realizado com o extrato bruto da esponja <i>Dictyonella</i> sp. nov. (W6).	31
Figura 4 – Fluxograma de separação das frações W6Ac, W6Ad e W6Ae reunidas..	33
Figura 5 - Perfil cromatográfico da fração W6A do extrato de 50 mg da esponja <i>Dictyonella</i> sp., analisado por HPLC-UV-MS ($\lambda_{\text{máx}}$ 254 nm).....	38
Figura 6 - Espectros de massas de baixa resolução (ESI ⁺) dos compostos observados na fração W6A do extrato de 50 mg da esponja <i>Dictyonella</i> sp.	39
Figura 7 - Perfil cromatográfico da fração W3A da esponja <i>Agelas sventres</i> (W3), obtido por HPLC-UV-MS ($\lambda_{\text{máx}}$ 254 nm).....	39
Figura 8 - Espectro de massas de baixa resolução (ESI ⁺) do composto observado na fração W3A do extrato de 50 mg da esponja <i>Agelas Sventres</i>	40
Figura 9 - Esquema de fracionamento do extrato da esponja <i>Dictyonella</i> sp. nov. (W6)	40
Figura 10 - Esquema de fracionamento do extrato da esponja <i>Dictyonella</i> sp. nov. (W6).	41
Figura 11 - Perfil cromatográfico da fração W6A2, obtido por HPLC-UV-MS ($\lambda_{\text{máx}}$ 254 nm).	41
Figura 12 - Espectros de massas dos picos observados na fração W6A2 por HPLC-UV-MS.....	41
Figura 13 – Fracionamento da fração W6A2 em coluna de Bio-Gel P-2 e subsequente separação da fração W6A2E por HPLC.....	42
Figura 14 – Cromatograma da separação por HPLC-UV da fração W6A2E em semipreparativa Inertsil C ₈ ($\lambda_{\text{máx}}$ 254 nm).....	43
Figura 15 - Perfil cromatográfico da fração W6A1, obtido por HPLC-UV-MS ($\lambda_{\text{máx}}$ 254 nm).	43

Figura 16 - Espectros de massas dos picos observados na fração W6A1 por HPLC-UV-MS.....	44
Figura 17 - Fluxograma da separação por HPLC-UV da fração W6A1	44
Figura 18 – Perfil cromatográfico da separação por HPLC-UV da fração W6A1 em coluna semipreparativa Inertsil C ₈ ($\lambda_{\text{máx}}$ 254 nm).	45
Figura 19 – Perfil cromatográfico da fração W6A13, obtido por HPLC-UV-MS ($\lambda_{\text{máx}}$ 254 nm).	45
Figura 20 – Espectros de ultravioleta e de massas dos picos observados na fração W6A13 por HPLC-UV-MS.	46
Figura 21 - Cromatograma da separação por HPLC-UV da fração W6A13 em coluna analítica Inertsil C ₈ ($\lambda_{\text{máx}}$ 254 nm).	46
Figura 22 - Fluxograma da separação por HPLC-UV da fração W6A13.	47
Figura 23 - Cromatograma da separação por HPLC-UV da fração W6A14 em coluna analítica Inertsil C ₈ ($\lambda_{\text{máx}}$ 254 nm).	47
Figura 24 - Cromatograma da separação por HPLC-UV da fração W6A143 em coluna analítica Inertsil C ₈ ($\lambda_{\text{máx}}$ 254 nm).	48
Figura 25 - Fluxograma da separação por HPLC-UV da fração W6A14.	48
Figura 26 - Espectro de massas de alta resolução (ESI ⁺) e espectro no UV da himenidina (16 , fração W6A2E3).....	49
Figura 27 - Correlações COSY e HMBC observadas para a himenidina (16).	51
Figura 28 - Espectro de absorção no UV da 4-desbromooroidina (29), em MeOH. ...	53
Figura 29 - Espectro de absorção no IV da 4-desbromooroidina (29), em pastilha de sílica.	53
Figura 30 - Espectro de massas de alta resolução (ESI ⁺) da 4-desbromooroidina (29)	54
Figura 31 - Correlações COSY e HMBC observadas para a 4-desbromooroidina (29).	56
Figura 32 - Espectro de massas de alta resolução (ESI ⁺) e de UV da clathrodina (17 , fração W6A132).	58
Figura 33 - Correlações COSY e HMBC observadas para a clathrodina (17).	59
Figura 34 - Espectro de absorção no UV da 5-desbromo-seco-isofaquelina (30), em MeOH.	61
Figura 35 - Espectro de absorção no IV da 5-desbromo-seco-isofaquelina (30), em pastilha de sílica.....	61

Figura 36 - Espectro de massas de alta resolução (ESI ⁺) da 4-desbromo-seco-isofaquelina (30 , fração W6A11).	62
Figura 37 - Correlações COSY e HMBC observadas para a 4-desbromo-seco-isofaquelina (30).	64
Figura 38 - Espectro de absorção no UV da 4-desbromo-seco-isofaquelina (32), em MeOH.	66
Figura 39 - Espectro de absorção no IV da 4-desbromo-seco-isofaquelina (32), em pastilha de sílica.	66
Figura 40 - Espectro de massas de alta resolução (ESI ⁺) da 4-desbromo-seco-isofaquelina (32 , fração W6A12).	67
Figura 41 - Correlações COSY e HMBC observadas para a 4-desbromo-seco-isofaquelina (32).	67
Figura 42 - Espectro de massas de alta resolução (ESI ⁺) e no UV da monobromoisofaquelina (20 , fração W6A1433).	69
Figura 43 - Correlações COSY e HMBC observadas para monobromoisofaquelina (20).	70
Figura 44 - Espectro de massas de alta resolução (ESI ⁺) da 5-bromopalau'amina (33 , fração W6A1432).	72
Figura 45 - Espectro de absorção no IV da 5-bromopalau'amina (33), em pastilha de sílica.	73
Figura 46 - Espectro de absorção no UV da 5-bromopalau'amina (33), em MeOH.	73
Figura 47 - Correlações COSY e HMBC observadas para 5-bromopalau'amina (33).	75
Figura 48 - Correlações observadas no espectro ROESY para a 5-bromopalau'amina (33) e estrutura com configuração relativa.	76
Figura 49 - Estrutura atribuída anteriormente (A) e estrutura revisada (B) para a palau'amina.	78
Figura 50 - Perfil cromatográfico da fração W3A, obtido por HPLC-UV-MS ($\lambda_{\text{máx}}$ 254 nm).	79
Figura 51 - Espectro no ultravioleta (A) e de massas (B) da fração W3A obtida do extrato da esponja <i>Agelas sventres</i> .	79
Figura 52 - Curva de inibição de <i>E. coli</i> pela oroidina (15).	82
Figura 53 - Curva de inibição de <i>B. subtilis</i> pela oroidina (15).	82
Figura 54 - Curva de inibição de <i>B. subtilis</i> pela 4-desbromooroidina (29).	82

Figura 55 - Distribuição de bromo no anel pirrólico em alcaloides bromopirrólicos isolados de esponjas marinhas.	84
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Código, gênero, massa inicial do extrato MeOH (M.I.) e massas das frações (M.F.) A e B dos extratos das esponjas coletadas no Delta do Amazonas.	36
Tabela 2 - Comparação dos valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) da himenidina (16) com dados da literatura ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz).....	51
Tabela 3 - Comparação dos valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) da 4-desbromooroidina (29) com dados da himenidina (16) da literatura ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz).	56
Tabela 4 - Comparação dos valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) da fração W6A132 com dados da literatura ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz).....	59
Tabela 5 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, DMSO- d_6) da 5-desbromo-seco-isofaquelina (30) e de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 500 MHz, ^{13}C 125 MHz, DMSO- d_6) da uguibolina* (31)	64
Tabela 6 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, DMSO- d_6) da 4-desbromo-seco-isofaquelina (32) e de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 500 MHz, ^{13}C 125 MHz, DMSO- d_6) da uguibolina* (31).	68
Tabela 7 – Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, DMSO- d_6) da monobromoisofaquelina (20) com dados da literatura. ...	71
Tabela 8 – Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz) da 5-bromopalau'amina (33) com dados de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 600 MHz, ^{13}C 125 MHz, DMSO- d_6) da palau'amina (22) da literatura.	76
Tabela 9 - Comparação dos valores de deslocamentos químicos de RMN ^1H da amostra W3A (500 MHz) com dados da literatura (400 MHz).....	80
Tabela 10 - Porcentagem de inibição do crescimento bacteriano na presença dos alcaloides bromopirrólicos.....	83

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

[α]_D	Rotação óptica específica
c	Concentração
CCD	Cromatografia em camada delgada
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-UV-MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
d	Dupleto
dt	Duplo tripleto
DMSO-<i>d</i>₆	Dimetilsufóxido deuterado
ESI⁺	<i>Positive electrospray ionisation</i>
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
HQSC	<i>Heteronuclear single quantum coherence</i>
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento em Hz
m	Multiplete
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MS	Espectroscopia de massas
NOESY	<i>Nuclear Overhauser effect correlation spectroscopy</i>
quin	Quinteto
RMN de ¹³C	Ressonância magnética nuclear de carbono -13
RMN de ¹H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
s	Simpleto
sext	Sexteto
t	Tripleto
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento químico
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda de máxima absorção

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 ESPONJAS DO DELTA DO RIO AMAZONAS	17
1.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE ESPONJAS DO GÊNERO <i>Dictyonella</i>	20
1.3 ALCALOIDES BROMOPIRRÓLICOS	21
2 JUSTIFICATIVA.....	23
3 OBJETIVOS.....	24
3.1 GERAL	24
3.2 ESPECÍFICOS	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	25
4.1.1 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	25
4.1.2 Cromatografia em coluna pré-empacotada.....	25
4.1.3 Cromatografia de Permeação em Gel.....	26
4.2 TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS E ESPECTROMÉTRICAS.....	26
4.2.1 Análise por HPLC-UV-MS	26
4.2.2 Análise por UPLC-QToF-MS	27
4.2.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	27
4.2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	28
4.2.5 Espectroscopia no ultravioleta (UV) e infravermelho (IV).....	28
4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	28
4.3.1 Preparação de extratos e frações de esponjas coletadas do delta do Rio Amazonas para desreplicação e avaliação em bioensaios	28
4.3.2 Fracionamento do extrato da esponja <i>Dictyonella</i> sp. nov. (W6)	30
4.3.3 Purificação dos compostos presentes nas frações obtidas	33
4.3.3.1 Separação cromatográfica da fração W6A2E	33
4.3.3.2 Separação cromatográfica da fração W6A1	33

4.3.3.2.1 Separação cromatografia da fração W6A13.....	34
4.3.3.2.2 Separação cromatografia da fração W6A14.....	34
4.3.3.2.3 Separação cromatografia da fração W6A143.....	34
4.3.4 Isolamento dos Metabólitos Secundários da esponja <i>Agelas sventres</i> (W3)	34
4.4 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 PREPARAÇÃO DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE ESPONJAS COLETADAS DO DELTA DO RIO AMAZONAS PARA DESREPLICAÇÃO	36
5.2 FRACIONAMENTO DO EXTRATO DA ESPONJA <i>DICTYONELLA</i> SP. NOV. (W6).....	40
5.2.1 Purificação dos compostos presentes na fração W6A2	41
5.2.2 Purificação dos compostos presentes na fração W6A1	43
5.2.2.1 Repurificação do composto presente na fração W6A13.....	45
5.2.2.2 Purificação dos compostos presente na fração W6A14	47
5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS METABOLITOS SECUNDÁRIOS DA ESPONJA <i>DICTYONELLA</i> SP. NOV. (W6)	48
5.3.1 Identificação da himenidina (16, fração W6A2E3)	48
5.3.2 Identificação da 4-desbromooroidina (29, fração W6A2E1)	52
5.3.3 Identificação da clathrodina (17, fração W6A132)	57
5.3.4 Identificação da 5-desbromo-seco-isofaquelina (30, fração W6A11).....	60
5.3.4 Identificação da 4-desbromo-seco-isofaquelina (32, fração W6A12).....	65
5.3.5 Identificações da monobromoisofaquelina (20, fração W6A1433).....	69
5.3.5 Identificação da 5-bromopalau'amina (33, fração W6A1432)	72
5.5 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA – ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	81
5.6 POSIÇÃO DO BROMO NO ANEL PIRRÓLICO EM ALCALOIDES BROMOPIRRÓLICOS.....	83

5 CONCLUSÃO	85
APÊNDICE.....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128

1 INTRODUÇÃO

Esponjas marinhas são invertebrados marinhos filtradores, fixos ao substrato. Utilizam células flageladas para gerar uma corrente de água através de um sistema no qual ocorrem processos fisiológicos (e.g. trocas gasosas, nutrição, excreção e reprodução) (MURICY et al., 2008). Estima-se que as esponjas marinhas tenham surgido há cerca de 600 milhões de anos (HENTSCHEL et al., 2012). Estes animais apresentam dimensões que podem variar de alguns centímetros a mais de 1 metro de altura. Seu esqueleto é constituído por pequenos elementos minerais denominados espículas que podem ser de sílica ou carbonato de cálcio. Em determinadas espécies, o esqueleto das esponjas é complementado ou substituído por espongina, proteínas da família do colágeno. (MURICY et al., 2008).

Figura 1 - Esponja marinha *Agelas sventres* localizada nas Antilhas Holandesas.

Fonte: <http://www.spongeguide.org/imageinfo.php?img=2063>. Acesso em: 01/12/2017.

As esponjas marinhas apresentam ampla distribuição em todos os oceanos (JACKSON et al., 2015). São mais abundantes do que qualquer outro organismo bentônico em termos de área de cobertura, biomassa e volume (MEESTERS et al., 1991; JACKSON et al., 2015). A diversidade de espécies de esponjas é maior do que a de todos os organismos bentônicos somados descritos até então (JACKSON et al., 2015). De acordo com a base de dados World Porifera Database, existem atualmente > 8370 espécies de esponjas válidas (VAN SOEST

et al., 2012) distribuídas em 680 gêneros e quatro classes: Calcarea, Hexactinellida, Demospongiae e Homoscleromorpha (GAZAVE et al., 2010).

Metabólitos secundários isolados de esponjas marinhas representam 50% dos produtos naturais reportados de invertebrados marinhos (BLUNT et al., 2015). Dentre estes, 98% são derivados de vias metabólicas derivadas de aminoácidos, policetídeos e isoprenoides. Mais da metade dos metabólitos secundários de esponjas são isoprenoides, enquanto que 26% e 22% são derivados de aminoácidos e policetídeos (HARPER et al., 2001). Número significativo de metabólitos secundários de esponjas marinhas são derivados de vias biossintéticas mistas (CRONIN, 2001).

Porção significativa dos metabólitos secundários isolados de esponjas (e micro-organismos associados) apresenta atividades biológicas (JACKSON et al., 2015). Embora muitas substâncias bioativas continuem sendo isoladas e caracterizadas de esponjas, estas substâncias não são utilizáveis para a indústria farmacêutica por serem acumuladas em quantidades mínimas (GULDER et al., 2009). Por exemplo, as halicondrinas isoladas da esponja marinha *Halichondria okadai* (HIRATA et al., 1986) demonstraram potente atividade antitumoral; no entanto, estima-se que seria necessário remover 1 tonelada desta esponja do ambiente natural para a obtenção de uma mistura de 300 mg de halicondrinas (PROKSCH et al., 2003). Considerando-se que são necessários de 1 a 5 kg de halicondrina B anualmente para o tratamento de pacientes com câncer, a coleta destas esponjas para utilização biotecnológica é impraticável (PROKSCH et al., 2003). Estudos atuais buscam elucidar processos de biossíntese para a futura produção de compostos de esponjas em organismos geneticamente modificados, já que muitas substâncias isoladas de esponjas são na verdade produtos de bactérias simbiotes (WATERS et al., 2010).

