LIZBETH LORENA LÓPEZ PARRA

**Uso de desreplicação por HPLC-UV-MS para a descoberta de
metabólitos bioativos de invertebrados marinhos**

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica.
Orientador: Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck

Exemplar revisado

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

São Carlos

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Assinatura: *Lizbeth Lorena*

Data: *23/02/2016*

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

López Parra, Lizbeth Lorena

Uso de desreplicação por HPLC-UV-MS para a descoberta de metabólitos bioativos em organismos marinhos. / Lizbeth Lorena López Parra. — São Carlos, 2016.

2 v.

Tese (Doutorado em Química Orgânica e Biológica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2016.

Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck

1. Produtos Naturais. 2. Desreplicação. 3. *Tedania brasiliensis*. 4. *Amathia verticillata*. 5. *Iotrochota birotulata*. I. Título.

*Referências Bibliográficas
conferidas pelo SBI/IQSC*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck pela orientação.

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

A Guilherme Titato e Leandro Arrivetti pela ajuda na obtenção dos dados de espectrometria de massas de alta resolução.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida e à FAPESP pelo apoio financeiro.

A todos os colegas do Grupo de Química Orgânica de Sistemas Biológicos pela amizade, sugestões e pela companhia, especialmente para Everton, Julie, Karen, Raquel, Laura, Maria Camila, Mirelle, Fabiana e Marcos.

À minha família, especialmente à minha mãe Luz Stella pelo apoio durando o doutorado.

A Geraldo Rodrigues pela amizade sincera e pela ajuda neste documento.

VOLUME 1

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABELAS	VII
ÍNDICE DE ESQUEMAS	VIII
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	IX
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
1.1. Desreplicação: estratégia associada à descoberta de metabólitos secundários bioativos.3	
1.2. Descoberta de metabólitos secundários bioativos de organismos marinhos.	7
1.3. <i>Tedania brasiliensis</i>	9
1.3.1. O gênero <i>Tedania</i>	9
1.3.2. A esponja <i>Tedania brasiliensis</i>	11
1.4. <i>Amathia verticillata</i> (= <i>Zoobotryon verticillatum</i>)	12
1.4.1. O gênero <i>Amathia</i>	12
1.4.2. O briozoário <i>Amathia verticillata</i>	13
1.5. <i>Iotrochota birotulata</i>	14
2. OBJETIVOS	16
3. PARTE EXPERIMENTAL	17
3. Parte Experimental	17
3.1. Técnicas espectroscópicas	17
3.1.1. Ressonância magnética nuclear (RMN)	17
3.1.2. Espectrometria de Massas	17
3.2. Técnicas Cromatográficas	17
3.2.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)	17
3.2.2. Cromatografia em colunas pré-empacotadas	18
3.2.3. Cromatografia de permeação em gel	19
3.2.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	19
3.3. Evaporação, secagem e armazenamento de extratos, frações e substâncias purificadas	19

3.4. Solventes	20
3.5. Protocolos dos bioensaios	20
3.5.1. Determinação in vitro da atividade antiparasitária e da concentração efetiva 50% (EC ₅₀) para morte de parasitas <i>Leishmania (L.) infantum</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS, RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1. Estudo de desreplicação do extrato da esponja <i>Iotrochota birotulata</i>	22
4.1.1 Coleta e preparação das amostras da esponja <i>Iotrochota birotulata</i>	22
4.1.2. Desreplicação das frações da esponja <i>Iotrochota birotulata</i>	23
4.2. Estudo químico do Briozoário <i>Amathia verticillata</i>	29
4.2.1. Procedimento Experimental	29
4.2.2. Resultados e Discussão	33
4.3. Desreplicação, investigação química e biológica do extrato bruto da esponja <i>Tedania brasiliensis</i>	38
4.3.1. Procedimento experimental.....	38
4.3.2. Análise espectroscópica das frações de <i>Tedania brasiliensis</i>	43
4.3.3. Preparação de derivados da pseudoceratidina	75
4.3.4. Avaliação biológica dos compostos isolados da esponja <i>Tedania brasiliensis</i> e os derivados sintéticos.	82
5. CONCLUSÕES	85
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas de primeiras moléculas isoladas por desreplicação.....	3
Figura 2 - Novas substâncias bioativas naturais isoladas mediante desreplicação.....	6
Figura 3 - Metabólitos inéditos isolados de extratos brutos de fontes naturais utilizando-se desreplicação.	7
Figura 4 - Violações de Lipinski observadas para: (a) Produtos naturais de origem marinha (azul) e para todos produtos naturais (vermelho), (b) Compostos obtidos de organismos pertencentes a diferentes Filos. Azul: número de violações = 0; Vermelho: número de violações = 1; Verde: violação de c_{logP} . ⁵⁷	8
Figura 5 - Estrutura da tedanolida A.....	9
Figura 6 - Compostos isolados de <i>Tedania</i> (17) β -carbolina e (18) 1-metilisoguanosina.	10
Figura 7 - Metabólitos secundários aromáticos isolados de <i>Tedania ignis</i>	10
Figura 8 - Estrutura do tedanol.	10
Figura 9 - Estruturas das tedarenas A (28) e B (29).	10
Figura 10 - Esponja <i>Tedania brasiliensis</i> . Foto: Cortesia do prof. Eduardo Hajdu.	11
Figura 11 - Taxonomia da esponja <i>Tedania brasiliensis</i>	11
Figura 12 - Briozoário <i>Amathia verticillata</i> . Foto: Cortesia de Daniel Stoupin.	13
Figura 13 - Taxonomia do briozoário <i>Amathia verticillata</i>	14
Figura 14 - 2,5,6-tribromo- <i>N</i> -metilgramina e seu correspondente <i>N</i> -óxido.	14
Figura 15 - Compostos isolados a partir de <i>Amathia verticillata</i>	14
Figura 16 - Esponja <i>Iotrochota birotulata</i> . Foto: The Sponge Guide www.spongeguide.org	15
Figura 17 - Taxonomia da esponja <i>Iotrochota birotulata</i>	15
Figura 18 - Metabólitos halogenados isolados a partir de <i>Iotrochota birotulata</i>	15
Figura 19 - Fluxograma de fracionamento do extrato bruto da esponja <i>Iotrochota birotulata</i>	23
Figura 20 - Compostos conhecidos detectados nas frações IbM-HM-C, IbM-HM-E, IbM-HM-F e IbM-HM-G, obtidas do extrato de <i>Iotrochota birotulata</i>	24
Figura 21 - Espectros de massas ESI(-) para compostos desconhecidos da fração IbM-HM-F de <i>Iotrochota birotulata</i>	25
Figura 22 - Compostos com as mesmas fórmulas moleculares da fração IbM-HM-F.	26
Figura 23 - Espectros de massas ESI(-) para o composto desconhecido da fração IbM-HM-G de <i>Iotrochota birotulata</i>	27

Figura 24 - Composto com a mesma fórmula molecular da fração IbM-HM-G.....	28
Figura 25 - Cromatograma do extrato metanólico do briozoário <i>Amathia verticillata</i>	31
Figura 26 - Espectros de massas ESI(+) e ultravioleta dos derivados bromados da <i>N</i> -metilgramina presentes no extrato metanólico do briozoário <i>A. verticillata</i> . (A) composto desconhecido com dois bromos, (B) 2,5,6-tribromo- <i>N</i> -metilgramina.....	31
Figura 27 - Espectro de massas de alta resolução ESI(+) do 2,6-dibromo- <i>N</i> -metilgramina (51).	35
Figura 28 - Estruturas de 2,5,6-tribromo- <i>N</i> -metilgramina (30) e dos dois possíveis isômeros da dibromo- <i>N</i> -metilgramina, um dos quais isolado de <i>A. verticillata</i> coletado em Arraial do Cabo, RJ.	36
Figura 29 - Correlações observadas no espectro do tipo HMBC para a estrutura 2,5-dibromo- <i>N</i> -metilgramina (51).	36
Figura 30 - Cromatograma do extrato bruto da esponja <i>Tedania brasiliensis</i> (detecção em $\lambda_{\max}$ 275 nm). Condições de análise: coluna C ₁₈ Inertsil ODS-3; eluente: gradiente a partir de 90% H ₂ O e 10% de MeOH/MeCN 1:1 durante 22 min. até 100% MeOH/MeCN 1:1 (todos os solventes com 0,1% de ácido fórmico) permanecendo nesta condição por 8 min., voltando-se à condição inicial de eluição em 10 minutos.	38
Figura 31 - Espectros de massas ESI(+) dos picos cromatográficos apresentados pelo extrato bruto de <i>Tedania brasiliensis</i>	39
Figura 32 - Metodologia para preparo e fracionamento inicial do extrato bruto de <i>Tedania brasiliensis</i>	40
Figura 33 - Fracionamento das frações TBA2 e TBA4.	41
Figura 34 - Fracionamento da fração TBA3.	42
Figura 35 - Fracionamento das frações TBA5 e TBA7.	42
Figura 36 - Possíveis estruturas para o composto da fração TBA2F.....	43
Figura 37 - Espectro de massas de alta resolução ESI(-) e espectro ultravioleta para a fração TBA2F.	44
Figura 38 - Espectro de massas de alta resolução ESI(+) da fração TBA2B7.	46
Figura 39 - Estrutura da pseudoceratidina (60).	46
Figura 40 - Correlações observadas no espectro COSY para a estrutura da pseudoceratidina (60).....	47
Figura 41 - Correlações observadas no espectro HMBC para a estrutura da pseudoceratidina (60).....	48

Figura 42 - Espectro de massas de alta resolução ESI(+) do composto puro TBA2B5.	50
Figura 43 - Correlações observadas no espectro COSY para o composto da fração TBA2B5.	50
Figura 44 - Estruturas da 3-desbromopseudoceratidina (62) e da 20- desbromopseudoceratidina (63), isoladas da esponja <i>Tedania brasiliensis</i>	51
Figura 45 - Espectro de massas de alta resolução ESI(+) da fração TBA7A8.....	54
Figura 46 - Estruturas da 4-bromopseudocertidina (63) e 19-bromopseudoceratidina (64)....	55
Figura 47 - Espectro de massas de alta resolução ESI(+) da fração TB35B1.....	57
Figura 48 - Espectros de íons produtos de alta resolução ESI(+) da fração TB3-5B1 em 40 eV.	58
Figura 49 - Espectro de massas de alta resolução ESI(+) da fração TB3-6A.	60
Figura 50 - Estrutura da 4,19-dibromopseudocertidina (65).....	61
Figura 51 - Espectro de massas de alta resolução ESI(+) da mistura das tedamidas A e B (fração TBA2B3).	62
Figura 52 - Estrutura parcial do pirrol substituído, presente nos compostos da fração TBA2B3.	65
Figura 53 - Correlações NOE observadas para as tedamidas A e B.....	65
Figura 54 - Estrutura das tedamidas A (66) e B (67).....	66
Figura 55 - Estrutura dos precursores hipotéticos das tedamidas A e B.....	67
Figura 56 - Espectro de massas de alta resolução ESI(+) da mistura das tedamidas C e D (fração TBA3-3C).....	69
Figura 57 - Estrutura das tedamidas C (70) e D (71).....	71
Figura 58 - Espectro de massas de alta resolução ESI(+) da mistura das tedamidas E e F (fração TBA4B1).	72
Figura 59 - Estrutura das tedamidas E (72) e F (73).....	73
Figura 60 - Espectro de massas de alta resolução ESI(+) da mistura das tedamidas G e H (fração TBA3-1C).....	74
Figura 61 - Estrutura das tedamidas G (74) e H (75).....	75
Figura 62 - Espectros de massas ESI(+) obtidos para os compostos obtidos na reação da acetilação sem catalisador.	76
Figura 63 - Possíveis estruturas de compostos obtidos de reação de acetilação sem catalisador.	77
Figura 64 - Espectro de massas ESI(-) do N^{12} -acetilpseudoceratidina (76).....	78

Figura 65 - Correlações do HMBC dos rotâmeros da N^{12} -acetilpseudoceratidina (76).	79
Figura 66 - Espectro de massas ESI(-) do N^{12} -formilpseudoceratidina (77).	81
Figura 67 - Correlações do HMBC dos rotâmeros do N^{12} -formilpseudoceratidina (77).	82

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Desreplicação abreviada para a fração IbM-HM-F.....	25
Tabela 2 - Locais nacionais e internacionais da coleta do briozoário <i>Amathia verticillata</i>	29
Tabela 3 - Quantificação de 2,5,6-tribromo- <i>N</i> -metilgramina (30) extraída do briozoário <i>Amathia verticillata</i> nos locais coletados.....	34
Tabela 4 - Dados de RMN- ¹ H (600 MHz) e RMN- ¹³ C (150 MHz) do composto (51) e suas correlações HSQC e HMBC.....	37
Tabela 5 - Desreplicação para a fração TBA2F.	43
Tabela 6 - Dados de RMN- ¹ H (400 MHz) e RMN- ¹³ C (100 MHz) da pseudoceratidina (60) e suas correlações COSY, HSQC e HMBC.....	48
Tabela 7 - Dados de RMN- ¹ H (400 MHz) e RMN- ¹³ C (100 MHz) da fração TB-A2B5 (61 e 62) e suas correlações COSY, HSQC e HMBC.....	51
Tabela 8 - Dados de RMN- ¹ H (600 MHz) e RMN- ¹³ C (150 MHz) da fração TBA7A8 (63 e 64).	56
Tabela 9 - Dados de RMN- ¹ H (600 MHz) e RMN- ¹³ C (150 MHz) da fração TBA3-5B1 (64) e suas correlações COSY, HSQC e HMBC.....	59
Tabela 10 - Dados de RMN- ¹ H (600 MHz) e RMN- ¹³ C (150 MHz) da fração TBA3-6A (65).	61
Tabela 11 - Dados de RMN- ¹ H (400 MHz) e RMN- ¹³ C (100 MHz) da fração TBA2B3 (66 e 67) e suas correlações COSY, HSQC e HMBC.....	68
Tabela 12 - Dados de RMN- ¹ H (600 MHz) e RMN- ¹³ C (150 MHz) da fração TBA3-3C (70 e 71).	70
Tabela 13 - Dados de RMN- ¹ H (600 MHz) e RMN- ¹³ C (150 MHz) da fração TBA4B1 (72 e 73).	73
Tabela 14 - Dados de RMN- ¹ H (600 MHz) e RMN- ¹³ C (150 MHz) dos derivados da pseudoceratidina (76) e (77).....	80
Tabela 15 - Resultados de testes de atividade anti-parasitária contra <i>Leishmania (L.) infantum</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i> para os compostos isolados a partir de <i>Tedania brasiliensis</i>	83

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Rota de biossíntese da espermidina (Ado= Adenosyl, APAO= Acetylpolyamine oxidase, ODC= Ornithine descarboxilase, SSAT= Spermidine/spermine <i>N</i> ¹ -acetyltransferase). ⁹²	53
Esquema 2 - Fragmentação do composto 19-bromopseudoceratidina (64) da fração TB3-5B1.	60
Esquema 3 - Oxidação e adição de MeOH do fragmento 4-bromo-1H-pirrol-2-carboxamida.	66
Esquema 4 - Rotação em solução para as tedamidas A (67) e B (68).	67
Esquema 5 - Reação de acetilação da pseudoceratidina (60) com catalisador.....	77

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Ado	Adenosyl (Adenosil)
APAO	Acetylpolyamine Oxidase (Acetil Poliamina Oxidase)
CC ₅₀	Half maximal Cytotoxic Concentration (Concentração Citotóxica 50%)
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
COSY	Correlation Spectroscopy (Correlação espectroscópica)
CV	Coeficiente de variação
δ	Deslocamento químico
DNP	Dictionary of Natural Products (Dicionário de Produtos Naturais)
DMAP	4-dimetil amino piridina
EC ₅₀	Half maximal Effective Concentration (Concentração Efetiva Mediana)
ED ₅₀	Median Effective Dose (Dose Efetiva Mediana)
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector (Detector Evaporativo com Espalhamento de Luz)
ESIMS	Elektrospray Ionization Mass Spectroscopic
HMBC	Heteronuclear Multiple-bond Correlation (Correlação Heteronuclear de Múltipla Ligação)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
HRMS	High-resolution mass spectrometry (Espectrometria de Massas de Alta Resolução)
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Coherence
HSV-1	Vírus da Herpes Simplex tipo I
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration (Concentração inibitória 50%)
J	Constante de acoplamento
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
ODC	Ornithine Descarboxylase (Ornitina Descarboxylase)
PDA	Photodiode Array Detector (Detector de arranjo de diodos)
MS	Mass Spectrometry (Espectrometria de Massas)
RMN- ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN- ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
SSAT	Spermidina/Spermina N ¹ -acetyltransferase
UV	Ultravioleta

RESUMO

O presente projeto de pesquisa teve por objetivo a descoberta de metabólitos secundários potencialmente bioativos contra atividade parasitária e como agentes anti-virais e antibióticos, usando desreplicação como metodologia essencial na seleção e priorização de extratos brutos oriundos de invertebrados, para a descoberta de produtos naturais estruturalmente inéditos.

Foram preparados diversos extratos de invertebrados marinhos a partir de um fracionamento inicial. O desenvolvimento e a aplicação de uma metodologia de desreplicação permitiu a seleção de três organismos de estudo, *Iotrochota birotulata*, *Amathia verticillata*, e *Tedania brasiliensis*. Os extratos destes organismos foram submetidos a diferentes metodologias de fracionamento, isolamento e purificação de substâncias, dependendo dos resultados de desreplicação para cada organismo.

Como resultado do isolamento e identificação de substâncias destes organismos, obteve-se dois compostos já conhecidos na literatura e dezesseis compostos inéditos, dos quais dois são derivados sintéticos. De todos os compostos isolados, a pseudoceratidina, as desbromopseudoceratidinas e as tedamidas A e B apresentaram um índice de seletividade de 243.1, 217.1 e 89.3 respectivamente para *Leishmania (L.) infantum*, e o composto *N*¹²-acetilpseudoceratidina de 23.2 para *Trypanosoma cruzi*, sendo estes resultados muito promissores para a utilização das estruturas destas moléculas como potenciais modelos para o desenvolvimento de farmacos.

Palavras chaves: Desreplicação, Produtos naturais marinhos, *Tedania brasiliensis*, *Amathia verticillata*, *Zoobotryon verticillatum*, *Iotrochota birotulata*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania (L.) infantum*.

ABSTRACT

This research project aimed at the discovery of potentially bioactive secondary metabolites against parasitic activity and as antiviral agents and antibiotics, using dereplication as an essential methodology in the selection and prioritization of crude extracts derived from invertebrates, to the discovery of natural products structurally unpublished.

Various extracts of marine invertebrates from an initial fractionation were prepared. The development and application of a dereplication methodology allowed the selection of three study organisms *Iotrochota birotulata*, *Amathia verticillata* and *Tedania brasiliensis*. The extracts of these organisms were subjected to different methods of fractionation, isolation and purification of substances, depending on the results of dereplication for each organism.

As a result of the isolation and identification of substances of these organisms, it obtained two compounds already known in the literature and unpublished sixteen compounds, two of which are synthetic derivatives. In all isolated compounds, pseudoceratidina, the desbromopseudoceratidinas and tedamidas A and B showed an index of selectivity 243.1, 217.1 and 89.3 respectively for *Leishmania (L.) infantum*, and the compound *N*¹²-acetilpseudoceratidina 23.2 for *Trypanosoma cruzi*, which are very promising results for the use of these molecules as structures potential models for drug development.

Key words: *Dereplication, Marine Natural Products, Tedania brasiliensis, Amathia verticillata, Zoobotryon verticillatum, Iotrochota birotulata, Trypanosoma cruzi, Leishmania (L.) infantum.*

1. INTRODUÇÃO

1.1. Desreplicação: estratégia associada à descoberta de metabólitos secundários bioativos.

O termo “desreplicação” (do inglês, dereplication) foi inicialmente introduzido na literatura científico-acadêmica no início dos anos 90, sendo definido como uma etapa crucial no processo de triagem de extratos brutos, objetivando estabelecer o grau de ineditismo de substâncias presentes nesses extratos, de maneira a se evitar o re-isolamento e determinação estrutural de uma substância que não seja inédita.¹ O processo de desreplicação foi inicialmente utilizado para a busca de substâncias específicas em meios de crescimento de diferentes linhagens de microrganismos, tais como a teleocidina (**1**), a elaiofilina (**2**), e a geldanamicina (**3**) (Figura 1).^{2,3}

Simultaneamente, o termo “dereplication” foi utilizado pela primeira vez em processo de triagem (screening) de extratos com atividade antiviral (anti-HIV) realizado por pesquisadores do National Cancer Institute (NCI).⁴ A partir de então, este termo foi amplamente aceito e utilizado, tanto por pesquisadores da área acadêmica como da iniciativa privada, principalmente no que se refere à indústria farmacêutica.

Figura 1 - Estruturas de primeiras moléculas isoladas por desreplicação.

Já em 1996, pesquisadores da Hoescht e da Lepetit utilizaram técnicas acopladas de LC/MS (ESI) para analisar a presença dos antibióticos teicoplanina, fenelfamicinas e verrucarinas.¹ Zhou e Hamburger desenvolveram um método de desreplicação para a análise simultânea de diversos produtos naturais, utilizando ionização por eletrospray (ESI), no caso de substâncias polares, e ionização química à pressão atmosférica (APCI, atmospheric pressure chemical

ionisation) para a análise de substâncias moderadamente polares, demonstrando ser de ampla aplicação.⁵ Vários sistemas de desreplicação foram desenvolvidos utilizando bioensaios, que incluem substâncias de origem marinha como inibidores de proteínas quinase C,⁶ substâncias oriundas de plantas terrestres com propriedades adoçantes,⁷ extratos de origem natural com atividade anti-HIV,⁸ extratos de organismos terrestres e marinhos com atividade antibacteriana,^{9,10} extratos com atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase,¹¹ extratos com atividade inibidora de ciclo-oxigenases e lipo-oxigenases,¹² substâncias oriundas de plantas com atividade citotóxica,¹³ substâncias com atividade anti-tuberculose,¹⁴ anti-fúngica,¹⁵ e como agentes desestruturadores de membranas de bactérias.¹⁶ Técnicas de desreplicação também foram utilizadas para a busca de classes específicas de produtos naturais, como flavonóides glicosilados,¹⁷ polipeptídeos,¹⁸ limonóides,¹⁹ derivados do ácido cafeólico,²⁰ depsipeptídeos cíclicos,²¹ flavonóides e derivados de flavonóides,²² derivados de taxóides,²³ vitanolídeos citotóxicos,²⁴ sesterterpenos de esponjas marinhas,²⁵ micotoxinas de fungos,²⁶ fitoestrogênios,²⁷ terpenos glicosilados,²⁸ pirroloiminoquinonas de esponjas marinhas,²⁹ isoflavanóides,³⁰ triterpenos pentacíclicos,³¹ alcalóides do tipo 1*H*-benzo-[*de*][1,6]-naftiridínicos de esponjas marinhas do gênero *Aaptos*,³² e derivados macrocíclicos de fungos marinhos.³³

As técnicas de desreplicação incluem a utilização rotineira de técnicas cromatográficas hifenadas, as quais são poderosas ferramentas para a análise preliminar de extratos brutos. Dentre estas, aquelas que utilizam cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas são as mais comumente utilizadas.^{1-3,5,7,10,13,14,17,19,21-24,26-29,31,34-36} Isso porque requerem equipamentos de menor custo quando comparado com aquelas que utilizam ressonância magnética nuclear, além de necessitarem uma menor quantidade de amostra para análise e necessitarem menor tempo de análise. Todavia, diversas técnicas de desreplicação e análise de produtos naturais que utilizam acoplamento de cromatografia líquida com ressonância magnética nuclear (LC/RMN) foram desenvolvidas, apesar do alto custo tanto dos equipamentos para análise quanto da técnica.^{20,25,30,32,37-40}

As técnicas de desreplicação estão continuamente em desenvolvimento no âmbito da pesquisa em produtos naturais, devido à sua versatilidade, rapidez, confiabilidade e reprodutibilidade na análise de extratos brutos, de maneira a prover uma rápida priorização de extratos e substâncias a serem isoladas, evitando-se o re-isolamento de substâncias já conhecidas.^{41,42}

Atualmente se considera que a desreplicação constitui uma etapa absolutamente essencial na descoberta de produtos naturais bioativos estruturalmente inéditos,⁴³ tanto que já existe uma patente sobre o método de desreplicação de produtos naturais.⁴⁴ Sendo assim, o processo de desreplicação na pesquisa e descoberta de produtos naturais deve ser cada vez mais utilizado e aprimorado.^{45,46}

A utilização de análise por HPLC-UV-MS de extratos brutos e/ou frações enriquecidas para a sua desreplicação permite a análise simultânea de substâncias majoritárias presentes nos extratos brutos e frações cromatográficas, segundo o perfil de sua absorção no ultravioleta-visível (UV) e seu espectro de massas. Além de ser uma técnica muito sensível, a análise é rápida e realizada de maneira simultânea para todas as substâncias presentes em extratos ou frações enriquecidas. O procedimento consiste em analisar misturas (extratos brutos e frações enriquecidas) pela aplicação de uma gradiente de eluição em colunas de fase reversa, com o fim de detectar substâncias muito polares (alguns aminoácidos, peptídeos hidrossolúveis, açúcares), polares (outros aminoácidos, nucleosídeos e bases nucleicas), medianamente polares (alguns alcalóides, derivados glicosilados, substâncias polihidroxiladas, outros peptídeos) e apolares (alcalóides lipofílicos, derivados de terpenos, peptídeos lipofílicos, derivados aromáticos, lactonas macrocíclicas, etc.). Desta forma é obtido um perfil químico dos extratos bioativos em função das absorções no UV e espectros de massas de seus constituintes. Finalmente, são selecionados quais dos extratos deverão ser estudados com base na informação em bancos de dados (SciFinder, Dictionary of Natural Products e MarinLit), que contém informações sobre a massa molecular de compostos, bem como sua absorção no UV.

