Messias Santos Passos

Metabólitos secundários das esponjas *Aiolochoira crassa* e *Dysidea robusta* e do fungo *Aspergillus sydowii*

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

Área de Concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck

São Carlos

2013

Dedicatória

*À minha família
em especial à minha sobrinha Maria Alice*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Roberto G. S. Berlínck pela orientação, paciência e imprescindíveis ensinamentos no desenvolvimento deste trabalho.

A todos os alunos Grupo de Química Orgânica de Produtos Naturais, ao colega Mario Santos e às colaboradoras Fabiana Rodrigues e Karin Bandeira por todo aprendizado nascido com o convívio.

*À colega Karen de Jesus pelo estudo inicial com o fungo *Aspergillus sydowii* e pela amizade e cumplicidade.*

Aos ex-colegas de Grupo e amigos, Dr^a. Miriam Kossuga, Dr. Fábio Pereira e Dr. Eli Pimenta, que muito utilizaram de suas experiências para me ensinar técnicas, conceitos e fundamentos.

Ao Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira e todos do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da UFSCar, pela obtenção dos espectros de RMN.

Ao D. Raymond J. Andersen e ao Dr. Davis E. Williams da University of British Columbia (Vancouver, Canada), pela obtenção de espectros de RMN e massas.

Ao Instituto de Química de São Carlos pela infraestrutura disponibilizada

Às agências de fomento CAPES, pela bolsa de mestrado e FAPESP, pelo aporte financeiro do projeto temático ao qual está ligado este trabalho.

Sumário

Índice de Figuras

Índice de Tabelas

Lista de Símbolos e Abreviaturas

Resumo

Abstract

1 Introdução.....	13
1.1 Produtos Naturais Marinhos.....	13
1.1 Produtos Naturais Marinhos e suas atividades em sistemas biológicos	15
1.2 As Esponjas Marinhas e seus Produtos Naturais.....	16
1.3 Os Fungos Marinhos e seus Produtos Naturais	18
2 Justificativa.....	21
3 Objetivos.....	22
4 Procedimentos Experimentais	23
4.1 Métodos cromatográficos	23
4.1.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	23
4.1.2 Cromatografia em coluna pré-empacotada.....	23
4.1.3 Cromatografia de Permeação em Gel	24
4.1.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	24
4.1.4.1 Condições de análise das amostras por CLAE-UV-EM.....	24
4.1.5 Solventes	25
4.2 Técnicas Espectroscópicas e Espectrométricas.....	25
4.2.1 Ressonância Magnética Nuclear	25
4.2.2 Medidas de rotação específica $[\alpha]_D$	26
4.2.3 Espectrometria de Massas.....	26
4.3 Isolamento de Produtos Naturais de esponjas marinhas.....	26
4.3.1 Estudo químico da esponja <i>Aiolochoiria crassa</i>	26
4.3.1.1 Preparação do extrato bruto e partições da esponja <i>Aiolochoiria crassa</i>	26
(BA04ES-39)	26
4.3.1.2 Fracionamento do extrato aquoso da esponja <i>Aiolochoiria crassa</i>	28
(BA04ES-39W)	28
4.3.1.3 Análise do extrato acetato de etila (BA04ES-39A) e do extrato aquoso.....	28
(BA04ES-39W) da esponja <i>Aiolochoiria crassa</i> por CLAE-UV-EM.....	28
4.3.1.4 Fracionamento do extrato acetato de etila (BA04ES-39A) da esponja.....	28

<i>Aiolochoiria crassa</i> por CLAE-UV	28
4.3.1.5 Purificação das frações BA04ES-39W1 e BA04ES-39W3, obtidas do extrato aquoso da esponja <i>Aiolochoiria crassa</i> , por CLAE-UV	29
4.3.2 Estudo químico da esponja <i>Dysidea robusta</i>	31
4.3.2.1 Preparo do extrato bruto da esponja <i>Dysidea robusta</i> (Dr).....	31
4.3.2.2 Preparo dos extratos hexano (DrH) e acetato de etila (DrA)	31
4.3.2.3 Preparo do extrato aquoso (DrW) da esponja <i>Dysidea robusta</i>	32
4.3.2.4 Separação do extrato aquoso (DrW) por Cromatografia em Coluna..... de fase reversa	34
4.3.2.5 Separação da fração DrW2 por CLAE-UV	35
4.3.2.6 Separação da fração DrW2P3 por CLAE-UV	36
4.4 Isolamento de Metabólitos Secundários do meio de cultura do fungo..... <i>Aspergillus sydowii</i>	37
4.4.1 Obtenção do extrato bruto da linhagem fúngica <i>Aspergillus sydowii</i>	38
4.4.2 Pré-purificação do extrato acetato de etila do meio de cultura líquido	38
4.4.3 Separação da fração DRG1M2-MC	39
4.4.4 Separação da fração DRG1M2-ME.....	41
5 Resultados e discussão	44
5.1 Estudo químico da esponja marinha <i>Aiolochoiria crassa</i>	44
5.1.1 Identificação estrutural do composto presente nas frações BA04ES-39A3..... e BA04ES-39W3C.....	47
5.1.2 Identificação estrutural do composto BA04ES-39W1C	52
5.2 Estudo químico da esponja marinha <i>Dysidea robusta</i>	57
5.2.1 Identificação estrutural dos compostos presentes na fração DrW2P3C	60
5.3 Estudo químico do fungo <i>Aspergillus sydowii</i>	67
5.3.1 Reativação da linhagem DRG-1	67
Figura 5. 29 - Cromatograma CLAE-UV 254 nm (A), Espectros de absorções no UV (B), Espectros de	70
5.3.2 Identificação estrutural do composto DRG1M2-MC2-4D.....	71
6 Conclusões.....	82
7 Referências bibliográficas.....	83
8 Anexos	92

Índice de Figuras

Figura 1. 1 - Estruturas da espongotimidina (1), espongouridina (2), ara-A (3) e ara-C (4) .	13
Figura 1. 2 - Distribuição de produtos naturais marinhos por filo de 1965 a 2007	14
Figura 1. 3 - Distribuição de produtos naturais marinhos por filo de 2008 a 2010	15
Figura 1. 4 - Compostos isolados de organismos marinhos com atividade biológica	16
Figura 1. 5 - Compostos bioativos isolados de esponjas marinhas	18
Figura 1. 6 - Compostos bioativos isolados de fungos do ambiente marinho	19
Figura 1. 7 - Compostos bioativos recentemente isolados de fungos marinhos	20
Figura 4. 1 - Obtenção dos extratos hexano e acetato de etila da esponja BA04ES-39	27
Figura 4. 2 - Separação do extrato acetato de etila por CLAE-UV.....	29
Figura 4. 3 - Separação da fração BA04ES-39W1 por CLAE-UV.....	29
Figura 4. 4 - Separação da fração BA04ES-39W3 por CLAE-UV.....	30
Figura 4. 5 - Obtenção dos extratos hexano e acetato de etila da esponja <i>Dysidea robusta</i>	32
Figura 4. 6 - Fluxograma da obtenção do extrato aquoso da esponja <i>Dysidea robusta</i>	33
Figura 4. 7 - Fracionamento do extrato aquoso da esponja Dr por cromatografia em coluna Sep-Pak®	35
Figura 4. 8 - Separação da fração DrW2 por CLAE-UV	35
Figura 4. 9 - Purificação da fração DrW2P3 por CLAE-UV.....	36
Figura 4. 10 - Fracionamento do extrato metanólico do fungo DRG1M2 por Sephadex LH-20	39
Figura 4. 11 - Fracionamento cromatográfico da fração DRG1M2-MC.....	40
Figura 4. 12 - Purificação da fração DRG1M2-ME	42
Figura 4. 13 - Purificação da subfração DRG1M2-ME1C4	43
Figura 4. 14 - Purificação da subfração DRG1M2-ME1C5	43
Figura 5. 1 - Compostos bioativos isolados de esponjas pertencentes à ordem Verongida	45
Figura 5. 2 - Foto da esponja marinha <i>Aiolochoiria crassa</i> e sua classificação taxonômica .	45
Figura 5. 3 - Compostos bioativos isolados da esponja <i>Aiolochoiria crassa</i>	46
Figura 5. 4 - Compostos isolados da esponja BA04ES-39 (<i>Aiolochoiria crassa</i>).....	47
Figura 5. 5 - Espectros de massas e absorção no UV das frações BA04ES-39A3 e BA04ES-39W3C	47
Figura 5. 6 - Cromóforo típico do éster metílico do ácido verongidóico	48
Figura 5. 7 - RMN de ¹ H (400 MHz) das frações BA04ES-39A3 e BA04ES-39W3C solubilizada em DMSO- <i>d</i> ₆	49
Figura 5. 8 - Atribuição dos sinais de ¹ H e ¹³ C do composto presente nas frações BA04ES-39A3 e	51
Figura 5. 9 - Estrutura química da purealidina L (28).....	51
Figura 5. 10 - Espectros de massas e de absorção no UV da fração BA04ES-39W1C.....	53
Figura 5. 11 - Cromóforo típico dos derivadios do 1-alquil-4-alcoxi-3,5-dibromobenzeno....	53
Figura 5. 12 - RMN de ¹ H (400 MHz) da fração BA04ES-39W1C solubilizada em DMSO- <i>d</i> ₆	54
Figura 5. 13 - Atribuição dos sinais de ¹ H do composto presente nas frações BA04ES-39W1C	56
Figura 5. 14 - Estrutura química da 3-bromo- <i>N,N,N,O</i> -trimetiltirosina (29)	56
Figura 5. 15 - Foto da esponja marinha <i>Dysidea robusta</i> e sua classificação taxonômica ..	57
Figura 5. 16 - Compostos bioativos isolados de esponjas da ordem dictyoceratida	58

Figura 5. 17 - Compostos isolados a partir da esponja marinha <i>Dysidea robusta</i>	59
Figura 5. 18 - Compostos isoladas da esponja <i>Dysidea robusta</i>	59
Figura 5. 19 - Espectros de absorção no UV e massas da fração DrW2P3C	60
Figura 5. 20 - RMN de ^1H (600 MHz) da fração DrW2P3C solubilizada em DMSO- d_6	61
Figura 5. 21 - RMN de ^{13}C (600 MHz) da fração DrW2P3C solubilizada em DMSO- d_6	61
Figura 5. 22 - Correlações observadas nos mapas de contorno gHMBC e gCOSY para o composto	63
Figura 5. 23 - Correlações observadas no mapa de contorno gHMBC para o composto presente na fração	64
Figura 5. 24 - Correlações observadas no mapa de contorno gHMBC para o composto presente na fração	64
Figura 5. 25 - Estruturas dos compostos presentes na fração DrW2P3C com atribuições de carbono e	65
Figura 5. 26 - Estrutura da palitazina (38) e da isopalitazina (39)	67
Figura 5. 27 - Foto do fungo <i>Aspergillus sydowii</i> e sua classificação taxonômica	68
Figura 5. 28 - Estruturas de compostos isolados a partir do fungo <i>Aspergillus sydowii</i>	69
Figura 5. 29 - Cromatograma CLAE-UV 254 nm (A), Espectros de absorções no UV (B), Espectros de	70
Figura 5. 30 - Estrutura do ácido sidowico (47) isolado do fungo <i>Aspergillus sydowii</i>	71
Figura 5. 31 - Espectros de absorção no UV e massas da fração DRG1M2-MC2-4D	72
Figura 5. 32 - RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) da fração DRG1M2-MC2-4D solubilizada em DMSO- d_6	73
Figura 5. 33 - Correlações observadas nos mapas de contorno gCOSY e gHMBC para o composto	75
Figura 5. 34 - Correlações observadas nos mapas de contorno gCOSY e gHMBC para o composto	76
Figura 5. 35 - Semiestrutura do composto presente na fração DRG1-M2MC2-4D	77
Figura 5. 36 - Estrutura do composto presente na fração DRG1-M2MC2-4D com atribuições de carbono e	78
Figura 5. 37 - Estrutura do (-)-ácido sidowico (47)	81
Figura 8. 1 - Espectro de RMN de ^1H da fração BA04ES-39W3C em DMSO- d_6 (400 MHz)	92
Figura 8. 2 - Espectro de RMN de ^1H da fração BA04ES-39W1C em DMSO- d_6 (400 MHz)	93
Figura 8. 3 - Espectro de massas (ESI+) da fração DrW2P3C	94
Figura 8. 4 - Espectro de RMN de ^1H da fração DrW2P3C, em DMSO- d_6 (600 MHz)	95
Figura 8. 5 - Espectro de RMN de ^{13}C da fração DrW2P3C, em DMSO- d_6 (600 MHz)	96
Figura 8. 6 - Espectro HSQC ^1H - ^{13}C da fração DrW2P3C, em DMSO- d_6	97
Figura 8. 7 - Espectro HMBC ^1H - ^{13}C da fração DrW2P3C, em DMSO- d_6	98
Figura 8. 8 - Espectro COSY ^1H - ^1H da fração DrW2P3C, em DMSO- d_6	99
Figura 8. 9 - Espectro de RMN de ^1H da fração DRG1M2-MC2-4D, em DMSO- d_6 (400 MHz)	100
Figura 8. 10 - Espectro de RMN de ^{13}C da fração DRG1M2-MC2-4D, em DMSO- d_6 (100 MHz)	101
Figura 8. 11 - Espectro HSQC ^1H - ^{13}C da fração DRG1M2-MC2-4D, em DMSO- d_6	102
Figura 8. 12 - Espectro HMBC ^1H - ^{13}C da fração DRG1M2-MC2-4D, em DMSO- d_6	103
Figura 8. 13 - Espectro COSY ^1H - ^1H da fração DRG1M2-MC2-4D, em DMSO- d_6	104

Índice de Tabelas

Tabela 4. 1 - Sais utilizados no preparo de água do mar artificial	37
Tabela 5. 1 - Estudo comparativo dos valores de RMN de ^1H para o composto purealidina L (28).....	50
Tabela 5. 2 - Estudo comparativo dos valores de RMN de ^1H para o composto 3-bromo- <i>N,N,N,O</i> - trimetiltirosinia (29)	55
Tabela 5. 3 - Deslocamentos de RMN de ^1H e ^{13}C e as correlações observadas para os compostos presentes na fração DrW2P3C	65
Tabela 5. 4 - Estudo comparativo dos valores de RMN de ^1H e ^{13}C para a palitazina (38) ..	66
Tabela 5. 5 - Resultado do bioensaio dos extratos obtidos dos meios de cultura do fungo .	70
Tabela 5. 6 - Deslocamentos de RMN de ^1H e ^{13}C e as correlações observadas para o composto presente na fração DRG1M2-MC2-4D.....	79
Tabela 5. 7 - Estudo comparativo dos valores de RMN de ^1H e ^{13}C para o composto ácido sidowico (47)	80

Lista de Símbolos e Abreviaturas

AcOEt – Acetato de etila

c – Concentração

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CDCl₃ – Clorofórmio deuterado

CD₃OD – Metanol deuterado

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

COSY – *Correlation Spectroscopy*

d – Dublete

dd – Duplo dublete

DMSO-*d*₆ – Dimetilsulfóxido deuterado

D₂O – Água deuterada

EM – Espectrometria de massas

ESI – *Eletrospray Ionization*

EtOH – Etanol

GPY – *Glucose, Peptone, Yeast extract*

HMBC – *Heteronuclear Multiple-Bond Correlation*

HSQC – *Heteronuclear Single-Quantum Correlation*

IC₅₀ – Concentração que promove 50% de inibição do desenvolvimento celular ou da atividade enzimática

J – Constante de acoplamento

MeOH – Metanol

MeCN - Acetonitrila

m - Multiplete

RMN de ^1H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN de ^{13}C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

s – Singlete

t - Triplete

TMS – Tetrametilsilano

UV – Ultravioleta

δ – Deslocamento químico

$[\alpha]_D$ – Rotação ótica específica

Resumo

Esponjas e micro-organismos isolados do meio marinho constituem grupos biológicos que apresentam produção e/ou acúmulo de substâncias do metabolismo secundário com ações em diversos sistemas biológicos. Neste trabalho foi realizada a investigação química das esponjas marinhas *Aiolochoia crassa* e *Dysidea robusta* e do meio de cultura de crescimento do fungo *Aspergillus sydowii*, isolado da esponja *Dragmacidon reticulatum*, com o objetivo de ampliar o conhecimento sobre a química destes organismos. O extrato bruto da esponja *Aiolochoia crassa* apresentou atividade antiviral e foi submetido à separação de seus componentes por diferentes técnicas de fracionamento. Foram obtidos dois compostos puros identificados como os alcaloides derivados da bromotirosina, purealidina L e a 3-bromo-*N,N,N,O*-trimetiltirosina. Já o extrato aquoso da esponja *Dysidea robusta* foi submetido a sucessivas separações por CLAE-UV até a purificação de uma fração, que forneceu uma mistura de pirazinas isoméricas, a palitazina e a isopalitazina. O fungo *Aspergillus sydowii* cultivado em meio líquido forneceu extrato que apresentou atividade anticancerígena. Uma sequência de separações por CLAE-UV levou ao isolamento de três compostos puros: o ácido sidowico e dois compostos adicionais cujas estruturas ainda não foram identificadas.

Palavras-chave: *Aiolochoia crassa*, *Dysidea robusta*, *Aspergillus sydowii*

Abstract

Sponges and micro-organisms isolated from the marine environment are groups that have biological production and/or accumulation of substances of secondary metabolism with shares in various biological systems. This work was conducted chemical research of marine sponges *Dysidea robusta* and *Aiolochoia crassa* and culture medium for growth of the fungus *Aspergillus sydowii* isolated sponge *Dragmacidon reticulatum*, with the goal of increasing knowledge about the chemistry of these organisms. The crude extract of the sponge *Aiolochoia crassa* showed antiviral activity and was subjected to separation des components by different fractionation techniques. Two pure compounds obtained were identified as derivatives of alkaloids bromotyrosine, purealidin L and 3-bromo-*N,N,N,O*-trimethyltyrosine. The aqueous extract of the sponge *Dysidea robusta* underwent successive separations by HPLC-UV to the purification of a fraction, which provided a mixture of isomeric pyrazines, the palythazine and the isopalythazine. The fungus *Aspergillus sydowii* cultivated in liquid medium has provided that extract showed anticancer activity. A sequence of separations by HPLC-UV allowed the isolation of three pure compounds: sydowico acid and two additional compounds whose structures have not yet been identified.

