

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

"Metabólitos Secundários Bioativos e Mediadores de Relação
Predador/Presa de Invertebrados Marinhos"

Fábio Renato Pereira

Tese apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos para a
obtenção do título de doutor em
Ciências. Área de concentração:
Físico-Química.

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

São Carlos-SP
2011

Exemplar revisado.

O exemplar original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação do IQSC-USP.

DEDICATÓRIA

AOS MEUS PAIS

Oswaldo e Eliana, por todo o apoio e amor incondicional
em todos os momentos de minha vida.

À minha irmã Cynthia pelo carinho e amizade.

À toda a minha família.

À Miriam por todo o amor e carinho.

Agradecimentos

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

- *Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck, pela dedicação, confiança, paciência e amizade durante a realização deste trabalho;*
- *Ao Prof. Dr. Guilherme Muricy (Museu Nacional- UFRJ) pela classificação da esponja *Agelas sventres*.*
- *Ao Vinícius Padula (Museu Nacional - UFRJ) pela coleta e identificação dos nudibrânquios e briozoários estudados neste trabalho;*
- *À Profa. Rosana Moreira da Rocha pela identificação da ascídia *Didemnum sp.* investigada neste trabalho;*
- *Ao Dr. André Tempone (Instituto Adolfo Lutz – São Paulo) pela realização dos bioensaios de atividade antiparasitária contra o protozoário *Leishmania chagasi* e de atividade tripanossomicida contra *Tripanosoma cruzi*;*
- *Ao Prof. Dr. Antonio Ferreira-Pereira (Departamento de Microbiologia Geral – UFRJ) pela realização dos bioensaios de atividade inibitória contra a enzima *Pdr5p*;*
- *Ao Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira e Katyuscya Veloso (Departamento de Química – UFSCar) pela inestimável ajuda e colaboração na obtenção de espectros de RMN;*
- *Ao Prof. Dr. Wagner Vilegas (IQ – UNESP) pela disponibilização de polarímetros para obtenção de medidas de rotação específica;*
- *Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho (Departamento de Química – UFSCar) pelas análises e obtenção dos espectros do tipo MS/MS;*
- *Ao Prof. Dr. Norberto P. Lopes (Faculdade de Ciências Farmacêuticas – FFCLRP) pela obtenção dos espectros de massas de alta resolução;*
- *Ao Instituto de Química de São Carlos pela infra-estrutura disponibilizada;*

- À *Silvia e Andréia da seção de pós-graduação;*
- À *CNPq, pela bolsa de estudos concedida e à FAPESP pelo apoio financeiro;*
- À *todos os amigos e colegas do Grupo de Química Orgânica de Produtos Naturais.*

Volume 1

Sumário

Índice de Figuras.....	iv
Índice de Esquemas.....	x
Índice de Tabelas.....	xi
Lista de Símbolos e Abreviaturas.....	xii
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xv
Capítulo 1 - Introdução à Química de Produtos Naturais.....	1
1.1. Produtos Naturais.....	1
1.2. Produtos Naturais Marinhos.....	4
1.3. Produtos Naturais de Esponjas Marinhas.....	6
1.4. Produtos Naturais de Ascídias.....	10
1.5. Produtos Naturais de Nudibrânquios.....	14
1.6. Produtos Naturais de Briozoários.....	21
Capítulo 2 – Justificativa e Objetivos.....	25
Capítulo 3 - Parte Experimental.....	26
3.1. Técnicas Espectroscópicas.....	26
3.1.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	26
3.1.2. Ultravioleta-Visível (UV-Vis).....	26
3.1.3. Infravermelho (IV).....	26
3.1.4. Espectrometria de Massas (MS).....	27
3.1.5. Rotação Ótica $[\alpha]_D$	27
3.2. Técnicas Cromatográficas.....	27
3.2.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	27
3.2.2. Cromatografia em Coluna pré-empacotada.....	28

3.2.3. Cromatografia em Coluna por exclusão de tamanho.....	28
3.2.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	29
3.2.5. Solventes.....	30
3.3. Protocolos dos Bioensaios.....	30
3.3.1. Determinação da Atividade Inibitória da oroidina.....	30
3.3.1.1. Preparação das Membranas de Plasma.....	30
3.3.1.2. Ensaios NTPase.....	30
3.3.1.3. Avaliação do Rendimento de Crescimento.....	30
3.3.2. Determinação <i>in vitro</i> da Atividade Antiparasitária e da Concentração Efetiva 50% (CE ₅₀) para Morte de Parasitas <i>Leishmania</i> sp. e <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
Capítulo 4 - Estudo químico dos extratos <i>n</i>-BuOH, AcOEt e CH₂Cl₂ da esponja marinha <i>Agelas sventres</i>.....	34
4.1. Introdução.....	34
4.2. Procedimento Experimental - Estudo do extrato bruto da esponja marinha <i>Agelas sventres</i>	41
4.3. Resultados.....	46
4.4. Atividade inibitória da oroidina.....	65
Capítulo 5 - Estudo químico do nudibrânquio <i>Tambja stegosauriformis</i> e do briozoário <i>Bugula</i> sp.....	69
5.1. Nudibrânquio <i>Tambja stegosauriformis</i>	69
5.1.1 – Introdução.....	69
5.1.2 – Procedimento Experimental: nudibrânquio <i>T. stegosauriformis</i>	71
5.1.3 – Resultados: Compostos identificados no extrato metanólico do nudibrânquio <i>Tambja stegosauriformis</i>	73
5.2. Briozoário <i>Bugula</i> sp.....	89
5.2.1 Introdução.....	89
5.2.2 Procedimento Experimental: briozoário <i>Bugula</i> sp.....	92
5.2.3 Resultados: Compostos identificados no extrato metanólico do briozoário <i>Bugula</i> sp.....	97
Capítulo 6 - Estudo químico da ascídia <i>Didemnum</i> sp. e do nudibrânquio <i>Pleurobranchus areolatus</i>.....	109
6.1 Ascídia <i>Didemnum</i> sp.....	109

6.1.1	Introdução.....	109
6.1.2	Procedimento experimental: ascídia <i>Didemnum</i> sp.....	115
6.1.3	Resultados obtidos no estudo do extrato metanólico da ascídia <i>Didemnum</i> sp.....	119
6.2	Nudibrânquio <i>Pleurobranchus areolatus</i>	123
6.2.1	Introdução.....	123
6.2.2	Procedimento experimental: nudibrânquio <i>Pleurobranchus areolatus</i>	125
6.2.3	Resultados: extrato metanólico do nudibrânquio <i>Pleurobranchus areolatus</i>	129
Capítulo 7 - Estudo químico dos nudibrânquios <i>Hypselodoris picta lajensis</i> e <i>Okenia zoobotryon</i> e do briozoário <i>Zoobotryon verticillatum</i>.....		142
7.1.	Nudibrânquio <i>Hypselodoris picta lajensis</i>	142
7.1.1	Introdução.....	142
7.1.2.	Procedimento Experimental - <i>Hypselodoris picta lajensis</i>	143
7.1.3.	Resultados: composto isolado no extrato etanólico do nudibrânquio <i>Hypselodoris picta lajensis</i>	145
7.2.	Nudibrânquio <i>Okenia zoobotryon</i> (Smallwood, 1910).....	149
7.2.1	Introdução e Procedimento Experimental.....	149
7.3.	Briozoário <i>Zoobotryon verticillatum</i>	153
7.3.1	Introdução e Procedimento Experimental.....	153
7.4	Determinação estrutural do composto isolado do extrato etanólico do nudibrânquio <i>Okenia zoobotryon</i> e do extrato metanólico do briozoário <i>Zoobotryon verticillatum</i>	156
Capítulo 8 – Conclusões.....		163
Capítulo 9 - Referências Bibliográficas.....		169

Índice de Figuras

Figura 1: Estruturas químicas dos compostos 1-5	2
Figura 2: Estruturas químicas dos compostos 6-8	3
Figura 3: Estruturas químicas dos compostos 9-12	3
Figura 4: Estruturas químicas dos compostos 13-16	5
Figura 5: Distribuição dos produtos naturais de origem marinha (Blunt et al., 2011).....	6
Figura 6: Diagrama de uma esponja asconóide parcialmente seccionada.....	7
Figura 7: Estruturas químicas dos compostos 17-21	8
Figura 8: Estruturas químicas dos compostos 22-27	9
Figura 9: Estruturas químicas dos compostos 28-31	10
Figura 10: Fotos das ascídias <i>Ascidia mentula</i> e <i>Didemnum albidum</i>	11
Figura 11: Estruturas dos compostos 32-36	12
Figura 12: Estruturas dos compostos 37-41	13
Figura 13: Estruturas dos compostos 42-44	14
Figura 14: <i>Pleurobranchea californica</i> (http://www.seaslugforum.net/pleucali.htm), <i>Tambja eliora</i> (http://www.seaslugforum.net/tambelio.htm) e <i>Doriopsis flabellifera</i> (http://www.seaslugforum.net/factsheet/doriflab).....	15
Figura 15: Estruturas químicas dos compostos 44-45	16
Figura 16: Estruturas dos compostos 46-59	17
Figura 17: Estruturas dos compostos 60 e 42	17
Figura 18: Estruturas dos compostos 62-66	18
Figura 19: Estruturas dos compostos 67-70	19
Figura 20: Estruturas dos compostos 71-72	20
Figura 21: Estruturas dos compostos 73-75	20
Figura 22: briozoário <i>Amathia convoluta</i> (www.bio.georgiasouthern.edu).....	22
Figura 23: Estrutura química da briostatina (76).....	22
Figura 24: Estrutura química dos compostos 77-84	24
Figura 25: <i>Agelas clathrodes</i> (Schmidt, 1870).....	34

Figura 26: Origem biogenética hipotética dos derivados pirrolaminopropilimidazol.....	35
Figura 27: Bromação catalizada por V-BrPO e por brometo aquoso do 1,3-di- <i>tert</i> -butilindol.....	36
Figura 28: Bromação catalizada por V-BrPO e ciclização do geraniol.....	37
Figura 29: Bromação catalizada por V-BrPO e ciclização do geranil acetato.....	37
Figura 30: Estruturas dos compostos 85-86	38
Figura 31: Estruturas das nagelamidas A-H e J (87-95).....	39
Figura 32: Estruturas das nagelamidas K-T (96-103).....	40
Figura 33: Fracionamento do extrato <i>n</i> -butanólico da esponja <i>Agelas sventres</i>	42
Figura 34: Fracionamento do extrato diclorometano da esponja <i>Agelas sventres</i>	44
Figura 34b: Fracionamento do extrato diclorometano da esponja <i>Agelas sventres</i>	44
Figura 35: Fracionamento do extrato AcOEt da esponja <i>Agelas sventres</i>	45
Figura 36: Estrutura da oroidina (104) e os deslocamentos químicos observados no RMN- ¹³ C.....	46
Figura 37: Espectro de massas de baixa resolução da oroidina (ESI ⁺).....	47
Figura 38: Espectro de massas de baixa resolução da sventrina (ESI ⁺).....	48
Figura 39: Espectro de massas de baixa resolução da dispacamida A (ESI ⁺).....	49
Figura 40: Espectro de massas de baixa resolução da taurodispacamida A (ESI ⁺).....	49
Figura 41: Espectro de massas do tipo MS/MS da sventrina.....	50
Figura 42: Espectro de massas do tipo MS/MS da dispacamida A.....	52
Figura 43: Espectro de massas do tipo MS/MS da taurodispacamida A.....	54
Figura 44: Correlações observadas para a hanishina (108).....	57
Figura 45: Estrutura da hanishina (108) e os deslocamentos químicos observados no RMN- ¹³ C.....	57
Figura 46: Espectro de massas de baixa resolução da hanishina (ESI ⁺).....	58
Figura 47: Estrutura da longamida B (109).....	59
Figura 48: Estrutura do éster metílico da longamida B (110).....	60
Figura 49: Espectro de massas de baixa resolução da longamida B (ESI ⁺).....	61
Figura 50: Espectro de massas de baixa resolução da longamida B metil-éster (ESI ⁺).....	61

Figura 51: Espectro de massas de baixa resolução do ácido dibromopirrólico (ESI ⁺).....	62
Figura 52: Espectro de massas do tipo MS/MS da longamida B.....	63
Figura 53: Espectro de massas do tipo MS/MS da longamida B metil éster.....	65
Figura 54: Estrutura da oroidina.....	66
Figura 55: Inibição da atividade “oligomycin-sensitive ATPase” pela oroidina isolada da esponja <i>Agelas sventres</i>	67
Figura 56: Inibição da oroidina do efluxo R6G na linhagem AD124567.....	67
Figura 57: Estruturas dos compostos BE18591 e YP1.....	70
Figura 58: Fotografia do nudibrânquio <i>Tambja stegosauriformis</i>	70
Figura 59: Estruturas das tambjamins K e D (113 e 118).....	71
Figura 60: Processo de extração do nudibrânquio <i>Tambja stegosauriformis</i> (extrato metanólico = Tsme; extrato hexânico = Tshx).....	72
Figura 61: Fracionamento do extrato metanólico do nudibrânquio <i>Tambja stegosauriformis</i>	73
Figura 62: Estruturas das tambjamins A e B (114 e 115).....	73
Figura 63: Espectros de UV-vis e massas (ESI ⁺) da fração Tsme-4.....	74
Figura 64: Estruturas das tambjamins D e I (113 e 119).....	76
Figura 65: Espectros de UV-vis e massas (ESI ⁺) da fração Tsme-7.....	76
Figura 66: Espectros no ultravioleta e de massas (ESI ⁺) da fração Tsme-2b1.....	77
Figura 67: Estruturas dos compostos 117 e 120	78
Figura 68: Espectros no ultravioleta e de massas (ESI ⁺) da fração Tsme-8.....	79
Figura 69: Espectros no ultravioleta e de massas (ESI ⁺) da fração Tsme-6.....	80
Figura 70: Espectro de massas do tipo MS/MS da tambjamina C.....	81
Figura 71: Espectro de massas do tipo MS/MS da tambjamina D.....	83
Figura 72: Espectro de massas do tipo MS/MS do aldeído da tambjamina B.....	85
Figura 73: Espectro de massas do tipo MS/MS do aldeído da tambjamina A.....	86
Figura 74: Espectro de massas do tipo MS/MS da tambjamina K.....	87
Figura 75: Estrutura da neristatina 1 (121).....	89
Figura 76: Fotografia dos briozoários <i>Bugula plumosa</i> , <i>B. neritina</i> e <i>B. flabellata</i>	90

Figura 77: Origem biossintética de uma prodiginina deduzida a partir de precursores marcados.....	91
Figura 78: Estruturas das tambjamins G-J isolados do briozoário <i>Bugula dentata</i>	92
Figura 79: Processo de extração e fracionamento do briozoário <i>Bugula sp.</i>	94
Figura 80: Fracionamento da amostra CF11BRI-2CD.....	94
Figura 81: Fracionamento da amostra CF11BRI-2G.....	95
Figura 82: Fracionamento da amostra CF11BRI-2H.....	96
Figura 83: Fracionamento das amostras CF11BRI-2I e CF11BRI-2I5.....	96
Figura 84: Espectros de UV e de massas (ESI ⁺ e ESI ⁻) do aldeído da tambjamina B.....	98
Figura 85: Espectros de UV e de massas (ESI ⁺ e ESI ⁻) da tambjamina C.....	99
Figura 86: Espectros de UV e de massas (ESI ⁺ e ESI ⁻) da tambjamina D.....	100
Figura 87: Espectros de UV e de massas (ESI ⁺ e ESI ⁻) da tambjamina A.....	101
Figura 88: Espectros de UV e de massas (ESI ⁺ e ESI ⁻) da tambjamina K.....	102
Figura 89: Estruturas dos compostos 113 , 117 , 119 , 122 e 124	104
Figura 90: Estrutura proposta do composto 125 e correlações observadas nos espectros de RMN do tipo COSY e HMBC.....	105
Figura 91: Espectros de UV e de massas (ESI ⁺) do composto (125).....	106
Figura 92: Espectros de UV e de massas (ESI ⁺) do composto não identificado da fração CF11-2CD2.....	107
Figura 93: Espectros de UV e de massas (ESI ⁺) do composto não identificado da fração CF11-2CD4.....	107
Figura 94: Tambjamins identificadas no briozoário <i>Bugula sp.</i> e no nudibrânquio <i>T. stegosauriformis</i>	108
Figura 95: Estruturas dos compostos 126-129	110
Figura 96: Fotografias das ascídias <i>Didemnum molle</i> , <i>D. granullatum</i> e <i>D. albidum</i>	110
Figura 97: Estruturas dos compostos 130-132	111
Figura 98: Estruturas dos compostos 133-138	112
Figura 99: Estruturas dos compostos 139-142	113
Figura 100: Estruturas dos compostos 143-146	114
Figura 101: Estruturas dos compostos 147-149	114

Figura 102: Estruturas dos compostos 150-157	115
Figura 103: Processo de extração da ascídia <i>Didemnum</i> sp.....	116
Figura 104: Fracionamento do extrato acetato de etila da ascídia <i>Didemnum</i> sp.....	117
Figura 105: Fracionamento da amostra ASAc-2d.....	117
Figura 106: Fracionamento do extrato aquoso da ascídia <i>Didemnum</i> sp.....	119
Figura 107: Fracionamento da amostra AS11-Aq2c.....	119
Figura 108: Estruturas das rodriguesinas A e B.....	120
Figura 109: Espectros no ultravioleta e de massas (ESI+) da fração ASAc-2d3.....	120
Figura 110: Espectros no ultravioleta e de massas (ESI+) da fração AS11-Aq2c5.....	122
Figura 111: Fotografias dos nudibrânquios <i>Pleurobranchus forskalii</i> , <i>P. grandis</i> e <i>P. areolatus</i>	123
Figura 112: Estruturas dos compostos 158-163	124
Figura 113: Estruturas dos compostos 164 e 165	125
Figura 114: Extração e fracionamento do extrato metanólico do nudibrânquio <i>Pleurobranchus areolatus</i>	126
Figura 115: Fracionamento do extrato metanólico do nudibrânquio <i>Pleurobranchus areolatus</i>	127
Figura 116: Fracionamento da amostra Pame-3.....	128
Figura 117: Fracionamento da amostra Pame-3d6.....	129
Figura 118a: Fragmento estrutural do composto 166	130
Figura 118b: Fragmento estrutural do composto 166	131
Figura 119: Estrutura e deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C do composto 166	132
Figura 120: Correlações observadas no espectro do tipo COSY do composto 166	133
Figura 121: Correlações observadas no espectro do tipo HMBC do composto 166	134
Figura 122: Espectros no ultravioleta e de massas de baixa resolução (ESI ⁺) do composto (166).....	136
Figura 123a: Fragmento estrutural do composto 167	137
Figura 123b: Fragmento estrutural do composto 167	138
Figura 124: Estrutura da etzionina.....	139
Figura 125: Estrutura e deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C do composto 167	139

Figura 126: Espectros no ultravioleta e de massas de baixa resolução (ESI+) do composto (167).....	141
Figura 127: Fotografia do nudibrânquio <i>Hypselodoris picta lajensis</i>	142
Figura 128: Estrutura da furodisinina (169).....	143
Figura 129: Estrutura da 22-deoxi-23-hidroximetilvariabilina (170).....	143
Figura 130: Processo de extração do nudibrânquio <i>Hypselodoris picta lajensis</i>	144
Figura 131: Fracionamento e purificação do extrato etanólico do nudibrânquio <i>Hypselodoris picta lajensis</i>	145
Figura 132: Correlações ^1H - ^1H observadas para a lactona da furodisinina (COSY).....	146
Figura 133: Correlações ^{13}C - ^1H observadas para a lactona da furodisinina (HMBC).....	146
Figura 134: Estrutura da lactona da furodisinina (171) e os deslocamentos químicos observados no RMN- ^{13}C e ^1H	147
Figura 135: Espectros de UV e de massas (ESI ⁺ e ESI ⁻) da lactona da furodisinina (171).....	148
Figura 136: Fotografias do nudibrânquio <i>Okenia zoobotryon</i>	149
Figura 137: Estruturas dos compostos 172 e 173.....	149
Figura 138: Processo de extração do nudibrânquio <i>Okenia zoobotryon</i>	150
Figura 139: Fracionamento do extrato etanólico do nudibrânquio <i>Okenia zoobotryon</i>	151
Figura 140: Purificação da fração Oket-2 do nudibrânquio <i>Okenia zoobotryon</i>	152
Figura 141: Fotografia do briozoário <i>Zoobotryon verticillatum</i>	153
Figura 142: Processo de extração do briozoário <i>Zoobotryon verticillatum</i> e fracionamento de seu extrato metanólico.....	154
Figura 143: Separação da fração Zvme-5 do briozoário <i>Zoobotryon verticillatum</i>	155
Figura 144: Cromatograma e espectro de massas da fração Oket-5b (ESI ⁺). Condições: coluna Waters X-Terra MS C ₁₈ , 3,5 μm , 2,1x50 mm; gradiente de MeOH em H ₂ O (início em MeOH/H ₂ O 2:8, curva linear) e fluxo de 0,5 mL/min.; MS: 25 V de voltagem do cone; modo ESI ⁺	157
Figura 145: Cromatograma e espectro de massas da fração Zvme-5b2 (ESI ⁺). Condições: coluna Waters X-Terra MS C ₁₈ , 3,5 μm , 2,1x50 mm; gradiente de MeOH em H ₂ O (início em MeOH/H ₂ O 2:8, curva linear) e fluxo de 0,5 mL/min.; MS: 25 V de voltagem do cone; modo ESI ⁺	158
Figura 146: Espectros de RMN- ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) das frações Oket-5b (<i>Okenia zoobotryon</i>) e Zvme-5b2 (<i>Zoobotryon verticillatum</i>).....	159
Figura 147: Estrutura da 2,5,6-tribromo- <i>N</i> -metilgramina.....	160
Figura 148: Espectro de massas do composto não identificado da fração Oket-2d (ESI ⁺).....	161

Figura 149: Compostos identificados nos extratos da esponja marinha <i>Agelas sventres</i>	165
Figura 150: Compostos identificados nos extratos do nudibrânquio <i>T. stegosauriformis</i> e sua presa, o briozoário <i>Bugula</i> sp.....	166
Figura 151: Compostos identificados nos extratos do nudibrânquio <i>P. areolatus</i> e sua presa, a ascídia <i>Didemnum</i> sp.....	167
Figura 152: Compostos identificados nos extratos do nudibrânquio <i>H. lajensis</i> e sua presa, a esponja marinha <i>Dysidea</i> sp.....	167
Figura 153: Compostos identificados nos extratos do nudibrânquio <i>O. zoobotryon</i> e sua presa, o briozoário <i>Z. verticillatum</i>	168

Índice de Esquemas

Esquema 1. Rota de fragmentação proposta para a sventrina, segundo análise de seu espectro de massas do tipo MS/MS.....	51
Esquema 2. Rota de fragmentação proposta para a dispacamida A, segundo análise de seu espectro de massas do tipo MS/MS.....	53
Esquema 3. Rota de fragmentação proposta para a taurodispacamida A, segundo análise de seu espectro de massas do tipo MS/MS.....	55
Esquema 4. Rota de fragmentação proposta para a longamida B, segundo análise de seu espectro de massas do tipo MS/MS.....	64
Esquema 5. Rota de fragmentação proposta para a tambjamina C, segundo análise de seu espectro de massas do tipo MS/MS.....	82
Esquema 6. Rota de fragmentação proposta para a tambjamina D, segundo análise de seu espectro de massas do tipo MS/MS.....	84
Esquema 7. Rota de fragmentação proposta para o aldeído da tambjamina B, segundo análise de seu espectro de massas do tipo MS/MS.....	85
Esquema 8. Rota de fragmentação proposta para o aldeído da tambjamina A, segundo análise de seu espectro de massas do tipo MS/MS.....	86
Esquema 9. Rota de fragmentação proposta para a tambjamina K, segundo análise de seu espectro de massas do tipo MS/MS.....	88

Índice de Tabelas

Tabela 1: Comparação dos valores de deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C da fração AgsBu-2c com dados da literatura.....	47
Tabela 2: Comparação dos valores de deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C da fração AgsDM-3h com dados da literatura.....	56
Tabela 3: Comparação dos valores de deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C da fração AgsDM-4g com dados da literatura.....	59
Tabela 4: Comparação dos valores de deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C da fração AgsDM-4h com dados da literatura.....	60
Tabela 5: Comparação dos valores de deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C da fração AgsAc-1f com dados da literatura.....	62
Tabela 6: Comparação dos valores de deslocamentos químicos de ^1H da fração Tsme-4 (Figura 5.1 , anexo) com dados da literatura.....	75
Tabela 7: Comparação dos valores de deslocamentos químicos de ^1H da fração Tsme-7 com dados da literatura.....	77
Tabela 8: Comparação dos valores de deslocamentos químicos de ^1H da fração Tsme-2b1 (Figura 5.3 , anexo) com dados da literatura.....	78
Tabela 9: Comparação dos valores de deslocamentos químicos de ^1H da fração Tsme-8 (Figura 5.8 , anexo) com dados da literatura.....	79
Tabela 10: Comparação dos valores de deslocamentos químicos de ^1H da fração CF11-2G9 com dados da literatura.....	98
Tabela 11: Comparação dos valores de deslocamentos químicos de ^1H da fração CF11-2H5 com dados da literatura.....	99
Tabela 12: Comparação dos valores de deslocamentos químicos de ^1H da fração CF11-2I6 (Figura 5.13 , anexo) com dados da literatura.....	100
Tabela 13: Comparação dos valores de deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C da fração CF11-2H2 (Figuras 5.15 e 5.16 , anexo) com dados da literatura.....	101
Tabela 14: Comparação dos valores de deslocamentos químicos de ^1H da fração CF11-2I5c (Figuras 5.17 e 5.18 , anexo) com dados da literatura.....	102
Tabela 15: Valores de deslocamento químico dos hidrogênios pirrólicos das tambjamins G, I e J.....	103
Tabela 16: Valores de deslocamento químico dos hidrogênios pirrólicos das tambjamins B (aldeído), D e do composto da fração CF11-2I7.....	104
Tabela 17: Valores de deslocamento químico dos hidrogênios e carbonos pirrólicos da tambjamina D e do composto da fração CF11-2I7 (Figuras 5.19 e 5.20 , anexo) (DMSO- d_6 , 600	

MHz).....	105
Tabela 18 – Resultado do teste leishmanicida contra o parasita <i>Leishmania chagasi</i> e da atividade tripanossomicida contra <i>T.cruzi</i> dos compostos (143-144) isolados da ascídia <i>Didemnum</i> sp.....	121
Tabela 19 – Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400 Hz) e ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 Hz) bem como as correlações observadas nos espectros COSY e HMBC do composto 166.....	135
Tabela 20 – Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400 Hz) e ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 Hz) bem como as correlações observadas nos espectros COSY e HMBC do composto 167.....	140
Tabela 21: Comparação dos valores de deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C da fração Hyet-4c, do composto isolado da esponja <i>Dysidea</i> sp. e dados da literatura.....	147
Tabela 22: Comparação dos valores de deslocamentos químicos de ^1H das frações Oket-5b e Zvme-5b2 com dados da literatura.....	161

Lista de Símbolos e Abreviaturas

CC₅₀ – 50% da concentração citotóxica

CE₅₀ – 50% da concentração efetiva

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

MIC - Concentração Inibitória Mínima

MID – Diluição Inibitória Máxima

RMN- ^1H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

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

HMBC – Heteronuclear Multiple-bond Correlation

HSQC – Heteronuclear Single-Quantum Coherence

COSY - Correlation Spectroscopy

DEPT – Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

ESIMS – Espectrometria de massas em modo “eletrospray”

IV - infravermelho

UV – ultravioleta – UV-vis

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

PDA – Photodiode Array Detector

TFA – ácido trifluoracético

J – constante de acoplamento

δ - deslocamento químico

s - singleto

d – dubleto

dd – duplo - dubleto

t - tripleto

q – quarteto

qui - quintupletto

m - multipletto

$[\alpha]_D$ – rotação ótica específica

c – concentração

MeOD – Metanol deuterado

DMSO – Dimetil-sulfóxido

CDCl_3 – Clorofórmio deuterado

Resumo

A presente investigação teve por objetivo o isolamento de metabólitos secundários biologicamente ativos de nudibrânquios, moluscos conhecidos por produzirem ou acumularem substâncias a partir de suas presas. Foram investigados extratos de quatro espécies de nudibrânquios marinhos juntamente com suas respectivas presas. Além disso, também foi investigado o extrato ativo da esponja marinha *Agelas sventres*. O estudo realizado com o extrato bruto da esponja marinha *Agelas sventres* levou ao isolamento de uma série de alcalóides bromopirrólicos, compostos tipicamente encontrados em esponjas do gênero *Agelas*. Dentre os compostos isolados, a oroidina apresentou atividade inibitória frente à enzima Pdr5p de *Saccharomyces cerevisiae*. O estudo do nudibrânquio *Tambja stegosauriformis* e de sua presa, o briozoário *Bugula* sp., levou ao isolamento de diversos alcalóides da classe das tambjamins. As tambjamins C, D, K e o produto de hidrólise da tambjamina B foram observados nos dois animais; o produto de hidrólise da tambjamina A foi encontrado apenas no extrato do nudibrânquio, enquanto que a tambjamina A e um isômero da tambjamina J foram encontrados apenas no extrato do briozoário. O estudo do nudibrânquio *Okenia zoobotryon* e de sua presa, o briozoário *Zoobotryon verticillatum*, resultou no isolamento de um único alcalóide indólico conhecido, 2,5,6-tribromo-*N*-metilgramina, presente nos dois animais. Resultados semelhantes foram obtidos a partir da investigação do extrato do nudibrânquio *Hypselodoris lajensis* e de sua presa, uma esponja do gênero *Dysidea*, com o isolamento de um único diterpeno, a lactona da furodisinina. Embora ambas substâncias sejam conhecidas, este foi o primeiro isolamento destes compostos a partir de espécies de nudibrânquios. Finalmente, a partir do extrato do nudibrânquio *Pleurobranchus areolatus* foram isoladas duas novas dicetopiperazinas modificadas, estruturalmente semelhantes às rodriguesinas A e B, outras dicetopiperazinas isoladas a partir da ascídia *Didemnum* sp., provável presa desta espécie de nudibrânquio. Vale ressaltar a utilização de análises por LC-UV-MS e MS/MS neste trabalho, que auxiliaram na identificação uma série de compostos presentes nos extratos estudados no presente trabalho, mesmo em quantidades muito pequenas.

Abstract

The present investigation aimed the isolation of biologically active secondary metabolites from different species of nudibranchs, mollusks that can produce or accumulate substances from their preys. We investigated the extracts of four nudibranchs species and their respective preys. The active extract of the marine sponge *Agelas sventres*, has also been investigated. From the extract of the marine sponge *Agelas sventres* we could isolate a series of bromopyrrolic alkaloids, substances that are typically found in sponges of *Agelas* genus. Among the isolated compounds, oroidin was found to inhibit the activity and function of the Pdr5p enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. From the extract of the nudibranch *Tambja stegosauriformis* and its prey, the bryozoan *Bugula* sp., several known tambjamines alkaloids were isolated. The tambjamines C, D, K, and the aldehyde of the tambjamine B were found in both animals; aldehyde of tambjamine A was identified only in the nudibranch extract, whereas tambjamine A and an isomer of tambjamine J were found on the bryozoan. The study of the extract of the nudibranch *Okenia zoobotryon* and its prey, the bryozoan *Zoobotryon verticillatum*, resulted in the isolation of a single known brominated indole alkaloid, 2,5,6-tribromo-*N*-metilgramine, present on both animals. Similar results were obtained in the study of extract of the nudibranch *Hypselodoris lajensis* along with its prey, a *Dysidea* sponge, that led to the isolation of a single diterpene, the furodysin lactone. Although both compounds are known, this is the first report on the isolation of those compounds from nudibranch species. Finally, the investigation of the extract from the nudibranch *Pleurobranchus areolatus* provided two new modified diketopiperazines, closely related to modified diketopiperazines, the rodriguesins A and B, isolated from the ascidian *Didemnum* sp. It is important to note the use of LC-UV-MS and MS/MS analysis in this work, which were important in the identification of several compounds present in the studied extracts in very small amounts.

Capítulo 1

Introdução à Química de Produtos Naturais

1.1 - Produtos Naturais

A utilização de produtos naturais pelo homem data dos tempos remotos de sua história com registros que vem desde 1500 a.C., sendo utilizados não somente para fins medicinais, como também para fins de defesa, caça e ainda na execução de prisioneiros (Souza et al., 2007; Viegas Jr. et al., 2006).

A descoberta de substâncias alucinógenas foi um exemplo marcante de produtos naturais que causaram grande impacto na humanidade. O ópio, preparado dos bulbos de *Papaver somniferum*, é conhecido há séculos por suas propriedades soporíferas e analgésicas. Esta planta era utilizada desde a época dos Sumérios (4000 a.C.), e dela foram obtidos diversos alcalóides como a morfina (1) (**Fig. 1**), constituinte majoritário utilizado como analgésico até hoje; a codeína (2) (**Fig. 1**), um antitussígeno; a tebaína (3) (**Fig. 1**), antagonista da morfina; a narcotina (4) (**Fig. 1**), um antitussígeno e espasmolítico, e a papaverina (5) (**Fig. 1**), com atividade espasmolítica (Hostettmann et al., 2003).

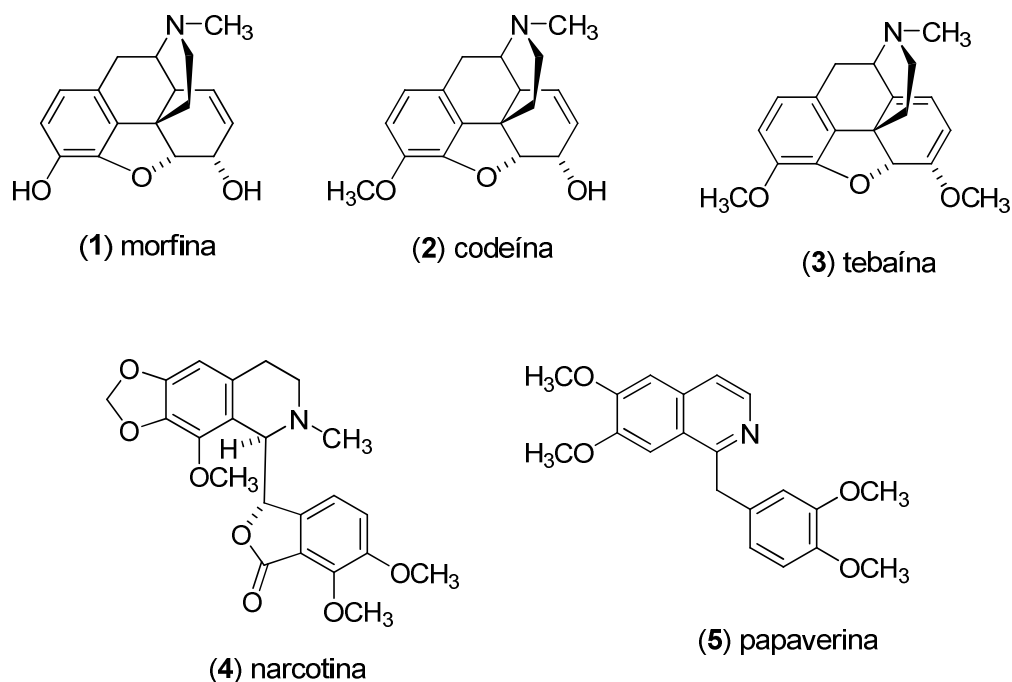


Figura 1: Estruturas químicas dos compostos 1-5.

Apesar da utilização dos produtos naturais desde muito tempo, o desenvolvimento e aplicação dos produtos naturais apresentaram pouco progresso até a década de 1940, somente a partir do advento dos métodos físicos de análise e de purificação, como por exemplo, a espectroscopia na região do visível, ultravioleta e infravermelho, no início dos anos 40 e ressonância magnética nuclear no início dos anos 60 (Souza et al., 2007).

No século XIX, com o desenvolvimento da indústria farmacêutica, os produtos naturais começaram a ser explorados comercialmente para o desenvolvimento de medicamentos. Talvez o marco mais importante para o desenvolvimento dos fármacos a partir de produtos naturais tenha sido a descoberta dos salicilatos obtidos da casca de *Salix alba*, que apresentaram propriedades analgésicas e antipiréticas, de onde foi isolada a salicina (6) (**Fig. 2**), a qual serviu de modelo para a síntese do ácido salicílico (7) (**Fig. 2**) e do ácido acetil-salicílico (AAS) (8) (**Fig. 2**), um composto menos ácido que o ácido salicílico mas com a mesma propriedade analgésica desejada (Yunes et al., 2001).

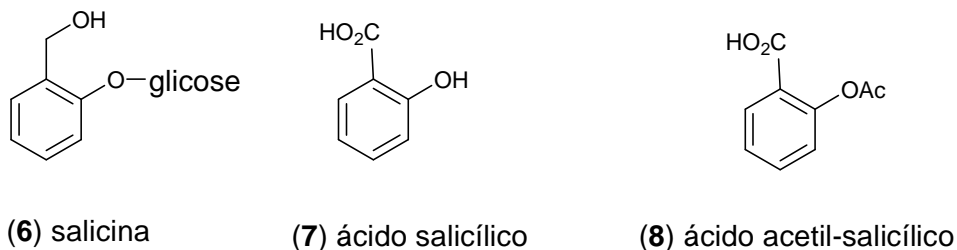


Figura 2: Estruturas químicas dos compostos 6-8.

A importância dos produtos naturais, de origem vegetal ou animal, no combate a diferentes tipos de doenças adquiridas pela espécie humana, pode ser vista pelo grande número de fármacos que estão atualmente disponíveis no mercado. Como exemplo, podemos citar a artemisinina (9) (Fig. 3), um antimalárico obtido da planta *Artemisia annua*; a atropina (10) (Fig. 3), anticolinérgico extraído da planta *Atropa belladonna*; a cafeína (11) (Fig. 3), estimulante extraído de diferentes plantas como *Coffea arábica* (café), *Ilex paraguariensis* (erva-mate) e *Paullinia cupana* (guaraná); a estreptomicina (12) (Fig. 3), o primeiro antibiótico utilizado no tratamento da tuberculose, isolado do fungo *Streptomyces griseus*, entre outros exemplos (Rocha et al., 2001).