Tal procedimento é amplamente utilizado em programas atuais de descoberta de novas substâncias bioativas naturais, seja de plantas, microrganismos ou animais. Por exemplo, Higgs e colaboradores⁴⁷ desenvolveram um método extremamente rápido (1 minuto) para detectar a presença de metabólitos secundários em extratos de 43 linhagens de actinomicetos utilizando LC-MS, método que também pode ser posteriormente utilizado para otimizar as condições de crescimento e produção de metabólitos por microrganismos. Três novos derivados da saxitoxina, (**4-6**), contendo um grupo hidroxibenzoato foram isolados por monitoramento de LC-MS (Figura 2).⁴⁸ Diversos derivados bromopirrólicos conhecidos (**7-**

11) foram detectados em extratos de uma esponja do gênero *Agelas* utilizando LC-PDA-MS.⁴⁹

Figura 2 - Novas substâncias bioativas naturais isoladas mediante desreplicação.

A investigação química do extrato do actinomiceto *Streptomyces violaceus* TU22 por LC-PDA-MS indicou a presença de metabólitos com padrão de absorção no UV e fragmentação em MS inéditos. O subsequente fracionamento e análise do extrato por LC-RMN, LC-MS/MS, LC-tandem MS e RMN-2D levou à identificação dos metabólitos inéditos granaticina C (**12**), metenaticina A (**13**) e B (**14**) (Figura 3).⁵⁰

Outros autores descreveram uma nova metodologia de screening de extratos brutos, a qual faz uso do acoplamento de cromatografia líquida acoplada com a análise bioquímica (enzimática), denominada HRS (high-resolution screening). Esta nova metodologia de screening foi aplicada à descoberta de compostos que se ligam ao receptor do estrogênio. Quando hifenada com espectrometria de massas, a técnica permitiu a simultânea determinação estrutural dos compostos ativos presentes nos extratos, como por exemplo, o α -zearalanol (**15**) presente no extrato de *Kummerowia stipulacea*,⁵¹ e luteolina, quercetina e kaempferol de *Punica granatum*.⁵²

Nielsen e Smedsgaard,⁵³ desenvolveram um método em micro-escala para a detecção e desreplicação de metabólitos de fungos utilizando LC-PDA-MS. Esta metodologia permitiu

aos autores a elaboração de um banco de dados com 474 metabólitos sem a necessidade da utilização de padrões, utilizando-se somente a análise de padrões de fragmentação por electrospray. Além disso, os autores indicam as melhores condições de análise em função dos possíveis metabólitos presentes, incluindo a obtenção de dados para compostos estruturalmente inéditos.

Figura 3 - Metabólitos inéditos isolados de extratos brutos de fontes naturais utilizando-se desreplicação.

1.2. Descoberta de metabólitos secundários bioativos de organismos marinhos.

A investigação de metabólitos secundários bioativos de organismos vivos, denominada recentemente de biodescoberta (biodiscovery), é considerada a principal porta de descoberta de novos quimiotipos para o desenvolvimento de modelos de fármacos.⁵⁴ Dentre os 24 metabólitos secundários que deram origem a fármacos que passaram a ser comercializados entre 1981 e 2006, 19 foram isolados de micro-organismos de solo e cinco de plantas.⁵⁵

A comercialização de medicamentos tendo por base metabólitos de organismos marinhos foi mais tardia pelo fato do próprio desenvolvimento da pesquisa nesta área ser muito mais recente.⁵⁶ Somente a partir de 2004, quando o Prialt®, desenvolvido a partir de toxina do molusco *Conus magus*, passou a ser comercializado como analgésico, seguido pelo Yondelis®, desenvolvido a partir da ascídia *Ecteinascidia turbinata*, para o tratamento de sarcomas e câncer de ovário, surgiram medicamentos a base de metabólitos de organismos marinhos.⁵⁷

Como uma fração ainda muito pequena dos organismos marinhos foi estudada para o isolamento de metabólitos bioativos, espera-se que o incremento da pesquisa nesta área leve à descoberta de novas entidades químicas que possam servir de modelos para o

desenvolvimento de fármacos. A importância da utilização de abordagens integradas de biologia química, que permitem conhecer os processos bioquímicos envolvidos na produção, armazenamento e utilização destes metabólitos, ressalta a necessidade de se desenvolver projetos mais integrados objetivando uma melhor compreensão de tais processos para a descoberta de substâncias potencialmente úteis em processos biotecnológicos e para desenvolvimento de fármacos.⁵⁸

Outro ponto a se ressaltar é o caráter de fármaco de compostos de produtos naturais de origem marinha, quando se considera o número de violações das regras de Lipinski, que são privilegiadas para a escolha de modelos para o desenvolvimento de novos medicamentos. Tais informações são apresentadas nos gráficos (a) e (b) da Figura 4 que indicam o baixo número de violações das regras de Lipinski para os produtos naturais de origem marinha em geral, particularmente aqueles isolados de *Actinobacteria*, *Ascomycota* e *Ascidacea* (*Chordata*).⁵⁷

Figura 4 - Violações de Lipinski observadas para: (a) Produtos naturais de origem marinha (azul) e para todos produtos naturais (vermelho), (b) Compostos obtidos de organismos pertencentes a diferentes Filos. Azul: número de violações = 0; Vermelho: número de violações = 1; Verde: violação de c_{logP} .⁵⁷

A investigação de macro-organismos marinhos desconhecidos, bem como fontes microbianas pouco exploradas, consideradas muito promissoras do ponto de vista sustentável e de novidade bioquímica, ganhou força. Esforços crescentes vêm sendo feitos para conhecer melhor o potencial metabólico de diferentes grupos de organismos marinhos para a produção de metabólitos secundários. A importância da exploração sustentável destes, não somente é considerada de extrema relevância para o desenvolvimento científico e tecnológico, também é considerada estratégica para o atual desenvolvimento das nações.⁵⁹

Neste projeto, diferentes extratos de invertebrados marinhos foram avaliados em bioensaios de atividade leishmanicida, anti-viral, anti-inflamatória e antibiótica contra micro-organismos patogênicos resistentes a antibióticos. Foram selecionados, por seus resultados nos testes biológicos e por análise preliminar dos extratos por HPLC-UV-MS, os extratos das espécies *Tedania brasiliensis*, *Amathia verticillata* e *Iotrochota birotulata*.

1.3. *Tedania brasiliensis*

1.3.1. O gênero *Tedania*

As esponjas (Filo Porifera), são animais bentônicos sésseis (fixos no substrato). Utilizam células flageladas chamadas coanócitos para promover a circulação da água através de um sistema de canais exclusivo do filo. Esta corrente de água traz partículas orgânicas que são filtradas e digeridas. São geralmente sustentadas por um esqueleto mineral formado por espículas, que são estruturas de sílica ou carbonato de cálcio cujo tamanho pode variar de poucos micrômetros a centímetros. Em algumas espécies, este esqueleto pode ser constituído por calcáreo maciço, classificando-as como esponjas coralinas. Em outras, conhecidas como esponjas córneas, o esqueleto é constituído por fibras de espongina, uma proteína do tipo colágeno.⁶⁰

O gênero *Tedania* apresenta diversas espécies (cerca de 70), das quais apenas as espécies *T. ignis*, *T. anhelans*, *T. digitata* e *T. excavata* foram objeto de investigações sobre os metabólitos secundários presente nas mesmas. A espécie *T. ignis* é conhecida como esponja de fogo, pois o contato da pele com suas espículas provoca a sensação de queimadura.⁶¹ A esponja *T. anhelans* também apresenta a mesma característica, podendo em casos mais graves causar necrose.⁶² Destas espécies, a *T. ignis* foi a mais investigada do ponto de vista químico. A tedanolida A (**16**) (Figura 5) demonstrou ser um composto com uma potente citotoxicidade sobre células de carcinoma de nasofaringe, com ED₅₀= 250 pg/mL, e sobre células de leucemia linfocítica, com ED₅₀= 16 pg/mL.⁶³

Figura 5 - Estrutura da tedanolida A.

A investigação química da esponja *T. anhelans*, encontrada na costa noroeste da Índia, levou ao isolamento de 12 compostos, com destaque à β -carbolina (**17**) (Figura 6).⁶² A investigação química da esponja *T. digitata*, coletada na Austrália, forneceu a 1-metilisoguanosina (**18**), que apresentou atividade anti-inflamatória e antialérgica, em doses de 1 mg/mL.⁶⁴ Já a partir de *T. excavata*, foram relatados treze derivados esteroidais.⁶⁵ A subsequente investigação da esponja *Tedania ignis* forneceu uma série de compostos aromáticos (**19-26**) (Figura 7), mas somente três apresentaram atividade citotóxica moderada.⁶⁶ O tedanol (**27**) (Figura 8), isolado a partir da *Tedania ignis*, apresentou uma potente atividade anti-inflamatória.⁶⁷ O mesmo grupo de pesquisa isolou mais dois compostos a partir da mesma esponja, denominados tedarena A (**28**) e B (**29**) (Figura 9).⁶⁸

Figura 6 - Compostos isolados de *Tedania* (**17**) β -carbolina e (**18**) 1-metilisoguanosina.

Figura 7 - Metabólitos secundários aromáticos isolados de *Tedania ignis*.

Figura 8 - Estrutura do tedanol.

Figura 9 - Estruturas das tedarenas A (**28**) e B (**29**).

1.3.2. A esponja *Tedania brasiliensis*.

A esponja *Tedania brasiliensis* (Figura 10) foi descrita pela primeira vez por Mothes e colaboradores,⁶⁹ e sua classificação taxonômica é apresentada na Figura 11. A esponja é vermelha-rosada intensa, de forma maciça recobrindo o substrato, com até 10 cm de comprimento e 2 cm de espessura, com pequenas elevações vulcaniformes, com ósculos de até 8 mm de diâmetro. Esta esponja é rara e geralmente fotófila, sendo encontrada em substratos duros próximos ao fundo arenoso, de 3 a 54 m de profundidade.

T. brasiliensis é relativamente comum no estado de São Paulo (Ilhabela e arquipélago de Alcatrazes), no estado do Rio de Janeiro (Arraial do Cabo, Búzios, Cabo de São Tomé) e no estado da Bahia.⁶⁹ Como não existem relatos de investigações químicas de metabólitos da esponja *T. brasiliensis*, e o extrato bruto desta esponja apresentou boa atividade anti-viral, esta espécie foi selecionada para realizar o isolamento e a identificação de metabólitos com atividade biológica.

Figura 10 - Esponja *Tedania brasiliensis*. Foto: Cortesia do prof. Eduardo Hajdu.

Figura 11 - Taxonomia da esponja *Tedania brasiliensis*.

Filo: Porifera
Classe: Demospongiae
Ordem: Poecilosclerida
Família: Tedaniidae
Gênero: *Tedania*
Espécie: *Tedania brasiliensis*

1.4. *Amathia verticillata* (= *Zoobotryon verticillatum*)

1.4.1. O gênero *Amathia*

Os briozoários ou "animais-musgo" (Bryozoa - do grego bryon, musgo + zoon, animal), pertencem ao filo Ectoprocta (do grego ektos, externo + proktos, ânus), que é um dos grupos de invertebrados mais diversos, abundantes e complexos. Devido à sua fragilidade e seu pequeno tamanho, tendem a ser menos familiares do que outros grupos zoológicos. O fato dos ectoproctos serem pseudocelomados e possuírem o ânus localizado no interior da coroa de tentáculos, separa os briozoários dos ectoproctos, porque os briozoários possuem o ânus fora do círculo de tentáculos. Estes estão frequentemente em rochas sedimentares carbonáticas, e são animais coloniais, sésseis e cosmopolitas. Esses organismos distribuem-se em todas as profundidades e latitudes no ambiente marinho sendo, porém, mais comuns nas águas rasas de mares tropicais. Habitam preferencialmente águas límpidas, e alimentam-se de micro-organismos planctônicos (diatomáceas e radiolários). Existem cerca de 5.500 espécies viventes e 15.000 fósseis descritas.

O filo Bryozoa é dividido em três classes: a Phylactolaemata, Gymnolaemata e Stenolaemata. A classe Gymnolaemata é quase completamente marinha, e inclui a grande maioria dos briozoários vivos, bem como muitas espécies fósseis. A classe Phylactolaemata restringe-se à água doce e, embora se distribua amplamente, contém somente cerca de 50 espécies.⁷⁰

Os briozoários são consumidos por uma grande variedade de invertebrados, como nudibrânquios. Suas colônias são colonizadas por muitos invertebrados sésseis, inclusive outros briozoários. Foram registradas 346 espécies de briozoários marinhos no Brasil, e representam aproximadamente 6,3% do total do número de espécies de briozoários conhecidas no mundo.⁷⁰ Embora a quantidade de pesquisas realizadas com metabólitos secundários de briozoários seja pequena quando comparado com outros invertebrados

marinhos, estes animais são uma excelente fonte de compostos novos e biologicamente ativos.⁷¹

1.4.2. O briozoário *Amathia verticillata*

Amathia verticillata (Delle Chiaje, 1828), vulgarmente conhecida como o briozoário spaghetti, é uma espécie colonial com uma estrutura parecida a um arbusto (Figura 12) e sua classificação taxonômica é apresentada na Figura 13. É encontrado em águas temperadas, rasas e quentes no oeste do Oceano Atlântico e do Mar do Caribe, e se espalhou pelo mundo como um organismo de incrustação, sendo considerado como uma espécie invasora em alguns países. Frequentemente é encontrado em regiões de portos e fazendas de peixes.

Figura 12 - Briozoário *Amathia verticillata*. Foto: Cortesia de Daniel Stoupin.

O briozoário *Amathia verticillata* chamado até julho do ano 2015 como *Zoobotryon verticillatum*,⁷² é conhecido por conter alcalóides indólicos bromados como a 2,5,6-tribromo-*N*-metilgramina (**30**), que é uma substância de defesa do animal.⁷³ Sato e Fenical,⁷⁴ realizaram a primeira investigação química realizada com este briozoário, quando publicaram a estrutura da 2,5,6-tribromo-*N*-metilgramina (**30**) e seu correspondente *N*-óxido (**31**) (Figura 14). Ortega e colaboradores,⁷⁵ continuaram o trabalho com o briozoário e isolaram outros alcalóides indólicos (Figura 15), junto com os compostos que já tinham sido isolados anteriormente (**32-37**). Os compostos (**34**), (**36**) e (**37**), apresentaram uma diminuição nas larvas de *Pluteus* sp. em concentrações maiores de 10 µg/mL.

Figura 13 - Taxonomia do briozoário *Amathia verticillata*.

Filo: Bryozoa Classe: Gymnolaemata Ordem: Ctenostomata Família: Vesiculariidae Gênero: <i>Amathia</i> Espécie: <i>Amathia verticillata</i>

Figura 14 - 2,5,6-tribromo-*N*-metilgramina e seu correspondente *N*-óxido.

Figura 15 - Compostos isolados a partir de *Amathia verticillata*.

1.5. *Iotrochota birotulata*

A esponja *Iotrochota birotulada* (Figura 16), ou esponja de dedos verdes (Higgins, 1977) com classificação taxonômica apresentada na Figura 17, tem ramos grossos verticais com uma superfície conulose total ou parcialmente suave. O comprimento dos ramos é de até 50 cm, o diâmetro é 1-5 cm, com consistência dura, incompressível. O habitat desta esponja é geralmente em recifes, debaixo das pedras em baías rasas e de águas mais profundas além dos recifes.

A esponja *Iotrochota birotulata* apresentou metabólitos com halogênios derivados da tirosina (**38-40**) (Figura 18), geralmente característicos para espécies de esponjas da ordem Verongida, à qual *I. birotulata* não pertence.⁷⁶ Marquez e colaboradores,⁷⁷ isolaram o composto (**38**) partir da esponja *Iotrochota birotulata*. Este foi testado contra três linhagens celulares de tumores humanos, incluindo os de pulmão (A-549), cólon (HT29) e mama

(MDA-MB-231), nas concentrações de 1 µg/mL, 5 µg/mL e 25 µg/mL. Os resultados dos bioensaios indicaram que o composto (**38**) inibiu totalmente o crescimento da linhagem de células A549 a 25 mg/mL, e apresentou inibição total do crescimento das linhagens de células de tumor de cólon e mama nas três concentrações avaliadas.

Figura 16 - Esponja *Iotrochota birotulata*. Foto: The Sponge Guide www.spongeguide.org.

Figura 17 - Taxonomia da esponja *Iotrochota birotulata*.

Filo: Polifera Classe: Demospongiae Ordem: Poecilosclerida Família: Iotrochotidae Gênero: <i>Iotrochota</i> Espécie: <i>Iotrochota birotulata</i>

Figura 18 - Metabólitos halogenados isolados a partir de *Iotrochota birotulata*.

Estes e muitos mais compostos já foram isolados de *Iotrochota birotulata*, mas eles serão discutidos adiante, nos resultados do projeto.

2. OBJETIVOS

Considerando-se:

- a) a necessidade de se continuar o investimento em esforços para a descoberta de produtos naturais potenciais modelos para o desenvolvimento de fármacos, e;
- b) a já considerável diversidade de metabólitos secundários bioativos conhecidos.

Este projeto tem por objetivos:

1. Selecionar extratos de invertebrados marinhos oriundos da costa do Brasil, que apresentaram atividade em bioensaios de atividade anti-viral, anti-Leishmania e anti-Chagas, utilizando-se metodologia de desreplicação por HPLC-UV-MS;
2. Realizar o isolamento e identificação de metabólitos secundários presentes nos extratos bioativos selecionados após análise e desreplicação por HPLC-UV-MS;
3. Avaliar as atividades biológicas dos metabólitos isolados, sempre que estejam disponíveis em quantidade suficiente para tal.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3. Parte Experimental

3.1. Técnicas espectroscópicas

3.1.1. Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos utilizando-se um aparelho Bruker DRX 400 (9,4 Tesla), operado a 400,35 MHz na frequência do hidrogênio (^1H) e a 100,10 MHz na frequência do carbono (^{13}C) no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (DQ-UFSCar). Também foi utilizado um espectrômetro da Bruker AV-600 com um criossonda de 5 mm, operando a 600 MHz para hidrogênio (^1H) e 150 MHz para carbono (^{13}C). As amostras para estas análises foram preparadas utilizando-se solventes deuterados de marca Cambridge Isotopes: metanol deuterado ($\text{MeOH-}d_4$), acetonitrila deuterada ($\text{MeCN-}d_3$) e dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$). O padrão usado como referência interna foi o trimetilsilano (TMS).

3.1.2. Espectrometria de Massas

Para a obtenção dos espectros de massas de baixa resolução foi utilizado um sistema cromatográfico de marca Waters que consiste em um sistema de controle Alliance modelo Waters 2695 acoplado com detector espectrofotométrico UV-visível modelo Waters 2696 com detector de arranjo de fotodiodos também acoplado a um detector espectrofotométrico de massas modelo Waters Micromass ZQ 2000 operado utilizando plataforma Empower. Os compostos puros foram analisados em espectro de massas de alta resolução LTQ Orbitrap velos da Thermo Scientific com fonte de ionização electrospray em modo positivo. Também foi utilizado um espectrômetro de massas com sistema híbrido quadrupolo/tempo-de-voo, modelo Microtof-QII (Bruker Daltonics) com o kit de calibrantes padrão Bruker.

3.2. Técnicas Cromatográficas

3.2.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

Para a análise qualitativa por cromatografia em camada delgada CCD, foram utilizadas cromatofolhas de sílica-gel 60 sobre poliéster com indicador ultravioleta F254 20 x 20 cm (Aldrich). As cromatofolhas foram reveladas por inspeção sob luz ultravioleta (UV), com

lâmpada Spectroline modelo ENF-240 C/FE nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm. Além disso, também foram utilizados os seguintes reagentes como reveladores:

1. Solução de 0,2 g de ninidrina em 100 mL de EtOH P.A., aquecendo-se a placa em seguida por 5 minutos em chapa aquecedora a 120°C, para identificação qualitativa de aminoácidos e aminas primárias.
2. Solução de 20% de ácido fosfomolibdico em EtOH P.A., aquecendo-se a placa em seguida por 5 minutos em chapa aquecedora a 120°C, para identificação qualitativa de substâncias redutoras.
3. Solução do reagente de Dragendorff, preparado da seguinte maneira: a) solução A: 0,85 g de nitrato básico de bismuto em 10,0 mL de ácido acético glacial e 40 mL de água; b) solução B: 8,00 g de iodeto de potássio dissolvido em 20 mL de água. Misturou-se as soluções A e B em proporções volumétricas iguais (1:1) resultando em uma solução estoque. Para o preparo do reagente de Dragendorff, 1 mL da solução estoque foi diluída em 2,0 mL de ácido acético glacial e 10,0 mL de água), para identificação qualitativa de alcalóides.