Keywords: *Aiolochoia crassa*, *Dysidea robusta*, *Aspergillus sydowii*

1 Introdução

1.1 Produtos Naturais Marinhos

A diversidade de seres marinhos representada pelo conjunto de animais, algas, plantas e micro-organismos constituem uma fonte de grande diversidade química que tem demonstrado apreciável potencial farmacológico e biotecnológico (APPELTANS et al. 2012; FREITAS et al. 2012;).

Há muito se sabe que o homem utiliza de recursos naturais, principalmente oriundos de plantas, para o tratamento de enfermidades. Contudo, nas últimas décadas pôde se observar um crescente desenvolvimento da química de produtos naturais de organismos marinhos com o motivo de se descobrir novos modelos de fármacos.

O isolamento dos nucleosídeos espongotimidina (1) e da espongouridina (2) (Fig. 1.1) a partir da esponja *Cryptothetya crypta* (BERGMANN e FEENEY, 1950), é historicamente considerado como o início da busca de produtos naturais oriundos de organismos do meio marinho. A descoberta de tais compostos despertou o interesse pela busca de novos metabólitos de esponjas marinhas (BERGQUIST, 1978).

Figura 1. 1 - Estruturas da espongotimidina (1), espongouridina (2), ara-A (3) e ara-C (4)

Os estudos com análogos sintéticos destes nucleosídeos, a adenina-arabinosídeo (ara-A) (3) e a citosina-arabinosídeo (ara-C) (4), revelaram o grande potencial biológico destes compostos. Atualmente o antiviral Ara-A[®] (ara-A) é utilizado no tratamento de *Herpes simplex* e *Herpes zoster*. O anticancerígeno ara-C

é comercializado como Cytosar U[®] e é indicado para o tratamento de leucemia aguda não-linfocítica, leucemia crônica mielocítica e leucemia da meninge. Estes são os primeiros fármacos comercializados derivados de produtos de organismos marinhos.

De acordo com o mais recente levantamento (BLUNT et al. 2012), no ano de 2010 foram publicados 352 artigos, os quais apresentaram um total de 1003 compostos inéditos de organismos marinhos.

O gráfico da Figura 1.2 (BLUNT et al. 2009) apresenta a distribuição média do número de produtos naturais marinhos por filo isolados entre os anos de 1965 e 2005 e os números exatos para os anos de 2006 e 2007. Nota-se a predominância dos compostos isolados de micro-organismos, cnidários e principalmente de esponjas.

Figura 1. 2 - Distribuição de produtos naturais marinhos por filo de 1965 a 2007

Fonte: BLUNT, J. W. et al. **Natural Product Report**, 2009, 26, 170-224.

Um gráfico semelhante (Fig. 1.3) foi, por nós, construído a partir dos dados das revisões subsequentes publicadas entre 2008 e 2010 (BLUNT et al. 2010, 2011, 2012).

Figura 1. 3 - Distribuição de produtos naturais marinhos por filo de 2008 a 2010

Percebe-se uma queda no número de substâncias oriundas de cnidários e que o interesse no estudo de micro-organismos permanece crescendo exponencialmente, chegando em 2010, a ser o principal filo a partir do qual mais foram isolados novos produtos naturais, posto sempre ocupado pelas esponjas.

1.1 Produtos Naturais Marinhos e suas atividades em sistemas biológicos

O interesse no estudo de organismos marinhos se deve, em parte, à notável capacidade destes produzirem substâncias com apreciáveis atividades biológicas. Vários exemplos podem ser citados de produtos que inspiraram novos fármacos já comercializados ou se encontram em fase de testes clínicos. Alguns exemplos destas substâncias são mostrados na figura 1.4.

A halicondrina B (5), um poliéter isolado da esponja marinha *Halichondria okadai* (HIRATA e UEMURA, 1986), apresentou atividade citotóxica e o estudo de um de seus derivados sintéticos (o mesilato de eribulina) encontra-se em fase de testes clínicos contra células cancerígenas e já é considerado como nova opção no tratamento da metástase do câncer de mama. A ecteinascidina (Yondelis®) (6) isolada do tunicado *Ecteinascidia turbinata*, é atualmente comercializada e utilizada no tratamento de sarcoma de tecido mole (COSTA-LOTUFO et al. 2009).

A briostatina 1 (7) foi isolada inicialmente do briozoário *Bugula neritina* (PETTIT et al. 1982). Essa substância apresentou atividade anticâncer e imunoestimulante e encontra-se em fase de ensaios clínicos. A tiocoralina (8),

isolada inicialmente da bactéria *Micromonospora marina* (ROMERO et al. 1997) apresentou potente atividade citotóxica contra câncer renal, de pulmão, do colo e melanoma, também se encontra em fase de testes clínicos.

Figura 1. 4 - Compostos isolados de organismos marinhos com atividade biológica

1.2 As Esponjas Marinhas e seus Produtos Naturais

Bergquist (1978) define as esponjas como metazoários filtradores e sedentários, os quais utilizam um sistema composto por uma camada simples de células flageladas que servem para bombear uma corrente de água através do seu corpo. As células conseguem capturar as moléculas orgânicas presentes na água, das quais se alimentam, enquanto ela é bombeada pelo seu corpo. Porém, atualmente são conhecidas pelo menos três famílias compostas por algumas espécies de esponjas carnívoras: Cladorhizidae, Gutarridae e Esperiopsidae (VACELET et al. 1995; HAJDU; PEIXINHO e FERNANDES, 2011)

A existência das esponjas marinhas remonta ao período Pré-Cambriano, sendo, possivelmente os animais pluricelulares mais primitivos. A reprodução

essencialmente assexuada, a respiração por difusão, colorações, formas e tamanhos bem diversificados, podem ser assinalados como algumas das principais características das esponjas marinhas (BERGQUIST, 1978; PEIXINHO, 1999).

Dentre as características destes seres, sua forma de vida sésil e a morfologia apenas no nível celular - ausência de tecidos, órgãos e, principalmente, de sistema nervoso – poderiam justificar a capacidade destes animais em produzir e/ou acumular substâncias químicas para incrementar sua capacidade de adaptação ao meio em que se encontram. Por não apresentarem locomoção voluntária, as esponjas marinhas são alvos fáceis de predadores. Porém, as esponjas desenvolveram mecanismos de defesa química. A ocorrência de produtos naturais biologicamente ativos em grande diversidade nas esponjas são respostas adaptativas para sua sobrevivência. (PEIXINHO, 1999).

O filo Porifera é o que apresenta o maior número de espécies cujos estudos químicos levaram a descoberta de compostos com estruturas inéditas (ABBAS et al. 2011; ABED et al. 2011; BERBER et al. 2011; HITORA et al. 2011; MANZO et al. 2011; ZHANG; KHALIL e CAPON, 2011; ANKISSETTY e SLATTERY, 2012; LIU et al. 2012; TAKAHASHI et al. 2012; TANG et al. 2012; UDDIN et al. 2012; WILLIAMS et al. 2012).

Gandolfi e colaboradores (2010) relataram a atividade antituberculose da 11-cetofistularina-3 (**9**) a partir da esponja *Aplysina fistularis*. A 11-cetofistularina-3 (**9**) apresentou um valor de concentração inibitória de *Mycobacterium tuberculosis* de IC_{50} 16 µg/mL com um índice de seletividade de 40. Davis e colaboradores (2012) descreveram a atividade antimalárica da tsitsicamamina C (**10**), uma pirroloiminoquinona isolada a partir da esponja *Zyzzia* sp. O composto foi testado contra duas linhagens de *Plasmodium falciparum*, sensível a cloroquina (IC_{50} 13 nM) e uma resistente (IC_{50} 18 nM) à mafloquina. A citotoxicidade do composto também foi testada utilizando uma linhagem de célula de rim embrionário humano e apresentou atividade com IC_{50} de 3,6 µM.

A candidaspongeolida A (**11**) (WHITSON et al. 2011), isolada a partir da esponja *Candidaspongia* sp., apresentou potente atividade inibitória (IC_{50} 3,4 nM) do crescimento celular de melanoma. Williams e colaboradores (2012) isolaram os ácidos haliclóico A (**12**) e B (**13**) a partir da esponja *Haliclona* sp., que apresentaram significativa atividade inibitória da expressão da indoleamina 2,3-dioxigenase. A

figura 1.5 mostra estruturas de compostos isolados de esponjas com recentes estudos de suas ações em sistemas biológicos.

Figura 1. 5 - Compostos bioativos isolados de esponjas marinhas

1.3 Os Fungos Marinhos e seus Produtos Naturais

Os fungos são seres vivos eucariotos com características próprias que constituem um reino exclusivo, diferenciando-os assim, das plantas, grupo ao qual eram atribuídos até final da década de 60. Estão ecologicamente bem distribuídos como decompositores de matéria orgânica, como predadores e como parasitas em relações patogênicas ou mutualísticas (JORGE, 2012).

Os fungos marinhos obrigatórios esporulam e se desenvolvem exclusivamente no ambiente marinho. Os fungos marinhos facultativos são de origem terrestre ou de água doce que podem crescer no ambiente marinho (KOHLMEYER e KOLMEYER, 1979), ou aqueles que são isolados de sedimentos e organismos presentes na água do mar (FAULKNER, 1997). Poucos fungos isolados do mar são representantes do grupo dos fungos marinhos obrigatórios. A maioria

deles é terrestre que se adaptou às condições marinhas (JENSEN e FENICAL, 2002).

No que se refere ao estudo químico de fungos marinhos, a sicaina (**14**) (KUPKA et al. 1981) foi primeiro produto natural a ser isolado de um fungo marinho obrigatório, *Halocyphina villosa*. Nos anos seguintes, observou-se um crescente interesse pelos metabólitos de fungos marinhos, muitos dos quais são caracterizados por apresentarem significativas atividades biológicas.

Fungos marinhos associados a esponjas são os mais estudados para o isolamento de compostos inéditos com atividades biológicas. O extrato acetato de etila do meio de cultura de um fungo não identificado isolado da esponja *Spirastrella vagabunda*, que apresentou inibição de 23% de *Bacillus subtilis* em teste de difusão em disco, forneceu o policetídeo 14,15-secocurvularina (**15**) (ABRELL; BORGESON e CREWS, 1996). As gimnastatina A (**16**) B (**17**) e C (**18**) (NUMATA et al. 1997) foram os primeiros compostos com atividade citotóxica isolados de fungo em associação com uma esponja.

Figura 1. 6 - Compostos bioativos isolados de fungos do ambiente marinho

A asperazina (**19**) (VAROGLU e CREWS, 2000) mostrou ser um potente agente citotóxico contra células de leucemia com apreciável seletividade, pois, não mostrou atividade antifúngica ou antibiótica. A microesfaeropisina (**20**) (HÖLLER; KÖNIG e WRIGHT, 1999) obtida do fungo *Microsphaeropsis* sp., isolado da esponja *Myxilla incrustans*, apresentou moderada atividade antimicrobiana com concentração de 50 µg em disco.

A 6-O-metil-7-cloroaveratina (**21**) (HUANG et al. 2012) isolada do fungo *Aspergillus* sp., apresentou atividade citotóxica contra células tumorais de adenocarcinoma de mama humana (MCF-7), glioblastoma humano (SF-268) e carcinoma de pulmão de grandes células humanas (NCI-H460), em concentrações inibitórias de IC₅₀ 7,11, 6,64 e 7,42 µM, respectivamente. Ohkawa e colaboradores (2010) relataram o isolamento da hipocromina B (**22**) e sua atividade citostática, que inibiu a atividade da tirosina-quinase com concentração inibitória de IC₅₀ 18,0 µM.

Figura 1. 7 - Compostos bioativos recentemente isolados de fungos marinhos

2 Justificativa

A necessidade constante da descoberta de novos modelos para o desenvolvimento de fármacos com eficácia no tratamento de doenças, principalmente de origem microbiana, torna a pesquisa com produtos naturais um dos ramos do conhecimento humano de grande relevância.

Há uma grande motivação para a realização de pesquisas de produtos naturais marinhos, já que esses continuam sendo fonte de um grande número de substâncias inéditas e que apresentam ações diversas em sistemas biológicos. No entanto, a busca de metabólitos secundários a partir de organismos marinhos ainda é pouco difundida no Brasil se pensarmos na grande faixa litorânea que o país apresenta e na sua diversidade biológica e química.

Assim, os estudos nessa área contribuem com o avanço do conhecimento do metabolismo secundário das espécies marinhas do Brasil. Essas pesquisas servem ainda para incrementar a descoberta de substâncias conhecidas com propriedades adequadas para a sua potencial utilização em tratamentos de doenças como o câncer e infecções bacterianas, virais e parasitárias.

3 Objetivos

Este trabalho está inserido no âmbito de projeto temático intitulado “Investigação do potencial biotecnológico e metabólico de organismos marinhos para processos de biorremediação e produção de substâncias com atividades antivirais, antileishmania e anti-inflamatória”, que busca ampliar o escopo da descoberta de metabólitos secundários bioativos de organismos marinhos da costa do Brasil.

Este trabalho/dissertação de mestrado objetivou:

1. O isolamento de substâncias de extratos de invertebrados e micro-organismos marinhos avaliados em testes antileishmania, antiviral, anti-inflamatório e citotóxico;
2. Realizar fracionamento destes extratos para o isolamento e identificação das substâncias constituintes;
3. Avaliar o potencial da atividade biológica das substâncias puras nos bioensaios citados, quando isolados em quantidade suficiente.

4 Procedimentos Experimentais

4.1 Métodos cromatográficos

4.1.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Foram utilizadas cromatofolhas de sílica-gel 60 sobre poliéster com indicador ultravioleta F₂₅₄ 20 x 20 cm (Aldrich). Após a eluição da amostra, as cromatofolhas foram reveladas sob luz ultravioleta (UV) com lâmpada Spectroline de modelo ENF-240 C/FE nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm. Em seguida, as cromatofolhas foram borrifadas com diferentes soluções de reveladores para determinar grupos funcionais e classe dos compostos presentes.

Foi utilizada solução de 0,2 g de ninidrina em 100 mL de EtOH PA. (Qhemis), aquecendo-se a placa em seguida por alguns minutos, para identificação qualitativa de aminoácidos e aminas primárias. Uma solução de 20% de ácido fosfomolibdico em EtOH PA. (Quimex), também seguida de aquecimento, foi utilizada para identificação qualitativa de substâncias redutoras.

As placas também foram reveladas com solução Dragendorff (solução A: 0,85 g de nitrato básico de bismuto em 10,0 mL de ácido acético glacial e 40 mL de água; solução B: 8,00 g de iodeto de potássio dissolvido em 20 mL de água; mistura-se 1:1 das soluções A e B resultando em uma solução estoque e utiliza-se a mistura na proporção 1,0 mL da solução estoque com 2,0 mL de ácido acético glacial e 10,0 mL de água), para identificação qualitativa de alcaloides.

4.1.2 Cromatografia em coluna pré-empacotada

As cromatografias em colunas pré-empacotadas foram realizadas em colunas das marcas Waters Sep-Pak[®] vac 35 cc e Phenomenex Strata[®] que apresentavam como fase estacionária: sílica-gel; sílica-gel derivatizada com grupos octadecilsilano (C₁₈), fenila ou cianopropila com 2, 5 ou 10 g de fase estacionária.

4.1.3 Cromatografia de Permeação em Gel

Para as separações por exclusão de tamanho foi utilizada uma coluna de vidro nas dimensões de 1,70 m de comprimento e 2,0 cm de diâmetro interno, preenchida com Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech®). A eluição foi realizada com MeOH grau cromatográfico.

4.1.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para a separação por CLAE utilizou-se um sistema Waters® consistindo em duas bombas modelo 600, um registrador modelo 746, um sistema de controle Controller 600 e um detector espectrofotométrico UV-Visível com detecção em dois comprimentos de onda modelo 2487.

Foi utilizado também um sistema Waters® de injeção automática – Alliance modelo 2695 acoplado a um espectrofotômetro UV-Visível com detector de arranjo de fotodiodo modelo Waters 2996 (Detector de Arranjo de Fotodiodo – DAF) e a um detector espectrométrico de massas (Espectrômetro de Massas – EM) modelo Waters Micromass ZQ – (CLAE-UV-EM). Foram utilizadas diferentes colunas cromatográficas de acordo com a amostra analisada.

Todas as frações orgânicas obtidas após separação cromatográfica em modo normal foram concentradas e secas em evaporador rotativo. As frações aquosas obtidas em cromatografia de fase reversa foram secas em um sistema de centrífuga a vácuo, Savant modelo Speedvac® Plus SC 210.

4.1.4.1 Condições de análise das amostras por CLAE-UV-EM

Todas as análises das amostras obtidas de separações por cromatografia em coluna pré-empacotada foram realizadas utilizando-se uma coluna de sílica gel derivatizada com grupos octadecilsilano C₁₈ (Inertsil ODS-SP, 250 x 4,6 mm, 5µm). Foram realizadas análises de 40 minutos e fluxo de 1 mL por minuto, com um gradiente de eluição (H₂O/MeOH/MeCN (80%: 10%: 10%) + 0,1% de ácido fórmico) sofrendo mudança linear do solvente até 21 minutos quando era atingida a

composição de 100% MeOH/MeCN (1:1) a qual permanecia por 8 minutos e retornava à condição inicial.