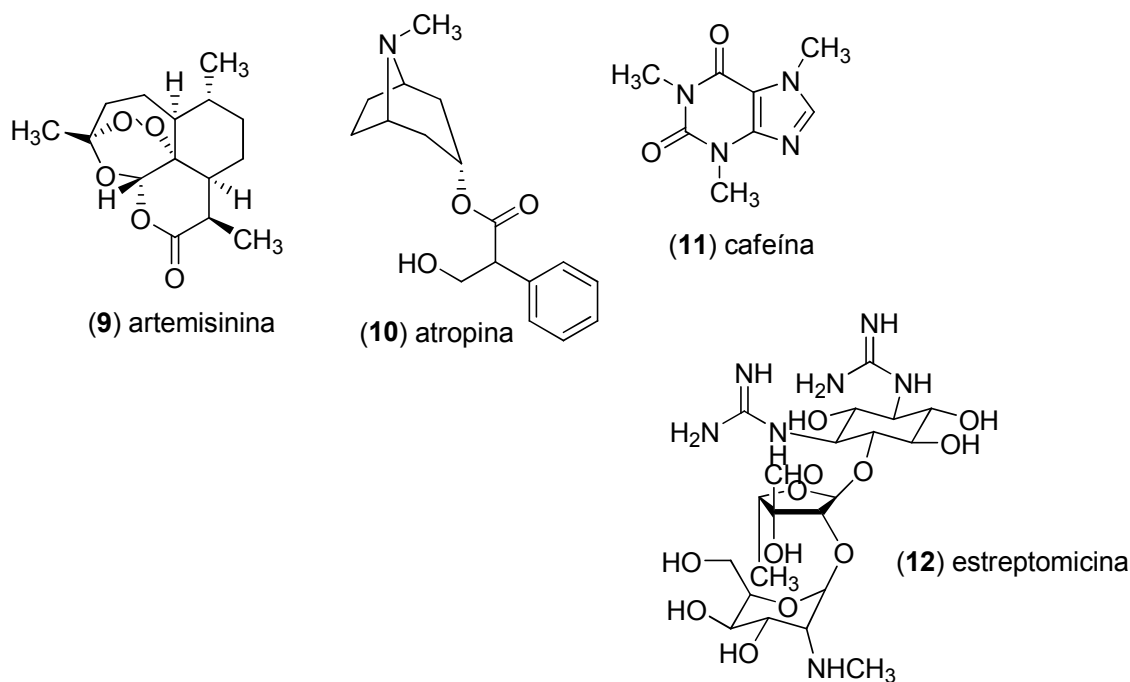


Figura 3: Estruturas químicas dos compostos 9-12.

Segundo pesquisa realizada entre 1981 – 2006, nos últimos 25 anos foram introduzidas no mercado 1010 novas entidades químicas (NCEs – “New Chemical Entities”), que apresentaram as mais variadas atividades biológicas: antifúngica, antibacteriana, antiviral, anticancerígena, entre outras. Aproximadamente 42% desses novos fármacos são produtos naturais ou derivados de produtos naturais, ou foram sintetizados e tiveram suas estruturas baseadas em grupos farmacofóricos de produtos naturais, demonstrando a importância e grande potencial dos produtos naturais para a descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos (Newman e Cragg, 2007).

A descoberta de novos fármacos pela indústria farmacêutica é considerada por especialistas uma atividade complexa, multifatorial, cara, demorada, envolvendo a aplicação de técnicas e metodologias modernas, e cuja produtividade é questionada com base em dados que demonstram a relação inversamente proporcional entre os investimentos em Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) e a descoberta de NCEs. A identificação de NCEs seguras e eficazes para um determinado alvo terapêutico constitui o principal foco das indústrias farmacêuticas. O potencial de ação completo de um NCE só é conhecido até que seja testado nas diferentes etapas de ensaios clínicos. Estima-se que a taxa de insucesso deste processo seja superior a 90%. As principais razões incluem: perda de eficácia clínica, propriedades farmacocinéticas inadequadas, toxicidade, reações adversas, razões comerciais e limitações farmacotécnicas (Lima, 2007; Cragg et al., 1997).

1.2 – Produtos Naturais Marinhos

Com a necessidade de se combater novas linhagens resistentes de microrganismos e produzir fármacos eficazes contra novas doenças, estimulou-se a procura por fontes não convencionais de alimentos e medicamentos (Kelecom, 1997). Os organismos dos oceanos se mostraram fonte de um grande número de substâncias químicas únicas, frequentemente

produzidas e acumuladas em invertebrados marinhos como esponjas, briozoários, tunicados e moluscos. Muitos destes compostos apresentam atividades farmacológicas, tornando-se candidatos interessantes para o desenvolvimento de novos fármacos (Proksch et al., 2002).

Por muito tempo os oceanos permaneceram inexplorados devido às dificuldades de acesso ao ambiente marinho, sendo somente a partir da Segunda Guerra Mundial que os estudos sobre produtos naturais de origem marinha cresceram de forma significativa, principalmente em decorrência do desenvolvimento de equipamentos de mergulho que deram início ao mergulho autônomo facilitando o até então difícil acesso ao ambiente subaquático (McConnell et al., 1994).

Considera-se que a química de produtos naturais de origem marinha teve início com o isolamento dos nucleosídeos espongotimidina (**13**) (**Fig. 4**) e espongouridina (**14**) (**Fig. 4**) a partir da esponja *Cryptotethya crypta*, por Bergmann e seus colaboradores (Bergmann, 1949; Bergmann e Feeney, 1950, 1951; Bergmann e Burke, 1955; Bergmann et al., 1957). O estudo de análogos sintéticos desses nucleosídeos levou ao desenvolvimento dos agentes antiviral Ara-A (**15**) (**Fig. 4**) e do anticancerígeno Ara-C (**16**) (**Fig. 4**). Estes compostos foram os primeiros derivados de produtos naturais marinhos a atingir o mercado para uso clínico.

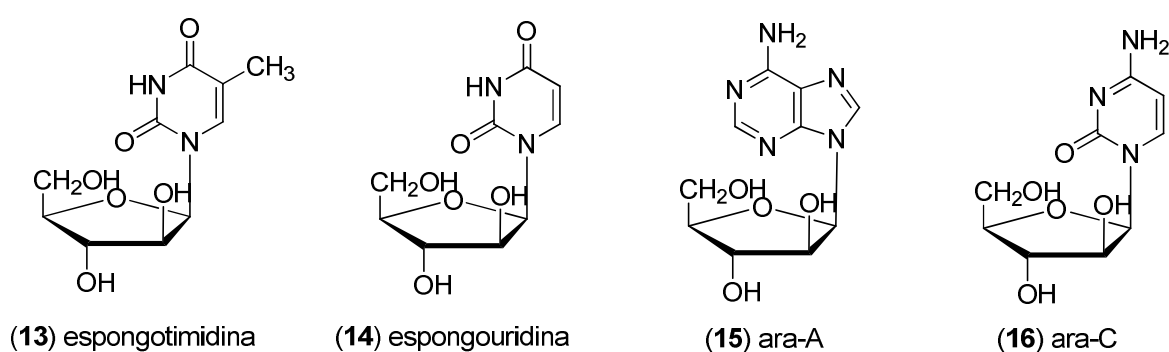


Figura 4: Estruturas químicas dos compostos **13-16**.

Segundo dados da literatura, somente no ano de 2009 foram isolados 1.011 novos compostos a partir de organismos marinhos, praticamente o mesmo número encontrado em

2008 (1065). Destes, pouco mais da metade (55%) foram isolados de microorganismos de origem marinha e de esponjas, sendo os dois filios mais estudados do ponto de vista químico atualmente. Estima-se que cerca de 153.000 produtos naturais conhecidos atualmente, sendo que aproximadamente 22.000 são de origem marinha (Blunt et al., 2011).

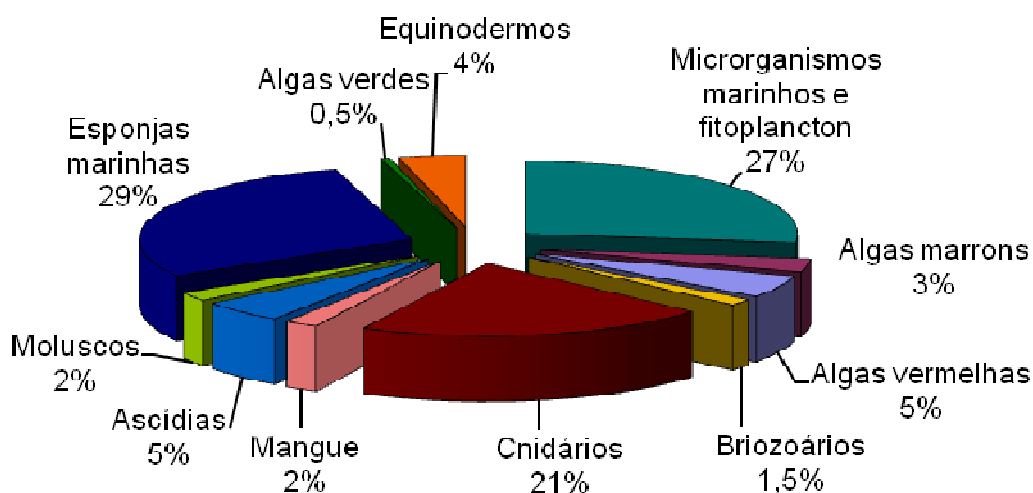


Figura 5: Distribuição dos produtos naturais de origem marinha (Blunt et al., 2011).

1.3 – Produtos Naturais de Esponjas Marinhas

As esponjas marinhas são os animais multicelulares mais primitivos. Estes animais não possuem órgãos, mas apresentam um tecido conjuntivo bem desenvolvido, no qual as células realizam várias funções. São animais aquáticos, predominantemente marinhos, e apresentam uma grande variação em relação ao seu tamanho, cores e formas, muitas vezes tornando difícil a identificação de uma espécie (Rupert e Barnes, 1996). Os poríferos se nutrem da matéria orgânica dissolvida e do picoplâncton, podendo ser altamente eficientes na execução de tal tarefa (Reiswig, 1973).

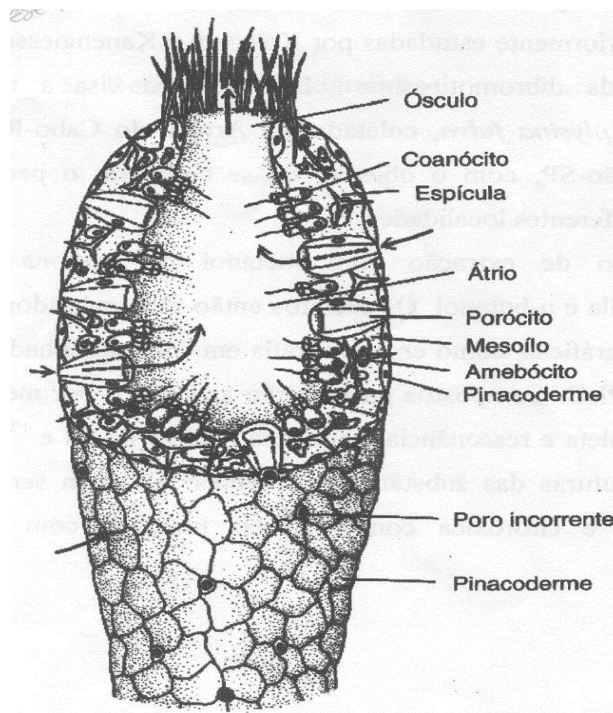


Figura 6: Diagrama de uma esponja asconóide parcialmente seccionada (Rupert e Barnes, 1996).

As esponjas continuam sendo fonte do maior número de metabólitos secundários dentre todos os filos marinhos (Blunt et al., 2011), e o estudo sistemático destes metabólitos tem levado ao isolamento de um número crescente de produtos naturais, os quais apresentam diversas atividades farmacológicas e biológicas (antibiótica, antifúngica, tóxica, citotóxica, antimetabólica e antiviral).

Dentre diversos exemplos de compostos bioativos isolados mais recentemente de esponjas marinhas, podemos citar o isolamento de dois novos policetídeos cíclicos, o 11,12-dide-hidro-13-oxo-plakortídeo (**17**) (**Fig. 7**) e 10-carboxi-11,12,13,14-tetranorplakortídeo Q (**18**) (**Fig. 7**) a partir da esponja marinha *Plakortis* sp., coletada na Austrália. O composto (**17**) apresentou atividade antitripanossomal *in vitro* contra *Trypanosoma brucei brucei* com um IC_{50} no valor de 49 nM, enquanto que o composto (**18**) apresentou atividade 20 vezes menor (Feng et al., 2010).

Estudos realizados com uma esponja marinha coreana, *Phorbas* sp., resultou no isolamento de três novos sesterterpenóides, os phorbacetais A (**19**) (**Fig. 7**), B (**20**) (**Fig. 7**) e C (**21**) (**Fig. 7**). O phorbacetal A apresentou moderada atividade frente a linhagens de células de câncer colo-retal (HT-29, com IC₅₀ de 12 µg/mL), câncer de fígado (HepG2, com IC₅₀ de 11.2 µg/mL) e câncer de pulmão (A549, com IC₅₀ de 11 µg/mL). Os phorbacetais B e C apresentaram os seguintes resultados de atividades: células HT-29 (IC₅₀ de 27,9 e 212 µg/mL), células HepG2 (IC₅₀ de 14,8 e 11,8 µg/mL) e células A549 (IC₅₀ de 465 e 12,4 µg/mL), respectivamente (Rho et al, 2009).

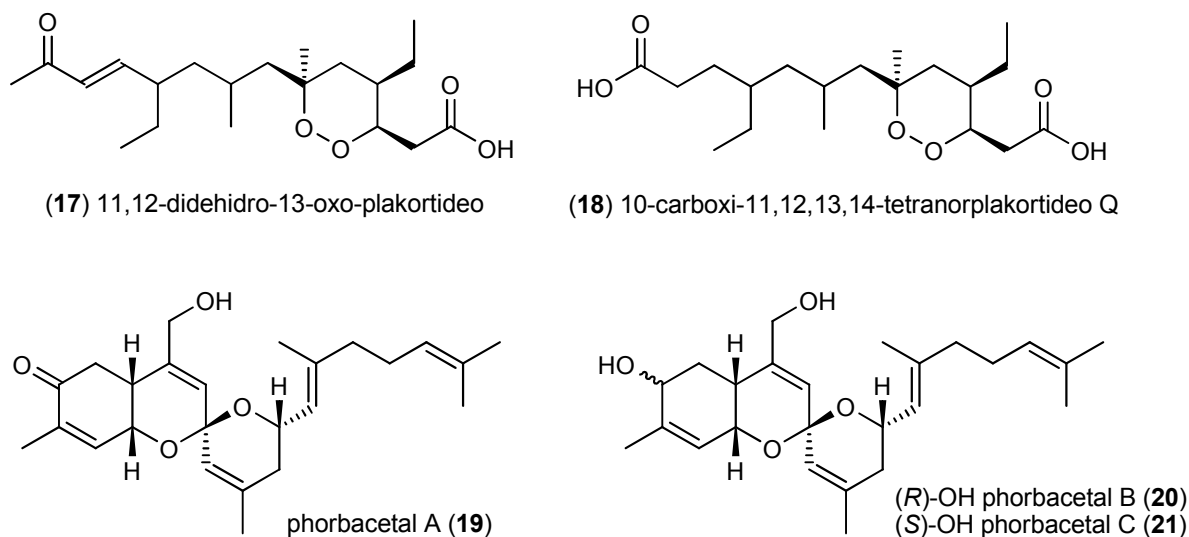


Figura 7: Estruturas químicas dos compostos 17-21.

Um novo bismacrolídeo nitrogenado, tausalarina C (**22**) (**Fig. 8**), foi isolado a partir da esponja *Fascaplysinopsis* sp. coletada em Madagascar. O composto apresentou atividade antiproliferativa frente a linhagem K562 de células leucêmicas, com inibição de 35%, 65% e 74% em 24, 48 e 72 horas respectivamente (Bishara et al., 2009).

Cinco novos sesterterpenos (**23-27**) (**Fig. 8**) foram isolados a partir da esponja *Hyatella* sp., coletada na Coréia. Os compostos apresentaram moderada citotoxicidade,

atividade antibacteriana e uma fraca atividade inibitória frente a liase isocitrato (Jeon et al., 2011).

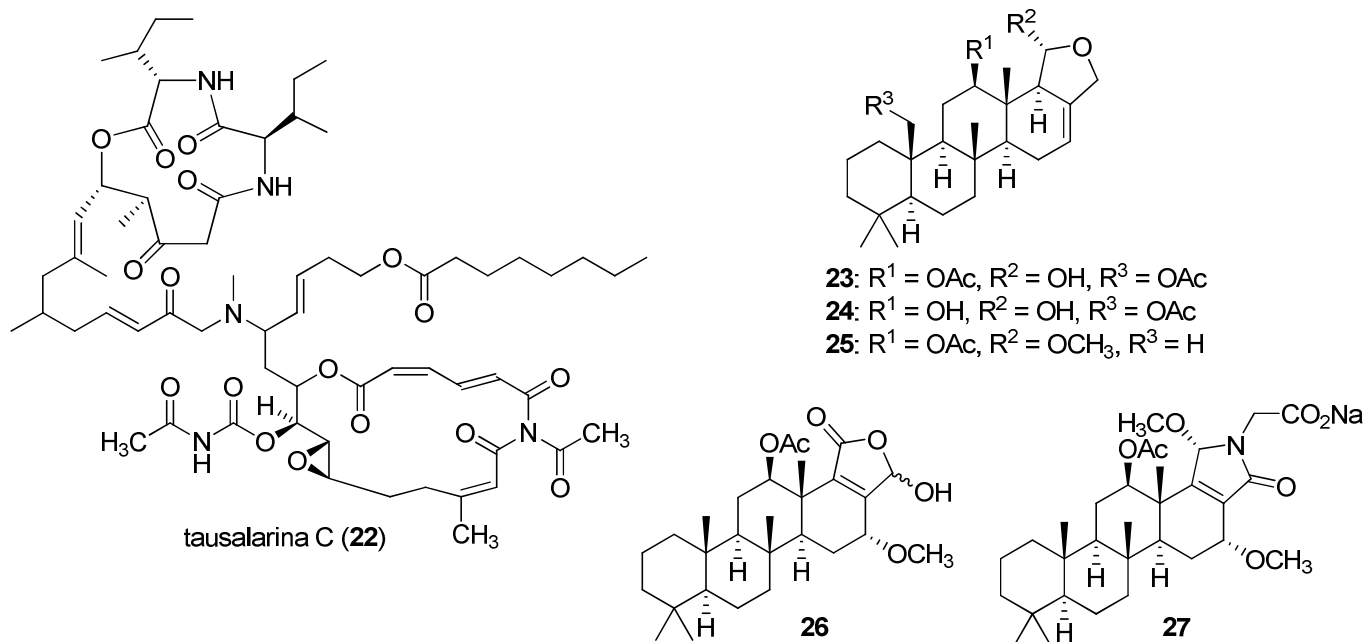


Figura 8: Estruturas químicas dos compostos **22-27**.

Da esponja marinha *Spongionella* sp. foram isolados quatro novos compostos, as gracilinas J-L (**28-30**) (**Fig. 9**), pertencentes às classes trisnorditerpeno, bisnorditerpenos e norditerpenos respectivamente, e ainda um novo diterpeno, a 3'-norspongilactona (**31**) (**Fig. 9**). Os compostos apresentaram atividade citotóxica frente a linhagem K562 de células leucêmicas (IC₅₀ de 15,0; 8,5; 2,65 e 12,0 μM respectivamente) e uma linhagem de células normais PBMC (IC₅₀ de 30,0; 9,0; 3,0 e 30,0 μM respectivamente) (Rateb et al., 2009).

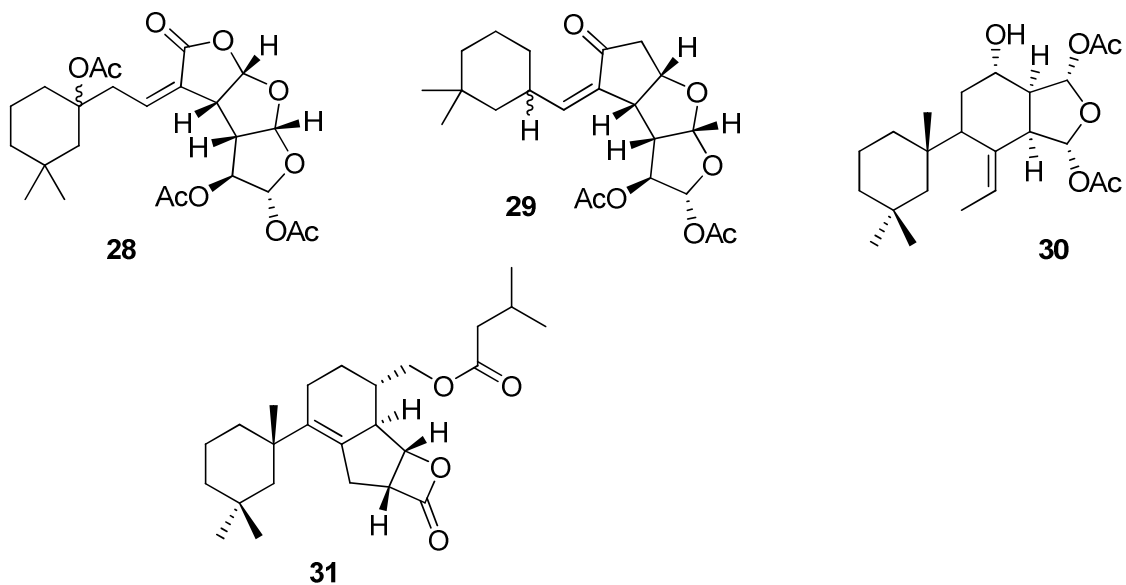


Figura 9: Estruturas químicas dos compostos **28-31**.

1.4 – Produtos Naturais de Ascídias

As ascídias são invertebrados marinhos sésseis comuns em todo o mundo. A maioria das ascídias é encontrada em águas rasas, onde se prendem a rochas, conchas, estacarias e fundos de navio, ou ainda se fixam na areia e na lama por meio de filamentos ou de uma haste. Uma grande diversidade de espécies habita mares tropicais rasos, e muitas formas coloniais diminutas habitam fendas nas cabeças antigas de coral e embaixo das rochas coralinas. O corpo das espécies solitárias pode variar desde 1 mm de diâmetro até 18 cm, enquanto que as espécies coloniais podem ter desde centímetros a um metro ou mais, assim como vários centímetros de espessura (Rupert e Barnes, 1994).



Figura 10: Fotos das ascídias *Ascidia mentula*

(http://www.marinbi.com/ascidiacea/ascidia_mentula.jpg) e *Didemnum albidum*

(<http://www.marinbi.com/ascidiacea/ascidie4.jpg>).

Um grande número de compostos biologicamente ativos já foram isolados de ascídias, comprovando sua importância devido ao potencial de aplicação farmacológica de substâncias isoladas destes animais (Blunt et al., 2008). Cerca de 85% dos compostos provenientes do metabolismo secundário isolados destes animais são compostos nitrogenados, geralmente alcalóides, peptídeos e derivados de aminoácidos, sendo os 15% restantes provenientes da rota do acetato ou ainda da rota do acetato-mevalonato (Ireland et al., 1993).

Um alcalóide poliaromático, aplidiopsamina A (**32**) (**Fig. 11**), foi isolado a partir de uma ascídia australiana, *Aplidiopsis confluata*. O composto isolado inibiu o crescimento de duas linhagens (3D7, IC_{50} = 1,47 μ M; Dd2, IC_{50} = 1,65 μ M) do parasita causador da malária, o *Plasmodium falciparum*, que provocam resistência a medicamentos contra a doença. Além disso, apresentou baixa toxicidade frente a células humanas (Carrol et al., 2010).

As rosinonas A e B (**33-34**) (**Fig. 11**), derivados de meroterpenos biologicamente ativos, foram isoladas de ascídias do gênero *Aplidium*, coletadas na Antártica. Ambos compostos apresentaram atividades anti-inflamatória, antiviral (contra os vírus HSV-1 e PV-

1) e antimicrobiana (contra a bactéria *Bacillus subtilis* e o fungo *Trichophyton mentagrophytes*) (Appleton et al., 2009).

O fracionamento de extratos da ascídia subártica *Synolcum pulmonaria*, coletada na costa norueguesa, levou ao isolamento de uma nova família de oxazolidinonas guanidínicas bromadas, denominadas synoxazolidinonas A e B (35-36) (Fig. 11). A synoxazolidinona A apresentou atividade antibacteriana frente ao *Staphylococcus aureus* (MIC = 10 µg/mL) e *Corynebacterium glutamicum* (MIC = 6,25 µg/mL), e antifúngica contra o *Saccharomyces cerevisiae* (MIC = 12,5 µg/mL) (Tadesse et al., 2010).

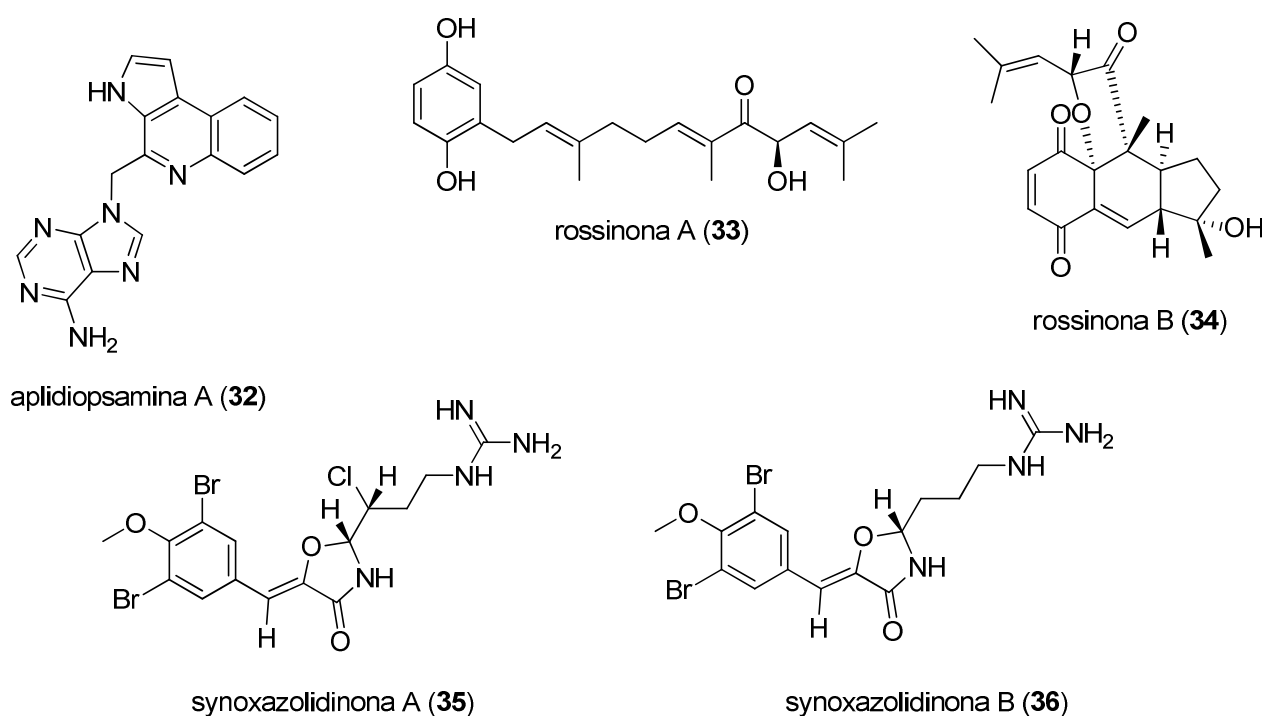


Figura 11: Estruturas dos compostos 32-36.

Cinco novos alcoóis insaturados, crucigasterinas A-E (37-41) (Fig. 12), foram isolados da ascídia do Mediterrâneo *Pseudodistoma crucigaster*. Em particular, a crucigasterina B se mostrou ativa frente a *Escherichia coli* e *Candida albicans* a 50 µg/mL, enquanto a crucigasterina E foi ativa frente a *E. coli* a 100 µg/mL (Ciavatta et al., 2010).

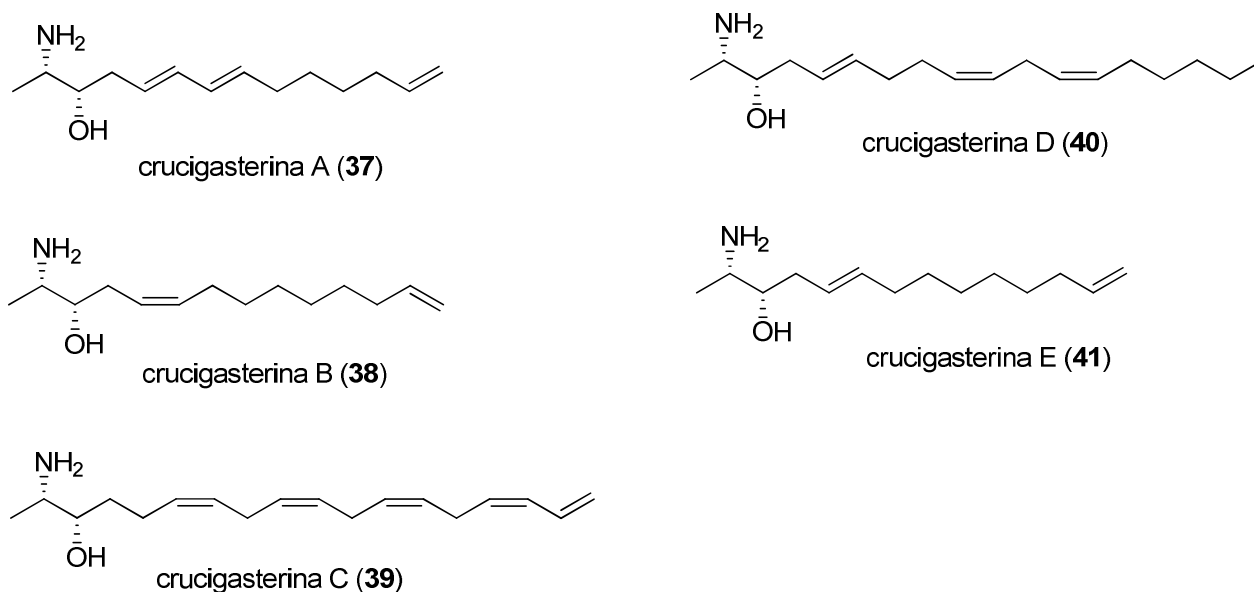


Figura 12: Estruturas dos compostos 37-41.

Estudos químicos realizados com ascídias levaram ao isolamento de um menor número de compostos, quando comparado com as esponjas marinhas, por exemplo. Apesar disso, muitos compostos isolados destes tunicados demonstraram possuir importantes propriedades farmacológicas, sendo um deles a ecteinascidina 743 (42) (Fig. 13) (Yondelis®) que se encontra atualmente em uso médico no tratamento de sarcomas, enquanto outros, como a didemnina B (43) e aplidina (44) (Fig. 13), encontram-se na Fase II de testes pré-clínicos (Molinski et al., 2009; Ciavatta et al., 2010).

Estes dados ilustram a grande importância desta classe de animais marinhos na busca por compostos biologicamente ativos.

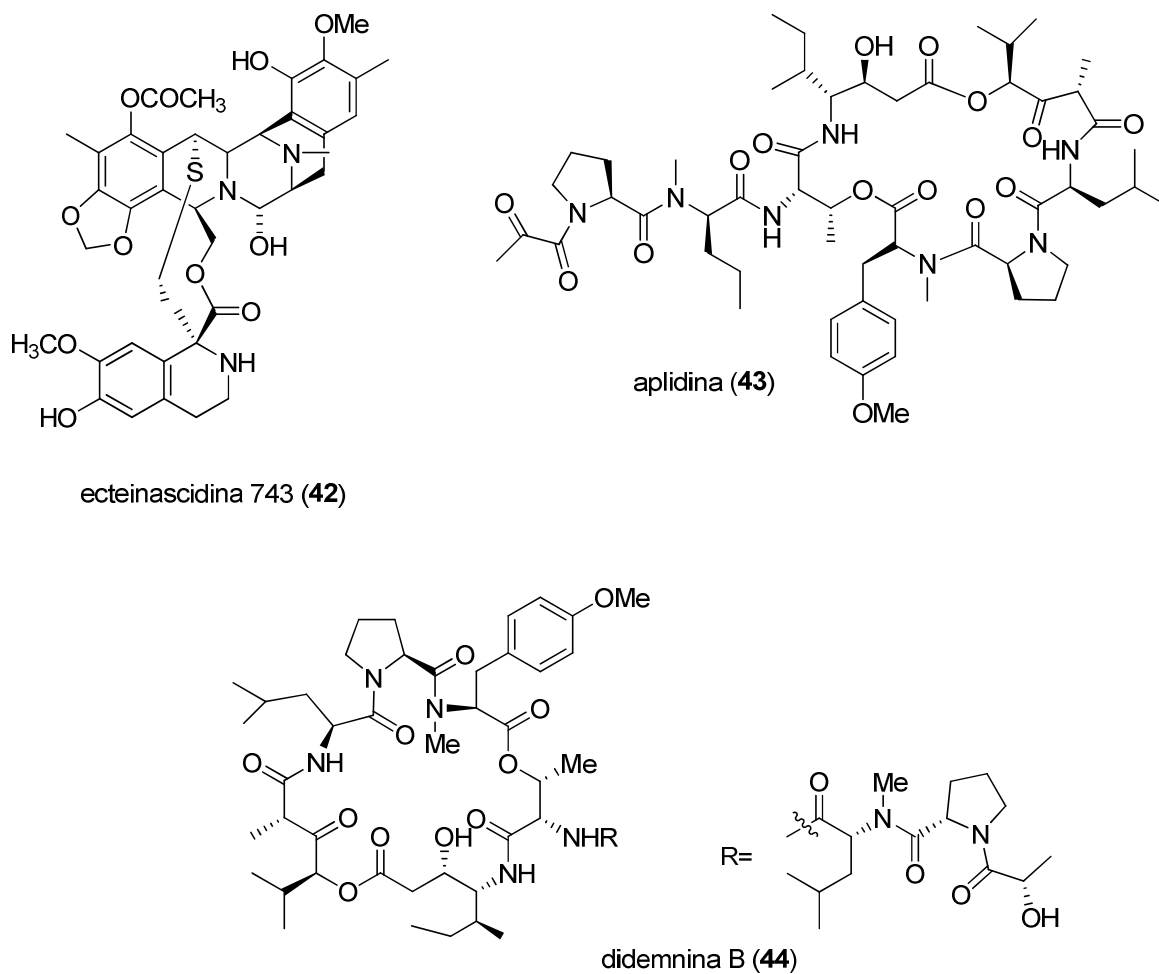


Figura 13: Estruturas dos compostos **42-44**.

1.5 – Produtos Naturais de Nudibrânquios

Os membros do filo Mollusca incluem formas tais como os mariscos, as ostras, as lulas, os polvos e os caramujos. Em abundância de espécies, os moluscos constituem o maior filo de invertebrados depois dos artrópodes. Já foram descritas mais de 50.000 espécies de moluscos, sendo a classe Gastropoda a maior deste filo com aproximadamente 30.000 espécies (Rupert e Barnes, 1994).

Com aproximadamente 3.000 espécies, os nudibrânquios, que pertencem a superordem Opisthobranchia, situam-se entre os moluscos mais espetaculares. Apresentam manto ou concha bem reduzida ou completamente ausente. A superfície corporal dorsal é

bastante aumentada na maioria dos nudibrânquios pelas numerosas projeções chamadas **ceres**, que podem ter a função de defesa contra predadores (Rupert e Barnes, 1994).

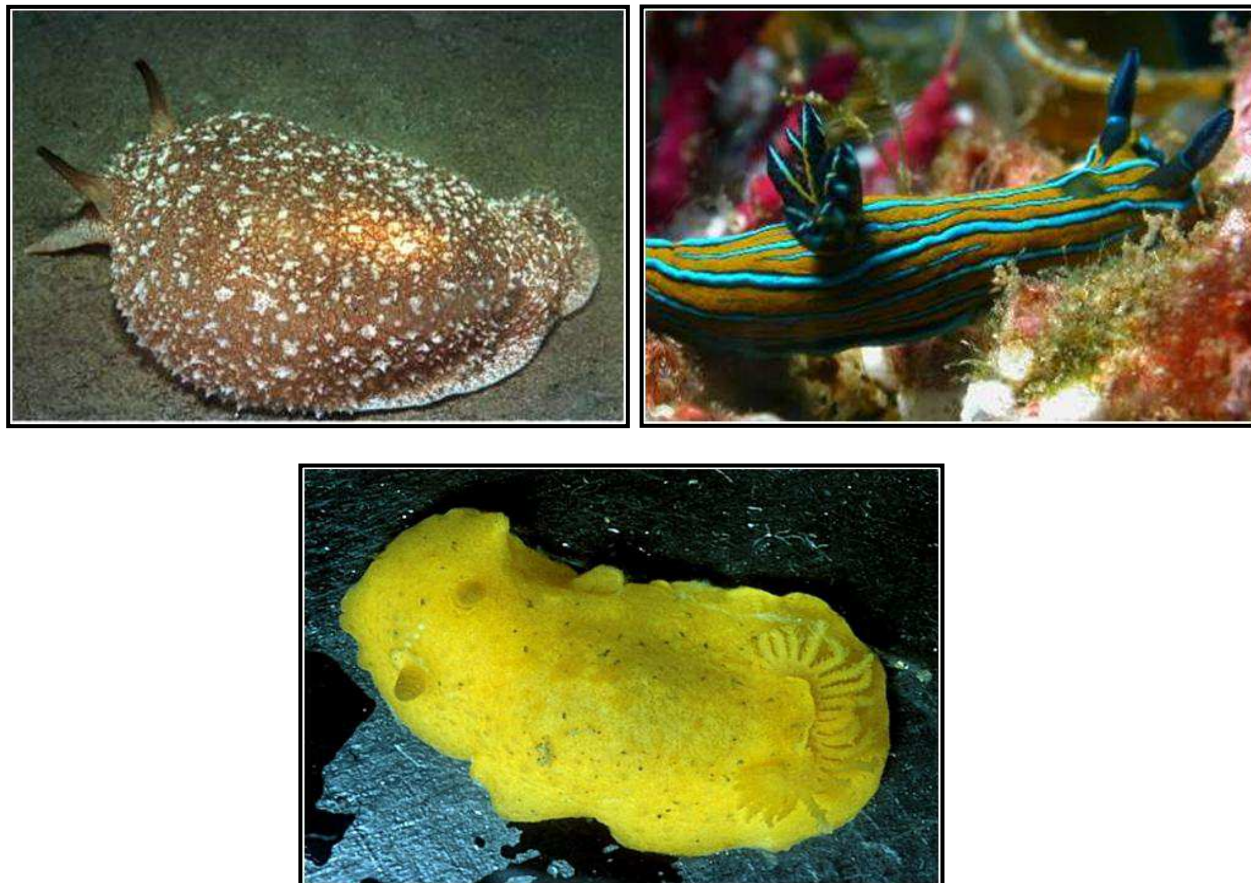


Figura 14: *Pleurobranchia californica* (<http://www.seaslugforum.net/pleucali.htm>), *Tambja eliora* (<http://www.seaslugforum.net/tambelio.htm>) e *Doriopsis flabellifera* (<http://www.seaslugforum.net/factsheet/doriflab>)

Moluscos nudibrânquios são tipicamente considerados predadores de esponjas, ascídias, briozoários, octocorais e outros moluscos. Como suas presas sésseis produzem ou acumulam substâncias que muitas vezes apresentam atividades biológicas, estes moluscos nudibrânquios terminam por adquirir e acumular estas substâncias. O estudo realizado com extratos do nudibrânquio *Hypselodoris zebra*, um predador da esponja marinha *Dysidea etheria*, revelou a presença de diversos furanosesquiterpenos além dos

compostos 5-acetoxi (**44**) e 5-hidroxi-nakafurano-8 (**45**) (**Fig. 15**), ambos encontrados previamente nos extratos da esponja (Grode e Cardellina, 1984). Diversos outros estudos indicaram este tipo de associação (Tischler e Andersen, 1991; Fontana et al., 1999; Corley et al., 1988; Hirota et al., 1998).