3.2.2. Cromatografia em colunas pré-empacotadas

Separações cromatográficas realizadas em colunas pré-empacotadas de marca Waters Sep-Pak vac 35 cc ou de marca Phenomenex Strata, com diferentes quantidades de fase estacionária (2,0 g, 5,0 g ou 10,0 g), foram realizadas de acordo com os seguintes procedimentos:

1. Para amostras contendo substâncias essencialmente polares, solúveis em água, foram utilizadas colunas pré-empacotadas com sílica-gel derivatizada com grupos octadecilsilano (C₁₈) como fase estacionária.
2. Para amostras contendo misturas de substâncias polares e apolares, foram utilizadas colunas pré-empacotadas com sílica-gel derivatizada com grupos cianopropila como fase estacionária.
3. Para amostras contendo misturas de substâncias apolares, foram utilizadas colunas pré-empacotadas com sílica-gel como fase estacionária.

O procedimento geral destas separações consiste em diluir a amostra em menos de 1 mL de solvente e aplicar na coluna pre-empacotada já condicionada com um eluente utilizando um manifold para a eluição sob vácuo. Antes da coluna secar adiciona-se o solvente continuamente e as frações são simultaneamente coletadas.

3.2.3. Cromatografia de permeação em gel

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

3.2.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os equipamentos utilizados nas separações por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram:

1. 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 Waters 2487, operado utilizando o software Empower;
2. Sistema cromatográfico Waters, com sistema de controle Alliance modelo Waters 2695 acoplado com detector espectrofotométrico UV-Visível modelo Waters 2996 com detector de arranjo de fotodiodos (varredura entre λ_{max} 200 a 800 nm) acoplado em série com um detector de espalhamento de luz modelo Waters 2424 (Evaporative Light Scattering Detector - ELSD), por sua vez acoplado em série com um detector de espectrometria de massas (MS) modelo Waters Micromass ZQ.

Para as separações cromatográficas por CLAE foram utilizadas as seguintes colunas:

- a) Coluna C₁₈ CSC-Inertsil 150 Å/ODS 2 de dimensões 250 x 9,4 mm e partículas de 5 µm;
- b) Coluna C₁₈ Inertsil ODS 3 de dimensões 250 x 4,6 mm e partículas de 5 µm;
- c) Coluna XTerra® RP₁₈ de dimensões 250 x 4,6 mm e partículas de 5 µm;
- d) Coluna XTerra® MS C₁₈ de dimensões 50 x 2,1 mm e partículas de 3,5 µm.

3.3. Evaporação, secagem e armazenamento de extratos, frações e substâncias purificadas

Extratos, frações e substâncias purificadas contendo MeOH, MeCN, H₂O ou DMSO para solubilizar amostras foram secas em sistema de centrífuga a vácuo Savant modelo Speedvac Plus SC 210. Frações contendo solventes voláteis (AcOEt, hexano, *i*-PrOH, CH₂Cl₂) foram

secas em um evaporador rotativo. Todos os extratos, frações e substâncias puras foram completamente secas com vácuo em dessecador e bomba de vácuo, e armazenadas em refrigerador a 4°C.

3.4. Solventes

Os solventes utilizados nas análises por CCD, e separações por cromatografia em Sephadex LH-20 ou em colunas pré-empacotadas foram todos de grau analítico (P.A.). Para as separações por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foram utilizados solventes de grau cromatográfico (J.T. Baker e Panreac). A água utilizada em todas as cromatografias foi purificada em um sistema Milli-Q Millipore equipado com resina de troca iônica e filtro biológico.

3.5. Protocolos dos bioensaios

3.5.1. Determinação in vitro da atividade antiparasitária e da concentração efetiva 50% (EC₅₀) para morte de parasitas *Leishmania (L.) infantum* e *Trypanosoma cruzi*

Estes bioensaios foram realizados no Instituto Adolfo Lutz (São Paulo) por o Dr. André Tempone.

3.5.1.1. Manutenção do parasita

O parasita *Leishmania chagasi* (MHOM/BR/1972/LD), foi mantido em hamsters dourados infectados. Aproximadamente 60-70 dias pós-infecção, amastigotas foram obtidos por centrifugação diferencial a partir de baços triturados destes hamsters. Promastigotas isolados foram mantidos em M-199 suplementado com 10% (v/v) de soro de vitela e 0,25% (v/v) de hemina a 24°C, de acordo com metodologia descrita na literatura.⁷⁸

3.5.1.2 Atividade leishmanicida

A atividade leishmanicida contra *L. chagasi* foi determinada utilizando-se a pentamidina como padrão positivo. Promastigotas foram contados em uma câmara de Neubauer, e semeados a 1×10^6 células/poço em microplacas de 96 poços. Amostras de extratos, frações ou substâncias puras foram incubadas em concentrações de 488 a 500 µg/mL, durante 48 horas a 24°C. A viabilidade do parasita foi determinada utilizando-se o método de MTT, medido em espectrofotômetro em λ_{max} 570 nm. A atividade leishmanicida contra amastigotas foi determinada com macrófagos infectados, usando antimônio pentavalente como padrão. A

carga parasitária foi definida como a média do número de amastigotas por macrófago de 500 células. Detalhes da metodologia experimental são descritos na literatura.⁷⁸

3.5.1.3. Atividade Tripanossomicida

Parasitas *Trypanosoma cruzi* livres foram obtidos a partir de culturas de células LLC-MK2. Estes parasitas foram contados em uma câmara de Neubauer, e semeados a 1×10^6 células/poço em microplacas de 96 poços. Os parasitas foram incubados a uma concentração de 100 ng/mL, durante 24 horas a 37°C, numa atmosfera de 5% de CO₂, em incubadora umidificada. O fármaco benzonidazol foi utilizado como padrão positivo. A viabilidade de tripomastigotas de *T. cruzi* foi avaliada na conversão celular do sal solúvel tetrazolium MTT para o sal insolúvel formazana por enzimas mitocondriais. A extração de formazana foi realizada com 10% (v/v) de SDS durante 18 horas (100 µL/poço), a uma temperatura de 24°C. Detalhes desta metodologia encontram-se descritos na literatura.⁷⁸

4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS, RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os estudos de desreplicação foram feitos para diversos organismos marinhos, dentre os quais as esponjas *Agelas díspar*, *Amphimedon compressa*, *Clathria* sp., *Dysidea* sp., *Ecionemia* sp., *Hyrtios* sp., *Iotrochota birotulata*, *Tedania brasiliensis*, a ascídia *Didemnum ligulum* e o briozoário *Amathia verticillata*. Porém, neste trabalho estarão especificados os resultados de três espécies onde a aplicação de metodologia de desreplicação resultou na obtenção de dados fidedignos para o posterior estudo das espécies seleccionadas.

Os organismos marinhos em foco nesse trabalho, as esponjas *Iotrochota birotulata* e *Tedania brasiliensis* bem como o briozário *Amathia verticillata*, foram manipulados de maneira diferente dependendo dos resultados de desreplicação, que serão mostrados a seguir:

4.1. Estudo de desreplicação do extrato da esponja *Iotrochota birotulata*

O extrato bruto desta esponja apresentou atividade anti-viral. Após uma separação preliminar por cromatografia em coluna de fase reversa C₁₈, as frações obtidas foram analisadas por HPLC-UV-ELSD-MS, de maneira a se verificar a ocorrência de substâncias conhecidas ou não no extrato bruto desta esponja.

4.1.1 Coleta e preparação das amostras da esponja *Iotrochota birotulata*

A esponja *Iotrochota birotulata* foi coletada na Bahia no ano de 2007. Para avaliação em testes de atividade biológica a esponja foi sonicada por 30 minutos em metanol, seguido de uma filtração, e o extrato foi evaporado em sistema de alto vácuo. Após o preparo do extrato, alíquotas de 2 mg foram enviadas para ensaios biológicos. O extrato MeOH apresentou atividade antiviral contra o vírus BVDV, com IC₅₀ de 40%.

O extrato MeOH foi desengordurado por uma partição líquido-líquido com hexano. Foram obtidos 291,4 mg de extrato metanólico. Este extrato foi submetido a uma extração em fase sólida usando uma coluna C₁₈ e três eluentes: H₂O, H₂O/MeOH(1:1) e MeOH (Figura 19).

A fração aquosa apresentou uma quantidade muito grande de sais inorgânicos e foi descartada. A segunda fração (H₂O/MeOH(1:1)), foi submetida a uma separação por HPLC, usando-se um gradiente de H₂O e MeOH/MeCN 1:1, iniciando-se em 100% H₂O até 100% da mistura de MeOH/MeCN (1:1), com todos os solventes contendo 0,1% de ácido fórmico.

Desta separação foram obtidas sete frações (A-G), as quais foram analisadas em HPLC-UV-ELSD-MS junto com a fração MeOH 100% obtida a partir da extração em fase sólida.

Figura 19 - Fluxograma de fracionamento do extrato bruto da esponja *Iotrochota birotulata*.

Cada uma das frações foi submetida à análise por desreplicação. Dentre as frações obtidas desta separação, as frações IbM-HM-A, IbM-HM-B, IbM-HM-D e IbM-Me não apresentaram compostos de interesse (massa molecular maior de 220 Da e absorções no UV distintas de nucleosídeos e aminoácidos comuns), pois não apresentaram picos cromatográficos que evidenciassem a presença de metabólitos secundários, enquanto as amostras IbM-HM-C, IbM-HM-E, IbM-HM-F e IbM-HM-G apresentaram vários picos que serão analisados a seguir.

4.1.2. Desreplicação das frações da esponja *Iotrochota birotulata*

- **IbM-HM-C**

Nesta fração foi observado um pico com um espectro de massas ESI(+) com sinal em m/z 193,9 e absorbância máxima em 215 e 268 nm. Este composto já havia sido isolado da esponja *I. birotulata* e corresponde à estrutura (41) da Figura 20.⁷⁹

- **IbM-HM-E**

Esta fração apresentou um pico principal no cromatograma de HPLC-UV-MS, que possui um perfil correspondente a um composto com um átomo de bromo em sua estrutura, já que apresenta sinais de íons $[M+H]^+$ em m/z 280,0 e 281,9 (1:1), além de um espectro de ultravioleta com absorbância máxima em 221, 263 e 286 nm. Este composto (**42**) também já foi previamente isolado de *I. birotulata*.⁸⁰

Figura 20 - Compostos conhecidos detectados nas frações IbM-HM-C, IbM-HM-E, IbM-HM-F e IbM-HM-G, obtidas do extrato de *Iotrochota birotulata*.

- **IbM-HM-F**

Esta fração apresentou uma mistura de compostos já conhecidos e desconhecidos de *Iotrochota birotulata*. O primeiro sinal é similar ao composto encontrado na fração anterior, e corresponde a um alcalóide isolado a partir de *I. birotulata* com massa molecular de 264,1 (Figura 20 (**43**)).⁷⁹ Observou-se também um perfil de composto tribromado com massas no ESI(+) em m/z 471,9/473,8/475,9/477,8 de intensidade relativa 1:3:3:1. Este composto já foi relatado para *Iotrochota* e é conhecido como a purpuroina A (Figura 20 (**44**)).⁸¹

Outros sinais do cromatograma desta fração, obtido após análise por HPLC-UV-ELSD-MS, indicaram a presença de compostos ainda não relatados para este organismo (após pesquisa detalhada nos bancos de dados SciFinder e Dictionary of Natural Products).

Os espectros de massas ESI(-) dos compostos aparentemente desconhecidos são apresentados na Figura 21. Contudo, a pequena disponibilidade de massa desta fração (1,1 mg) impediu sua investigação objetivando o isolamento e identificação destes metabólitos bromados.

Todos os compostos detectados na fração IbM-HM-F apresentaram um perfil isotópico particular para moléculas bromadas. Os espectros de massas no modo negativo em m/z 348,9/350,9 de intensidade relativa 1:1 (Figura 21(a)) e m/z 359,9/361,9 de intensidade

relativa 1:1 (Figura 21 (c)), correspondem a compostos com um átomo de bromo na sua estrutura. Também se observou um perfil de composto dibromado em m/z 430,9/433,0/434,9 de intensidade relativa 1:2:1 (Figura 21(b)).

Figura 21 - Espectros de massas ESI(-) para compostos desconhecidos da fração IbM-HM-F de *Iotrochota birotulata*.

Depois de se analisar estes três compostos por desreplicação nas bases de dados (Dictionary of Natural Products), considerando-se na busca o número de átomos de bromo na estrutura e uma faixa de massa exata possível para o composto (Tabela 1), encontrou-se os seguintes compostos já conhecidos na literatura:

Tabela 1 - Desreplicação abreviada para a fração IbM-HM-F.

Fração (composto)	Busca nas bases de dados	Fórmula molecular	Massa exata
IbM-HM-F (a)	Bromos = 1	$C_{14}H_{15}BrN_4O_2$	350.06
	M. exata = 349.5-350.5	$C_{18}H_{23}BrO_2$	350.10
IbM-HM-F (b)	Bromos = 2	$C_{15}H_{18}Br_2N_2O_3$	432.01
	M. exata = 431.5-432.5	$C_{18}H_{26}Br_2O_2$	432.07
IbM-HM-F (c)	Bromos = 1 M. exata = 360.5-361.5	$C_{18}H_8BrN_3O$	361.00

A quantidade de compostos que apresentam a massa molecular e número de átomos de bromo é maior do que apresentado na tabela 1, já que outro parâmetro foi utilizado na busca destes resultados. Dentre os resultados obtidos, foram observadas moléculas que também continham em sua estrutura átomos de cloro. Como é bem conhecido, o padrão de intensidade relativa para compostos que tem átomos de bromo e cloro na mesma estrutura é mais complexa do que foi observado nos espectros da Figura 21. Desta forma, estes compostos foram retirados da lista.

Depois de já ter a lista de possíveis compostos das frações reduzida, passou-se analisar estas estruturas. Para os compostos (a) e (b), foram encontradas como possíveis fórmulas moleculares $C_{18}H_{23}BrO_2$ e $C_{18}H_{26}Br_2O_2$. Estas estruturas correspondem a ácidos graxos e, pela extração realizada (Figura 19), é muito improvável que esta classe de moléculas esteja na fração IbM-HM-F.

Analisando-se o primeiro composto (a) desta fração, com fórmula molecular $C_{14}H_{15}BrN_4O_2$, encontrou-se dois compostos conhecidos já isolados de esponjas; o primeiro isolado de *Trorectandra* sp.⁸² e o segundo da esponja *Trachycladus laevispirulifer*,⁸³ compostos (**46**) e (**47**) respectivamente (Figura 22).

As estruturas já conhecidas com massas moleculares (b) $C_{15}H_{18}Br_2N_2O_3$ e (c) $C_{18}H_8BrN_3O$ corresponderiam aos compostos (**48**) e (**49**), já isolados do briozoário *Amathia wilsoni* e da ascidia *Leptoclinides* sp. respectivamente.^{84,85}

Figura 22 - Compostos com as mesmas fórmulas moleculares da fração IbM-HM-F.

Os compostos da fração IbM-HM-F nunca foram relatados anteriormente para *Iotrochota birotulata*, e podem corresponder aos citados na figura 22 baseados na busca por desrepliação, assim como podem ser compostos totalmente inéditos. Essa possibilidade só

pode ser verificada mediante o isolamento de cada um desses compostos, a qual não foi possível nesse trabalho pelo fato de só ter obtido 1,1 mg desta fração.

- **IbM-HM-G**

Nesta fração foram encontrados dois compostos, um composto ainda não reportado na literatura, após pesquisa nos bancos de dados SciFinder e Dictionary of Natural Products (DNP), e um já conhecido.

O composto conhecido, a partir da análise desta fração, é o éster etílico do ácido 6-bromo-1H-indol-3-carboxílico (composto **(45)** da figura 20), composto já isolado de *I. birotulata*, e também isolado a partir das esponjas *Mycale fibrexilis* e *Pleroma menoui*.⁸⁶ Este composto apresenta dois sinais de íons $[M+H]^+$ em m/z 268,1/270,0 (1:1) e $\lambda_{\max}$ em 223 e 282 nm.

Também foi detectado um composto de interesse, pois não se encontram registros do mesmo na literatura. O espectro de massas em modo negativo deste composto desconhecido, apresentado na Figura 23, apresentou sinal de m/z 445,0/447,0/448,9 de intensidade relativa 1:2:1 que corresponde a um composto com dois átomos de bromo na sua estrutura. Comparando-se com a fração anterior (IbM-HM-F (b)), estes sinais estão diferenciados provavelmente por um grupo metilênico adicional na sua estrutura.

Figura 23 - Espectros de massas ESI(-) para o composto desconhecido da fração IbM-HM-G de *Iotrochota birotulata*.

A análise destas informações nas bases de dados (DNP), permitiu verificar a presença de um composto com fórmula molecular $C_{16}H_{20}Br_2N_2O_3$ isolado também do briozoário *Amathia wilsoni*,⁸⁴ correspondente ao composto **(48)** da fração anterior, com a adição um grupo metil no nitrogênio 1 da estrutura **(50)**, como é apresentado na figura 24.

Um composto com essa massa também nunca foi isolado da esponja *I. birotulata*. Este pode ser o composto (**50**) isolado já de outro organismo, mas também poderia ser uma estrutura inédita na literatura. Análises futuras para este organismo poderiam ser promissoras na busca daqueles compostos minoritários ainda desconhecidos.

Figura 24 - Composto com a mesma fórmula molecular da fração IbM-HM-G.

Estes resultados obtidos da análise de frações do extrato bruto da esponja *I. birotulata* ilustram de maneira clara a importância em se realizar análises eficazes de desreplicação que permitam obter informações sobre compostos que estejam presentes em extratos de organismos vivos que produzem e/ou acumulam metabólitos secundários. Como ilustrado na introdução deste projeto, atualmente o grau de redundância no isolamento de produtos naturais é muito grande. Por isso, é absolutamente imprescindível se desenvolver estratégias de trabalho que minimizem tais redundâncias, e reduzam ao máximo a perda de tempo e recursos na obtenção de resultados de pouca ou nenhuma importância.

4.2. Estudo químico do Briozoário *Amathia verticillata*

Este organismo já foi estudado anteriormente por Pereira *et al.*⁸⁷ O objetivo inicial deste capítulo foi verificar a presença da 2,5,6-tribromo-*N*-metilgramina (**30**) em espécimes de *A. verticillata* coletada em diferentes localidades de diferentes países. No entanto, a aplicação de metodologia de desreplicação contribuiu no processo na descoberta de um composto inédito dando um valor adicional ao trabalho desenvolvido.

4.2.1. Procedimento Experimental

4.2.1.1. Coleta das amostras do briozoário *Amathia verticillata*

Trinta amostras do briozoário *Amathia verticillata* foram obtidas em quinze localidades diferentes, das quais vinte e quatro foram coletadas no Brasil (estados da Bahia, Ceará, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Santa Catarina e São Paulo) e seis amostras na Austrália, Estados Unidos e Itália (Tabela 2).

Tabela 2 - Locais nacionais e internacionais da coleta do briozoário *Amathia verticillata*.

Estado/Pais	Localização	# de coletas
Bahia / Brasil	Salvador	1
Ceara / Brasil	Marina park, Fortaleza	2
Rio Grande do Norte / Brasil	Praia da Redinha Velha, Natal	2
Rio de Janeiro / Brasil	Arraial do Cabo	1
Rio de Janeiro / Brasil	Cabo Frio	2
Santa Catarina / Brasil	Porto Belo	1
São Paulo / Brasil	Praia do Araçá, São Sebastião	2
São Paulo / Brasil	Praia do Cabelo Gordo, São Sebastião	5
São Paulo / Brasil	São Vicente	1
São Paulo / Brasil	Yatch Club, Ilhabela	7
Queensland / Austrália	TSV Boat Club Marina, Townsville	1
The New South Wales / Austrália	Coon Island	1
Flórida / EUA	Little Jim Island Fish Camp dock, Fort Pierce	2
Flórida / EUA	Peacock's Pocket	1
Ligúria / Itália	La Spezia	1

4.2.1.2. Extração e quantificação da 2,5,6-tribromo-*N*-metilgramina em amostras de *Amathia verticillata*

A extração das amostras de *A. verticillata* foi realizada segundo método previamente descrito.⁸⁷ Espécimes do briozoário preservados em EtOH foram removidos do solvente e re-extraídos com 50 mL de MeOH em banho de ultrassom por dois minutos, permanecendo em repouso durante uma hora. Após filtração do solvente, repetiu-se este procedimento mais duas vezes. Os 150 mL de MeOH da extração foram reunidos com o EtOH de preservação do animal, e o solvente foi evaporado até redução do volume para aproximadamente 50 mL.

A suspensão hidroalcoólica foi submetida a uma partição líquido-líquido com hexano (4 x 50 mL). O extrato metanólico foi analisado por HPLC-UV-MS, utilizando-se uma coluna Waters X-Terra MS C₁₈, 2,1 x 50 mm e partículas de 3,5 µm. Como eluente foi utilizado um gradiente de MeOH em H₂O (início em MeOH/H₂O 2:8, curva linear), e fluxo de 0,5 mL/min. A detecção por espectrometria de massas foi realizada com o detector ajustado com 25 V de voltagem do cone, em modo ESI(+), observando-se um sinal no cromatograma que apresentou em seu espectro de massas um padrão isotópico de molécula protonada [M+H]⁺ em *m/z* 422,8/424,8/ 426,8/428,8 de intensidade relativa 1:3:3:1 (composto **30**).

A separação também foi monitorada usando detector de arranjo de diodos. O pico correspondente à 2,5,6-tribromo-*N*-metilgramina (**30**) aparece em 6,05 minutos com λ_{max} 254 nm (Figura 25).

Além do pico referente à 2,5,6-tribromo-*N*-metilgramina, procurou-se detectar derivados relacionados a este composto. Observou-se um pico em 5,6 minutos muito pequeno (Figura 25) e no espectro de massas ESI(+) apresentou sinais em *m/z* 345,0/346,9/349,0, com proporção 1:2:1, indicando um composto com dois átomos de bromo (Figura 26).

As amostras que apresentaram o composto desconhecido foram principalmente oriundas de Cabo Frio, estado do Rio de Janeiro. Todas as outras amostras apresentaram somente a 2,5,6-tribromo-*N*-metilgramina ou nenhum dos dois compostos. A quantificação da 2,5,6-tribromo-*N*-metilgramina nas amostras de *A. verticillata* foi realizada de acordo com a metodologia a seguir.

Figura 25 - Cromatograma do extrato metanólico do briozoário *Amathia verticillata*.

Figura 26 - Espectros de massas ESI(+) e ultravioleta dos derivados bromados da *N*-metilgramina presentes no extrato metanólico do briozoário *A. verticillata*. (A) composto desconhecido com dois bromos, (B) 2,5,6-tribromo-*N*-metilgramina

4.2.1.3. Validação da metodologia de quantificação do composto 2,5,6-tribromo-*N*-metilgramina

A validação da metodologia foi feita realizando as análises de linearidade, limite de quantificação (LQ), limite de detecção (LD), precisão (ensaios intra-dia e inter-dias) e robustez. Estes experimentos permitiram que a quantificação do analito se mantivesse sempre dentro de uma determinada faixa de concentração, conhecendo-se o menor nível de detecção, a quantidade mínima de analito que pode ser detectada e a suscetibilidade da metodologia a variações nas condições analíticas. Foram incluídos apenas coeficientes de variação (CV) menores a 10%. Estes tópicos são descritos a seguir:⁸⁸

✓ Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação.

✓ Limite de quantificação (LQ)

O LQ representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida e é estabelecido através da análise de soluções contendo concentrações decrescentes da substância até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis.

✓ Limite de detecção (LD)

O LD representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, estabelecida através da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do composto, até o menor nível detectável.

✓ Precisão

Representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. Corresponde a análise de três concentrações (baixa, média e alta), dentro da faixa limite esperada, realizando-se pelo menos cinco réplicas. O CV não deve exceder 15%, exceto para o LQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20%. As análises são feitas em um único dia e em vários dias (ensaios intra-dia e inter-dias).