Para análise das amostras obtidas de separações por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizou-se sempre uma coluna sílica gel derivatizada com grupos octadecilsilano (XTerra[®] MS C₁₈, 2,1 x 50 mm, 3,5 µm) em análises de 23 minutos e fluxo de 0,5 mL por minuto com gradiente de eluição (H₂O/MeOH/MeCN (90%: 5%: 5%) + 0,1% de ácido fórmico) sofrendo mudança linear do solvente até 12 minutos quando era atingida a proporção 100% MeOH/MeCN (1:1) que permanecia por 4 minutos até a condição inicial ser novamente atingida.

4.1.5 Solventes

Foram utilizados solventes de grau cromatográfico em todas as separações com cromatografias Sep-Pak, CCD e em Sephadex LH-20. Nas separações por CLAE também foram utilizados solventes em grau cromatográfico das marcas J. T Baker, Mallinckrodt e Panreac. A água utilizada em todas as separações foi obtida após purificação em sistema Milli-Q Millipore composto por filtro biológico e por resina de troca iônica.

4.2 Técnicas Espectroscópicas e Espectrométricas

4.2.1 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em um aparelho da marca Bruker modelo DRX (9,4 Tesla) operando a 400,35 MHz na frequência do hidrogênio (¹H) e a 100,1 MHz na frequência do carbono (¹³C), pertencente ao Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (DQ-UFSCar).

As amostras foram preparadas com dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆) e MeOH deuterado (CD₃OD). O tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como padrão de referência interna em todas as amostras. Os solventes são da marca Cambridge Isotopes.

4.2.2 Medidas de rotação específica $[\alpha]_D$

As medidas de rotação específica foram obtidas em um Polarímetro da marca JASCO modelo P1020 com cela cilíndrica de vidro modelo CG1-10 (f 10 mm I.D. x 10 mm), pertencente ao Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus Araraquara. As amostras foram preparadas com a dissolução de 1,0 mg do composto em 1,0 mL de MeOH grau cromatográfico da marca Panreac. As medidas foram feitas a 23 °C.

4.2.3 Espectrometria de Massas

Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos no modo de ionização por “spray de elétrons” em um detector espectrométrico do modelo Waters[®] Micromass ZQ 2000. Foram ainda obtidos espectros de massas de alta e baixa resolução com o espectrômetro Bruker-Hewlett Packard 1100 Esquire pertencente à University of British Columbia.

4.3 Isolamento de Produtos Naturais de esponjas marinhas

4.3.1 Estudo químico da esponja *Aiolochoia crassa*

4.3.1.1 Preparação do extrato bruto e partições da esponja *Aiolochoia crassa* (BA04ES-39)

A esponja *Aiolochoia crassa* foi coletada no litoral da Bahia no ano de 2004. O material disponível consistia de 2,7 g de massa úmida do animal. O extrato bruto foi preparado pela trituração da esponja com MeOH em liquidificador e posterior filtração à vácuo através de Celite.

O material sólido foi novamente extraído com MeOH em banho ultrassom por 3 minutos e em seguida filtrado. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes. A solução foi concentrada em evaporador rotativo e seca em centrífuga Speedvac[®], assim chegou-se ao extrato bruto com 228,0 mg de massa seca.

Devido à quantidade reduzida do material, o extrato bruto foi dissolvido em 10,0 mL de MeOH e transferido para um tubo de ensaio onde foram realizadas as

partições com hexano. Foi adicionado o mesmo volume de hexano à amostra e as fases foram separadas utilizando uma pipeta de Pasteur. Foram realizadas cinco extrações com hexano e o volume final de 50,0 mL foi seco em evaporador rotativo e foram obtidos 48,8 mg de extrato hexano.

A solução metanólica restante foi seca e em seguida solubilizada em 10,0 mL de H₂O. O mesmo procedimento das partições com hexano foi seguido para as partições com acetato de etila. Após este procedimento, a fase orgânica foi seca em evaporador rotativo e a fase aquosa foi seca em centrífuga Speedvac[®]. Ao final foram obtidos 16,0 mg de extrato acetato de etila e 143,1 mg de extrato aquoso.

O fluxograma a seguir (Fig. 4.1) apresenta a ilustração dos procedimentos seguidos para a obtenção do extrato bruto e partições com hexano e acetato de etila da esponja *Aiolochoia crassa*.

Figura 4. 1 - Obtenção dos extratos hexano e acetato de etila da esponja BA04ES-39

4.3.1.2 Fracionamento do extrato aquoso da esponja *Aiolochoia crassa* (BA04ES-39W)

O extrato aquoso (BA04ES-39W) foi fracionado em coluna pré-empacotada Sep-Pack[®] (2 g) com fase estacionária de sílica gel derivatizada com grupos octadecilsilano C₁₈, e como eluente foi utilizado um gradiente de MeOH:H₂O (50%:50%; 75%:25%) e MeOH 100%. Foram obtidas três frações denominadas de BA04ES-39W1 (117,3 mg), BA04ES-39W2 (3,6 mg), BA04ES-39W3 (15,2 mg).

4.3.1.3 Análise do extrato acetato de etila (BA04ES-39A) e do extrato aquoso (BA04ES-39W) da esponja *Aiolochoia crassa* por CLAE-UV-EM

As três frações obtidas a partir do extrato aquoso e o extrato acetato de etila foram analisadas por CLAE-UV-EM nas condições de análise apresentadas no tópico 4.1.4.1.

4.3.1.4 Fracionamento do extrato acetato de etila (BA04ES-39A) da esponja *Aiolochoia crassa* por CLAE-UV

Para o fracionamento por CLAE-UV dos constituintes do extrato de acetato de etila, utilizou-se uma coluna de sílica gel derivatizada com grupos octadecilsilano C₁₈ (Phenomenex[®], 100Å, 250 x 4,6 mm, 4 µm). Foram realizadas análises de 40 minutos com o gradiente de eluição (H₂O:MeOH:MeCN + 0,1% de ácido fórmico (80%:10%:10%) com uma mudança linear do solvente até 21 minutos quando era atingida a composição de 100% MeOH:MeCN (1:1) a qual permanecia por 8 minutos e retornava à condição inicial).

Coletou-se 8 frações (Fig. 4.2) que foram analisadas por CLAE-UV-EM. Observou-se que a maioria das frações eram misturas. A fração 3 apresentou elevado grau de pureza, e foi, então, preparada para obtenção de seu espectro de RMN de ¹H. O estudo das demais frações não foi continuado devido à pequena quantidade de massa destas.

Figura 4. 2 - Separação do extrato acetato de etila por CLAE-UV

4.3.1.5 Purificação das frações BA04ES-39W1 e BA04ES-39W3, obtidas do extrato aquoso da esponja *Aiolochoia crassa*, por CLAE-UV

Para a purificação da fração BA04ES-39W1 foi utilizada uma coluna analítica de sílica-gel derivatizada com grupos octadecilsilano C₁₈ (Inertsil ODS-SP, 250 x 4,6 mm, 5µm). A eluição foi realizada com a mistura de solventes H₂O/MeOH/MeCN (65:18:17) com adição de 0,1% de ácido fórmico, em modo isocrático com análises de 15 minutos. Foram coletadas três subfrações (Fig. 4.3) que foram posteriormente analisadas por CLAE-UV-EM.

Figura 4. 3 - Separação da fração BA04ES-39W1 por CLAE-UV

A partir do resultado da análise das amostras (BA04ES-39W1A, BA04ES-39W1B e BA04ES-39W1C) por CLAE-UV-EM, foi possível observar que a fração BA04ES-39W1C demonstrou um alto grau de pureza e, por isso, foram obtidos os seus dados de RMN de ^1H . As demais amostras apresentavam várias substâncias do metabolismo primário, as quais não eram de interesse para o estudo.

Para a separação dos constituintes da fração BA04ES-39W3 foi utilizada uma coluna analítica de sílica gel derivatizada com grupos octadecilsilano C_{18} (Inertsil ODS-SP, 250 x 4,6 mm, 5 μm). A eluição foi realizada em modo isocrático por $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}/\text{MeCN}$ (65:18:17) com adição de 0,1% de ácido fórmico, em análises de 30 minutos.

Foram obtidas quatro frações (Fig. 4.4) nesta separação, todas com massa muito pequena, uma vez que foi injetada na coluna apenas a parte da fração totalmente solúvel em MeOH.

Figura 4. 4 - Separação da fração BA04ES-39W3 por CLAE-UV

As amostras foram analisadas por CLAE-UV-EM e os resultados demonstraram que apenas a subfração BA04ES-39W3C era de interesse, a qual apresentou perfil semelhante à fração BA04ES-39A3 obtida na separação do extrato acetato de etila (BA04ES-39A) da esponja *Aiolochoia crassa*.

As duas amostras foram reunidas, para posterior análise de seus dados espectroscópicos.

4.3.2 Estudo químico da esponja *Dysidea robusta*

4.3.2.1 Preparo do extrato bruto da esponja *Dysidea robusta* (Dr)

A esponja *Dysidea robusta* (Dr) foi coletada na Baía de Todos os Santos, Salvador - BA. Sua massa úmida total foi de 987 g. Após a coleta, a esponja foi condicionada em um recipiente fechado contendo EtOH.

Para a obtenção do extrato bruto, a esponja foi separada do EtOH de preservação e triturada em liquidificador com 1 L de MeOH. A mistura foi mantida em repouso por 14 h, sendo em seguida filtrada à vácuo através de celite.

O extrato MeOH foi concentrado até o volume de 500 mL em evaporador rotativo à pressão reduzida. À esse volume, foi acrescentado o etanol do recipiente onde a esponja encontrava-se inicialmente, chegando ao volume final de 1,5 L de extrato alcoólico.

4.3.2.2 Preparo dos extratos hexano (DrH) e acetato de etila (DrA)

A solução alcoólica (1,5 L) com o extrato da esponja *Dysidea robusta* foi dividida em alíquotas de 500 mL cada. Foram realizadas partições líquido-líquido com hexano com cada uma das alíquotas.

A partição consistiu em adicionar à solução o mesmo volume (500 mL) de hexano em um funil de separação, o qual foi agitado e deixado em repouso por cerca de 10 minutos para total separação das fases. Em seguida as fases foram recolhidas em erlenmeyers distintos. A fase alcoólica foi devolvida ao funil e a fase hexânica foi concentrada em evaporador rotativo. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes. Assim, obteve-se o extrato hexano.

O procedimento para obtenção do extrato acetato de etila foi semelhante ao utilizado na obtenção do extrato hexano. Contudo, inicialmente foram adicionados 10% em volume de água Milli-Q à solução alcoólica (1,5 L) do extrato da esponja, para melhor separação das fases.

Em seguida é mostrado um fluxograma (Fig. 4.5) que resume esses procedimentos e apresenta as massas obtidas para cada extrato.

Figura 4. 5 - Obtenção dos extratos hexano e acetato de etila da esponja *Dysidea robusta*

4.3.2.3 Preparo do extrato aquoso (DrW) da esponja *Dysidea robusta*

A solução aquosa (100 mL) foi filtrada e transferida para um erlenmeyer, ao qual foram também adicionados 15 g de resina cromatográfica adsorvente polimérica não iônica Amberlite® XAD-2. O erlenmeyer contendo a amostra foi deixado por uma noite sob agitação em “shaker”.

Após 14 horas a amostra foi filtrada em funil de Buchner. O filtrado, denominado de “A”, foi reservado. A resina foi transferida para um béquer contendo aproximadamente 300 mL de água Milli-Q, e novamente filtrada. A resina XAD-2 foi então extraída com solução de MeOH/Acetona 1:1, e finalmente com Acetona 100%. Os filtrados obtidos nas lavagens com H₂O 100% e Acetona 100% foram descartados. O filtrado obtido na lavagem com solução MeOH/Acetona 1:1, a exemplo do filtrado A, também foi reservado. Esse procedimento foi repetido para o filtrado A, utilizando no lugar da resina XAD-2, a resina XAD-4. Todos os extratos com MeOH/Acetona 1:1, obtidos da dessorção da fração aquosa do extrato bruto

da esponja *D. robusta* com as resinas Amberlite® XAD-2 e Amberlite® XAD-4, foram reunidos e secos em centrífuga Speedvac®. Essa fração (3,7569 g) foi denominada de extrato aquoso (DrW). Em seguida é mostrado um fluxograma (Fig. 4.6) contendo um resumo do procedimento para a obtenção do extrato aquoso/orgânico.

Figura 4. 6 - Fluxograma da obtenção do extrato aquoso da esponja *Dysidea robusta*

Os extratos hexano, acetato de etila e aquoso foram aplicados em placas cromatográficas juntamente com uma substância padrão. Utilizou-se o colesterol para a análise do extrato hexano e a timidina para a análise do extrato acetato de etila e aquoso.

O extrato hexano foi eluído em três diferentes fases móveis: hexano/acetato de etila 9:1; 7:3 e 1:1. O extrato acetato de etila foi analisado 5 vezes por CCD: 3 eluições com hexano:acetato de etila 9:1; 7:3 e 1:1 na presença de colesterol como padrão e 2 eluições com diclorometano/MeOH 7:3 e 9:1 na presença de timidina. Do mesmo modo, o extrato mais polar (aquoso) também foi analisado por CCD. Foram realizadas duas análises por CCD com as misturas CH₂Cl₂/MeOH 7:3 e 9:1 como eluentes e a timidina como padrão.

Todas as placas foram observadas sob a luz UV (254 nm) e reveladas com cada um dos reveladores descritos anteriormente.

4.3.2.4 Separação do extrato aquoso (DrW) por Cromatografia em Coluna de fase reversa

O extrato aquoso (DrW) foi fracionado em coluna pré-empacotada Sep-Pack[®] (5 g) com fase estacionária de sílica gel derivatizada com grupos octadecilsilano C₁₈, e como eluente foi utilizado um gradiente de H₂O 100%, H₂O/MeOH (75:25; 1:1; 25:75) e MeOH 100%.

Para cada eluente foi recolhida uma fração de 100 mL. Assim, obteve-se ao final da separação, um total de cinco frações. Esse procedimento foi realizado com o total do extrato aquoso (3,7569 g), em alíquotas de 500 mg. Após as separações cromatográficas, as frações foram secas em centrífuga Speedvac[®] e suas massas foram determinadas.

O fluxograma a seguir (Fig. 4.7) resume o procedimento e apresenta a massa de cada fração obtida.

Após a separação, as frações coletadas foram analisadas por CCD. Observou-se que a fração DrW2 apresentava um bom grau de pureza e, por isso, separou-se 10 mg da amostra que foi solubilizada em MeOH deuterado (CD₃OD) e enviada para obtenção de seus dados de RMN de ¹H. O TMS foi utilizado como padrão. Porém o resultado demonstrou que a amostra ainda não estava pura.

Figura 4. 7 - Fracionamento do extrato aquoso da esponja Dr por cromatografia em coluna Sep-Pak®

4.3.2.5 Separação da fração DrW2 por CLAE-UV

A amostra (DrW2) foi analisada por CLAE-UV-EM e, em seguida, foi realizada a sua purificação por CLAE-UV. Foi utilizada uma coluna cromatográfica semi preparativa de sílica gel derivatizada por grupos octadecilsilano C₁₈ (Inertsil ODS-2, 150 Å, 250 x 94 mm, 5 µm) na fase estacionária e MeCN/H₂O na proporção 85:15 como fase móvel, à qual foi adicionado 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA).

Foram coletadas cinco frações que estão representadas no fluxograma da Fig. 4.8.

Figura 4. 8 - Separação da fração DrW2 por CLAE-UV

Essas frações foram posteriormente analisadas CLAE-UV-EM. Esta análise indicou boa pureza das amostras correspondentes às frações DrW2P2 e DrW2P3. Estas frações foram enviadas para obtenção de seus dados de RMN de ^1H .

A análise dos dados espectroscópicos, obtidos para as amostras DrW2P2 e DrW2P3, indicou que a primeira (DrW2P2) não era de interesse para este estudo, e a segunda (DrW2P3), apesar de impura, apresentou um perfil químico muito interessante e por isso foi submetida à purificação por CLAE-UV.

4.3.2.6 Separação da fração DrW2P3 por CLAE-UV

A purificação da fração DrW2P3 foi realizada em coluna analítica de sílica gel derivatizada por grupos octadecilsilano C_{18} (Phenomenex[®], 100Å, 250 x 4,6 mm, 4 µm), e um gradiente que iniciava com a composição de $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}/\text{MeCN}$ na proporção 90:5:5, passava à proporção 1:1 da composição MeOH/MeCN e finalmente retornava à condição inicial. Foram coletadas quatro frações, cujas massas estão mostradas no fluxograma abaixo (Fig 4.9).

Figura 4. 9 - Purificação da fração DrW2P3 por CLAE-UV

Analogamente ao que foi feito com as frações obtidas anteriormente, estas frações foram analisadas por CLAE-UV-EM. A partir do resultado desta análise, foi possível determinar que as frações DrW2P3B e DrW2P3C eram as mais promissoras, portanto, foram obtidos os seus dados de RMN de ^1H . Verificou-se que a amostra DrW2P3B, apesar de estar pura, não era de interesse e, ainda, que a

amostra DrW2P3C estava pura e tinha perfil de metabólito secundário. Assim, foram obtidos os espectros de RMN de ^{13}C , RMN bidimensional e espectros de massas de alta resolução apenas da amostra DrW2P3C.

4.4 Isolamento de Metabólitos Secundários do meio de cultura do fungo

Aspergillus sydowii

A linhagem fúngica *Aspergillus sydowii* (DRG-1) foi inicialmente isolada em meio de crescimento “Glucose, Peptone, Yeast extract” (GPY) a partir da esponja *Drumacidom reticulatum* e preservada de acordo com método descrito por Castellani (1967).

Posteriormente a linhagem foi selecionada para estudo pela mestrandia Karen de Jesus, que realizou a sua reativação e o crescimento em pequena escala no meio original de isolamento. Para o preparo de 1L do meio de crescimento GPY, utilizou-se 1 g de glicose, 0,5 g de peptona de soja, 0,1 g de extrato de levedura e 15 g de ágar dissolvidos em água do mar artificial. A água do mar artificial (1L) é preparada com a dissolução dos sais mostrados na tabela 4.1 em água destilada.