Atualmente os nucleosídeos Ara-A (Aciclovir, **1**) e Ara-C (citarabina, **2**), obtidos da esponja *Cryptotethya crypta*, estão comercialmente disponíveis como fármacos antiviral e antitumoral, respectivamente (SASHIDHARA et al., 2009). A síntese química da halicondrina B (eribulin, **3**) foi concluída e recentemente aprovada para o tratamento de câncer de mama (JAIN et al., 2012; PEAN et al., 2012). O tripeptídeo hemiasterlina (**4**), isolado da esponja marinha *Cymbastela* sp. e obtido por síntese total, está sendo submetido a ensaios clínicos em fase I para o tratamento de vários tipos de câncer (WATERS et al., 2010). Um derivado da

psammaplina, o panobinostat (**5**), obtido da esponja *Psammaplysina* sp., encontra-se atualmente em fase II de ensaios clínicos (JACKSON et al., 2015).

O ambiente marinho (pH, pressão, temperatura e osmolaridade) no qual as esponjas se encontram é extremamente variável e exerce influência direta na biossíntese das substâncias produzidas por estes animais (THAKUR et al., 2005). A ocorrência de novas populações de esponjas em locais com propriedades físico-químicas peculiares constitui oportunidades para a descoberta de novas espécies destes animais com metabolismo secundário ainda desconhecido (THAKUR et al., 2005; LEAL et al., 2012).

1.1 ESPONJAS DO DELTA DO RIO AMAZONAS

O presente projeto origina-se de sucessivas amostragens de organismos bentônicos realizadas em recente expedição a bordo do Navio Cruzeiro do Sul (Marinha do Brasil) (Figura 2 A-D) ao longo da margem equatorial da Foz do Rio Amazonas (Pará). Esta expedição foi liderada pelo Professor Dr. Rodrigo Leão de Moura da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e pelo Prof. Dr. Fernando Moraes do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro (IPJBRJ). Os

espécimes coletados estão sendo identificados pelos Profs. Dr. Fernando Moraes (IPJBRJ) e Dr. Eduardo Hajdu (UFRJ). A coleta foi realizada na porção média da plataforma continental. As esponjas foram encontradas aderidas a substrato constituído majoritariamente por rodólitos (Figura 2D).

Esta região está submetida a forte ciclo sazonal no padrão de dispersão da pluma do Rio Amazonas (MÜLLER-KARGER et al., 1988). Entre janeiro e maio, a água do Rio Amazonas se espalha diretamente a partir do equador para noroeste ao longo da costa de América Sul em direção ao Mar do Caribe influenciada pela Corrente Norte do Brasil (JOHNS et al., 2014). Observou-se que as características bióticas e abióticas da pluma diferem daquelas normalmente encontradas em condições oligotróficas oceânicas, tais como, baixa salinidade ($35 \pm 0,05$ psu), alta concentração de clorofila a ($1,26 \pm 0,21$ mg.m⁻³), alta temperatura superficial ($26,67 \pm 0,14$ °C) e altas concentrações de oxigênio dissolvido ($4,90 \pm 0,06$ mL.L⁻¹) (JOHNS et al., 2014). Assembleias de larvas de peixes da pluma da Foz do Amazonas apresentaram maior quantidade de espécies pelágicas (Myctiphidae e Nomeidae) do que as massas d'águas sem a pluma, bem como maior número de táxons de típicos de recifes de corais, tais como Scaridae e Clupeidae (JOHNS et al., 2014). Levando-se em conta dados da literatura (EISMA; MAREL, 1971; LUMPKIN; GARZOLI, 2005; JOHNS et al., 2014), esponjas coletadas no presente estudo estão constantemente submetidas a descarga de material particulado proveniente da pluma em algumas épocas do ano, ocasionando condições ambientais únicas para a biossíntese de novas moléculas pelos organismos do local (e.g. esponjas marinhas). (MOURA et al., 2016)

Figura 2 - Expedição no Navio Cruzeiro do Sul da Marinha do Brasil à margem equatorial da Foz do Amazonas. (A) Navio Cruz do Sul no ancorado em Niterói. (B) Rede de porta sendo lançada. (C) Rede de porta com material biológico coletado. (D) Rodolitos e biota associada (e.g., esponjas marinhas).

Fonte: Prof. Dr. Fernando Moraes.

O objetivo desse projeto é o estudo químico de duas esponjas coletadas na foz do Rio Amazonas. A esponja do gênero *Dictyonella*, com espécie não identificada até então. Essa espécie foi selecionada pelo fato de seu extrato apresentar vários compostos bromados. Não existem compostos bromados isolados de esponjas do gênero *Dictyonella* reportados na literatura. E também a esponja do gênero *Agelas sventres*. É comum o isolamento de alcaloides bromopirrólicos de esponjas do gênero *Agelas*.

1.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE ESPONJAS DO GÊNERO *Dictyonella*

Existem 21 espécies registradas do gênero *Dictyonella* segundo a base de dados WoRMS (World Register of Marine Species).

Poucos compostos foram isolados de esponjas marinhas do gênero *Dictyonella*. Em 1989, Ciminiello e colaboradores isolaram um cetoesteroide (**6**) e a nova classe de esteróis degradados (**7-10**) da esponja *Dictyonella incisa*, coletada no Mediterrâneo. (CIMINIELLO et al., 1989; CIMINIELLO et al., 1990). Os compostos são o colest-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (**6**), o incisterol (**7**), o (17R)-17metilincisterol (**8**), o (17S)-17metilincisterol (**9**) e o (17R)-17-etilincisterol (**10**).

Posteriormente, o composto **6** foi isolado da esponja *Dysidea herbacea* (KOBAYASHI et al., 1992) e o composto **7** da esponja *Homaxinella* sp. (MANSOOR et al., 2005).

Em 1990, Ciminiello e colaboradores isolaram ésteres de ácidos graxos furânicos (**11-12**) com atividade inflamatória da esponja *Dictyonella incisa* (CIMINIELLO et al., 1991).

Em 2015, Genta-Jouve e colaboradores isolaram um triterpeno aminoglicosilado (**14**) da esponja *Dictyonella marsilii* (GENTA-JOUE et al, 2015).

1.3 ALCALOIDES BROMOPIRRÓLICOS

Os alcaloides bromopirrólicos compõem uma família de alcaloides exclusivamente marinhos e constituem um exemplo da grande variedade de metabolitos secundários isolados de esponjas marinhas. A oroidina (**15**) foi o primeiro composto isolado dessa família, a partir da esponja *Agelas oroides*. (FORENZA et al., 1971).

- 15** R=R'=Br
16 R=H; R'=Br
17 R=R'=H

A maioria dos alcaloides bromopirrólicos foi isolada de esponjas de ordem Agelasida. Essa classe de compostos apresenta atividades antibacteriana, antifúngica e citotóxica. (AIELLO et al., 2008).

A himenidina (**16**) foi posteriormente isolada da esponja *Hymeniacidon* sp., como um potente antagonista dos receptores serotoninérgicos (KOBAYASHI et al., 1986).

Mais de 140 derivados da oroidina foram isolados desde a década de 70. Incluem derivados policíclicos, como as faquelinas (**18-19**) e isofaquelinas (**20-21**) e até derivados mais complexos como as palau'aminas (**22-24**) e estiloguanidinas (**25-27**) (BURKHOLDER et al., 1969; ASSMANN et al., 2002; KINNEL et al., 1993; KATO et al., 1995).

- 18** R=H
19 R=Br

- 20** R=H
21 R=Br

- 22** R=R'=H
23 R=R'=Br
24 R=H; R=Br

- 25** R=R'=H
26 R=R'=Br
27 R=H; R=Br

2 JUSTIFICATIVA

A descoberta de metabólitos secundários de esponjas marinhas decorre da sua enorme diversidade de entidades químicas e atividades biológicas. A descoberta de novas populações de esponjas, em localidades com propriedades físico-químicas peculiares, representa oportunidades para a descoberta de novas espécies de esponjas com metabolismo secundário ainda desconhecido.

O presente trabalho foi desenvolvido para conhecer melhor a diversidade química das esponjas coletadas no delta do Rio Amazonas, um ambiente que ainda não foi investigado, com ênfase na esponja *Dictyonella* sp.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

O presente projeto tem por objetivo realizar o primeiro estudo de bioprospecção de esponjas marinhas coletadas no delta do Rio Amazonas. A coleta realizada por pesquisadores do Rio de Janeiro permitiu a obtenção de 36 amostras de esponjas marinhas. Duas espécies foram selecionadas após um processo de *screening* químico e biológico para descoberta de metabólitos bioativos.

3.2 ESPECÍFICOS

- Fracionamento dos extratos de todas as amostras de esponjas coletadas em sistema de fracionamento automático, de maneira a obter frações de cada extrato para avaliação das frações em bioensaios de atividade antiparasitária (*anti-Leishmania* e *anti-T. cruzi*), citotóxica contra linhagens de células tumorais, antimicrobiana contra linhagens suscetíveis e resistentes de micro-organismos, de inibição do proteassomo;
- Análise das frações dos extratos bioativos em sistemas HPLC-UV-MS e uPLC-qTOF com o objetivo de se realizar processo de desreplicação;
- Avaliação das substâncias puras identificadas em bioensaios.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

4.1.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Foram utilizadas cromatofolhas de sílica-gel 60 sobre poliéster com indicador ultravioleta F₂₅₄, 20x20 cm (Sigma Aldrich®). A revelação das cromatofolhas foi realizada utilizando-se luz ultravioleta (UV) com lâmpada Spectroline (modelo ENF-240 C/FE) em comprimentos de onda de 254 e 365 nm.

Soluções de reveladores foram borrifadas nas cromatofolhas para observar a presença de grupos funcionais e classe de compostos:

- Solução de 0,2 de ninidrina em 100 mL de EtOH PA. (Qhemis) seguido de aquecimento, para identificação qualitativa de aminoácidos e aminas primárias.
- Solução de 20% de ácido fosfomolibdico em EtOH PA. (Quimex) seguido de aquecimento, para identificação qualitativa de substâncias redutoras.
- Solução Dragendorff (Solução A: 0,85 g de nitrato de bismuto em 10,0 mL de ácido acético glacial e 10,0 mL de água; solução B: 8,00 g de iodeto de potássio dissolvido em 20,0 mL de água; mistura-se 1:1 das soluções A e B resultando em uma solução estoque. Utiliza-se uma mistura de 1,0 mL da solução estoque com 2,0 mL de ácido acético glacial e 10,0 mL de água). Este revelador é utilizado para identificação qualitativa de alcaloides.

4.1.2 Cromatografia em coluna pré-empacotada

Foram utilizadas colunas pré-empacotadas (Phenomenex Strata®) com diferentes tamanhos (1,0 g, 2,0 g e 10,0 g) e fase estacionária sílica-gel derivatizada com grupos octadesilano (C₁₈).

4.1.3 Cromatografia de Permeação em Gel

Foi utilizada coluna de vidro nas dimensões de 1,70 m de comprimento e 2,0 cm de diâmetro interno, com Sephadex LH-20® (Pharmacia Biotech) como fase estacionária e eluição com MeOH grau HPLC.

Também foi utilizada coluna de vidro nas dimensões de 50 cm de comprimento e 1,5 cm de diâmetro interno, preenchida com Bio-Gel® P-2 como fase estacionária e eluição com 8:2 H₂O (milli-Q®)/EtOH.

4.2 TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS E ESPECTROMÉTRICAS

4.2.1 Análise por HPLC-UV-MS

A obtenção dos espectros de massas de baixa resolução foi realizada em um sistema cromatográfico da marca Waters® que consiste em um sistema de controle Alliance modelo Waters 2695 acoplado a um detector espectrofotométrico UV-visível modelo Waters 2696 com detector de arranjo de fotodiodos, também acoplado a um detector de espectrometria de massas modelo Waters Micromass ZQ 2000 operado utilizando plataforma Empower.

As análises foram realizadas utilizando-se coluna de fase reversa C₁₈ X-Terra (50 × 2.1 mm, 3.5 mm) e a mistura de solventes: (A) H₂O + 0,1 % de ácido fórmico, (B) MeOH:MeCN (1:1, v/v) + 0,1 % de ácido fórmico. A coluna foi eluída com 1 mL.min⁻¹ em gradiente linear: 0 – 1 min manteve-se 10% de B em A, 1 – 22 min gradiente linear até 100% de B, 22 – 30 min manteve-se 100% de B, 30 – 40 min manteve-se 10% de B em A para reequilíbrio da coluna. O detector de arranjo de diodos foi ajustado para análise de $\lambda_{\text{máx}}$ 200 – 400 nm. Para as análises por MS foram ajustadas as seguintes condições: voltagem do capilar: a 3 kV; temperatura da fonte: 100 °C; temperatura de dessolvatação: 350 °C; modo ESI, faixa de aquisição 100: 1000 Da; fluxo de gás no cone: 50 L h⁻¹ e de dessolvatação: 350 L h⁻¹. As amostras foram diluídas em MeOH em uma concentração de 2 mg mL⁻¹.

4.2.2 Análise por UPLC-QToF-MS

As amostras para análise por UPLC-QToF-MS foram solubilizadas em volumes adequados de MeOH/H₂O (1:1). Em seguida, as amostras foram transferidas para vials e diluídas com MeOH/H₂O (1:1) de modo a se obter 400 µL de solução e concentração de 0,01 mg mL⁻¹. Tanto na solubilização, quanto na diluição das amostras, utilizou-se solventes em grau MS (Sigma).

As análises de UPLC-QToF-MS/MS foram realizadas em equipamento composto por um cromatógrafo líquido de ultra eficiência Waters® Acquity UPLC H-class acoplado a um espectrômetro de massas Waters® Xevo® G2-XS QToF com interface *electrospray* (ESI) (Waters Corporation). Utilizou-se uma coluna BEH C₁₈ (dimensões: 2,1 x 100 mm, 1,7 µm; Waters Corporation) e fase móvel constituída por H₂O Milli-Q + 0,1% de ácido fórmico (Panreac) e MeCN (Sigma) + 0,1% de ácido fórmico. O gradiente de eluição utilizado foi H₂O/MeCN 9:1 por 6 minutos, H₂O/MeCN 1:1 por 3 minutos, H₂O/MeCN 1:49 por 0,1 minuto e H₂O/MeCN 9:1 por 0,9 minuto; vazão de 0,5 mL min⁻¹. O volume de injeção utilizado foi de 10 µL. A coluna foi mantida a uma temperatura de 40 °C e as amostras foram mantidas a 15 °C.

A aquisição dos espectros de massas em modo MS^E *Centroid* foi realizada em modo positivo e sensibilidade, tempo de aquisição de 0 a 10 minutos, fonte ESI, intervalo de massa de 100 a 1200 Da, scan time de 0,2 s⁻¹, energia de colisão (alta energia) de 20 a 30 V. As condições do ESI no modo positivo foram: voltagem do capilar de 1,2 kV, voltagem do cone de 30 V, temperatura da fonte de 100 °C, temperatura de dessolvatação de 450 °C, vazão do gás no cone de 50 L h⁻¹ e vazão do gás de dessolvatação de 750 L h⁻¹. Para calibração interna, utilizou-se uma solução de leucina-encefalina (Sigma) 200 pg mL⁻¹, infundida pela sonda do lock-mass com vazão de 10 µL min⁻¹.

4.2.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As amostras foram preparadas em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆), utilizando-se tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Após diluição em solvente, as amostras foram pipetadas e inseridas em tubo de vidro de volume apropriado. Foram realizadas análises por RMN de ¹H, ¹³C, COSY ¹H-¹H, HSQC, HMBC e NOESY. As análises foram realizadas em equipamento Bruker, modelo AVANCE III

9,4 Tesla, de 500 MHz na frequência do ^1H , ou 14,1 Tesla, de 600 MHz na frequência do ^1H e de 150 MHz na frequência do ^{13}C .