✓ Robustez

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta com pequenas variações e é considerada durante a fase de desenvolvimento do trabalho. Constatando-se a suscetibilidade a variações nas condições analíticas, estas foram adequadamente controladas e as precauções foram incluídas no procedimento.

4.2.2. Resultados e Discussão

4.2.2.1. Quantificação do composto 2,5,6-tribromo-*N*-metilgramina de *Amathia verticillata*

A validação da quantificação da 2,5,6-tribromo-*N*-metilgramina em extratos do briozoário *A. verticillata* foi realizada utilizando-se o próprio composto puro, anteriormente isolado pelo aluno Fabio R. Pereira.⁸⁷ Foi preparada uma solução estoque com 1,0 mg do composto. A partir desta solução estoque foram preparadas seis soluções diluídas em MeOH.

Após a validação da metodologia, foram preparadas as trinta amostras do briozoário coletadas nos diferentes locais, em triplicata. Os resultados das análises das amostras são apresentados na tabela 3.

Obtiveram-se os seguintes resultados para as diferentes amostras:

- As amostras 15 e 27 apresentaram o composto 2,5,6-tribromo-*N*-metilgramina em quantidade abaixo do limite de quantificação.
- As amostras que apresentaram maior quantidade do composto foram aquelas obtidas em Arraial do Cabo, do estado do Rio de Janeiro.
- As amostras 7, 8, 9 e 28 de Cabo Frio (Brasil) e Little Jim Island (USA) apresentaram um pico em 5,7 minutos, semelhante à 2,5,6-tribromo-*N*-metilgramina, mas com um bromo a menos. Estas amostras foram reunidas e separadas por HPLC-UV-MS, utilizando-se uma coluna Waters X-Terra MS C₁₈, de dimensões de 2,1 x 50 mm, tamanho de partícula de 3,5 µm, com um gradiente de 25% até 75% MeOH e fluxo de 0,5 mL/min. Foram obtidos 0,2 mg da 2,6-dibromo-*N*-metilgramina (**51**).

Tabela 3 - Quantificação de 2,5,6-tribromo-*N*-metilgramina (**30**) extraída do briozoário *Amathia verticillata* nos locais coletados.

Numero	Estado ou País	Localidade	[2,5,6-tribromo- <i>N</i> -metilgramina] (µg/mg de materia seca)
1	Bahia	Salvador	0,367
2	Ceará	Marina Park, Fortaleza	0,051
3		Marina Park, Fortaleza	0,015
4	Rio Grande do Norte	Praia da Redinha Velha, Natal	0,013
5		Praia da Redinha Velha, Natal	0,034
6	Rio de Janeiro	Arraial do cabo	3,919
7		Cabo Frio	0,430*
8		Cabo Frio	1,071*
9	Santa Catarina	Porto Belo	0,589*
10	São Paulo	Praia do Araçá, São Sebastião	0,057
11		Praia do Araçá, São Sebastião	0,052
12		Praia do Cabelo Gordo, São Sebastião	0,041
13		Praia do Cabelo Gordo, São Sebastião	0,026
14		Praia do Cabelo Gordo, São Sebastião	0,038
15		Praia do Cabelo Gordo, São Sebastião	<0,010
16		Praia do Cabelo Gordo, São Sebastião	0,09
17		São Vicente	0,051
18		Yatch Club, Ilhabela	0,011
19		Yatch Club, Ilhabela	0,010
20		Yatch Club, Ilhabela	0,186
21		Yatch Club, Ilhabela	0,299
22		Yatch Club, Ilhabela	0,158
23		Yatch Club, Ilhabela	0,062
24		Yatch Club, Ilhabela	0,28
25	Austrália	TSV Boat Club Marina, Townsville Queensland	0,184
26		Coon Island	0,201
27	Estados Unidos	Little Jim Island Fish Camp dock, Fort Pierce	<0,010
28		Little Jim Island Fish Camp dock, Fort Pierce	0,045*
29		Peacock's Pocket	0,316
30	Itália	La Spezia	0,571

*Amostras com o composto desconhecido; verde= [**30**] maior; amarelo= [**30**] menor ao LQ.

4.2.2.2 Determinação estrutural do composto 2,6-dibromo-*N*-metilgramina (**51**)

O espectro de massas de alta resolução deste composto indicou um padrão isotópico da molécula protonada $[M+H]^+$ em m/z 344,9585/346,9567/348,9547 (Figura 27) que corresponde à fórmula molecular $C_{12}H_{14}Br_2N_2$, com um átomo de bromo a menos do que a 2,5,6-tribromo-*N*-metilgramina (**30**).

Figura 27 - Espectro de massas de alta resolução ESI(+) do 2,6-dibromo-*N*-metilgramina (**51**).

O espectro de RMN- ^1H (600 MHz) (Anexos 2-4) deste composto apresentou um dubleto em δ 7,76 ($J=1,7$ Hz), um dubleto em δ 7,46 ($J=8,8$ Hz), um duplo dubleto em δ 7,28 ($J=1,7$ e 8,7 Hz). Este padrão de substituição corresponde a de um benzeno 1,2,4-trissubstituído. Além disso, também se observou um singlete de um grupo metila em δ 3,73, um singlete em δ 3,48 de um grupo metileno, bem como um singlete intenso em δ 2,13 de duas metilas quimicamente equivalentes. Comparando-se estes dados com os dados espectroscópicos da 2,5,6-tribromo-*N*-metilgramina (**30**), observa-se que o composto pode ser um dos dois isômeros, **51** ou **52** (Figura 28).

A análise dos espectros bidimensionais (Anexos 5-11), principalmente o espectro HMBC, permitiu-nos identificar a estrutura da 2,6-dibromo-*N*-metilgramina.

Figura 28 - Estruturas de 2,5,6-tribromo-*N*-metilgramina (**30**) e dos dois possíveis isômeros da dibromo-*N*-metilgramina, um dos quais isolado de *A. verticillata* coletado em Arraial do Cabo, RJ.

A Figura 29 apresenta as correlações observadas no espectro HMBC da 2,6-dibromo-*N*-metilgramina. Observou-se neste espectro que o metileno em δ 3,48 apresenta uma correlação à longa distância com o sinal em δ 125,2, necessariamente atribuído a C-3a. Considerando-se que o hidrogênio H-4 em δ 7,46 (d, 8,8 Hz) também apresenta correlação com C-3a, e apresenta acoplamento *orto* com H-5 em δ 7,28 (dd, 1,9, 8,7), torna-se evidente que o átomo de bromo situa-se em C-6 (δ 117,1). Apesar de H-7 (δ 7,76, d, 1,5) não apresentar correlações no espectro HMBC, os acoplamentos observados para o grupo metila conectado ao nitrogênio do grupo indol (δ 3,73, s) com os carbonos em δ 135,7 (C-7a) e em δ 116,5 (C-2) evidenciam as atribuições estabelecidas, permitindo identificar o composto **51** como sendo a 2,6-dibromo-*N*-metilgramina (Tabela 4). Este composto é inédito na literatura, sendo uma variante dos alcaloides até hoje isolados do briozoário *Amathia verticillata*.

Figura 29 - Correlações observadas no espectro do tipo HMBC para a estrutura 2,5-dibromo-*N*-metilgramina (**51**).

O fato do briozoário apresentar ocorrência de alcalóides indólicos bromados nos faz considerar que estes alcalóides podem ser indicadores taxonômicos. Além disso, a biossíntese destes alcalóides bromados por *A. verticillata* é notável, tornando este briozoário uma fonte em potencial de enzimas halogenantes de grupos indóis, enzimas estas que podem ser de extremo interesse em reações de biocatálise.

Tabela 4 - Dados de RMN-¹H (600 MHz) e RMN-¹³C (150 MHz) do composto (**51**) e suas correlações HSQC e HMBC.

Posição	HSQC			HMBC
	δ_C	Multip	δ_H (J in Hz)	
2	116,5	C	-	-
3	111,5	C	-	-
3a	125,2	C	-	-
4	112,3	CH	7,46 (d, 8,8)	C-3a, C-5
5	124,5	CH	7,28 (dd, 1,7, 8,7)	C-6
6	117,1	C	-	-
7	121,2	CH	7,76 (d, 1,7)	-
7a	135,7	C	-	-
8	54,1	CH ₂	3,48 (s)	C-2, C-3, C-3a, C-9
9	45,2	CH ₃	2,13 (s)	C-8, C-9
10	31,8	CH ₃	3,73 (s)	C-2, C-7a

*Deslocamentos químicos em δ (ppm) obtidos em DMSO-*d*₆

Os resultados de quantificação de 2,5,6-tribromo-*N*-metilgramina permitiram fazer um trabalho em colaboração com o grupo de ecologia marinha da Universidade Federal Fluminense focado na avaliação química defensiva do briozoário *Amathia verticillata* frente a peixes em uma ampla escala geográfica.⁸⁹ Adicionalmente a utilização de análise por HPLC-UV-ELSD-MS de frações permitiu não só a análise simultânea de substâncias majoritárias presentes no extrato brutos como também proporcionou dados de perfil de sua absorção no ultravioleta-visível e seu espectro de massas de outros compostos em menor escala para sua desreplicação.

4.3. Desreplicação, investigação química e biológica do extrato bruto da esponja *Tedania brasiliensis*

4.3.1. Procedimento experimental

4.3.1.1. Preparação e fracionamento do extrato bruto de *Tedania brasiliensis*

Para a preparação do extrato de *Tedania brasiliensis* para avaliação em testes de atividade biológica, foram pesados cerca de 5 g de esponja seca (liofilizada). Esta amostra foi triturada em almofariz com MeOH, por cerca de 10-15 minutos. O material macerado foi filtrado através de papel filtro, e o procedimento foi repetido três vezes. Após a filtração, o extrato foi evaporado em sistema de alto vácuo (Speed Vac), e pesado. Após o preparo do extrato, uma alíquota de 2 mg foi separada e enviada para cada bioensaio, dando positivo para atividade anti-Leishmania, tripanossomicida e anti-viral.

A análise do perfil químico do extrato bruto de *T. brasiliensis* por HPLC-UV-MS foi realizada com uma alíquota na concentração de 1 mg/mL em MeOH. A análise foi realizada utilizando-se uma coluna de fase reversa C₁₈ Inertsil ODS-3.

Figura 30 - Cromatograma do extrato bruto da esponja *Tedania brasiliensis* (detecção em λ_{max} 275 nm). Condições de análise: coluna C₁₈ Inertsil ODS-3; eluente: gradiente a partir de 90% H₂O e 10% de MeOH/MeCN 1:1 durante 22 min. até 100% MeOH/MeCN 1:1 (todos os solventes com 0,1% de ácido fórmico) permanecendo nesta condição por 8 min., voltando-se à condição inicial de eluição em 10 minutos.

Como fase móvel utilizou-se um gradiente de eluição de composição inicial de 10% de MeOH/MeCN 1:1 em 90% de H₂O (todos os solventes com 0,1% de ácido fórmico). O tempo de corrida cromatográfica do gradiente de eluição foi de 22 minutos. Ao final deste período, o

eluente permaneceu em 100% MeOH/MeCN 1:1. Esta condição final foi mantida durante 8 minutos, voltando-se à condição inicial de eluição durante 10 minutos (Figura 30). Para a detecção por massas, utilizou-se o modo de ionização por electrospray no modo positivo e negativo (Figura 31). Os compostos detectados foram isolados e identificados (*ver adiante*, seção 4.3.2).

Figura 31 - Espectros de massas ESI(+) dos picos cromatográficos apresentados pelo extrato bruto de *Tedania brasiliensis*.

Após a análise em bioensaios e por HPLC-UV-MS de uma alíquota do extrato MeOH da esponja *T. brasiliensis*, o extrato bruto total foi preparado a partir de 136,2 g de material seco. Este foi extraído com MeOH (4 x 500 mL), filtrado e concentrado até um volume final de 500 mL. O extrato MeOH foi submetido a uma partição com hexano (3 x 500 mL). Ambas frações hexano e metanólica foram evaporadas. A fração hexânica foi seca e pesada, fornecendo 1,7934 g de extrato. A fração metanólica foi evaporada até a remoção de MeOH, ressuspendida em H₂O e o volume foi ajustado para 500 mL e particionado com AcOEt (3 x 500 mL). Ambos extratos foram secos. O extrato AcOEt forneceu 5,3708 g de material seco. A fração aquosa foi dissolvida em H₂O (500 mL), à qual foram adicionados 50 g de uma mistura das resinas XAD-7 e XAD-4 em proporção 1:1.

A suspensão aquosa junto com a mistura de resinas foi deixada com agitação por uma noite em shaker microbiológico. Após este período, a mistura de resinas foi filtrada e lavada com água MilliQ. Em seguida a mistura de resinas foi colocada em MeOH (300 mL) e deixada sob agitação em shaker por 4 h. A resina foi separada por filtração através de papel de filtro em funil de Büchner. A mistura de resinas foi re-extraída com 300 mL de uma mistura 1:1 de MeOH e acetona por mais 4 h. Após filtração, ambos extratos MeOH e MeOH/acetona foram reunidos e evaporados até a secagem. Esta fração orgânica foi seca em dessecador e pesada, fornecendo 2,1686 g de material. Este processo de extração e partição do extrato bruto de *T. brasiliensis* está sumarizado na figura 32.

Figura 32 - Metodologia para preparo e fracionamento inicial do extrato bruto de *Tedania brasiliensis*.

4.3.1.2 Investigação química da fração acetato de etila do extrato bruto de *Tedania brasiliensis*

O extrato MeOH da esponja *Tedania brasiliensis* apresentou atividade antiviral contra os vírus da hepatite C e Norovírus humano, bem como atividade leishmanicida contra *Leishmania (L.) infantum*. A análise por HPLC-UV-MS das frações obtidas do extrato bruto mostrou que os metabólitos secundários se concentraram na fração acetato de etila (AcOEt) deste extrato. Esta fração foi dividida em 10 frações de aproximadamente 0,5 g cada. Cada uma destas frações foi submetida a uma separação por cromatografia em coluna pré-empacotada com fase estacionária de sílica gel derivatizada com grupos octadecilsilano (C₁₈),

utilizando-se um gradiente de H₂O/MeOH (9:1 → 100% MeOH). Após a evaporação, cada uma das frações foi analisada por HPLC-UV-MS. As frações foram reunidas em oito frações de acordo com seu perfil cromatográfico.

Após análise por HPLC-UV-MS observou-se que a fração TBA2 (566,9 mg) apresentou compostos bromados, e foi selecionada para posterior fracionamento por HPLC-UV. Esta separação forneceu sete frações, denominadas de TBA2(A-G) (Figura 33). Dentre estas, a fração TBA2B foi novamente separada por HPLC, fornecendo as frações TBA2B (1-7).

Dentre estas, as frações TBA2F, TBA2B3, TBA2B5 e TBA2B7 apresentaram grau de pureza satisfatório para a obtenção dos seus espectros de ressonância magnética nuclear para determinação estrutural, descrita adiante. O processo de obtenção e massas destas frações está sumarizado na Figura 33.

Processo de separação análogo foi realizado com as frações TBA3 (347 mg), TBA4 (376 mg), TBA5 (251 mg) e TBA7 (338 mg). As frações obtidas nestas separações e os procedimentos cromatográficos adotados para a obtenção das mesmas estão sumarizados nas figuras 33, 34 e 35.

Figura 33 - Fracionamento das frações TBA2 e TBA4.

Destas frações, TBA3-1C, TBA3-3C, TBA3-5A, TBA3-5B1, TBA3-6A, TBA4B1, TBA7A8, TBA7A1A e TBA7A1B apresentaram um grau de pureza satisfatório e foram submetidas à

análise estrutural. A fração TBA5D, constituída pela pseudoceratidina (ver adiante), foi utilizada exclusivamente para a preparação de derivados, a pseudoceratidina acetilada e formulada. A análise espectroscópica destas frações nos permitiu verificar serem constituídas por dois metabólitos conhecidos e dezesseis inéditos.

Figura 34 - Fracionamento da fração TBA3.

Figura 35 - Fracionamento das frações TBA5 e TBA7.

4.3.2. Análise espectroscópica das frações de *Tedania brasiliensis*

4.3.2.1 Desrepliação e determinação estrutural do ácido 4,5-dibromo-1H-pirrol-2-carboxílico (fração TBA2F) (11)

A análise por espectrometria de massas de baixa resolução do composto apresentou um padrão isotópico de $[M-H]^-$ em m/z 266,0/267,9/270,0 indicando a presença de dois átomos de bromos na estrutura deste composto. Com base nas informações do número de bromos e uma massa exacta de ~266.8 Da (Tabela 5), a desrepliação utilizando a base de dados Dictionary of Natural Products forneceu 8 possíveis estruturas (Figura 36).

Tabela 5 - Desrepliação para a fração TBA2F.

Nome do composto	Fórmula molecular	Massa exata
Ácido 4,5-dibromo-1H-pirrol-2-carboxílico (11)	C ₅ H ₃ Br ₂ NO ₂	266.89
1,1-dibromo-3,3-dicloro-1-propeno (53)	C ₃ H ₂ Br ₂ Cl ₂	265.83
4,5-dibromofuran-2-carboxamida (54)	C ₅ H ₃ Br ₂ NO ₂	266.89
Ácido 2,5-dibromo-1H-pirrole-3-carboxílico (55)	C ₅ H ₃ Br ₂ NO ₂	266.89
Ácido 3,4-dibromo-1H-pirrol-2-carboxílico (56)	C ₅ H ₃ Br ₂ NO ₂	266.89
Ácido 3,5-dibromo-1H-pirrol-2-carboxílico (57)	C ₅ H ₃ Br ₂ NO ₂	266.89
3,4-dibromo-1-metil-1H-pirrol-2,5-diona (58)	C ₅ H ₃ Br ₂ NO ₂	266.89
2,3-dibromo-5-(metoximetil)-1H-pirrol (59)	C ₆ H ₇ Br ₂ NO	266.93

Figura 36 - Possíveis estruturas para o composto da fração TBA2F.

O espectro de massas de alta resolução (Figura 37) deste composto, que apresentou um padrão isotópico da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em m/z 265,8486/267,8468/269,8446 de intensidade relativa 1:2:1 compatível com a fórmula C₅H₃Br₂NO₂. Desta forma foi possível se

eliminar, por desreplicação o composto (**53**) e (**59**) da tabela 5 (o composto **53** também é descartado pelo fato de conter dois átomos de cloro na sua estrutura, o que não corresponde ao padrão isotópico obtido).

Figura 37 - Espectro de massas de alta resolução ESI(-) e espectro ultravioleta para a fração TBA2F.

A desreplicação da fração TBA2F utilizando a fórmula molecular obtida levou à obtenção de 6 possíveis estruturas pelo Dictionary of Natural Products (Figura 37): a 4,5-dibromofuran-2-carboxamida (**54**), o ácido 2,5-dibromo-1*H*-pirrol-3-carboxílico (**55**), o ácido 3,4-dibromo-1*H*-pirrol-2-carboxílico (**56**), o ácido 3,5-dibromo-1*H*-pirrol-2-carboxílico (**57**), o ácido 4,5-dibromo-1*H*-pirrol-2-carboxílico (**11**) e a 3,4-dibromo-1-metil-1*H*-pirrol-2,5-diona (**58**).

Desta forma, não foi possível, no caso do composto presente na fração TBA2F, determinar sua estrutura sem ambiguidade utilizando somente sua fórmula molecular estabelecida por espectrometria de massas de alta resolução. Procurou-se, assim, estabelecer quais seriam os critérios mínimos para que esta pudesse ser estabelecida sem ambiguidade.

O composto da fração TBA2F só apresentou dois sinais no seu espectro de RMN-¹H (anexo 12): um singlete em δ 12,92, referente ao hidrogênio ligado a nitrogênio do pirrol, e um dubleto em δ 6,80 ($J = 2,7$ Hz), referente ao hidrogênio ligado a um carbono do tipo sp^2 . Desta forma, a análise do espectro de RMN-¹H, em conjunto com a informação da fórmula molecular, possibilita eliminar a fórmula do composto **54** para a fração TBA2F pelo fato de

que o sinal da amida de **54** deve corresponder a dois hidrogênios, o que não se observa no sinal do RMN-¹H. De maneira análoga, a estrutura 3,4-dibromo-1-metil-1*H*-pirrol-2,5-diona (**58**) também pode ser eliminada, pelo fato que se espera que seu espectro de RMN-¹H hipotético apresente um sinal de metila intenso, na região de δ 3,1-3,3, o que não se observa no espectro da fração. Restariam, assim, quatro possíveis estruturas para serem atribuídas para o composto presente na fração TBA2F.

Em princípio é muito difícil distinguir os possíveis espectros de RMN-¹H dos compostos **11**, **55**, **56** e **57**, do espectro de RMN-¹H obtido para a fração TBA2F. Até mesmo o espectro de RMN-¹³C (anexo 13), e possivelmente também os espectros HMBC. O espectro COSY de **56** deveria, em princípio, apresentar uma correlação entre o hidrogênio ligado ao carbono sp² e o grupo N-H, o que não seria observado no espectro COSY de **11** (não obtido), e poderia ser utilizado para eliminar a estrutura **56**, restando apenas as estruturas **11**, **55** e **57** a serem consideradas.

A comparação dos dados de RMN-¹H e RMN-¹³C do composto da fração TBA2F com dados obtidos para **11** por outros autores nos permitem atribuir sem ambiguidade esta estrutura para a fração TBA2F. A fração apresentou sinais δ 160,1, 124,9, 116,7, 106,6 e 98,6 no espectro de RMN-¹³C e coincidem totalmente com os sinais do composto **11** previamente isolado e identificado.^{90,91}

4.3.2.1. Determinação estrutural pseudoceratidina (fração TBA2B7)

O espectro de massas de alta resolução do composto presente na fração TBA2B7 apresentou um padrão isotópico da molécula protonada [M+H]⁺ em *m/z* 643,8483/645,8458/647,8432/649,8409/651,8382, com padrão isotópico dos ions M+2, M+4, M+6 e M+8 de intensidade relativa 1:3:5:3:1 (Figura 38), indicando a presença de quatro átomos de bromo compatível com a fórmula C₁₇H₂₁Br₄N₅O₂, a qual apresenta oito insaturações.

A desreplicação utilizando o banco de dados Dictionary of Natural Products indicou que a fórmula molecular deste composto corresponde à da pseudoceratidina (**60**) (Figura 39), escolhendo como parâmetros de desreplicação o intervalo de massa molecular entre 646 e 648 Da e simultaneamente indicando a presença de 4 átomos de bromo.

Figura 38 - Espectro de massas de alta resolução ESI(+) da fração TBA2B7.

TBA2B7#495 RT: 20.73 AV: 1 NL: 1.75E9
T: FTMS + p ESI Full ms [110.00-900.00]

Figura 39 - Estrutura da pseudoceratidina (**60**).

A desreplicação utilizando a fórmula molecular da pseudoceratidina (C₁₇H₂₁Br₄N₅O₂) obtida do espectro de massas de alta resolução foi suficiente para identificar, pelo Dictionary of Natural Products, que se tratava exclusivamente deste composto. Mesmo assim, decidiu-se coletar os dados de RMN mono e bidimensionais da pseudoceratidina, de maneira a se confirmar sua estrutura sem ambiguidades e fazer comparações com os outros compostos isolados do extracto de *T. brasiliensis*.