Tabela 4. 1 - Sais utilizados no preparo de água do mar artificial (volume final: 1L)

Substância	Massa
Cloreto de cálcio di-hidratado	1,36 g
Cloreto de magnésio hexa-hidratado	9,68 g
Cloreto de potássio	0,60 g
Cloreto de sódio	30,0 g
Fosfato de sódio bibásico	0,14 mg
Sulfato de sódio	3,47 g
Bicarbonato de sódio	0,17 g
Brometo de potássio	0,10 g
Cloreto de estrôncio hexa-hidratado	0,04 g
Ácido bórico	0,15 g

A linhagem foi transferida para o crescimento em meio ágar extrato de malte 2%. O meio malte 2% (1L) é preparado através da dissolução de 20 g de extrato de

malte e 20 g de ágar em água do mar artificial. A linhagem passou a ser designada pelo código (DRG1M2). Após avaliação da atividade citotóxica dos extratos obtidos de ambos os meios, foi realizado o crescimento da linhagem em 8 L do meio de crescimento malte 2%.

4.4.1 Obtenção do extrato bruto da linhagem fúngica *Aspergillus sydowii*

A linhagem fúngica designada como DRG1M2 foi inoculada para crescimento em placas de Petri. Após o crescimento, discos contendo o meio sólido e a linhagem foram transferidos para um frasco do tipo *Schott* no qual havia 250 mL do meio líquido no crescimento em pequena escala.

O mesmo procedimento foi realizado para o crescimento em média escala, quando foram utilizados 32 frascos do tipo *Schott* com 250 mL de meio de crescimento perfazendo um volume total de 8 L do meio de crescimento inoculados com a linhagem selecionada.

No processo de inoculação do fungo em frascos do tipo *Schott*, foram utilizadas seringas de 10 mL para retirada de 5 discos de cada colônia para, em seguida, serem transferidos para os frascos. Os frascos contendo as linhagens de fungos foram incubados à temperatura ambiente (25 °C) durante 21 dias, de modo a reproduzir o crescimento anterior.

Após 21 dias de crescimento, foram adicionados 250 mL de acetato de etila a cada um dos frascos, com agitação periódica. A mistura resultante foi filtrada através de celite. A solução filtrada foi posteriormente separada por partição líquido-líquido (acetato de etila/água), a fração aquosa foi descartada e a fração orgânica foi seca em evaporador rotativo.

4.4.2 Pré-purificação do extrato acetato de etila do meio de cultura líquido

O extrato acetato de etila seco (2 g) foi dissolvido em 500 mL de MeOH, e em seguida foi realizada uma partição líquido-líquido com hexano. A fração hexânica foi seca em evaporador rotativo, e a fração metanólica foi concentrada em evaporador rotativo e, em seguida, seca em centrífuga Speedvac[®]. Foram obtidos 1,5 g do extrato metanólico.

O extrato metanólico foi fracionado por cromatografia em coluna por permeação em gel de Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech®). Após análise por CCD, foi possível reunir o material coletado em 6 frações diferentes (Fig 4.10). Alíquotas com cerca de 5 mg de cada fração foram retiradas para reavaliação nos bioensaios de citotoxicidade em que a linhagem havia sido testada anteriormente.

Figura 4. 10 - Fracionamento do extrato metanólico do fungo DRG1M2 por Sephadex LH-20

4.4.3 Separação da fração DRG1M2-MC

A fração DRG1M2-MC foi submetida à separação por cromatografia em coluna pré-empacotada Sep-Pak® com fase estacionária de sílica-gel (5 g). Como eluente foi utilizado um gradiente de polaridade crescente com as seguintes proporções:

- [CH₂Cl₂/hexano 1:1]/AcOEt (8:2; 7:3; 6:4; 1:1),
- CH₂Cl₂/AcOEt (8:2; 7:3; 6:4; 1:1),
- CH₂Cl₂/MeOH (9:1; 1:1)
- MeOH 100%.

Foram obtidas onze amostras de 70 mL cada. Após análise por CCD, foi possível reagrupar as amostras em cinco subfrações.

As subfrações foram analisadas por CLAE-UV-EM. Observou-se que o perfil químico das mais interessantes foram os das frações DRG1M2-MC2, DRG1M2-MC3 e DRG1M2-MC4. Devido às semelhanças no perfil cromatográfico destas subfrações, elas foram agrupadas, dando origem à subfração DRG1M2-MC2-4.

A subfração DRG1M2-MC2-4 foi separada por CLAE-UV com a utilização de uma coluna de fase reversa de sílica-gel derivatizada com grupos octadecilsilano C₁₈ (Inertsil ODS-SP, 250 x 4,6 mm, 5µm), em modo isocrático, tendo como eluente uma mistura de H₂O/MeOH/MeCN (60:20:20) com adição de 0,1% de ácido fórmico.

O fluxograma mostrado na figura 4.11 apresenta um resumo dos procedimentos de purificação da amostra DRG1M2-MC e isolamento do composto DRG1M2-MC2-4D.

Figura 4. 11 - Fracionamento cromatográfico da fração DRG1M2-MC

Foram coletadas seis frações correspondentes aos picos cromatográficos. Após análises por CLAE-UV-EM, foi possível observar que a fração DRG1M2-MC2-

4D estava pura e por isso a amostra foi preparada para obtenção dos seus dados de RMN de ^1H , de ^{13}C e bidimensionais.

4.4.4 Separação da fração DRG1M2-ME

A fração DRG1M2-ME foi separada por cromatografia em coluna pré-empacotada Sep-Pak[®] com fase estacionária de sílica-gel derivatizada com grupos cianopropila (5 g). Como fase móvel foi utilizado um gradiente de polaridade crescente com as seguintes proporções:

- $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ (9:1 8:2; 7:3; 6:4; 1:1);
- $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9:1; 8:2; 7:3; 1:1);
- MeOH 100%

Foram obtidas dez amostras de 50 mL cada. Após análise por CCD, as amostras foram reagrupadas nas subfrações DRG1M2-ME1 e DRG1M2-ME2. A subfração DRG1M2-ME1 apresentou um perfil químico mais interessante e por isso foi dada continuidade ao seu estudo.

A subfração DRG1M2-ME1 foi submetida à separação por cromatografia em coluna pré-empacotada Sep-Pak[®] com fase estacionária de sílica-gel (5g). Como fase móvel foi utilizado um gradiente de polaridade crescente nas seguintes proporções:

- $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ (95:5; 90:10; 85:15; 80:20; 75:25; 70:30; 65:35; 60:40; 50:50);
- $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95:5; 90:10; 80:20; 70:30; 60:40; 50:50) e MeOH 100%.

As dezesseis amostras obtidas foram analisadas por CCD e posteriormente reagrupadas formando seis subfrações diferentes. Através da análise por CLAE-UV-EM foi possível identificar que a subfração DRG1M2-ME1C apresentava melhor perfil para continuação do estudo.

A subfração DRG1M2-ME1C foi então separada por CLAE-UV com a utilização de uma coluna de fase reversa de sílica-gel derivatizada com grupos octadecilsilano C_{18} (Inertsil ODS-3, 250 x 4,6 mm, 5 μm), em modo isocrático com o eluente $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}/\text{MeCN}$ (50:25:25) e adição de 0,1% de ácido fórmico.

O fluxograma a seguir (Fig. 4.12) apresenta um resumo com os procedimentos realizados para purificação da amostra DRG1M2-ME.

Figura 4. 12 - Purificação da fração DRG1M2-ME

Após análise por CLAE-UV-EM, foi observado que as subfrações DRG1M2-ME1C4 e DRG1M2-ME1C5 estavam com bom grau de pureza. Pelo fato de apresentarem também uma boa quantidade de massa, essas amostras foram repurificadas, separadamente.

Para a purificação da subfração DRG1M2-ME1C4 foi utilizada uma coluna de sílica-gel derivatizada com grupos octadecilsilano C₁₈ (Inertsil ODS-3, 250 x 4,6 mm, 5 µm) em corridas de 40 minutos em modo gradiente com a composição de H₂O variando de 60% a 45% nos primeiros 25 minutos e a composição de solventes orgânicos (MeOH/MeCN 1:1) variando de 40% a 55%. Em seguida a composição de solventes orgânicos chegou à 100% até os 32 minutos quando retornava à condição inicial. Foram obtidas cinco subfrações, como mostrado no fluxograma da figura 4.13.

Figura 4. 13 - Purificação da subfração DRG1M2-ME1C4

As subfrações obtidas foram analisadas por CLAE-UV-EM. Verificou-se que a subfração DRG1M2-ME1C4B era a de interesse, por isso a amostra foi preparada para obtenção dos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C .

A purificação da subfração DRG1M2-ME1C5 foi realizada nas mesmas condições utilizadas na separação da subfração DRG1M2-ME1C4. Desta separação foram obtidas quatro subfrações mostradas no fluxograma (Fig. 2.14). Estas amostras foram analisadas por CLAE-UV-EM e, a partir dos resultados foi possível determinar a subfração DRG1M2-ME1C5C como a amostra de interesse.

Figura 4. 14 - Purificação da subfração DRG1M2-ME1C5

5 Resultados e discussão

5.1 Estudo químico da esponja marinha *Aiolochoia crassa*

A espécie *Aiolochoia crassa* está distribuída na região do Mar do Caribe e no Brasil. No Brasil pode ser encontrada desde a Foz do Rio Amazonas até o Rio de Janeiro. No litoral da Bahia, onde foi coletado o espécime para este estudo, a esponja *A. crassa* tem ocorrência em Salvador, na cidade de Itacaré e na extensão da região conhecida como Costa das Baleias (HAJDU; PEIXINHO e FERNANDEZ, 2011).

Esponjas pertencentes à ordem Verongida (BERGQUIST, 1978), à qual pertence a espécie *A. crassa*, são caracterizadas pela produção e/ou acúmulo de metabólitos bromados biologicamente relacionados à tirosina. Estes compostos são considerados marcadores taxonômicos das esponjas pertencentes a esta ordem (SHAALA et al. 2011).

Os derivados da bromotirosina representam a maior classe de produtos naturais de origem marinha (PENG; LI e HAMANN, 2005 apud KALAITZIS; DAVIS e QUINN, 2012). Muitos trabalhos relatam o isolamento destes compostos (JUREK; YOSHIDA e SHEUER, 1993; MIERZWA et al. 1994; LIU et al. 1997; HIRANO et al. 2000; SHIN et al. 2000; TAKADA et al. 2001; TSUDA et al. 2002; TILVI et al. 2004; LIRA et al. 2006; MUKAI et al. 2009; MANI et al. 2012; XU et al. 2011).

Alguns exemplos podem ser citados como a aeroplisinina-1 (**23**) isolada da esponja *Aplysina aerophoba* (KOULMAN et al. 1996) que apresentou citotoxicidade contra células cancerígenas HeLa (IC₅₀ 5,6 µM), a psammapisina F (**24**) isolada da esponja *Hyattella* sp. (YANG et al. 2010) apresentou atividade antimalárica contra duas linhagens de *Plasmodium falciparum* com inibição do crescimento em valores de IC₅₀ 1,4 µM e 0,87 µM e a iantheliformisamina A (**25**) que foi isolada da esponja *Suberea ianthelliformis* (XU et al. 2012) e apresentou atividade antibacteriana inibindo o crescimento de *P. aeruginosa* com um valor de IC₅₀ de 6,8 µM.

Figura 5. 1 - Compostos bioativos isolados de esponjas pertencentes à ordem Verongida

A figura 5.2 apresenta a taxonomia da esponja *A. crassa* e a foto de um espécime ainda submerso.

Figura 5. 2 - Foto da esponja marinha *Aiolochoiria crassa* e sua classificação taxonômica

Filo	⇒ Porifera
Classe	⇒ Demospongie
Ordem	⇒ Verongida
Família	⇒ Aplysinidae
Gênero	⇒ <i>Aiolochoiria</i>
Espécie	⇒ <i>Aiolochoiria crassa</i>

Fonte: HAJDU, E.; PEIXINHO, S.; FERNANDEZ, J. Esponjas marinhas da Bahia: guia de campo e laboratório. Rio de Janeiro: **Museu Nacional**, 2011. 276 p.

Recentemente, compostos derivados da bromotirosina já conhecidos, foram isolados da esponja *A. crassa* e tiveram sua atividade biológica testada contra os parasitas *Leshmania panamensis*, *Plasmodium falciparum* e *Trypanosoma cruzi*. Os compostos 3-bromo-*N,N,N*-trimetiltirosina (**26**) e 3,5-dibromo-*N,N,N*-trimetiltirosina (**27**) (Fig. 5.3) foram apontados como os compostos que apresentaram os resultados mais interessantes entre todos já testados contra *Leshmania panamensis* e *Plasmodium falciparum* (GALEANO et al. 2012).

Figura 5. 3 - Compostos bioativos isolados da esponja *Aiolochoia crassa*

O estudo do extrato bruto da esponja *A. crassa* foi motivado pelo resultado que apresentou em teste de atividade antiviral, no qual observou-se 99% de inibição contra o metapneumovírus aviário (aMPV) em concentração de 50 µg/mL.

O fracionamento do extrato bruto da esponja *A. crassa* envolveu as etapas cromatográficas descritas no capítulo 2, bem como, análises posteriores de ressonância magnética nuclear dos compostos isolados.

As partições líquido-líquido MeOH/AcOEt resultaram no extrato metanólico e o extrato acetato de etila. O fracionamento cromatográfico destes extratos levou ao isolamento da purealidina L (**28**) (BA04ES-39A3 e BA04ES-39W3C) e da 3-bromo-*N,N,N*,*O*-trimetiltirosina (**29**) (BA04ES-39W1C) (Fig. 5.4). O estudo das demais frações não foi continuado por estas apresentarem perfil químico de metabólitos primários.

Figura 5. 4 - Compostos isolados da esponja BA04ES-39 (*Aiolochroia crassa*)

5.1.1 Identificação estrutural do composto presente nas frações BA04ES-39A3 e BA04ES-39W3C

A partir da análise dos espectros de massas e UV (Fig. 5.5), bem como dos dados de RMN de ^1H (Fig. 8.1, anexo) obtidos para as frações BA04ES-39A3 e BA04ES-39W3C foi possível observar que apresentavam a mesma substância. As frações foram reunidas e repurificadas por CLAE-UV e obteve-se uma massa final de 0,9 mg do composto puro, o que representa 0,03% de rendimento em relação à massa úmida inicial da esponja (2,7 g).

Figura 5. 5 - Espectros de massas e absorção no UV das frações BA04ES-39A3 e BA04ES-39W3C

Foi possível observar no espectro de UV bandas de absorções com $\lambda_{\text{máx}}$ em 231,9 e 282,7 nm, comprimentos de onda típicos do cromóforo presente no dieno trissubstituído (3,5-dibromo-4-metoxi) derivado do ácido verongidóico (Fig. 5.6) (SILVA et al. 2010), frequentemente presente em derivados da bromotirosina isolados de esponjas da ordem Verongida (figura 5.6).

Figura 5. 6 - Cromóforo típico do éster metílico do ácido verongidóico

Fonte: SILVA, M. M. et al. **Australian Journal of Chemistry**, 2010. p. 888.

O espectro de massas do composto nas frações reunidas mostrou um pico do íon *quasi*-molecular em $[M+H]^+$ m/z 494,0. O espectro ampliado mostra também dois picos adjacentes ao íon *quasi*-molecular $[M+H]^+$ m/z 494,0, em 496,0 e 498,0, na proporção 1:2:1. Este padrão de espectro de massas é característico de compostos dibromados. O sinal “triplete” em proporção 1:2:1 é indicativo que o composto apresenta dois átomos de bromo em sua estrutura.

Após obtenção das informações dos espectros de massas e UV e constatar que a amostra estava pura, foram adquiridos os dados espectroscópicos de RMN de ^1H (Fig. 5.7) e (Fig. 8.1, anexo).

Figura 5. 7 - RMN de ^1H (400 MHz) das frações BA04ES-39A3 e BA04ES-39W3C solubilizada em $\text{DMSO-}d_6$

Devido à quantidade de massa muito pequena, não foi possível obter os dados de RMN de ^{13}C da amostra das frações reunidas. Assim, a identificação do composto, deu-se, essencialmente pela comparação dos dados de UV, massas e RMN de ^1H com dados da literatura.

Foi realizada uma consulta ao banco de dados MarinLit utilizando os dados de UV e massas obtidos para o composto presente nas frações BA04ES-39A3 e BA04ES-39W3C, a qual possibilitou encontrar a estrutura da purealidina L (KOBAYASHI et al. 1995) como sendo provável para o composto isolado, que foi confirmada pela análise do espectro de RMN de ^1H .

O espectro de RMN de ^1H apresentou sinal multiplete em δ 1,44, característico de hidrogênios metilênicos alifáticos, e em δ 3,08 e δ 3,13. Também foram observados sinais multiplas em δ 3,17 e δ 3,59 característicos de hidrogênios metilênicos alifáticos de carbonos ligados a heteroátomos como o nitrogênio ou oxigênio. Foi observado um sinal singlete em δ 3,62 atribuído a hidrogênios de grupo metila sofrendo efeito de desblindagem pela ligação com oxigênio. Sinais dublete em δ 3,88, e singlete em δ 6,34 típicos de hidrogênios em sistema cicloexadieno, um sinal multiplete em δ 7,45 que pode ser atribuído a hidrogênio ligado a nitrogênio e um sinal triplete em δ 8,54 que pode ser atribuído a hidrogênio de amida.

A tabela 5.1 apresenta um estudo comparativo entre os dados das frações BA04ES-39A3 e BA04ES-39W3C reunidas e os dados da purealidina L.