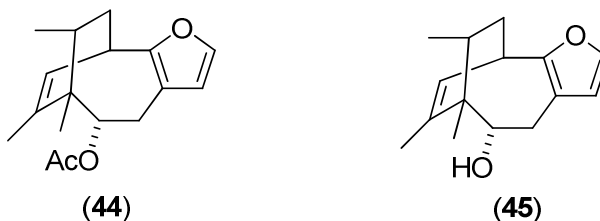


Figura 15: Estruturas químicas dos compostos **44-45**.

Uma série de novos sesquiterpenos, as dendocarbinas A-N (**46-59**) (**Fig. 16**), foram obtidas a partir do extrato etanólico do nudibrânquio *Dendrodoris carbunculosa* coletado no Japão, sendo que alguns destes sesquiterpenos exibiram atividade citotóxica contra linhagens de células de leucemia P388 (Sakio et al., 2001).

Devido a esta capacidade de armazenar as mais diversas substâncias, os nudibrânquios se tornaram um interessante alvo de estudos químicos visando o isolamento de produtos naturais. A partir dos extratos da pele e do muco do nudibrânquio *Jorunna funebris*, foi isolado o composto jorumicina (**60**) (**Fig. 17**), um alcalóide isoquinolínico que apresentou atividade citotóxica contra diversas linhagens de células cancerosas humanas, com um IC_{50} de 12,5 ng/mL. Este composto possui uma estrutura relacionada com as ecteinascidinas e saframocinas, duas conhecidas classes de compostos com atividades antitumorais. Embora tenha apresentado uma atividade menos potente que o Et-743 (**42**), acredita-se que o mecanismo de ação da jorumicina seja semelhante (Fontana et al., 2000).

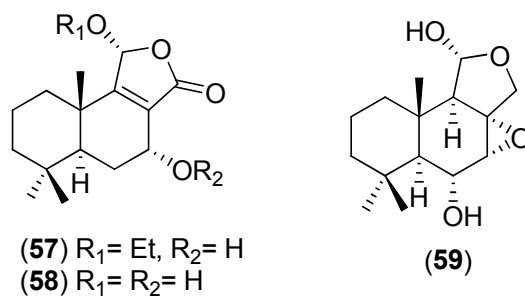
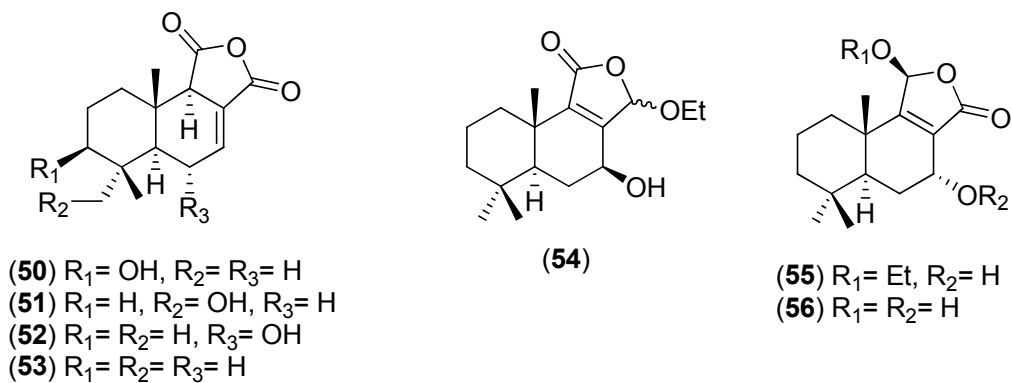
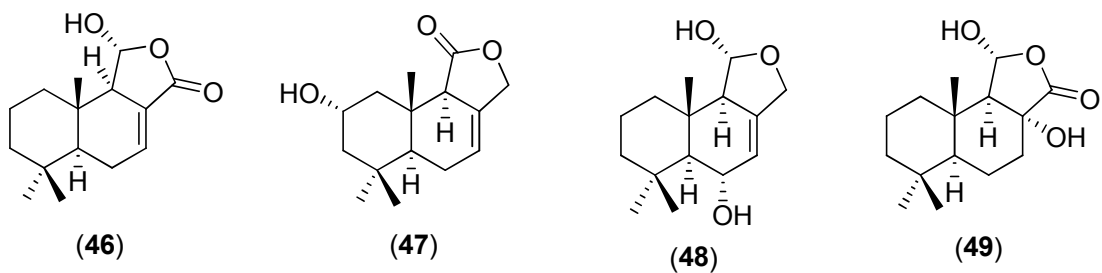


Figura 16: Estruturas dos compostos 46-59.

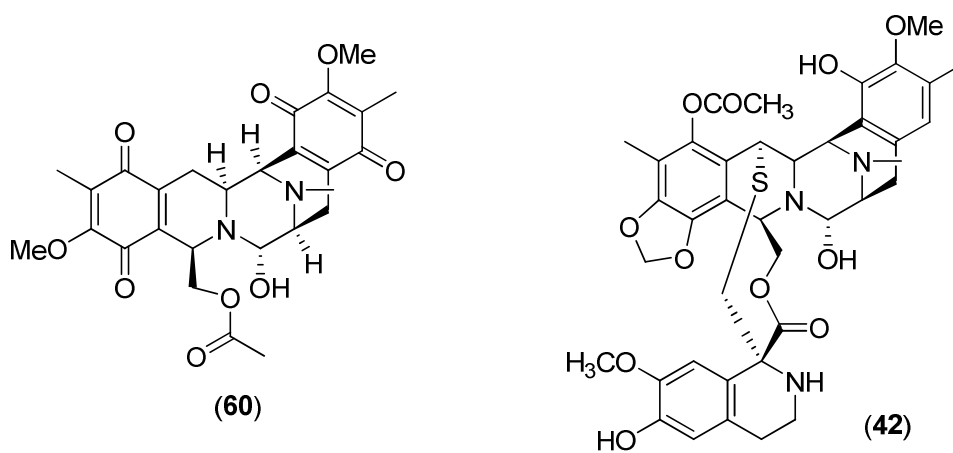


Figura 17: Estruturas dos compostos 60 e 42.

Dois sesterterpenos, desoximanoalida (**62**) e deoisecomanoalida (**63**) (**Fig. 18**), foram isolados do extrato lipofílico do nudibrânquio *Chromodoris willani* coletado em Okinawa, e ambos compostos apresentaram atividade antimicrobiana moderada contra *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*, e também inibição da ação do veneno de cobra fosfolipase A2 a 0,2 e 0,5 μM (Uddin et al., 2009).

Uma série de oito isocianetos, incluindo três novos sesquiterpenos (**64-66**) (**Fig. 18**), foram isolados a partir do nudibrânquio *Phyllidiella pustulosa* coletado na China. Dentre os compostos isolados estão alguns diterpenos já conhecidos, porém nunca antes encontrados em nudibrânquios deste gênero (Manzo et al., 2004).

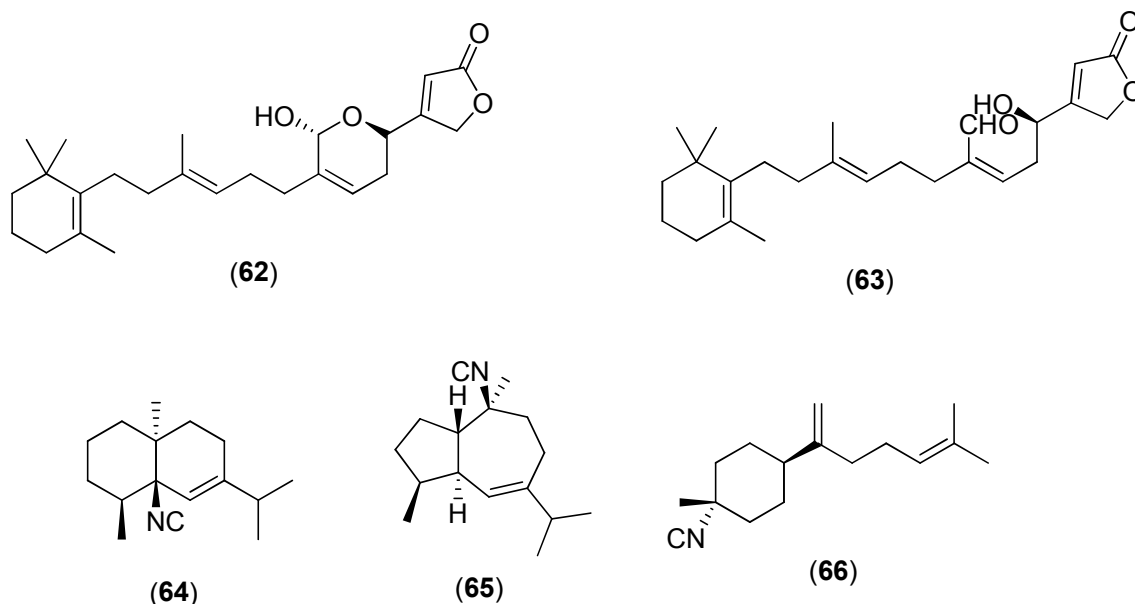


Figura 18: Estruturas dos compostos **62-66**.

Um estudo químico realizado com um nudibrânquio *Chromodoris* sp. forneceu dois novos diterpenos (**67-68**) (**Fig. 19**), juntamente com outros compostos conhecidos. Os compostos inéditos apresentaram moderada atividade citotóxica contra a linhagem de células P388 com IC_{50} de 4,13 e 2,72 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (Yong et al., 2008).

O primeiro estudo químico realizado com o nudibrânquio *Doriopsilla pelseneeri*, coletado na costa de Portugal, resultou no isolamento de dois novos alcoóis furanosesquiterpenóicos (**69-70**) (**Fig. 19**) juntamente com alguns compostos previamente conhecidos. Devido à similaridade estrutural com diversos sesquiterpenos isolados de esponjas do gênero *Dysidea*, pode-se dizer que a presença destes metabólitos no nudibrânquio esteja relacionada à dieta deste animal (Gaspar et al., 2005).

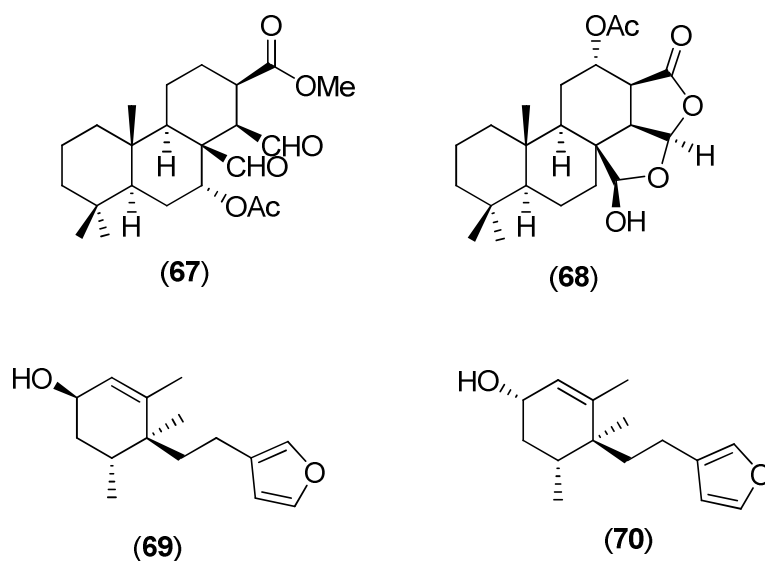


Figura 19: Estruturas dos compostos **67-70**.

Diversos estudos apontam que algumas espécies de moluscos nudibrânquios são capazes de realizar biossíntese *de novo* de metabólitos adquiridos em sua dieta, adaptando-o para sua defesa.

Em trabalho de Faulkner e colaboradores (Faulkner et al., 1990) realizou-se uma comparação dos constituintes químicos de seis espécies de nudibrânquios coletados em diferentes locais da costa do Pacífico, a fim de se observar se a diferença na alimentação dos nudibrânquios levava a uma variação da constituição química de seus extratos. As espécies que apresentassem os mesmos metabólitos independentemente de seu habitat, seriam aquelas mais prováveis de apresentarem biossíntese *de novo*. Embora a maioria das

espécies de nudibrânquios analisada tenham apresentado uma variação dos metabólitos encontrados, os espécimens de *Archidoris montereyensis* apresentaram os mesmos compostos **71** e **72** (**Fig. 20**), independente do local de coleta (La Jolla e Vancouver). Testes adicionais com a injeção de ácido mevalônico marcado (^{14}C) nas glândulas digestivas dos moluscos demonstraram que o *A. montereyensis* era capaz de biossintetizar de novo a porção terpeno destes glicerídeos (Gustafson et al., 1984; Gustafson e Andersen, 1985).

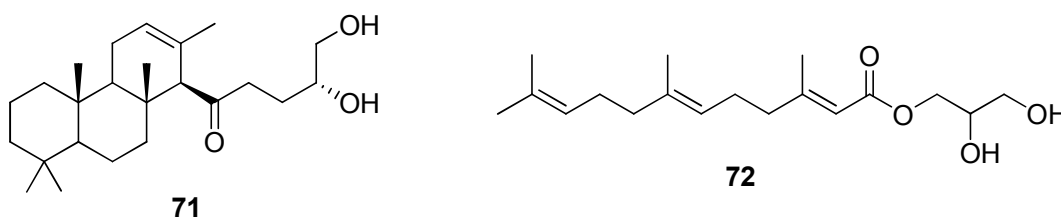


Figura 20: Estruturas dos compostos **71-72**.

Em outro estudo, analisou-se os extratos do molusco *Ascobulla fragilis* e de sua presa, a alga *Caulerpa prolifera*. A alga contém a caulerpenina (**73**) (**Fig. 21**), um sesquiterpeno venenoso para peixes. O molusco *A. fragilis* é capaz de seqüestrar a caulerpenina e modificar a molécula para a oxitoxina-1 (**74**) e oxitoxina-2 (**75**) (**Fig. 21**) (Cimino et al., 1990).

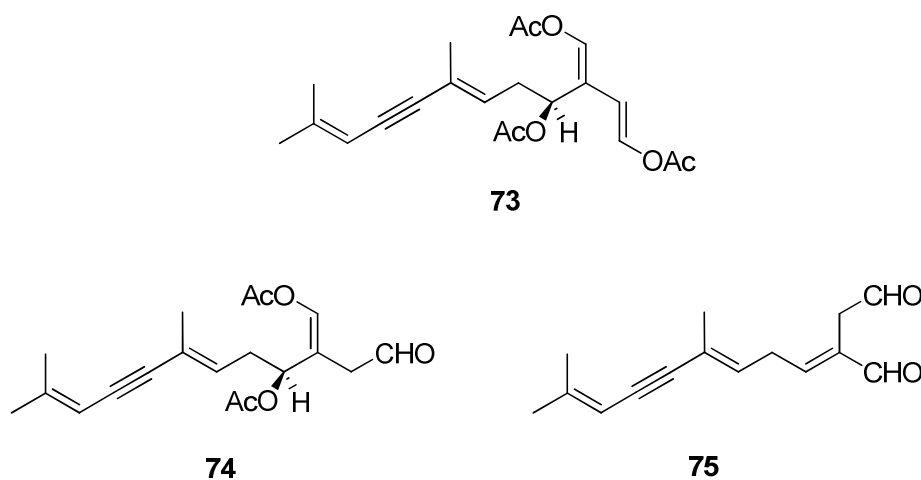


Figura 21: Estruturas dos compostos **73-75**.

Os moluscos nudibrânquios, portanto, se mostram uma interessante fonte de substâncias biologicamente ativas, pelo fato desses animais utilizarem geralmente uma defesa química contra predadores, tornando importante o entendimento biológico e químico destes animais.

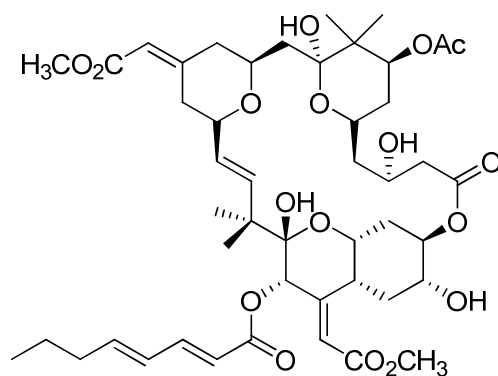
1.6 – Produtos Naturais de Briozoários

Os briozoários são organismos coloniais, sedentários e filtrantes, amplamente distribuídos nos ambientes marinhos e de água doce, e com aproximadamente 5.000 espécies. Uma colônia de briozoários consiste em um grande número de minúsculos indivíduos intercomunicados, os zoóides, podendo variar em tamanho, forma e textura nas diferentes espécies. O filo Bryozoa é dividido em três classes: a Phylactolaemata, Gymnolaemata e Stenolaemata. A classe Gymnolaemata é quase completamente marinha e inclui a grande maioria dos briozoários vivos, bem como muitas espécies fósseis. A classe Phylactolaemata restringe-se à água doce e, embora se distribua amplamente, contém somente cerca de 50 espécies.

Embora a quantidade de pesquisas realizadas com metabólitos secundários de briozoários seja pequena quando comparado com outros invertebrados marinhos, estes animais se mostraram uma excelente fonte de compostos novos e biologicamente ativos (Yao et al., 2003). O mais significativo composto isolado desta classe de animais é a briostatina (**76**) (**Fig. 23**), isolada a partir do briozoário *Bugula neritina* nos anos 70, que apresentou atividade citotóxica em linhagens de células de tumores de pulmão, cólon, sistema nervoso central, melanomas, renais e ovarianas.



Figura 22: briozoário *Amathia convoluta* (www.bio.georgiasouthern.edu).



briostatina (76)

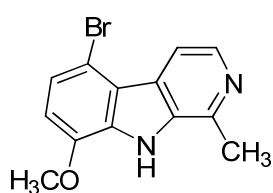
Figura 23: Estrutura química da briostatina (76).

Os briozoários são uma fonte excepcional de alcalóides estruturalmente únicos, além de outras classes compostos como as flustraminas, securaminas, tambjaminas dentre outros.

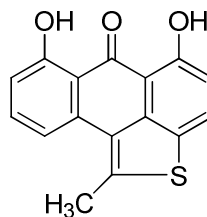
Um novo alcalóide, o 5-bromo-8-metoxi-1-metil- β -carbolina (77) (Fig. 24), foi isolado a partir do briozoário marinho *Pterocella vesiculosa* coletado na Nova Zelândia. O alcalóide apresentou atividade contra células leucêmicas P388 com um $IC_{50} = 5,01 \mu\text{g/mL}$, e também atividade inibitória frente a bactéria Gram-positiva *Bacillus subtilis* e os fungos *Candida albicans* e *Trichophyton mentagrophytes* com MID nas faixas de 2-4, 4-5 e 4-5 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (Till e Prinsep, 2009).

No estudo realizado com o briozoário *Watersipora subtorquata* coletado no Japão, foi isolado o briolantratiofeno (**78**) (**Fig. 24**), um novo composto com atividade antiangiogênica. A angiogênese define-se pelo crescimento e formação de novos vasos sanguíneos a partir de outros pré-existentes sendo crítica para o desenvolvimento e crescimento de tumores e na metástase. O briolantratiofeno apresentou uma significativa atividade antiangiogênica inibindo o crescimento de células endoteliais aórticas bovinas (BAEC) com IC₅₀ de 0,005 μ mol (Jeong et al., 2002).

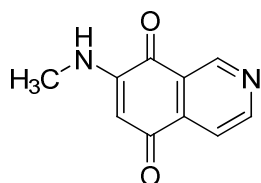
O extrato obtido do briozoário marinho *Caulibugula intermis* coletado no Pacífico, forneceu seis novos compostos, caulibugulonas A-F (**79-84**) (**Fig. 24**). Estes compostos apresentaram atividade citotóxica contra células tumorais IC-2^{WT}, com IC₅₀ de 0,34; 0,22; 0,28; 1,67; 0,03 e 0,1 μ g/mL respectivamente (Milanowski et al., 2004).



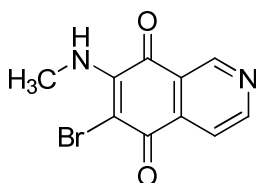
5-bromo-8-metoxi-1-metil- β -carbolina (77)



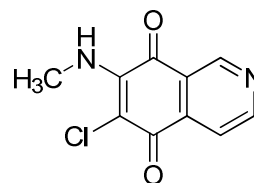
brioantratiofeno (78)



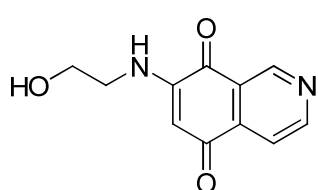
caulibugulona A (79)



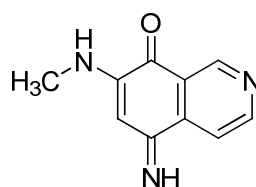
caulibugulona B (80)



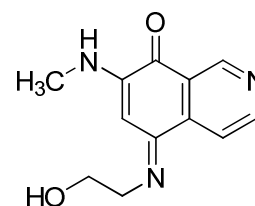
caulibugulona C (81)



caulibugulona D (82)



caulibugulona E (83)



caulibugulona F (84)

Figura 24: Estrutura química dos compostos 77-84.

Capítulo 2

Justificativa e Objetivos

2.1. Justificativa

Os invertebrados marinhos, como esponjas, ascídias, nudibrânquios e briozoários, se mostraram uma excepcional fonte de substâncias com atividades biológicas e farmacológicas. Sendo assim, é de extremo interesse que se investigue o metabolismo secundário destas espécies, objetivando quando possível o isolamento dos compostos responsáveis pela atividade biológica. Em particular, moluscos nudibrânquios, que são considerados predadores de animais produtores de substâncias com atividade biológica, terminam por adquirir e acumular tais substâncias. Sendo assim, o estudo químico destes moluscos nudibrânquios é importante para contribuir em se conhecer a ecologia e a química destes animais.

2.2. Objetivos

Os principais objetivos do presente trabalho são:

- 1– Selecionar extratos ativos de organismos marinhos como esponjas, ascídias e outros, com o objetivo de se isolar compostos com atividade biológica;
- 2- Realizar o estudo químico de extratos de nudibrânquios da costa do Brasil, paralelamente ao estudo dos extratos de suas respectivas presas, a fim de se conhecer melhor a química destes animais;
- 3– Isolar e identificar as substâncias presentes nos extratos selecionados com o auxílio do método de desreplicação por LC-UV-MS e comparação com dados da literatura dos compostos já descritos;
- 4– Quando isolados em quantidade suficiente, avaliar as atividades biológicas das substâncias puras.

Capítulo 3

Parte Experimental

3.1. Técnicas Espectroscópicas

3.1.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN foram obtidos utilizando-se os seguintes aparelhos: Bruker DRX 400 (9,4 Tesla), operando a 400,35 MHz na frequência do hidrogênio (^1H) e a 100,10 MHz na frequência do Carbono (^{13}C) no DQ-UFSCar; Bruker Avance III (14,1 Tesla), operando a 600,23 MHz na frequência do hidrogênio (^1H) e a 150,93 MHz na frequência do Carbono (^{13}C) no DQ-UFSCar. Os deslocamentos químicos são expressos em ppm, calibrados a partir do sinal do TMS. Valores de constantes de acoplamento são expressos em Hz.

As amostras para análise foram preparadas utilizando-se de solventes deuterados de marca Cambridge Isotopes: metanol deuterado ($\text{MeOD-}d_4$), dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO-}d_6$) e clorofórmio deuterado (CDCl_3). O padrão usado como referência interna foi o tetrametilsilano (TMS).

3.1.2. Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

Os espectros na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) foram obtidos com um detector espectrofotométrico UV-Visível modelo Waters 2996 com detector de arranjo de fotodiodos ("Photodiode Array Detector" - PDA), que nos permitiu observar entre os comprimentos de ondas de 200 a 800 nm.

3.1.3. Infravermelho (IV)

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos em um espectrofotômetro FTIR Bomem modelo MB-102 (IQSC-USP). As amostras foram dissolvidas em pequena quantidade de solvente volátil apropriado e aplicadas sob forma de filme em disco de silício, evaporando o solvente sob vácuo em dessecador.

3.1.4. Espectrometria de Massas (MS)

Foram obtidos espectros de massas de baixa e alta resolução no espectrômetro Bruker Daltonics modelo Ultra-TOF (gás de colisão N₂) na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

Os espectros de massas MS/MS foram obtidos em um aparelho LC-UV-ESI-MS/MS, com resolução cromatográfica em um sistema Alliance 2695 (Waters), detecção por arranjo de diodos PDA 2996 (Waters) e acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo, modelo Micromass QuattroLC (Manchester, U.K), equipado com uma fonte de íons "API Z-spray" e uma sonda para ionização eletrospray em alto fluxo.

3.1.5. Rotação Ótica [α]_D

As medidas de rotação ótica foram obtidas em um Polarímetro da marca JASCO Modelo P1020 com cela cilíndrica de vidro modelo CG1-10 tamanho: f 10 mm I.D. x 10 mm. As amostras foram dissolvidas em 1,0 mL de MeOH grau cromatográfico (HPLC) da marca J.T. Baker ou Honeywell e o experimento realizado em temperaturas de 20°C ou 25°C.

3.2. Técnicas Cromatográficas

3.2.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para análise qualitativa em CCD foram utilizadas cromatofolhas de sílica-gel 60 sobre poliéster com indicador ultravioleta F₂₅₄ 20 x 20 cm (Aldrich). As cromatofolhas foram reveladas por inspeção sob luz ultravioleta (UV) com lâmpada Spectroline modelo ENF-240

C/FE nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm, além de serem usados os seguintes reagentes como reveladores:

- a- Solução de 0,2 g de ninidrina em 100 mL de EtOH P.A. (Quimex), aquecendo-se a placa em seguida por 5 minutos em estufa a 120° C, para identificação qualitativa de aminoácidos e aminas primárias;
- b- Solução de 20% de ácido fosfomolibdico em EtOH P.A. (Quimex), aquecendo-se em seguida por 5 minutos em estufa a 120° C, para identificação qualitativa de substâncias redutoras;
- c- Solução Dragendorff. (solução A: 0,85 g de nitrato básico de bismuto em 10,0 mL de ácido acético glacial + 40 mL de água, e solução B: 8,00 g de iodeto de potássio dissolvido em 20 mL de água. Mistura-se 1:1 de soluções A e B resultando em uma solução estoque. 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 alcalóides, principalmente.

3.2.2. Cromatografia em Coluna pré-empacotada

Dependendo da polaridade da amostra em análise, foram realizadas cromatografias em colunas pré-empacotadas de marca Waters Sep-Pak[®] vac 35 cc ou de marca Phenomenex Strata[®] de diferentes dimensões (2,0 g; 5,0 g ou 10,0 g) e com diferentes fases estacionárias: sílica-gel ou sílica-gel derivatizada com grupos octadecilsilano (C₁₈) ou cianopropila.

3.2.3. Cromatografia em Coluna por exclusão de tamanho

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

3.2.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Os equipamentos utilizados nas separações por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) consistiam em um sistema Waters® com duas bombas modelo Pump 600, um sistema degaseificador utilizando-se gás hélio, um detector espectrofotométrico UV-Visível com leitura em dois comprimentos de onda, modelo 2487, e um sistema de controle Controller 600.

Também foi utilizado um sistema cromatográfico Waters® que consiste em um sistema de controle Alliance Modelo Waters 2695 acoplado com detector espectrofotométrico UV-Visível modelo Waters 2996 com detector de arranjo de fotodiodos (“Photodiode Array Detector” - PDA); detector de espalhamento de luz modelo Waters 2424 (“Evaporative light scattering detector” – ELSD) e detector espectrométrico de massas (MS) modelo Waters Micromass ZQ 2000 (sistema LC-UV-ELSD-MS). Um “split” de fluxo foi utilizado para que apenas 20% do efluente cromatográfico fosse direcionado ao detector de massas (MS).

Para as separações foram utilizadas as colunas: a) Waters X-Terra MS C₁₈, 3.5 μm, 2,1 x 50 mm; b) coluna C₁₈ CSC-Inertsil 150 Å/ODS 2 de 5 μm, de dimensões 25 x 0,94 cm; c) Phenomenex Synergi Fusion RP18, 4 μm, 250 x 4,6 mm; d) Inertsil Ph, 5 μm, 4,6 x 250 mm, GL Sciences Inc.; e) Inertsil ODS-3, 5 μm, 4,6 x 250 mm, GL Sciences Inc.; f) Inertsil ODS-SP, 5 μm, 4,6 x 250 mm, GL Sciences Inc.; g) Waters Delta Pak C₁₈, 15 μm, 300 x 7,8 mm; h) Waters Symmetry C₁₈, 3.5 μm, 4,6 x 75 mm.

As frações aquosas provenientes das cromatografias em fase reversa foram secas em um sistema de centrífuga a vácuo Savant modelo Speedvac® Plus SC 210. As frações orgânicas provenientes de cromatografia em fase normal foram secas em um evaporador rotativo.

3.2.5. Solventes

Os solventes utilizados em CCD, Sephadex LH-20 e Sep-Pak foram todos de grau analítico. Nas cromatografias líquidas de alta eficiência (HPLC) foram utilizados solventes de grau cromatográfico (J.T. Baker, Mallinckrodt, Honeywell, etc). A água utilizada em todas as cromatografias foi destilada e purificada em um sistema Milli-Q Millipore equipado com resina de troca iônica e filtro biológico.

3.3. Protocolos dos Bioensaios

3.3.1 Determinação da Atividade inibitória da oroidina

3.3.1.1 Preparação das Membranas de Plasma

As membranas de plasma contendo a proteína Pdr5p foram preparadas a partir da linhagem mutante AD124567 de *Saccharomyces cerevisiae*.

3.3.1.2 Ensaio NTPase

As atividades enzimáticas utilizando ATP e UTP como substratos foram avaliadas em um meio padrão (50 μ L de volume final) contendo 100 mM de Tris-HCl com pH 7,5, 4 mM de $MgCl_2$, 75 mM de KNO_3 , 7,5 mM de NaN_3 , e 0,3 mM de molibdato de amônio, na presença de 3 mM de ATP ou UTP. A reação foi iniciada pela adição da membrana de plasma para 13 μ g/mL, mantida a 37° por 60 minutos, e paralisada pela adição de 1% de SDS. O fosfato inorgânico liberado (Pi) foi medido como descrito em ref.. A oroidina foi adicionada a partir de soluções em DMSO para uma concentração final de 5% em volume. A diferença na atividade NTPase na presença e na ausência de oligomicina 3 μ M corresponde à atividade ATPase mediada pela Pdr5p.

3.3.1.3 Avaliação do rendimento de crescimento

O rendimento do crescimento de ambas linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas neste trabalho, a linhagem resistente de Pdr5p (AD124567) e a linhagem hipersensível de Pdr5p

(AD1234567), foram determinados utilizando-se placas de 96 poços como descrito em Niimi et al. (2004). Resumidamente, 4×10^3 células foram inoculadas nos poços na presença e na ausência de diferentes concentrações de oroidina, e cultivadas por 48hs à 30° sob constante agitação. O crescimento celular foi avaliado em 600 nm em um leitor microplacas (FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH).

3.3.2 - Determinação *In Vitro* da Atividade Antiparasitária e da Concentração Efetiva 50% (CE₅₀) para morte de parasitas *Leishmania* sp. e *Trypanosoma cruzi*

Compostos puros foram dissolvidos em DMSO, diluídos em meio de cultura e incubados com os parasitas em diferentes concentrações com o objetivo de se determinar suas respectivas CE₅₀.

***Leishmania* spp.**

A CE₅₀ dos diferentes compostos foi determinada utilizando-se promastigotas de *Leishmania chagasi*, que foram aplicados a 10⁶/poço em placas de 96 poços contendo os diferentes compostos, utilizando-se meio M-199 como meio de desenvolvimento do parasita. Após 24 horas, foi verificada a viabilidade dos promastigotas observando-se a atividade oxidativa mitocondrial com o ensaio de MTT (Tada et al., 1986) a 570 nm. Foi utilizado o fármaco pentamidina como controle positivo do ensaio. Avaliou-se a atividade leishmanicida dos compostos em macrófagos peritoneais de camundongos infectados, os quais foram adicionados (4×10^5 /lamínula) a lamínulas de vidro (13 mm) em placas de 24 poços, permanecendo em estufa a 37 °C por 120 horas (Tempone et al., 2004). A CE₅₀ foi determinada pela contagem de 600 macrófagos/poço, avaliando-se o número de macrófagos infectados, utilizando-se como controle (100% infectado) macrófagos não tratados. O fármaco glucantima[®] foi utilizado como controle.

Os animais utilizados nos bioensaios foram hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) fornecidos pelo biotério do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo e mantidos em caixas

esterilizadas com material absorvente, recebendo água e alimento *ad libitum*. Os hamsters foram infectados a cada mês com amastigotas provenientes de baço para manutenção da cepa de *L. chagasi*. Todos os procedimentos realizados nos ensaios foram previamente aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz.

Amastigotas de *L. chagasi* (MHOM/BR/1972/LD) foram purificados de baço de hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) utilizando-se centrifugação diferencial, sendo a infecção avaliada pelo método de Stauber (1958) em 60-70 dias após o inóculo. Promastigotas de *L. chagasi* foram cultivadas em meio M199 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 0,25% de hemina e 5% de urina humana, a 24°C.

Para verificar a efetividade das amostras em *L. chagasi*, realizou-se a determinação da Concentração Efetiva 50% (CE₅₀) em diferentes concentrações (150 µg/mL a 0,073 µg/mL), utilizando-se ainda o isotiocianato de pentamidina (EUROFARMA) como fármaco padrão. O composto foi previamente dissolvido em DMSO e posteriormente diluído em meio M 199, sendo incubado por um período de 48 horas com 1x10⁶ promastigotas/poço (previamente contados em hemocitômetro-Neubauer) em placas de 96 poços (triplicata). A viabilidade dos promastigotas foi verificada por observação em microscópio óptico e do ensaio com MTT (Tada et al., 1986). Neste, o MTT (5,0 mg/mL) foi dissolvido em tampão fosfato-salina (PBS), esterilizado em membranas de 0,22 µm e adicionado à concentração de 20 µL/poço. A placa foi novamente incubada por 4 h a 24°C. A extração da formazana foi realizada através da adição (100 µL/poço) de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% em HCl 0,01M por um período de 18 h. A densidade óptica dos poços foi verificada em um espectrofotômetro Multiskan MS (UNISCIENCE) em 570 nm. Poços sem a adição de fármacos e com DMSO foram utilizados como controle de viabilidade do ensaio. A Concentração Efetiva 50% (CE₅₀) foi analisada pelo software Graph Pad Prism 3.0 (curva sigmóide dose-resposta) com base em pelo menos dois ensaios distintos (Lane et al., 1996; Tada et al., 1986 e Tempone et al., 2004).

Trypanosoma cruzi

Formas tripomastigotas sanguíneas, extraídas no primeiro dia da cultura de células LLC-MK2, foram aplicadas na concentração 1×10^6 /poço em placas de 96 poços contendo diferentes amostras em meio RPMI-1640, suplementado com 2% de soro fetal bovino. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas e a viabilidade dos tripomastigotas foi determinada pelo método do MTT (Lane et al., 1996). SDS 10% foi aplicado por 18 horas (50 µL/poço) a 24°C e o número de parasitas viáveis foi determinado através da densidade óptica (D.O.) a 570 nm. Foi utilizado o fármaco benznidazol como controle positivo do ensaio. Formas amastigotas de *T. cruzi* foram testadas frente aos diferentes compostos, utilizando-se células LLC-MK2, as quais foram infectadas com formas tripomastigotas. Avaliou-se a atividade anti-amastigota dos compostos através de contagem microscópica de células LLC-MK2 infectadas e não infectadas após 72 horas de incubação a 37°C (Lane et al., 1996; Tada et al., 1986 e Tempone et al., 2004)

Capítulo 4

Estudo químico dos extratos *n*-BuOH, AcOEt e CH₂Cl₂ da esponja marinha *Agelas sventres*

4.1 Introdução

O interesse na biologia e química das esponjas marinhas que pertencem ao gênero *Agelas* continua mesmo após mais de 30 anos de estudos destes animais. Os membros deste grupo são encontrados em recifes de corais tropicais pelo mundo todo, e atualmente os registros taxonômicos apontam para cerca de 33 espécies conhecidas (Piña et al, 2007).