A análise do espectro de RMN-¹H da pseudoceratidina (**60**) obtido em DMSO-*d*₆ (400 MHz), apresentou os seguintes sinais (Anexo 14):

- Dois dubletos em δ 12,68 ($J = 2,2$ Hz) e δ 12,64 ($J = 2,2$ Hz) referentes a hidrogênios ligados a nitrogênios de pirrol (H-22 e H-1).
- Um singlete largo em δ 8,35 referente a hidrogênio ligado a nitrogênio de amina (H-12).
- Dois tripletos em δ 8,25 ($J = 5,8$ Hz), e δ 8,14 ($J = 5,7$ Hz) referentes aos hidrogênios ligados a nitrogênios de amidas (H-16 e H-7).
- Dois dubletos em δ 6,89 ppm ($J = 2,6$ Hz) e δ 6,90 ppm ($J = 2,7$ Hz) referentes a hidrogênios ligados a carbonos sp^2 tipo C-H (H-4 e H-19).
- Cinco multipletos em δ 3,26, 3,20, 1,77, 1,55 e 1,52, referentes a hidrogênios ligados a carbonos metilênicos (CH₂-15, CH₂-8, CH₂-14, CH₂-10 e CH₂-9).
- Um singlete largo em δ 2,90 referente a hidrogênios ligados a carbonos metilênicos (CH₂-11 e CH₂-13).

O espectro de RMN-¹³C do mesmo composto (Anexo 15), apresentou sinais em δ 159,3 e 159,0 típicos de carbonilas de amidas (C-17 e C-6). Sinais de ¹³C em δ 46,8, 45,0, 38,0, 35,9, 26,4, 26,3 e 23,3 são referentes a carbonos metilênicos (CH₂-11, CH₂-13, CH₂-8, CH₂-15, CH₂-9, CH₂-14 e CH₂-10). Os sinais de ¹³C em δ 112,8 e 112,6 são referentes a carbonos sp^2 (CH-4 e CH-19). Pôde-se também observar seis carbonos quaternários tipo sp^2 , com sinais em δ 128,3 e 128,1, 104,8 e 104,6, 98,0 e 97,9 (C-18, C-5, C-21, C-2, C-20, C-3).

Os dados dos espectros de COSY, HSQC, e HMBC da pseudoceratidina (**60**) (anexos 16-18) são apresentados na tabela 6. As figuras 40 e 41 apresentam as correlações observadas nos espectros COSY e HMBC, respectivamente.

Figura 40 - Correlações observadas no espectro COSY para a estrutura da pseudoceratidina (**60**).

Figura 41 - Correlações observadas no espectro HMBC para a estrutura da pseudoceratidina (**60**).

Tabela 6 - Dados de RMN-¹H (400 MHz) e RMN-¹³C (100 MHz) da pseudoceratidina (**60**) e suas correlações COSY, HSQC e HMBC.

Posição	HSQC			COSY	HMBC
	δ_c	Multi p	δ_H (J in Hz)		
NH-1	-	-	12,64 (d, 2,2)	H-4	C-4, C-3
2	104,6	C	-	-	-
3	97,9	C	-	-	-
4	112,8	CH	6,89 (d, 2,6)	H-1	C-2, C-5, C-6
5	128,1	C	-	-	-
6	159,0	C	-	-	-
NH-7	-	-	8,14 (t, 5,7)	H-8	C-6, C-8
8	38,0	CH ₂	3,20 (m)	H-9	C-9, C-10
9	26,4	CH ₂	1,52 (m)	H-8	C-8, C-10, C-11
10	23,3	CH ₂	1,55 (m)	H-11/13	C-9
11	46,8	CH ₂	2,90 (br)	H-10, H-12	C-9, C10
NH-12	-	-	8,35 (br)	H-11/13	
13	45,0	CH ₂	2,90 (br)	H-12, H-14	C-14
14	26,3	CH ₂	1,77 (m)	H-11/13, H,15	C-15, C-13
15	35,9	CH ₂	3,26 (m)	H-14, H-16,	C-13, C-14
NH-16	-	-	8,25 (t, 5,8)	H-15	C-15, C-17
17	159,3	C	-	-	
18	128,3	C	-	-	
19	112,6	CH	6,90 (d, 2,7)	H-22	C-18, C-21
20	98,0	C	-	-	
21	104,8	C	-	-	
NH-22	-	-	12,68 (d, 2,2)	H-19	C-19, C-20

*Deslocamentos químicos em δ (ppm) obtidos em DMSO-*d*₆

Desta forma, pudemos confirmar, sem qualquer ambiguidade, a estrutura da pseudoceratidina (60) pela análise de seus espectros RMN-¹H, RMN-¹³C e bidimensionais, apesar da desreplicação por espectrometria de massas de alta resolução ter sido suficiente para indicar que se tratava deste composto.

4.3.2.3 Determinação estrutural da mistura de 3-desbromopseudoceratidina (61) e 20-desbromopseudoceratidina (62) (fração TBA2B5)

O espectro de massas de alta resolução da fração TBA2B5 (Figura 42) apresentou um padrão isotópico da molécula protonada [M+H]⁺ em *m/z* 565,9380/567,9355/569,9330/571,9305, com padrão isotópico dos íons M+2, M+4 e M+6 de intensidade relativa 1:3:5:3:1 corresponde à fórmula C₁₇H₂₂Br₃N₅O₂ com três átomos de bromo.

Em princípio esta fórmula corresponderia à pseudoceratidina com um átomo de bromo a menos. A consulta no banco de dados Dictionary of Natural Products não forneceu nenhum composto conhecido com esta fórmula molecular, indicando que o composto é, muito provavelmente, inédito na literatura. Esta informação constitui um dado muito importante, mostrando que, neste caso, realmente vale a pena investir esforço, tempo e recursos na identificação do composto presente nesta fração.

Os espectros de RMN-¹H e RMN-¹³C da fração TBA2B5 (Anexos 19-26) apresentaram sinais muito similares aos da pseudoceratidina (Tabela 7). Porém, observa-se um duplo tripleto em δ 6,72 (*J* = 3,7 e 2,8 Hz) e um duplo duplo dubleto em δ 6,12 (*J* = 6,2, 3,8 e 2,4 Hz) para os hidrogênios dos anéis pirrólicos, diferentemente dos sinais singletos observados no espectro da pseudoceratidina. Assim, verifica-se que um dos anéis pirrólicos da pseudoceratidina apresenta um átomo de bromo a menos no composto da fração TBA2B5 (Figura 44).

O espectro COSY (Anexo 27) do composto da fração TBA2B5 apresentou duas correlações:

(a) Os hidrogênios N-H em δ 12,18/ δ 12,13 apresentaram acoplamentos com os hidrogênios em δ 6,72/ δ 6,12.

(b) O hidrogênio em δ 6,12 apresentou acoplamento com o hidrogênio C-H de δ 6,72. Desta forma, foi possível verificar que pelo menos um dos núcleos pirrólicos apresenta somente um átomo de bromo (Figura 43).

Analisando o espectro de HSQC (Anexo 28) foram observadas correlações entre o hidrogênio em δ 6,72 e os carbonos em δ 112,0 e 111,7, e entre o hidrogênio em δ 6,12 e os carbonos em δ 111,1 e 111,0.

Figura 42 - Espectro de massas de alta resolução ESI(+) do composto puro TBA2B5.

Figura 43 - Correlações observadas no espectro COSY para o composto da fração TBA2B5.

Verificou-se, assim, que a fração TBA2B5 é constituída por dois isômeros estruturais, a 3-desdromopseudoceratidina (**61**) e a 20-desbromopseudoceratidina (**62**) (Figura 44). Além destes compostos serem inéditos na literatura, não foi possível se realizar a separação destes, pois a diferença estrutural entre os mesmos é negligível.

Figura 44 - Estruturas da 3-desbromopseudoceratidina (**62**) e da 20-desbromopseudoceratidina (**63**), isoladas da esponja *Tedania brasiliensis*.

Tabela 7 - Dados de RMN-¹H (400 MHz) e RMN-¹³C (100 MHz) da fração TB-A2B5 (**61** e **62**) e suas correlações COSY, HSQC e HMBC.

Posição	HSQC				COSY	HMBC
	δ_C 61 ^a	δ_H 61 ^b	δ_C 62 ^a	δ_H 62 ^b		
1	-	12,13 (br)	-	12,63 (d, 2,1)	H-3(62), H-4	C-3, C-4
2	102,7	-	104,7	-	-	-
3	111,7	6,72 (dt, 3,7; 2,8)	98,0	-	H-4(61)	-
4	111,0	6,12 (ddd, 6,2; 3,8; 2,4)	112,9	6,90 (d, 2,7)	H-1, H-3(61)	C-2, C-5, C-6
5	128,4	-	128,0	-	-	-
6	159,9	-	159,4	-	-	-
7	-	8,03 (t, 5,7)	-	8,14 (t, 5,6)	H-8	C-6, C-8
8	38,0	3,20 (m)	37,9	3,20 (m)	H-7, H-9	C-9, C-10
9	26,52	1,51 (m)	26,6	1,51 (m)	H-8	C-8, C-10, C-11
10	23,3	1,58 (m)	23,4	1,58 (m)	H-11/13	C-9
11	46,8	2,90 (br)	46,9	2,90 (br)	H-10, H-12	C-9, C10
12	-	8,33 (br)	-	8,33 (br)	H-11/13	-
13	45,07	2,90 (br)	45,09	2,90 (br)	H-12, H-14	C-14
14	26,4	1,77 (m)	26,57	1,77 (m)	H-11/13, H,15	C-15, C-13
15	36,0	3,25 (m)	35,8	3,25 (m)	H-14, H-16,	C-13, C-14
16	-	8,24 (t, 6,0)	-	8,15 (t, 5,7)	H-15	C-15, C-17
17	159,1	-	160,2	-	-	-
18	128,1	-	128,3	-	-	-
19	112,7	6,89 (d, 2,6)	111,1	6,12 (ddd, 6,2; 3,8; 2,4)	H-20(63), H-22	C-18, C-21
20	98,1	-	112,0	6,72 (dt, 3,7; 2,8)	H-19(62)	-
21	104,9	-	102,4	-	-	-
22	-	12,67 (d, 1,7)	-	12,18 (br)	H-19, H-20(62)	C-19, C-20

^a100 MHz; ^b400 MHz; Deslocamentos químicos em δ (ppm) obtidos em DMSO-*d*₆

Como a eletronegatividade do átomo de bromo ($\chi = 2,96$) não é tão pronunciada como a de outros heteroátomos ($\chi_F = 3,98$; $\chi_O = 3,44$; $\chi_N = 3,04$; $\chi_{Cl} = 3,16$), sendo apenas ligeiramente maior do que do átomo de iodo ($\chi_I = 2,66$) e astato ($\chi_{At} = 2,20$), o qual apresenta a mesma eletronegatividade do átomo de hidrogênio ($\chi_H = 2,20$), a alternância do átomo de bromo a menos em cada uma das duas unidades pirrólicas da pseudoceratidina não promove uma diferença significativa no momento dipolar de **61** e **62** suficiente para que os dois isômeros possam eventualmente ser diferenciados por cromatografia líquida. De fato, diversas etapas de purificação desta mistura foram tentativamente realizadas, sem sucesso, muito provavelmente porque os dois compostos são praticamente idênticos.

Além do mais, conseguiu-se isolar apenas 2 mg da mistura de **61** e **62**, o que realmente não facilitou a separação dos dois compostos. Adicionalmente, foram testadas diferentes colunas de separação cromatográfica, condições, tempos de corrida e solventes, observando-se sempre um único pico, demonstrando que os compostos **61** e **62** têm um comportamento cromatográfico idêntico.

A alternância das duas unidades pirrólicas monobromada e dibromada nos compostos **61** e **62** é realmente muito curioso, pois ilustra uma rota biossintética que não diferencia as duas extremidades da espermidina depois da condensação com as duas unidades, monobromopirrol e dibromopirrol. A espermidina é formada a partir da ornitina (Esquema 1), um aminoácido não-essencial, que se transforma na putrescina pela ação da enzima ornitina descarboxilase. Subsequentemente a putrescina é transformada em espermidina pela ação da enzima propilaminotransferase na presença de *S*-adenosilmetionina descarboxilada.⁹²

Na esponja, ou em um micro-organismo simbiote ou associado à esponja, a condensação da espermidina com as duas unidades pirrol (mono- e dibromada) ocorre de maneira não diferenciada, sugerindo a presença de uma enzima do tipo peptídeo sintetase não-ribossomal inespecífica para o substrato, no caso a espermidina.

Este é um caso raro de biossíntese de um metabólito secundário através de uma reação enzimática inespecífica, que está sendo investigada em projeto paralelo de análise metagenômica, mineração e sequenciamento dos agregados gênicos do genoma da esponja

Tedania brasiliensis. Mesmo isolada em pequena quantidade, a mistura de desbromopseudoceratidinas **61** e **62** foi analisada em testes de atividade anti-parasitária.

Esquema 1 - Rota de biossíntese da espermidina (Ado= Adenosyl, APAO= Acetylpolymine oxidase, ODC= Ornithine descarboxilase, SSAT= Spermidine/spermine *N*¹-acetyltransferase).⁹²

4.3.2.4. Determinação estrutural da 4-Bromopseudoceratidina (**63**) e 19-Bromopseudoceratidina (**64**) (frações TBA35B1 e TBA7A8)

O espectro de massas dos compostos presentes na fração TBA7A8 (Figura 45) apresentou um padrão isotópico da molécula protonada $[M+H]^+$ em m/z 721,7598/723,7574/725,7548/727,7522/729,7497/731,7469 com padrão isotópico $M+2$, $M+4$, $M+6$, $M+8$ e $M+10$ de intensidade relativa 1:5:10:10:5:1, que corresponde à fórmula molecular $C_{17}H_{20}Br_5N_5O_2$, com oito graus de insaturação.

Figura 45 - Espectro de massas de alta resolução ESI(+) da fração TBA7A8.

TBA7A8 #520 RT: 21.78 AV: 1 NL: 8.84E8
T: FTMS + p ESI Full ms [110.00-900.00]

O espectro de RMN-¹H (Anexo 30) apresentou sinais em δ 8,24 (t, J = 5,6 Hz) referente ao hidrogênio de um dos grupos amida, em δ 8,12 (m) referente ao hidrogênio do grupo amina da cadeia espermidina, em δ 7,76 (t, J = 5,9 Hz) e em δ 7,62 (t, J = 5,6 Hz), que provavelmente se referem ao hidrogênio de outro grupo amida, que aparece duplicado, resultante da presença de dois rotâmeros em solução. Além disso, também se observa um singlete que integra para dois hidrogênios em δ 6,90, referente a hidrogênios ligados a grupos pirrólicos similares aos da pseudoceratidina. Os outros sinais observados no espectro de RMN-¹H da fração TBA7A8 claramente se referem aos hidrogênios da cadeia espermidina, tipicamente observados para os derivados da pseudoceratidina aqui descritos.

O espectro de RMN-¹³C (150 MHz) apresenta, além de sinais análogos aos grupos pirróis da pseudoceratidina substituídos pelo grupo amida (em δ 159,4/159,1, δ 128,3/128,1, δ 112,8/112,6, δ 104,9/104,6 e δ 98,0/97,9), sinais em δ 46,84/46,80, δ 45,0/44,9 que podem ser

parcialmente atribuídos aos carbonos metilênicos conectados aos grupos amida, e sinais em δ 38,3, δ 38,0, δ 36,0, δ 35,9, δ 26,5, δ 26,39, δ 26,37, δ 26,2, δ 23,35 e δ 23,31 de cadeia alifática (Anexos 31-32). Estes sinais mostram a presença de dois derivados da pseudoceratidina nesta fração, contendo 5 átomos de bromo. Esta fração corresponde à mistura da 4-Bromopseudoceratidina (**63**) e 19-Bromopseudoceratidina (**64**), cujas estruturas estão representadas na figura 46. Já os dados dos espectros de RMN bidimensionais (Anexos 33-35) são apresentados na tabela 8.

Figura 46 - Estruturas da 4-bromopseudoceratidina (**63**) e 19-bromopseudoceratidina (**64**).

O composto (**64**) se encontra em maior proporção nessa fração, o que é possível ser observado no espectro RMN-¹³C. O mesmo perfil isotópico (pseudoceratidina pentabromada) foi observado no espectro de massas de alta resolução da fração TBA3-5. Para esta fração foram feitas as devidas separações e purificações, obtendo-se no final a fração TBA3-5B1, a qual encontrava-se pura e o mais importante, só continha um dos compostos da fração TBA7A8 (mistura da 4-Bromopseudoceratidina (**63**) e 19-Bromopseudoceratidina (**64**)).

O espectro de massas de alta resolução da fração TBA35B1 (Figura 47) apresentou um padrão isotópico da molécula protonada [M+H]⁺ em m/z 721,7596 com padrão isotópico dos íons M+2, M+4, M+6, M+8 e M+10 de intensidade relativa 1:5:10:10:5:1, que corresponde à fórmula molecular C₁₇H₂₀Br₅N₅O₂.

O espectro de RMN-¹H desta fração obtido em DMSO-*d*₆ (600 MHz) apresentou os seguintes sinais (Anexo 36):

- Dois tripletos em δ 8,13 (J=5,6 Hz), e δ 7,72 (J=6,0 Hz) referentes aos hidrogênios ligados a nitrogênios de amidas.
- Um singlete em δ 6,89 ppm referente ao hidrogênio ligado a carbono sp² tipo C-H.
- Sete multipletos em δ 3,25, 3,21, 2,89, 2,86, 1,76, 1,58 e 1,52, referentes a hidrogênios ligados a carbonos metilênicos.

Tabela 8 - Dados de RMN-¹H (600 MHz) e RMN-¹³C (150 MHz) da fração TBA7A8 (**63** e **64**).

Posição	HSQC			
	δ_C 63 ^a	δ_H 63 ^b	δ_C 64 ^a	δ_H 64 ^b
1	-	-	-	-
2	n.o.	-	104,9	-
3	n.o.	-	97,9	-
4	n.o.	-	112,6	6,90 (s)
5	n.o.	-	128,1	-
6	158,6	-	159,1	-
7	-	7,76 (t, 5,9)	-	8,14 (t, 5,8)
8	38,3	3,21 (m)	38,0	3,21 (m)
9	26,37	1,53 (m)	26,39	1,53 (m)
10	23,31	1,58 (m)	23,35	1,58 (m)
11	46,80	2,90 (m)	46,84	2,90 (m)
12	-	8,12 (m)	-	8,12 (m)
13	44,9	2,90 (m)	45,0	2,90 (m)
14	26,2	1,79 (m)	26,5	1,79 (m)
15	36,0	3,25 (m)	35,9	3,25 (m)
16	-	8,24 (t, 5,6)	-	7,62 (t, 5,6)
17	159,4	-	162,0	-
18	128,3	-	n.o.	-
19	112,8	6,90 (s)	n.o.	-
20	98,0	-	n.o.	-
21	104,6	-	n.o.	-
22	-	-	-	-

*Deslocamentos químicos em δ (ppm) obtidos em DMSO-*d*₆

O espectro de RMN-¹³C (150 MHz) desta fração apresentou um sinal de carbono de carbonila em δ 159,1, incluindo um sinal de pequena intensidade em δ 163,5. Este último provavelmente é devido ao mesmo carbono como rotâmero em solução. Adicionalmente, o espectro apresentou sinais em δ 128,3, 112,6, 104,6 e 97,9 que indicam a presença de um derivado de pirrol, tal como observado para a pseudoceratidina e para as misturas anteriores (Anexo 37).

No espectro COSY (Anexo 38) não foram observadas correlações entre os hidrogênios do grupo pirrol, mas as correlações entre os hidrogênios do grupo espermidina com os dois hidrogênios das amidas em δ_H 8,13 e δ_H 7,72 estão evidentes. A análise do espectro HSQC da

fração TBA35B1 (Anexo 39), em conjunto com os espectros de RMN- ^1H e RMN- ^{13}C , indicou correlação entre o hidrogênio em δ_{H} 6,89 (s) e o carbono em δ_{C} 112,6.

Figura 47 - Espectro de massas de alta resolução ESI(+) da fração TB35B1.

No espectro HMBC (Anexo 40), o sinal do hidrogênio em δ_{H} 8,13 apresentou correlação com os sinais dos carbonos em δ_{C} 159,1 e δ_{C} 38,0, indicando ser este hidrogênio do grupo amida que faz a conexão entre o grupo espermidina e um grupo pirrólico. Por sua vez, o sinal do hidrogênio em δ_{H} 6,89 apresenta correlação com os sinais de carbono em δ_{C} 159,1, 128,3, 104,6 e 97,9, indicando ser este hidrogênio na posição 4 de um grupo pirrólico, por analogia à pseudoceratidina. No espectro HMBC observa-se a correlação entre o hidrogênio em δ_{H} 7,72 com um carbono em $\sim\delta_{\text{C}}$ 162,0, não observado no espectro RMN- ^{13}C . Este carbono corresponde ao carbono carbonílico de um segundo grupo amida conectado a um grupo pirrólico, para o qual não foi observado sinal de hidrogênio.

Assim, de acordo com a fórmula molecular estabelecida por espectrometria de massas de alta resolução para a fração TBA35B1, considerou-se a presença de um grupo pirrólico substituído por três bromos nas posições 2, 3 e 4. Desta forma, a estrutura do composto presente na fração TBA35B1 poderia ser **63** ou **64**, sem poder definir, com esses dados, a qual estrutura tal molécula corresponde. Uma varredura de íons produto em alta resolução da fração TBA35B1 (Figura 48) foi utilizada com o objetivo de se estabelecer qual dos grupos pirrólicos conectados a cada uma das diferentes extremidades da espermidina apresenta três átomos de bromo.

Figura 48 - Espectros de íons produtos de alta resolução ESI(+) da fração TB3-5B1 em 40 eV.

A presença de 4 sinais em m/z 384,8184/386,8165/388,8146/390,8121 $[M+H]^+$ de intensidade relativa 1:3:3:1 indica a presença de um fragmento com o anel pirrólico com 3 átomos de bromo ligado à extremidade da espermidina com três grupos metileno. Já os íons com três sinais em 320,9235/322,9219/324,9187 de intensidade relativa 1:2:1 indicam a presença de um fragmento com o grupo pirrólico substituído por 2 átomos de bromo ligado à extremidade da espermidina com quatro grupos metileno (Esquema 2).

Desta forma, a análise do espectro de massas MS/MS permitiu-nos identificar sem ambiguidade o composto presente na fração TBA35B1 como sendo a 19-bromopseudoceratidina (**64**) (Tabela 9).

Tabela 9 - Dados de RMN- ^1H (600 MHz) e RMN- ^{13}C (150 MHz) da fração TBA3-5B1 (**64**) e suas correlações COSY, HSQC e HMBC.

Posição	HSQC			COSY	HMBC
	δ_C	Multip	δ_H		
2	104,6	C	-	-	-
3	97,9	C	-	-	-
4	112,6	CH	6,89 (s)	-	C-2, C-3, C-5, C-6
5	128,3	C	-	-	-
6	159,1	C	-	-	-
NH-7	-	-	8,13 (t, 5,6)	H-8	C-6, C-8
8	38,0	CH ₂	3,21 (m)	H-7, H-9	C-6, C-9, C-10
9	26,50	CH ₂	1,52 (m)	H-8	C-8, C-10, C-11
10	23,3	CH ₂	1,58 (m)	H-11	C-8, C-9, C-11
11	46,7	CH ₂	2,89 (m)	H-10	C-10, C13
13	44,7	CH ₂	2,86 (m)	H-14	C-11, C-14, C-15
14	26,55	CH ₂	1,76 (m)	H-13, H-15	C-13, C-15
15	35,3	CH ₂	3,25 (m)	H-14, H-16	C-13, C-14, C-17
NH-16	-	-	7,72 (t, 6,0)	H-15	C-15, C-17
17	~162,0	C	-	-	-
18	n.o.	C	-	-	-
19	n.o.	C	-	-	-
20	n.o.	C	-	-	-
21	n.o.	C	-	-	-

*Deslocamentos químicos em δ (ppm) obtidos em DMSO- d_6

Esquema 2 - Fragmentação do composto 19-bromopseudoceratidina (**64**) da fração TB3-5B1.