Tabela 5. 1 - Estudo comparativo dos valores de RMN de ^1H para o composto purealidina L (28)

	$^1\text{H}^{\text{a}}$ (mult, J = Hz, integral)	$^1\text{H}^{\text{b}}$ (mult, J = Hz, integral)
1	3,88 (d, J = 5,5 Hz, 1H)	3,91 (d, J = 7,9 Hz, 1H)
3-OMe	3,62 (s, 3H)	3,64 (s, 3H)
5	6,54 (s, 1H)	6,57 (s, 1H)
7	3,17 (m, 1H)	3,19 (d, J = 18,2 Hz, 1H)
	3,59 (m, 1H)	3,62 (d, J = 18,2 Hz, 1H)
9-NH	8,54 (t, J = 4,0 Hz, 1H)	8,54 (t, J = 5,8 Hz, 1H)
10	3,13 (m, 2H)	3,16 (m, 2H)
11	1,44 (m, 2H)	1,47 (m, 2H)
12	1,43 (m, 2H)	1,45 (m, 2H)
13	3,08 (m, 2H)	3,09 (m, 2H)
13-NH	7,45 (m, 1H)	7,44 (br s, 1H)
14-C(NH)₂NH₂	-	7,44 (br, 4H)

^a400 MHz, DMSO- d_6 ; ^b400 MHz, DMSO- d_6 ;

^bKobayashi; et al, (1995)

A comparação dos dados de RMN de ^1H , bem como com os dados de massas e absorções no UV, foi possível identificar o composto presente nas frações BA04ES-39A3 e BA04ES-39W3C como o alcaloide derivado da bromotirosina, purealidina L (28) (Fig. 5.9), que apresenta a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{Br}_2\text{N}_5\text{O}_4$ e massa molar de 493 u.m.a. A figura 5.8 mostra as atribuições de hidrogênio no composto.

Figura 5. 8 - Atribuição dos sinais de ^1H e ^{13}C do composto presente nas frações BA04ES-39A3 e BA04ES-39W3C

Figura 5. 9 - Estrutura química da purealidina L (28)

A purealidina L (**28**) apresenta um grupo guanidínico terminal em sua cadeia diamina. Os alcaloides guanidínicos (BERLINCK; TRINDADE-SILVA e SANTOS, 2012) são conhecidos por apresentar diversas atividades biológicas. Kelly e colaboradores (2005) relataram que extratos da esponja *A. crassa* apresentaram resultados significativos em testes de atividade antibacteriana. Dentre os compostos isolados a partir destes extratos estava a purealidina L (**28**). No presente trabalho não foram realizados os estudos de atividade biológica do composto nos testes contra o vírus aMPV devido à restrição imposta pela quantidade de massa obtida (0.9 mg).

Além da esponja *Psammaplysilla purea* (KOBAYASHI et al. 1995), a partir da qual a purealidina L foi primeiramente isolada, a purealidina L (**28**) foi também isolada a partir da esponja *A. crassa* por Assmann e colaboradores (1998), bem como das esponjas *Aplysina insularis* (FENDERT et al. 1999), *Suberea clavata* (BUCHANAN et al. 2009), *Aplysina* sp. (SANTALOVA; DENISENKO e STONIK, 2010), e da esponja *Suberea mollis* (SHAALA et al. 2011). Todas essas esponjas são pertencentes à ordem Verongida. Assim é possível afirmar que esta substância é de ampla ocorrência em esponjas desta ordem.

5.1.2 Identificação estrutural do composto BA04ES-39W1C

Após as etapas de separação e purificação da fração BA04ES-39W1C, os dados dos espectros de massas e de absorção no UV (Fig. 5.10) obtidos para a amostra indicaram um bom grau de pureza com massa de 1,0 mg, o que representa 0,04% de rendimento em relação à massa úmida (2,7g) da esponja. Desta forma, a amostra foi preparada para a obtenção dos dados espectroscópicos de RMN de ^1H (Fig. 8.2, anexo).

Figura 5. 10 - Espectros de massas e de absorção no UV da fração BA04ES-39W1C

O espectro de absorção no UV apresentou bandas de absorções com $\lambda_{\text{máx}}$ em 221,3 e 278,0 nm, típicos do cromóforo apresentado pelos derivados do 1-alkil-4-alcóxi-3,5-dibromobenzeno (Fig. 5.11) (SILVA et al. 2010).

Figura 5. 11 - Cromóforo típico dos derivados do 1-alkil-4-alcóxi-3,5-dibromobenzeno

Fonte: SILVA, M. M. et al. **Australian Journal of Chemistry**, 2010. p. 888.

No espectro de massas observa-se o pico do íon *quasi*-molecular em $[M+H]^+$ m/z 315,8. A ampliação do espectro mostra também um pico adjacente ao íon *quasi*-

molecular $[M+H]^+$ m/z 318,0, na proporção 1:1, indicando que o composto apresenta um átomo de bromo em sua estrutura.

Após constatação da pureza da fração, o material da amostra foi preparado para obtenção do espectro de RMN de 1H (Fig. 5.12).

Figura 5. 12 - RMN de 1H (400 MHz) da fração BA04ES-39W1C solubilizada em $DMSO-d_6$

O espectro de RMN de ^1H apresenta sinais dubletes em δ 7,49 e δ 7,01 e um sinal duplo dublete com deslocamento em δ 7,22. Esses deslocamentos são característicos de hidrogênios aromáticos. As multiplicidades dos sinais de hidrogênio sugerem a presença de um anel benzênico do tipo 1,2,4 trissubstituído. O composto apresenta também um sinal singlete em δ 3,81, atribuído a um grupo metila ligado a oxigênio, além dos sinais de duplo dublete em δ 3,58, singlete em δ 3,14, multiplete em δ 3,09 e um duplo dublete largo em δ 2,94 característicos de metilenos alifáticos de carbonos ligados a heteroátomos como o nitrogênio ou anel aromático.

Uma ou A busca bibliográfica em bancos de dados de produtos naturais marinhos levou ao trabalho em que Albrizio e colaboradores (1994) relatam o isolamento de derivados inéditos da bromotirosina a partir da esponja *Pseudoceratina crassa*, dentre estes compostos, a 3-bromo-*N,N,N,O*-trimetiltirosina (29). O composto apresenta dados espectroscópicos que conferem com os encontrados para o composto presente na fração BA04ES-39W1C isolado da esponja *A. crassa*. Estudo comparativo dos dados da fração BA04ES-39W1C com a literatura e as atribuições de hidrogênio são apresentadas na tabela 5.2 e figura 5.13.

Tabela 5. 2 - Estudo comparativo dos valores de RMN de ^1H para o composto 3-bromo-*N,N,N,O*-trimetiltirosina (29)

	$^1\text{H}^a$ (mult, J= Hz, integral)	$^1\text{H}^b$ (mult, J= Hz, integral)
2	7,49 (d, J= 1,9 Hz, 1H)	7,22 (d, J= 2,0 Hz, 1H)
5	7,01 (d, J= 8,5 Hz, 1H)	6,66 (d, J= 8,5 Hz, 1H)
6	7,22 (dd, J= 8,5, 2,2 Hz, 1H)	6,95 (dd, J= 8,5, 2,0 Hz, 1H)
7	2,94 (ddl, J= 23,7, 11,2 Hz, 1H)	2.80 (t, J= 12,0, 1H)
	3,09 (m, 1H)	2.95*
8	3,58 (dd, J= 11,9, 3,7 Hz, 1H)	3.42 (dd, J= 12,0, 3,7 Hz, 1H)
O-Me	3,81 (s, 3H)	3.54 (s, 3H)
*N(Me)₃	3,14 (s, 9H)	2.96 (s, 9H)

^a400 MHz, DMSO- d_6 ; ^b400 MHz, D₂O; *sinal sobreposto por outro sinal

^bAlbrizio; et al, (1994)

Figura 5. 13 - Atribuição dos sinais de ^1H do composto presente nas frações BA04ES-39W1C

Com isso, foi possível identificar o composto presente na fração BA04ES-39W1C como o 3-bromo-*N,N,N,O*-trimetiltirosina (**29**) (Fig. 5.14), um derivado da bromotirosina que apresenta a fórmula molecular $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{BrNO}_3$ e massa molar de 317 u.m.a.

Figura 5. 14 - Estrutura química da 3-bromo-*N,N,N,O*-trimetiltirosina (**29**)

Não foram realizados testes de atividade biológica para o composto pelo fato da quantidade de massa obtida ser muito pequena (1 mg).

Galeano e colaboradores (2012) relataram atividade antiparasitária para o mesmo composto, porém bem mais fraca do que a atividade apresentada por seus análogos dibromados e que apresentam uma hidroxila livre no anel aromático.

O isolamento da 3-bromo-*N,N,N,O*-trimetiltirosina (**29**), bem como da purealidina L (**28**) a partir da esponja BA04ES-39 pode ser entendido como uma confirmação da identificação da esponja *Aiolochoia crassa*, pois não é a primeira vez que é relatado o isolamento destes compostos como constituintes químicos da esponja *A. crassa* (ASSMANN et al. 1998; GALEANO, et. al, 2012). Portanto, apesar da massa obtida de cada composto ser muito pequena o que impossibilitou a realização de experimentos de atividade biológica, é possível afirmar que a identificação dos compostos foi realizada sem ambiguidade.

5.2 Estudo químico da esponja marinha *Dysidea robusta*

A esponja *Dysidea robusta* é uma espécie endêmica do Brasil. Tem distribuição geográfica nos Estados do Rio de Janeiro (MURICY; HAJDU, 2006) e da Bahia, nas cidades de Salvador onde foi coletado o espécime para este estudo, e em Abrolhos (HAJDU; PEIXINHO; FERNANDEZ, 2011). Na figura 5.15 encontra-se a foto de uma esponja desta espécie e sua classificação taxonômica.

Figura 5. 15 - Foto da esponja marinha *Dysidea robusta* e sua classificação taxonômica

Fonte: HAJDU, E.; PEIXINHO, S.; FERNANDEZ, J. C. C. Esponjas marinhas da Bahia: guia de campo e laboratório. Rio de Janeiro: **Museu Nacional**, 2011. 276 p.

A ordem Dictyoceratida (BERGQUIST, 1978), à qual pertence a espécie *Dysidea robusta*, é composta por esponjas que são reconhecidas pela produção de compostos terpênicos considerados marcadores taxonômicos da ordem (BERGQUIST, 1983; KEYZERS; NORTHOCOTE; DAVIES-COLEMAN, 2006).

As esponjas deste grupo também produzem diversas outras classes de compostos. Destacam-se as quinonas híbridas com terpenos, as hidroquinonas sesquiterpênicas (GORDALIZA, 2010), muitos destes, a exemplo do avarol (**30**) (MINALE; RICCIO; SODANO, 1974) e da ilimaquinona (**31**) (LUIBRAND et al. 1979), mostrados na figura 5.16, apresentam atividades biológicas como citotoxicidade, antimicrobiana e anti-inflamatória (MOTTI et al. 2007). As esponjas do gênero *Dysidea* também são grandes produtoras de alcaloides, principalmente os clorados (DUMDEI, et al. 1997)

Figura 5. 16 - Compostos bioativos isolados de esponjas da ordem Dictyoceratida

A esponja *Dysidea robusta*, endêmica do Brasil, já forneceu três compostos derivados do ácido pirodisinóico: o ácido isopirodisinóico (**32**), ácido 13-hidroxi-isopirodisinóico (**33**), e o ácido pirodisinóico B (**34**) (WILLIAMS et al. 2009), bem como uma mistura das ceramidas 2-hidroxi-*N*-(1,3,4-trihidroxi-18-metilnonadecan-2-il)icosamida (**35**), 2-hidroxi-*N*-(1,3,4-trihidroxi-19-metilnonadecan-2-il)icosamida (**36**) e 2-hidroxi-*N*-(1,3,4-trihidroxi-20-metilnonadecan-2-il)icosamida (**37**) (MARQUES, 2009) (Fig. 5.17).

Figura 5. 17 - Compostos isolados a partir da esponja marinha *Dysidea robusta*

Neste trabalho, o estudo químico do extrato da esponja marinha *Dysidea robusta* envolveu as etapas cromatográficas descritas no capítulo 2. A análise dos dados de espectrometria de massas, UV e de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C , e bidimensionais da fração DrW2P3C resultaram na identificação dos alcaloides pirazínicos palitazina (**38**) e isopalitazina (**39**) (Fig. 5.18).

Figura 5. 18 - Compostos isoladas da esponja *Dysidea robusta*

5.2.1 Identificação estrutural dos compostos presentes na fração DrW2P3C

Após as etapas de purificação foram adquiridos os espectros de UV e massas (Fig. 5.19) da fração DrW2P3C. Foi possível observar duas bandas de absorções com $\lambda_{\text{máx}}$ em 206,0 e 285,1 nm. No espectro de massas observou-se o pico correspondente ao íon *quasi*-molecular $[M+H]^+$ em m/z 253,2. Além disso, no espectro de massas de alta resolução (Fig. 8.3, anexo) observou-se o pico correspondente ao aduto de sódio $[M+Na]^+$ em m/z 275,1 no modo de ionização por spray de elétrons positivo. Assim foi possível determinar a massa exata do composto em m/z 252,1008 u.m.a. e a fórmula molecular $C_{12}H_{16}N_2O_4$.

A amostra com massa de 2,4 mg, o que equivale a 0,0002% de rendimento em relação à massa úmida inicial da esponja (987 g), foi em seguida preparada para obtenção dos seus dados espectroscópicos de RMN de 1H e ^{13}C (Fig. 8.4 e 8.5, anexo), bem como bidimensionais *g*HSQC, *g*HMBC e *g*COSY mostrados nas figuras 8.6, 8.7 e 8.8 (anexo) respectivamente.

Figura 5. 19 - Espectros de absorção no UV e massas da fração DrW2P3C

O RMN de 1H (Fig. 5.20), apresentou sinais em δ 2,78 (4 H) onde se observa a sobreposição de sinais que dificulta a identificação da sua multiplicidade, um singlete largo em δ 3,54 (4 H), um octeto em δ 3,83 (2 H), dubletes em δ 4,72 (4 H) e um singlete largo em δ 4,89 (2 H).

A figura 5.21 apresenta o espectro de RMN de ^{13}C e suas expansões, onde foi possível observar a duplicação de vários sinais.

Figura 5. 20 - RMN de ^1H (600 MHz) da fração DrW2P3C solubilizada em $\text{DMSO}-d_6$ Figura 5. 21 - RMN de ^{13}C (600 MHz) da fração DrW2P3C solubilizada em $\text{DMSO}-d_6$

No espectro de RMN de ^{13}C observou-se sinais em δ 146,32, δ 147,21, δ 148,10 e 147,20 característicos de carbonos com hibridização sp^2 ligados a átomos mais eletronegativos, como o oxigênio ou nitrogênio. Foram observados outros sinais em δ 75,6, δ 75,59 característicos de carbono oximetínico, sinais em δ 67,74 e δ 67,64 de carbono oximetilênico, dois sinais sobrepostos em δ 63,63 que são deslocamentos típicos de carbono hidroximetilênico. Foram observados dois sinais com deslocamentos em δ 32,48 e δ 32,38 característicos de carbonos metilênicos.

Puderam ser observados no espectro de RMN de ^{13}C quatro sinais duplicados: um sinal com dois carbonos sobrepostos em δ 147,20 e δ 147,21 e a presença de dois sinais singletes em δ 148,10 e δ 146,32, sugerindo a presença de uma mistura de compostos isoméricos na amostra. Considerando-se o número de carbonos indicado na fórmula molecular $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$, verificou-se que havia seis sinais de carbonos para cada composto da mistura e que ambos apresentavam um plano de simetria.

A partir do mapa de contorno gHSQC (Fig. 8.6, anexo), foi possível verificar que os carbonos em δ 75,59 e δ 75,61 apresentavam correlação com os hidrogênios em δ 3,83. Os carbonos em δ 67,64 e δ 67,74 apresentaram correlação com os hidrogênios em δ 4,72. Os carbonos em δ 63,63 correlacionavam-se com os hidrogênios em δ 3,54. Foi observado ainda que os carbonos em δ 32,48 e δ 32,38 apresentavam correlação com os hidrogênios em δ 2,78.

No mapa de contorno gHMBC (Fig. 8.7, anexo), foram observadas correlações entre os hidrogênios δ 4,89 e o carbono em δ 63,63. Os hidrogênios em δ 4,72 apresentaram correlações com os carbonos em δ 32,38, δ 32,48, δ 75,59, δ 75,61, δ 146,32, δ 147,20, δ 147,21 e δ 148,10.

A análise do espectro bidimensional gHMBC (Fig. 8.7, anexo), permitiu observar ainda correlações entre os hidrogênios em δ 3,83 e os carbonos em δ 63,63, δ 67,64, δ 67,74, δ 146,32, δ 147,20, δ 147,21. Os hidrogênios em δ 3,54 apresentaram correlações com os carbonos em δ 32,38, δ 32,48, δ 75,59, δ 75,61 e os hidrogênios em δ 2,78 apresentaram correlações com os carbonos em δ 63,63, δ 67,64, δ 67,74, δ 75,59, δ 75,61, δ 146,32, δ 147,20, δ 147,21 e δ 148,10.

A partir da análise dos dados do gCOSY (Fig. 8.8, anexo), que apresenta correlações do tipo ^1H - ^1H (2J e 3J), foi possível observar as correlações entre os hidrogênios metilênicos em δ 4,72 e o hidrogênio metínico em δ 3,83, bem como

entre este último e os hidrogênios metilênicos em δ 3,54. Com esses dados foi possível sugerir uma semiestrutura mostrada na figura 5.22.

Figura 5. 22 - Correlações observadas nos mapas de contorno gHMBC e gCOSY para o composto presente na fração DrW2P3C

Os carbonos em δ 146,32, δ 147,20, δ 147,21 e δ 148,10, típicos de sistema heteroaromático, não apresentaram correlações com sinais de hidrogênio no mapa de contorno de gHSQC (Fig. 8.6, anexo) o que indica que todos são carbonos quaternários.