4.2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Para separação por cromatografia líquida de alta eficiência foi utilizado sistema cromatográfico de marca Waters® com sistema de controle e bombeamento de solventes modelo Waters 600, acoplado a um detector espectrofotométrico de duplo feixe UV-visível modelo Water 2487, operado utilizando-se a plataforma Empower. Foram utilizadas coluna analítica C_8 Inertsil (GL Sciences 124 Å/5 μm – 250 x 4,6 mm) e coluna semipreparativa C_8 Inertsil (GL Sciences 300 Å/5 μm – 300 x 7,8 mm)

4.2.5 Espectroscopia no ultravioleta (UV) e infravermelho (IV)

A obtenção dos espectros no ultravioleta (UV) foi realizada em um espectrofotômetro de UV da marca Shimadzu, modelo UV-3600. As amostras foram diluídas em MeOH em concentração de 0,01 mg mL⁻¹.

Os espectros no infravermelho (IV) foram obtidos utilizando-se o equipamento Shimadzu, modelo IRAffinity. As amostras foram diluídas em MeOH e a solução resultante aplicada em pastilhas de sílica. Foi utilizado nitrogênio gasoso (N_2) para evaporação do solvente remanescente após aplicação das amostras em pastilha de sílica.

4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.3.1 Preparação de extratos e frações de esponjas coletadas do delta do Rio Amazonas para desreplicação e avaliação em bioensaios

Seguindo o protocolo de Fusetani et al. (1990), espécimes de esponjas coletados foram imediatamente inseridos em EtOH 96% (Aleloquímica Ltda) para a extração. No laboratório, o solvente foi evaporado em rotaevaporador (60°C, Fisatom), e em seguida, em um dessecador elétrico Drybox-DUC-3200 (ARSEC). Em caso de resquício de material viscoso, o solvente foi evaporado em nitrogênio (N_2). Na

persistência do material viscoso nos extratos, estes foram então congelados, e submetidos a liofilização para a remoção de água remanescente. Os extratos totalmente secos foram pesados e mantidos em freezer (-80°C) até a etapa do fracionamento.

Os extratos foram submetidos a cromatografia em colunas pré-empacotadas (Phenomenex Strata®) com 1g de C₁₈ como fase estacionária.

Todos os extratos foram solubilizados em 2 mL de uma mistura de H₂O/MeOH em condição A (condição escolhida através da polaridade do extrato da esponja estudada) e aplicados em uma coluna pré-empacotada de sílica-gel derivatizada com C₁₈ (Phenomenex Strata®, 1g), previamente condicionada com 40 mL de solução de H₂O/MeOH utilizada para dissolver a amostra. Após a aplicação da amostra, inicialmente 3 frações foram coletadas. A primeira fração com eluente A, a segunda fração com 1:1 H₂O/MeOH e a terceira fração com 100% MeOH. As frações foram evaporadas em sistema de alto vácuo (Speedvac). As frações coletadas com o eluente H₂O/MeOH 1:1 apresentaram pouca massa (~1 mg). Sendo assim, foram reunidas com a fração 100% MeOH. Depois de secas, as frações foram transferidas para pequenos frascos, para análises por HPLC-UV-MS e em diferentes para bioensaios.

A condição A de eluição inicial dos extratos polares foi utilizada para o fracionamento dos extratos das esponjas *Agelas sventres* (W3), *Callyspongia vaginalis* (W4) e *Haplosclerida* (Ext. 5) foi H₂O/MeOH 1:1. Para os extratos das esponjas *Callyspongia fallax* (W2), *Geodia* sp. (W5), *Dictyonella* sp. nov. (W6), *Arenosclera* sp. nov. 1 (W9), a condição A de eluição inicial em coluna de EFS foi H₂O/MeOH 65:35. Para os extratos das demais esponjas, a condição A de eluição inicial dos extratos em colunas EFS foi H₂O/MeOH na proporção 75:25.

Os extratos das esponjas *Haplosclerida* (Ext. 51 e ext. 52) e *Petrosia* sp. (Ext. 53) não solubilizaram em MeOH, H₂O, diclorometano ou acetato de etila (AcoEt), e não foram fracionados.

Todas as frações foram analisadas em HPLC-UV-MS e enviadas para avaliação em bioensaios.

4.3.2 Fracionamento do extrato da esponja *Dictyonella* sp. nov. (W6)

Cerca de 500 mg do extrato MeOH da esponja *Dictyonella* sp. nov. (W6) foram dissolvidos em uma mistura de 10 mL 65:35 H₂O/MeOH e aplicada em coluna pré-empacotada com sílica-gel derivatizada com C₁₈ (Phenomenex Strata®, 10g) previamente condicionada com 200 mL da solução 65:35 H₂O/MeOH. Foram coletados 100 mL da fração 65:35 H₂O/MeOH (Fração A) e 100 mL da fração 100% MeOH (fração B). Este processo foi repetido mais uma vez, com um total de 1,0 g do extrato MeOH da esponja. A amostra foi filtrada através de algodão antes de ser aplicada à coluna.

A fração A obtida do fracionamento anterior foi separada por cromatografia de permeação em gel em coluna contendo Sephadex-LH20® e MeOH como eluente. As frações desta separação foram reunidas a partir de análise por CCD (eluente: 8:2 CH₂Cl₂/MeOH; revelador: UV).

O restante do extrato da esponja *Dictyonella* sp. foi submetido às separações descritas no fluxograma da Figura 3.

Figura 3 - Fluxograma do trabalho realizado com o extrato bruto da esponja *Dictyonella* sp. nov. (W6).

O extrato da esponja *Dictyonella* sp. nov. foi submetido à partição entre MeOH/H₂O 9:1 e Hexano (4 x 500 mL). Após a partição as frações obtidas (MeOH/H₂O 9:1 e hexano) foram evaporadas até a secura, e pesadas. A fração MeOH (8,5 g) foi aplicada em coluna pré-empacotada de sílica-gel derivatizada com C₁₈ (Phenomenex Strata®, 10g). Para aplicação na coluna, a amostra foi solubilizada em

MeOH e adsorvida em celite. Depois de evaporado todo o MeOH, a amostra adsorvida em celite foi aplicada à coluna. Os eluentes utilizados foram: H₂O/MeOH 75:25 (W6A); 1:1 (W6B); 25:75 (W6C) e 100% MeOH (W6D). As frações foram obtidas evaporadas até secar, e pesadas.

A amostra W6A apresentou muitos sais inorgânicos em seu conteúdo. Assim, foi diluída em 9:1 MeOH/EtOH para precipitação dos sais. Com uma pipeta com algodão na ponta foi feita uma filtração para a separação do excesso de sais. A fração solúvel foi então evaporada, dissolvida em 2 mL de MeOH e aplicada a uma coluna empacotada com Sephadex-LH20® (150 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro interno), com eluição isocrática utilizando-se MeOH como eluente. As frações coletadas foram analisadas por CCD (eluente: 8:2 CH₂Cl₂/MeOH; revelador: UV). Após análise por CCD, as frações similares foram reunidas, resultando em sete frações.

As frações oriundas da separação em Sephadex LH-20 foram analisadas por HPLC-UV-MS. Frações similares foram reunidas (W6Ac, W6Ad e W6Ae, 1,6 g no total) e aplicadas em uma coluna com 50 g de sílica-gel derivatizada com C₁₈, previamente condicionada 100% H₂O. Desta separação por cromatografia em fase reversa foram coletadas 21 frações eluídas com um gradiente de MeOH em H₂O. Após a evaporação e análise por CCD (eluente: 8:2 CH₂Cl₂/MeOH; revelador: UV) as frações foram reunidas em sete frações.

A fração W6A2 (490,6 mg) foi separada por cromatografia de permeação em gel uma coluna contendo Bio-Gel® P-2 (dimensões 50 cm comprimento e 1,5 de diâmetro), com eluição isocrática 8:2 H₂O/EtOH. A separação de 117 horas foi realizada com coletor automático (tubos de 4 mL). 300 frações coletadas. Estas foram reunidas de 10 em 10 (resultando em 30 frações) e evaporadas. Estas foram analisadas por CCD (eluente: 8:2 CH₂Cl₂/MeOH; revelador: UV). Após análise, as frações foram reunidas por similaridade cromatográfica, resultando em sete frações da separação em coluna de Bio-Gel P-2. As frações reunidas foram analisadas por HPLC-UV-MS.

As frações W6A3, W6A4 e W6A5 apresentaram perfil cromatográfico similar nas análises por HPLC-UV-MS e foram reunidas formando uma nova fração, W6A3. Esta fração ainda apresentava sais em sua composição, foi diluída em 9:1 MeOH/EtOH para precipitação. Com uma pipeta com algodão na ponta foi feita uma filtração para a retirada do excesso de sais (Figura 4).

Figura 4 – Fluxograma de separação das frações W6Ac, W6Ad e W6Ae reunidas.

4.3.3 Purificação dos compostos presentes nas frações obtidas

4.3.3.1 Separação cromatográfica da fração W6A2E

A fração W6A2E (146,6 mg) foi submetida a uma separação por HPLC. Utilizou-se coluna semipreparativa Inertsil C₈, um detector de UV monitorando-se no comprimento de onda de 254 e 310 nm, com fluxo de 4 mL.min⁻¹ em modo isocrático e mistura eluente H₂O/MeOH 70:30 + ácido trifluoroacético 0,5%. Foram obtidas 3 frações, designadas W6A2E1 (48 mg), W6A2E2 (0,3 mg) e W6A2E3 (9,1 mg). A fração W6A2E2 foi recolhida entre os dois picos principais.

4.3.3.2 Separação cromatográfica da fração W6A1

A fração W6A1 (144,0 mg) foi submetida a uma separação por HPLC. Utilizou-se coluna semipreparativa Inertsil C₈, um detector de UV monitorando-se no comprimento de onda de 254 e 308 nm, com fluxo de 4 mL.min⁻¹ em modo isocrático e mistura eluente H₂O/MeOH 72:28 + ácido trifluoroacético 0,5%. Foram obtidas 8 frações, designadas W6A11 (16 mg), W6A12 (7,3 mg), W6A13 (4,6 mg), W6A14 (22,1

mg), W6A15 (4,7 mg), W6A16 (4,0 mg), W6A17 (1,9 mg), W6A18 (5,3 mg), W6A10 (48,2 mg) e W6A1R (28,0 mg).

4.3.3.3 Separação cromatográfica da fração W6A13

A fração W6A11 (4,6 mg) foi submetida a uma separação por HPLC. Utilizou-se coluna analítica Inertsil C₈, um detector de UV monitorando-se no comprimento de onda de 254 e 320 nm, com fluxo de 1 mL.min⁻¹ em modo isocrático e mistura eluente H₂O/MeOH 84:16 + ácido trifluoroacético 0,5%. Foram obtidas 3 frações, designadas W6A131 (0,1 mg), W6A132 (1,3 mg) e W6A133 (0,4 mg).

4.3.3.4 Separação cromatográfica da fração W6A14

A fração W6A14 (22,1 mg) foi submetida a uma separação por HPLC. Utilizou-se coluna analítica Inertsil C₈, um detector de UV monitorando-se no comprimento de onda de 254 e 320 nm, com fluxo de 1 mL.min⁻¹ em modo isocrático e mistura eluente H₂O/MeOH 76:24 + ácido trifluoroacético 0,5%. Foram obtidas 3 frações, designadas W6A141 (1,6 mg), W6A142 (0,6 mg) e W6A143 (8,0 mg).

4.3.3.5 Separação cromatográfica da fração W6A143

A fração W6A143 (8,0 mg) foi submetida a uma separação por HPLC. Utilizou-se coluna analítica Inertsil C₈, um detector de UV monitorando-se no comprimento de onda de 254 e 308 nm, com fluxo de 1 mL.min⁻¹ em modo isocrático e mistura eluente H₂O/MeOH 84:16 + ácido trifluoroacético 0,5%. Foram obtidas 3 frações, designadas W6A1431 (0,2 mg), W6A1432 (3,7 mg) e W6A1433 (1,1 mg).

4.3.4 Isolamento dos Metabólitos Secundários da esponja *Agelas sventres* (W3)

O extrato MeOH desta esponja (5 g) foi dissolvido em 500 mL de MeOH com 10% de H₂O (450 mL MeOH + 50 mL H₂O). Esta solução foi particionada com hexano (4 x 500 mL). As frações MeOH e hexânica foram evaporadas até completamente secas e pesadas. A fração MeOH (500 mg) foi separada por cromatografia em coluna de sílica-gel derivatizada com C₁₈ (Phenomenex Strata[®],

10g). A eluição foi realizada com 100% H₂O (descartada), e H₂O/MeOH 75:25 (W3A), 1:1 (W3B), 25:75 (W3C) H₂O/MeOH e 100% MeOH (W3D). Estas frações foram analisadas por HPLC-UV-MS e a fração A analisada por RMN ¹H.

4.4 AVALIAÇÃO BIOLÓGICA – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Cada fração foi enviada para bioensaio de atividade antibacteriana, com cerca de 1 mg de amostra em frascos Eppendorf previamente etiquetados e pesados. O bioensaio foi realizado pela colaboradora Profa. Dra. Andréa Dessen (UNICAMP).

Os testes foram realizados com culturas bacterianas (*Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*). As frações foram diluídas em MeOH a uma concentração de 100 µg mL⁻¹ e aplicadas em placas de 96 orifícios utilizando Mueller Hinton Broth. As frações foram incubadas durante 24 horas.

A percentagem de inibição de cada composto foi calculada medindo as densidades ópticas iniciais e finais a densidade óptica (OD) de 600 nm após 20-24 horas de crescimento:

$$\% \text{ de inibição} = 100 \times (\text{OD}_{\text{controle negativo}} - \text{OD}_{\text{composto}}) / (\text{OD}_{\text{controle negativo}} - \text{OD}_{\text{positivo controle}})$$

onde o controle positivo é cloranfenicol a 32 µg mL⁻¹ e o controle negativo é o meio de crescimento bacteriano + 1% de DMSO. Os "hits" são definidos como compostos que inibem o crescimento bacteriano em 40% ou mais do nível do controle positivo.

Os hits mais interessantes detectados no *screening* principal são submetidos a um *screening* secundário para confirmar sua atividade antibacteriana. O crescimento bacteriano é monitorado durante 20 horas na presença dos hits em repetições biológicas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PREPARAÇÃO DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE ESPONJAS COLETADAS DO DELTA DO RIO AMAZONAS PARA DESREPLICAÇÃO

Extratos de 36 esponjas coletadas no delta do Rio Amazonas, recebidos de colaboradores do Rio de Janeiro, foram submetidos a cromatografia em colunas pré-empacotadas contendo C₁₈ como fase estacionária. Nem todos os extratos solubilizaram facilmente em solução de H₂O/MeOH 75:25, sendo necessário em alguns casos, o aumento da proporção de MeOH. Alguns extratos não solubilizaram em MeOH, H₂O, CH₂Cl₂ ou AcOEt. Na Tabela 1 estão listadas as massas das frações obtidas após a separação dos extratos por cromatografia em colunas pré-empacotadas.

Tabela 1 - Código, gênero, massa inicial do extrato MeOH (M.I.) e massas das frações (M.F.) A e B dos extratos das esponjas coletadas no Delta do Amazonas.