4.3.2.5. Determinação estrutural da 4,19-dibromopseudoceratidina (**65**) (fração TBA3-6A)

A fração TBA3-6A foi analisada por espectrometria de massas de alta resolução. O espectro de massas apresentou um padrão isotópico da molécula protonada $[M+H]^+$ em m/z 799,6352/801,6241/803,6213/805,6219/807,6194/809,6263/811,6205 com padrão dos íons $M+2$, $M+4$, $M+6$, $M+8$, $M+10$ e $M+12$ de intensidade relativa 1:6:15:20:15:6:1, corresponde à fórmula molecular $C_{17}H_{19}Br_6N_5O_2$, com oito graus de insaturação (Figura 49). O padrão isotópico de incorporação de átomos de bromo indica que o composto presente na fração TBA3-6A apresenta 6 átomos de bromo, correspondendo à 4,19-dibromopseudoceratidina (**65**) (Figura 50). Este composto é inédito na literatura, e é considerado o composto minoritário presente no extrato de *T. brasiliensis*.

Figura 49 - Espectro de massas de alta resolução ESI(+) da fração TB3-6A.

Figura 50 - Estrutura da 4,19-dibromopseudocertidina (**65**).

A análise do espectro de RMN-¹H desta fração (Anexos 41-43) mostrou claramente os hidrogênios ligados a carbonos da cadeia espermidina e se observa a total ausência de sinais entre δ 6,8-6,9. Isso indicaria que os dois bromos adicionais estariam localizados nas posições 4 e 19 da pseudoceratidina. O espectro de RMN-¹³C do mesmo (Anexo 44) mostrou unicamente os carbonos da espermidina. Do mesmo jeito que os compostos pentabromados não apresentaram sinais de carbono no anel pirrólico com 3 átomos de bromo, é observado neste caso a ausência de sinais de carbono para estes anéis (Tabela 10).

Tabela 10 - Dados de RMN-¹H (600 MHz) e RMN-¹³C (150 MHz) da fração TBA3-6A (**65**).

Posição	HSQC		
	δ_C	Multip	δ_H
6	162,8	C	-
NH-7	-	-	7,34 (br)
8	37,3	CH ₂	3,16 (m)
9	27,0	CH ₂	1,48 (m)
10	23,4	CH ₂	1,57 (m)
11	46,9	CH ₂	2,88 (t, 7,4)
NH-12	-	-	8,22 (m)
13	44,8	CH ₂	2,83 (t, 7,4)
14	26,9	CH ₂	1,73 (m)
15	34,8	CH ₂	3,20 (q, 6,2)
NH-16	-	-	7,61 (t, 6,0)
17	163,9	C	-

*Deslocamentos químicos em δ (ppm) obtidos em DMSO-*d*₆

4.3.2.6 Determinação estrutural das tedamidas A (66) e B (67) (fração TBA2B3)

O espectro de massas de alta resolução do composto presente na fração TBA2B3 apresentou um padrão isotópico da molécula protonada $[M+H]^+$ em m/z 611,9432/613,9408/615,9382/617,9359 com íons M+2, M+4 e M+6 de intensidade relativa 1:3:3:1 (Figura 51), indicando a presença de três átomos de bromo no composto, que apresenta a fórmula $C_{18}H_{24}Br_3N_5O_4$. Esta fórmula corresponde a um número de 8 insaturações. Uma consulta ao banco de dados Dictionary of Natural Products utilizando a fórmula molecular estabelecida por HRMS também não forneceu nenhum composto conhecido. Desta forma, julgamos prioritária a identificação deste composto sem precedentes na literatura.

Figura 51 - Espectro de massas de alta resolução ESI(+) da mistura das tedamidas A e B (fração TBA2B3).

O espectro de RMN-¹³C (100 MHz) da fração TBA2B3 apresentou sinais duplicados de carbonos de carbonilas em δ 167,2, 167,1, 166,0, 165,6, 159,3 e 159,0, incluindo dois sinais de pequena intensidade em δ 158,4 e 158,1 (Anexos 54-57). Estes últimos provavelmente devem ser deslocamentos químicos dos mesmos carbonos observados em δ 159,3 e 159,0, porém de rotâmeros minoritários presentes em solução. Os dados espectroscópicos da fração TBA2B3 são similares aos da pseudoceratidina e, portanto, os compostos presentes nesta fração também devem apresentar grupos amida, os quais podem apresentar rotação restrita na ligação O=C-N-R deste grupo funcional.

Adicionalmente, o espectro de RMN-¹³C da fração TBA2B3 apresentou um sinal intenso em δ 144,5, bem como sinais em δ 128,3, 128,1, 121,6, 121,5, 112,8, 112,6, 104,8, 104,6, 98,0, 97,9, 92,1 e 92,0. Estes surgem agrupados dois a dois em sequência, indicando que, como no caso da fração TBA2B5, a fração TBA2B3 apresenta dois compostos isoméricos de igual fórmula molecular. Em conjunto com os sinais de carbonos carbonílicos, os sinais de carbonos entre δ 144,5 e 92,0 indicam a presença de duas unidades derivadas de pirrol, tal como observado para a pseudoceratidina e para a mistura de desbromopseudoceratidinas.

A análise do espectro HSQC da fração TBA2B3 (Anexo 59-60), em conjunto com os espectros de RMN-¹H e -¹³C indicou, além dos sinais observados para um anel pirrólico trissubstituído por dois bromos e um grupo amida, e para a cadeia espermidina (tal como para a pseudoceratidina e para a mistura de desbromopseudoceratidinas), a presença de um grupo metoxila (-OCH₃) em δ_H 3,18-3,17/ δ_C 51,1 e de um metino sp² desblindado, em δ_H 7,30/ δ_C 144,5 para o isômero majoritário e em δ_H 7,34/ δ_C 144,5 para o isômero minoritário. A presença de duas carbonilas adicionais, em δ_C 166,0 e 165,6, sugere que um dos grupos pirróis apresenta significativa modificação estrutural.

Considerando-se que os sinais característicos da pseudoceratidina observados para o pirrol trissubstituído e para a cadeia spermidina são facilmente discerníveis nos espectros de RMN-¹H, RMN-¹³C e bidimensionais da fração TBA2B3, a diferença dos compostos presentes na fração TBA2B3 com relação à pseudoceratidina e às desbromopseudoceratidinas se deve à presença deste grupo pirrol modificado. Assim, a análise estrutural dos compostos presentes na fração TBA2B3 se concentrou neste fragmento estrutural.

Os sinais dos hidrogênios em δ_H 7,34 (d, $J=1,7$ Hz) e δ_H 7,30 (d, $J=1,6$ Hz) apresentam acoplamento com os sinais dos hidrogênios em δ_H 9,09 (d, $J=1,5$ Hz) e δ_H 9,07 (d, $J=1,6$ Hz) no espectro COSY (Anexo 58), indicando que estes hidrogênios encontram-se neste mesmo fragmento estrutural, atribuído ao grupo pirrol modificado.

No espectro HMBC (Anexos 61-66) da fração TBA2B3, os sinais de hidrogênios em δ_H 9,09 e δ_H 9,07 apresentam acoplamento com os carbonos em δ_C 92,1/92,0, em δ_C 121,6/121,5, em δ_C 144,5 e em δ_C 167,2/167,1.

Também no espectro HMBC, os sinais dos hidrogênios em δ_H 7,34 e 7,30 apresentam correlações com os sinais dos carbonos em δ_C 92,1/92,0 e δ_C 167,2/167,1. Por sua vez, o sinal dos hidrogênios da metoxila em δ_H 3,18 e 3,17 apresenta correlação com o sinal de carbono em δ_C 92,1/92,0. Considerando-se a presença de outro grupo pirrólico substituído por dois bromos nas posições 2 e 3, o grupo pirrol modificado sob análise deve apresentar um único bromo, de acordo com a fórmula molecular estabelecida por espectrometria de massas de alta resolução para a mistura de dois compostos presentes na fração TBA2B3. Sendo assim, o grupo pirrol modificado deve necessariamente incluir:

- a) um grupo C-H sp^2 em δ_H 7,34 ou 7,30 e δ_C 144,5;
- b) um grupo carbonila em δ_C 167,2/167,1;
- c) um átomo de bromo;
- d) um grupo metoxila em δ_H 3,18-3,17/ δ_C 51,1;
- e) um carbono quaternário em δ_C 92,1/92,0;
- f) outro carbono quaternário em δ_C 121,6/121,5.

Os dados dos espectros de RMN- ^1H , RMN- ^{13}C , COSY, HSQC, e HMBC desta fração são apresentados na tabela 11.

Dentre as três hipóteses estruturais possíveis para este fragmento pirrol modificado (Figura 52), as hipóteses 2 e 3 são as que melhor concordam com os dados espectroscópicos da mistura de dois compostos na fração TBA2B3. Isso porque a hipótese 1 apresenta uma carbonila de cetona α,β -insaturada, cujo deslocamento químico deveria situar-se entre δ 190 e

200, mas não em δ_C 167,2, como se observa. Além disso, a hipótese 1 apresenta um carbono substituído por um átomo de bromo, um oxigênio (do grupo metoxila) e um nitrogênio, que constitui um grupo funcional altamente incomum e de estabilidade duvidosa, uma vez que está sujeita à perda de H-Br ou de MeOH, levando à formação da imina correspondente.

Figura 52 - Estrutura parcial do pirrol substituído, presente nos compostos da fração TBA2B3.

A plausibilidade da hipótese 2 é maior do que a da hipótese 3, levando-se em conta a origem biossintética comum dos alcalóides isolados de *T. brasiliensis*. Porém, a hipótese 3 apresenta estrutura que concorda melhor com os dados observados para o composto presente na fração TBA2B3 da esponja *T. brasiliensis*.

As estruturas destes compostos foram confirmadas pela análise de espectros NOE realizados em MeCN- d_3 . O Anexo 69 e a Figura 53 ilustram o efeito NOE observado entre o sinal do hidrogênio em δ_H 7,10 e o sinal do grupo metoxila δ_H 3,24 (δ_H 7,30 e 3,17 em DMSO- d_6). Este efeito só pode ser observado se o hidrogênio do grupo lactama β,γ -insaturada e o grupo metoxila estiverem suficientemente próximos, tal como observado para a hipótese estrutural 2 das tedamidas presentes na fração TBA2B3.

Figura 53 - Correlações NOE observadas para as tedamidas A e B.

As α -bromo- α -alcóxi amidas, grupo funcional presente nas hipóteses estruturais 2 e 3 das tedamidas, são entidades químicas descritas na literatura, estáveis, comumente utilizadas como substratos funcionalizados para a preparação de diversos derivados úteis em química medicinal.⁹³⁻⁹⁸ Assim, as estruturas (66) e (67) dois isômeros presentes na fração TBA2B3 foram nomeadas tedamidas A (66) e B (67) (Figura 54).

Figura 54 - Estrutura das tedamidas A (66) e B (67).

Cabe assinalar algumas particularidades com relação às tedamidas. No melhor de nosso conhecimento, este é o primeiro isolamento de α -bromo- α -alcóxi-amidas a partir de fontes naturais, levando-se em conta buscas realizadas nos bancos de dados SciFinder e Dictionary of Natural Products. Consequentemente, a modificação de um núcleo pirrólico dando origem à sub-estrutura da hipótese 2 seria totalmente sem precedência. Uma análise estrutural do fragmento da hipótese 2 permite conjecturar sobre a sua formação, a partir da oxidação da 4-bromo-1*H*-pirrol-2-carboxamida ou ácido correspondente, à adição de MeOH ao carbono bromado (Esquema 3).

Esquema 3 - Oxidação e adição de MeOH do fragmento 4-bromo-1*H*-pirrol-2-carboxamida.

Seriam, assim, as tedamidas artefatos de isolamento? É possível que, de fato, os produtos naturais originalmente presentes no extrato bruto de *T. brasiliensis* fossem as hipotéticas 2-

desbromopseudoceratidina (**68**) e 21-desbromopseudoceratidina (**69**) da figura 55, as quais, no entanto, não foram observadas no extrato bruto da esponja *Tedania brasiliensis*.

Resta saber se tais compostos sofreriam oxidação e adição de MeOH com relativa facilidade, levando à formação das tedamidas A (**66**) e B (**67**). Tal hipótese poderá ser eventualmente comprovada através da síntese total da 4-bromo-1*H*-pirrol-2-carboxamida e a realização da sua conversão no produto de oxidação e adição de MeOH (Esquema 3).

Figura 55 - Estrutura dos precursores hipotéticos das tedamidas A e B.

Cabe ainda uma palavra final com relação ao espectro de RMN-¹³C da mistura de tedamidas A (**66**) e B (**67**), pois os carbonos das carbonilas 17 e 6 das estruturas (**66**) e (**67**) respectivamente podem apresentar rotação restrita em solução, dando origem aos dois conjuntos de sinais, em δ 159,3 e 159,0 (rotâmero majoritário) e δ 158,4 e 158,1 (rotâmero minoritário), tal como ilustrado no Esquema 4.

Esquema 4 - Rotação em solução para as tedamidas A (**67**) e B (**68**).

Tabela 11 - Dados de RMN-¹H (400 MHz) e RMN-¹³C (100 MHz) da fração TBA2B3 (**66** e **67**) e suas correlações COSY, HSQC e HMBC.

Posição	HSQC				COSY	HMBC
	δ_C 66 ^a	δ_H 66 ^b	δ_C 67 ^a	δ_H 67 ^b		
1	-	12,63 (d, 1,6)	-	9,07 (d, 1,6)	H-4	C-2, C-3, C-4, C-5
2	104,6	-	167,1	-	-	-
3	97,9	-	92,1	-	-	-
4	112,6	6,90 (m)	144,5	7,30 (d, 1,6)	H-1	C-2, C-5
5	128,3	-	121,5	-	-	-
6	159,0	-	165,6	-	-	-
7	-	8,14 (t, 5,7)	-	8,28 (m)	H-8	C-6, C-8
8	38,0	3,21 (m)	38,7	3,08 (m)	H-7, H-9	C-9, C-10
9	26,4	1,49 (m)	26,1	1,46 (m)	H-8	C-8, C-10, C-11
10	23,2	1,53 (m)	23,1	1,57 (m)	H-11/13	C-9
11	46,7	2,88 (br)	46,6	2,88 (br)	H-10, H-12	C-9, C10
12	-	8,36 (br)	-	8,36 (br)	H-11/13	-
13	44,7	2,88 (br)	44,9	2,88 (br)	H-12, H-14	C-14
14	25,8	1,73 (m)	26,3	1,78 (m)	H-11/13, H,15	C-15, C-13
15	36,5	3,11 (m)	35,9	3,26 (m)	H-14, H-16,	C-13, C-14
16	-	8,39 (t, 6,0)	-	8,26 (m)	H-15	C-15, C-17
17	166,0	-	159,3	-	-	-
18	121,6	-	128,1	-	-	-
19	144,5	7,34 (d, 1,7)	112,8	6,90 (m)	H-22	C-18, C-21
20	92,0	-	98,0	-	-	-
21	167,2	-	104,8	-	-	-
22	-	9,09 (d, 1,5)	-	12,67 (d, 1,4)	H-19	C-18, C-19, C-20, C-21
OCH ₃	51,1	3,18 (s)	51,1	3,17 (s)	-	C-3(67) C-20(66)

^a100 MHz; ^b400 MHz; Deslocamentos químicos em δ (ppm) obtidos em DMSO-*d*₆

4.3.2.7. Determinação estrutural das tedamidas C (70) e D (71) (fração TBA3-3C)

O espectro de massas de alta resolução desta fração (Figura 56) apresentou um padrão isotópico da molécula protonada [M+H]⁺ em *m/z* 689,8533/691,8513/693,8492/695,8471/697,8447, com padrão isotópico dos íons M+2, M+4, M+6 e M+8 de intensidade relativa 1:3:5:3:1 indica a presença de quatro átomos de bromo compatível com a fórmula C₁₈H₂₃Br₄N₅O₄, a qual apresenta oito insaturações. Comparando este resultado poderia se

determinar que o composto é similar a tedamida A ou B com um bromo a mais (ou a mistura das tedamidas A e B tetrabromadas).

Figura 56 - Espectro de massas de alta resolução ESI(+) da mistura das tedamidas C e D (fração TBA3-3C).

TBA33C+_150408103543 #2 RT: 0.05 AV: 1 NL: 9.19E6
T: FTMS + p ESI Full ms [185.00-800.00]

O espectro de RMN-¹³C (150 MHz) da fração TBA3-3C (Anexos 71-74) apresentou sinais duplicados de carbonos de carbonilas em δ 167,4, 167,3, 166,2, 165,8, 162,0 e 160,4, assim como observado para a fração de tedamidas A e B analisada anteriormente. Tal espectro também apresentou um sinal intenso em δ 144,73/144,72, bem como sinais em δ 121,79/121,71, 92,29/92,21. (agrupados dois a dois em sequência) (Tabela 12).

Como no caso da fração TBA2B3, esta fração corresponde a dois compostos isoméricos de igual fórmula molecular. A maior diferença observada entre estes sinais de carbono em comparação com as tedamidas A e B é que só foram observados quatro pares de sinais do anel

pirrólico, enquanto esperava-se que houvessem oito pares de sinais. Uma possível explicação para isso é o pirrol estar com três átomos de bromo e então seus carbonos não aparecem no espectro.

Tabela 12 - Dados de RMN-¹H (600 MHz) e RMN-¹³C (150 MHz) da fração TBA3-3C (**70** e **71**).

Posição	HSQC			
	δ_C 70 ^a	δ_H 70 ^b	δ_C 71 ^a	δ_H 71 ^b
1	-	n.o.	-	9,07 (br)
2	n.o.	-	167,3	-
3	n.o.	-	92,29	-
4	n.o.	-	144,73	7,29 (s)
5	n.o.	-	121,71	-
6	160,4	-	165,8	-
7		7,54 (t, 5,8)	-	8,27 (t, 5,9)
8	37,9	3,21 (m)	38,8	3,10 (m)
9	26,67	1,54 (m)	26,1	1,48 (m)
10	23,3	1,58 (m)	23,2	1,54 (m)
11	46,9	2,88 (m)	46,7	2,88 (m)
12	-	n.o.	-	n.o.
13	44,9	2,85 (m)	44,8	2,85 (m)
14	25,9	1,74 (m)	26,60	1,77 (m)
15	36,6	3,15 (m)	35,5	3,26 (m)
16	-	8,39 (t, 5,9)	-	7,71 (t, 6,0)
17	166,2	-	162,0	-
18	121,79	-	n.o.	-
19	144,72	7,33 (s)	n.o.	-
20	92,21	-	n.o.	-
21	167,4	-	n.o.	-
22	-	9,08 (br)	-	n.o.
OCH ₃	51,3	3,17 (s)	51,3	3,16 (s)

^a150 MHz; ^b600 MHz; Deslocamentos químicos em δ (ppm) obtidos em DMSO-*d*₆

O espectro de RMN-¹H (600 MHz) mostra os singletos dos hidrogênios em δ_H 7,29/ δ_C 144,73 e δ_H 7,33/ δ_C 144,72 correspondentes aos hidrogênios das lactamas, da mesma forma observada para as tedamidas A e B. A maior prova de que esta fração contém uma mistura de compostos tetrabromados semelhantes às tedamidas A e B foi a ausência de sinais na região de $\sim\delta_H$ 6,90 correspondente ao hidrogênio do pirrol dibromado, sendo esta a posição do

bromo adicional. Outra mudança foi os sinais δ_H 7,71 (t, 6,0) e δ_H 7,54 (t, 5,8) correspondente aos átomos N-H do novo anel pirrólico com três átomos de bromo.

Essas foram provas suficientes para determinar que as estruturas desta fração são as novas Tedamida C (**70**) e Tedamida D (**71**) (Figura 57). Os dados destas duas moléculas estão na Tabela 12 sendo o composto **71** aquele que se encontra em maior proporção nesta mistura.

Figura 57 - Estrutura das tedamidas C (**70**) e D (**71**).

4.3.2.8. Determinação estrutural das tedamidas E (**72**) e F (**73**) (fração TBA4B1)

O espectro de massas de alta resolução do composto presente na fração TBA4B1 apresentou o mesmo padrão isotópico da molécula protonada $[M+H]^+$ em m/z 597,9329/599,9307/601,9285/603,9262, com padrão isotópico dos íons M+2, M+4 e M+6 de intensidade relativa 1:3:3:1 indica a presença de quatro átomos de bromo compatível com a fórmula $C_{17}H_{22}Br_4N_5O_4$ (Figura 58). A diferença desta amostra com a amostra TBA2B3 (Tedamidas A e B) corresponde basicamente ao grupo CH_3 da metoxila na lactama.

No espectro de RMN- ^1H (600 MHz) não se observa o sinal do grupo metoxila do espectro das tedamidas A e B em δ_H 3,17 e 3,18 como dois singletos bem pronunciados e integrados para 3 hidrogênios, o que indica que este grupo metoxi não está presente na estrutura (Anexos 81-82). Pela pouca quantidade de amostra isolada, não foi possível obter um espectro de carbono, mas os espectros bidimensionais permitiram assinalar os carbonos na molécula, sendo os espectros de HMBC aqueles que deram mais informação dos carbonos (Tabela 13).

Figura 58 - Espectro de massas de alta resolução ESI(+) da mistura das tedamidas E e F (fração TBA4B1).

O espectro de COSY (Anexo 83) apresentou correlação entre os hidrogênios:

- δ_H 8,36 com δ_H 3,14 e δ_H 3,14 com δ_H 1,68;
- δ_H 8,17 com δ_H 3,24 e δ_H 3,24 com δ_H 1,73;
- δ_H 8,09 com δ_H 3,20 e δ_H 3,20 com δ_H 1,51;
- δ_H 8,22 com δ_H 3,08 e δ_H 3,08 com δ_H 1,47.

Com essa análise da similaridade com os dados das tedamidas A e B, a ausência do grupo metoxi, o massas de alta resolução e toda a análise espectroscópica, foi proposto que esta fração se trata das estruturas da Figura 59, nomeadas como tedamidas E (**72**) e tedamidas F (**73**). Os dados espectroscópicos da mistura das tedamidas E e F se encontram na Tabela 13.

Figura 59 - Estrutura das tedamidas E (**72**) e F (**73**).

Tabela 13 - Dados de RMN-¹H (600 MHz) e RMN-¹³C (150 MHz) da fração TBA4B1 (**72** e **73**).

Posição	HSQC			
	δ_C 72 ^a	δ_H 72 ^b	δ_C 73 ^a	δ_H 73 ^b
1	-	n.o.	-	9,07 (br)
2	104,5	-	167,2	-
3	96,6	-	94,0	-
4	112,5	6,87 (m)	146,7	7,24 (s)
5	128,4	-	121,0	-
6	159,3	-	167,5	-
7	-	8,08 (m)	-	8,22 (m)
8	37,9	3,20 (m)	38,5	3,08 (m)
9	26,2	1,47 (m)	26,2	1,47 (m)
10	23,7	1,51 (m)	23,7	1,51 (m)
11	46,9	2,77 (m)	46,9	2,77 (m)
12	-	8,28 (m)	-	8,28 (m)
13	45,1	2,77 (m)	45,1	2,77 (m)
14	26,3	1,68 (m)	26,8	1,73 (m)
15	36,4	3,14 (m)	35,8	3,24 (m)
16	-	8,36 (m)	-	8,17 (m)
17	167,8	-	159,8	-
18	121,0	-	128,4	-
19	146,8	7,27 (s)	112,5	6,85 (m)
20	94,0	-	96,6	-
21	167,2	-	104,5	-
22	-	9,09 (br)	-	n.o.