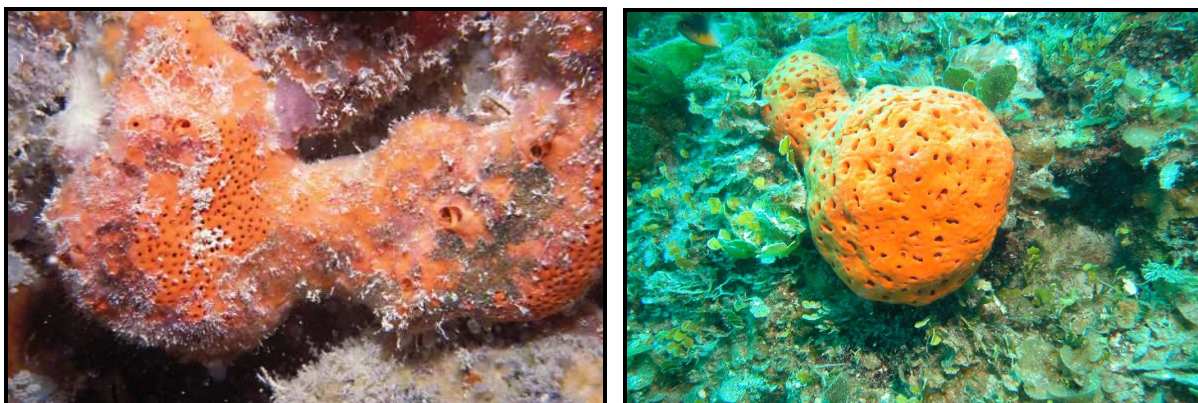


Figura 25: *Agelas clathrodes* (Schmidt, 1870).

(fonte:<http://www.poriferabrasil.mn.ufrj.br/4especies/ceractinomorpha/agelasida/aclathrodes/aclathrodes.htm>); *Agelas sventres* (fonte: <http://spongeguide.org/speciesinfo.php?searchtype=0&species=97>)

Alcalóides bromopirrólicos são conhecidos por serem um dos metabólitos mais comuns encontrados em esponjas marinhas, particularmente nas esponjas do gênero *Agelas* (Kubota et al, 2009). Atividades biológicas como antimicrobiana, citotóxica e outras são descritas para esta classe de compostos. Estruturalmente a maioria destes compostos são constituídos de um grupo ácido 4-bromo- ou 4,5-dibromopirrol-2-carboxílico, o qual é geralmente conectado a um grupo 2-aminoimidazol através de um segmento alifático.

Monômeros deste quimotipo podem dimerizar ou trimerizar, resultando em uma grande variedade de alcalóides 2-aminoimidazólicos (Regalado et al., 2011).

Embora a questão da origem biossintética destes alcalóides não esteja totalmente clara, algumas rotas metabólicas já foram propostas. Uma rota hipotética (**Fig. 26**) foi sugerida por Braekman et al. em que prolina, ornitina e guanidina seriam os prováveis precursores das porções bromopirrólicas e 2-aminoimidazolinona presentes nestes compostos (Braekman, et al., 1993; Mourabit et al., 2011).

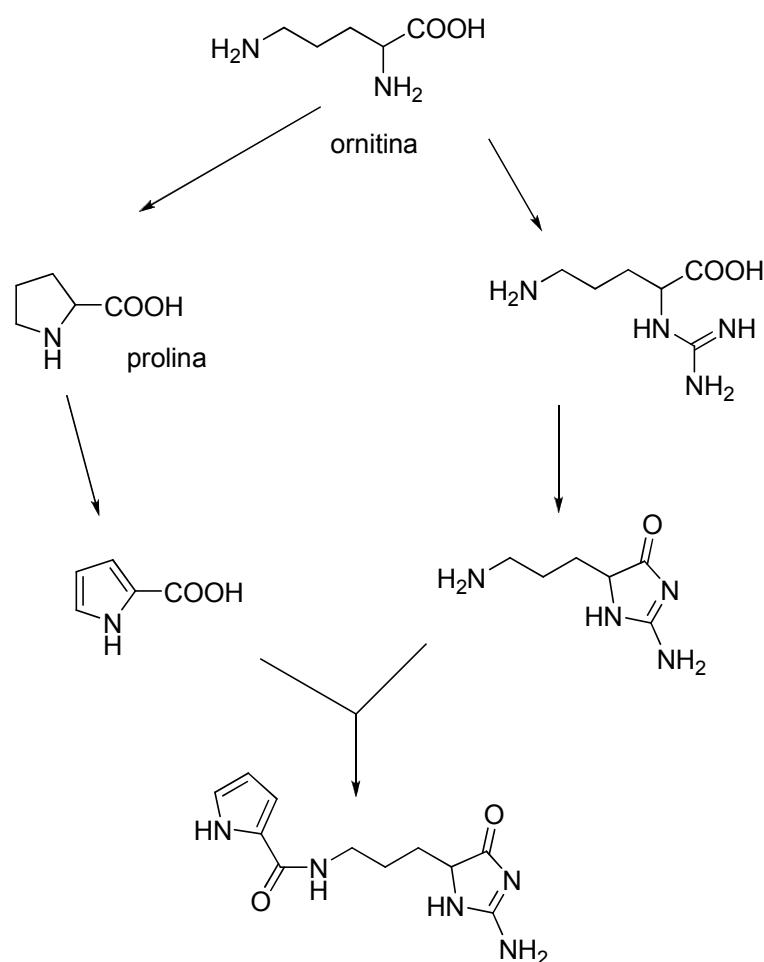


Figura 26: Origem biogenética hipotética dos derivados pirrolaminopropilimidazol.

De modo geral, produtos naturais halogenados, como indóis, terpenos, acetogeninas, fenóis e alcalóides, são metabólitos frequentemente encontrados em animais marinhos. Em muitos casos, estes metabólitos halogenados apresentam atividades biológicas de

interesse, como antifúngica, antiviral e anti-inflamatória. Dada a abundância com que são encontrados e as importantes atividades biológicas que apresentam, cientistas começaram a se interessar pela biogênese destes compostos. Atualmente sabe-se que enzimas haloperoxidases, como as haloperoxidases vanádio-dependentes (V-HPOs), atuam na biossíntese de diversos metabólitos halogenados (Butler e Carter-Franklin, 2004). Estas enzimas podem catalizar a oxidação de íons haletos por peróxido de hidrogênio, produzindo um intermediário oxidado, que podem halogenar um substrato orgânico por exemplo (Martinez et al., 2001).

As haloperoxidases podem se envolver em reações de oxidação ou bromação regio-seletiva em produtos naturais. Reações com V-BrPO e o derivado 1,3-di-*tert*-butilindol resultou em uma oxidação regioespecífica para produzir a 1,3-di-*tert*-butil-2-indolinona como único produto, não ocorrendo neste caso a formação de produtos bromados, diferentemente da reação do 1,3-di-*tert*-butilindol com brometo aquoso onde ocorre reações não regio-seletivas com formação de diferentes compostos bromados. A formação da 1,3-di-*tert*-butil-2-indolinona provavelmente ocorre por um ataque eletrofílico de espécies bromadoras geradas pela enzima na ligação dupla C2-C3 do anel pirrólico (Martinez et al., 2001).

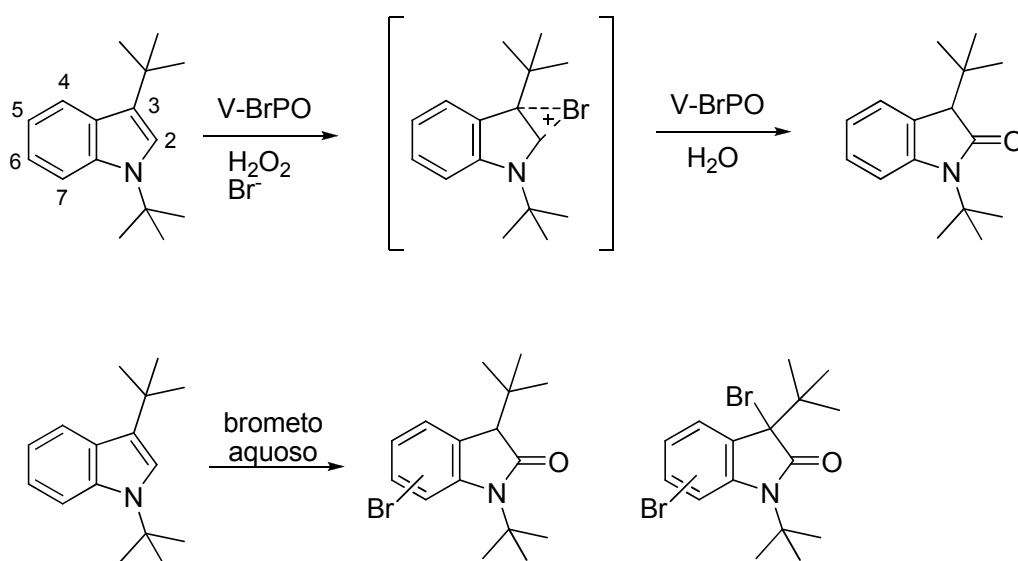


Figura 27: Bromação catalizada por V-BrPO e por brometo aquoso do 1,3-di-*tert*-butilindol.

A reatividade da V-BrPO foi avaliada com o geraniol e alguns derivados em misturas de um tampão e co-solventes orgânicos (como etanol, isopropanol e acetonitrila), resultando na produção de bromidrinas como produtos majoritários, espécies dibromadas, e dois álcoois cíclicos monobromados. O mecanismo de formação provavelmente envolve o ataque do íon bromônio no alqueno terminal do geraniol, gerando um intermediário bromônio-geraniol (**Fig. 28**) (Carter-Franklin et al., 2003).

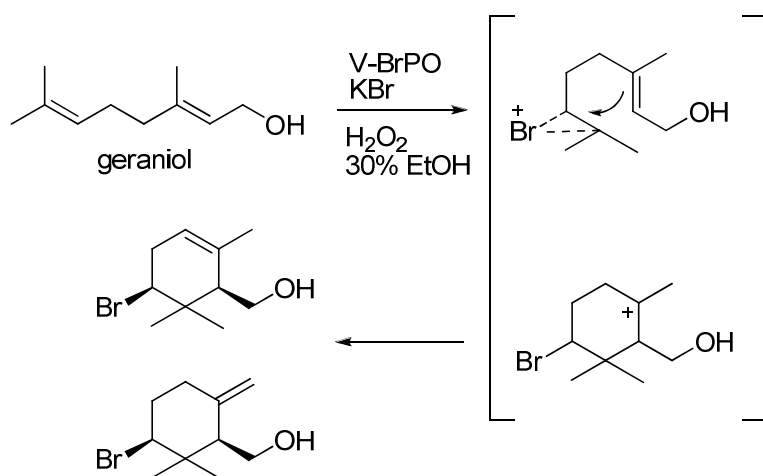


Figura 28: Bromação catalizada por V-BrPO e ciclização do geraniol.

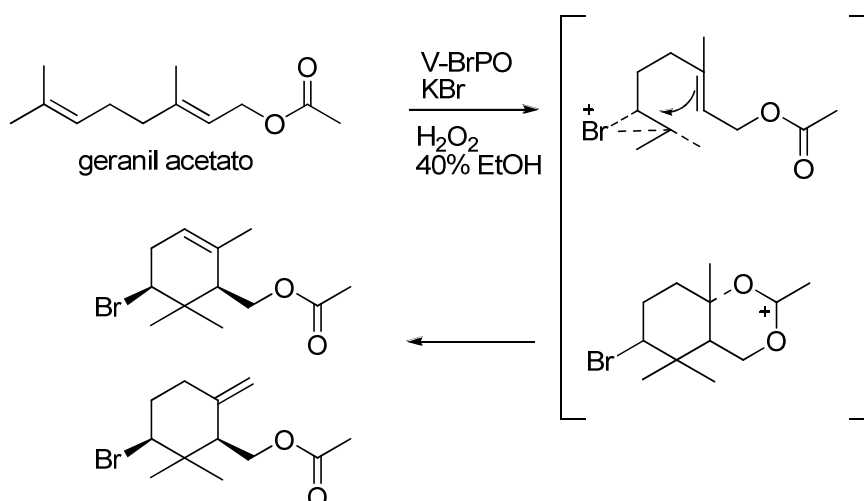


Figura 29: Bromação catalizada por V-BrPO e ciclização do geranyl acetato.

Um novo alcalóide bromopirrólico dimérico, a benzosceptrina C (**85**) (**Fig. 30**), foi isolado a partir de uma esponja marinha do gênero *Agelas*, coletada em Okinawa. O

composto apresentou atividade antimicrobiana contra diversas linhagens de fungos e bactérias como *Bacillus subtilis* (MIC 13,0 µg/mL), *Escherichia coli* (MIC 13,0 µg/mL), *Micrococcus luteus* (MIC 6,0 µg/mL), *Staphylococcus aureus* (MIC 13,0 µg/mL), *Tricophyton mentagrophytes* (MIC 6,0 µg/mL), *Cryptococcus neoformans* (MIC 13,0 µg/mL), *Candida albicans* (MIC 13,0 µg/mL) e *Aspergillus niger* (MIC 13,0 µg/mL) (Kubota et al., 2009).

A ageladina A (**86**) (**Fig. 30**), um metabólito heteroaromático tricíclico, foi isolado da esponja *Agelas nakamurai* coletada no sul do Japão. Este composto apresentou potente atividade inibitória frente a matrizmetaloproteinases, enzimas envolvidas na regulação da angiogênese, um processo essencial para crescimento de tumores e metástase, em uma concentração de 10 µg/mL (Fujita et al., 2003).

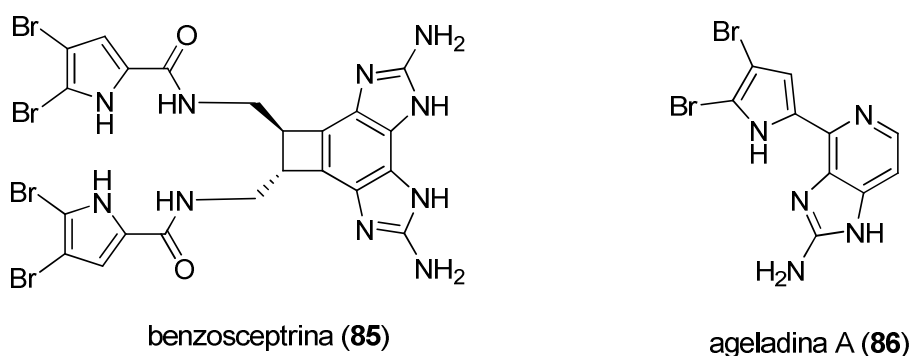


Figura 30: Estruturas dos compostos **85-86**.

Outros exemplos recentes de alcalóides bromopirrólicos diméricos isolados a partir de esponjas do gênero *Agelas*, incluem a série das nagelamidas (**87-103**) (**Figs. 31 e 32**). Conhece-se atualmente 17 compostos desta classe, os quais apresentaram atividades biológicas como antibacteriana, antifúngica e inibitória contra uma série de linhagens de bactérias patogênicas. (Endo et al., 2004; Araki et al., 2007, 2008 e 2009; Kubota et al., 2008; Appenzeller et al., 2009).

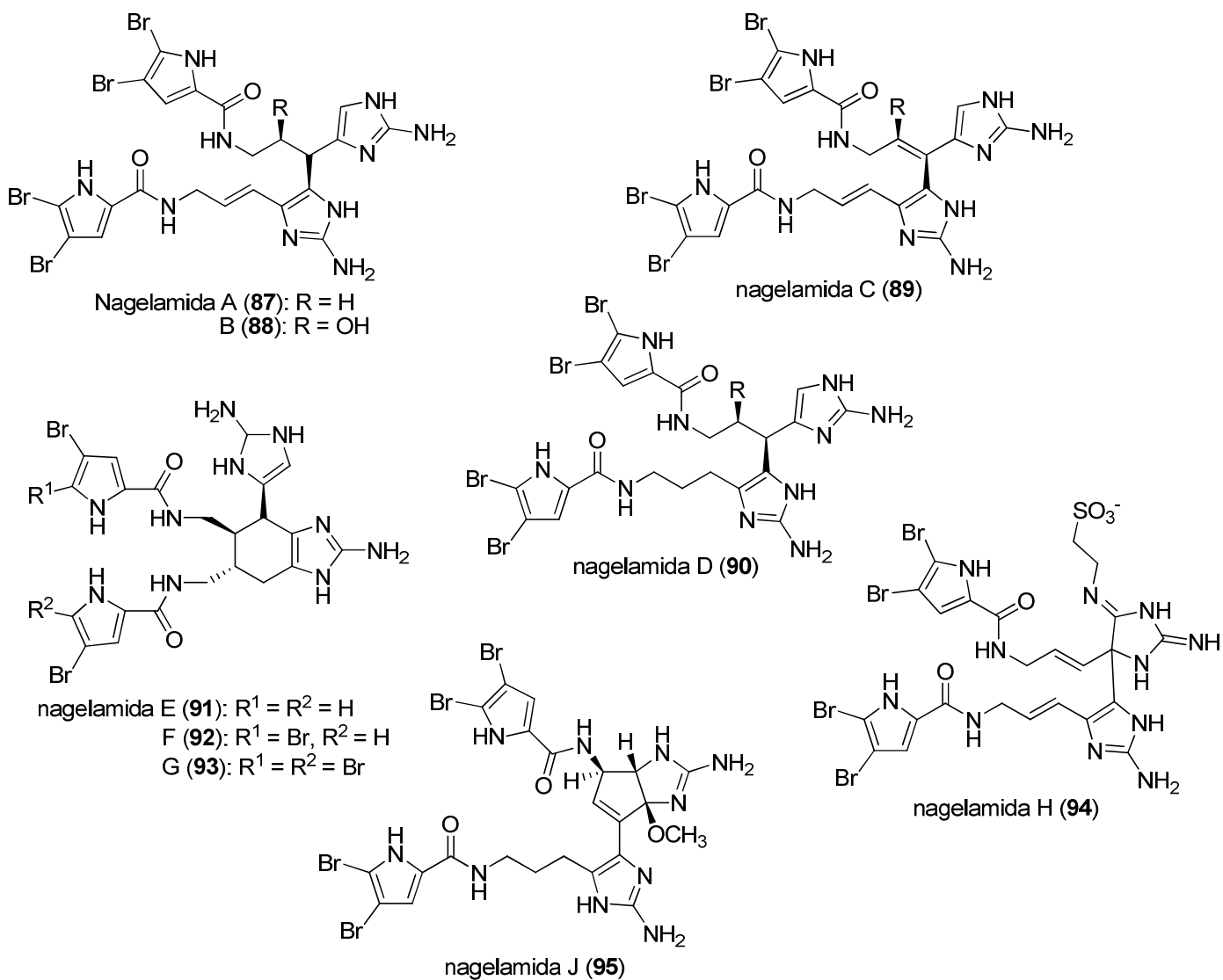


Figura 31: Estruturas das nagelamidas A-H e J (**87-95**).

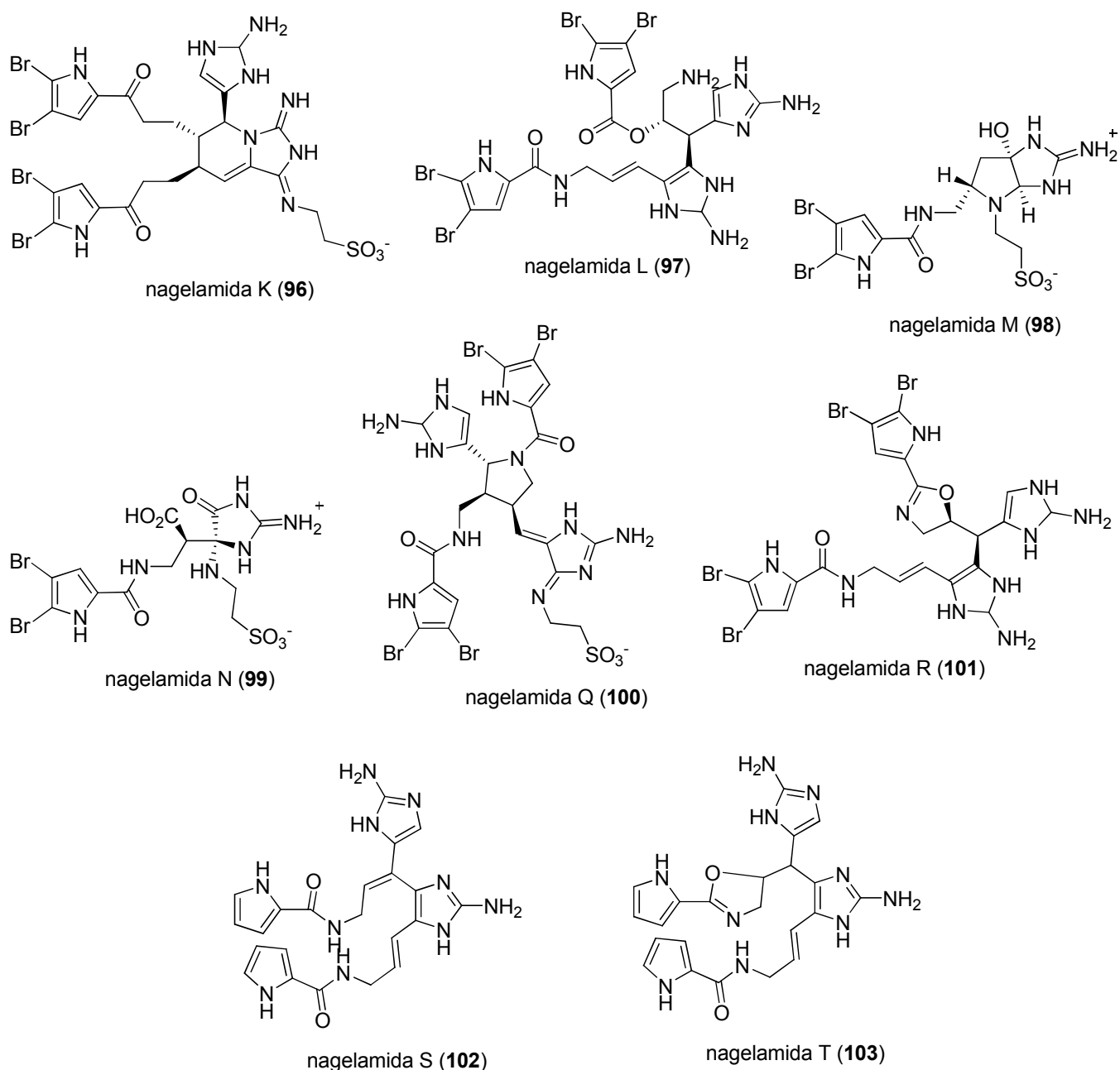


Figura 32: Estruturas das nagelamidas K-T (96-103).

As esponjas marinhas do gênero *Agelas*, caracterizam-se por apresentarem compostos bromopirrólicos como metabólitos secundários, os quais são conhecidos por apresentarem diversas atividades biológicas. Assim, este capítulo descreve o estudo químico realizado com o extrato obtido da esponja marinha *Agelas sventres* coletada na costa brasileira. Os extratos brutos obtidos de *A. sventres* foram analisados em um sistema LC-UV-MS, com o objetivo de se observar a possível presença de compostos bromados nestes extratos. Uma vez que o extrato bruto desta esponja apresentou atividade inibitória

contra a enzima Pdr5p de *Saccharomyces cerevisiae*, a atividade biológica dos compostos isolados foi avaliada.

4.2 Procedimento Experimental - Estudo do extrato bruto da esponja marinha *Agelas sventres*

Os extratos brutos (*n*-BuOH, CH₂Cl₂ e AcOEt) da esponja *Agelas* foram fornecidos pelo grupo do Prof. Antonio Pereira, do Laboratório de Bioquímica Microbiana (Instituto de Microbiologia-UFRJ), para que fosse realizado o trabalho de fracionamento e isolamento de compostos bioativos.

O extrato *n*-butanólico, AgsBu (302,0 mg), foi submetido a uma cromatografia em coluna pré-empacotada contendo sílica-gel derivatizada com grupos octadecilsilano (C₁₈) como fase estacionária, utilizando-se um gradiente de H₂O em MeOH (H₂O 100%; H₂O/MeOH 9:1, 8:2, 7:3, 6:4; 1:1, 4:6, 3:7 e MeOH 100%) como fase móvel. Após a análise por cromatografia camada delgada (CCD), utilizando CH₂Cl₂/MeOH 9:1 e 7:3 como eluentes e ácido fosfomolibdico, ninidrina e Dragendorff como reveladores, das frações obtidas, estas foram reunidas em 7 novas frações, que foram analisadas por LC-UV-MS. As condições cromatográficas e parâmetros de análise foram os seguintes:

- gradiente de MeOH em H₂O contendo 0,1% de ácido fórmico, com fluxo de 1,0 mL/min, em uma coluna de sílica-gel derivatizada com grupos C₁₈ (Phenomenex RP18, 4 μ , 250 x 4,6 mm);
- espectro de UV-vis obtido para a região entre 200-400 nm no detector de arranjo de fotodiodos (PDA);
- espectro de massas de baixa resolução obtido em modo de ionização por eletrospray positivo utilizando-se a voltagem do cone em 25 e 50 V, observando-se íons de massa entre *m/z* 200-900.

Com base nos resultados obtidos nas análises por LC-UV-MS, a fração AgsBu-2 (82,5 mg) foi selecionada para ser purificada por HPLC em coluna C₁₈ (Inertsil ODS-3, 5 μ m,

4,6 x 250 mm, GL Sciences Inc.), utilizando MeOH/H₂O (0,1% TFA) 4:6 em modo isocrático e fluxo de 1 mL/min. Esta separação forneceu quatro novas frações, AgsBu-2a (24,5 mg), -2b (8,2 mg), -2c (27,3 mg) e -2d (12,3 mg), e resultou no isolamento de 22,0 mg da oroidina (**104**), que teve sua estrutura determinada comparando-se os seus dados de RMN-¹H e ¹³C obtidos com os dados da literatura.

As frações AgsBu-3 (8,4 mg) e -4 (15,9 mg) apresentaram três outros compostos. Estes puderam ser identificados por análises de LC-UV-MS e por buscas nas bases de dados SciFinder e MarinLit, como sendo a sventrina (**105**), a dispacamida A (**106**) e a taurodispacamida A (**107**).

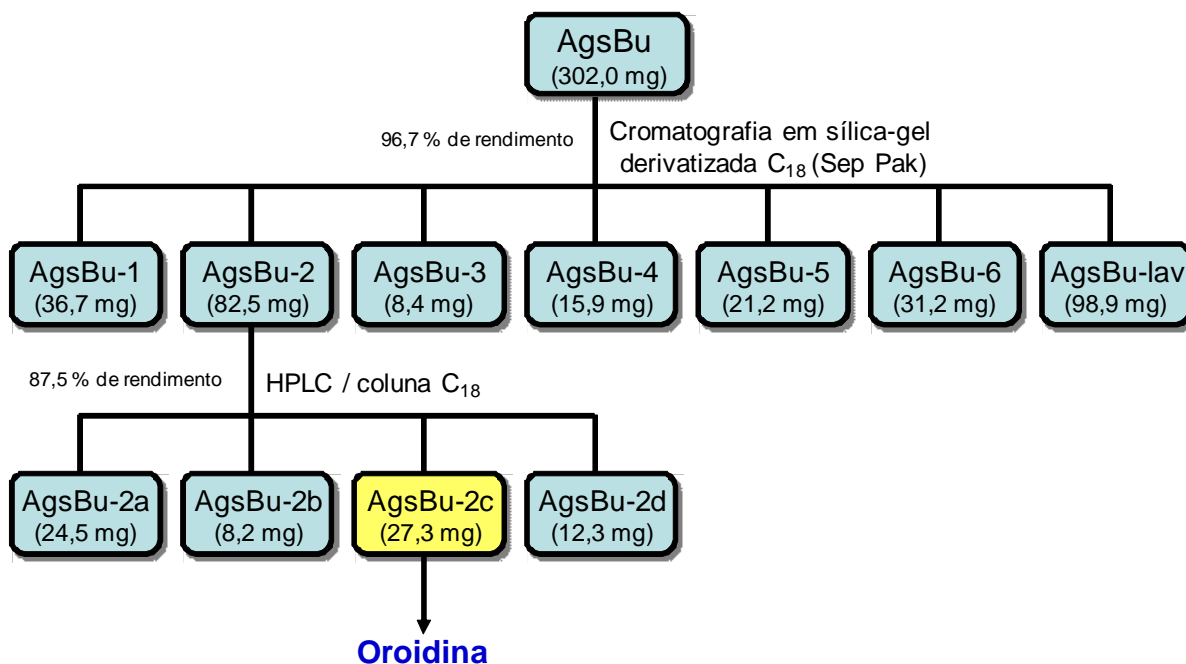


Figura 33: Fracionamento do extrato *n*-butanólico da esponja *Agelas sventres*.

O extrato CH₂Cl₂ (140,5 mg) de *A. sventres*, foi submetido a uma cromatografia em coluna pré-empacotada utilizando-se sílica-gel como fase estacionária. O sistema de eluentes escolhido para o processo foi o seguinte:

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

Após a separação obteve-se uma série de frações que foram analisadas por CCD, utilizando-se $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 e 7:3 como eluentes e ácido fosfomolibdico, ninidrina e Dragendorff como reveladores, e reunidas em 5 novas frações: AgsDM-1 (4,4 mg), -2 (32,2 mg), -3 (35,8 mg), -4 (52,3 mg) e -lav (13,9 mg).

As frações obtidas foram analisadas em um sistema LC-UV-MS, nas mesmas condições citadas anteriormente (pag. 38), com o objetivo de observar a presença de compostos bromados. A fração AgsDM-3 (35,8 mg) foi separada por HPLC em coluna de fase reversa C_{18} (Phenomenex RP18, 4μ , 250 x 4,6 mm), utilizando-se como eluente $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (0,1% ác. fórmico) 55:45 em modo isocrático e fluxo de 0,9 mL/min fornecendo oito novas frações: AgsDM-3a (8,1 mg), -3b (7,5 mg), -3c (7,4 mg), -3d (8,1 mg), -3e (0,3 mg), -3f (0,3 mg), -3g (1,0 mg) e -3h (0,9 mg). A fração AgsDM-3h forneceu (0,9 mg) do composto hanishina (**108**), que teve sua estrutura identificada a partir da comparação dos seus dados de RMN- ^1H e ^{13}C e seu espectro de massas com a literatura.

A fração AgsDM-4 (52,3 mg) também foi purificada por HPLC em fase reversa nas mesmas condições utilizadas para a fração AgsDM-3, porém utilizando-se outra coluna C_{18} (Inertsil ODS-3, 5μ , 4,6 x 250 mm, GL Sciences Inc.). A separação forneceu oito novas frações: AgsDM-4a (17,1 mg), -4b (7,5 mg), -4c (7,9 mg), -4d (2,3 mg), -4e (1,5 mg), -4f (1,4 mg), -4g (1,6 mg) e -4h (1,5 mg). As frações foram novamente analisadas por LC-UV-MS. Após a análise dos dados obtidos foi realizada uma pesquisa nos bancos de dados SciFinder e MarinLit, sendo possível a identificação de mais três alcalóides bromopirrolícos, a longamida B (**109**), o éster metílico da longamida B (**110**) e o ácido dibromopirrolíco (**111**) nas frações AgsDM-4g (1,6 mg) e -4h (1,5 mg).

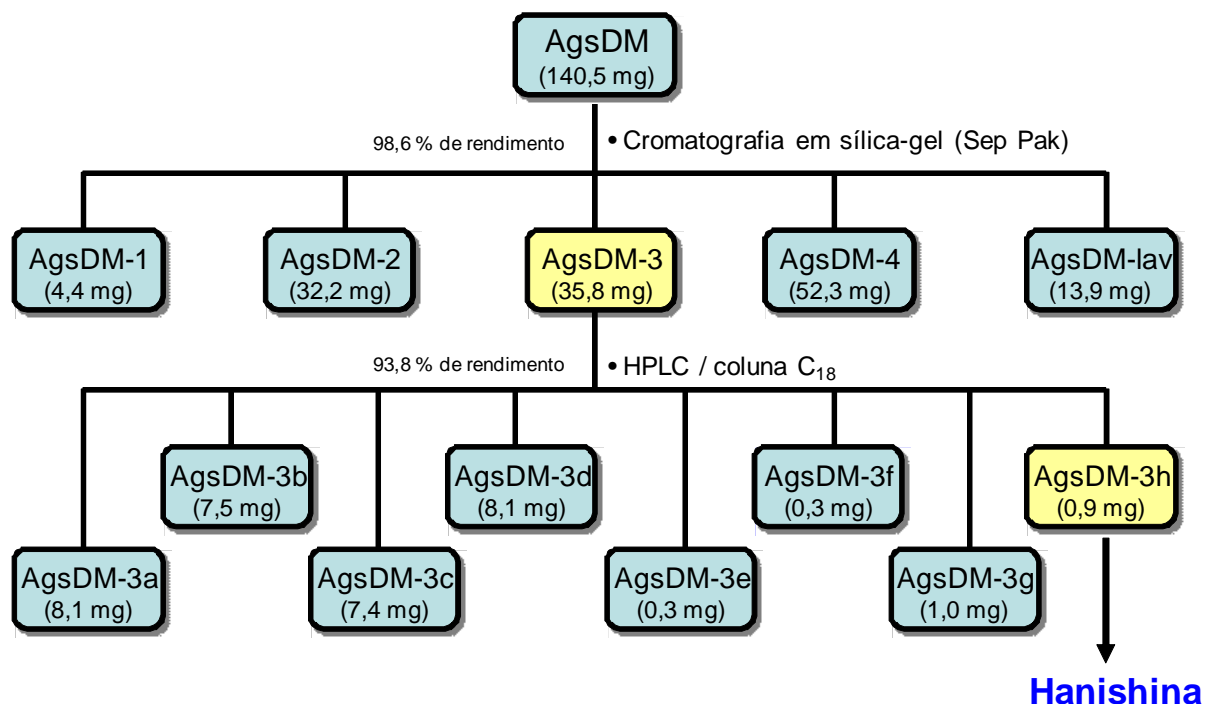


Figura 34: Fracionamento do extrato de diclorometano da esponja *Agelas sventres*.

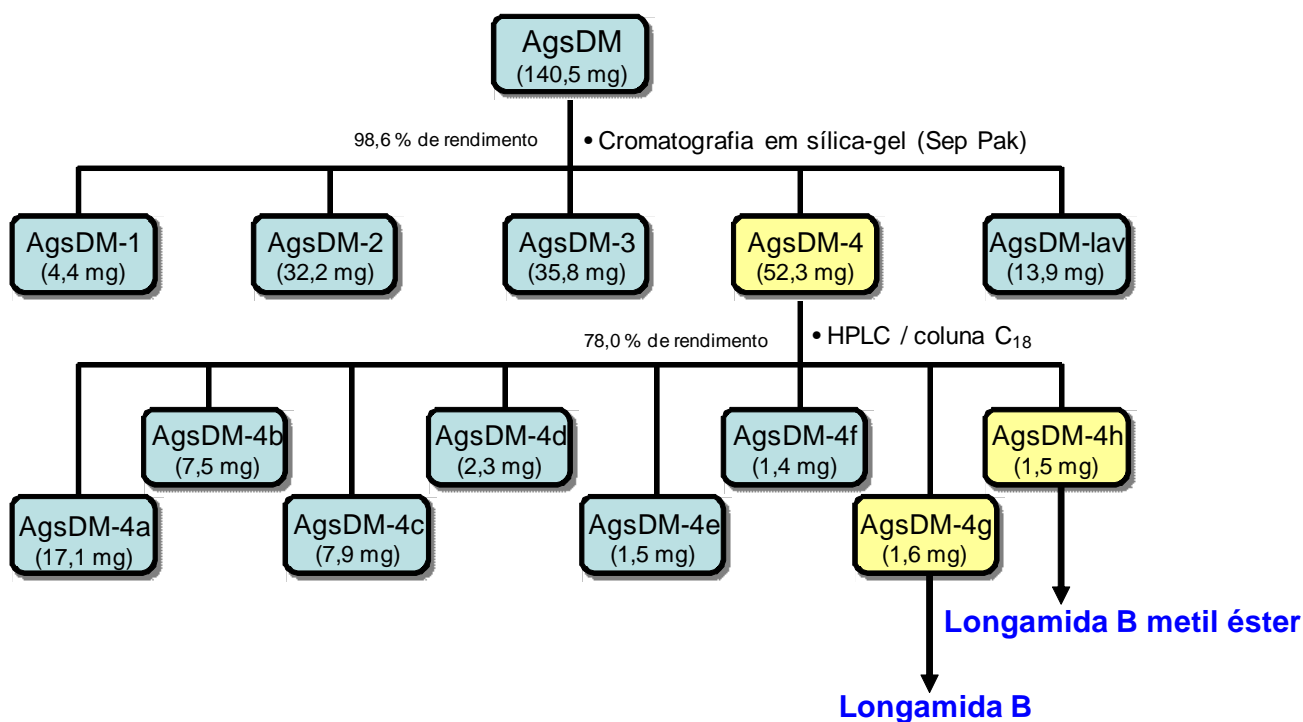


Figura 34b: Fracionamento do extrato de diclorometano da esponja *Agelas sventres*.

O extrato de acetato de etila AgsAc (162,1 mg) da mesma esponja, foi submetido a uma separação por cromatografia em coluna pré-empacotada com fase estacionária de sílica-gel derivatizada com grupos ciano (CN), utilizando-se um gradiente de CH_2Cl_2 e AcOEt

(com início em 9:1 até 1:1), seguido de outro gradiente de CH₂Cl₂ e MeOH (início em 9:1 até 7:3). Após análises por CCD (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 e 7:3 como eluentes e ácido fosfomolibdico, ninidrina e Dragendorff como reveladores) das diversas frações obtidas, estas foram reunidas em 3 frações: AgsAc-1 (96,2 mg), AgsAc-2 (23,0 mg) e AgsAc-3 (20,5 mg), que foram analisadas por LC-UV-MS. A fração AgsAc-1 (96,2 mg) foi então separada por HPLC utilizando-se uma coluna semi-preparativa de sílica-gel derivatizada com grupos C₁₈ (CSC-Inertsil 150A/ODS2, 5 μm, 250 x 9,4 mm), com H₂O/MeOH 2:8 como eluente em modo isocrático e fluxo de 1,2 mL/min, fornecendo oito novas frações: AgsAc-1a (50,8 mg), -1b (10,0 mg), -1c (3,1 mg), -1d (2,2 mg), -1e (5,3 mg), -1f (3,3 mg), -1g (1,2 mg) e -1h (4,0 mg). Após novas análises no sistema LC-UV-MS, observou-se que a fração AgsAc-1f (3,3 mg) continha o ácido dibromopirrólico (**111**), também isolado no extrato diclorometano desta mesma esponja. A partir das análises realizadas por LC-UV-MS e pesquisa em bancos de dados, foi possível identificar na fração AgsAc-2 (28,0 mg) a presença da sventrina (**105**) e da longamida B (**109**), identificadas anteriormente nos extratos butanólico e de diclorometano desta esponja.