Essa informação, associada ao fato de que a fórmula molecular prevê a presença de dois átomos de nitrogênio na estrutura do composto, sugere um anel pirazínico tetrassubstituído como mostrado na semiestrutura abaixo (Fig. 5.23).

Figura 5. 23 - Correlações observadas no mapa de contorno gHMBC para o composto presente na fração DrW2P3C

Os carbonos em δ 67,74 e δ 75,59 indicam a presença de um átomo de oxigênio formando uma ligação éter entre os dois carbonos. Isso sugere um ciclo do tipo tetra-hidropirano na molécula. Assim tem-se a semiestrutura mostrada na figura 5.24.

Figura 5. 24 - Correlações observadas no mapa de contorno gHMBC para o composto presente na fração DrW2P3C

A partir dos dados expostos, e considerando-se o fato de que os compostos apresentam um plano de simetria, foi possível determinar que os compostos apresentam um anel pirazínico entre dois anéis tetra-hidropiranos e, assim, estabelecer suas estruturas com as atribuições dos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C (Fig. 5.25).

Figura 5. 25 - Estruturas dos compostos presentes na fração DrW2P3C com atribuições de carbono e hidrogênio

Os dados espectroscópicos obtidos para os dois compostos presentes na fração DrW2P3C são mostrados na tabela 5.3.

Tabela 5. 3 - Deslocamentos de RMN de ^1H e ^{13}C e as correlações observadas para os compostos presentes na fração DrW2P3C

	$^{13}\text{C}^a$		$^1\text{H}^b$	COSY ^c	HMBC ^d
	(HSQC)		(mult, J = Hz, integral)		
1	67,64	67,74	4,72 (m, 4H)	-	H4, H5
2	146,32	148,10	-	-	H1, H4, H5
3	147,21	147,20	-	-	H1, H4, H5
4	32,48	32,38	2,78 (m, 4H)	H5	H1, H5, H6
5	75,59	75,61	3,83 (oct, 2H)	H4, H6	H1, H4, H6
6	63,63	63,63	3,54 (sl, 4H)	H5	H4, H5
6-OH	-	-	4,89 (s, 2H)	-	-

^a600 MHz, DMSO- d_6 ; ^b600 MHz, DMSO- d_6 ; ^cDMSO- d_6 ; ^dDMSO- d_6

Uemura e colaboradores (1979) descreveram o isolamento e a identificação de duas pirazinas, a palitazina e a isopalitazina, isoladas a partir do coral zoantídeo *Palythoa tuberculosa*. A (-)-palitazina foi recentemente sintetizada por Brehm e colaboradores (2008). Os dados obtidos para a fração DrW2P3C foram então, comparados com os dados da literatura, que são mostrados na Tabela 5.4.

Tabela 5. 4 - Estudo comparativo dos valores de RMN de ^1H e ^{13}C para a palitazina (38)

	$^{13}\text{C}^a$	$^{13}\text{C}^b$	$^{13}\text{C}^c$	$^1\text{H}^d$ (mult, J= Hz, integral)	$^1\text{H}^e$ (mult, J= Hz, integral)
1	67,64	68,34	67,70	4,72 (m, 4H)	4,74 (s, 4H)
2	146,32	147,88	146,2	-	
3	147,21	147,98	148,0	-	
4	32,48	32,08	32,30	2,78 (m, 4H)	2,80 (d, J= 7 Hz, 4H)
5	75,59	76,32	75,50	3,83 (oct, 2H)	3,86 (oct, 2H)
6	63,63	64,29	63,60	3,54 (sl, 4H)	3,56 (t, J= 5 Hz, 4H)
6-OH	-	-		4,89 (s, 2H)	4,87 (t, J= 6 Hz, 2H)

^{a,d}600 MHz, DMSO- d_6 ; ^c25.6 MHz, DMSO- d_6 ; ^e100 MHz, DMSO- d_6

^bHuemura; et. al, (1979); ^{c,e}Brehm; et. al, (2008)

Com estas informações concluiu-se que a amostra DrW2P3C era constituída por uma mistura das duas pirazinas descritas na literatura, palitazina (38) e isopalitazina (39) (Fig. 5.26).

Testes biológicos de atividade antimicrobiana da mistura das duas pirazinas isoladas da esponja *Dysidea robusta* mostraram que elas são inativas contra *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (SARM), *Xanthomonas maltophilia*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas cepacia*, *Enterococcus* resistente a vancomicina (ERV) e *Candida albicans*.

A palitazina foi sintetizada a partir da D-glucose e teve sua estereoquímica absoluta estabelecida em trabalho realizado por Jarglis e Lichtenthaler (1982). Brehm e colaboradores (2008) propuseram um aprimoramento da síntese do composto a partir da conversão da D-glucose em 1,5-anidro-D-frutose e Nagaiah e colaboradores (2010) realizaram a síntese estereosseletiva da palitazina a partir do D-manitol.

Figura 5. 26 - Estrutura da palitazina (38) e da isopalitazina (39)

A palitazina e a isopalitazina só foram obtidas como produtos naturais a partir do coral zoantídeo *Palythoa tuberculosa*. Nosso estudo é, portanto, a primeira vez que estes alcaloides são isolados de uma esponja. Isso pode indicar que os compostos são, na verdade, produtos de micro-organismos hospedeiros destas espécies. O fato da 1,5-anidro-D-frutose ser um precursor da biossíntese destes compostos vai de encontro com esta hipótese, uma vez que a 1,5-anidro-D-frutose ocorre principalmente em fungos, bactérias, algas e tecidos de mamíferos (FISKESUND et al. 2010).

5.3 Estudo químico do fungo *Aspergillus sydowii*

5.3.1 Reativação da linhagem DRG-1

A linhagem designada como DRG-1 foi isolada a partir da esponja *Drummacidon reticulatum* e identificada pelo grupo da Prof. Dr^a. Lara Durães Sette da Divisão de Recursos Microbianos do CPQBA (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Unicamp) como *Aspergillus sydowii* (Fig. 5.27).

O código utilizado para nomear a amostra é derivado do hospedeiro a partir do qual a linhagem foi isolada e do meio em que foi cultivada. Assim, DRG-1 significa que o fungo identificado como *Aspergillus sydowii*, sendo linhagem de

número 1 isolada da esponja marinha *Dragmacidon reticulatum* (DR) e cultivada em meio de glicose (G).

Figura 5. 27 - Foto do fungo *Aspergillus sydowii* e sua classificação taxonômica

O fungo *Aspergillus sydowii* é um fungo mesófilo terrestre, é um contaminante alimentar e pode causar doenças também em humanos (OLUTIOLA e COLE, 1977 apud ALKER; SMITH e KIM, 2001). É também de ocorrência marinha e já foi descrito como patógeno de corais (ALKER; SMITH; KIM, 2001).

Estudos envolvendo *Aspergillus sydowii* já resultaram no isolamento de diversos compostos, tais como são mostrados na figura 5.28, os ácidos sidônico (40) e hidroxissidônico (41) (HAMASAKI; NAGAYAMA e HATSUDA, 1978), as sidowinas A (42) e B (43) (TEUSCHER et al. 2006), os sesquiterpenos aspergilusenos A (44) e B (45) (TRISUWAN et al. 2011), e a ciclotriprostatina E (46) (HE et al. 2012).

Figura 5. 28 - Estruturas de compostos isolados a partir do fungo *Aspergillus sydowii*

A linhagem DRG-1 foi selecionada do banco de fungos isolados a partir de organismos marinhos pertencentes ao Grupo de Química Orgânica de Produtos Naturais do Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP). O extrato bruto do seu meio de cultura apresentou potente atividade citotóxica em testes realizados entre os anos de 2006 e 2007. Após reativação no meio original, o extrato do meio de cultura foi novamente avaliado em bioensaio de atividade citotóxica. Contudo, observou-se que não houve a manutenção da citotoxicidade.

Mesmo assim, a linhagem foi transferida para cultivo em meio de malte 2% e reavaliada em ensaio de atividade citotóxica. Foi observado que o extrato bruto do meio de cultura da linhagem cultivada em meio malte 2% (DRG1M2) apresentou potente atividade frente às células tumorais de câncer de mama humano (MDA-MB435) e glioblastoma humano (SF295) e pouca atividade frente à célula de câncer de cólon humano (HCT-8), conforme resultados apresentados na tabela 5.5.

Tabela 5. 5 - Resultado do bioensaio dos extratos obtidos dos meios de cultura do fungo *A. sydowii*

Amostras	HCT-8	MDA-MB435	SF295
DRG1	SA	PA (25,29%)	SA
DRG1M2	PA (29,14%)	MA (99,52%)	MA (82,24%)

Legenda: SA = Sem atividade PA = Pouca atividade MA = Muita atividade

Figura 5. 29 - Cromatograma CLAE-UV 254 nm (A), Espectros de absorções no UV (B), Espectros de massas no modo ESI (C), do extrato bruto do meio de cultura da linhagem DRG1M2

Além disso, a análise por CLAE-UV-EM do extrato bruto obtido do meio de cultura do fungo *Aspergillus sydowii*, cultivado em meio malte 2%, apresentou um perfil químico que evidenciou a presença de diversos metabólitos secundários.

Como pode ser observado na figura 5.29, o cromatograma de CLAE-UV do extrato bruto da linhagem DRG1M2, apresentou picos distribuídos em tempos de retenção intermediários, entre os iniciais, que normalmente são compostos muito polares como os açúcares e os finais que são muito apolares como ácidos graxos.

Os espectros no UV dos sinais cromatográficos apresentam absorções que se distinguem de metabólitos primários por serem mais complexas. Estes espectros de metabólitos secundários corriqueiramente apresentam mais de duas bandas de absorção na região do UV. No que se refere aos espectros de massas, pode-se ressaltar a presença de picos com m/z acima de 200 u.m.a., o que indica a presença de metabólitos secundários, uma vez que massas menores são, de um modo geral, atribuídas à compostos do metabolismo primário.

O estudo químico do extrato do meio de cultura do fungo *Aspergillus sydowii* levou ao isolamento de um composto identificado como ácido sidowico (**47**) (Fig. 5.30) e mais dois compostos puros presentes nas frações DRG1M2-ME1C4B e DRG1M2-ME1C5C que necessitam ainda de análises adicionais para a identificação de suas estruturas.

Figura 5. 30 - Estrutura do ácido sidowico (**47**) isolado do fungo *Aspergillus sydowii*

5.3.2 Identificação estrutural do composto DRG1M2-MC2-4D

Após as etapas de purificação descritas no capítulo 4 foi possível observar que a fração DRG1M2-MC2-4D estava pura e por isso a amostra foi preparada para obtenção dos seus dados de RMN de ^1H (Fig. 8.9, anexo) e ^{13}C (Fig. 8.10, anexo) e

bidimensionais, gHSQC, gHMBC e gCOSY mostrados, respectivamente, nas figuras 8.11, 8.12 e 8.13 (anexo).

A substância presente na fração DRG1M2-MC2-4D apresentou-se como um óleo amarelado, cujas medidas de rotação específica mostraram que é opticamente ativa com $[\alpha]^{23.3}_D = -4^\circ$ (c: 1,0 mg/mL, MeOH).

A massa da fração DRG1M2-MC2-4D foi de 6,8 mg, esse valor corresponde a 0,34 % de rendimento em relação à massa inicial do extrato acetato de etila do meio de cultura do fungo *A. sydowii*.

No espectro de absorção no UV (Fig. 5.31) é possível observar três bandas com $\lambda_{\text{máx}}$ em 211,9, 243,7 e 299,3 nm. O espectro de massas do tipo spray de elétrons apresentou sinal de íon *quasi*-molecular $[M-H_2O]^+$ m/z 247 no modo positivo, o que sugere a massa de 264 u.m.a. para o composto.

Figura 5. 31 - Espectros de absorção no UV e massas da fração DRG1M2-MC2-4D

A análise dos sinais nos espectros de carbono e hidrogênio (Fig. 5.32) possibilitou a identificação da presença de quinze átomos de carbono, vinte átomos de hidrogênio e quatro átomos de oxigênio. Isso levou à fórmula molecular $C_{15}H_{20}O_4$ que é coerente com os dados observados no espectro de massas.

Figura 5. 32 - RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) da fração DRG1M2-MC2-4D solubilizada em $\text{DMSO}-d_6$

O espectro de RMN de ^1H apresentou um sinal singlete largo em δ 9,98 (1H) atribuído a hidrogênio de hidroxila de ácido carboxílico, e mais três sinais atribuídos à hidrogênios de anel aromático, sendo um dublete em δ 7,39 ($J = 8.0$ Hz, 1H), um duplo dublete em δ 7,33 ($J = 8.0, 1.7$ Hz, 1H) e um dublete em δ 7,28 ($J = 1.7$ Hz, 1H). A multiplicidade e os acoplamentos dos hidrogênios sugeriram a presença de um anel do tipo 1,3,4-trissubstituído.

Ainda no espectro de RMN de ^1H foi observado um sinal singlete largo em δ 5,55 (1H) característico de hidrogênio de grupo hidroxila, uma vez que esse sinal

não apresentou acoplamento ^1H - ^{13}C no mapa de contorno $g\text{HSQC}$. Além disso, foi observada também a presença de sinais característicos de hidrogênios de cadeia alquila, sendo eles os multipletes em δ 1,92 (1H) e em δ 1,66 (1H). Observou-se um sinal singlete correspondente a uma metila em δ 1,50 (3H), sinais multipletes que podem ser atribuídos a hidrogênios metilênicos em δ 1,25 (2H), sinais multipletes em δ 1,30 (1H) e δ 1,06 (1H) e sinais singletes de hidrogênios de metila em δ 0,98 (s, 3H) e δ 0,97 (s, 3H).

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Fig. 5.32) e do mapa de contorno $g\text{HSQC}$ (Fig. 8.11, anexo) permitiu a identificação de um sinal característico de carbono de carbonila em δ 167,41, um sinal em δ 154,76 característico de carbono com hibridização sp^2 ligado a oxigênio, sinais em δ 138,08 e δ 130,27 característicos de carbonos quaternários de anel aromático e sinais em δ 127,10, 119,86 e δ 116,78 característicos de carbonos metínicos de anel aromático. Também foram observados sinais de carbonos quaternários ligados a oxigênio em δ 74,97 e δ 68,91, três sinais de carbonos metilênicos em δ 44,18, δ 42,09 e δ 18,67, além de dois carbonos de metilas sobrepostos em δ 29,54 e um sinal de carbono de metila em δ 28,40.

A combinação destes dados com posteriores análises das correlações presentes no mapa de contorno $g\text{HSQC}$ permitiram identificar que os sinais de hidrogênios de metila em δ 0,97 e δ 0,98 apresentavam correlação com os carbonos em δ 29,54. Outro sinal de hidrogênios de metila foi observado em δ 1,50 que apresentava correlação com o carbono δ 28,40. Foram observados sinais de hidrogênios metilênicos diastereotópicos em δ 1,30 e δ 1,06 em correlação com o carbono em δ 18,67 e em δ 1,92 e δ 1,66 em correlação com o carbono em δ 42,09. Um sinal de hidrogênio metilênico foi ainda observado em δ 1,25 em correlação com o carbono em δ 44,18.

No mapa de contorno $g\text{HSQC}$ também foi possível observar correlações entre os hidrogênios em δ 7,39, δ 7,33 e δ 7,28 com os carbonos em δ 119,86, δ 127,10 e δ 116,78, respectivamente. Esses dados confirmam a presença de um anel aromático do tipo 1,3,4-trissubstituído.

A partir da análise dos dados fornecidos pelo mapa de contorno $g\text{HMBC}$ (Fig. 8.12, anexo) foi possível determinar correlações entre os carbonos em δ 154,76 e os hidrogênios em δ 7,28, δ 7,39 e δ 7,33 e entre o carbono em δ 167,41 e os hidrogênios em δ 7,28, δ 7,39. Foram observadas correlações entre o carbono em δ 138,08 e os hidrogênios em δ 7,33 e δ 7,28. Foram observadas ainda, correlações

entre o carbono em 130,27 e os hidrogênios em δ 7,39 e δ 7,28, entre o carbono em δ 119,86 e o hidrogênio em δ 7,28, bem como entre o carbono em δ 116,78 e os hidrogênios em δ 7,33 e δ 7,39.

A partir das informações contidas no mapa de contorno gCOSY (Fig. 8.13, anexo) o qual apresenta correlações ^1H - ^1H (2J e 3J) foi possível observar correlações sequenciais entre três grupos metilênicos que apresentam sinais de hidrogênio em δ 1,66 e δ 1,92, δ 1,06 e δ 1,30 e em δ 1,25. Foi possível observar também correlações entre os hidrogênios aromáticos em δ 7,33 e δ 7,39. Estes dados sugeriram a semiestrutura mostrada na figura 5.33.

Figura 5. 33 - Correlações observadas nos mapas de contorno gCOSY e gHMBC para o composto presente na fração DRG1-M2MC2-4D

Na análise do mapa de contorno gHMBC foram observadas ainda, correlações entre o carbono δ 74,97 e os hidrogênios em δ 1,66, δ 1,92 e também com os hidrogênios da metila em δ 1,50. Observou-se correlação entre o carbono em δ 42,09 e os hidrogênios da metila em δ 1,50. Correlação entre o carbono em δ 18,67 e os hidrogênios metilênicos em δ 1,25 também foi observada. Os sinais de

carbonos em δ 44,18 e δ 68,91 apresentaram correlações com os hidrogênios das metilas em δ 0,97 e δ 0,98, o sinal de carbono em δ 68,91 apresentou correlação também com os hidrogênios metilênicos em δ 1,25. Foram observadas também correlações entre o carbono em δ 28,40 e os hidrogênios metilênicos em δ 1,66 e δ 1,91.

A análise destes dados, somada ao fato de que os sinais de carbono em δ 68,91, δ 74,97 não apresentaram correlações com hidrogênios no mapa de contorno gHSQC, e são, portanto, quaternários, possibilitou sugerir a semiestrutura mostrada na figura 5.34.