Código	Gênero	M. I. (mg)	M. F. A (mg)	M. F. B (mg)
W1	<i>Clathria nicoleae</i>	50	30,1	4,4
W2	<i>Callyspongia fallax</i>	50	12,6	14,9
W3	<i>Agelas sventres</i>	50	28,1	6,3
W4	<i>Callyspongia vaginalis</i>	47	33,6	3
W5	<i>Geodia</i> sp.	50	16,8	10,3
W6	<i>Dictyonella</i> sp. Nov.	50	25,7	9
W7	<i>Clathria nicoleae</i>	50	28,8	2,4
W8	<i>Oceanapia</i> sp.	50	41,9	1,2
W9	<i>Arenosclera</i> sp. nov. 1	50	13,8	7
Ext. 2	<i>Monanchora arbuscula</i>	44,7	31,7	9,2
Ext. 8	<i>Stelletta</i> sp.	39,2	22,1	3
Ext. 10	<i>Amphimedon compressa</i>	41,1	37,3	2,5
Ext. 11	<i>Cinachyrella kuekenthali</i>	37,2	16,4	15,4
Ext. 12	<i>Arenosclera</i> sp. nov. 2	41,3	36,7	2,4
Ext. 13	<i>Monanchora arbuscula</i>	62,5	27,6	31,7
Ext. 16	<i>Geodia neptuni</i>	50,5	41,6	1,5
Ext. 28	<i>Dictyonella</i> sp. nov.	47,8	29,9	11,3
Ext. 36	<i>Geodia neptuni</i>	50,5	0,9	10,8

Ext. 37	<i>Agelas clathrodes</i>	46,4	21,0	11,9
Ext. 40	<i>Desmoxyidae</i>	25,2	22,6	1,3
Ext. 44	<i>Petrosia</i> sp.	41,1	38,1	2,5
Ext. 45	<i>Haplosclerida</i>	29,4	16,7	3,4
Ext. 46	<i>Niphates</i> sp.	45,4	42,8	2,0
Ext. 49	<i>Plakinastrella</i> sp.	49,8	31,1	3,8
Ext. 51	<i>Haplosclerida</i>	49,5		
Ext. 52	<i>Haplosclerida</i>	24,7		
Ext. 53	<i>Petrosia</i> sp.	37,6		
Ext. 55	<i>Callyspongia vaginalis</i>	46,4	40,6	2,4
Ext. 57	<i>Geodia</i> sp.	64,8	48,0	16,0
Ext. 61	<i>Theonela atlantica</i>	50,1	48,6	1,6
Ext. 3	<i>Monanchora arbuscula</i>	41,9	31,9	4,6
Ext. 5	<i>Haplosclerida</i>	51,3	40,8	3,4
Ext. 6	<i>Lithistida</i>	44,7	40,8	1,4
Ext. 7	<i>Echinodictyum dendroides</i>	38,2	29,3	7,2
Ext. 17	<i>Amphimedon compressa</i>	39,7	37,9	1,3
Ext. 18	<i>Terpios</i> sp.	40,1	39,3	1,6

Todas as frações foram analisadas por HPLC-UV-MS. Os resultados obtidos permitiu realizar desreplicação dos compostos presentes nos extratos, de maneira a verificar a ocorrência de substâncias conhecidas ou desconhecidas nas respectivas frações. Para a realização da desreplicação, foi utilizado o banco de dados *Dictionary of Natural Products*. A análise das frações do extrato da esponja *Dictyonella* sp. nov. indicou a presença de diversos compostos bromados, como discutido a seguir.

A análise por HPLC-UV-MS da fração W6A proveniente do extrato da esponja *Dictyonella* sp. nov. indicou a presença de quatro compostos bromados (figura 5). Os picos dos compostos A e B são de dois isômeros apresentaram íon $[M+H]^+$ em m/z 309,8 com padrão de distribuição isotópica típica para a presença de 1 átomo de bromo. Com esses dados, uma busca foi feita no *Dictionary of Natural Products*. Considerou-se a possibilidade desses compostos ser a himenidina (**16**) ou isômero(s).

O composto C apresentou íon $[M+H]^+$ em m/z 401,6 com padrão de distribuição isotópica típica para a presença de 2 átomos de bromo (figura 6C). A

consulta no banco de dados *Dictionary of Natural Products*, indicou 3 compostos com esta massa molecular. Um deles é a esventrina (**28**), previamente isolada da esponja *Agelas sventres* (ASSMANN et al., 2001). A possibilidade do composto C ser a esventrina é biogeneticamente plausível se os compostos A e B forem isômeros da himenidina, pois apresentam esqueleto similar.

O mesmo pode ser dito do composto D, que apresentou íon $[M+H]^+$ em m/z 387,6 com padrão de distribuição isotópica típica para a presença de 2 átomos de bromo (figura 6D) e pode ser a oroidina (**15**).

Figura 5 - Perfil cromatográfico da fração W6A do extrato de 50 mg da esponja *Dictyonella* sp., analisado por HPLC-UV-MS ($\lambda_{\text{máx}}$ 254 nm)

Figura 6 - Espectros de massas de baixa resolução (ESI⁺) dos compostos observados na fração W6A do extrato de 50 mg da esponja *Dictyonella* sp.

No cromatograma da fração W3A obtida do extrato da esponja *Agelas sventres* (W3) também foi observado um composto bromado, com íon $[M+H]^+$ em m/z 387,6 e padrão de distribuição isotópica típica para a presença de 2 átomos de bromo (figura 7), também pode ser sugerido que o composto seja a oroidina (**15**), ou um isômero.

Figura 7 - Perfil cromatográfico da fração W3A da esponja *Agelas sventres* (W3), obtido por HPLC-UV-MS ($\lambda_{\text{máx}}$ 254 nm).

Figura 8 - Espectro de massas de baixa resolução (ESI⁺) do composto observado na fração W3A do extrato de 50 mg da esponja *Agelas Sventres*.

5.2 FRACIONAMENTO DO EXTRATO DA ESPONJA *Dictyonella* sp. nov.

(W6)

Após o extrato bruto (11,0 g) da esponja *Dictyonella* sp. ser particionado com hexano e MeOH 90%, a fração MeOH foi submetida a uma extração em fase sólida. As frações obtidas (W6A, W6B, W6C e W6D) foram analisadas por HPLC-UV-MS (Figura 9).

Figura 9 - Esquema de fracionamento do extrato da esponja *Dictyonella* sp. nov. (W6)

Após a análise por HPLC-UV-MS a fração W6A foi selecionada para fracionamento sendo submetida à separação por cromatografia de permeação em gel de Sephadex LH-20®, utilizando-se MeOH como eluente. Foram obtidas 7 frações,

das quais as frações W6Ac, W6Ad e W6Ae foram reunidas e separadas por cromatografia em coluna de fase reversa derivatizada com C₁₈ (figura 10). As frações resultantes foram analisadas por HPLC-UV-MS.

Figura 10 - Esquema de fracionamento do extrato da esponja *Dictyonella* sp. nov. (W6).

5.2.1 Purificação dos compostos presentes na fração W6A2

A análise por HPLC-UV-MS da amostra W6A2 apresentou o cromatograma (Figura 11), contendo dois compostos monobromados majoritários.

Figura 11 - Perfil cromatográfico da fração W6A2, obtido por HPLC-UV-MS ($\lambda_{\text{máx}}$ 254 nm).

Figura 12 - Espectros de massas dos picos observados na fração W6A2 por HPLC-

UV-MS.

A fração W6A2 foi subsequentemente separada por cromatografia de permeação em gel em coluna de Bio-Gel® P-2 (eluente: H₂O/EtOH 8:2). Esta separação resultou em sete frações, denominadas W6A2B, W6A2C, W6A2D, W6A2E, W6A2J, W6A2K e W6A2L (figura 13).

Figura 13 – Fracionamento da fração W6A2 em coluna de Bio-Gel P-2 e subsequente separação da fração W6A2E por HPLC.

Cerca de 60 mg da fração W6A2E foram separados por HPLC-UV (Figura 14) utilizando-se coluna semipreparativa Inertsil C₈, detector de UV = 254 nm, e como fase móvel a mistura de solventes H₂O/MeOH 70:30 e ácido trifluoroacético 0,5% em um fluxo de 4 mL min⁻¹. As frações foram analisadas por UPLC-QToF-MS e as amostras W6A2E1 e W6A2E3 foram enviadas para análise de RMN ¹H e ¹³C.

Figura 14 – Cromatograma da separação por HPLC-UV da fração W6A2E em semipreparativa Inertsil C₈ ($\lambda_{\text{máx}}$ 254 nm).

5.2.2 Purificação dos compostos presentes na fração W6A1

A fração W6A1 forneceu um cromatograma (figura 15) com picos apresentando íons $[M+H]^+$ em m/z 309,8 com padrão de distribuição isotópica típica para a presença de 1 átomo de bromo (figura 16A, 16B, 16C e 16D). Os íons $[M+H]^+$ em m/z 436,7 também apresentaram padrão de distribuição isotópica típica para a presença de 1 átomo de bromo (Figuras 16E e 16F). Estes compostos foram procurados no banco de dados *Dictionary of Natural Products*. Não foi encontrado nenhum composto conhecido com essa massa isolado de esponjas marinhas.

Figura 15 - Perfil cromatográfico da fração W6A1, obtido por HPLC-UV-MS ($\lambda_{\text{máx}}$ 254 nm).

Figura 16 - Espectros de massas dos picos observados na fração W6A1 por HPLC-UV-MS.

A fração W6A1 (144 mg) foi separada por HPLC-UV, utilizando-se coluna semipreparativa Inertsil C₈, detector de UV = 254 nm, fluxo de 4 mL min⁻¹ composto da mistura de solventes H₂O/MeOH 72:28 e ácido trifluoroacético 0,5% por 27 minutos e aos 27-37 minutos 100% MeOH + 0,5% + ácido trifluoroacético. Foram obtidas 10 frações: W6A11 (16 mg), W6A12 (7,3 mg), W6A13 (4,6 mg), W6A14 (22,1 mg), W6A15 (4,7 mg), W6A16 (4 mg), W6A17 (1,9 mg), W6A18 (5,3 mg), W6A10 (48,2 mg) e W6A1R (28 mg).

As frações foram analisadas por HPLC-UV-MS e UPLC-QToF-MS. As frações W6A11 e W6A12 foram enviadas para análises por RMN ¹H e ¹³C.

Figura 17 - Fluxograma da separação por HPLC-UV da fração W6A1

Figura 18 – Perfil cromatográfico da separação por HPLC-UV da fração W6A1 em coluna semipreparativa Inertsil C₈ ($\lambda_{\text{máx}}$ 254 nm).

5.2.2.1 Repurificação do composto presente na fração W6A13

Através da análise da fração W6A13 por HPLC-UV-MS (Figuras 19 e 20), foi possível concluir que a amostra não estava pura. Como foi obtida pouca massa dessa fração (4,6 mg), foi possível isolar apenas o composto majoritário.

Figura 19 – Perfil cromatográfico da fração W6A13, obtido por HPLC-UV-MS ($\lambda_{\text{máx}}$ 254 nm).

Figura 20 – Espectros de ultravioleta e de massas dos picos observados na fração W6A13 por HPLC-UV-MS.

A fração W6A13 foi repurificada por HPLC-UV utilizando-se coluna analítica Inertsil C₈, detector de UV = 254 nm, fluxo de 1 mL min⁻¹ composto da mistura de solventes H₂O/MeOH 84:16 e ácido trifluoroacético 0,5%, resultando em 3 frações: W6A131 (0,1 mg), W6A132 (1,3 mg) e W6A133 (0,4 mg). Foi realizada análise de RMN de ¹H da fração W6A132, que apresentou um grau de pureza satisfatório (figura A11).

Figura 21 - Cromatograma da separação por HPLC-UV da fração W6A13 em coluna analítica Inertsil C₈ ($\lambda_{\text{máx}}$ 254 nm).

Figura 22 - Fluxograma da separação por HPLC-UV da fração W6A13.

5.2.2.2 Purificação dos compostos presente na fração W6A14

A fração W6A14 (22,1 mg) foi submetida a uma separação por HPLC, utilizando-se coluna analítica Inertsil C₈, um detector de UV monitorando-se no comprimento de onda de 254 e 320 nm, com fluxo de 1 mL min⁻¹ em modo isocrático e mistura eluente H₂O/MeOH 76:24 + ácido trifluoroacético 0,5%. Foram obtidas 3 frações, designadas W6A141 (1,6 mg), W6A142 (0,6 mg) e W6A143 (8,0 mg) (Figura 23).

Foi realizada análise de RMN de ¹H nas amostras W6A141 e W6A143. Foi possível observar que a fração W6A141 era o mesmo composto da fração W6A11. A fração W6A143 mostrou estar ainda impura, sendo necessária a sua purificação.

Figura 23 - Cromatograma da separação por HPLC-UV da fração W6A14 em coluna analítica Inertsil C₈ ($\lambda_{\text{máx}}$ 254 nm).

A fração W6A143 (8 mg) foi separada por HPLC-UV utilizando-se coluna analítica Inertsil C₈, um detector de UV monitorando-se no comprimento de onda de 254 e 308 nm, com fluxo de 1 mL min⁻¹ em modo isocrático e mistura eluente H₂O/MeOH 84:16 + ácido trifluoroacético 0,5%. Foram obtidas 3 frações, designadas W6A1431 (0,2 mg), W6A1432 (3,7 mg) e W6A1433 (1,1 mg) (figura 24).

Figura 24 - Cromatograma da separação por HPLC-UV da fração W6A143 em coluna analítica Inertsil C₈ ($\lambda_{\text{máx}}$ 254 nm).

Figura 25 - Fluxograma da separação por HPLC-UV da fração W6A14.

5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS METABOLITOS SECUNDÁRIOS DA ESPONJA *Dictyonella* sp. nov. (W6)

5.3.1 Identificação da himenidina (16, fração W6A2E3)

O composto presente na fração W6A2E3 foi analisado por UPLC-QToF-MS (Figura 26) e apresentou íon $[M + H]^+$ em m/z 310,0305 e m/z 312,0286. Estas medidas de massa exata indicam que o composto apresenta a fórmula C₁₁H₁₃BrN₅O, com um átomo de bromo. O composto apresentou-se como um sólido amorfo marrom.

No espectro no UV foram observadas bandas de absorção de maior intensidade em $\lambda_{\text{máx}}$ 216 e 272 nm (figura 26).

Figura 26 - Espectro de massas de alta resolução (ESI⁺) e espectro no UV da himenidina (**16**, fração W6A2E3).

A análise dos espectros de RMN uni e bidimensionais (figuras A1-A5) do composto presente na fração W6A2E3, e das bandas no UV e do espectro de massas de alta resolução, em comparação com os dados da literatura (KOBAYASHI et al., 1986) possibilitou identificar a substância como sendo a himenidina (**16**).

O espectro de RMN de ¹H do composto **16** (figura A1) apresenta sinal com deslocamento químico em δ 11,81, atribuído a um hidrogênio do grupo amina do anel pirrólico; um sinal em δ 8,38 atribuído ao hidrogênio do grupo amida; um sinal em δ 7,61 atribuído ao hidrogênio da amina primária do grupo 2-aminoimidazol; dois sinais em δ 6,97 e 6,87 atribuídos aos hidrogênios ligados aos carbonos do anel pirrólico; um sinal em δ 6,89 atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono do anel 2-aminoimidazol; dois sinais em δ 6,21 e 6,10 atribuídos aos hidrogênios ligados aos carbonos sp² da cadeia central; um sinal em δ 3,95 atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono sp³ da

cadeia central. Não foi possível observar no espectro HSQC correlação entre o ^1H com deslocamento químico em δ 6,89 com o carbono com o deslocamento químico em δ 111,1 (figura A5), sendo esta correlação confirmada pelo sinal satélite observado no espectro HMBC (figura A4).

O espectro de RMN de ^{13}C do composto **16** (figura A2) apresenta um sinal com deslocamento químico em δ 159,4 atribuído ao carbono do grupo amida; um sinal com deslocamento químico em δ 147,8 atribuído ao carbono substituído por 3 átomos de nitrogênio do grupo 2-aminoimidazol; dois sinais em δ 126,7 e 116,2 atribuídos aos carbonos sp^2 da cadeia que interliga o grupo amida ao grupo 2-aminoimidazol; um sinal em δ 126,7 atribuído carbono do anel pirrólico ligado a cadeia alifática; um sinal em δ 124,9 atribuído carbono do 2-amidoimidazol ligado a cadeia alifática; dois sinais em δ 121,3 e 111,5 atribuídos aos carbonos C-H do anel pirrólico; um sinal em δ 111,1 atribuído carbono C-H do grupo 2-amidoimidazol; um sinal em δ 94,9 atribuído ao carbono bromado do anel pirrólico; um sinal em δ 39,9 atribuído ao carbono sp^3 da cadeia que interliga o grupo amida ao grupo 2-aminoimidazol.