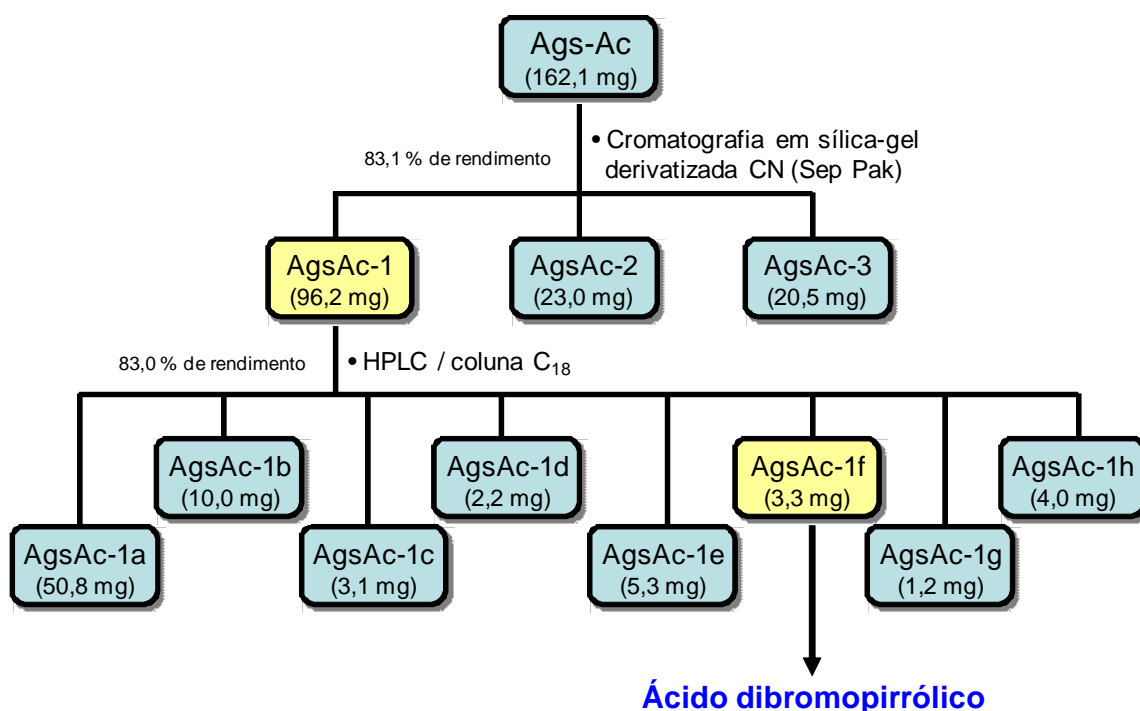


Figura 35: Fracionamento do extrato AcOEt da esponja *Agelas sventres*.

4.3- Resultados

A purificação da fração AgsBu-2 por HPLC, resultou no isolamento da oroidina (**104**), na fração AgsBu-2c. A identificação da oroidina foi realizada a partir da obtenção do espectro de massas de baixa resolução (MS-ESI⁺) em um sistema LC-UV-MS e comparação dos seus espectros de RMN-¹H e ¹³C (**Figuras 4.1 e 4.2**, anexo) obtidos com dados da literatura (Tasdemir et al., 2007). No espectro de RMN-¹H (MeOD, 400 MHz) é possível observar os seguintes sinais: singletos em δ 6,83 e 6,72 referentes aos hidrogênios dos anéis dibromopirrol e 2-aminoimidazol, respectivamente; de hidrogênios ligados a carbonos de dupla ligação (*sp*²) em δ 6,07 e 6,30; dubleto em δ 4,04 referente a um hidrogênio ligado a carbono próximo a elemento eletronegativo. Estes dados se mostram compatíveis com os hidrogênios observados na estrutura da oroidina (**Tabela 1**). O espectro de RMN-¹³C obtido para a oroidina apresentou um sinal em δ 161,6 típico de um carbono de grupo carbonila de grupo amida; um sinal em δ 41,7 referente a um grupo metileno nitrogenado; sinais em δ 128,7; 114,4; 100,0; 106,3; 127,5; 112,3; 127,3; 149,6 e 118,0 referentes a carbonos do tipo *sp*². O sinal do pico do íon *quasi*-molecular observado no espectro de massas de baixa resolução obtido por ESI em modo positivo, se mostra como um sinal triplo em *m/z* 388, 390 e 392, na proporção 1:2:1, sendo compatível com um composto com massa molecular de 389 Da e contendo 2 átomos de bromo em sua estrutura, como no caso da oroidina.

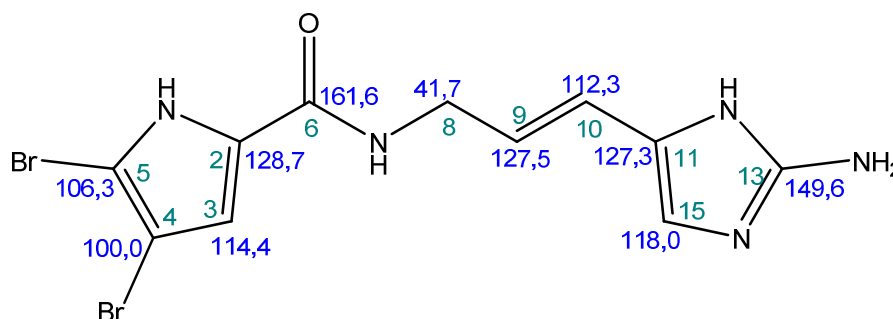


Figura 36: Estrutura da oroidina (**104**) e os deslocamentos químicos observados no RMN-¹³C.

Tabela 1: Comparação dos valores de deslocamentos químicos de RMN-¹H (400 MHz) e ¹³C (100 MHz) da fração AgsBu-2c com dados da literatura.

Posição	AgsBu-2c (MeOH- <i>d</i> ₄)		Literatura* (MeOH- <i>d</i> ₄)	
	δ ¹³ C	δ ¹ H (mult, J/Hz)	δ ¹³ C	δ ¹ H (mult, J/Hz)
2	128,7		128,9	
3	114,4	6,83 (s)	114,4	6,82 (s)
4	100,0		100,0	
5	106,3		106,5	
6	161,6		161,6	
8	41,7	4,04 (d, 4,9)	42,3	4,00 (dd, 6,1 e 1,3)
9	127,5	6,07 (dt, 10,9 e 5,0)	121,5	5,87 (dt, 16,0 e 6,1)
10	112,3	6,30 (d, 16,0)	122,9	6,31 (d, 16,0)
11	127,3		131,4	
13	149,6		152,0	
15	118,0	6,72 (s)	117,7	6,47 (s)

* Tasdemir, D. et al., 2007

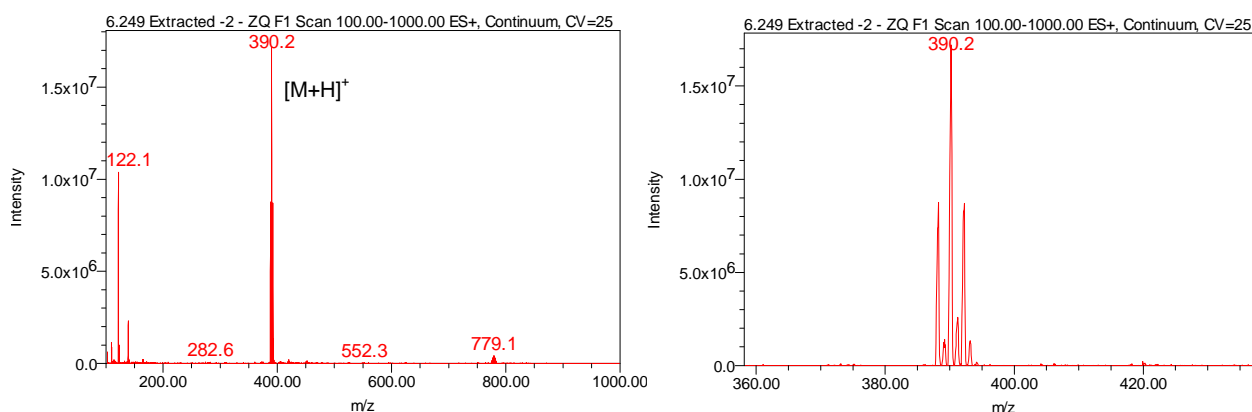
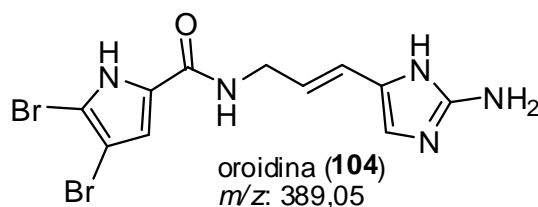


Figura 37: Espectro de massas de baixa resolução da oroidina (ESI⁺).

Outros compostos puderam ser identificados nos extratos da esponja *Agelas sventres*, a partir de resultados obtidos das análises realizadas por LC-UV-MS, mesmo em frações ainda impuras. Para isso utilizou-se informações dos bancos de dados SciFinder e MarinLit. Realizou-se buscas para alcalóides bromopirrólicos, cruzando-se estas informações com os resultados de espectrometria de massas obtidos. Este processo possibilitou propor a identificação de três compostos conhecidos presentes em frações ainda impuras, a sventrina (**105**), a dispacamida A (**106**) e a taurodispacamida A (**107**), compostos anteriormente encontrados em esponjas do gênero *Agelas*. A dispacamida A foi isolada pela primeira vez em um estudo com diversas espécies de esponjas do gênero *Agelas* (*Agelas conifera*, *A. longissima*, *A. clathrodes* e *A. dispar*), e apresentou atividade anti-histamínica (Cafieri et al., 1996), assim como a taurodispacamida A, isolada pela primeira vez a partir da esponja *Agelas oroides* coletada no mediterrâneo (Fattorusso e Scafati, 2000). Sinais indicando a presença de diversos outros compostos bromados puderam ser observados nos extratos da esponja *Agelas sventres*, porém não sendo possível uma identificação mais precisa destes, devido à impossibilidade de se obter frações mais puras destes compostos em virtude da pouca quantidade de material disponível.

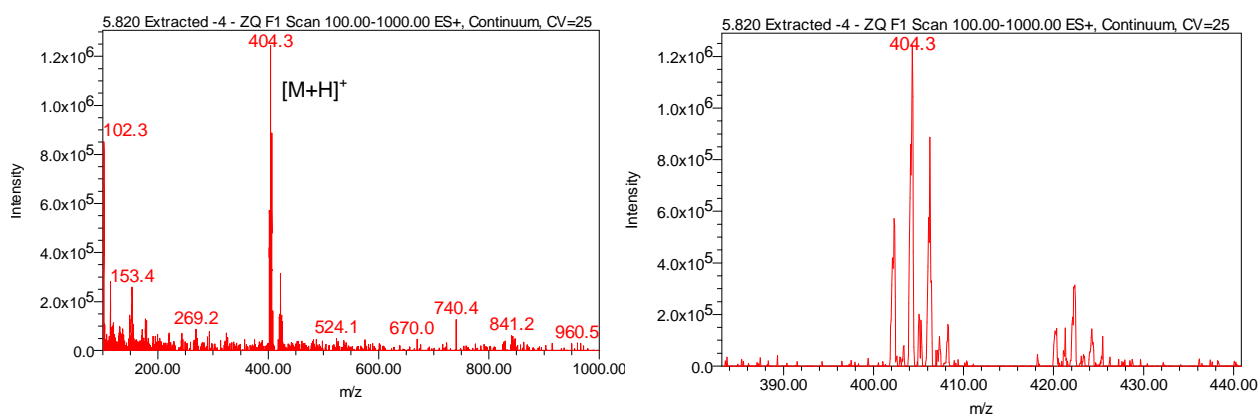
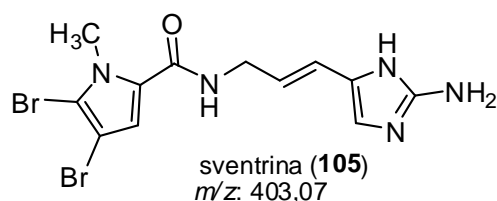


Figura 38: Espectro de massas de baixa resolução da sventrina (ESI⁺).

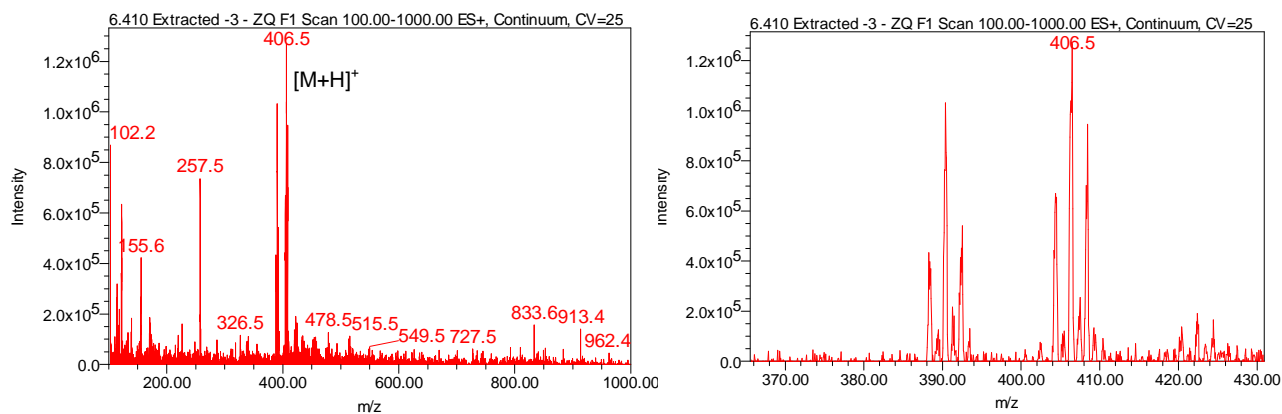
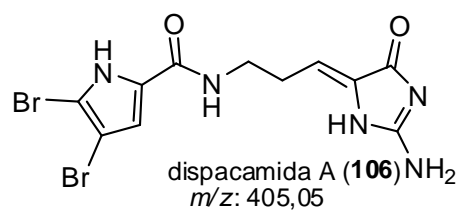


Figura 39: Espectro de massas de baixa resolução da dispacamida A (ESI⁺).

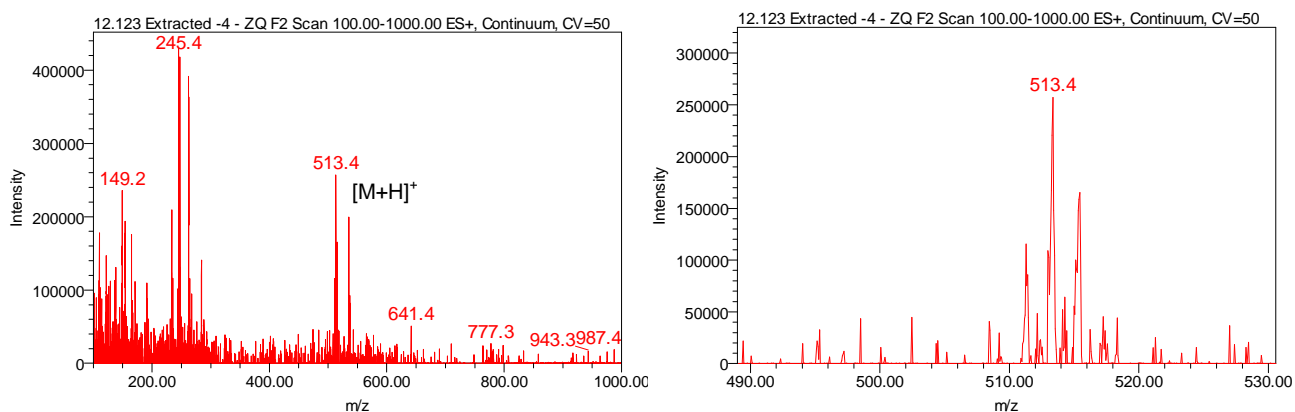
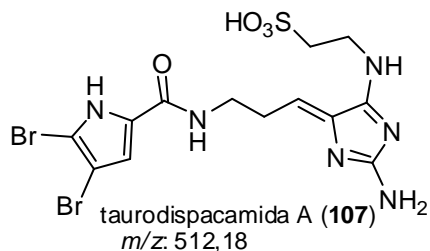


Figura 40: Espectro de massas de baixa resolução da taurodispacamida A (ESI⁺).

Com o objetivo de se obter mais informações relacionadas a estes compostos identificados sem a obtenção da substância pura, foram realizadas análises em um sistema

LC-MS/MS para observação dos padrões de fragmentação, e então se estas poderiam ser compatíveis com as estruturas propostas no trabalho. Os espectros seguem a seguir.

No espectro do tipo MS/MS obtido para o composto que apresenta o pico do íon *quasi*-molecular em m/z 404, o qual propõe-se que seja a sventrina, observam-se sinais em 324 e 243 m/z que podem ser atribuídos à perda de um e dois átomos de bromo, respectivamente, pela molécula em questão. Porém, não foi possível estabelecer uma proposta de fragmentação mais completa para este composto, com os íons observados no espectro MS/MS obtido.

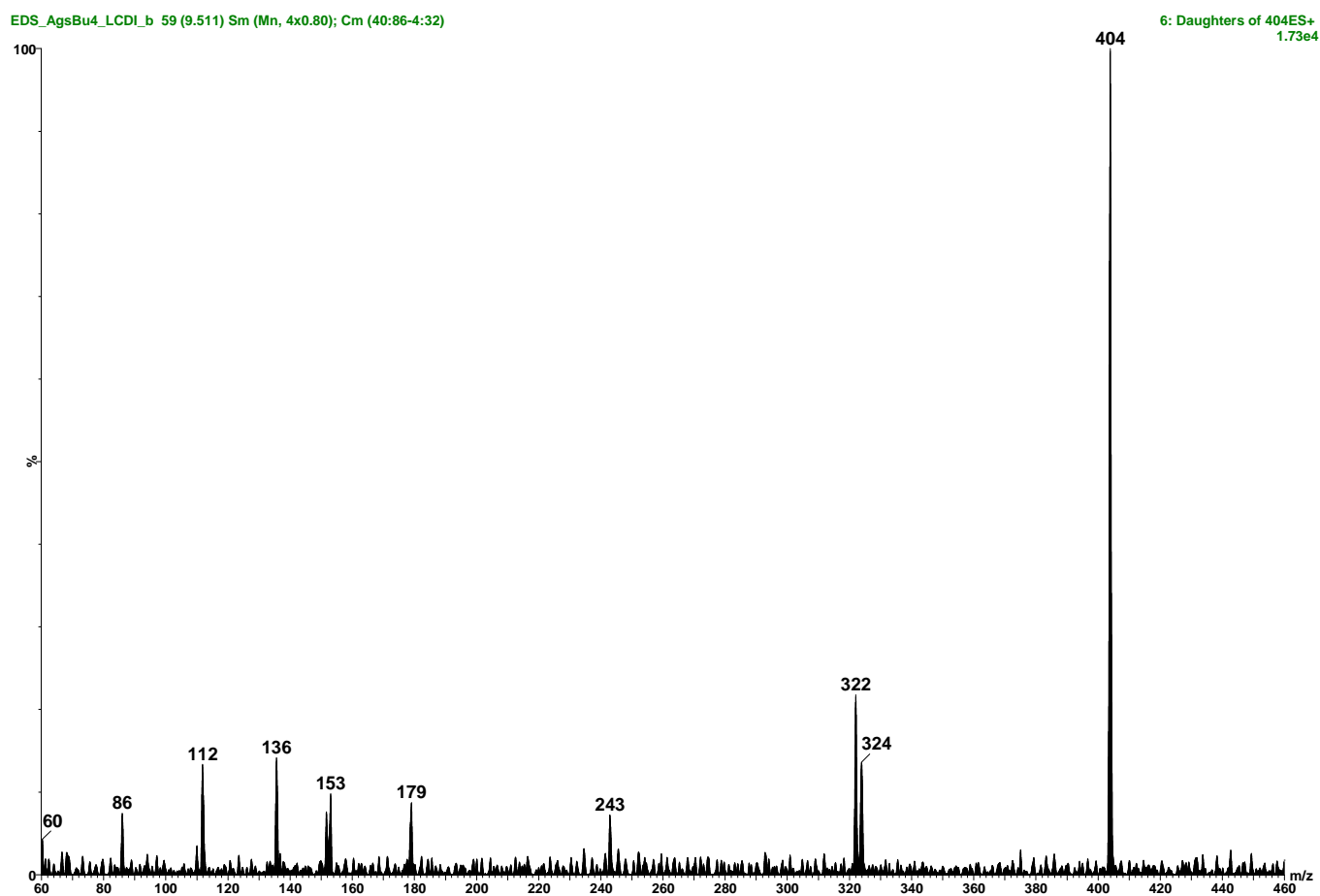
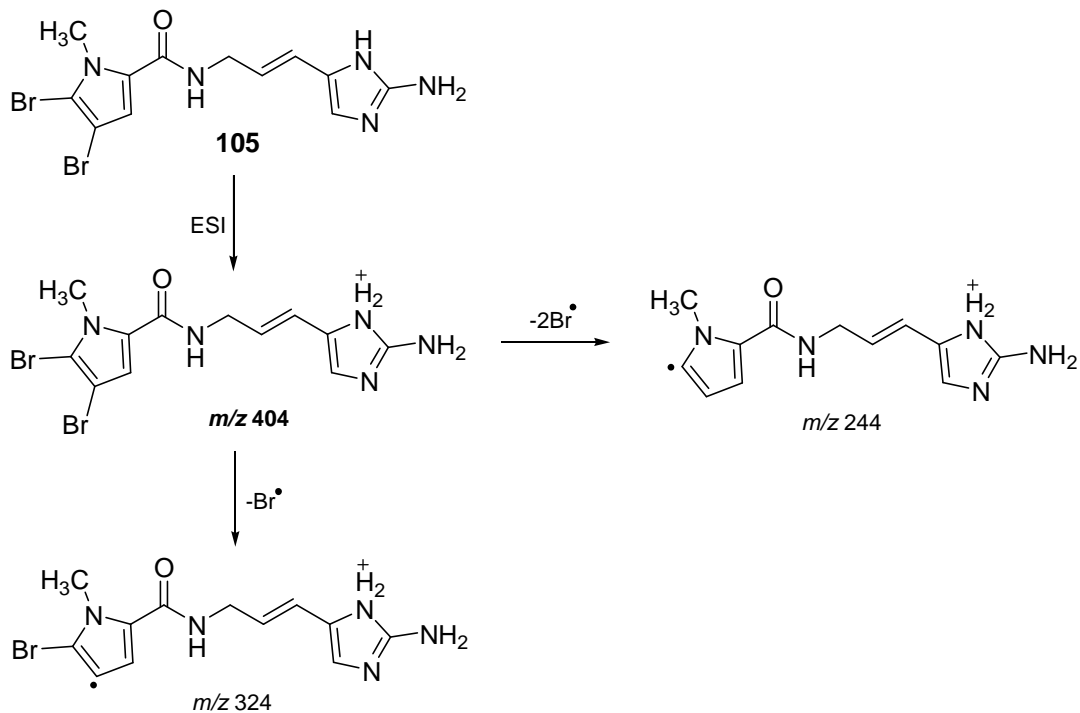


Figura 41: Espectro de massas do tipo MS/MS da sventrina.



Esquema 1. Rota de fragmentação proposta para a sventrina, segundo análise de seu espectro de massas do tipo MS/MS.

A seguir temos os espectros do tipo MS/MS obtidos dos compostos que apresentam o pico do íon *quasi*-molecular em m/z 406, e em m/z 513, os quais se propõe que sejam a dispacamida A e a taurodispacamida A respectivamente (**Figuras 42 e 43**). As rotas de fragmentação propostas são observadas nos **Esquemas 2 e 3**.

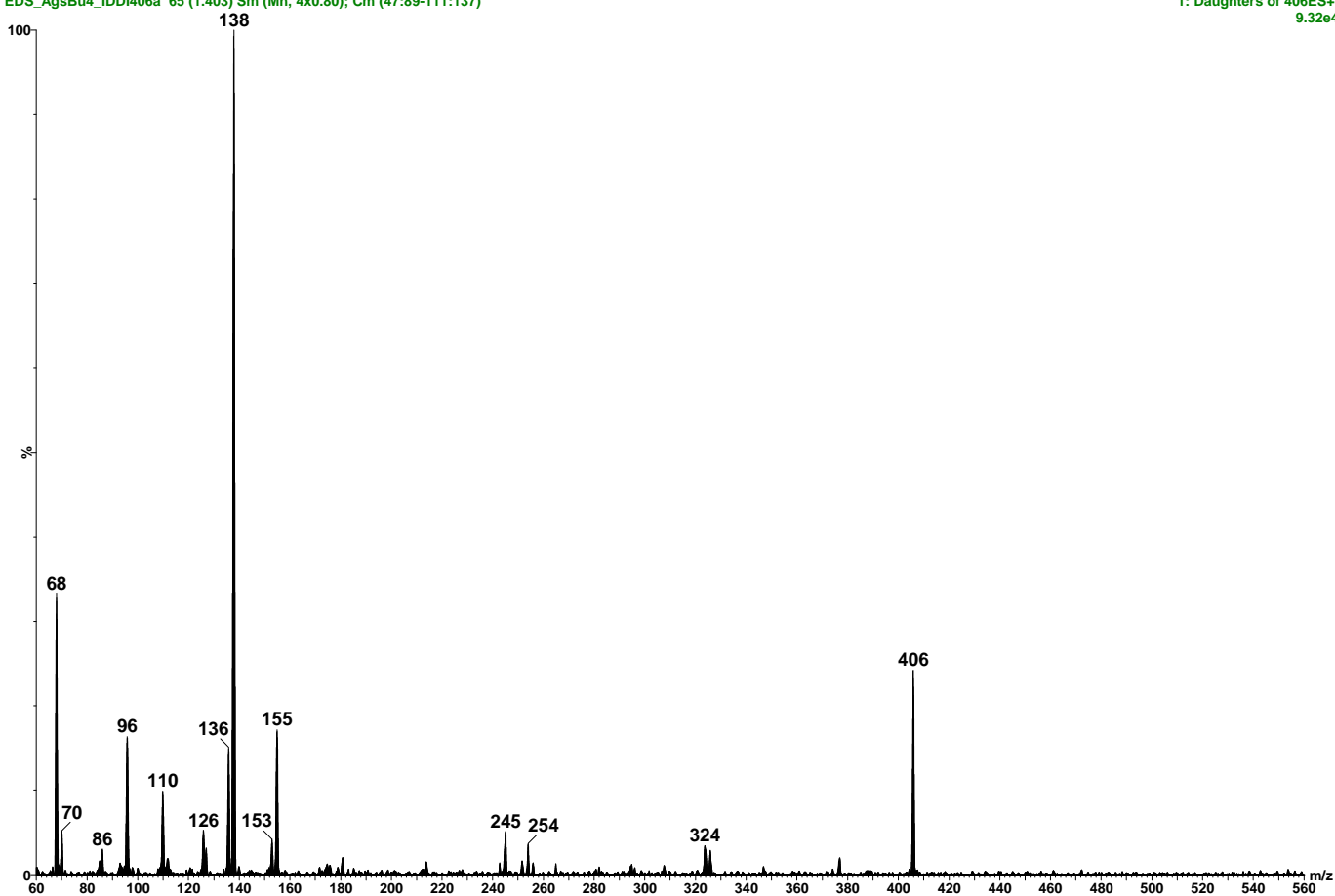
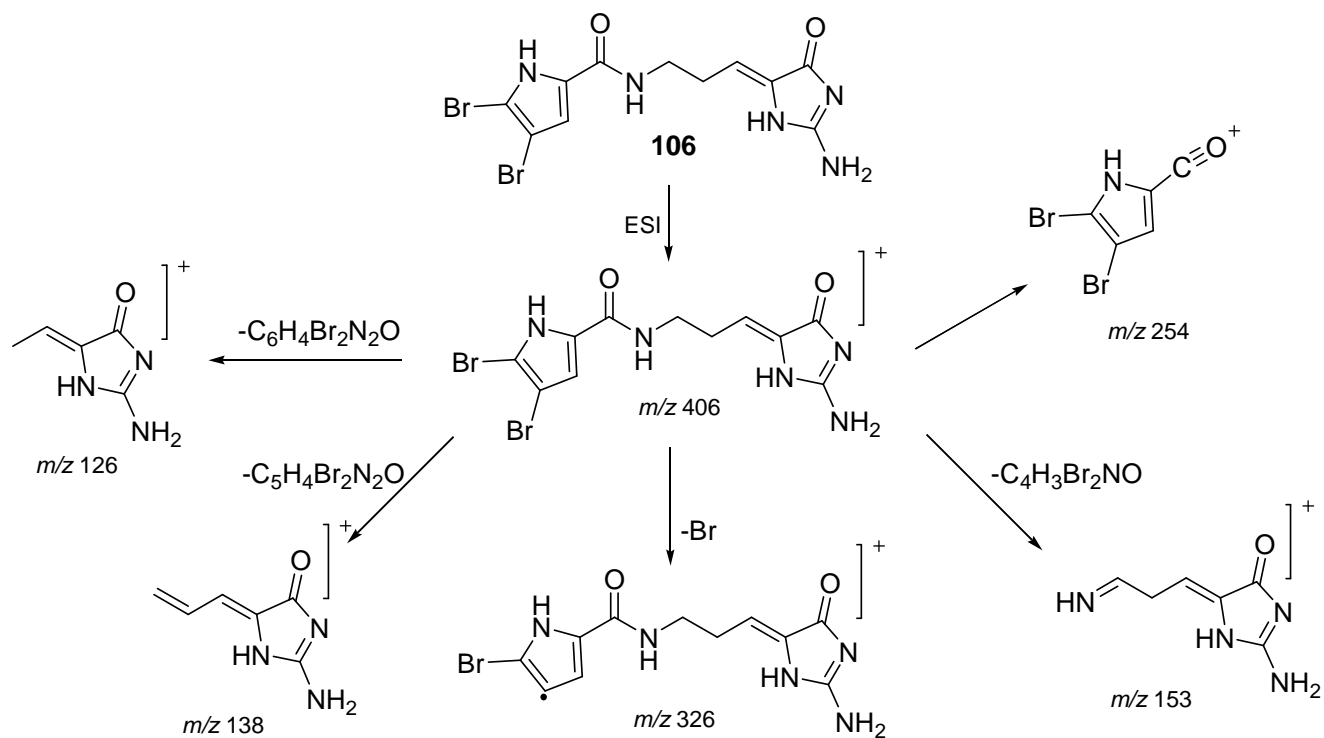


Figura 42: Espectro de massas do tipo MS/MS da dispacamida A.



Esquema 2. Rota de fragmentação proposta para a dispacamida A, segundo análise de seu espectro de massas do tipo MS/MS.

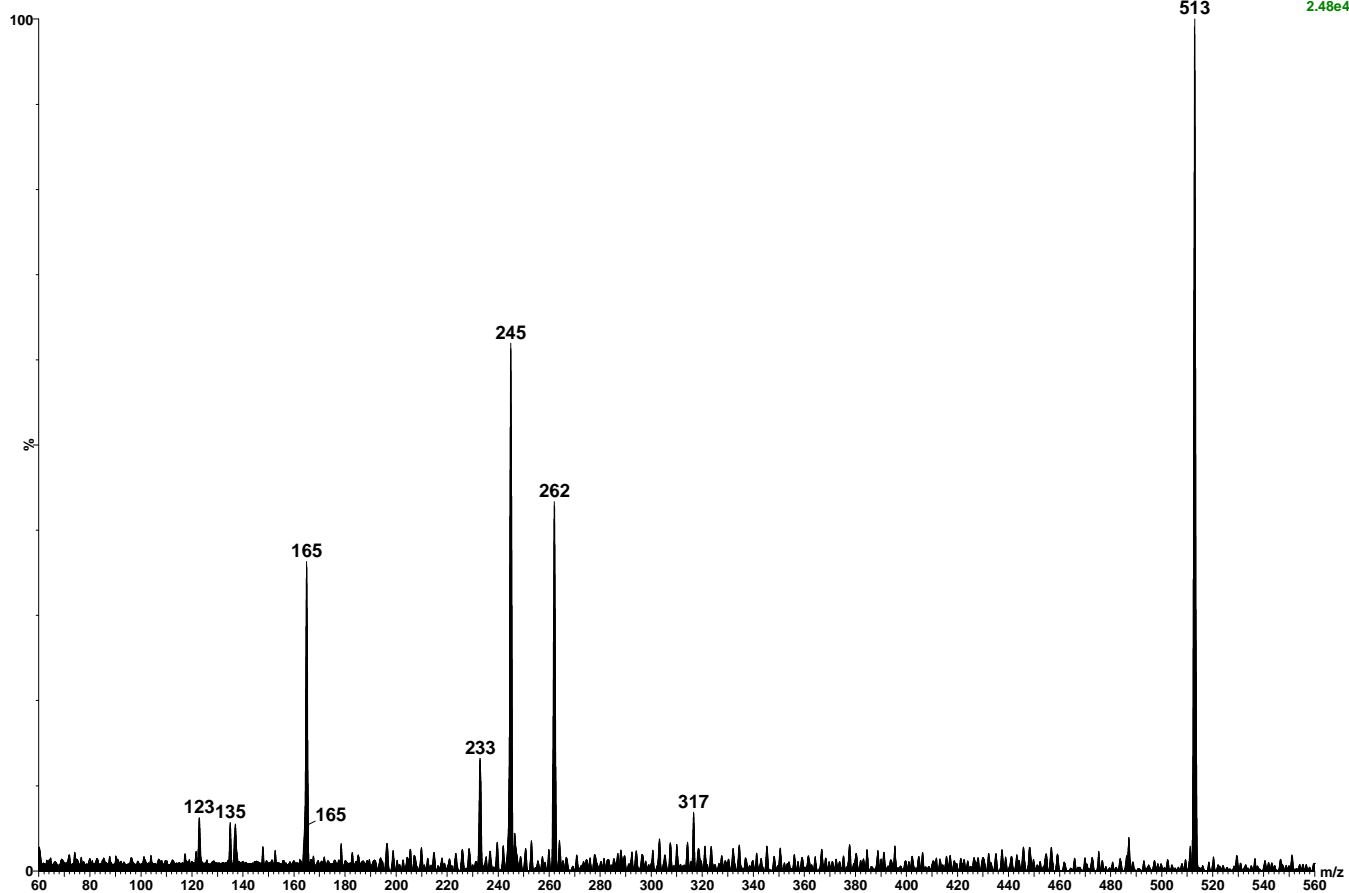
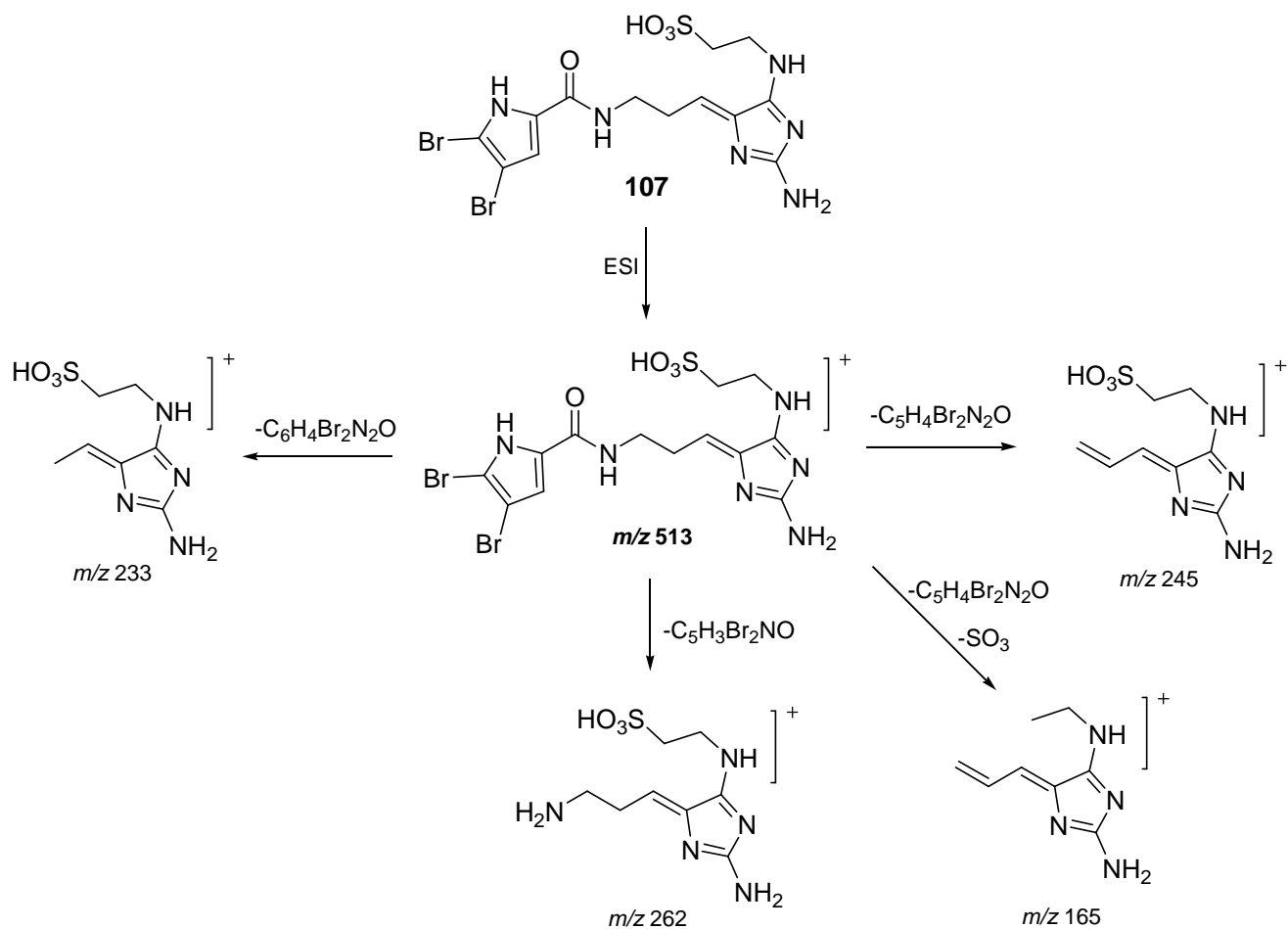


Figura 43: Espectro de massas do tipo MS/MS da taurodispacamida A.