^a150 MHz; ^b600 MHz; Deslocamentos químicos em δ (ppm) obtidos em DMSO-*d*₆

4.1.2.9 Determinação estrutural das tedamidas G (74) e H (75) (fração TBA3-1C)

O espectro de massas de alta resolução do composto presente na fração TBA3-1C apresentou um padrão isotópico da molécula protonada $[M+H]^+$ em m/z 675,8423/677,8401/679,8381/681,8359/683,8335 com padrão isotópico dos íons M+2, M+4, M+6 e M+8 de intensidade relativa 1:3:5:3:1 indica a presença de quatro átomos de bromo compatível com a fórmula $C_{17}H_{21}Br_4N_5O_4$ (Figura 60). A diferença desta amostra com a amostra TBA3-3C (Tedamidas C e D) corresponde basicamente ao grupo CH_3 da metoxila na lactama. Assim como para as amostras anteriores, a primeira tentativa de determinação estrutural foi simplesmente supor que o grupo $-OCH_3$ perdeu o grupo metila.

Figura 60 - Espectro de massas de alta resolução ESI(+) da mistura das tedamidas G e H (fração TBA3-1C)

Com base no suposto de que esta amostra corresponde às mesmas estruturas das tedamidas C e D com um bromo adicional, foi obtido o espectro de RMN-¹H (600 MHz) desta fração (Anexo 90), detectando assim a ausência do hidrogênio pirrólico das tedamidas C e D.

Figura 61 - Estrutura das tedamidas G (74) e H (75).

Foi assim, observado claramente uma alta similitude com as tedamidas C e D como também a ausência dos hidrogênios na região entre δ_H 7,0 e 6,8. Isto indica que o bromo estaria localizado na região do hidrogênio do grupo pirrol como é apresentado na figura 61. Estas estruturas foram nomeadas como tedamidas G (74) e H (75).

4.3.3. Preparação de derivados da pseudoceratidina

A pseudoceratidina foi acetilada utilizando-se 20 mg de pseudoceratidina pura, 1 mL de piridina e 1 mL de anidrido acético, durante uma noite à temperatura ambiente sem uso de catalisador.

Os compostos obtidos depois da reação foram analisados por HPLC-UV-MS observando-se a presença de seis produtos de derivados sintéticos em pequenas quantidades (Figura 62). Nenhum destes compostos tem o perfil da pseudoceratidina indicando que a reação foi completa mas, pela quantidade de derivados, pouco seletiva.

Figura 62 - Espectros de massas ESI(+) obtidos para os compostos obtidos na reação da acetilação sem catalisador.

Destes compostos, é possível observar que só o primeiro composto (PA1) é o composto que se esperava obter (com mais 42 unidades de m/z). Os compostos PA2 e PA3 têm o mesmo perfil de massa, com 82 unidades de m/z adicional, sugerindo se tratar de dois isômeros estruturais derivados da pseudoceratitidina com duas unidades acetil adicionais.

O composto PA4 apresenta 126 unidades de m/z a mais o que poderia ser um derivado da pseudoceratidina com três unidades acetil em sua estrutura. Finalmente, os compostos PA5 e PA6 têm um perfil com 112 unidades de m/z adicional, possivelmente se tratando de dois isômeros estruturais derivados da pseudoceratidina com duas unidades de formil e uma de acetil. As possíveis estruturas obtidas nesta reação estão simplificadas na Figura 63.

A quantidade obtida de cada um deste compostos foi muito pequena. A reação foi realizada novamente utilizando-se um catalisador que tornasse a reação mais seletiva, objetivando-se que os produtos obtidos pudessem ser enviados para bioensaio de atividade parasitária (ativo para pseudoceratidina, ver adiante tópico 4.3.4).

Figura 63 - Possíveis estruturas de compostos obtidos de reação de acetilação sem catalisador.

A reação de acetilação foi realizada com 15 mg de pseudoceratidina pura, 10 mg de 4-*N,N*-dimetilaminopiridina (DMAP), 1 mL de piridina e 1 mL de anidrido acético (Esquema 5), durante uma noite à temperatura ambiente. Observou-se a acetilação do grupo amina secundário da cadeia espermidina, muito provavelmente por causa do fraco caráter básico dos nitrogênios dos grupos pirróis (os hidrogênios dos grupos N-H do pirrol apresentam caráter ácido, com pKa de 3,8).

Esquema 5 - Reação de acetilação da pseudoceratidina (**60**) com catalisador.

Os produtos foram analisados e purificados por HPLC/UV/MS, obtendo-se dois compostos puros em quantidades razoáveis, confirmando-se que a utilização de DMAP ofereceu uma seletividade maior na reação. Os produtos de reação foram purificados por HPLC. O derivado (**76**) é o produto esperado. O derivado formulado (**77**) provavelmente resulta da reação da

pseudoceratidina com o anidrido misto formado entre o anidrido acético e o íon formato, este último provindo do eluente de purificação dos produtos da reação.

4.3.3.1. Determinação estrutural da N^{12} -acetilpseudoceratidina (76)

O composto forneceu espectro de massas de alta resolução com um padrão isotópico da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em m/z 683,8433/685,8409/687,8385/689,8362/691,8339, com padrão isotópico dos íons $M+2$, $M+4$, $M+6$ e $M+8$ de intensidade relativa 1:3:5:3:1 (Figura 64) indica a presença de quatro átomos de bromo, compatível com a fórmula $C_{19}H_{23}Br_4N_5O_3$, a qual apresenta nove insaturações. Esta fórmula molecular é congruente com o produto esperado na reação.

Figura 64 - Espectro de massas ESI(-) do N^{12} -acetilpseudoceratidina (76).

Foram obtidos espectros de RMN- ^1H e RMN- ^{13}C (Anexos 91-97) do produto acetilado obtendo-se os seguintes dados mais relevantes (Tabela 14):

- No espectro RMN- ^1H , observa-se dois singletos em δ 1,97 e δ 1,93 integrados para 1,5 hidrogênios cada um. Este fato é interessante já que corresponde a três hidrogênios do grupo acetil, indicando a presença de rotâmeros em solução.
- No espectro de RMN- ^{13}C , observou-se que todos os sinais estavam em pares, aparecendo um par de novos sinais (comparando com a pseudoceratidina) correspondentes aos novos C=O da amida formada em δ 169,9 e δ 169,5 e o CH_3 em δ 21,5 e δ 21,4 do mesmo grupo.
- No HSQC (Anexos 99-100), observa-se correlação entre os hidrogênios da metila do grupo acetila em δ 1,97 com o carbono em δ 21,5 e entre o hidrogênio em δ 1,93 com o carbono em δ 21,4. Estes sinais correspondem ao carbono do grupo CH_3 do *N*-acetil.
- No HMBC (Anexos 101-104), observa-se correlações entre δ 1,97/1,93 com os carbonos carbonila δ 169,9/169,5 como era de esperar-se. O interessante no espectro de HMBC é a correlação bem diferenciada para cada rotâmero na molécula: é clara a relação diferenciada entre δ 1,97/ δ 48,0 e δ 1,93/ δ 45,9, sendo estes carbonos da cadeia da espermidina (Figura 65).
- Outro fato de interesse foi a comparação entre o espectro de hidrogênio da pseudoceratidina e o derivado *N*-acetilado. Observa-se que o multipletto em δ 1,77/ δ 26,3 observado para a pseudoceratidina (C_{14}), encontra-se levemente diferente para o composto *N*-acetilado. Agora, estes dois hidrogênios possuem um deslocamento determinado para cada rotâmero.

Figura 65 - Correlações do HMBC dos rotâmeros da N^{12} -acetilpseudoceratidina (**76**).

Tabela 14 - Dados de RMN-¹H (600 MHz) e RMN-¹³C (150 MHz) dos derivados da pseudoceratidina (76) e (77).

Posição	Derivados da pseudoceratidina			
	δ_C 76 ^a	δ_H 76 ^b	δ_C 77 ^a	δ_H 77 ^b
1	-	12.62, br	-	12.63/12.61, s
2	104.8/104.71, C	-	104.78/104.68, C	-
3	98.09/98.07, C	-	98.09/98.07, C	-
4	112.73/112.67, CH	6.85, br	112.8/112.6, CH	6.88/6.87, s
5	128.54/128.50, C	-	128.53/128.47, C	-
6	159.07/159.16, C	-	159.2/159.15, C	-
7	-	8.10 t (5.6)/8.08, m	-	8.10, m
8	38.6/38.5, CH ₂	3.18 m	38.5/38.3, CH ₂	3.21/3.17, m
9	26.9/26.7, CH ₂	1.46/1.39, m	26.8/26.4, CH ₂	1.40/1.37, m
10	26.1/25.1, CH ₂	1.52/1.42, m	25.8/24.5, CH ₂	1.49/1.45, m
11	48.0/44.6, CH ₂	3.23/3.20, m	46.4/40.1, CH ₂	3.24/3.20, m
12	-	-	-	-
13	45.9/42.9, CH ₂	3.24/3.23, m	44.2/41.0, CH ₂	3.23/3.22, m
14	28.8/27.9, CH ₂	1.72/1.63, m	28.2/27.4, CH ₂	1.68/1.64, m
15	36.6/36.4, CH ₂	3.16, m	36.6/36.0, CH ₂	3.16/3.15, m
16	-	8.14 t (5.6) / 8.08, m	-	8.10, m
17	159.09/159.3, C	-	159.2/159.13, C	-
18	128.52/128.4, C	-	128.50/128.41, C	-
19	112.69/112.60, CH	6.88, br	112.8/112.6, CH	6.88/6.87, s
20	98.07/98.06, C	-	98.09/98.07, C	-
21	104.70/104.6, C	-	104.75/104.63, C	-
22	-	12.62, br	-	12.63/12.61, s
23	169.9/169.5, C=O	-	163.2/163.1, CHO	8.00/7.99, s
24	21.5/21.4, CH ₃	1.97/1.93, s	-	-

^a150 MHz; ^b600 MHz; Deslocamentos químicos em δ (ppm) obtidos em DMSO-*d*₆

4.1.3.2 Determinação estrutural da N¹²-formilpseudoceratidina (77)

Este composto foi obtido a partir da fração do produto da reação de acetilação da pseudoceratidina. Este composto forneceu um padrão isotópico da molécula desprotonada [M-H]⁻ em *m/z* 669,8283/671,8260/673,8238/675,8218/677,8197 com padrão isotópico de íons M+2, M+4, M+6 e M+8 de intensidade relativa 1:3:5:3:1 (Figura 66), compatível com a

fórmula $C_{18}H_{21}Br_4N_5O_3$, com nove insaturações. Esta fórmula molecular é congruente para o composto *N*-formilado.

Figura 66 - Espectro de massas ESI(-) do N^{12} -formilpseudoceratidina (**77**).

PAPU2A_150921113828 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 7.98E6
T: FTMS - p ESI Full ms [600.00-800.00]

Os dados dos espectros de RMN- ^1H e RMN- ^{13}C (Anexos 105-111) se encontram na tabela 14 já descrita anteriormente, e os dados mais relevantes são:

- No espectro de RMN- ^1H , observa-se dois singletos em δ 8,00 e δ 7,99 integrados para 0,5 hidrogênios cada um. Assim como para o composto acetilado, estes sinais correspondem aos rotâmeros do hidrogênio do grupo *N*-formil.
- No espectro de RMN- ^{13}C , observa-se os mesmos sinais que a pseudoceratidina (todas em pares por causa dos rotâmeros) com um par de novos sinais, δ 163,2 e δ 163,1 correspondentes ao novo grupo CHO.
- No HSQC (Anexos 113-114), observa-se correlação direta entre estes dois sinais anteriores δ 8,00 / δ 163,2 e δ 7,99 / δ 163,1.

- d) No HMBC (Anexos 115-116) observa-se correlação entre δ 8,00 com o carbono δ 46,4 e entre δ 7,99 com o carbono δ 44,2. Estas correlações são desenhadas na Figura 67.

Figura 67 - Correlações do HMBC dos rotâmeros do N^{12} -formilpseudoceratidina (**77**).

4.3.4. Avaliação biológica dos compostos isolados da esponja *Tedania brasiliensis* e os derivados sintéticos.

A pseudoceratidina (**60**) isolada a partir do extrato bruto da esponja *T. brasiliensis* foi submetida a bioensaios de atividade anti-parasitária contra o parasita *Leishmania (L.) infantum*, causador de leishmaniose visceral, e contra *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas. Os bioensaios foram realizados pelo grupo do Dr. André Tempone, do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

A atividade anti-parasitária dos alcalóides polibromados isolados da *Tedania brasiliensis* e dos compostos derivados foram avaliados contra a fase tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* e os resultados se encontram na tabela 15.

Foram avaliados no total quatro compostos puros e quatro misturas isoméricas. O ácido 4,5-dibromo-1*H*-pirrol-2-carboxílico (**11**), que não contém a cadeia de espermidina em sua estrutura, não apresentou atividade contra *Trypanosoma cruzi* nem contra *Leishmania (L.) infantum*, concluindo-se que esta cadeia alifática é essencial para a atividade antiparasita dos derivados da pseudoceratidina.

Tabela 15 - Resultados de testes de atividade anti-parasitária contra *Leishmania (L.) infantum* e *Trypanosoma cruzi* para os compostos isolados a partir de *Tedania brasiliensis*.

Composto	IC ₅₀ (μM) CI 95%					
	<i>T. cruzi</i> <i>tripomastigota</i>	<i>Leishmania</i> <i>(L.) infantum</i> <i>promastigota</i>	<i>Leishmania</i> <i>(L.) infantum</i> <i>amastigota</i>	Citotoxicidade Células NCTC	SI	SI*
(11)	NA	NA	NA	>200	ND	ND
(60)	11,43 (9,66-13,51)	NA	0,27 (0,21-0,34)	65,63 (59,85-71,76)	5,7	243,1
(61) / (62)	13,46 (8,51-21,28)	NA	0,69 (0,54-0,85)	149,8 (135,1-166,2)	11,1	217,1
(63) / (64)	19,20 (17,61-20,93)	NA	NA	>200	>10,4	ND
(66) / (67)	NA	NA	1,68 (1,49-1,88)	>150	ND	>89,3
(70) / (71)	15,03 (12,64-17,88)	NA	NA	>200	13,3	ND
(76)	3,30 (2,35-4,67)	NA	16,05 (13,86-18,58)	76,52 (66,64-87,86)	23,2	4,8
(77)	NA	NA	19,94 (16,65-23,88)	112,4 (102,1-123,2)	ND	5,6
Benznidazol	440,73 (406,1-478,3)	ND	ND	469,9 (414,9-532,1)	1,1	ND
Miltefosina	ND	16,77 (13,07-21,52)	16,43 (15,45-17,46)	241,4 (206,9-281,6)	ND	14,7

Ácido 4,5-dibromo-1*H*-pirrol-2-carboxílico (11); Pseudoceratidina (60); 3-desbromopseudoceratidina; (61); 20-desbromopseudoceratidina (62); 4-bromopseudoceratidina; (63); 19-Bromopseudoceratidina (64); Tedamida A (66); Tedamida B (67); Tedamida C (70); Tedamida D (71); *N*¹²-acetilpseudoceratidina (76); *N*¹²-formilpseudoceratidina (77); IC₅₀: 50% concentração inibitória; CC₅₀: 50% concentração citotóxica (NCTC células de mama); CI 95%: 95% intervalo de confiança; SI: Índice de seletividade para tripomastigota (CC₅₀ células mama/IC₅₀ tripomastigota); SI*: índice de seletividade para amastigota (CC₅₀ células mama/IC₅₀ amastigota); NA: Não ativo; ND: Não determinado.

Contra *Trypanosoma cruzi*, o composto *N*¹²-acetilpseudoceratidina (76) foi o composto mais ativo com um índice de seletividade de 23,2. Comparando-se os resultados com o composto *N*¹²-formilpseudoceratidina (77), se observa que este último não apresenta atividade contra *Trypanosoma cruzi*, sendo o grupo metil do composto (76) parte vital da molécula para a atividade. A pseudoceratidina (60), a mistura de compostos tribromados (61-62) e a mistura de compostos pentabromados (62-63) também apresentou uma boa atividade contra

Trypanosoma cruzi comparando-se com o controle benznodizazol (medicamento atualmente utilizado para combater este parasita).

Para a *Leishmania (L.) infantum*, estes resultados foram ainda mais interessantes. A pseudoceratidina (**60**), os compostos tribromados (**61-62**) e as tedamidas A e B (**66-67**) apresentaram uma atividade que supera todos os valores citados anteriormente com um índice de seletividade de 243,1, 217,1 e 89,3. Estes resultados superaram até os resultados do medicamento usado atualmente (Miltefosina).

Uma análise das estruturas dos derivados da pseudoceratidina que apresentaram atividade anti-parasitária indica que a presença da amina secundária da cadeia espermidina é importante para a atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. No caso da atividade leishmanicida contra *Leishmania (L.) infantum*, o padrão de substituição de bromos nos anéis pirróis parece ser mais importante.

Atualmente, o grupo do Dr. André Tempone, do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz, está investindo esforços na investigação do estudo do mecanismo de ação dessas moléculas, de modo a explicar o elevado potencial antiparasitário observado.

Este projeto de pesquisa não só abriu portas no desenvolvimento de estudos mecanísticos, também foi o primeiro passo para um projeto maior financiado por FAPESP com o intuito de encontrar rotas sintéticas simples para produzir em maior escala todos os compostos aqui relatados e adicionalmente produzir compostos com outras cadeias alifáticas semelhantes à espermidina, como a homoespermidina, espermina, putrescina, entre outros.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram desenvolvidas técnicas de desreplicação para a descoberta de novas substâncias estruturalmente inéditas obtendo-se compostos novos e biologicamente ativos a partir de organismos marinhos, mostrando que estas técnicas hifenadas tem um grande potencial no processo de screening de extratos brutos, e devem ser cada vez mais utilizadas e aprimoradas.

- O trabalho de desreplicação realizado com o extrato de *Iotrochota birotulata* mostrou a presença de vários compostos já isolados anteriormente por outros pesquisadores e também a presença de compostos nunca reportados na literatura para esta esponja. Para esse organismo e para outros já estudados e não incluídos no documento, a desreplicação foi parte importante no processo de busca de compostos inéditos, e evitou investir tempo em frações que tinham compostos provavelmente já conhecidos na literatura.
- Foi realizada a validação da metodologia de quantificação do composto 2,5,6-tribromo-*N*-metilgramina para briozoários. Mediante o uso de HPLC-UV-MS foi detectado e isolado um composto inédito a partir do briozoário *Amathia verticillata*, a 2,6-dibromo-*N*-metilgramina.
- Foi realizado o primeiro estudo químico da esponja *Tedania brasiliensis*, espécie endêmica do Brasil, tendo sido isolados dois compostos conhecidos em grandes quantidades, a pseudoceratidina e o ácido 4,5 dibromo-1H-pirrol-2-carboxílico, quinze compostos inéditos em quantidades menores.
- A avaliação dos compostos isolados da esponja *Tedania brasiliensis* e seus derivados sintéticos no teste de atividade contra *Trypanosoma cruzi* demonstrou que apresentam boa atividade sendo o composto *N*¹²-acetilpseudoceratidina o que mostrou maior atividade contra esta parasita.
- Bioensaios de atividade anti-parasitária contra *Leishmania (L.) infantum* para todos compostos isolados de *T. brasiliensis* apresentaram resultados muito promissores, sobretudo para a pseudoceratidina (**60**), os compostos tribromados (**61-62**) e as

tedamidas A e B (**66-67**), sendo necessário continuar com os estudos mecanísticos destas moléculas frente ao parasita.

Os resultados obtidos a partir de este projeto abriram as portas para dois projetos adicionais, o primeiro, relacionado com o estudo do mecanismo de ação das moléculas isoladas da *T. brasiliensis* e seus derivados realizado no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, e o segundo relacionado com a produção de estes compostos em quantidades maiores utilizando poucas etapas de síntese, variando também a cadeia alifática para obter estruturas semelhantes não isoladas, que será realizado na Baylor University, Texas, EUA, em colaboração com o prof. Daniel Romo.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CONSTANT, H. L.; BEECHER, C. W. W. A method for the dereplication of natural product extracts using electrospray HPLC/MS. **Natural Product Letters**, v. 6, p.193-196, 1995.
2. SEDLOCK, D. M.; SUN, H. H.; SMITH, W. F.; KAWAOKA, K.; GILLUM, A. M.; COOPER, R. Rapid identification of teleocidins in fermentation broth using HPLC photodiode array and LC-MS methodology. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 45-52, 1992.
3. ALVI, K. A.; PETERSON, J.; HOFMANN, B. Rapid identification of elaiophylin and geldanamycin in streptomyces fermentation broths using CPC coupled with a photodiode-array detector and LC-MS methodologies. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 80-84, 1995.
4. CARDELLINA, J. H.; MUNRO, M. H. G.; FULLER, R. W.; MANFREDI, K. P.; MCKEE, T. C.; TISCHLER, M.; BOKESCH, H. R.; GUSTAFSON, K. R.; BEUTLER, J. A.; BOYD, M. R. A chemical-screening strategy for the dereplication and prioritization of HIV-inhibitory aqueous natural-products extracts. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 7, p. 1123-1129, 1993.
5. ZHOU, S.; HAMBURGER, M. Application of liquid chromatography-atmospheric pressure ionization mass spectrometry in natural product analysis. Evaluation and optimization of electrospray and heated nebulizer interfaces. **Journal of Chromatography A**, v. 755, n. 2, p. 189-204, 1996.
6. DE VRIES, D. J.; SUNDAR RAO, K.; WILLIS, R. H. Application of a radioreceptor assay to the screening and characterization of compounds from marine organisms with activity at the phorbol ester binding site of protein kinase C. **Toxicon**, v. 35, n. 3, p. 347-354, 1997.
7. CHUNG, M. S.; KIM, N. C.; LONG, L.; SHAMON, L.; AHMAD, W. Y.; SAGRERO-NIEVES, L.; KARDONO, L. B. S.; KENNELLY, E. J.; PEZZUTO, J. M.; SOEJARTO, D. D.; KINGHORN, A. D. Dereplication of saccharide and polyol constituents of candidate sweet-tasting plants: isolation of the sesquiterpene glycoside Mukurozioside IIb as a sweet principle of *Sapindus Rarak*. **Phytochemical Analysis**, v. 8, n. 2, p. 49-54, 1997.
8. CARDELLINA, J. H.; FULLER, R. W.; GAMBLE, W. R.; WESTERGAARD, C.; BOSWELL, J.; MUNRO, M. H. G.; CURRENS, M.; BOYD, M. R. Evolving strategies for the selection, dereplication and prioritization of antitumor and HIV-inhibitory natural products extracts. **Proceedings of the Phytochemical Society of Europe**, v. 43, p. 25-35, 1999.
9. RAMAKRISHNA, N. V. S.; NADKARNI, S. R.; BHAT, R. G.; NAKER, S. D.; KUMAR, E. K. S.; LAL, B. Screening of natural product extracts for antibacterial activity: early identification and elimination of known compounds by dereplication. **Indian Journal of Chemistry**, v. 38B, n. 12, p. 1384-1387, 1999.