Os sinais observados são similares ao da literatura (KOBAYASHI et al., 1986), diferindo um pouco no valor do deslocamento químico dos sinais de hidrogênios e carbonos das posições 9 e 15. Isso pode ser explicado através da observação do espectro de RMN de ^1H onde existe uma pequena elevação na região de 12 para 12,5 ppm, o que pode indicar que o nitrogênio na posição 14 do 2-aminoimidazol esteja protonado. Por essa razão, a estrutura isolada possui valores de deslocamento químicos dos hidrogênios e carbonos das posições 9 e 15 mais desblindados em relação aos dados da literatura.

As correlações observadas nos espectros COSY e HMBC são ilustradas na figura 27.

Figura 27 - Correlações COSY (—) e HMBC (→) observadas para a himenidina (16).

9	116,2	6,10 (1H, dt, 5,0 e 16,2)	113,5	5,83 (1H, dt, 5,5 e 16,2)
10	126,7	6,21 (1H, d, 16,1)	126,7	6,18 (1H, d, 16,2)
11	124,9	-	125,2	-
12	-	11,81 (1H, s)	-	12,0 (1H, brs)
13	147,8	-	147,8	-
15	111,1	6,89 (1H, s)	111,2	6,4 (1H, s)
16	-	7,61 (2H, s)	-	7,7 (2H, s)

*Fonte: KOBAYASHI *et. al.*, 1986.

A himenidina (**16**) foi isolada pela primeira vez da esponja *Hymeniacidon* sp. (KOBAYASHI et al., 1986). Possui o mesmo esqueleto da oroidina (**15**), porém é desbromada na posição 5 do pirrol. Também foi isolada da esponja *Agelas clathrodes* (MORALES et al., 1991; ASSMANN et al., 2001). Esse composto apresenta atividade antiserotoninérgica e antimuscarínica (KOBAYASHI et al., 1986; ROSA et al., 1992).

5.3.2 Identificação da 4-desbromooroidina (29, fração W6A2E1)

O composto 29 foi analisado por UPLC-QToF-MS (Figura 30) e apresentou íons $[M + H]^+$ em m/z 310,0286 e em m/z 312,0266. Esta massa exata corresponde à fórmula $C_{11}H_{13}BrN_5O$. O espectro de massas apresenta padrão de distribuição isotópica dos dois picos típica para a presença de 1 átomo de bromo. O composto também apresentou-se como um sólido amorfo marrom. O espectro no UV apresentou bandas de absorção em $\lambda_{\text{máx}}$ 213 e 274 nm (figura 28). O espectro de absorção no IV (figura 29) apresentou uma banda forte e larga de estiramento em 3250 cm^{-1} provavelmente de estiramento N-H do grupo da amida. A absorção 1685 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento do C=O do grupo amida. A banda menos intensa 1560 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento C=C da cadeia alifática.

Figura 28 - Espectro de absorção no UV da 4-desbromooroidina (**29**), em MeOH.

Figura 29 - Espectro de absorção no IV da 4-desbromooroidina (**29**), em pastilha de sílica.

Figura 30 - Espectro de massas de alta resolução (ESI⁺) da 4-desbromooroidina (**29**)

A análise dos espectros de RMN uni e bidimensionais (figuras A6-A10) do composto **29** em comparação com a himenidina (**16**) levou à identificação do mesmo como sendo a 4-desbromooroidina (**29**). O espectro de RMN de ¹H em DMSO-*d*₆ (figura A6) do composto **29** apresenta sinal com deslocamento químico em δ 12,20 atribuído ao hidrogênio do grupo amina do anel pirrólico; um sinal em δ 8,29 atribuído ao hidrogênio do grupo amida; um sinal em δ 7,61 atribuído ao hidrogênio da amina primária do grupo 2-aminoimidazol; dois sinais em δ 12,67 e 12,04 atribuídos aos outros grupos N-H do grupo 2-aminoimidazol; dois sinais em δ 6,78 e 6,13 atribuídos aos hidrogênios ligados aos carbonos do anel pirrólico; um sinal em δ 6,89 atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono do grupo 2-aminoimidazol; dois sinais em δ 6,20 e 6,10 atribuídos aos hidrogênios ligados aos carbonos sp² da cadeia que interliga o anel pirrólico com o grupo 2-aminoimidazol; um sinal em δ 3,94 atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono sp³ da cadeia que interliga o anel pirrólico com o grupo 2-aminoimidazol.

O espectro de RMN de ¹³C do composto **29** (figura A7) apresenta um sinal com deslocamento químico em δ 159,6 atribuído ao carbono da amida; um sinal com

deslocamento químico em δ 147,9 atribuído ao carbono substituído por 3 nitrogênios do grupo 2-aminoimidazol; dois sinais em δ 127,2 e 116,3 atribuídos aos carbonos sp^2 da cadeia que interliga o anel pirrólico com o grupo 2-aminoimidazol; um sinal em δ 128,1 atribuído carbono do anel pirrólico ligado ao grupo amida; um sinal em δ 125,1 atribuído carbono do grupo 2-aminoimidazol ligado à cadeia central; dois sinais em δ 111,9 e 111,1 atribuídos aos carbonos C-H do anel pirrólico; um sinal em δ 111,3 atribuído carbono C-H do grupo 2-aminoimidazol; um sinal em δ 102,5 atribuído ao carbono bromado do anel pirrólico; um sinal em δ 39,9 atribuído ao carbono sp^3 da cadeia central.

Foi possível observar que os sinais da 4-desbromooroidina (**29**) são similares ao da himenidina (**16**), com mudanças apenas nos deslocamentos químicos dos sinais de 1H (e as multiplicidades) e ^{13}C do anel pirrólico pela mudança na posição do bromo. O deslocamento químico do sinal do carbono ligado ao bromo na himenidina está em δ 94,9 e na 4-desbromooroidina em δ 102,5. Esse aumento no deslocamento químico deve-se ao fato do carbono ligado ao bromo da 4-desbromooroidina estar mais próximo do nitrogênio do anel pirrólico, um átomo eletronegativo, desblindando o carbono. Pelo mesmo observa-se motivo a diferença entre os deslocamentos químicos dos 1H e outros ^{13}C do anel pirrólico.

No espectro de RMN de 1H da 4-desbromooroidina (**29**) foi possível observar o sinal do H relativo a protonação do nitrogênio na posição 14, o que explica o fato dos hidrogênios das posições 9 e 15 estarem mais desblindados em relação aos hidrogênios dos dados da literatura.

As correlações observadas nos espectros COSY (figura A8) e HMBC (figura A9) são ilustradas na figura 31.

Também pode ser observado a correlação no espectro COSY entre os 1H com deslocamento químico em δ 6,13 e 6,78 do anel pirrólico, o que não foi observado no espectro COSY da himenidina (**16**), o que é mais uma confirmação da estrutura proposta.

Figura 31 - Correlações COSY (—) e HMBC (—→) observadas para a 4-desbromooroidina (**29**).

A tabela 3 apresenta os dados de RMN ^1H e ^{13}C obtidos para a 4-desbromooroidina (**29**) da fração W6A2E1 e dados da literatura da himenidina (**16**) (KOBAYASHI *et al.*, 1986).

Tabela 3 - Comparação dos valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) da 4-desbromooroidina (**29**) com dados da himenidina (**16**) da literatura ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz).

	4-desbromooroidina (29) isolada (DMSO- d_6)		himenidina (16) literatura (DMSO- d_6)	
	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)
1	-	12,20 (s)	-	12,0 (1H, brs)
2	128,1	-	127,9	-
3	111,9	6,78 (1H, dd, 2,6 e 3,9)	112,1	6,86 (1H, dd, 1,2 e 2,5)
4	111,1	6,13 (1H, dd, 2,5 e 3,8)	95,4	-
5	102,5	-	121,0	6,94 (1H, dd, 1,2 e 2,5)
6	159,6	-	160,2	-
7	-	8,29 (1H, t, 5,9)	-	8,21 (1H, t, 5,5)
8	39,9	3,94 (2H, t, 5,4)	39,3	3,91 (2H, t, 5,5)

9	116,3	6,10 (1H, dt, 5,3 e 16,1)	113,5	5,83 (1H, dt, 5,5 e 16,2)
10	127,2	6,20 (1H, d, 16,3)	126,7	6,18 (1H, d, 16,2)
11	125,1	-	125,2	-
12	-	-	-	12,0 (1H, brs)
13	147,9	-	147,8	-
14	-	12,67	-	-
15	111,3	6,89 (1H, s)	111,2	6,4 (1H, s)
16	-	7,61 (2H, s)	-	7,7 (2H, s)

*Fonte: KOBAYASHI *et. al.*, 1986.

Ainda não foi reportado na literatura o isômero de mesmo esqueleto da himenidina com o bromo na posição 5. Sendo assim, o composto **29** é inédito na literatura. Fato interessante da 4-desbromooidina (**29**) foi por nós isolada 31 anos após o isolamento da himenidina (**16**), apesar de muitos derivados bromopirrólicos terem sido isolados de esponjas marinhas no decorrer desses anos.

5.3.3 Identificação da clathrodina (**17**, fração W6A132)

O composto **17** foi analisado por UPLC-QToF-MS (Figura 32) e apresentou íon $[M+H]^+$ em m/z 232,1185, massa exata que corresponde à fórmula $C_{11}H_{14}N_5O$. O composto apresentou-se também como um sólido amorfo marrom. No espectro no UV foram observadas bandas de absorção de maior intensidade em $\lambda_{\text{máx}}$ 219 e 269 nm (figura 32).

Figura 32 - Espectro de massas de alta resolução (ESI⁺) e de UV da clathrodina (**17**, fração W6A132).

A análise dos espectros de RMN uni e bidimensionais (figuras A11-A15) do composto **17** em comparação com os dados da literatura (MORALES et al., 1991) levou à identificação do mesmo como sendo a clathrodina (**17**).

A tabela 3 apresenta a comparação dos dados de RMN ¹H e ¹³C obtidos para a clathrodina (**17**) da fração W6A132 com os dados da literatura (MORALES et al., 1991).

Figura 33 - Correlações COSY (—) e HMBC (→) observadas para a clathrodina (17).

Tabela 4 - Comparação dos valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H (600 MHz) e ^{13}C (150 MHz) da fração W6A132 com dados da literatura ^1H (300 MHz) e ^{13}C (75 MHz).

	clathrodina (17) isolada (DMSO- d_6)		Clathrodina (17) literatura* (DMF- d_7)	
	δ_c	δ_H (J em Hz)	δ_c	δ_H (J em Hz)
1	-	11,42 (1H, s)	-	11,52 (1H, brs)
2	126,3	-	130,9	-
3	110,5	6,78 (1H, m)	110,3	6,96 (1H, m)
4	108,8	6,07 (1H, m)	109,0	6,12 (1H, m)
5	121,7	6,84 (1H, m)	121,9	6,96 (1H, m)
6	160,8	-	161,5	-
7	-	8,28 (1H, t, 6,1)		8,12 (1H, t, 5,6)
8	40,3	3,94 (1H, t, 5,3)	41,4	3,98 (2H, t, 5,5)
9	116,2	6,11 (1H, dt, 5,5 e 16,2)	120,8	5,93 (1H, dt, 6,4 e 15,6)

10	127,6	6,21 (1H, d, 16.5)	122,5	6,27 (1H, d, 15,6)
11	125,2	-	127,4	-
12	-	12,54 (1H, br s)	-	11,52 (1H, brs)
13	147,8	-	151,8	-
14	-	11,94 (1H, br s)	-	-
15	111,3	6,89 (1H, s)	117,5	6,49 (1H, s)
16	-	7,55 (2H, s)	-	5,41 (2H, brs)

*Fonte: MORALES et al., 1991.

A clathrodina (**17**) foi isolada pela primeira vez a partir da esponja *Agelas clathrodes*. Sua estrutura é a forma desbromada da oroidina (**15**). Não existe reportado da literatura o isolamento dessa estrutura de outra esponja. Assim como a himenidina e a oroidina, a clathrodina (**17**) também apresenta atividade antiserotonérgica e antimuscarínica (MORALES et al., 1991; ASSMANN et al., 2001). Esse composto também foi testado quanto ao seu efeito nas correntes de canais de sódio, demonstrando que atua como uma neurotoxina no canal de sódio, o que influencia a condutância iônica do canal (RENTAS et al., 1995).

5.3.4 Identificação da 5-desbromo-seco-isofaquelina (**30**, fração W6A11)

O composto presente na fração W6A11 foi analisado por UPLC-QToF-MS (Figura 36) e apresentou íons $[M+H]^+$ em m/z 310,0309 e em m/z 312,0289. Estes valores de massa exata correspondem à fórmula $C_{11}H_{13}BrN_5O$. O composto apresentou-se como um pó bege. No espectro no UV foram observadas bandas de absorção de maior intensidade em $\lambda_{\text{máx}}$ 238 e 294 nm (figura 34).

O espectro de absorção no IV (figura 35) apresentou uma banda forte e larga de estiramento em 3150 cm^{-1} , atribuída ao estiramento N-H do grupo amida.

Banda em 1675 cm^{-1} atribuída ao estiramento $\nu_{\text{C=O}}$ da amida. Banda menos intensa foi observada em 1580 cm^{-1} , atribuída ao estiramento $\text{C}=\text{C}$.

Figura 34 - Espectro de absorção no UV da 5-desbromo-seco-isofaquelina (**30**), em MeOH.

Figura 35 - Espectro de absorção no IV da 5-desbromo-seco-isofaquelina (**30**), em pastilha de sílica.

Figura 36 - Espectro de massas de alta resolução (ESI⁺) da 4-desbromo-seco-isofaquelina (**30**, fração W6A11).

Busca realizada no *Dictionary of Natural Products* com os dados obtidos indicou existir nenhum composto com esses dados. A análise dos espectros de RMN uni e bidimensionais (figuras A16-A20) do composto presente na fração W6A11 em comparação com dados da literatura (GOETZ *et. al.*, 2001) levou à identificação do mesmo como sendo a 5-desbromo-seco-isofaquelina (**30**). Os sinais dos espectros de RMN de ¹H e ¹³C são muito similares os da uguibolina (**31**), isolada da esponja marinha *Axinella carteri* (GOETZ *et al.*, 2001).

O espectro de RMN de ¹H da 5-desbromo-seco-isofaquelina (**30**) em DMSO-*d*₆ (figura A 16) apresenta sinal com deslocamento químico em δ 12,51

atribuído ao hidrogênio do grupo nitrogênio do anel pirrólico; Sinais em δ 9,25 e 7,56 foram atribuídos aos hidrogênios ligados aos nitrogênios do grupo guanidina; um sinal em δ 7,45 foi atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono do anel pirrólico; Sinais em δ 4,10, 2,99 e 2,14 foram atribuídos aos hidrogênios ligados aos carbonos sp^3 .

O espectro de RMN de ^{13}C do composto **30** (figura A17) apresenta sinal em δ 152,8, atribuído ao carbono da amida; sinal em δ 157,8, atribuído ao carbono do grupo guanidina; sinais em δ 48,5, 28,7 e 21,8 atribuídos a carbonos sp^3 ; sinais em δ 126,7 e 123,4 atribuídos a carbonos quaternários do anel pirrólico; sinal em δ 103,1 atribuído ao carbono quaternário do anel de seis membros ligado ao grupo guanidina; sinal em δ 127,6 atribuído ao carbonos C-H do anel pirrólico; sinal em δ 142,4 atribuído ao carbono ligado ao anel de seis e cinco membros; um sinal em δ 87,1 atribuído ao carbono bromado do anel pirrólico.

A análise dos espectros de RMN de 1H e ^{13}C do composto **30** em comparação com os da uguibolina (**31**) (GOETZ et al., 2001) indicou diferença apenas na presença do sinal de hidrogênio em δ 7,45 atribuído a CH-5. Esse sinal está ausente nos dados da uguibolina (**31**) (GOETZ et al., 2001), pois o C-5 está substituído por um átomo de bromo. O deslocamento químico do C-5 é menor na uguibolina (**30**) pelo fato do átomo de bromo ser volumoso, com nuvem de elétrons que blindar o núcleo desse carbono. O composto **31** está desprovido do bromo nessa posição, e C-5 apresenta deslocamento químico maior.