Esquema 3. Rota de fragmentação proposta para a taurodispacamida A, segundo análise de seu espectro de massas do tipo MS/MS.

O extrato de diclorometano, AgsDM, foi submetido a uma separação por cromatografia em coluna pré-empacotada de sílica-gel fornecendo quatro novas frações, que foram analisadas no sistema LC-UV-MS.

A purificação da fração AgsDM-3h resultou no isolamento do composto conhecido hanishina (**108**), isolado pela primeira vez da esponja *Acanthella carteri* (Mancini et al., 1997). O composto foi identificado a partir da comparação dos seus espectros de RMN- 1H , ^{13}C e de massas de baixa resolução obtidos com dados da literatura.

O espectro de RMN- 1H (**Figura 4.3**, anexo) (DMSO- d_6 , 400 MHz) obtido da fração AgsDM-3h apresentou os seguintes sinais:

- dubleto em δ 7,87 referente a um hidrogênio ligado a nitrogênio;

- singleto em δ 6,85 referente a um hidrogênio ligado a carbono sp^2 ;
- quadrupletto em δ 4,04 e multipletto em δ 4,68 referentes a hidrogênios ligados a carbonos sp^3 funcionalizados com O ou N;
- multiplettos em δ 3,80; 3,40; 2,74 e 2,55 referentes a hidrogênios metilênicos;
- triplete em δ 1,15 referentes a hidrogênios de um grupo metila.

No espectro de RMN- ^{13}C (**Figura 4.4**, anexo) (DMSO- d_6 , 100 MHz) pôde-se observar sinais de carbonos sp^2 em δ 99,8; 106,6; 114,5; 125,8; 158,1 e 169,7, sendo os dois últimos de grupos carbonila. Os sinais em δ 42,8 e 14,1 são referentes a carbonos sp^3 de cadeia alquila, enquanto que os sinais em δ 36,5; 50,5 e 61,0 referem-se a carbonos sp^3 funcionalizados com O ou N. A análise dos espectros de RMN bidimensionais COSY, HSQC e HMBC (**Figuras 4.5 a 4.7**, anexo) possibilitou-nos observar diversas correlações que auxiliaram no estabelecimento da estrutura da hanishina, isolada de *A. sventres*. A tabela a seguir mostra a comparação dos deslocamentos químicos observados para o composto aqui isolado com dados da literatura.

Tabela 2: Comparação dos valores de deslocamentos químicos de RMN- ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) da fração AgsDM-3h com dados da literatura.

Posição	Literatura* [(CD_3) $_2\text{CO}$]		AgsDM-3h (DMSO- d_6)	
	δ ^{13}C	δ ^1H (mult, J/Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H (mult, J/Hz)
2	106,1		106,6	
3	99,5		99,8	
4	115,2	6,86 (s)	114,5	6,85 (s)
5	127,5		125,8	
6	158,5		158,1	
8	36,6	4,00 (ddd, 13,6; 4,3 e 1,5) e 3,68 (ddd, 13,6; 5,3 e 1,5)	36,5	2,74 (dd, 9,0 e 15,1) e 2,55 (m)
9	51,7	4,82 (dt, 10,1 e 3,9)	50,5	4,68 (m)
10	43,6	2,96 (dd, 16,0 e 10,1) e 2,64 (ddd, 6,0; 3,9 e 1,5)	42,8	3,8 (m) e 3,4 (m)
11	170,6		169,7	
12	61,5	4,25 (q, 7,2)	61,0	4,04 (q, 7,1)
13	14,3	1,23 (t, 7,2)	14,1	1,15 (t, 7,1)
NH	-	6,95	-	7,87

*Mancini, I., et al. 1997

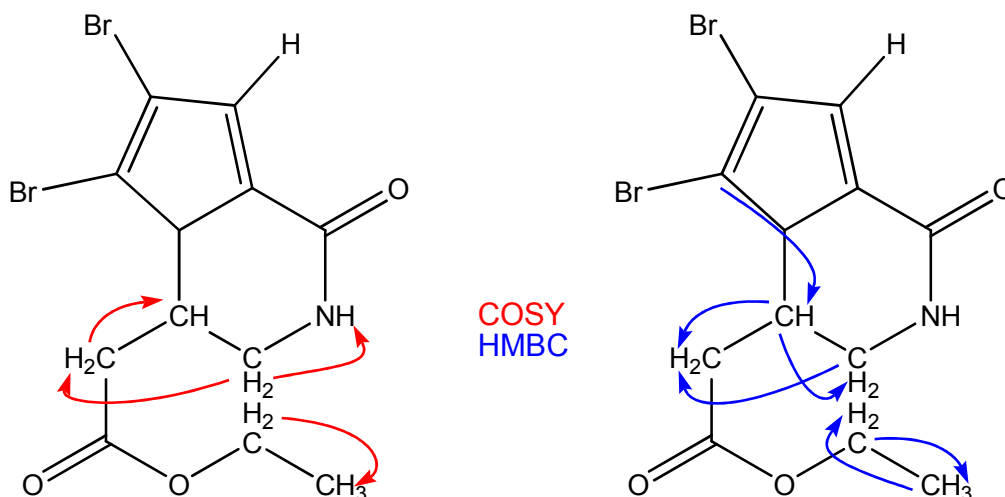


Figura 44: Correlações observadas para a hanishina (**108**).

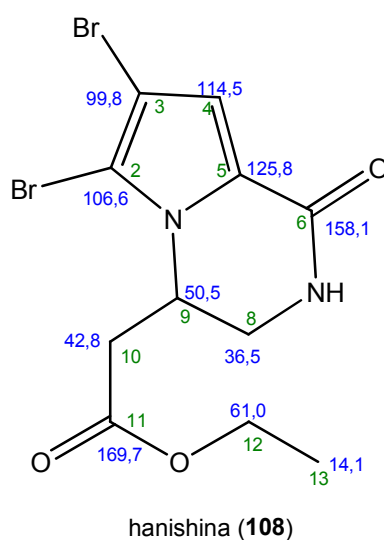


Figura 45: Estrutura da hanishina (**108**) e os deslocamentos químicos observados no RMN-¹³C.

O espectro de massas de baixa resolução do composto isolado foi obtido em sistema LC-UV-MS, utilizando-se a ionização por eletrospray em modo positivo. Observou-se três sinais na região do íon *quasi*-molecular em m/z 379, 381 e 383, na proporção 1:2:1, indicando a presença de dois átomos de bromo na estrutura com massa molecular de 380 Da, compatível com estrutura da hanishina aqui proposta.

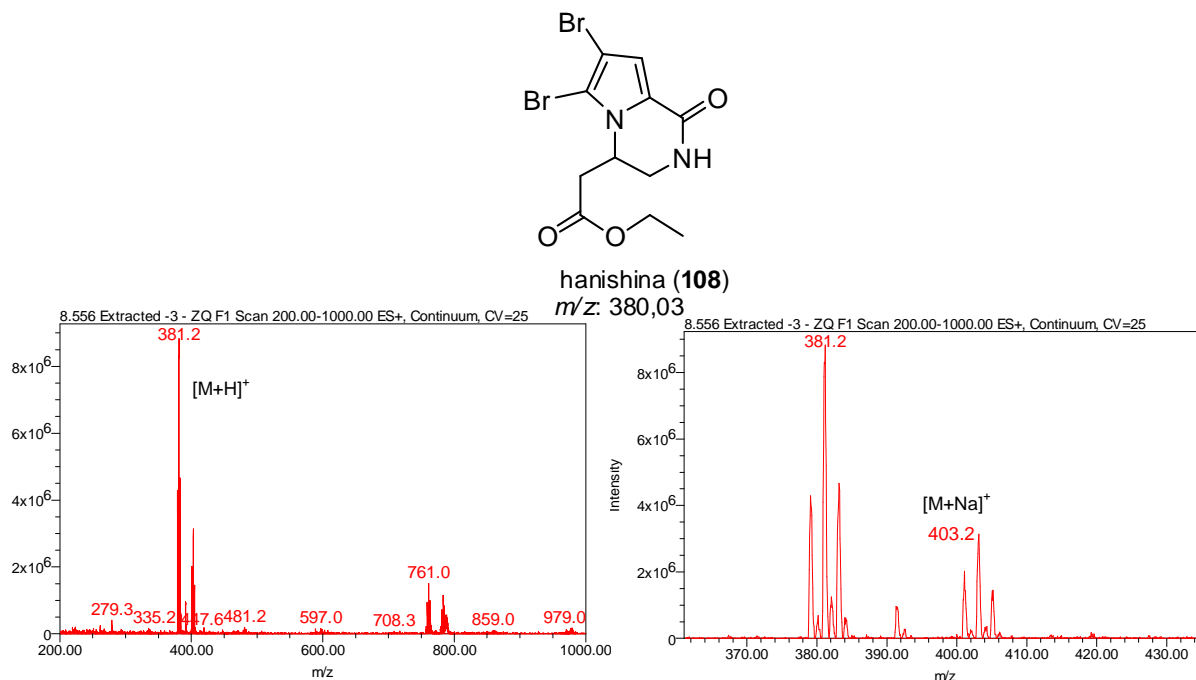


Figura 46: Espectro de massas de baixa resolução da hanishina (ESI⁺).

A separação da fração AgsDM-4 por HPLC levou ao isolamento de outros dois alcalóides bromopirrólicos, a longamida B (**109**) e o éster metílico da longamida B (**110**), nas frações AgsDM-4g e -4h respectivamente. A longamida B foi isolada originalmente de uma esponja *Agelas dispar* do Caribe e apresentou moderada atividade antibiótica contra bactérias Gram-positivas (Cafieri et al., 1998). A identificação dos compostos foi feita com base nos resultados obtidos nas análises realizadas no sistema LC-UV-MS, cruzando os dados observados nos respectivos espectros de massas obtidos com informações dos bancos de dados MarinLit e SciFinder. Também foram obtidos os espectros de RMN-¹H (**Figuras 4.8 e 4.9**, anexo) (MeOH-*d*₄, 400 MHz) para os compostos, mesmo não estando em frações totalmente purificadas. Os valores de deslocamento químico observados nos espectros, juntamente com os dados da literatura, dos compostos **109** e **110**, encontram-se nas **Tabelas 3 e 4** respectivamente.

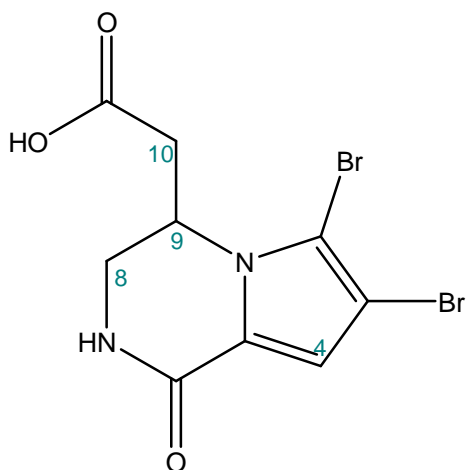


Figura 47: Estrutura da longamida B (109).

Tabela 3: Comparação dos valores de deslocamentos químicos de RMN-¹H (400 MHz) da fração AgsDM-4g com dados da literatura.

	AgsDM-4g (MeOH-<i>d</i>₄)	Literatura* (MeOH-<i>d</i>₄)
Posição	δ ¹ H (mult, J/Hz)	δ ¹ H (mult, J/Hz)
4	6,94 (s)	6,96 (s)
8	3,89 (ddd, 13,6; 4,1 e 1,5)	3,91 (ddd, 13,6; 4,1 e 1,5)
8	3,67 (m)	3,67 (dd, 13,5 e 1,3)
9	4,82 (m)	4,81 (m)
10	2,86 (dd, 16,3 e 10,7)	2,87 (dd, 16,4 e 10,8)
10	2,55 (dd, 16,4 e 2,0)	2,57 (ddd, 16,3; 3,4 e 1,4)

*Patel, J. et al., 2005

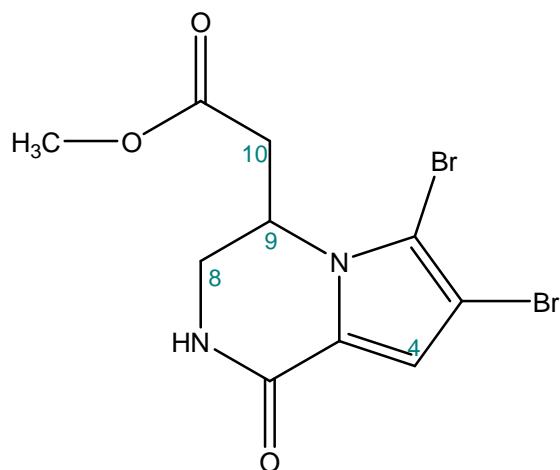
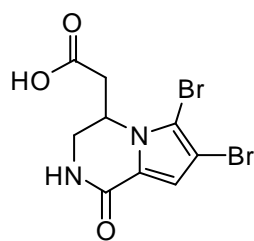


Figura 48: Estrutura do éster metílico da longamida B (110).

Tabela 4: Comparação dos valores de deslocamentos químicos de RMN-¹H (400 MHz) da fração AgsDM-4h com dados da literatura.

	AgsDM-4h (MeOH- <i>d</i> ₄)	Literatura* (CDCl ₃)
Posição		
4	6,93 (s)	6.93 (s)
8	3,88 (dd, 13,6 e 4,1)	3,86 (ddd, 13,3; 4,0 e 1,4)
8	3,62 (d, 13,4)	3,61 (ddd, 13,4; 5,3 e 1,3)
9	4,34 (m)	4,68 (m)
10	2,90 (dd, 15,9 e 9,9)	2,95 (dd, 16,7 e 10,8)
10	2,61(ddd, 16,7; 3,8 e 1,8)	2,54 (ddd, 16,8; 3,1 e 1,5)
OCH ₃	3,70 (s)	3,67 (s)
NH	-	6,26 (s)

*Patel, J. et al., 2005



longamida B (**109**)
 m/z : 351,98

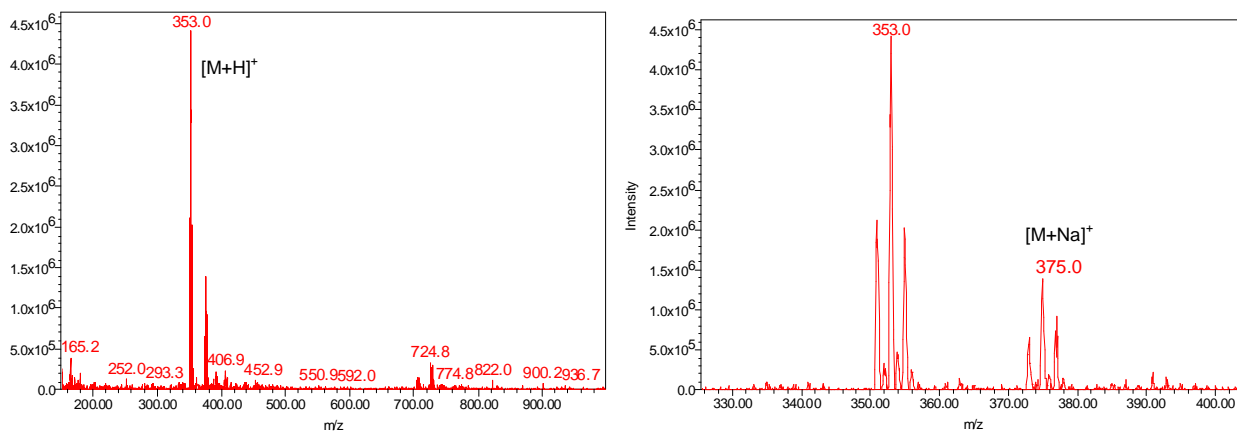
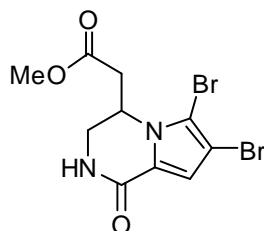


Figura 49: Espectro de massas de baixa resolução da longamida B (ESI⁺).



éster metílico da longamida B (**110**)
 m/z : 366,01

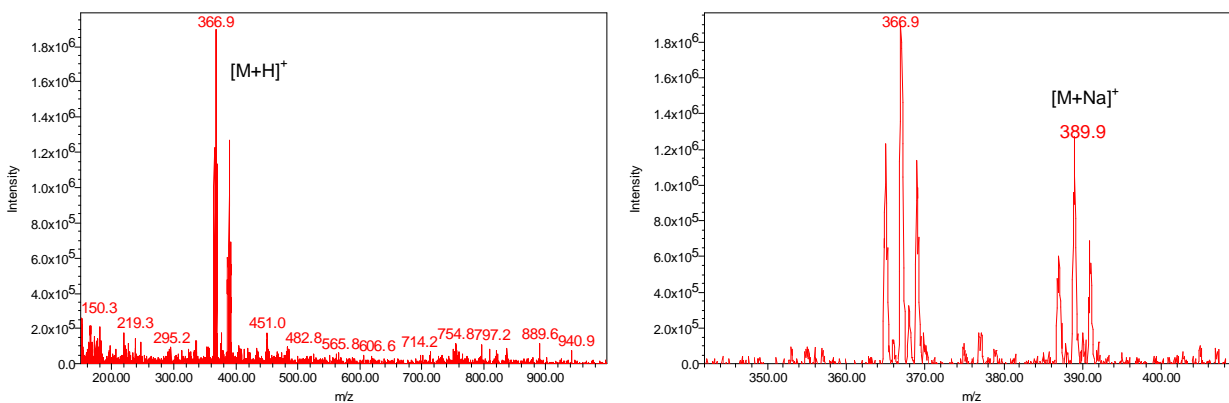


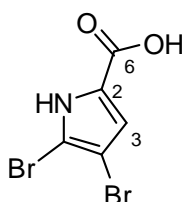
Figura 50: Espectro de massas de baixa resolução do éster metílico da longamida B (ESI⁺).

A separação da fração AgsAc-1 levou à identificação de um alcalóide conhecido, o ácido dibromopirrólico (**111**), baseando-se na comparação dos dados obtidos nas análises por LC-UV-MS, e nos valores de deslocamentos químicos de RMN-¹H e ¹³C (**Figuras 4.10 e 4.11**, anexo), com os dados da literatura. Observa-se no espectro de massas de baixa resolução obtido (**Figura 51**) três sinais com intensidade relativa 1:2:1 separados por duas unidades de massa cada um, indicando um composto com 2 átomos de bromo em sua estrutura, e com massa molecular de 268 Da, condizente com o composto proposto.

Tabela 5: Comparação dos valores de deslocamentos químicos de RMN-¹H (400 MHz) e ¹³C (100 MHz) da fração AgsAc-1f com dados da literatura.

Posição	AgsAc-1f (MeOH- <i>d</i> ₄)		Literatura* (MeOH- <i>d</i> ₄)	
	δ ¹³ C	δ ¹ H (mult, J/Hz)	δ ¹³ C	δ ¹ H (mult, J/Hz)
2	126,1		126,3	
3	118,6	6,83 (s)	118,5	6,82 (s)
4	100,5		100,4	
5	107,6		107,4	
6	162,4		162,6	

* Tasdemir, D. et al., 2007



ácido dibromopirrólico (**111**)
m/z: 268,8

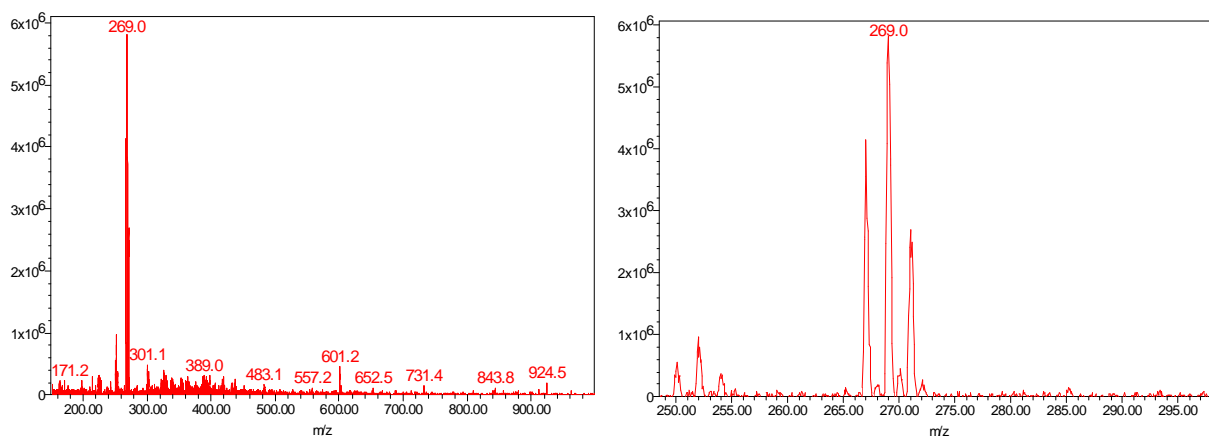


Figura 51: Espectro de massas de baixa resolução do ácido dibromopirrólico (ESI⁺).

Assim como realizado anteriormente no auxílio da identificação dos compostos **105**, **106** e **107** do extrato *n*-butanólico desta esponja, obteve-se espectros do tipo MS/MS para as frações contendo os compostos identificados como longamida B (**109**) e seu éster metílico (**110**), a fim de se obter informações que comprovassem a estrutura destes compostos. Os espectros obtidos estão a seguir.

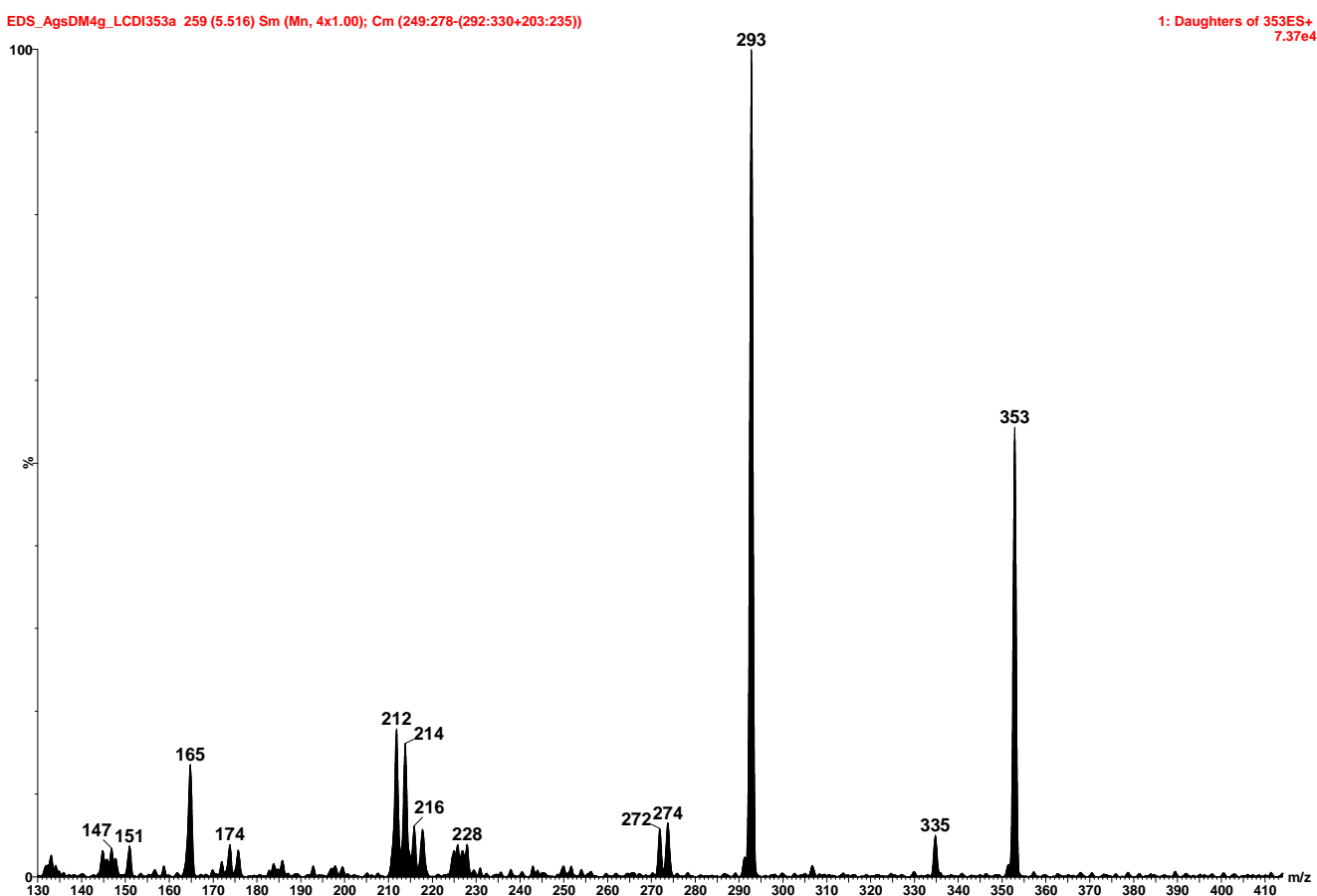
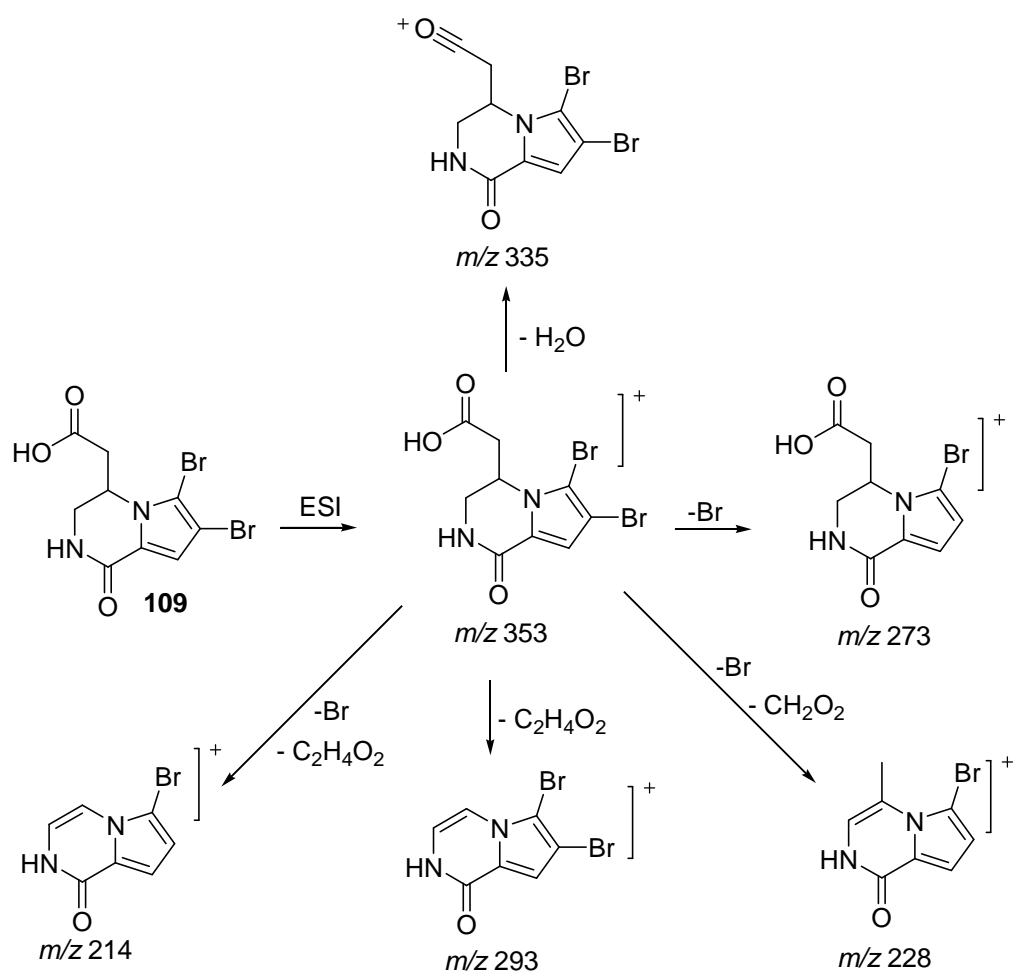


Figura 52: Espectro de massas do tipo MS/MS da longamida B.

A partir do espectro do tipo MS/MS obtido para a fração AgsDM-4g, a qual propõe-se que contenha o composto longamida B (**109**), sugerimos o esquema de fragmentação ilustrado no **Esquema 4**. A fragmentação do éster metílico da longamida B (**110**), deve seguir caminho semelhante ao da longamida B.



Esquema 4. Rota de fragmentação proposta para a longamida B, segundo análise de seu espectro de massas do tipo MS/MS.

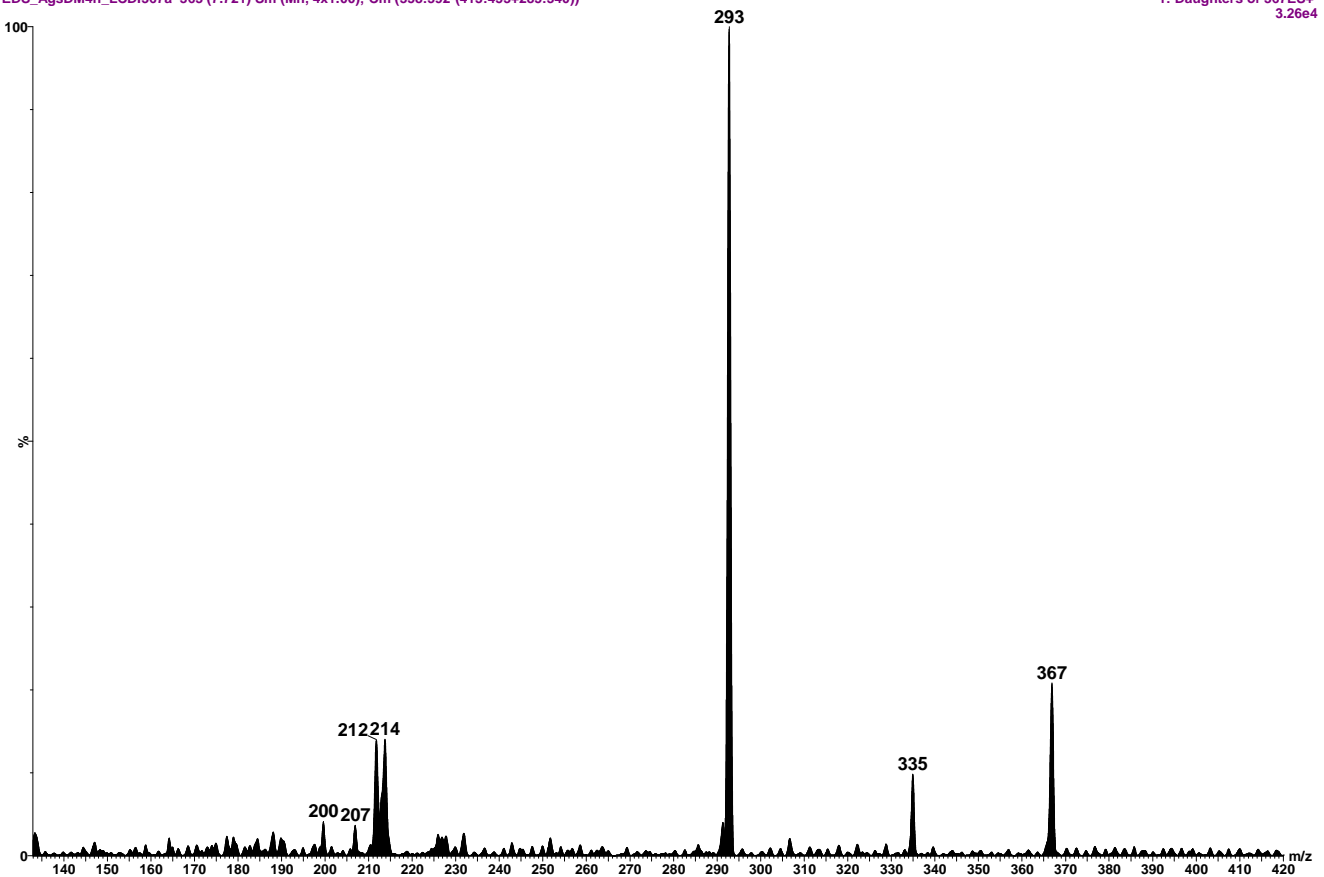


Figura 53: Espectro de massas do tipo MS/MS da longamida B metil éster.

Os resultados mostram a importância da utilização de um sistema LC-UV-MS na identificação de metabólitos secundários mesmo em frações ainda impuras, possibilitando o estabelecimento das estruturas dos compostos mesmo sem uma quantidade satisfatória de fração. A observação de diversos alcalóides bromopirrólicos nos extratos estudados da esponja *A. sventres*, confirmaram o fato de que estes compostos são marcadores taxonômicos para esponjas do gênero *Agelas*.

4.4. Atividade inibitória da oroidina

A oroidina isolada no trabalho inibiu a atividade e funções da Pdr5p (Silva et al., 2011), uma enzima responsável pela resistência multidrogas (ou MDR, multi-drug resistance) “fenotípica” em *Saccharomyces cerevisiae*. A resistência multidrogas, a qual confere resistência cruzada a vários agentes antitumorais, se mostra um dos principais

obstáculos no tratamento do câncer. Também contribui para a falha da quimioterapia contra diversas doenças como fibrose cística ou infecções fúngicas. Células tumorais que apresentam MDR super-expressam proteínas da membrana que agem como drogas energia-dependentes, como P-glicoproteína (P-gp) (ABCB1) e MRP (Gottesman et al., 2002).

Em *Saccharomyces cerevisiae*, os principais exportadores multidrogas são os transportadores Pdr5p e Snq2p. Estas proteínas apresentam limitada similaridade seqüencial e compartilham muitos substratos e inibidores com a P-gp de mamíferos. Desta forma, a proteína Pdr5p de levedura pode ser utilizada em triagens para compostos que podem ser inibidores efetivos da P-gp (Lamping et al., 2010).

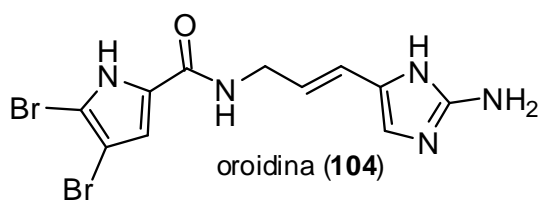


Figura 54: Estrutura da oroidina.

Diferentes compostos têm sido investigados por suas habilidades de reverter a MDR mediada por estas proteínas em pacientes de câncer, os quais incluem o verapamil, fenotiazinas, a quinidina, a progesterona, a ciclosporina A, dentre outros. No entanto, todos estes compostos apresentaram toxicidade moderada a alta (Gottesman et al., 2002). Esforços no sentido de se identificar produtos naturais como inibidores de exportadores MDR possuem o potencial de fornecer um grande número de novas drogas.

As esponjas pertencentes à ordem Agelasida são fontes bem conhecidas de alcalóides bromopirrólicos e peptídeos modificados, os quais já apresentaram as mais diversas atividades biológicas. Desta forma, investigou-se o extrato da esponja *Agelas sventres*, que apresentou atividade inibitória frente a proteína Pdr5p de levedura. O fracionamento levou ao isolamento do metabólito conhecido oroidina como único composto

ativo no ensaio. A oroidina isolada neste trabalho, inibiu a atividade ATPase com um IC_{50} de $20 \mu M$ (Silva et al., 2011).

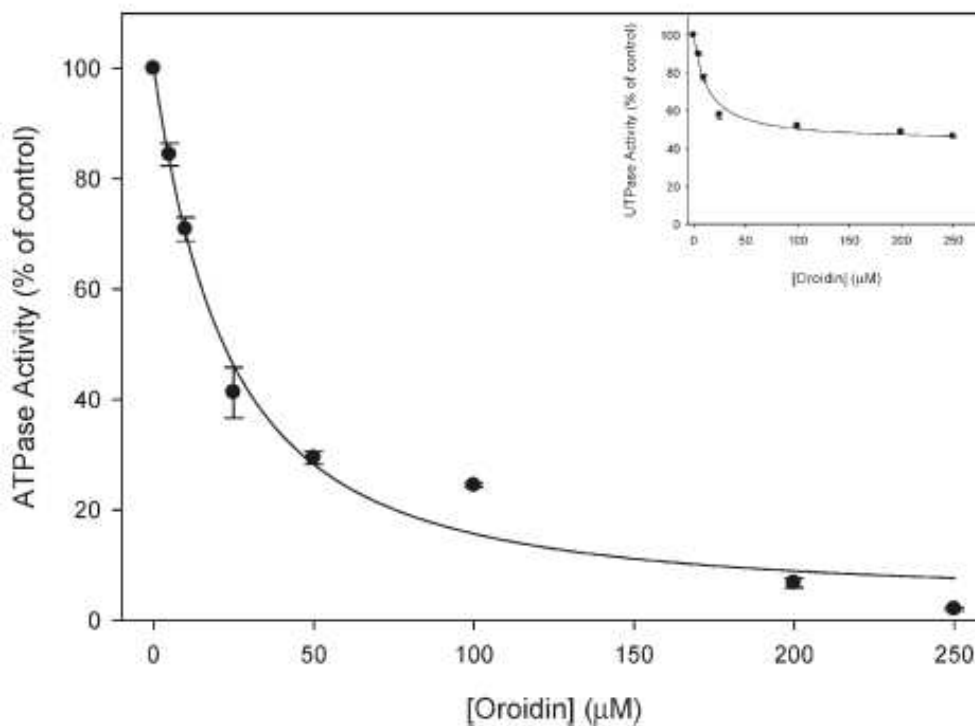


Figura 55: Inibição da atividade “oligomycin-sensitive ATPase” pela oroidina isolada da esponja *Agelas sventres* (Silva et al., 2011).