10. LEEDS, J. A.; SCHITT, E. K.; KRASTEL, P. Recent developments in antibacterial drug discovery: microbe-derived natural products - from collection to the clinic. Novartis institutes for biomedical research, **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 15, n. 3, p. 211-226, 2006.
11. RHEE, I. K.; VAN DE MEENT, M.; INGKANINAN, K.; VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from *Amaryllidaceae* using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography A**, v. 915, n. 1-2, p. 217-223, 2001.
12. JIA, Q. Generating and screening a natural product library for cyclooxygenase and lipoxygenase dual inhibitors. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 29, p. 643-718, 2003.
13. KINGHORN, D.; FARNSWORTH, N.; SOEJARTO, D.; CORDELL, G.; SWANSON, S.; PEZZUTO, J.; WANI, M.; WALL, M.; OBERLIES, N.; KROLL, D.; KRAMER, R.; ROSE, W.; VITE, G.; FAIRCHILD, C.; PETERSON, R.; WILD, R. Novel strategies for the discovery of plant-derived anticancer agents. **Pharmaceutical Biology**, v. 41, p. 53-67, 2003.
14. STAVRI, M.; SCHNEIDER, R.; O'DONNELL, G.; LECHNER, D.; BUCAR, F.; GIBBONS, S. The antimycobacterial components of hops (*Humulus lupulus*) and their dereplication. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 9, p. 774-776, 2004.
15. MASOKO, P.; ELOFF, J. N. The diversity of antifungal compounds of six South African *Terminalia* species (*Combretaceae*) determined by bioautography. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 12, p. 1425-1431, 2005.
16. SINGH, M. P. Rapid test for distinguishing membrane-active antibacterial agents. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, n. 1, p. 125-130, 2006.
17. WARIDEL, P.; WOLFENDER, J. L.; NDJOKO, K.; HOBBY, K. R.; MAJOR, H. J.; HOSTETTMANN, K. Evaluation of quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and ion-trap multiple-stage mass spectrometry for the differentiation of C-glycosidic flavonoid isomers. **Journal of Chromatography A**, v. 926, n. 1, p. 29-41, 2001.
18. CLAESON, P.; GOERANSSON, U.; JOHANSSON, S.; LUIJENDIJK, T.; BOHLIN, L. Fractionation protocol for the isolation of polypeptides from plant biomass. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 1, p. 77-81, 1998.
19. CUI, B.; CHAI, H.; CONSTANT, H. L.; SANTISUK, T.; REUTRAKUL, V.; BEECHER, C. W. W.; FARNSWORTH, N. R.; CORDELL, G. A.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. Limonoids from *Azadirachta excelsa*. **Phytochemistry**, v. 47, n.7, p. 1283-1287, 1998.
20. PAULI, G. F.; KUCZKOWIAK, U.; NAHRSTEDT, A. Solvent effects in the structure dereplication of caffeoyl quinic acids. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 37, n. 11, p. 827-836, 1999.

21. POTTERAT, O.; KLAUS, W.; HAAG, H. Liquid chromatography-electrospray time-of-flight mass spectrometry for on-line accurate mass determination and identification of cyclodepsipeptides in a crude extract of the fungus *Metarrhizium anisopliae*. **Journal of Chromatography A**, v. 872, n. 1-2, p. 85-90, 2000.
22. WOLFENDER, J.-L.; WARIDEL, P.; NDJOKO, K.; HOBBY, K. R.; MAJOR, H. J.; HOSTETTMANN, K. Evaluation of Q-TOF-MS/MS and multiple stage IT-MSⁿ for the dereplication of flavonoids and related compounds in crude plant extracts. **Analysis**, v. 28, n. 10, p. 895-906, 2000.
23. STEFANOWICZ, P.; PRASAIN, J. K.; YEBOAH, K. F.; KONISHI, Y. Detection and partial structure elucidation of basic taxoids from *Taxus wallichiana* by electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 15, p. 3583-3589, 2001.
24. MINGUZZI, S.; BARATA, L. E. S.; SHIN, Y. G.; JONAS, P. F.; CHAI, H. B.; PARK, E. J.; PEZZUTO, J. M.; CORDELL, G. A. Cytotoxic withanolides from *Acnistus arborescens*. **Phytochemistry**, v. 59, n. 6, p. 635-641, 2002.
25. STESSMAN, C. C.; EBEL, R.; CORVINO, A. J.; CREWS, P. Employing dereplication and gradient 1D NMR methods to rapidly characterize sponge-derived sesterterpenes. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 8, p. 1183-1186, 2002.
26. NIELSEN, K. F.; SMEDSGAARD, J. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardized liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. **Journal of Chromatography A**, v. 1002, n. 1-2, p. 111-136, 2003.
27. VAN ELSWIJK, D. A.; SCHOBEL, U. P.; LANSKY, E. P.; IRTH, H.; VAN DER GREEF, J. Rapid dereplication of estrogenic compounds in pomegranate (*Punica granatum*) using on-line biochemical detection coupled to mass spectrometry. **Phytochemistry**, v. 65, n. 2, p. 233-241, 2004.
28. WARIDEL, P.; WOLFENDER, J. L.; LACHAVANNE, J. B.; HOSTETTMANN, K. Identification of the polar constituents of Potamogeton species by HPLC-UV with post-column derivatization, HPLC-MSⁿ and HPLC-NMR, and isolation of a new ent-labdane diglycoside. **Phytochemistry**, v. 65, n. 16, p. 2401-2410, 2004.
29. DIJOUX, M. G.; SCHNABEL, P. C.; HALLOCK, Y. F.; BOSWELL, J. L.; JOHNSON, T. R.; WILSON, J. A.; IRELAND, C. M.; VAN SOEST, R.; BOYD, M. R.; BARROWS, L. R.; CARDELLINA, J. H. Antitumor activity and distribution of pyrroloiminoquinones in the sponge genus *Zyzya*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 21, p. 6035-6044, 2005.
30. LAMBERT, M.; STRK, D.; HANSEN, S. H.; SAIRAFIANPOUR, M.; JAROSZEWSKI, J. W. Rapid extract dereplication using HPLC-SPE-NMR: Analysis of isoflavonoids from *Smirnowia iranica*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 10, p. 1500-1509, 2005.
31. GU, J. Q.; WANG, Y.; FRANZBLAU, S. G.; MONTENEGRO, G.; TIMMERMAN, B. N. Dereplication of pentacyclic triterpenoids in plants by GC-EI/MS. **Phytochemical Analysis**, v. 17, n. 2, p. 102-106, 2006.

32. BOBZIN, S. C.; YANG, S. T.; KASTEN, T. P. Application of liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy to the identification of natural products. **Journal of Chromatography B**, v. 748, n. 1, p. 259-267, 2000.
33. LANG, G.; MITOVA, M. I.; ELLIS, G.; VAN DER SAR, S.; PHIPPS, R. K.; BLUNT, J. W.; CUMMINGS, N. J.; COLE, A. L. J.; MUNRO, M. H. G. Bioactivity profiling using HPLC/microtiter-plate analysis: Application to a New Zealand marine alga-derived fungus, *Gliocladium* sp. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 621-624, 2006.
34. SHIGEMATSU, N. F. Dereplication of natural products using LC/MS Pharmaceutical. **Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan**, v. 45, n. 3, p. 295-300, 1997.
35. FREDENHAGEN, A., DERRIEN, C., GASSMANN, E. An MS/MS library on an ion-trap instrument for efficient dereplication of natural products. Different fragmentation patterns for $[M+H]^+$ and $[M+Na]^+$ ions CPR analytics. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 3, p. 385-391, 2005.
36. DIECKMANN, R.; GRAEBER, I.; KAESLER, I.; SZEWZYK, U.; DOEHREN, H. Rapid screening and dereplication of bacterial isolates from marine sponges of the Sula Ridge by Intact-Cell-MALDI-TOF mass spectrometry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 4, p. 539-548, 2005.
37. WILLIAMSON, R. T.; CHAPIN, E. L.; CARR, A. W.; GILBERT, J. R.; GRAUPNER, P. R.; LEWER, P.; MCKAMEY, P.; CARNEY, J. R.; GERWICK, W. H. New diffusion-edited NMR experiments to expedite the dereplication of known compounds from natural product mixtures. **Organic Letters**, v. 2, n. 3, p. 289-292, 2000.
38. WOLFENDER, J. L.; TERREAUX, C.; HOSTETTMANN, K. The importance of LC-MS and LC-NMR in the discovery of new lead compounds from plants. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, p. 41-54, 2000.
39. BRUST, A.; GARSON, M.J. Dereplication of complex natural product mixtures by 2D NMR: Isolation of a new carbonimidic dichloride of biosynthetic interest from the tropical marine sponge *Stylotella aurantium*. **Chemical Research Communications**, v. 17, p. 33-37, 2004.
40. LAMBERT, M.; STRK, D.; HANSEN, S. H.; SAIRAFIANPOUR, M.; JAROSZEWSKI, J. W. Rapid extract dereplication using HPLC-SPE-NMR: Analysis of isoflavonoids from *Smirnowia iranica*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 10, p. 1500-1509, 2005.
41. HANSEN, M. E.; SMEDSGAARD, J.; LARSEN, T. O. X-Hitting: An algorithm for novelty detection and dereplication by UV spectra of complex mixtures of natural products. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 21, p. 6805-6817, 2005.
42. WOLFENDER, J. L.; QUEIROZ, E. F.; HOSTETTMANN, K. The importance of hyphenated techniques in the discovery of new lead compounds from nature. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 1, n. 3, p. 237-260, 2006.
43. SHEO, B. S.; BARRETT, J. F. Empirical antibacterial drug discovery-Foundation in natural products. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 1006-1015, 2006.

44. JIA, Q.; HONG, M. F. **Method for generating, screening, and dereplicating natural product libraries for the discovery of therapeutic agents**. WO 2003002134 A1, 09 jan. 2003.
45. ABEL, U.; KOCH, C.; SPEITLING, M.; HANSSKE, F. G. Modern methods to produce natural-product libraries. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, p. 453-458, 2002.
46. ELDRIDGE, G. R.; VERVOORT, H. C.; LEE, C. M.; CREMIN, P. A.; WILLIAMS, C. T.; HART, S. M.; GOERING, M. G.; O'NEIL-JOHNSON, M.; ZENG, L. High-throughput method for the production and analysis of large natural product libraries for drug discovery. **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 3963-3971, 2002.
47. HIGGS, R. E.; ZAHN, J. A.; GYGI, J. D.; HILTON, M. D. Rapid method to estimate the presence of secondary metabolites in microbial extracts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 371-376, 2001.
48. NEGRI, A.; STIRLING, D.; QUILLIAM, M.; BLACKBURN, S.; BOLCH, C.; BURTON, I.; EAGLESHAM, G.; THOMAS, K.; WALTER, J.; WILLIS, R. Three novel hydroxybenzoate saxitoxin analogues isolated from the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. **Chemical Research in Toxicology**, v. 16, p. 1029-1033, 2003.
49. HAO, E.; FROMONT, J.; JARDINE, D.; KARUSO, P. Natural products from sponges of the genus *Agelas* - on the trail of a [2+2]-photoaddition enzyme. **Molecules**, v. 6, p. 130-141, 2001.
50. PHAM, L. H.; VATER, J.; ROTARD, W.; MUGGE, C. Identification of secondary metabolites from *Streptomyces violaceoruber* TU22 by means of on-flow LC-NMR and LC-DAD-MS. **Magnetic Resonance Chemistry**, v. 43, p. 710-23, 2005.
51. SCHOBEL, U.; FRENAY, M.; VAN ELSWIJK, D. A.; MCANDREWS, J. M.; LONG, K. R.; OLSON, L. M.; BOBZIN, S. C.; IRTH, H. High resolution screening of plant natural product extracts for estrogen receptor α and β binding activity using an online HPLC-MS biochemical detection system. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 6, p. 291-303, 2001.
52. VAN ELSWIJK, D. A.; SCHOBEL, U. P.; LANSKY, E. P.; IRTH, H.; VAN DER GREEF, J.; KIADIS, L. Rapid dereplication of estrogenic compounds in pomegranate (*Punica granatum*) using on-line biochemical detection coupled to mass spectrometry. **Phytochemistry**, v. 65, p. 233-241, 2004.
53. NIELSEN, K. F.; SMEDSGAARD, J. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardized liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. **Journal of Chromatography A**, v. 1002, n. 1-2, p. 111-136, 2003.
54. NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311-335, 2012.
55. GANESAN, A. The impact of natural products upon modern drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, p. 306-317, 2008.

56. BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine Natural Products. **Natural Product Reports**, v. 28, p. 196-268, 2011.
57. GLASER, K. B.; MAYER, A. M. S. A renaissance in marine pharmacology: From preclinical curiosity to clinical reality. **Biochemical Pharmacology**, v. 78, p. 440-448, 2009.
58. GERWICK, W. H.; MOORE, B. S. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. **Chemistry & Biology**, v. 19, p. 85-98, 2012.
59. ARNAUD-HAOND, S.; ARRIETA, J. M.; DUARTE, C. M. Marine Biodiversity and Gene Patents. **Science**, v. 331, p. 1521-1522, 2011.
60. PORIFERA BRASIL. **As esponjas**. 2012. Disponível em:
<<http://www.poriferabrasil.mn.ufrj.br/>>. Acesso em: 23 ago. 2014.
61. ISBISTER, G. K.; HOOPER, J. N. Clinical effects of stings by sponges of the genus *Tedania* and a review of sponge stings worldwide. **Toxicon**, v. 46, p. 782-785, 2005.
62. PARAMESWARAN, P. S.; NAIK, C. G.; HEGDE, V. R. Secondary metabolites from the sponge *Tedania anhelans*: Isolation and characterization of two novel pyrazole acids and other metabolites. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 802-803, 1997.
63. SCHMITZ, F.J.; GUNASEKERA, S. P.; YALAMANCHILI, G.; HOSSAIN, M. B.; VAN DER HELM, D. Tedanolide: A potent cytotoxic macrolide from the Caribbean sponge *Tedania ignis*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 106, n. 23, p. 7251-7252, 1984.
64. QUINN, R. J.; GREGSON, R. P.; COOK, A. F.; BARTLETT, R. T. Isolation and synthesis of 1-methylisoguanosine, a potent pharmacologically active constituent from the marine sponge *Tedania digitata*. **Tetrahedron Letters**, v. 21, p. 567-568, 1980.
65. SELDES, A. M.; GROS, E. G.; ROVISOTA, J.; VASQUEZ, M. L.; SAN-MARTIN, A. Sterols from the merine sponge *Tedania excavata*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 16, n. 5, p. 495-496, 1988.
66. DILLMAN, R. L.; CARDELLINA, J. H. Aromatic secondary metabolites from the sponge *Tedania ignis*. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 4, p. 1056-1061, 1991.
67. COSTANTINO, V.; FATTORUSSO, E.; MANGONI, A.; PERINU, C.; CIRINO, G.; DE GRUTTOLA, L.; ROVIEZZO, F. Tedanol: A potent anti-inflammatory *ent*-pimarane diterpene from the Caribbean sponge *Tedania ignis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 7542-7547, 2009.
68. COSTANTINO, V.; FATTORUSSO, E.; MANGONI, A.; PERINU, C.; TETA, R.; PANZA, E.; IANARO, A. Tedarenes A and B: Structural and stereochemical analysis of two ane strained cyclic diarylheptanoids from the marine sponge *Tedania ignis*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 77, p. 6377-6383, 2012.

69. MOTHEs, B.; HAJDU, E.; VAN SOEST, R. W. M. *Tedania brasiliensis* new species (Demospongiae, Poecilosclerida, Tedaniidae) from Brazil, with some remarks about the genus *Tedania* on the tropical southwestern Atlantic. **Bulletin of Marine Science**, v. 66, n. 1, p. 1-11, 2000.
70. PEREIRA, R. C.; SOARES-GOMES, A. **Biologia marinha**. Rio de Janeiro: Interciência, 2009. 631 p.
71. YAO, B.; PRINSEP, M. R.; NICHOLSON, B. K.; GORDON, D. P. The Pterocellins, novel bioactive alkaloids from the marine bryozoan *Pterocella vesiculosa*, **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1074-1077, 2003.
72. WAESCHENBACH, A.; VIEIRA, L. M.; REVERTER-GIL, O.; SOUTO-DERUNGS, J.; NASCIMENTO, K. B.; FEHLAUER-ALE, K. H. A phylogeny of Vesiculariidae (Bryozoa, Ctenostomata) supports synonymization of three genera and reveals possible cryptic diversity. **Zoologica Scripta**, v. 44, n. 6, p. 667-683, 2015.
73. ROBINSON, Nicole Michelle. **Interactions between the nudibranch *Okenia zoobotryon* and its bryozoan prey *Zoobotryon verticillatum***. 2004. 67f. Tese (Mestrado em Biologia) - College of Arts and Sciences, University of Central Florida, Florida, 2004.
74. SATO, A.; FENICAL, W. Gramine-derived bromo-alkaloids from the marine bryozoan *Zoobotryon verticillatum*. **Tetrahedron Letters**, v. 24, n. 5, p. 481-484, 1983.
75. ORTEGA, M. J.; ZUBIA, E.; SALVA, J. A new brominated indole-3-carbaldehyde from the marine bryozoan *Zoobotryon verticillatum*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 4, p. 633-636, 1993.
76. COSTANTINO, V.; FATTORUSSO, E.; MANGONI, A. Three new brominated e iodinated tyrosine derivatives from *Iotrochota birotulata*, a non-Verongida sponge. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 11, p. 1552-1556, 1994.
77. MARQUEZ, D. M.; MARQUEZ, M. E.; MARTINEZ, A.; OLIVIER, T. Isolation of a bromotyrosine derivative compound of a bioactive fraction from the marine sponge *Iotrochota birotulata* from the Uraba Gulf (Colombia). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, n. 2, p. 392-396, 2011.
78. KOSSUGA, M. H.; NASCIMENTO, A. M.; REIMAO, J. Q.; TEMPONE, A. G.; TANIWAKI, N. N.; VELOSO, K.; FERREIRA, A. G.; CAVALCANTI, B. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; MAYER, A. M. S.; HAJDU, E.; BERLINCK, R. G. S. Antiparasitic, antineuroinflammatory, and cytotoxic poliketides from the marine sponge *Plakortis angulospiculatus* collected in Brazil. **Journal of Natural Products**, v. 71, p. 334-339, 2008.
79. LI, L.; DENG, Z.; FU, H.; LI, J.; PROKSCH, P.; LIN, W. H. Chemical constituents from the marine sponge *Iotrochota birotulata*. **Pharmazie**, v. 58, p. 680-681, 2003.
80. FUSETANI, N.; SUGAWARA, T.; MATSUNAGA, S.; HIROTA, H. Bioactive marine metabolites. Part 35. Vytotoxic metabolites of the marine sponge *Mycale adhaerens* Lambe. **Journal of Organic Chemistry**, v. 56, n. 16, p. 4971-4974, 1991.

81. SHEN, S.; LIU, D.; WEI, C.; PROKSCH, P.; LIN, WENHAN, L. Purpurines A-J, halogenated alkaloids from the sponge *Iotrochota purpurea* with antibiotic activity and regulation of tyrosine kinases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 6924-6928, 2012.
82. SEGRAVES, N. L.; CREWS, P. Investigation os brominated tryptophan alkaloids from two Thorectidae sponges: *Trorectandra* and *Smenospongia*. **Journal of natural products**, v. 68, n. 10, p. 1484-1488, 2005.
83. CAPON, R. J.; PENG, C.; DOOMS, C. Trachycladindoles A-G: cytotoxic heterocycles from an Australian marine sponge, *Trachycladus laevispirulifer*. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 6, p. 2765-2771, 2008.
84. MORRIS, B. D.; PRINSEP, M. R. Amathaspiramides A-F, novel brominated alkaloids from the marine bryozoan *amathia wilsoni*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 5, p. 688-693, 1999.
85. BLOOR, S. J.; SCHMITZ, F. J. A novel pentacyclic aromatic alkaloid from an ascidian. **Journal of American Chemistry Society**, v. 109, n. 20, p. 6134-3136, 1987.
86. GUELLA, G.; MANCINI, I.; DUHET, D.; RICHER, B.; PIETRA, F. Ethyl 6-bromo-3-indolcarboxylate and 3-hydroxyacetal-6-bromoindole, novel bromoindoles from the sponge *Pleroma menoui* of the Coral Sea. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 44c, p. 914-916, 1989.
87. PEREIRA F. R.; BERLINCK, R. G. S.; RODRIGUES, E.; VELOSO, K.; FERREIRA, A. G.; PADULA, V. Metabólitos secundários dos nudibrânquios *Tambja stegosauriformis*, *Hypselodoris lajensis* e *Okenia zoobotryon* e dos briozoários *Zoobotryon verticillatum* e *Bugula dentata* da costa do Brasil. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2194-2201, 2012.
88. RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS C. H.; JARDIM, I. C. S.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e electroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
89. HASHIMOTO, Larissa. **Avaliação do potencial químico defensivo do briozoário *Zoobotryon verticillatum* em uma ampla escala geográfica**. 2014. 89f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Geociências, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2014.
90. ASSMANN, M.; ZEA, S.; KOCK, M. Sventrin, a new bromopyrrole alkaloid from the Caribbean sponge *Agelas sventres*. **Journal of Natural Porducts**, v. 64, p. 1593-1595, 2001.
91. PEREIRA, Fábio Renato. **Metabólitos Secundários Bioativos e Mediadores de Relação Predador/Presa de Invertebrados Marinhos**. 2011. 178f. Tese (Doutorado em Físico - Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.
92. NATURE. **Targets in the polyamine methabolic pathway**. 2007. Disponível em: <http://www.nature.com/nrd/journal/v6/n5/fig_tab/nrd2243_F1.html>. Acesso em: 23 fev. 2016.

93. SOMSÁK, L.; KOVÁCS, L.; TÓTH, M.; ÖSZ, E.; SZILÁGYI, L.; GYÖRGYDEÁK, Z.; DINYA, Z.; DOCSA, T.; TÓTH, B.; GERGELY, P. Synthesis of and a comparative study on the inhibition of muscle and liver glycogen phosphorylases by epimeric pairs of D-Glucopyranosylidene-spiro-(thio)hydantoins and N-(D-Glucopyranosyl) Amides. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 2843-2848, 2001.
94. CZIFRÁK, K.; SOMSÁK, L. Radical-mediated bromination of carbohydrate derivatives: searching for alternative reaction conditions without carbon tetrachloride. **Tetrahedron Letters**, v. 43, p. 8849-8852, 2002.
95. CZIFRÁK, K.; SZILÁGYI, P.; SOMSÁK, L. Anomeric α -azido acid (2-azido-2-deoxy-hept-2-ulopyranosonic acid) derivatives en route to peptides incorporating sugar amino acids. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 16, p. 127-141, 2005.
96. CZIFRÁK, K.; GYÓLLAI, V.; KÖVÉR, K. E.; SOMSÁK, L. Ritter-type reaction of C-(1-bromo-1-deoxy-D-glycopyranosyl)formamides and its application for the synthesis of oligopeptides incorporating anomeric α -amino acids. **Carbohydrate Research**, v. 346, p. 2104-2112, 2011.
97. HANINGTON, P. M.; JUNG, M. E. Selective bromination of β -Ribofuranosyl amide. enantioselective synthesis of (+)-hydantocidin. **Tetrahedron Letters**, v. 35, p. 5145-5148, 1994.
98. SOMSÁK, L.; NAGY, V. A new, scalable preparation of a glucopyranosylidene-spiro-thiohydantoin: one of the best inhibitors of glycogen phosphorylases. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 11, p. 1719-1727, 2000.