As correlações observadas nos espectros COSY (figura A18) e HMBC (figura A19) são ilustradas na figura 37.

O composto **30** apresenta o mesmo esqueleto de carbono da uguibolina (**31**). Porém, o derivado monobromado da uguibolina ainda não foi reportado na literatura, sendo este então um composto inédito.

Figura 37 - Correlações COSY (—) e HMBC (→) observadas para a 4-desbromo-seco-isofaquelina (**30**).

A tabela 5 apresenta os dados de RMN ^1H e ^{13}C obtidos para a 5-desbromo-seco-isofaquelina (**30**) da fração W6A11 e comparação com dados da literatura da uguibolina (**31**) (GOETZ et al., 2001)

Tabela 5 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, DMSO- d_6) da 5-desbromo-seco-isofaquelina (**30**) e de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 500 MHz, ^{13}C 125 MHz, DMSO- d_6) da uguibolina* (**31**)

	5-desbromo-seco-isofaquelina (30) (DMSO- d_6)		uguibolina (31) literatura* (DMSO- d_6)	
	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)
1	-	12,51 (1H, s)	-	13,42 (1H, s)
2	123,4	-	127,4	-
3	126,7	-	123,7	-
4	87,1	-	89,7	-
5	127,6	7,45 (1H, d, 1,6)	113,3	-
6	103,1	-	102,8	-
7	-	9,25 (1H, s)	-	8,88 (s)
8	157,8	-	157,7	-

10	142,4	-	142,9	-
11	28,7	2,99 e 2,86 (2H, m)	28,3	2,85 e 3,00 (2H, m)
12	21,8	2,14 (2H, sext, 7,55)	21,1	2,13 (2H, m)
13	48,5	4,10 e 3,96 (2H, m)	48,4	3,97 e 4,10 (2H, m)
15	152,8	-	151,7	-
16	-	7,56 (2H, s)	-	7,25 (s)

*Fonte: GOETZ et al., 2001.

5.3.4 Identificação da 4-desbromo-seco-isofaquelina (32, fração W6A12)

O composto da fração W6A12 foi analisado por UPLC-QToF-MS (Figura 40) e apresentou íons $[M+H]^+$ em m/z 310,0307 e em m/z 312,0287. Estes íons correspondem à fórmula $C_{11}H_{13}BrN_5O$. O composto apresentou-se como um pó branco. No espectro de UV foram observadas bandas de absorção de maior intensidade em $\lambda_{\text{máx}}$ 238 e 265 nm (Figura 38).

O espectro de absorção no IV (Figura 39) apresentou uma banda forte e larga de estiramento em 3130 cm^{-1} de estiramento N-H. Banda em 1650 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento do C=O da amida. Banda menos intensa em 1590 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento da ligação C=C.

Figura 38 - Espectro de absorção no UV da 4-desbromo-seco-isofaquelina (**32**), em MeOH.

Figura 39 - Espectro de absorção no IV da 4-desbromo-seco-isofaquelina (**32**), em pastilha de sílica.

Figura 40 - Espectro de massas de alta resolução (ESI⁺) da 4-desbromo-seco-isofaquelina (**32**, fração W6A12).

A análise dos espectros de RMN uni e bidimensionais (figuras A21-A25) do composto presente na fração W6A12 em comparação com o composto **30** levou à identificação do mesmo como sendo a 4-desbromo-seco-isofaquelina (**32**).

Os sinais de RMN-¹H e -¹³C da 5-desbromo-seco-isofaquelina (**32**) são similares aos da 4-desbromo-seco-isofaquelina (**30**). Observou-se mudanças apenas nos deslocamentos químicos dos sinais de ¹H e ¹³C do anel pirrólico, devido à mudança na posição do bromo. O deslocamento químico de C-5 da 4-desbromo-seco-isofaquelina (**30**) é δ 87,1 enquanto que na 5-desbromo-seco-isofaquelina (**32**) é δ 127,6.

As correlações observadas nos espectros COSY (figura A23) e HMBC (figura A24) são ilustradas na figura 41.

O composto **32** apresenta somente mudança na posição do bromo no anel pirrólico. O composto **32** também é inédito na literatura.

Figura 41 - Correlações COSY (—) e HMBC (→) observadas para a 4-desbromo-

seco-isofaquelina (**32**).

Tabela 6 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da 4-desbromo-seco-isofaquelina (**32**) e de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 500 MHz, ^{13}C 125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da uguibolina* (**31**).

	4-desbromo-seco-isofaquelina (32) ($\text{DMSO}-d_6$)		Uguibolina (31) literatura* ($\text{DMSO}-d_6$)	
	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)
1	-	12,93 (1H, s)	-	13,42 (1H, s)
2	131,2	-	127,4	-
3	124,0	-	123,7	-
4	102,4	6,23 (1H, s)	89,7	-
5	110,8	-	113,3	-
6	103,4	-	102,8	-
7	-	9,31 (1H, s)	-	8,88 (s)
8	157,1	-	157,7	-
10	141,1	-	142,9	-
11	28,8	2,93 (2H, m)	28,3	2,85 e 3,00 (2H, m)
12	21,8	2,12 (2H, quin, 7,4)	21,1	2,13 (2H, m)
13	48,5	4,02 (2H, s)	48,4	3,97 e 4,10 (2H, m)
15	152,1	-	151,7	-
16	-	7,50 (2H, s)	-	7,25 (s)

*Fonte: GOETZ et al., 2001.

5.3.5 Identificação da monobromoisofaquelina (20, fração W6A1433)

O composto presente na fração W6A1433 foi analisado por UPLC-QToF-MS (Figura 42) e apresentou íons $[M+H]^+$ em m/z 310,0303 e em m/z 312,0284. Estes valores de massa exata correspondem à fórmula $C_{11}H_{13}BrN_5O$. O composto apresentou-se como um sólido amorfo marrom. No espectro no UV foram observadas bandas de absorção em $\lambda_{\text{máx}}$ 240 e 275 nm (Figura 42).

Figura 42 - Espectro de massas de alta resolução (ESI⁺) e no UV da

monobromoisofaquelina (**20**, fração W6A1433).

A análise dos espectros de RMN uni e bidimensionais (figuras A26-A30) do composto presente na fração W6A1433 em comparação com os dados da literatura (ASSMANN et al., 2002) levou à identificação do mesmo como sendo a monobromoisofaquelina (**20**) (Figura 43 e Tabela 7). Esse composto foi primeiramente isolado a partir da esponja marinha *Agelas* sp. (ASSMANN et al., 2002)

As correlações observadas nos espectros COSY (figura A28) e HMBC (figura A29) são ilustradas na figura 43.

Figura 43 - Correlações COSY (—) e HMBC (→) observadas para

monobromoisofaquelina (**20**).

Tabela 7 – Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) da monobromoisofaquelina (**20**) com dados da literatura.

	monobromoisofaquelina (20) isolada ($\text{DMSO-}d_6$)		monobromoisofaquelina (20) literatura* ($\text{DMSO-}d_6$)	
	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)
1	-	12,45 (1H, s)	-	12,44 (1H, br)
2	125,1	7,22 (1H, d, 2,94)	124,4	7,22 (1H, d, 3,00)
3	93,9	-	93,3	-
4	122,3	-	121,6	-
5	122,1	-	121,4	-
6	54,8	5,22 (1H, s)	54,1	5,23 (1H, s)
7	-	8,59 (1H, s)	-	8,88 (1H, br)
8	157,3	-	157,0	-
9	-	9,53 (1H, s)	-	9,96 (1H, br)
10	84,9	-	84,2	-
11	39,8	2,21 (2H, m)	39,1	2,22 (2H, m)
12	19,9	2,00 (2H, m)	19,2	2,04 (2H, m)
13	44,8	3,57/3,46 (2H, m)	43,9	3,57/3,47 (2H, m)
14	-	-	-	-
15	156,2	-	155,5	-

*Fonte: ASSMANN et al., 2002.

Por apresentar dados de RMN de ^1H e ^{13}C praticamente idênticos aos da literatura, e $[\alpha]_D +14^\circ$ (MeOH, c 0,001), assumimos a mesma estereoquímica relativa e absoluta para a monobromoisofoquelina por nós isolada a partir da esponja *Dictyonella* sp.

5.3.5 Identificação da 5-bromopalau'amina (33, fração W6A1432)

O composto presente na fração W6A1432 foi analisado por UPLC-QToF-MS (Figura 44) e apresentou íon $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 498,0783, em m/z 500,0768 e em m/z 502,0735, com padrão de distribuição isotópica que indica a presença de um átomo de bromo e um átomo de cloro. Estas massas exatas correspondem à fórmula $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{BrClN}_9\text{O}_2$. O composto apresentou-se como um sólido amorfo transparente. No espectro de UV foram observadas bandas de absorção de maior intensidade em $\lambda_{\text{máx}}$ 201 e 279 nm (figura 46). O espectro de absorção no IV (Figura 45) apresentou uma banda forte e larga de estiramento em 3402 cm^{-1} de grupo(s) N-H. Banda em 1683 cm^{-1} foi atribuído ao estiramento C=O de grupo da amida. Banda menos intensa em 1200 cm^{-1} foi atribuída a estiramento de ligação(ões) C=C.

Figura 44 - Espectro de massas de alta resolução (ESI $^+$) da 5-bromopalau'amina (33, fração W6A1432).

Figura 45 - Espectro de absorção no IV da 5-bromopalau'amina (**33**), em pastilha de sílica.

Figura 46 - Espectro de absorção no UV da 5-bromopalau'amina (**33**), em MeOH.

A análise dos espectros de RMN uni e bidimensionais (figuras A32-A37) do composto presente na fração W6A1432 em comparação com dados da literatura (BUCHANAN *et. al.*, 2007) levou à identificação do mesmo como sendo a 5-bromopalau'amina (**33**).

Os sinais dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C são muito similares com os da estrutura revisada da palau'amina (**22**) (BUCHANAN *et al.*, 2007). O espectro de RMN de ^1H em DMSO- d_6 (figura A32) do composto presente na fração W6A1432 apresenta: sinais em δ 9,81, 9,47 e 8,28 atribuídos a hidrogênios ligados a átomos de nitrogênio; sinal em δ 7,91 atribuído ao hidrogênio de uma hidroxila; sinais em δ 6,51 e 6,84 atribuídos a hidrogênios de carbonos C-H do anel pirrólico; sinais em δ 2,96 e 3,14, 4,08 e 3,09 atribuídos a hidrogênios de grupos CH_2 ; sinais em δ 6,47, 3,15, 2,55, 2,27, 4,42 e 5,73 de hidrogênios de carbonos metínicos de carbonos sp^3 . Sinais em δ 4,42 e 5,73 foram atribuídos a hidrogênios de carbonos substituídos por cloro e hidroxila, respectivamente.

O espectro de RMN de ^{13}C do composto presente na fração W6A1432 (figura A33) apresenta sinais em δ 157,8 e 157,1 de carbonos guanidínicos; sinal em δ 155,2 atribuído ao carbono da carbonila; sinais em δ 104,3, 114,7, 114,5 e 124,7 dos carbonos do anel pirrólico; sinais em δ 44,8 e 40,4 atribuídos aos grupos CH_2 ; sinais adicionais de carbonos sp^2 em δ 67,7, 79,8, 55,8, 41,0, 70,8, 47,5, 82,5, 73,7.

As correlações observadas nos espectros COSY (figura A34) e HMBC (figura A35) são ilustradas na figura 45.

Figura 47 - Correlações COSY (—) e HMBC (→) observadas para 5-bromopalau'amina (**33**).

A análise do espectro ROESY (figura A37) em DMSO-*d*₆ possibilitou propor a estereoquímica relativa da estrutura **33**, idêntica àquela estabelecida após a revisão estrutural da palau'amina (**22**) (BUCHANAN et al., 2007). Efeitos NOE observados entre os hidrogênios em δ 6,47, 3,15, 5,73, 2,27 e 3,09 indicam que situam-se na

mesma face do composto **33**; correlações análogas observadas para hidrogênios em δ 4,42, 2,5 e 4,08 indicam que estes situam-se na outra face do composto **33**.

Figura 48 - Correlações observadas no espectro ROESY para a 5-bromopalau'amina (**33**) e estrutura com configuração relativa.

A estereoquímica relativa da 5-bromopalau'amina (**33**) pôde ser estabelecida como 6(*S**), 10(*R**), 11(*S**), 12(*R**), 16(*R**), 17(*S**), 18(*S**) e 20(*S**).

A configuração absoluta da estrutura da 5-bromopalau'amina (**33**) foi confirmada por comparação dos dados de $[\alpha]_D$ da palau'amina publicada em 2007 (BUCHANAN *et. al.*, 2007). O valor do $[\alpha]_D$ da palau'amina é $-18,9^\circ$ (MeOH, *c* 0,1) enquanto da 5-bromopalau'amina $-80,7^\circ$ (MeOH, *c* 0,001).

Tabela 8 – Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz)

da 5-bromopalau'amina (**33**) com dados de RMN de ^1H e ^{13}C (^1H 600 MHz, ^{13}C 125 MHz, DMSO- d_6) da palau'amina (**22**) da literatura.

	5-bromopalau'amina (33) (DMSO-d_6)		palau'amina (22) literatura* (DMSO-d_6)	
Posição	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J em Hz)
2	127,7	-	122,7	-
3	114,5	6,84 (1H, d, 3,9)	112,2	6,75 (1H, dd, 3,8 e 1,7)
4	114,7	6,51 (1H, d, 4,0)	111,6	6,35 (1H, dd, 3,8 e 2,8)
5	104,3	-	122,3	7,19 (1H, dd, 2,8 e 1,7)
6	67,7	6,47 (1H, s)	67,5	6,21 (1H, d, 1,0)
7	-	9,81 (1H, s)	-	9,93 (1H, s)
8	157,1	-	156,7	-
10	79,8	-	79,4	-
11	55,8	3,15 (1H, d, 14,5)	55,3	3,05 (1H, d, 14,4)
12	41,0	2,55 (1H, m)	40,6	2,53 (1H, dddd, 14,6, 10,2, 9,0 e 7,2)
13	44,8	4,08 (1H, dd, 10,3 e 7,62) 3,09 (1H, t, 10,3)	44,8	4,05 (1H, 10,2 e 7,2) 3,14 (1H, t, 10,2)
15	155,2	-	155,6	-
16	70,8	-	70,3	-
17	73,7	4,42 (1H, d, 8,5)	73,7	4,42 (1H, d, 9,0)
18	47,5	2,27 (1H, m)	47,0	2,24 (1H, qd, 9,0 e 5,0)
19	40,4	2,96 (1H, dd, 13,9 e 8,8) 3,14 (1H, m)	40,2	3,15 (1H, m) 2,94 (1H, m)
20	82,5	5,73 (1H, d, 5,0)	82,2	5,75 (1H, dd, 5,2 e 1,0)
21	-	9,47 (1H, s)	-	9,38 (1H)
22	157,4	-	156,9	-
23	-	8,28 (1H, s)	-	8,94 (1H, s)
OH	-	7,91 (1H, s)	-	7,71 (1H, d, 5,2)

*Fonte: BUCHANAN et al., 2007.

A palau'amina (**22**) foi isolada primeiramente a partir da esponja marinha *Stylotella agminata* (KINNEL et al., 1993). Em 1998 foram isoladas a 4,5-dibromopalau'amina (**23**) e a 4-bromopalau'amina (**24**) da esponja marinha *Stylotella aurantium* (KINNEL et al., 1998). Em 2007, a estrutura da palau'amina (**22**) foi revisada. Os autores propuseram que os carbonos C-11 e C-12 deveriam possuir configuração absoluta 11*S* e 12*R* e os carbonos C-17 e C-20 a configuração *S*. A estrutura publicada anteriormente para a palau'amina (**22**) apresentava configuração absoluta *S* para os carbonos C-11 e C-12 e configuração *R* para os carbonos C-17 e C-20 (Figura 48) (BUCHANAN et al., 2007).