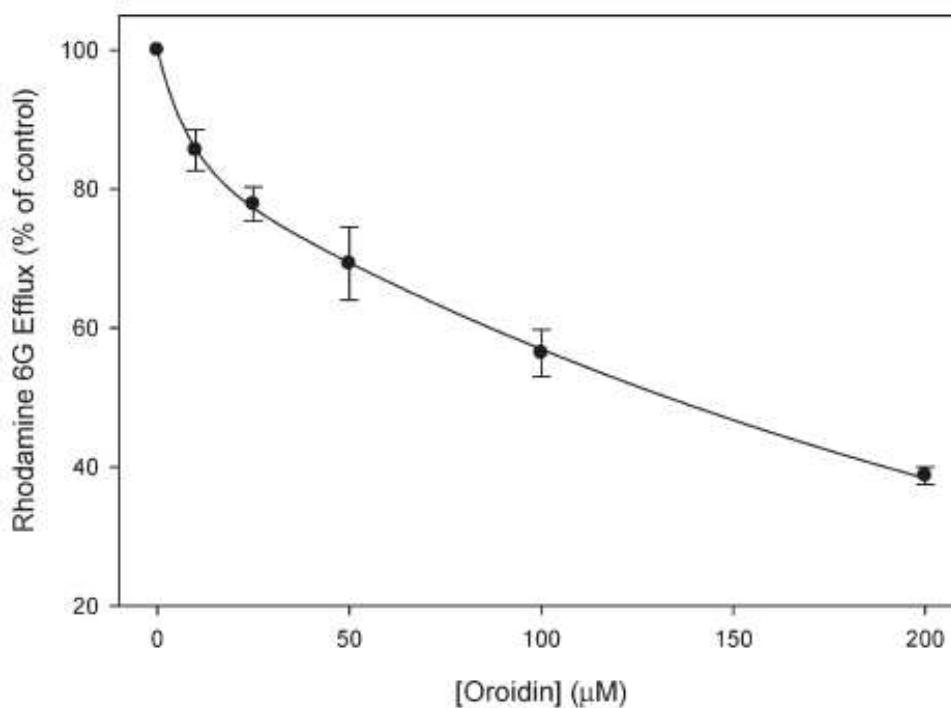


Figura 56: Inibição da oroidina do efluxo R6G na linhagem AD124567 (Silva et al., 2011).

Os resultados identificam a oroidina como um novo composto inibidor de ABC Pdr5p de membrana de levedura. Trabalhos posteriores podem ser necessários a fim de se determinar sua especificidade e sua possibilidade de ser utilizada como uma droga potencial contra problemas de saúde humanos, relacionados a resistência multi-drogas.

Capítulo 5

Estudo químico do nudibrânquio *Tambja stegosauriformis* e do briozoário *Bugula* sp.

5.1 Nudibrânquio *Tambja stegosauriformis*

5.1.1 – Introdução

Os nudibrânquios do gênero *Tambja* são conhecidos por apresentarem como metabólitos secundários compostos denominados tambjamins. Estes compostos são alcalóides bispirrólicos com diferentes terminações alifáticas e estão relacionados com a família das prodigiosinas, alcalóides bispirrólicos isolados de bactérias do gênero *Pseudoalteromonas* e *Streptomyces*. A estrutura das tambjamins é caracterizada por um anel pirrólico apresentando um segundo sistema pirrólico ligado a ele em C-2, um grupo enamina em C-5, e um grupo metóxi em C-4, sendo que na maioria destes compostos o nitrogênio da enamina é substituído com uma cadeia alquila saturada (Carbone et al., 2010). Os membros desta classe já apresentaram uma grande variedade de atividades biológicas, como antitumoral, antimicrobiana e propriedades imunossupressivas (Aldrich et al., 2010). As tambjamins parecem estar relacionadas com o mecanismo de defesa química do organismo a partir do qual estas são obtidas (Carbone et al., 2010).

Compostos estruturalmente relacionados a classe das tambjamins já foram isolados a partir de uma linhagem terrestre de *Streptomyces* (BE18591) (Kojiri et al., 1993) e da bactéria marinha *Pseudoalteromonas tunicata*, da qual foi isolado o pigmento amarelo YP1 que possui atividade antifúngica (Franks et al., 2005). Devido ao fato desses compostos já terem sido isolados de diversas classes de invertebrados marinhos, como ascídias, briozoários e nudibrânquios, além de microrganismos, discute-se se a origem das tambjamins estaria relacionada a organismos simbiotes associados a estes animais. Um estudo realizado com a bactéria marinha *Pseudoalteromonas tunicata* levou a detecção e

identificação de um “cluster” de genes relacionado com a biossíntese do composto YP1 (Burke et al., 2007).

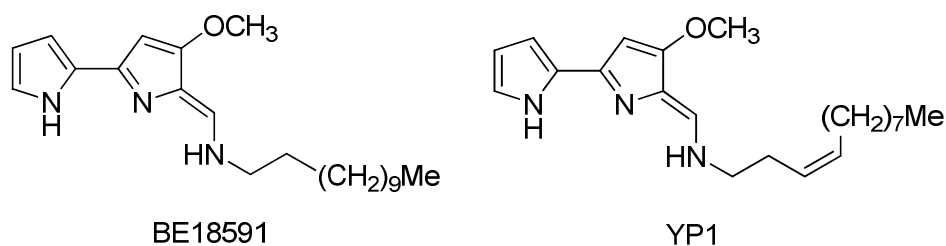


Figura 57: Estruturas dos compostos BE18591 e YP1.



Figura 58: Fotografia do nudibrânquio *Tambja stegosauriformis* (fonte: <http://www.seaslugforum.net/factsheet.cfm?base=tambsteg>)

A tambjamina K (118) (Fig. 59), isolada a partir do nudibrânquio *Tambja ceutae* dos Açores, apresentou alta citotoxicidade contra linhagens de células tumorais e não-tumorais de mamíferos, dentre elas a CaCo-2 de adenocarcinoma colo-retal humano ($IC_{50} = 0,0035 \mu M$), HeLa de câncer cervical humano ($IC_{50} = 14,6 \mu M$), C6 de glioma em ratos ($IC_{50} = 14,0 \mu M$), H9c2 de mioblasto cardíaco de ratos ($IC_{50} = 2,7 \mu M$) e 3T3-L1 de fibroblastos murínicos ($IC_{50} = 19,0 \mu M$). O mesmo composto também foi encontrado no extrato do briozoário *Bugula dentata*, que é uma presa deste nudibrânquio (Carbone et al., 2010).

A tambjamina D (113) (Fig. 59), isolada pela primeira vez de extratos dos nudibrânquios *Tambja abdere* e *T. eliora* (Carté e Faulkner, 1983), e posteriormente em um

estudo realizado em nosso grupo de pesquisa com espécimes de *T. eliora* coletados na costa brasileira, também apresentou atividades biológicas interessantes. O composto apresentou atividade citotóxica frente a linhagens de células de leucemia (CEM, IC₅₀ = 12,2 µg/mL; HL60, IC₅₀ = 13,2 µg/mL), câncer de mama (IC₅₀ = 13,2 µg/mL), câncer de cólon (IC₅₀ = 10,1 µg/mL) e melanoma (IC₅₀ = 6,7 µg/mL) (Granato, 2005). Outro trabalho apresenta a investigação de efeitos citotóxicos e genotóxicos da tambjamina D em fibroblastos pulmonares de hamster (Cavalcanti et al., 2008).

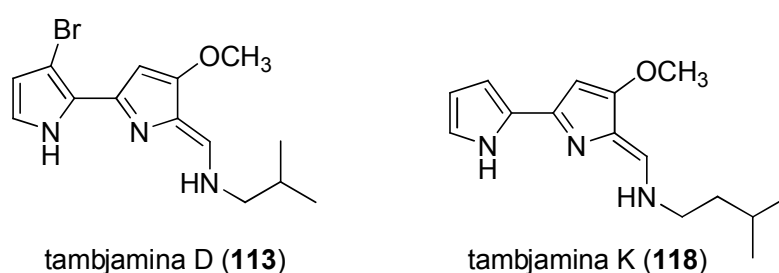


Figura 59: Estruturas das tambjamins K e D (113 e 118).

5.1.2 – Procedimento Experimental: nudibrânquio *T. stegosauriformis*

Espécimes do nudibrânquio *Tambja stegosauriformis* (3 indivíduos) foram coletados na Ilha do Papagaio, em Cabo Frio-RJ e preservados em EtOH. O processo de extração foi realizado da seguinte forma: após separação do EtOH de preservação, os animais foram transferidos para 40 mL de EtOH. Os animais em EtOH foram sonicados em banho de ultrassom por 2 minutos, deixando-se em repouso por mais 30 minutos. Removeu-se o EtOH e adicionou-se mais 40 mL do mesmo solvente, repetindo-se esta operação mais uma vez. Após a extração, todo o EtOH, de preservação e de extração, foi evaporado resultando no extrato etanólico do nudibrânquio. Os animais foram re-extraídos com MeOH (3 x 40 mL). Os extratos metanólico e etanólico foram reunidos e concentrados até um volume de 300 mL. A suspensão alcoólica assim obtida foi particionada com hexano. Após evaporação da fração polar e da fração apolar obteve-se os extratos brutos metanólico (Tsme, 254,0 mg) e hexânico (Tshx, 143,0 mg), os quais foram analisados por LC-UV-MS. As condições cromatográficas e parâmetros de análise por LC-UV-MS foram os seguintes:

- gradiente de MeOH em H₂O contendo 0,1% de ácido fórmico, com fluxo de 1,0 mL/min, em uma coluna de sílica-gel derivatizada com grupos C₁₈ (coluna Inertsil ODS-SP, 5 μm, 4,6 x 250 mm, GL Sciences Inc.); espectros de UV-vis obtido para a região entre 200-600 nm no detector de arranjo de fotodiodos (PDA); espectros de massas de baixa resolução obtido em modo de ionização por eletrospray positivo utilizando-se a voltagem do cone em 25V, observando-se íons de massa entre *m/z* 180-700.

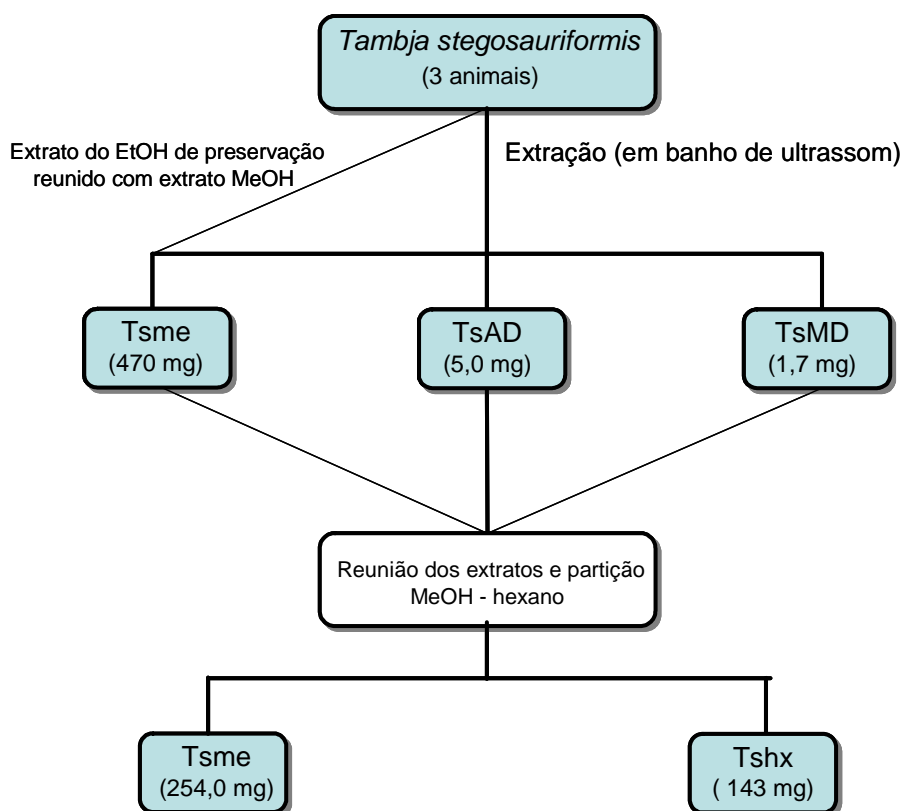


Figura 60: Processo de extração do nudibrânquio *Tambja stegosauriformis* (extrato metanólico = Tsme; extrato hexânico = Tshx).

O extrato metanólico de *T. stegosauriformis* (254,0 mg) foi separado por HPLC em fase reversa, com uma coluna semi-preparativa de sílica-gel derivatizada com grupos C₁₈ e uma mistura de MeOH e H₂O 67:33 como eluente. Esta separação forneceu nove frações, Tsme-1 (102,9 mg), -2 (14,6 mg), -3 (1,5 mg), -4 (1,6 mg), -5 (1,2 mg), -6 (0,8 mg), -7 (2,3 mg), -8 (1,5 mg) e -lav (12,4 mg). A análise dos resultados obtidos no sistema LC-UV-MS indicou a presença das tambjamins C (112), D (113) e K (118), além dos aldeídos formados pela hidrólise das tambjamins A (114) e B (115) (Fig. 62), o 4'-metóxi-2,2'-

bipirrol-5-carboxaldeído (**116**) e 3'-bromo-4-metóxi-2,2'-bipirrol-5-carboxaldeído (**117**), respectivamente, nas frações obtidas.

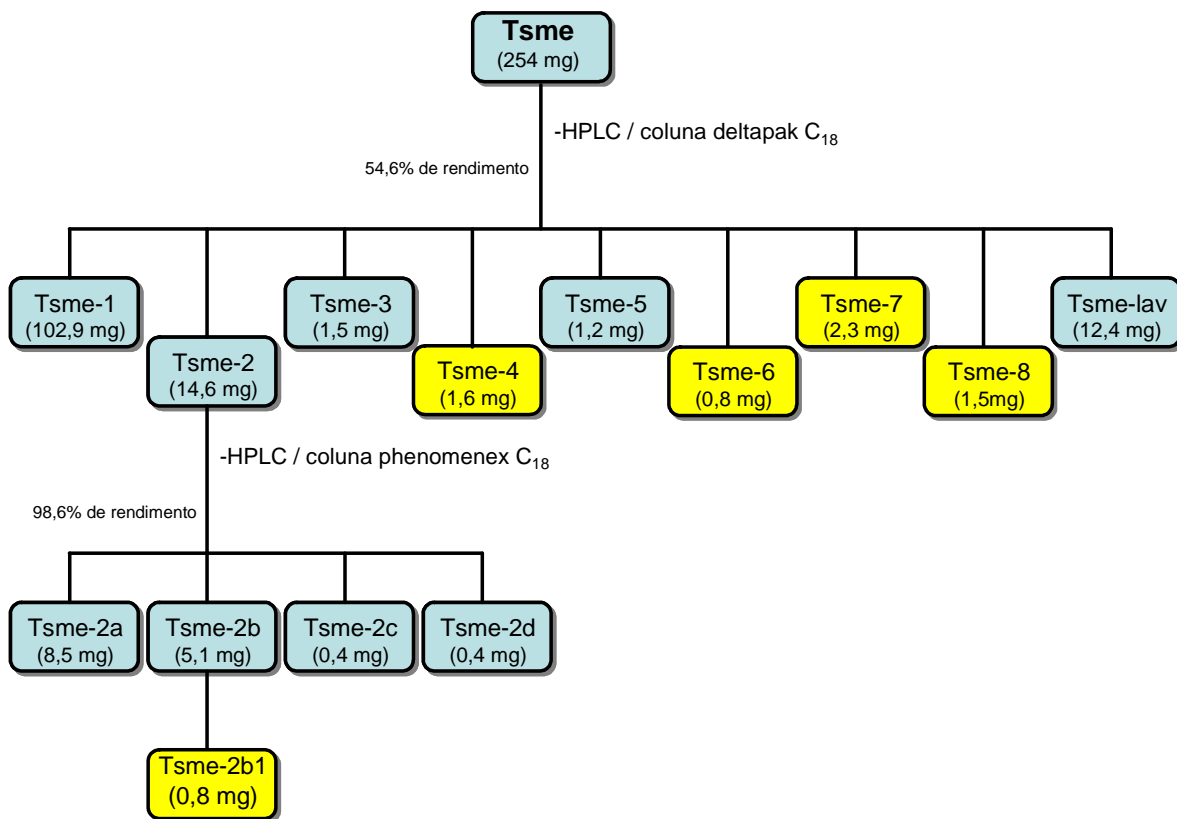


Figura 61: Fracionamento do extrato metanólico do nudibrânquio *Tambja stegosauriformis*

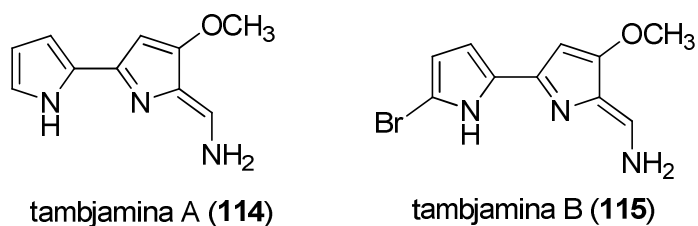


Figura 62: Estruturas das tambjamins A e B (**114** e **115**).

5.1.3 – Resultados: Compostos identificados no extrato metanólico do nudibrânquio *Tambja stegosauriformis*

A identificação dos compostos **112**, **113**, **116-118** foi realizada por comparação dos dados obtidos nas análises por LC-UV-MS com informações dos bancos de dados MarinLit

e Scifinder, e também de seus espectros de RMN-¹H com dados da literatura. A pesquisa nos bancos de dados MarinLit e SciFinder foi feita realizando-se uma busca por compostos isolados de animais do gênero *Tambja*, obtendo-se dados de absorções no UV e dados de massa molecular. As tambjamins possuem espectros no ultravioleta característicos, sempre apresentando uma banda intensa entre 390 e 410 nm (Carté e Faulkner, 1983), provavelmente devido à presença do sistema bispirrol. Estes compostos geralmente possuem uma intensa coloração esverdeada.

Estes dados foram comparados com os dados obtidos por LC-UV-MS das frações isoladas a partir de *T. stegosauriformis*. Os espectros no ultravioleta e de massas de baixa resolução (ESI⁺) e os resultados obtidos das análises por RMN-¹H das frações do extrato metanólico do nudibrânquio, estão a seguir (**Figuras 63, 65, 66, 68 e 69, e Tabelas 6-9**).

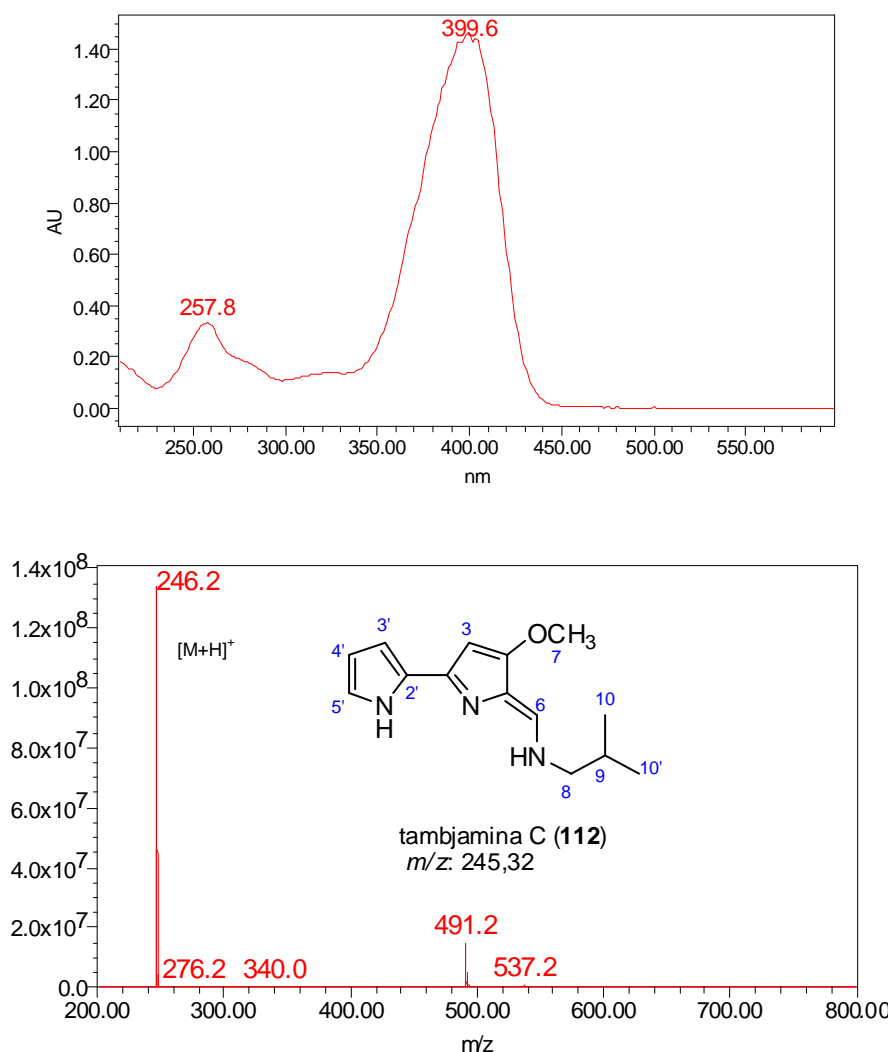


Figura 63: Espectros de UV-vis e massas (ESI⁺) da fração Tsme-4.

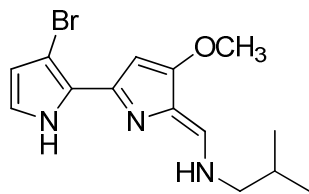
Tabela 6: Comparação dos valores de deslocamentos químicos de ^1H (400 MHz) da fração Tsme-4 (**Figura 5.1**, anexo) com dados da literatura.

	Tsme-4 (CDCl₃)	Literatura* (CDCl₃)
Posição	δ ^1H (mult., J/Hz)	δ ^1H (mult., J/Hz)
3	5,98 (m)	5,95 (s)
6	7,27 (d, 19,4)	7,28 (s)
7	3,93 (s)	3,90 (s)
8	3,28 (t, 6,4)	3,24 (d, 6,6)
9	1,99 (m)	1,98 (m)
10 e 10'	1,00 (d, 6,7)	0,99 (d, 6,6)
3'	6,75 (m)	6,70 (m)
4'	6,28 (m)	6,24 (m)
5'	7,09 (m)	7,04 (m)

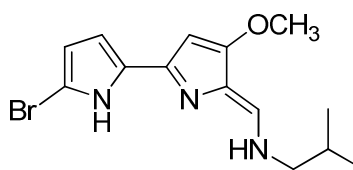
* Pinkerton, D.M. et al., 2007

Observou-se na fração Tsme-7 a presença de um composto exibindo no seu espectro de massas um claro padrão isotópico que indica a presença de um átomo de bromo, devido a presença de dois íons $[\text{M}+\text{H}]^+$ em m/z 324 e 326 de aproximadamente a mesma intensidade. Os dados observados nas análises por LC-UV-MS poderiam indicar a presença ou da tambjamina D (**113**) como da tambjamina I (**119**), uma vez que estes compostos são isômeros.

Porém a análise dos dados de RMN- ^1H obtidos para esta fração (**Figura 5.2**, anexo), apontou que se tratava da tambjamina D. A principal diferença entre os espectros de RMN- ^1H das tambjamins D e I estão nos deslocamentos químicos dos hidrogênios ligados aos carbonos dos anéis pirrólicos. Observou-se no espectro de RMN- ^1H do composto analisado sinais em δ 7,02; 6,71 e 6,34, concordando com dados da literatura que mostram estes sinais em δ 7,00; 6,64 e 6,33 para a tambjamina D (Carté e Faulkner, 1983), enquanto que para a tambjamina I os hidrogênios pirrólicos aparecem em δ 6,55; 6,15 e 5,86 (Pinkerton et al., 2007).



tambjamina D (113)



tambjamina I (119)

Figura 64: Estruturas das tambjaminsas D e I (113 e 119).

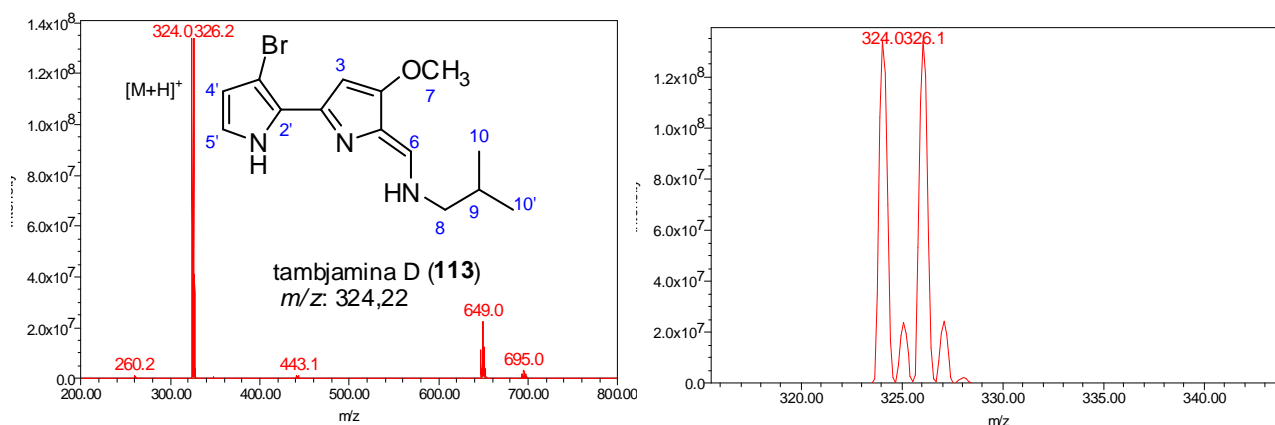
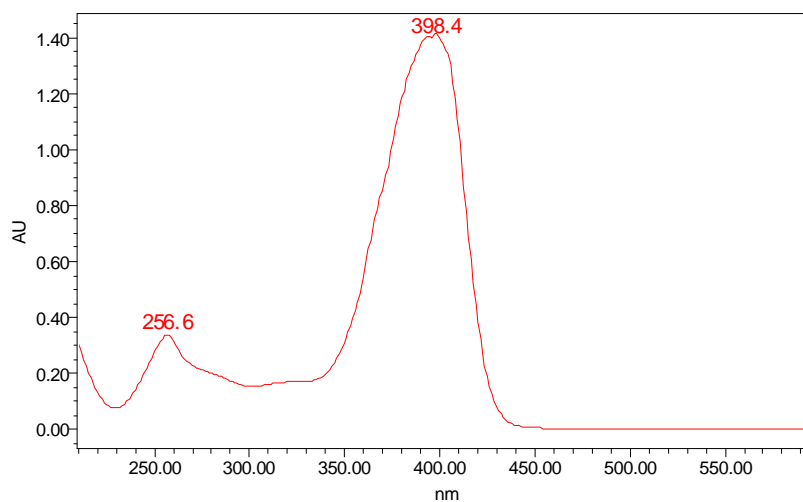


Figura 65: Espectros de UV-vis e massas (ESI⁺) da fração Tsme-7.

Tabela 7: Comparação dos valores de deslocamentos químicos de ^1H (400 MHz) da fração Tsme-7 com dados da literatura.

	Tsme-7 (CDCl_3)	Literatura* (CDCl_3)
Posição	δ ^1H (mult., J/Hz)	δ ^1H (mult., J/Hz)
3	6,71 (d, 2,3)	6,64 (s)
6	7,40 (d, 15,0)	7,39 (d, 14,0)
7	3,97 (s)	3,97 (s)
8	3,30 (m)	3,32 (m)
9	2,01 (m)	2,05 (m)
10 e 10'	1,01 (d, 6,7)	1,04 (d, 6,6)
4'	6,34 (m)	6,33 (m)
5'	7,02 (m)	7,00 (m)

* Carté, B., 1983

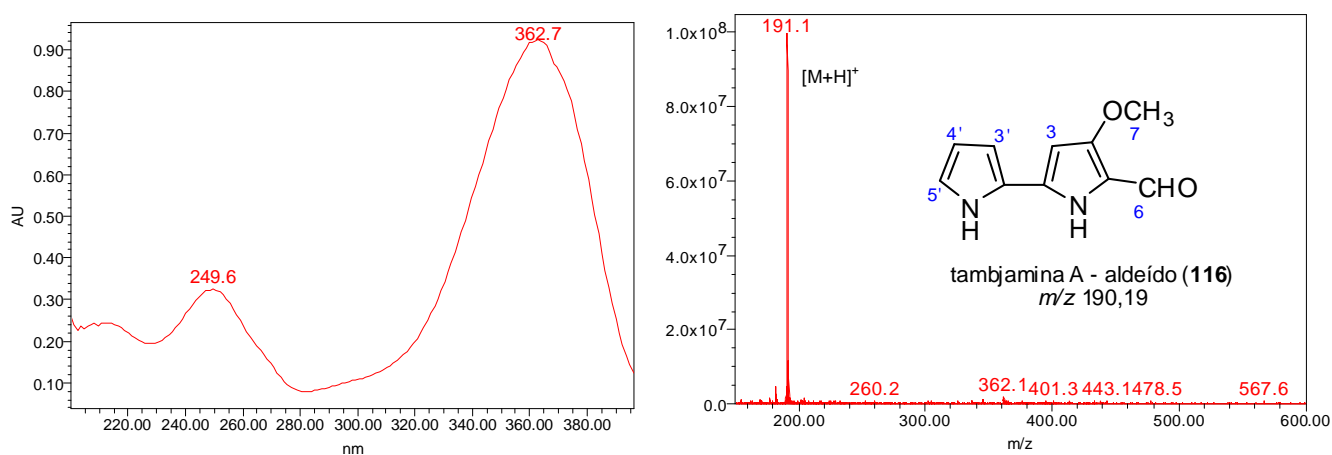


Figura 66: Espectros no ultravioleta e de massas (ESI^+) da fração Tsme-2b1.

Tabela 8: Comparação dos valores de deslocamentos químicos de ^1H (600 MHz) da fração Tsme-2b1 (**Figura 5.3**, anexo) com dados da literatura.

	Tsme-2b1 (DMSO- d_6)	Literatura* (DMSO- d_6)
Posição	δ ^1H (mult., J/Hz)	δ ^1H (mult., J/Hz)
3	6,26 (d, 2,7)	6,28 (s)
6	9,28 (s)	9,30 (s)
7	3,82 (s)	3,85 (s)
3'	6,74 (m)	6,76 (s)
4'	6,10 (dd, 2,5 e 5,8)	6,13 (t, 3,0)
5'	6,89 (d, 1,4)	6,92 (s)
NH	11,23 (s)	11,20 (s)
NH	11,40 (s)	11,50 (s)

* Pinkerton, D.M. et al., 2007

Na fração Tsme-8 foi identificado o composto 3'-bromo-4-metóxi-2,2'-bipirrol-5-carboxaldeído (**117**) (**Fig. 67**), que é um dos compostos formados a partir da hidrólise da tambjamina B, sendo o outro o 5'-bromo-4-metóxi-2,2'-bipirrol-5-carboxaldeído (**120**) (**Fig. 67**), apresentando como diferença o átomo de bromo na posição 5' no anel pirrólico. Diferencia-se os dois compostos observando-se os deslocamentos químicos dos hidrogênios pirrólicos, assim como foi explicado na diferenciação das tambjaminsas D e I citado anteriormente.

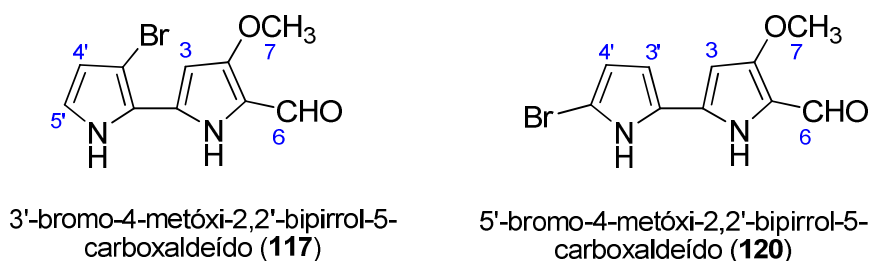


Figura 67: Estruturas dos compostos **117** e **120**.

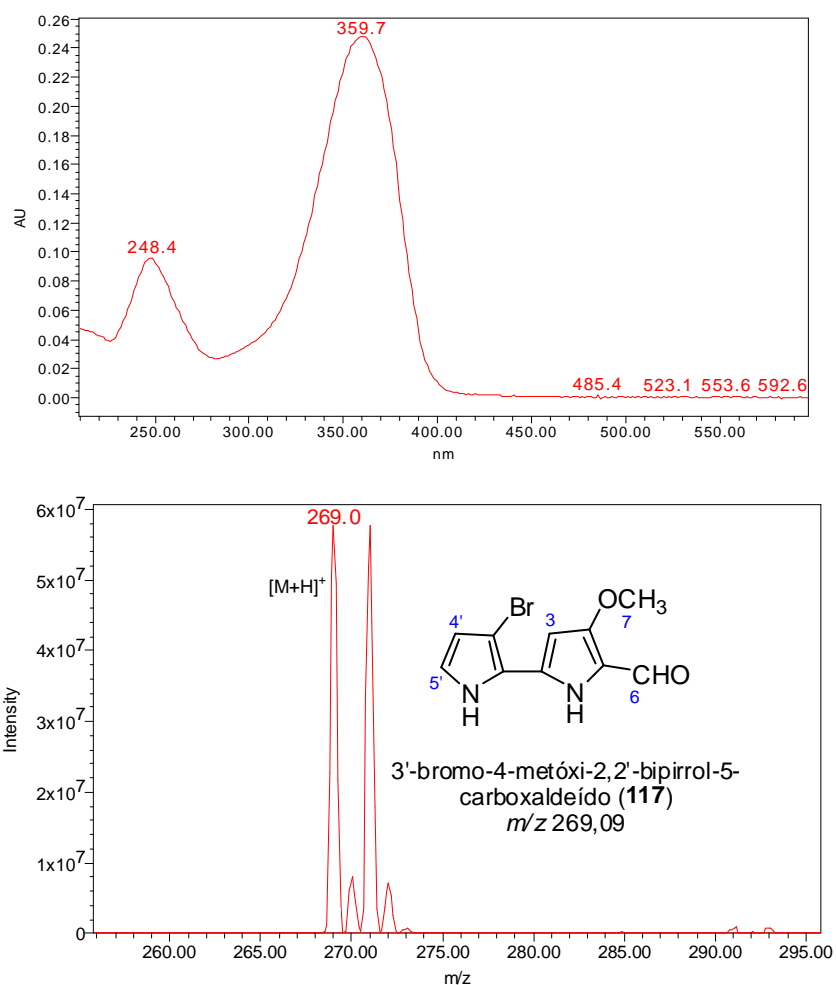


Figura 68: Espectros no ultravioleta e de massas (ESI⁺) da fração Tsme-8.

Tabela 9: Comparação dos valores de deslocamentos químicos de ¹H (400 MHz) da fração Tsme-8 (**Figura 5.8**, anexo) com dados da literatura.

	Tsme-8 (DMSO-<i>d</i>₆)	Literatura* (CDCl₃)
Posição	δ ¹ H (mult., J/Hz)	δ ¹ H (mult., J/Hz)
3	6,53 (d, 2,3)	6,74 (d, 2,6)
6	9,39 (s)	9,24 (s)
7	3,87 (s)	3,97 (s)
4'	6,28 (t, 2,7)	6,33 (t, 2,7)
5'	7,01 (t, 2,7)	6,89 (t, 2,7)
NH	11,28 (s)	11,70 (s)
NH	11,50 (s)	12,00 (s)

* Carté, B., 1983

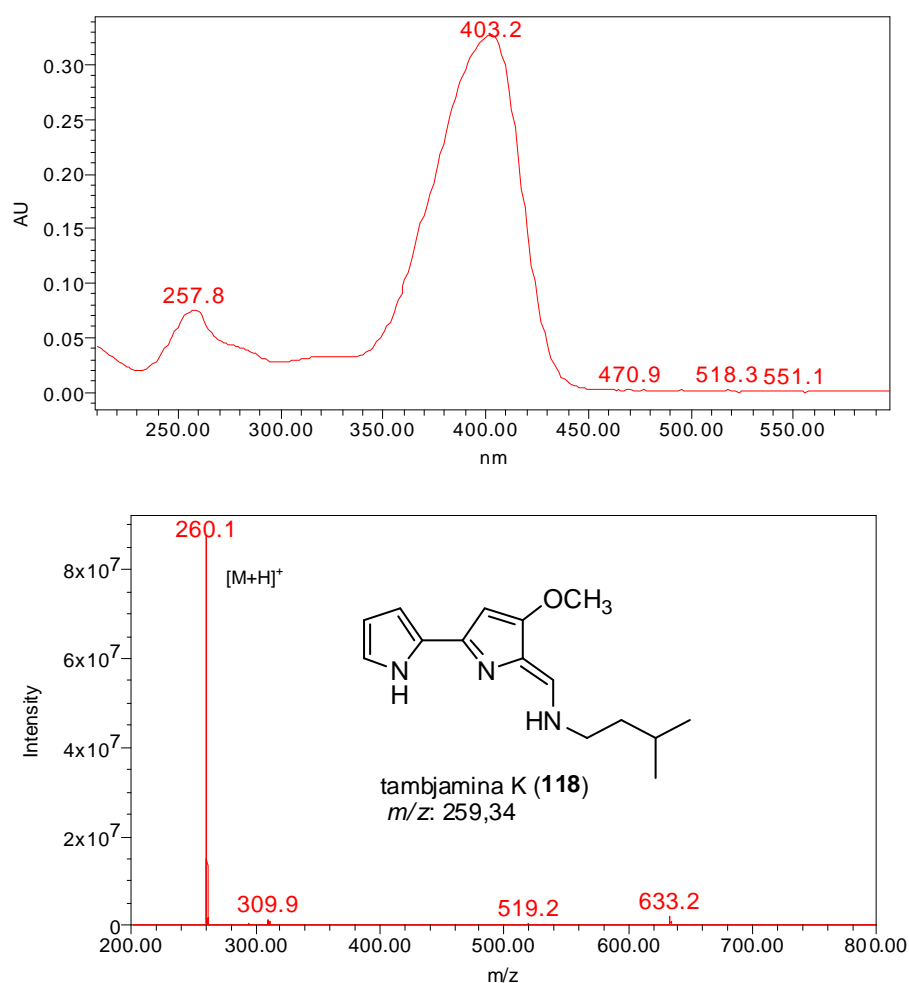


Figura 69: Espectros no ultravioleta e de massas (ESI⁺) da fração Tsme-6.