Figura 5. 34 - Correlações observadas nos mapas de contorno gCOSY e gHMBC para o composto presente na fração DRG1-M2MC2-4D

A fórmula molecular C₁₅H₂₀O₄ encontrada para o composto presente na fração DRG1M2-MC2-4D indica um IDH (Índice de Deficiência de Hidrogênio) igual a 6. Foram observados na primeira semiestrutura proposta 4 insaturações e 1 ciclo. Assim, há a necessidade de mais uma insaturação ou um ciclo na estrutura para satisfazer ao IDH da fórmula. É necessário ainda, atribuir um átomo de oxigênio à

estrutura. Portanto, sugeriu-se a presença de um anel do tipo tetra-hidropirano como mostrado na semiestrutura da figura 5.35.

Figura 5. 35 - Semiestrutura do composto presente na fração DRG1-M2MC2-4D

Ainda de acordo com a análise do mapa de contorno gHMBC foi possível observar correlações entre o carbono em δ 74,97 e os hidrogênios em δ 7,39 e δ 7,28 e correlação entre o carbono em δ 138,08 e os hidrogênios da metila em δ 1,50. Com isso, e de acordo com as informações já apresentadas, foi possível chegar à estrutura final do composto presente na fração DRG1M2-MC2-4D com as atribuições dos sinais de ^1H e ^{13}C (Fig. 5.36).

Figura 5. 36 - Estrutura do composto presente na fração DRG1-M2MC2-4D com atribuições de carbono e hidrogênio e correlações observadas no mapa de contorno gHMBC

Os dados espectroscópicos obtidos para a fração DRG1M2-MC2-4D são mostrados na tabela 5.6.

Tabela 5. 6 - Deslocamentos de RMN de ^1H e ^{13}C e as correlações observadas para o composto presente na fração DRG1M2-MC2-4D

	$^{13}\text{C}^{\text{a}}$ (HSQC)	$^1\text{H}^{\text{b}}$ (mult, J = Hz, integral)	COSY ^c	HMBC ^d
1	154,76	-	-	H2, H5, H4
1-OH	-	5,55 (s, 1H)	-	-
2	116,78	7,28 (d, J = 1,7 Hz, 1H)	-	H4, H5
3	130,27	-	-	H2, H2
4	119,86	7,39 (d, J = 8,0 Hz, 1H)	H5	-
5	127,10	7,33 (dd, J = 8,0, 1,7 Hz, 1H)	H4	H4
6	138,08	-	-	H2, H4
7	74,97	-	-	H2, H4, H8, H14
8	42,09	1,66 (m, 1H); 1,92 (m, 1H)	H9, H10	H14
9	18,68	1,30 (m, 1H); 1,06 (m, 1H);	H8	H10
10	44,18	1,25 (m, 2H);	H9	H12, H13
11	68,91	-	-	H10
12	29,54	0,97 (s, 3H)	-	-
13	29,54	0,98 (s, 3H);	-	-
14	28,40	1,50 (s, 3H);	-	H8,
15	167,41	-	-	H4, H5
15-OH	-	9,98 (s, 1H);	-	H2, H4

^a100 MHz, DMSO- d_6 ; ^b400 MHz, DMSO- d_6 ; ^cDMSO- d_6 ; ^dDMSO- d_6

Os dados obtidos para o composto presente na fração DRG1M2-MC2-4D foram comparados com os dados da literatura (HAMASAKI; SATO; HATSUDA, 1975) para o composto ácido sidowico (**47**) (Fig. 5.37) e são mostrados na Tabela 5.7.

Tabela 5. 7 - Estudo comparativo dos valores de RMN de ^1H e ^{13}C para o composto ácido sidowico (47)

	$^{13}\text{C}^{\text{a}}$	$^{13}\text{C}^{\text{b}}$	$^1\text{H}^{\text{c}}$	$^1\text{H}^{\text{d}}$
1	154,76	157,1	-	-
1-OH	-		5,55 (s, 1H)	9,37 (s, 1H)
2	119,86	121,3	7,28 (d, $J= 1,7$ Hz, 1H)	7,14 (d, $J= 9,0$ Hz, 1H)
3	130,27	129,6	-	-
4	119,86	124,6	7,39 (d, $J= 8,0$ Hz, 1H)	7,57 (d, $J= 2,0$ Hz, 1H)
5	127,10	118,9	7,33 (dd, $J= 8,0, 1,7$ Hz, 1H)	7,6 (dd, $J= 2,0$ Hz 9,0 Hz, 1H)
6	138,08	137,0	-	-
7	74,97	77,6	-	-
8	42,09	33,8	1,66 (m, 1H); 1,92 (m, 1H)	1,5~1,8 (m, 1H); 2,2~2,6 (m, 1H)
9	18,68	16,6	1,30 (m, 1H); 1,06 (m, 1H)	1,5~1,8 (m, 2H)
10	44,18	36,7	1,25 (m, 2H);	1,5~1,8 (m, 2H)
11	68,91	75,3	-	-
12	29,54	31,9	0,97 (s, 3H)	0,95 (s, 3H)
13	29,54	31,3	0,98 (s, 3H)	1,28 (s, 3H)
14	28,40	24,8	1,50 (s, 3H)	1,5 (s, 3H)
15	167,41	172,0	-	-
15-OH	-		9,98 (s, 1H);	11,01 (s, 1H)

^a100 MHz, DMSO- d_6 ; ^b60 MHz, CDCl_3 ; ^c400 MHz, DMSO- d_6 ; ^d60 MHz, CDCl_3 ^{b,d}Hamasaki; Sato; Hatsuda, (1975)

Os dados da tabela 5.7 mostram em alguns casos uma grande diferença nos deslocamentos, principalmente de próton. Isso está relacionado ao efeito do solvente no qual ocorreu a aquisição dos espectros. Hamasaki, Sato e Hatsuda (1975) relatam a boa solubilidade do composto em CDCl_3 . Porém, isso não foi observado neste trabalho, o composto teve sua solubilidade testada em CDCl_3 mas não foi obtido o mesmo resultado, por isso os espectros foram obtidos em DMSO- d_6 .

Figura 5. 37 - Estrutura do (-)-ácido sidowico (47)

O ácido sidowico foi isolado originalmente por Hamasaki, Sato e Hatsuda (1975) a partir do mesmo organismo descrito neste trabalho, o fungo *Aspergillus sydowii*, porém do ambiente terrestre, como um produto natural pertencente à classe dos sesquiterpenos.

Há alguns trabalhos citando o ácido sidowico. Dentre estes Ishikawa, Morimoto e Piamasaki (1984) descrevem um estudo da sua propriedade inibitória da oxidação de óleo comestível e gorduras, isoladamente e em sinergismo com o tocoferol, porém o efeito não foi apreciável. Serra (2000) relatou a síntese do seu enantiômero (+)-ácido sidowico. Posteriormente, o enantiômero (+)-ácido sidowico foi isolado como produto natural por Wei e colaboradores (2010), também a partir de *Aspergillus sydowii* associada à gorgônia *Dichotella gemmacea*, que o testaram contra *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. O composto foi fracamente ativo contra a primeira e não apresentou atividade contra a segunda linhagem de bactéria patogênica.

6 Conclusões

O isolamento dos compostos purealidina L (**28**) e a 3-bromo-*N,N,N,O*-trimetiltirosina (**29**), a partir da esponja de código BA04ES-39, coletada na Baía de Todos os Santos, Salvador - BA, cujo extrato bruto apresentou atividade citotóxica, reforça a certeza na sua identificação como a espécie *Aiolochoia crassa*. Isso porque diversos estudos demonstraram o isolamento recorrente destes compostos a partir de diferentes amostras desta espécie de esponja.

O isolamento das pirazinas palitazina (**38**) e isopalitazina (**39**), a partir da esponja *Dysidea robusta* é inédito considerando-se que estes compostos foram anteriormente isolados a partir do coral zoantídeo *Palythoa tuberculosa*, animal sem relação filogenética com as esponjas. Isso leva à crer que estes compostos podem ter origem em micro-organismos simbiontes.

O ácido sidowico (**47**), um sesquiterpeno obtido a partir do extrato do meio de cultura da linhagem fúngica *Aspergillus sydowii* isolada da esponja marinha *Drummacidon reticulatum*, reforça a ocorrência de linhagens fúngicas de origem terrestre no ambiente marinho, e que muitas destas linhagens mantêm seu metabolismo original ativo no ambiente marinho.

É razoável imaginar que, por sua extensão, a costa brasileira abrigue um número muito grande de espécies vivas muitas destas ainda sem identificação, e por consequência, necessitam de investigação química e biológica, isso porque, é sabido que diversas substâncias provenientes de organismos do meio marinho apresentam atividade frente a sistemas biológicos, e algumas destas já se tornaram modelos para fármacos comercializados atualmente. Neste sentido, é possível concluir que este trabalho contribui consideravelmente com o avanço do conhecimento das espécies marinhas, mais especificamente de esponjas e fungos associados.

7 Referências bibliográficas

ABBAS, S.; KELLY, M.; BOWLING, J.; SIMS, J.; WATERS, A.; HAMANN, M. Advancement into the arctic region for bioactive sponge secondary metabolites. **Marine Drugs**, v. 9, p. 2423 - 2437, 2011.

ABED, C.; LEGRAVE, N.; DUFIES, M.; ROBERT, G.; GUÉRINEAU, V.; VACELET, J.; AUBERGER, P.; AMADE, P.; MEHIRI, M. A new hydroxylated nonaprenylhydroquinone from the mediterranean marine sponge *Sarcotragus spinosulus*. **Marine Drugs**, v. 9, p. 1210 - 1219, 2011.

ABRELL, L. M.; BORGESON, B.; CREWS, P. A new polyketide, secocurvularin, from the salt water culture of a sponge derived fungus. **Tetrahedron Letters**, v. 37, n. 50, p. 8983 - 8984, 1996.

ALBRIZIO, S.; CIMINIELLO, P.; FATTORUSSO, E.; MAGNO, S. Chemistry of verongida sponges. I. constituents of the Caribbean sponge *Pseudoceratina crassa*. **Tetrahedron**, v. 50, n. 3, p. 783 - 788, 1994.

ALKER, A. P.; SMITH, G. W.; KIM, K. Characterization of *Aspergillus sydowii* (Thom et Church), a fungal pathogen of Caribbean sea fan corals. **Hydrobiologia**, v. 460, p. 105 - 111, 2001.

ANKISETTY, S.; SLATTERY, M., 2012. Antibacterial secondary metabolites from the cave sponge *Xestospongia* sp. **Marine Drugs**, v. 10, p. 1037 - 1043, 2012.

APPELTANS, W. et al. The magnitude of global marine species diversity. **Current Biology**, v. 22, n. 23, p. 2189 - 2202

ASSMANN, M., WRAY, V., VAN SOEST, R. W. M. & PROKSCH, P. A new bromotyrosine alkaloid from the Caribbean sponge *Aiolochoira crassa*. **Zeitschrift für Naturforschung, C: Journal of Biosciences**, v. 53, p. 398 - 401, 1998.

BERBER, J. M. QUEK, N. C. H.; LEAHY, D. C.; MILLER, J.; BELLOWS, D. S.; NORTHCOTE, P. T. Lehuallides E-K, cytotoxic metabolites from the Tongan marine sponge *Plakortis* sp. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 809 - 815, 2011.

BERGMANN, W.; FEENEY, R. J. The isolation of new thymine pentoside from sponges. **Journal of the American Chemical Society**, v.72, p. 2809-2810, 1950.

BERGQUIST, P. R. **Sponges**. Los Angeles: University of California, 1978. 268 p.

BERGQUIST, P. R. Porifera. **National Museum of New Zealand Miscellaneous Series Supplement**: n. 7, p. 54 - 59, 1983.

BERLINCK, R. G. S.; TRINDADE-SILVA, A. E.; SANTOS, M. C. F. The chemistry and biology of organic guanidine derivatives. **Natural Product Reports**, v. 29, n. 12, p. 1369 - 1484, 2012.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; HU, W.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural product. **Natural Product Reports**, v. 26, p. 170 - 244, 2009.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 27, p. 165 - 237, 2010.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MUNRO, M. G. H.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural product. **Natural Product Reports**, v. 28, p. 196 - 268, 2011.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A.; MUNRO, M. H. G.; PRINSEP, M. R. Marine natural product. **Natural Product Reports**, v. 29, p. 144 - 222, 2012

BRASIL. Ministério da Saúde, Organização Pan-Americana de Saúde, Ministério da Ciência e Tecnologia. **Caracterização do estado da arte em biotecnologia marinha no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 134 p. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BREHM, M.; GÖVKEL, V. H.; JARGLIS, P.; LICHTENTHALER, F. W. Expedient conversion of D-glucose into 1,5-anhydro-D-fructose and into single stereogenic-center dihydropyranones, suitable six-carbon scaffolds for concise syntheses of the soft-coral constituents (-)-bisetone and (-)-palythazine. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 19, p. 358 - 373, 2008.

BUCHANAN, M. S.; CARROLL, A. R.; WESSLING, D.; JOBLING, M.; AVERY, V. M.; DAVIS, R. A.; FENG, Y.; HOOPER, J. N. A.; QUINN, R. J. Clavatadines C-E, guanidine alkaloids from the Australian sponge *Suberea clavata*. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 5, p. 973 - 975, 2009.

COSTA-LOTUFO, L. V.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; EPIFANIO, R. A. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: Histórico e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 703 - 716, 2009.

DAVIS, R. A.; BUCHANAN, S. M.; DUFFY, S.; AVERY, V. M.; CHARMAN, S. A.; CHARMAN, W. N.; WHITE, K. L.; SHACKLEFORD, D. M.; EDSTEIN, M. D.; ANDREWS, K. T.; CAMP, D.; QUINN, R. J. Antimalarial activity of pyrroloiminoquinones from the Australian marine sponge *Zyzzya* sp. **Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 5851 - 5858, 2012.

DUMDEI, E. J.; SIMPSON, J. S.; GARSON, M. J.; BYRIEL, K. A.; KENNARD, C. H. L. New chlorinated metabolites from the tropical marine sponge *Dysidea herbacea*. **Australian Journal of Chemistry**, v. 50, p. 139 - 144, 1997.

FAULKNER, D. J. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 14, n. 3, p. 258 - 302, 1997.

FENDERT, T.; WRAY, V.; VAN, S.; ROB, W. M.; PROKSCH, P. Bromoisoxazoline alkaloids from the Caribbean sponge *Aplysina insularis*. **Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences**, v. 54, p. 246 - 252, 1999.

FISKESUND, R.; ABEYAMA, K.; YOSINAGA, K.; ABE, J.; YUAN, Y.; YU, S. 1,5-anhydro-d-fructose and its derivatives: Biosynthesis, preparation and potential medical applications. **Planta Medica**, v. 76, p. 1635 - 1641, 2010.

FREITAS, A. C.; RODRIGUES, D.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; GOMES, A. M. P.; DUARTE, A. C. Marine biotechnology advances towards applications in new functional foods. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1506 - 1515. 2012.

GALEANO, E.; MARTÍNEZ, A.; THOMAS, O. P.; ROBLEDO, S.; MUNOZ, D. Antiparasitic bromotyrosine derivatives from the caribbean marine sponge *Aiolochoia crassa*. **Química Nova**, v. 35, n. 6, p. 1189 - 1193, 2012.

GANDOLFI, R. C.; MEDINA, M. B.; BERLINCK, R. G. S.; LIRA, S. P.; GALETTI, F. C. S.; SILVA, C. L.; VELOSO, K.; FERREIRA, A. G.; HAJDU, E.; PEIXINHO, S. Metabólitos secundários das esponjas *Aplysina fistularis* e *Dysidea* sp. e a atividade antituberculose da 11-cetofistularina-3. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1853 - 1858, 2010.

GORDALIZA, M. Cytotoxic terpene quinones from marine sponges. **Marine Drugs**, v. 8, p. 2849-2870, 2010.

HAJDU, E.; PEIXINHO, S.; FERNANDEZ, J. **Esponjasa da Bahia**: Guia de campo e laboratório. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2011. 276 p.

HAMASAKI, T.; NAGAYAMA, K.; HATSUDA, Y. Isolation of new metabolites from *Aspergillus sydowi* and structure of sydonic acid. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 39, p. 2337 - 2340, 1975.

HAMASAKI, T.; NAGAYAMA, K.; HATSUDA, Y. Two new metabolites, sydonic acid and hydroxysydonic acid, from *Aspergillus sydowi*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 42, n. 1, p. 37 - 40, 1978.

HE, F.; SUN, Y.; LIU, K.; ZHANG, X.; QIAN, P.; WANG, Y.; QI, S. Indole alkaloids from marine-derived fungus *Aspergillus sydowii* SCSIO 00305. **Journal of Antibiotics**, v. 65, n. 2, p. 109 - 111, 2012.

HIRANO, K.; KUBOTA, T.; TSUDA, M.; WATANABE, K.; FROMONT, J.; KOBAYASHI, J. Ma'edamines A and B, cytotoxic bromotyrosine alkaloids with a unique 2(1H) pyrazinone ring from sponge *Suberea* sp. **Tetrahedron**, v. 56, p. 8107 - 8110, 2000.

HIRATA, Y.; UEMURA, D. Halichondrins - antitumor polyether macrolides from a marine sponge. **Pure and Applied Chemistry**, v. 58, n. 5, p. 701 - 710, 1986.

HITORA, Y.; TAKADA, K.; OKADA, S.; MATSUNAGA, S. Miyakosynes A - F, cytotoxic methyl branched acetylenes from a marine sponge *Petrosia* sp.. **Tetrahedron**, v. 67, n. 25, p. 4530 - 4534, 2011.

HÖLLER, U.; KÖNIG, G. M.; WRIGHT, A. D. Three new metabolites from marine-derived fungi of the genera *Coniothyrium* and *Microsphaeropsis*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 1, p. 114 - 118, 1999.