Figura 49 - Estrutura atribuída anteriormente (A) e estrutura revisada (B) para a palau'amina.

Além de apresentar estrutura complexa, a palau'amina (**22**) apresenta diversas atividades biológicas: citotóxica, antibacteriana, imunossupressora (KINNEL et al., 1993), anticancerígena e antifúngica (LANSDELL et al., 2012; BECK et al., 2012). A síntese total da palau'amina (**22**) levou 17 anos e foi realizada em 25 etapas (Seiple et al., 2010).

A 5-bromopalau'amina (**22**) por nós isolada do extrato bruto da esponja *Dictyonella* sp. é inédita na literatura.

5.4 Isolamento e Identificação de Metabolitos Secundários da esponja *AGELAS SVENTRES* (W3)

O extrato de MeOH da esponja *Agelas sventres* (W3) foi particionado entre hexano e MeOH 90%. Obteve-se 4,7 g da fração metanólica e 0,2 g da fração hexânica. Cerca de 500 mg de extrato metanólico foi submetido ao fracionamento em coluna de sílica-gel derivatizada com C₁₈ com um gradiente de MeOH em H₂O. Foram obtidas 4 frações desta separação: W3A – 41,5 mg, W3B – 22,0 mg, W3C – 14,1 mg e W3D – 41,2 mg. Grande parte da amostra, cerca de 70%, apresentou sais que foram removidos na eluição com água.

A análise por HPLC-UV-MS da fração W3A forneceu um cromatograma (figura 50) com pico de íon $[M+H]^+$ em m/z 387,7 (figura 51) com padrão de distribuição isotópica típica para a presença de 2 átomos de bromo.

Figura 50 - Perfil cromatográfico da fração W3A, obtido por HPLC-UV-MS ($\lambda_{\text{máx}}$ 254 nm).

Figura 51 - Espectro no ultravioleta (A) e de massas (B) da fração W3A obtida do extrato da esponja *Agelas sventres*.

A análise por HPLC-UV-MS sugeriu que o composto fosse a oroidina. Essa fração foi analisada por RMN de ^1H (figura A38). Comparando-se os dados de RMN- ^1H observados para o composto da fração W3A com dados da literatura (tabela 9), confirmou-se a identificação como sendo a oroidina (**15**). A oroidina (**15**) foi primeiramente isolada da *Agelas oroides* (FORENZA et al., 1971), tendo sido também anteriormente isolada pelo Dr. Fábio Renato Pereira da esponja *Agelas sventres* da costa brasileira (PEREIRA, 2011).

O sinal tripleto em δ 8,5 e singlete em δ 7,4 são referentes a hidrogênios ligados aos átomos de nitrogênio dos grupos amida e amina primária, respectivamente. Nos dados da literatura esses sinais não aparecem pois o solvente utilizado para análise por RMN ^1H foi $\text{MeOH-}d_4$.

Tabela 9 - Comparação dos valores de deslocamentos químicos de RMN ^1H da amostra W3A (500 MHz) com dados da literatura (400 MHz).

	W3A ($\text{DMSO-}d_6$)	Oroidina* ($\text{MeOH-}d_4$)
H	δH (J em Hz)	δH (J em Hz)
4	6.97 (s, 1H)	6,82 (s, 1H)
15	6.87 (s, 1H)	6,47 (s, 1H)
10	6.22 (d, 1H, 16.1)	6.31 (d, 1H, 16.0)
9	6.11 (dt, 1H, 16.1 e 5.2)	5.87 (dt, 1H, 16.0 e 6.1)
8	3.94 (dd, 2H, 5.5 e 2.0)	4,00 (dd, 2H, 6.1 e 1.3)

*Fonte: TASDEMIR et. al., 2007.

A oroidina (**15**) primeiramente isolada da esponja *Agelas oroides* em 1971 (FORENZA et al., 1971) teve sua estrutura revisada 1973 (GARCIA et al., 1973). Posteriormente a oroidina foi isolada de diversas esponjas marinhas, dos gêneros *Hymeniacidon*, *Cymbaxinella* e *Axinella* (FORTE et al., 2009). A oroidina apresenta atividade antiserotonérgica e antimuscarínica (KOBAYASHI et al., 1986; SILVA et

al., 1992), bem como atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*. (ZIDAR et al., 2014). A oroidina (**15**) mostrou ser inativa contra *E. coli*, diferentemente dos resultados observados nos bioensaios realizados pelo grupo da Dra. Andréa Dessen (Seção 5.5).

5.5 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ALCALOIDES BROMOPIRRÓLICOS ISOLADOS DA ESPONJA *DICTYONELLA* SP. E *AGELAS SVENTRES*

Os extratos metanólicos das esponjas *Dictyonella* sp. e *Agelas sventres* foram avaliados em bioensaios de atividade contra *Trypanosoma cruzi*, citotóxica contra linhagens de células tumorais, e de inibição do proteassomo. Nenhum dos extratos apresentou atividade nos bioensaios testados.

Os alcaloides oroidina (**15**), 4-desbromooroidina (**29**), himenidina (**16**), 5-desbromo-seco-isofaquelina (**30**) e 4-desbromo-seco-isofaquelina (**32**) foram testados em bioensaio antibacteriano para inibição de *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*.

A oroidina (**15**) mostrou-se ativa contra *E. coli* até 720 min do experimento considerada parcialmente ativa contra *E. coli* (figura 51). A oroidina (**15**) também apresentou atividade contra *B. subtilis* (figura 52). A 4-desbromooroidina (**29**) foi parcialmente ativa contra *B. subtilis*. (figura 53).

A 5-desbromo-seco-isofaquelina (**30**), 4-desbromo-seco-isofaquelina (**32**) e a himenidina (**16**) não apresentaram atividade de inibição contra nenhuma das bactérias testadas.

Figura 52 - Curva de inibição de *E. coli* pela oroidina (15).

Figura 53 - Curva de inibição de *B. subtilis* pela oroidina (15).

Figura 54 - Curva de inibição de *B. subtilis* pela 4-desbromooroidina (29).

Tabela 10 - Porcentagem de inibição do crescimento bacteriano na presença dos alcaloides bromopirrólicos.

Composto	Porcentagem de inibição	
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
4-desbromooroidina (29)	-6%	-9%
Himenidina (16)	-8%	-58%
5-desbromo-seco-isofaquelina (30)	-10%	9%
4-desbromo-seco-isofaquelina (32)	13%	13%
Oroidina (15)	-3%	100%
Controle positivo	100%	100%
Controle negativo	0%	0%

5.6 ANÁLISE DA POSIÇÃO DO BROMO NO ANEL PIRRÓLICO EM ALCALOIDES BROMOPIRRÓLICOS

Depois do isolamento dos alcaloides da esponja *Dictyonella* sp., nós deparamos com uma dúvida: é comum o bromo na posição 5 do anel pirrólico em alcaloides bromopirrólicos de esponjas marinhas? Foi realizado levantamento bibliográfico utilizando reviews de Faulkner e de Blunt et al. sobre produtos naturais marinhos publicados na revista *Natural Products Reports* no intervalo de 1976 a 2018, sobre alcaloides bromopirrólicos isolados de esponjas marinhas. Após o levantamento realizado, foi possível gerar um gráfico ilustrando a distribuição do bromo nos anéis pirrólicos (Figura 55). Dentre os alcaloides bromopirrólicos isolados de esponjas marinhas, 48% apresentam bromo nas posições 4 e 5 do anel pirrólico, 35% são bromados na posição 4 e 9% na posição 5. Desta forma, é possível concluir que o isolamento de compostos bromados na posição 5 não é comum, muito possivelmente em decorrência da reatividade intrínseca do grupo pirrol frente à reação de bromação.

Figura 55 - Distribuição de bromo no anel pirrólico em alcaloides bromopirrólicos isolados de esponjas marinhas.

5 CONCLUSÃO

O estudo químico das esponjas *Dictyonella* sp. e *Agelas sventres* levou ao isolamento de oito alcaloides bromopirrólicos. Desses, a oroidina (15), himenidina (16), clathrodina (17) e monobromoisofaquelina (20) são conhecidos. A 4-desbromoroidina (29), a 5-desbromo-seco-isofaquelina (30), a 4-desbromo-seco-isofaquelina (32) e a 5-bromopalau'amina (33) são inéditos.

A 4-desbromoroidina (29) é um isômero de posição da himenidina (16), no qual o bromo está na posição 5 do pirrol, em vez da posição 4. A 4-desbromoroidina (29) mostrou ser parcialmente ativa na inibição da bactéria *B. subtilis*.

A 4-desbromo-seco-isofaquelina (32) e a 5-desbromo-seco-isofaquelina (30) apresentam esqueleto igual ao da uguibolina (31), única diferença é que são monobromados. Como existem poucos estudos na literatura sobre a uguibolina (31), compostos dessa classe são de interesse para avaliação em diferentes bioensaios. Devido às quantidades isoladas dos compostos 30 e 32 não foi possível analisar nenhuma atividade biológica para esses alcaloides.

A 5-bromopalau'amina (33) isolada da *Dictyonella* sp. é o primeiro derivado dessa classe isolado desde 1996.

Três compostos dos sete isolados da esponja *Dictyonella* sp. apresentam átomo de bromo exclusivamente na posição 5 do anel pirrólico. Levantamento bibliográfico realizado neste trabalho possibilitou verificar que alcaloides bromopirrólicos bromados exclusivamente na posição 5 são raros nessa classe de metabólitos secundários.

Nenhum alcaloide bromopirrólico havia sido isolado de esponjas do gênero *Dictyonella* até o presente estudo. Esse trabalho sugere que o estudo químico de estrados de outras esponjas coletadas na foz do Rio Amazonas pode levar ao isolamento de compostos ainda desconhecidos na literatura.

APÊNDICE

Figura A1 - Espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) da amostra W6A2E3 – himenidina (16).....	89
Figura A2 - Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6) da amostra W6A2E3 – himenidina (16).....	90
Figura A3 - Espectro COSY da amostra W6A2E3 – himenidina (16).....	91
Figura A4 - Espectro HMBC da amostra W6A2E3 – himenidina (16)	92
Figura A5 - Espectro HQSC da amostra W6A2E3 – himenidina (16).....	93
Figura A6 - Espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) da amostra W6A2E1 – 4-desbromooroidina (29).	94
Figura A7 - Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6) da amostra W6A2E1 – 4-desbromooroidina (29).	95
Figura A8 - Espectro COSY da amostra W6A2E1 – 4-desbromooroidina (29).	96
Figura A9 - Espectro HMBC da amostra W6A2E1 – 4-desbromooroidina (29).....	97
Figura A10 - Espectro HQSC da amostra W6A2E1 – 4-desbromooroidina (29).	98
Figura A11 - Espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) da amostra W6A132 – clathrodina (17).	99
Figura A12 - Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6) da amostra W6A132 – clathrodina (17).	100
Figura A13 - Espectro COSY da amostra W6A132 – clathrodina (17).....	101
Figura A14 - Espectro HMBC da amostra W6A132 – clathrodina (17).....	102
Figura A15 - Espectro HQSC da amostra W6A132 – clathrodina (17).....	103
Figura A16 - Espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) da amostra W6A11 – 5-desbromo-seco-isofaquelina (30).....	104
Figura A17 - Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6) da amostra W6A11 – 5-desbromo-seco-isofaquelina (30).....	105
Figura A18 - Espectro COSY da amostra W6A11 – 5-desbromo-seco-isofaquelina (30).....	106
Figura A19 - Espectro HMBC da amostra W6A11 – 5-desbromo-seco-isofaquelina (30).....	107
Figura A20 - Espectro HQSC da amostra W6A11 – 5-desbromo-seco-isofaquelina (30).....	108

Figura A21 - Espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) da amostra W6A12 – 4-desbromo-seco-isofaquelina (32).....	109
Figura A22 - Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6) da amostra W6A12 – 4-desbromo-seco-isofaquelina (32).....	110
Figura A23 - Espectro COSY da amostra W6A12 – 4-desbromo-seco-isofaquelina (32).....	111
Figura A24 - Espectro HMBC da amostra W6A12 – 4-desbromo-seco-isofaquelina (32).....	112
Figura A25 - Espectro HSQC da amostra W6A12 – 4-desbromo-seco-isofaquelina (32).....	113
Figura A26 - Espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) da amostra W6A1433 – monobromoisofaquelina (20).....	114
Figura A27 - Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6) da amostra W6A1433 – monobromoisofaquelina (20).....	115
Figura A28 - Espectro COSY da amostra W6A1433 – monobromoisofaquelina (20).....	116
Figura A29 - Espectro HMBC da amostra W6A1433 – monobromoisofaquelina (20).....	117
Figura A30 - Espectro HSQC da amostra W6A1433 – monobromoisofaquelina (20).....	118
Figura A31 - Espectro ROESY da amostra W6A1433 – monobromoisofaquelina (20).....	119
Figura A32 - Espectro de RMN ^1H (600 MHz, DMSO- d_6) da amostra W6A1432 – 5-bromopalau'amina (33).	120
Figura A33 - Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6) da amostra W6A1432 – 5-bromopalau'amina (33).	121
Figura A34 - Espectro COSY da amostra W6A1432 – 5-bromopalau'amina (33)...	122
Figura A35 - Espectro HMBC da amostra W6A1432 – 5-bromopalau'amina (33)...	123
Figura A36 - Espectro HSQC da amostra W6A1432 – 5-bromopalau'amina (33)...	124
Figura A37 - Espectro ROESY da amostra W6A1432 – 5-bromopalau'amina (33).	125
Figura A 38 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) da amostra W3A – oroidina (15).....	126

Figura A 39 – Espectro de discroísmo circular da 5-bromopalau'amina (nr) (MeOH, $c = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$) – A; Espectro de discroísmo circular da monobromoisofakelina (nr) (MeOH, $c = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$) – B..... 127

Figura A1 - Espectro de RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da amostra W6A2E3 – himenidina (**16**).

Figura A2 - Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da amostra W6A2E3 – himenidina (**16**).

Figura A4 - Espectro HMBC da amostra W6A2E3 – himenidina (16)

Figura A5 - Espectro HQSC da amostra W6A2E3 - himenidina (16).

Figura A6 - Espectro de RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da amostra W6A2E1 – 4-desbromooroidina (**29**).

Figura A7 - Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da amostra W6A2E1 – 4-desbromooroidina (**29**).

Figura A8 - Espectro COSY da amostra W6A2E1 – 4-desbromooroidina (**29**).

Figura A9 - Espectro HMBC da amostra W6A2E1 – 4-desbromooroidina (**29**).

Figura A10 - Espectro HQSC da amostra W6A2E1 – 4-desbromooroidina (**29**).

Figura A11 - Espectro de RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da amostra W6A132 – clathrodina (**17**).

Figura A12 - Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da amostra W6A132 – clathrodina (**17**).

Figura A13 - Espectro COSY da amostra W6A132 – clathrodina (17)

Figura A14 - Espectro HMBC da amostra W6A132 – clathrodina (17).

Figura A15 - Espectro HQSC da amostra W6A132 – clathrodina (17).

Figura A16 - Espectro de RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da amostra W6A11 – 5-desbromo-seco-isofaquelina (**30**).

Figura A17 - Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da amostra W6A11 – 5-desbromo-seco-isofaquelina (**30**).

Figura A18 - Espectro COSY da amostra W6A11 – 5-desbromo-seco-isofaquelina (**30**).

Figura A19 - Espectro HMBC da amostra W6A11 – 5-desbromo-seco-isofaquelina (**30**).

Figura A20 - Espectro HQSC da amostra W6A11 – 5-desbromo-seco-isofaquelina (**30**).

Figura A21 - Espectro de RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da amostra W6A12 – 4-desbromo-seco-isofaquelina (**32**).

Figura A22 - Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da amostra W6A12 – 4-desbromo-seco-isofaquelina (**32**).

Figura A23 - Espectro COSY da amostra W6A12 – 4-desbromo-seco-isofaquelina (**32**).

Figura A24 - Espectro HMBC da amostra W6A12 – 4-desbromo-seco-isofaquelina (**32**).

Figura A25 - Espectro HSQC da amostra W6A12 – 4-desbromo-seco-isofaquelina (**32**).

Figura A26 - Espectro de RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da amostra W6A1433 – monobromoisofaquelina (**20**).

Figura A27 - Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da amostra W6A1433 – monobromoisofaquelina (**20**).

Figura A28 - Espectro COSY da amostra W6A1433 – monobromoisofaquelina (**20**).

Figura A29 - Espectro HMBC da amostra W6A1433 – monobromoisofaquelina (**20**).

Figura A30 - Espectro HSQC da amostra W6A1433 – monobromoisofaquelina (**20**).

Figura A31 - Espectro ROESY da amostra W6A1433 – monobromoisofaquelina (**20**).

Figura A32 - Espectro de RMN ^1H (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da amostra W6A1432 – 5-bromopalau'amina (**33**).

Figura A33 - Espectro de RMN ^{13}C (150 MHz, DMSO- d_6) da amostra W6A1432 – 5-bromopalau'amina (**33**).

Figura A34 - Espectro COSY da amostra W6A1432 – 5-bromopalau'amina (**33**).

Figura A35 - Espectro HMBC da amostra W6A1432 – 5-bromopalau'amina (**33**).

Figura A36 - Espectro HSQC da amostra W6A1432 - 5-bromopalau'amina (33).

Figura A37 - Espectro ROESY da amostra W6A1432 – 5-bromopalau'amina (**33**).

Figura A 38 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) da amostra W3A – oroidina (**15**)

Figura A 39 – Espectro de discoísmo circular da 5-bromopalau'amina (**33**) (MeOH, $c = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$) – A; Espectro de discoísmo circular da monobromoisofaquelina (**20**) (MeOH, $c = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$) – B.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIELLO, A.; FATTORUSSO, E.; MENNA, M.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. A typical class of marine alkaloids: bromopyrroles. In: Fattorusso, E.; Taglialatela-scafati, O. (Ed.). **Modern alkaloids: structure, isolation, synthesis and biology**. Weinheim: Wiley-VCH, 2008. p. 271-296.

ASSMANN, M.; KÖCK, M. Monobromoisophakellin, a new bromopyrrole alkaloid from the Caribbean sponge *Agelas* sp. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 57, n. 1–2, p. 153–156, 2002.

ASSMANN, M.; ZEA, S.; KÖCK, M. Sventrin, a new bromopyrrole alkaloid from the caribbean sponge *Agelas sventres*. **Journal of Natural Products**. v. 64, p. 1593-1595, 2001.

BECK, P.; LANSDELL, T. A.; HEWLETT, N. M.; TEPE, J. J.; GROLL, M. Indolophakellins as β 5-specific noncovalent proteasome inhibitors. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 54, n. 9, p. 2830–2833, 2015.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A.; MUNRO, M. H. G.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 2, p. 116–211, 2015.

BUCHANAN, M. S.; CARROLL, A. R.; QUINN, R. J. Revised structure of palau'amine. **Tetrahedron Letters**, v. 48, n. 26, p. 4573–4574, 2007.

BURKHOLDER, P. R.; SHARMA, G. M. Antimicrobial agents from the sea. **Lloydia**, v. 32, n. 4, p. 466-483, 1969.

CIMINIELLO, P.; FATTORUSSO, E.; MAGNO, S.; MANGONI, A.; PANSINI, M.; Incisterols, a new class of highly degraded sterols from the marine sponge *Dictyonella incisa*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, n. 9, p. 3505-3509, 1990.

CIMINIELLO, P.; FATTORUSSO, E.; MAGNO, S.; MANGONI, A.; IALENTI, A.; DI ROSA, M. Furan fatty acid steryl esters from the marine sponge *Dictyonella incisa* which show inflammatory activity. **Experientia**, v. 47, n. 7, p. 739-743, 1991.

CRONIN, G. Resource allocation in seaweeds and marine invertebrates: Chemical defense patterns in relation to defense theories. In: MCCLINTOCK, J. B.; BAKER B. J. (Ed.). **Marine chemical ecology**. Boca Raton: CRC, 2001. p. 325–353.

EISMA, D.; MAREL, H. W. Marine muds along the Guyana coast and their origin from the Amazon basin. **Contributions to Mineralogy and Petrology**, v. 31, p. 321–334, 1971.

FORENZA, S.; MINALE, L.; RICCIO, R.; FATTORUSSO, E. New bromo-pyrrole derivatives from the sponge *Agelas oroides*. **Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications**, v. 285, n. 18, p. 1129, 1971.

FORTE, B.; MALGESINI, B.; PIUTTI, C.; QUARTIERI, F.; SCOLARO, A.; PAPEO, G. A submarine journey: The pyrrole-imidazole alkaloids. **Marine Drugs**, v. 7, n. 4, p. 705–753, 2009.

FUSETANI, N.; MATSUNAGA, S.; MATSUMOTO, H.; TAKEBAYASHI, Y. Bioactive marine metabolites. Cyclotheonamides, potent thrombin inhibitors, from a marine sponge *Theonella* sp. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, p. 7053–7054, 1990.

GARCIA, E. E.; BENJAMIN, L. E.; FRYER, R. I. Reinvestigation into the structure of oroidin, a bromopyrrole derivative from marine sponge. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, v.3, p. 78-70, 1973.

GAZAVE, E.; LAPÉBIE, E.; RENARD, J.; VACELET, C.; ROCHER, A. V.; ERESKOVSKY, D. V.; LAVROV, C. Borchellini: molecular phylogeny restores the suprageneric subdivision homoscleromorph sponges (Porifera, Homoscleromorpha). **PLoS ONE**, v.5, n. 12, p. e14290, 2010.

GOETZ, G. H.; HARRIGAN, G. G.; LIKOS, J. Ugibohlin: A new dibromo-seco-isophakellin from *Axinella carteri*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 12, p. 1581–1582, 2001.

GULDER, T. A. M.; MOORE, B. S. Chasing the treasures of the sea – bacterial marine natural products. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, p. 252-260, 2009.

HARPER, M. K.; BUGNI, T. S.; COPP, B. R.; JAMES, R. D.; LINDSAY, B. S.; RICHARDSON, A. D.; SCHNABEL, P. C.; TASDEM. IR, D.; VANWAGONER, R. M.; VERBITSKI, S. M.; IRELAND, C. M. Introduction to the chemical ecology of marine natural products. In: MCCLINTOCK, J. B.; BAKER B. J. (Ed.). **Marine Chemical Ecology**. Boca Raton: CRC, 2001, p. 3-69.

HENTSCHEL, U.; PIEL, J.; DEGNAN, S. M.; TAYLOR, M. W. Genomic insights into the marine sponge microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 9, p. 641–654, 2012.

HIRATA, Y.; UEMURA, D. Halichondrins – antitumour polyether macrolides from a marine sponge. **Pure and Applied Chemistry**, v. 58, p. 701-710, 1986.

JACKSON, S. A.; KENNEDY, J.; MARGASSERY, L. M.; FLEMER, B.; O'LEARY, N.; MORRISSEY, J. P.; FERGAL O'GARA, F.; DBSON, A. D. W. Marine sponges: molecular biology and biotechnology. In: SE-KWON, K. (Ed.). **Springer handbook of marine biotechnology**. Heidelberg: Springer, 2015. p. 219-254..

JAIN, S.; CIGLER, T. Eribulin mesylate in the treatment of metastatic breast cancer. **Biologics : Targets & Therapy**, v. 6, p. 21–9, 2012.

JOHNS, E. M.; MULING, B. A.; PEREZ, R. C.; MÜLLER-KARGER, F. E.; MELO, N.; SMITH, R. H.; LAMKIN, J. T.; GERARD, T. L; MALCA, E. . Amazon River water in the northeastern Caribbean Sea and its effect on larval reef fish assemblages during April 2009. **Fisheries Oceanography**, v. 23, p. 472, 2014.

KATO, T.; SHIZURI, Y.; IZUMIDA, H.; YOKOYAMA, A.; ENDO, M. Styloguanidines, new chitinase inhibitors from the marine sponge *Stylotella aurantium*. **Tetrahedron Letters**, v. 36, n. 12, p. 2133–2136, 1995.

KINNEL, R. B.; GEHRKEN, H. P.; SCHEUER, P. J. Palau'amine: a cytotoxic and immunosuppressive hexacyclic bisguanidine antibiotic from the Sponge *Stylotella agminata*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, n. 8, p. 3376–3377, 1993.

KINNEL, R. B.; GEHRKEN, H. P.; SWALI, R.; SKOROPOWSKI, G.; SCHEUER, P. J. Palau'amine and its congeners: A family of bioactive bisguanidines from the marine sponge *Stylotella aurantium*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 63, n. 10, p. 3281–3286, 1998.

KOBAYASHI, J.; OHIZUMI, Y.; NAKAMURA, H.; HIRATA, Y. A Novel antagonist of serotonergic receptors, hymenidin, isolated from the okinawan marine Sponge *Hymeniacidon* Sp. **Experientia**, v. 42, n. 10, p 1176-1177, 1986.

KOBAYASHI, M.; KRISHNA, M. M.; ISHIDA, K.; ANJANEYULU, V. Marine sterols XXII. Occurrence of 3-Oxo-4,6,8(14)-triunsaturated steroids in the Sponge *Dvsidea herbacea*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, n. 1, p. 72-74, 1992.

LANSDSELL, T. A.; HEWLETT, N. M.; SKOUMBOURDIS, A. P.; FODOR, M. D.; SEIPLE, I. B.; SU, S.; BARAN, P. S.; FELDMAN, K. S.; TEPE, J. J. Palau'amine and related oroidin alkaloids dibromophakellin and dibromophakellstatin inhibit the human 20s proteasome. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 5, p. 980–985, 2012.

LEAL, M. C.; PUGA, J.; SERÔDIO, N. C.; GOMES, R. Trends in the discovery of new marine natural products from invertebrates over the last two decades – where and what are we bioprospecting?. **PLoS ONE**, v. 1, n. 7, p. e30580, 2012.

LUMPKIN, R.; GARZOLI, S. L.; Near-surface circulation in the tropical atlantic ocean. **Deep-Sea Research I**, v. 52, n. 3, p. 495-518, 2005.

MEESTERS, E.; KNIJN, R.; WILLEMSSEN, P.; PENNARTZ, R.; ROEBERS, G.; VAN SOEST R. W. M. Subrubble communities of Curaçao and Bonaire coral reefs. **Coral Reefs**, v. 10, p. 189–197. 1991.

MORALES, J. J.; RODRIGUEZ, A. D. The structure of clathrodin, a novel alkaloid isolated from the caribbean sea sponge *Agelas clathrodes*. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 2, p. 629–631, 1991.

MOURA, R. L.; AMADO-FILHO, G. M.; MORAES, F. C.; BRASILEIRO, P. S.; SALOMON, P. S.; MAHIQUES, M. M.; BASTOS, A. C.; ALMEIDA, M. G.; SILVA, J. M.; ARAUJO, B. F.; BRITO, F. P.; RANGEL, T. P.; OLIVEIRA, B. C. V.; BAHIA, R. G.; PARANHOS, R. P.; DIAS, R. J. S.; SIEGLE, E.; FIGUEIREDO, A. G.; PEREIRA, R. C.; LEAL, C. V.; HAJDU, E.; ASP, N. E.; GREGORACCI, G. B.; NEUMANN-LEITAO, S.; YAGER, P. L.; FRANCINI-FILHO, R. B.; FROES, A.; CAMPEAO, M.; SILVA, B. S.; MOREIRA, A. P. B.; OLIVEIRA, L.; SOARES, A. C.; ARAUJO, L.; OLIVEIRA, N. L.; TEIXEIRA, J. B.; VALLE, R. A. B.; THOMPSON, C. C.; REZENDE, C. E.; THOMPSON, F. L. An extensive reef system at the Amazon River mouth. **Science Advances**, v. 2, n. 4, p. e1501252–e1501252, 2016.

MÜLLER-KARGER, F.E.; MCLAIN C.R.; RICHARDSON P.L. The dispersal of the Amazon's water. **Nature**, v. 333, p. 56–69, 1988.

MURICY, G.; ESTEVES, E. L.; MORAES, F.; SANTOS, J. P.; SILVA, S. M.; KLAUTAU, M.; LANNA, E. Biodiversidade marinha da bacia Potiguar – porifera. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2008. 156p. (Série livros, 29).

PEAN, E.; KLAAR, S; BERGLUND, E.G.; SALMONSON, T.; BORREGAARD, J.; HOFLAND, K.F.; ERSBØLL, J.; ABADIE, E.; GIULIANI, R.; PIGNATTI, F. The European medicines agency review of eribulin for the treatment of patients with locally advanced or metastatic breast cancer: summary of the scientific assessment of the committee for medicinal products for human use. **Clinical Cancer Research**, v. 18, p. 4491–4497, 2012.

PEREIRA, Fábio Renato. **Metabólitos secundários bioativos e mediadores de relação predados/presa de invertebrados marinhos**. 2011. 178f. Tese (Doutorando em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

PROKSCH, P.; EDRADA-EBEL, R.; EBEL, R. Drugs from the sea – opportunities and obstacles. **Marine Drugs**, v. 1, p. 5-17, 2003.

RIVERA RENTAS, A. L.; ROSA, R.; RODRÍGUEZ, A. D.; DE MOTTA, G. E. Effect of alkaloid toxins from tropical marine sponges on membrane sodium currents. **Toxicon**, v. 33, n. 4, p. 491–497, 1995.

ROSA, R.; SILVA, W.; DE MOTTA, G. E.; RODRÍGUEZ, A. D.; MORALES, J. J.; ORTIZ, M. Anti-muscarinic activity of a family of C11N5 compounds isolated from *Agelas* sponges. **Experientia**, v. 48, n. 9, p. 885–887, 1992.

SASHIDHARA, K. V.; WHITE, K.N.; CREWS, P. A selective account of effective paradigms and significant outcomes in the discovery of inspirational marine natural products. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 3, p. 588–603, 2009.

BUCHANAN, M. S.; CARROLL, A. R.; QUINN, R. J. Revised structure of palau'amine. **Tetrahedron Letters**, v. 48, n. 26, p. 4573–4574, 2007.

TASDEMIR, D.; TOPALOGLU, B.; PEROZZO, R.; BRUN, R.; O'NEILL, R.; CARBALLEIRA, N. M.; ZHANG, X.; TONGE, P. J.; LINDEN, A.; RÜEDI, P. Marine Natural products from the Turkish sponge *Agelas oroides* that inhibit the enoyl reductases from *Plasmodium falciparum*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Escherichia coli*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 6834-6845, 2007.

THAKUR, N. L.; THAKUR, A. N.; MULLER, W. W. Marine natural products in drug discovery. **Natural Product Radiance**, v. 4, p. 471–477, 2005.

VAN SOEST, R.W.; BOURY-ESNAULT, N.; VACELET, J.; DOHRMANN, M.; ERPENBECK, D.; DE VOOGE, N.J.; SANTODOMINGO, N.; VANHOORNE, B.; KELLY, M.; HOOPER, J.N. Global diversity of sponges (Porifera). **PLoS ONE**, v. 4, n. 7, p. e35105, 2012.

WATERS, A. L.; HILL, R.T.; PLACE, A.R.; HAMANN, M.T. The expanding role of marine microbes in pharmaceutical development. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, p. 1–7, 2010.

ZIDAR, N.; MONTALVÃO, S.; HODNIK, Ž.; NAWROT, D. A.; ŽULA, A.; ILAŠ, J.; KIKELJ, D.; TAMMELA, P.; MAŠIČ, L. P. Antimicrobial activity of the marine alkaloids, clathrocin and oroidin, and their synthetic analogues. **Marine Drugs**, v. 12, n. 2, p. 940–963, 2014.