HUANG, H.; WANG, F.; LUO, M.; CHEN, Y.; SONG, Y.; ZHANG, W.; ZHANG, S.; JU, J. Halogenated anthraquinones from the marine-derived fungus *Aspergillus* sp. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 1346 - 1352, 2012.

ISHIKAWA, Y.; MORIMOTO, K.; HAMASAKI, T. Flavoglucin, a metabolite of eurotium cheva, lieri, its antioxidation and synergism with tocopherol. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 61, n. 12, p. 1864 - 1868, 1984.

JARGLIS, P.; LICHTENTHALER, F. W. Sugar enolones. Part 15. A stereospecific synthesis of (S,S)-palythazine from D-glucose. **Angewandte Chemie**, v. 94, n. 2, p. 140 - 141, 1982.

JENSEN, P. R.; FENICALI, W. Secondary metabolites from marine fungi. In: HYDE, K. D. (Org.) **Fungi in marine environments**: Fungal diversity research series. Hong Kong: Fungal Diversity Press, 2002. v 7, p. 293 - 315.

JORGE, A. O. C.; Microbiologia e imunologia oral. Disponível em: <<http://books.google.com.br/books?id=zlvMzOa-YbYC&printsec=frontcover&hl=pt-BR#v=onepage&q&f=false>>. Acesso em: 23 jan. 2013.

JUREK, J.; YOSHIDA, W. Y.; SHEUER, P. J. Three new bromotyrosine-derived metabolites of the sponge *Psammophysilla purpurea*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 9, p. 1609 - 1612, 1993.

KALAITZIS, J.A.; DAVIS, R.A.; QUINN, R. J. Unequivocal ¹³C NMR assignment of cyclohexadienyl rings in bromotyrosine-derived metabolites from marine sponges. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 50, p. 749 - 754, 2012.

KEYZERS, R. A.; NORTHCOTE, P. T.; DAVIES-COLEMAN, M. T. Spongian diterpenoids from marine sponges. **Natural Product Reports**, v. 23, p. 321 - 334, 2006.

KOBAYASHI, J.; HONMA, K.; SASAKI, T.; TSUDA, M. Puralidins J - R, new bromotyrosine alkaloids from Okinawan marine sponge *Psammophysilla purpurea*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 43, n. 3, p. 403 - 407, 1995.

KOHLMEYER, J.; KOLMEYER, E. **Marine mycology: The higher fungi**. London: Academic Press, 1979. 704 p.

KOULMAN, A.; PROKSCH, P.; EBEL, R.; BEEKMAN, A.; UDEN, W.; KONINGS, A. W. T.; PEDERSEN, J. A.; PRAS, N.; WOERDENBAG, H. J. Cytotoxicity and mode of action of aeroplysinin-1 and a delated dienone from the sponge *Aplysina aerophoba*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 6, p. 591 - 594, 1996.

KUPKA, J.; ANKE, T.; GIANNETI, B.; STEGLICH, W. Antibiotics from basidiomycetes. XIV Isolation and biological characterization of hypnophilin, pleurotellol, and pleurotellic acid from *Pleurotellus hypnophilus* (Berk.) Sacc. **Archives os Microbiology**, v. 130, p. 223 - 227, 1981.

LIRA, T. O.; BERLINCK, R. G. S.; NASCIMENTO, G. G. F.; HAJDU, E. Further dibromotyrosine-derived metabolites from the marine sponge *Aplysina caissara*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 7, p. 1233 - 1240, 2006.

LIU, S.; FU, X.; SCHMITZ, F. J.; KELLY-BORGES, M. Psammaplysin F, a new bromotyrosine derivative from a sponge, *Aplysinella* sp. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 6, p. 614 - 615, 1997.

LIU, X.; SHEN, Y.; YANG, F.; HAMANN, M. T.; JIAO, W.; ZHANG, H.; CHEN, W. LIN, H. Simplexolides A - E and plakorfan A, six butyrate derived polyketides from the marine sponge *Plakortis simplex*. **Tetrahedron**, v. 68, p. 4635 - 4640, 2012.

LUIBRAND, R. T.; ERDMAN, T. R.; VOLLMER, J. J.; SCHEUER, P. J.; FINER, J.; CLARDY, J. Ilimaquinone, a sesquiterpenoid quinone from a marine sponge. **Tetrahedron**, v. 35, n. 5, p. 609 - 612, 1979.

MANI, L.; JULLIAN, V.; MOURKAZEL, B.; VALENTIN, A.; DUBOIS, J. CRESTEIL, T.; FOLCHER, E.; HOOPER, J. N. A.; ERPENBECK, D.; AALBERSBERG, W.; DEBITUS, C. New antiplasmodial bromotyrosine derivatives from *Suberea ianthelliformis* Lendenfeld, 1888. **Chemistry and Biodiversity**, v. 9, p. 1436 - 1451, 2012.

MANZO, E.; CIAVATTA, M. L.; VILLANI, G.; VARCAMONTI, M.; SAYEM, S. M. A.; SOEST, R.; GAVAGNIN, M. Bioactive terpenes from *Spongia officinalis*. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 5, p. 1241 - 1247, 2011.

MARQUES, S. O. **Estudo químico da esponja Dysidea robusta**. 2009, 75 f., v. 1. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

MIERZWA, R.; KING, A.; CONOVER, M. A.; TOZZI, S.; PUAR, M. S.; PATEL, M.; COVAL, S. J. Verongamine, a novel bromotyrosine-derived histamine H₃-antagonist from the marine sponge *Verongula gigantea*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 1, p. 175 - 177, 1994.

MINALE, L.; RICCIO, R.; SODANO, G. Avarol, a novel sesquiterpenoid hydroquinone with a rearranged drimane skeleton from the sponge *Disidea avara*. **Tetrahedron Letters**, v. 38, p. 3401 - 3404, 1974.

MOTTI, C. A.; BOURGUET-KONDRACKI, M.; LONGEON, A.; BOYLE, J. R.; LLEWELLYN, L. E.; TAPIOLAS, D. M.; YIN, P. Comparison of the biological properties of several marine sponge-derived sesquiterpenoid quinones. **Molecules**, v. 12, p. 1376-1388, 2007.

MUKAI, H.; KUBOTA, T.; AOYAMA, K.; MIKAMI, Y.; FROMONT, J.; KOBAYASHI, J. Tyrokeradines A and B, new bromotyrosine alkaloids with an imidazolyl-quinolinone moiety from a verongid sponge. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**, v.19, p. 1337 - 1339, 2009.

MURICY, G.; HAJDU, E. **Porifera Brasilis: guia de identificação das esponjas mais comuns do Sudeste do Brasil**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2006. 104 p. (Série Livros 17).

NAGAIHAH, K.; SRINIVASU, K.; KUMAR, S. P.; BASHA, J.; YADAV, J. S. Stereoselective synthesis of (S,S)-palythazine from D-mannitol. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 21, p. 885 - 889, 2010.

NUMATA, A.; AMAGATA, T.; MINOURA, K. ITO, T. Gymnastatins, novel cytotoxic metabolites produced by a fungal strain from a sponge. **Tetrahedron Letters**, v. 38, n. 32, p. 5675 - 5678, 1997.

OHKAWA, Y.; MIKI, K.; SUZUKI, T.; NISHIO, K.; SUGITA, T.; KINOSHITA, K.; TAKAHASHI, K.; KOYAMA K. Antiangiogenic metabolites from a marine-derived fungus, *Hypocrea Winosa*. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 4, p. 579 - 582, 2010.

OLUTIOLA, P. O.; COLE, O. O. Some environmental and nutritional factors affecting growth and sporulation of *Aspergillus sydowi*. **Physiologia Plantarum**, v. 39, n. 3, p. 239 - 242, 1977 apud ALKER, A. P.; SMITH, G. W.; KIM, K. Characterization of *Aspergillus sydowii* (Thom et Church), a fungal pathogen of Caribbean sea fan corals. **Hydrobiologia**, v. 460, p. 105 - 111, 2001.

PEIXINHO, S. **Aspectos da biologia de poríferas**. Disponível em: <<http://www.zoo1.ufba.br/porifera.html>>. Acesso em: 16 nov. 2012.

PENG, J.; LI, J.; HAMANN, T. **The marine bromotyrosine derivatives**. In: Alkaloids: Chemistry and Biology. G. A. CORDEL (Org.). Boston: Academic Press, v. 61, p. 59 - 262, 2005 apud KALAITZIS, J.A.; DAVIS, R.A.; QUINN, R. J. Unequivocal ¹³C NMR assignment of cyclohexadienyl rings in bromotyrosine-derived metabolites from marine sponges. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 50, p. 749 - 754, 2012

PETTIT, G. R.; HERALD, C. L.; DEUBEK, D. L.; HERALD, D. L. Isolation and structure of bryostatin 1. **Journal of the American Chemical Society**, v. 104, n. 24, p. 6846 - 6848, 1982.

ROMERO, F.; ESPLIEGO, F.; BAZ, J. P.; QUESADA, T. G.; GRÁVALOS, D.; CALLE, F.; FERNÁNDEZ-PUENTEZ, J. L. Thiocoraline, a new depsipeptide with antitumor activity produced by a marine *Micromonospora*. **The Journal of Antibiotics**, v. 50, n. 9, p. 734 - 737, 1997.

SANTALOVA, E. A.; DENISENKO, V. A.; STONIK, V. A. Dibromotyrosine and histamine derivatives from the tropical marine sponge *Aplysina* sp. **Natural Product Communications**, v. 5, n. 3, p. 377 - 382, 2010.

SERRA, S. Bisabolane sesquiterpenes: synthesis of (R)-(+)-sydowic acid and (R)-(+)-curcumene ether. **Synlett**, v. 6, p. 890 - 892, 2000.

SHAALA, L. A.; BAMANE, F. H.; BADR, J. M.; YOUSSEF, D. T. A. Brominated arginine-derived alkaloids from the red sea sponge *Suberea mollis*. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 1517 - 1520, 2011.

SHIN, J.; LEE, H.; SEO, Y.; RHO, J.; CHO, K. W.; PAUL, V. J. New bromotyrosine metabolites from the sponge *Aplysinella rhax*. **Tetrahedron**, v. 56, p. 9071 - 9077, 2000.

SILVA, M. M.; BERGAMASCO, J.; LIRA, S. P.; LOPES, N. P.; HAJDU, E.; PEIXINHO, S.; BERLINCK, R. G. S. Dereplication of Bromotyrosine-derived Metabolites by LC-PDA-MS and Analysis of the Chemical Profile of 14 *Aplysina* Sponge Specimens from the Brazilian Coastline. **Australian Journal of Chemistry**, v. 68, p. 886 - 894, 2010.

TAKADA, N.; WATANABE, R.; SUENAGA, K.; YAMADA, K.; UEDA, K.; KITA, M.; UEMURA, D. Zamamistatin, a significant antibacterial bromotyrosine derivative, from the Okinawan sponge *Pseudoceratina purpurea*. **Tetrahedron Letters**, v. 42, p. 5265 - 5267, 2001.

TAKAHASHI, Y.; TANAKA, N.; KUBOTA, T.; ISHIYAMA, H.; SHIBAZAKI, A.; GONOI, T.; FROMONT, J.; KOBAYASHI, J. Heteroaromatic alkaloids, nakijinamines, from a sponge *Suberites* sp. **Tetrahedron**, v. 68, p. 8545 - 8550, 2012.

TANG, S.; XU, R.; LIN, W.; DUAN, H. Jaspiferin A and B: Two new secondary metabolites from the south China sea sponge *Jaspis stellifera*. **Records of Natural Products**, v. 6, n. 4, p. 398 - 401, 2012.

TEUSCHER, F.; LIN, W.; WRAY, V.; EDRADA, R.; PADMAKUMAR, K.; PROKSCH, P.; EBELI, R. Two new cyclopentanoids from the endophytic fungus *Aspergillus sydowii* associated with the marine alga *Acanthophora spicifera*. **Natural Product Communications**, v. 1, n. 11, p. 927 - 933, 2006.

- TILVI, S.; RODRIGUES, C.; NAIK, C. G.; PARAMESWARAN, P. S.; WAHIDHULLA, S. New bromotyrosine alkaloids from the marine sponge *Psammaplysilla purpurea*. **Tetrahedron**, v. 60, p. 10207 - 10215, 2004.
- TRISUWAN, K.; RUKACHAISIRIKUL, V.; KAEWPET, M.; PHONGPAICHIT, S.; HUTADILOK-TOWATANA, N.; PREEDANON, S.; SAKAYAROJ, J. Sesquiterpene and xanthone derivatives from the sea fan-derived fungus *Aspergillus sydowii* PSU-F154. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 1663 - 1667, 2011.
- TSUDA, M.; ENDO, T.; WATANABE, K.; FROMONT, J.; KOBAYASHI, J. Nakirodin A, a bromotyrosine alkaloid from a verongid sponge. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 11, p. 1670 - 1671, 2002.
- UDDIN, M. H.; HOSSAIN, M. K.; NIGAR, M.; ROY, M. C.; TANAKA, J. New cytotoxic spongian-class rearranged diterpenes from a marine sponge. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 48, n. 3, p. 412 - 415, 2012.
- UEMURA, D.; TOYA, Y.; WATANABE, I.; HIRATA, Y. Isolation and structures of two new pyrazines, palythazine and isopalythazine from *Palythoa tuberculosa*. **Chemistry Letters**, v. 8, n. 12, p. 1481 - 1482, 1979 .
- VACELET, J.; BOURY-ESNAULT, N. Carnovorous sponges. **Nature**, v. 373, n. 26, p. 333 - 335, 1995.
- VAROGLU, M.; CREWS, P. Biosynthetically Diverse Compounds from a Saltwater Culture of sponge-Derived *Aspergillus niger*. **Journal of Natural Products** , v. 63, n. 1, p. 41 - 43, 2000.
- WEI, M. WANG, C.; LIU, Q.; SHAO, C.; SHE, Z.; LIN, Y. Five Sesquiterpenoids from a Marine-Derived Fungus *Aspergillus* sp. Isolated from a Gorgonian *Dichotella gemmacea*. **Marine Drugs**, v. 8, p. 941 - 949, 2010.
- WHITSON, E. L.; PLUCHINO, K. M.; HALL, M. D.; McMAHON, J. B.; McKEE, T. C. New candidaspongiolides, tedanolide analogues that selectively inhibit melanoma cell growth. **Organic Letters**, v. 13, n. 13, p. 3518 - 3521, 2011.
- WILLIAMS, D. E.; MARQUES, S. O.; HAJDU, E.; PEIXINHO, S.; ANDERSEN, R. J.; BERLINCK, R. G. S. Pyrodysinoic acid derivatives from the marine sponge *Dysidea robusta*. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 9, p. 1691 - 1694, 2009.
- WILLIAMS, D. E.; STEINØ, A.; VOOGD, N. J.; MAUK, A. G.; ANDERSEN, R. J. Halicloic acids A and B isolated from the marine sponge *Haliclona* sp. collected in the Philippines inhibit indoleamine 2,3-dioxygenase. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 1451 - 1458, 2012.
- XU, M.; ANDREWS, K. T.; BIRRELL, G. W.; TRAN, T. L.; CAMP, D.; DAVIS, R. A.; QUINN, R. J. Psammaplysin H, a new antimalarial bromotyrosine alkaloid from a

marine sponge of the genus *Pseudoceratina*. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, p. 846 - 848, 2011.

XU, M.; DAVIS, R. A.; FENG, Y.; SYKES, M. L.; SHELPER, T.; AVERY, V. M.; CAMP, D.; QUINN, R. J. Ianthelliformisamines A - C, antibacterial bromotyrosine-derived metabolites from the marine sponge *Suberea ianthelliformis*. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 1001 - 1005, 2012.

YANG, X.; DAVIS, R. A.; BUCHANAN, M. S.; DUFFY, S.; AVERY, V. M.; CAMP, D.; QUINN, R. J. Antimalarial bromotyrosine derivatives from the Australian marine sponge *Hyattella* sp. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 5, p. 985 - 987, 2010.

ZHANG, H.; KHALIL, Z. G.; CAPON, R. J. Fascioquinols A - F: bioactive meroterpenes from a deep-water southern Australian marine sponge, *Fasciospongia* sp. **Tetrahedron**, v. 67, p. 2591 - 2595, 2011.

8 Anexos

Figura 8. 1 - Espectro de RMN de ^1H da fração BA04ES-39W3C em $\text{DMSO}-d_6$ (400 MHz)

Figura 8. 2 - Espectro de RMN de ^1H da fração BA04ES-39W1C em $\text{DMSO}-d_6$ (400 MHz)

Figura 8. 3 - Espectro de massas (ESI+) da fração DrW2P3C

Figura 8. 4 - Espectro de RMN de ^1H da fração DrW2P3C, em $\text{DMSO}-d_6$ (600 MHz)

Figura 8. 5 - Espectro de RMN de ^{13}C da fração DrW2P3C, em $\text{DMSO}-d_6$ (600 MHz)

Figura 8. 6 - Espectro HSQC ^1H - ^{13}C da fração DrW2P3C, em $\text{DMSO}-d_6$

Figura 8. 7 - Espectro HMBC ^1H - ^{13}C da fração DrW2P3C, em $\text{DMSO}-d_6$

Figura 8. 8 - Espectro COSY ^1H - ^1H da fração DrW2P3C, em $\text{DMSO}-d_6$

Figura 8. 9 - Espectro de RMN de ^1H da fração DRG1M2-MC2-4D, em $\text{DMSO}-d_6$ (400 MHz)

Figura 8. 10 - Espectro de RMN de ^{13}C da fração DRG1M2-MC2-4D, em $\text{DMSO}-d_6$ (100 MHz)

Figura 8. 12 - Espectro HMBC ^1H - ^{13}C da fração DRG1M2-MC2-4D, em $\text{DMSO}-d_6$

Figura 8. 13 - Espectro COSY ^1H - ^1H da fração DRG1M2-MC2-4D, em $\text{DMSO}-d_6$