Considerando-se a pouca massa das frações obtidas, em decorrência de um limitado número de espécimes (apenas três) disponíveis para a extração, não foi possível isolar as substâncias puras em quantidades suficientes para realizar sua análise completa por RMN mono e bidimensional. Todavia, a análise dos espectros de massas do tipo MS/MS obtidos das frações isoladas de *T. stegosauriformis* indicaram que as estruturas analisadas seguem um padrão de fragmentação condizente com as características estruturais das tambjamins.

A seguir ilustramos uma possível rota de fragmentação para o composto identificado como a tambjamina C (**Esquema 5**), utilizando-se dados de fragmentação do íon precursor m/z 246, obtidos da fração contendo este composto. A fragmentação se inicia pela cadeia *N*-alquila ligada a um dos anéis pirrólicos da molécula, posteriormente chegando ao grupo

metóxi ligado ao mesmo anel pirrólico da cadeia *N*-alquila. Este padrão de fragmentação também foi observado nos espectros de íons produtos obtidos dos íons precursores relativos às tambjamins D e K identificadas neste trabalho, como pode ser observado nas **Figuras 70-74** a seguir. No entanto, poucas informações a respeito das fragmentações foram obtidas para os compostos **116** e **117** (aldeídos das tambjamins A e B respectivamente).

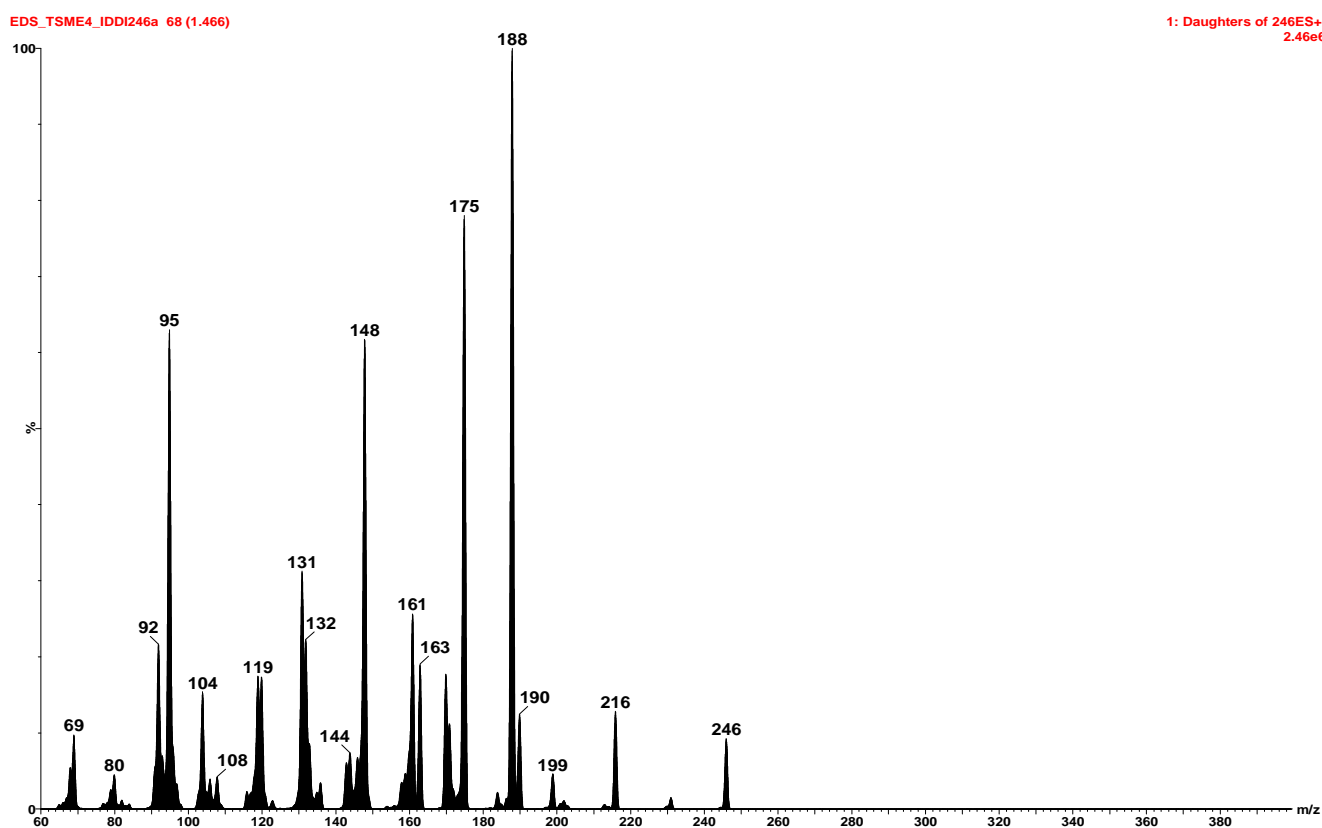
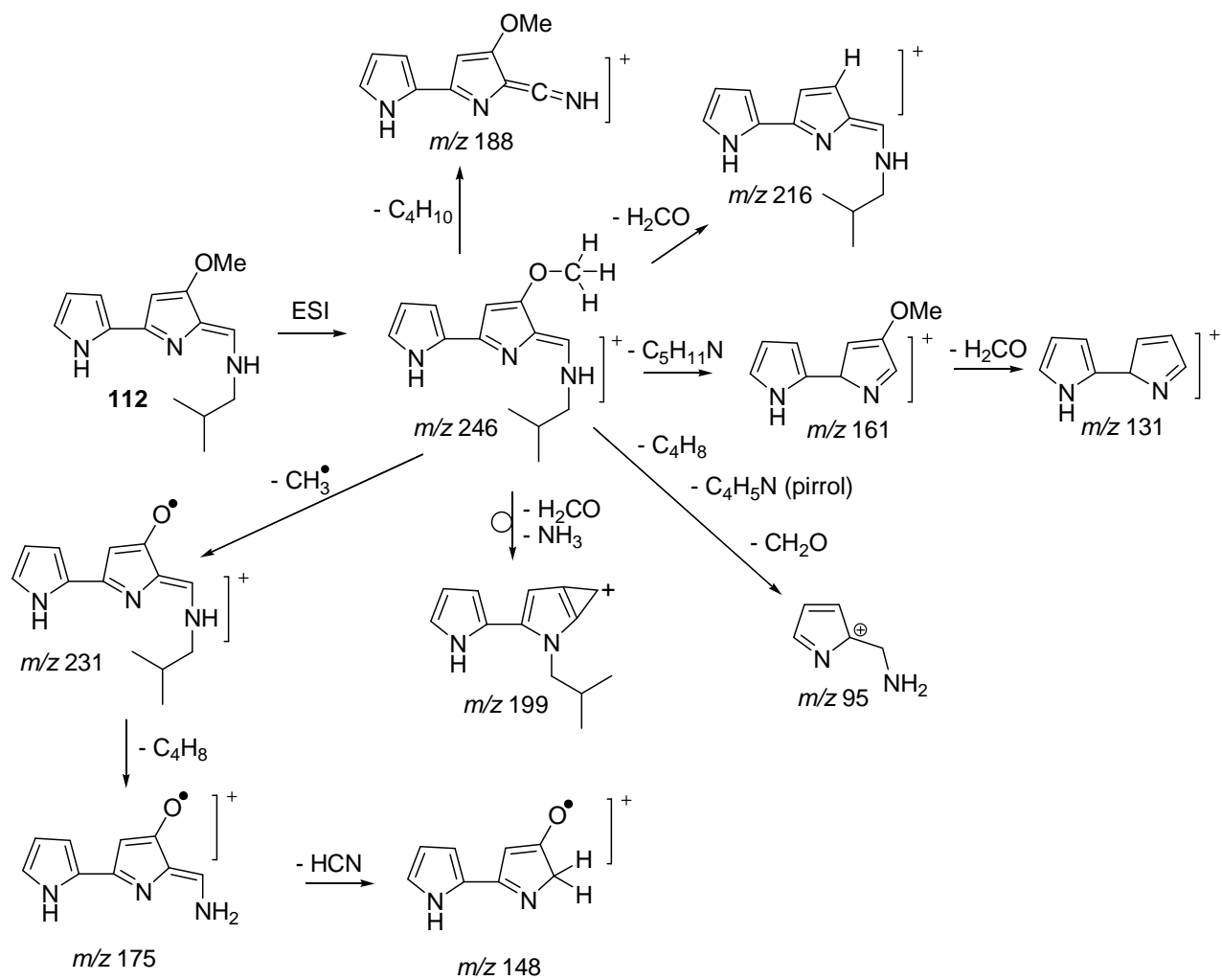


Figura 70: Espectro de massas do tipo MS/MS da tambjamina C.



Esquema 5. Rota de fragmentação proposta para a tambjamina C, segundo análise de seu espectro de massas do tipo MS/MS.

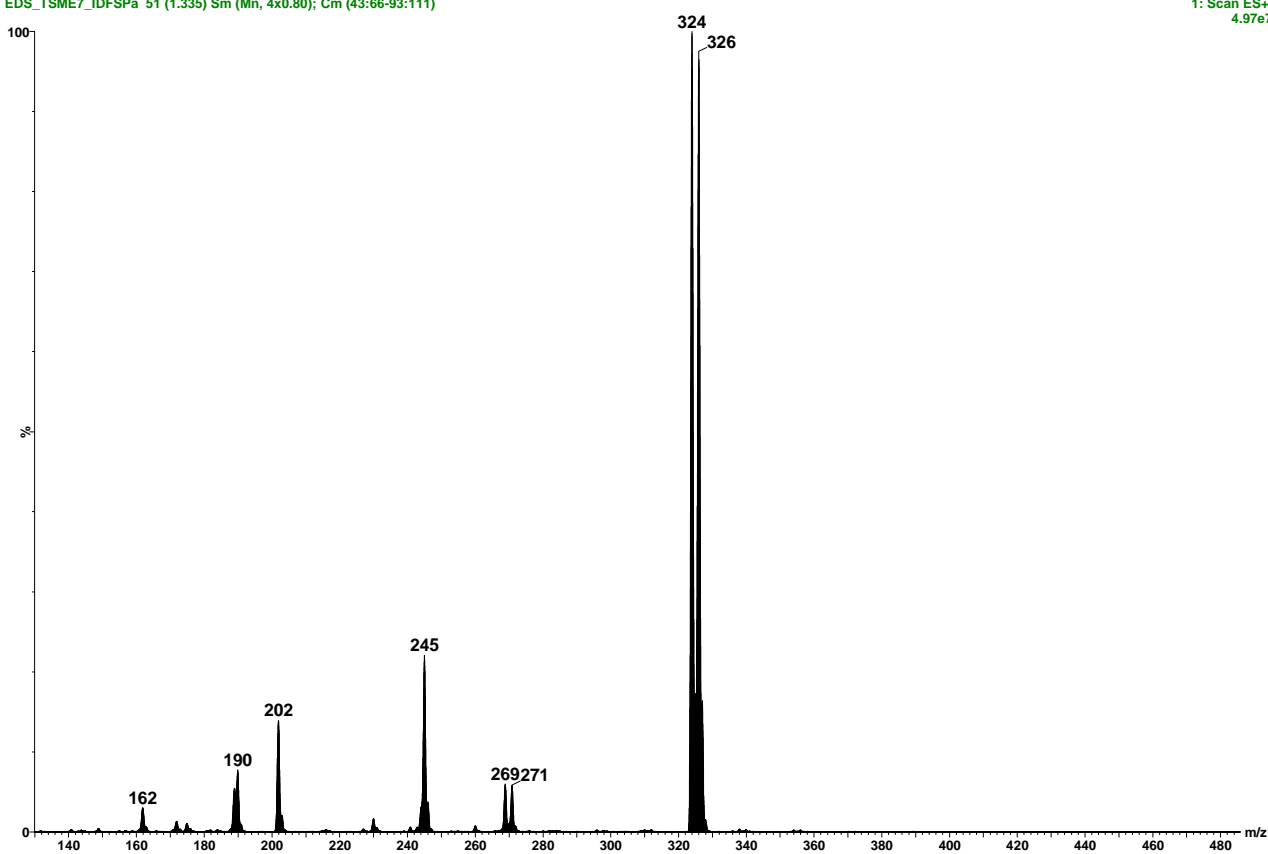
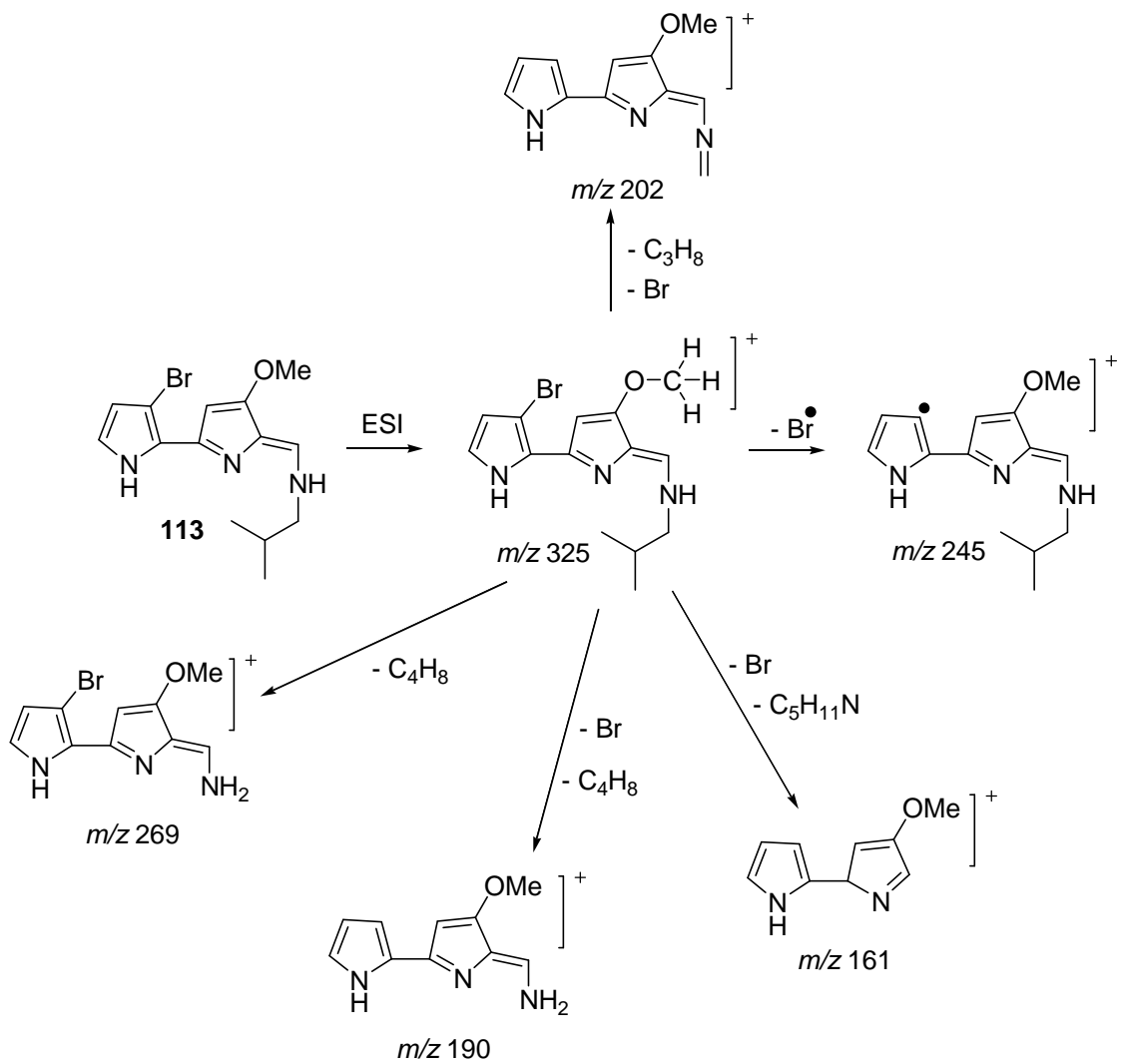


Figura 71: Espectro de massas do tipo MS/MS da tambjamina D.



Esquema 6. Rota de fragmentação proposta para a tambjamina D, segundo análise de seu espectro de massas do tipo MS/MS.

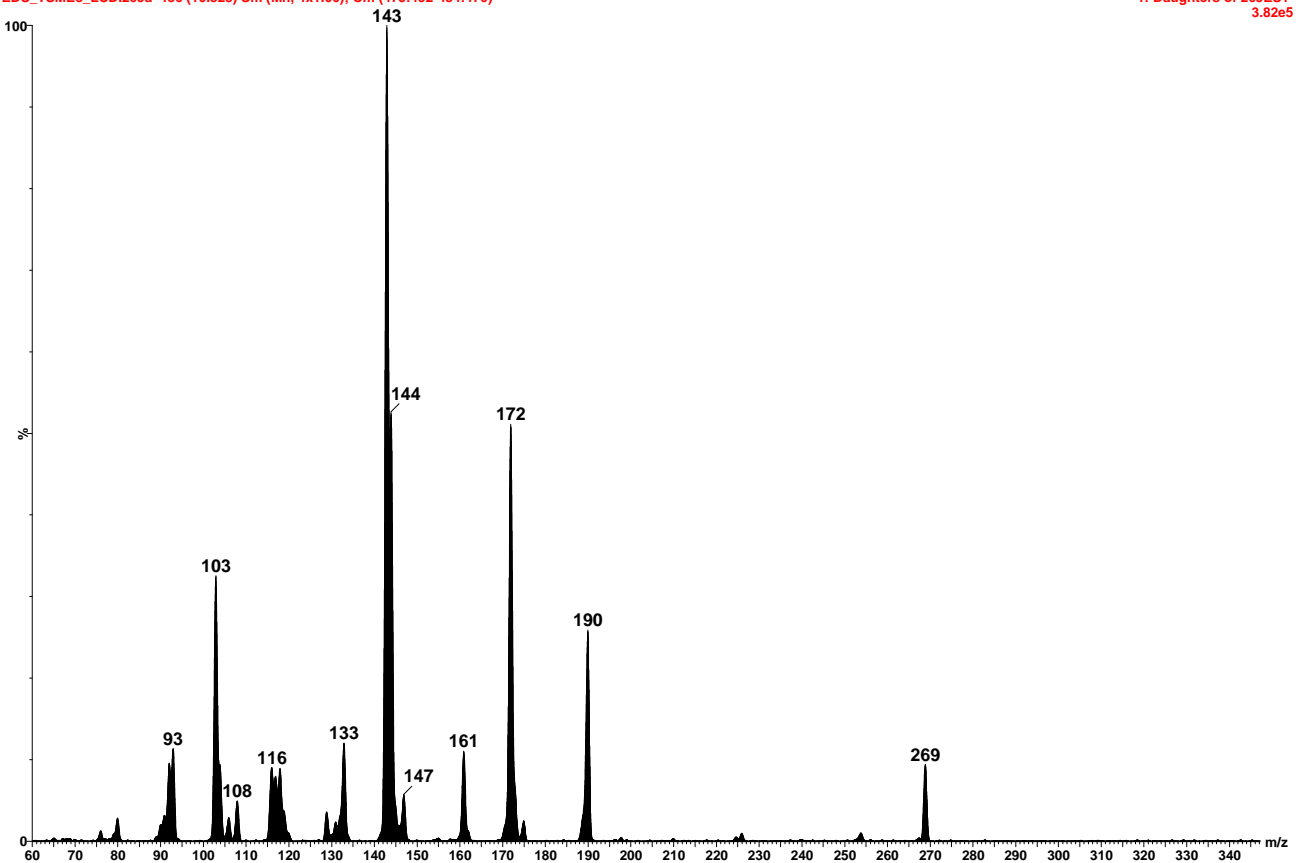
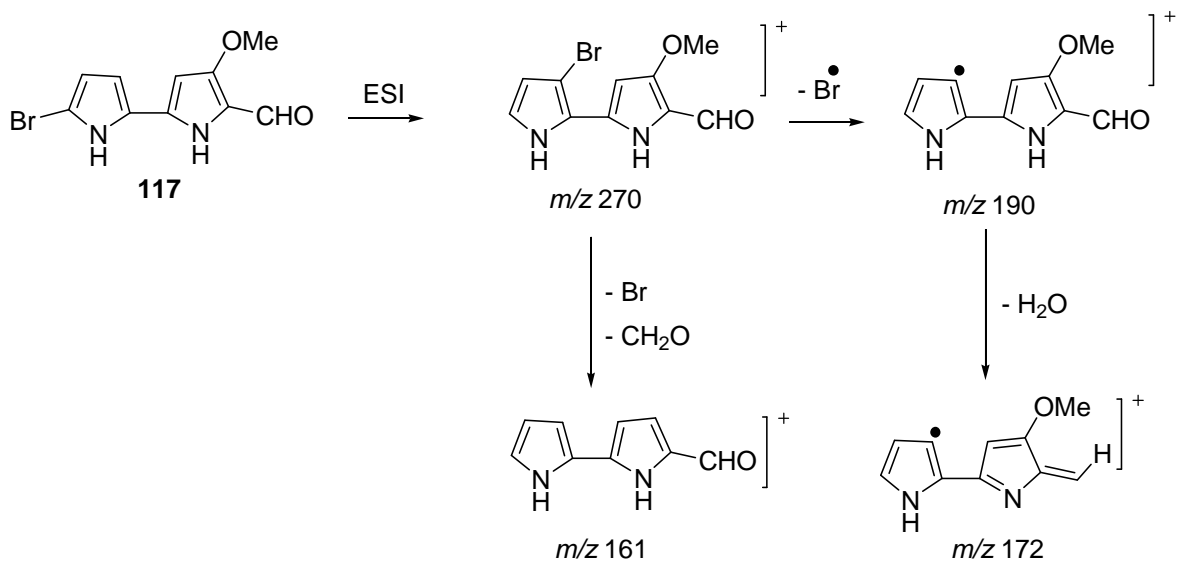


Figura 72: Espectro de massas do tipo MS/MS do aldeído da tambjamina B.



Esquema 7. Rota de fragmentação proposta para o aldeído da tambjamina B, segundo análise de seu espectro de massas do tipo MS/MS.

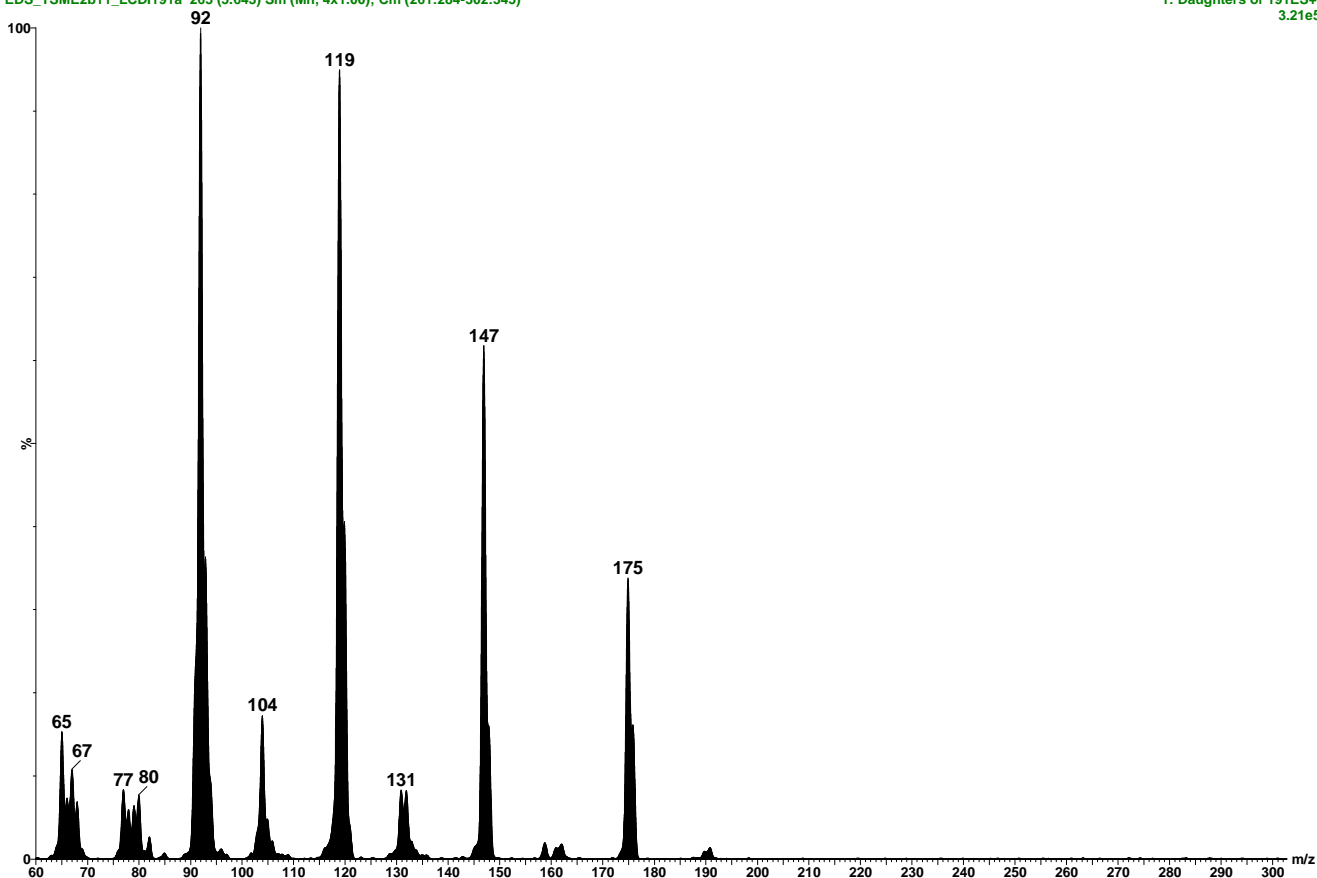
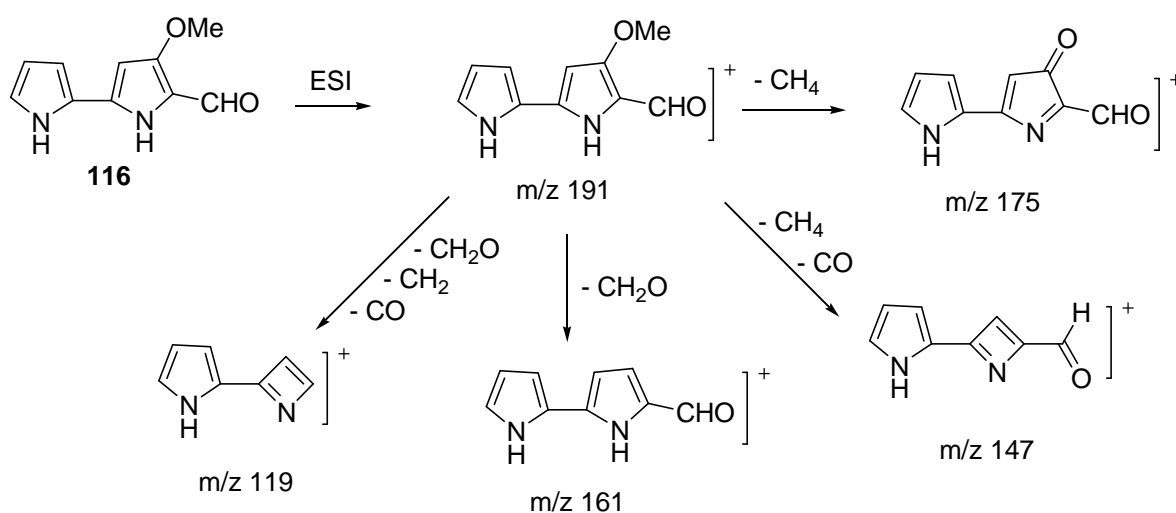


Figura 73: Espectro de massas do tipo MS/MS do aldeído da tambjamina A.



Esquema 8. Rota de fragmentação proposta para o aldeído da tambjamina A, segundo análise de seu espectro de massas do tipo MS/MS.

Met Aminas

EDS_TSME6_LCDI260b 292 (6.210) Sm (Mn, 4x0.80); Cm (257:364-(47:114+565:624))

1: Daughters of 260ES+
7.04e4

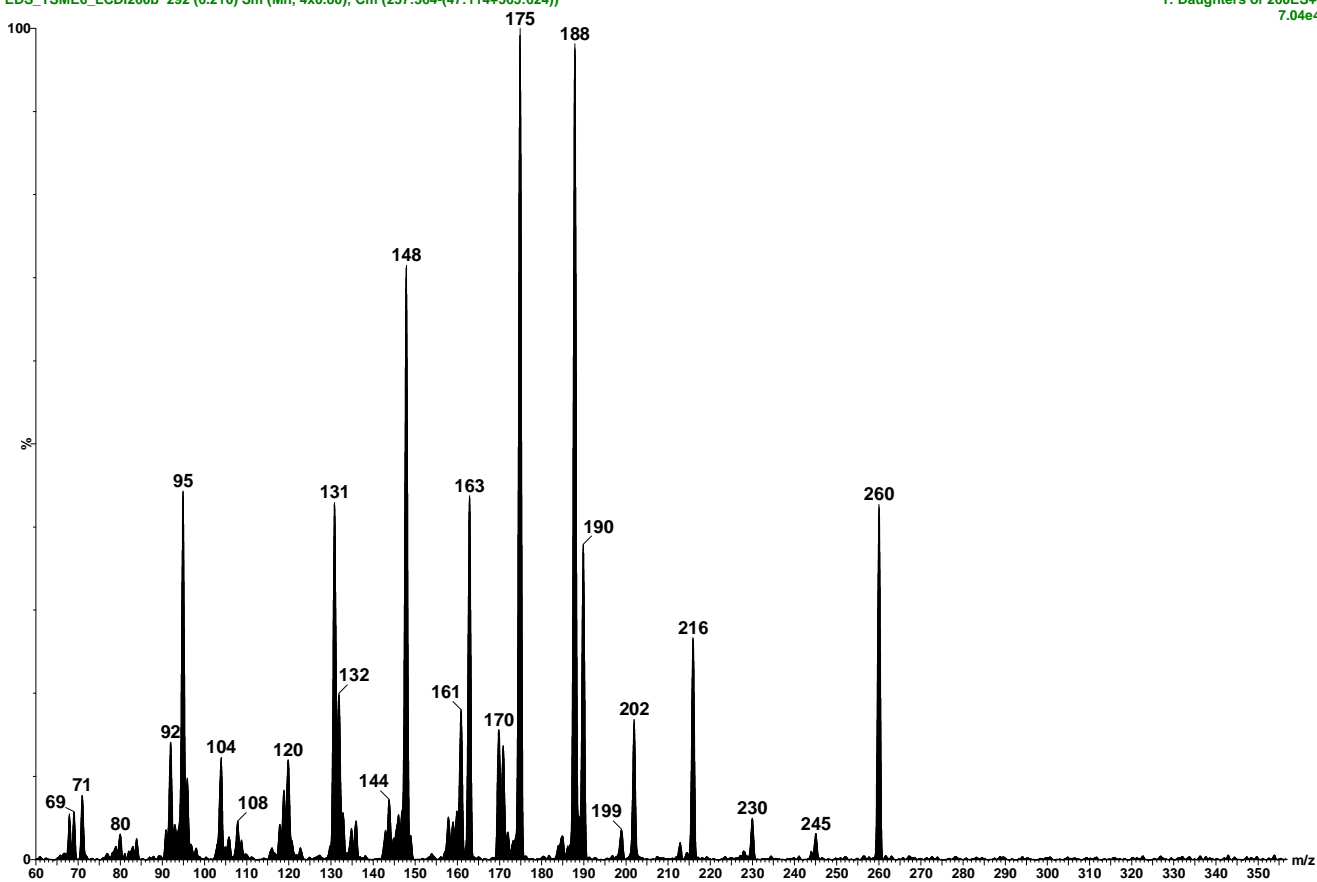
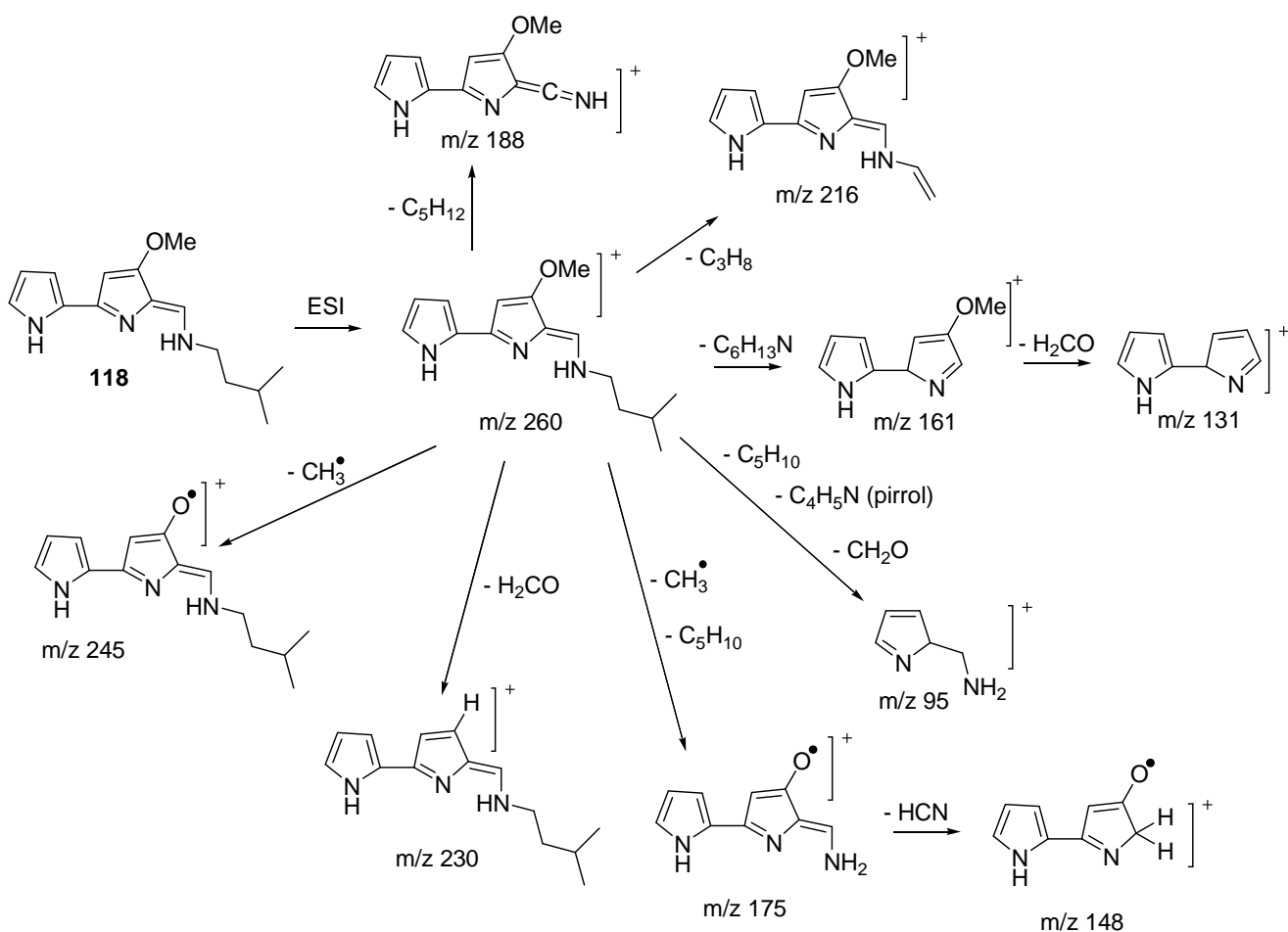


Figura 74: Espectro de massas do tipo MS/MS da tambjamina K.



Esquema 9. Rota de fragmentação proposta para a tambjamina K, segundo análise de seu espectro de massas do tipo MS/MS.

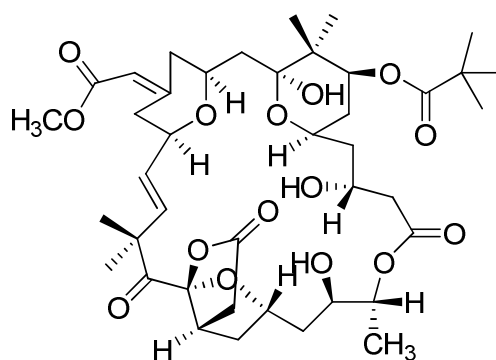
Um trabalho realizado em nosso grupo de pesquisa apresentou a investigação química do nudibrânquio *Tambja eliora*, coletado em São Sebastião – SP (Granato et al., 2005). Neste estudo foram isoladas as tambjamins A e D. Apenas este último alcalóide foi também encontrado no extrato do *T. stegosauriformis* investigado no presente trabalho. Este é o primeiro estudo químico realizado com *Tambja stegosauriformis*, espécie nova recentemente descrita na literatura (Pola, M., 2005).

5.2 Briozoário *Bugula* sp.

5.2.1 – Introdução

Os briozoários do gênero *Bugula*, dentro do filo Bryozoa, são considerados dos mais importantes devido ao potencial farmacológico. O *Bugula neritina*, por exemplo, é um briozoário queilostomado, de crescimento ereto e cosmopolita, e suas colônias são tipicamente encontradas em regiões de portos e baías, fixados normalmente em substratos firmes ou com material orgânico (<http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?si=1080&fr=1&sts>).

O briozoário marinho *Bugula neritina* é considerado um dos organismos mais promissores, desde a descoberta de seu potencial farmacológico em 1968 com o isolamento da briostatina. Hoje são conhecidos mais de 20 compostos desta série de lactonas macrocíclicas com potente atividade antitumoral, além das neristatinas (**121**) e que também apresentam esta atividade, porém mais fraca que as briostatinas (Tang et al., 2010).



neristatina 1 (**121**)

Figura 75: Estrutura da neristatina 1 (**121**).

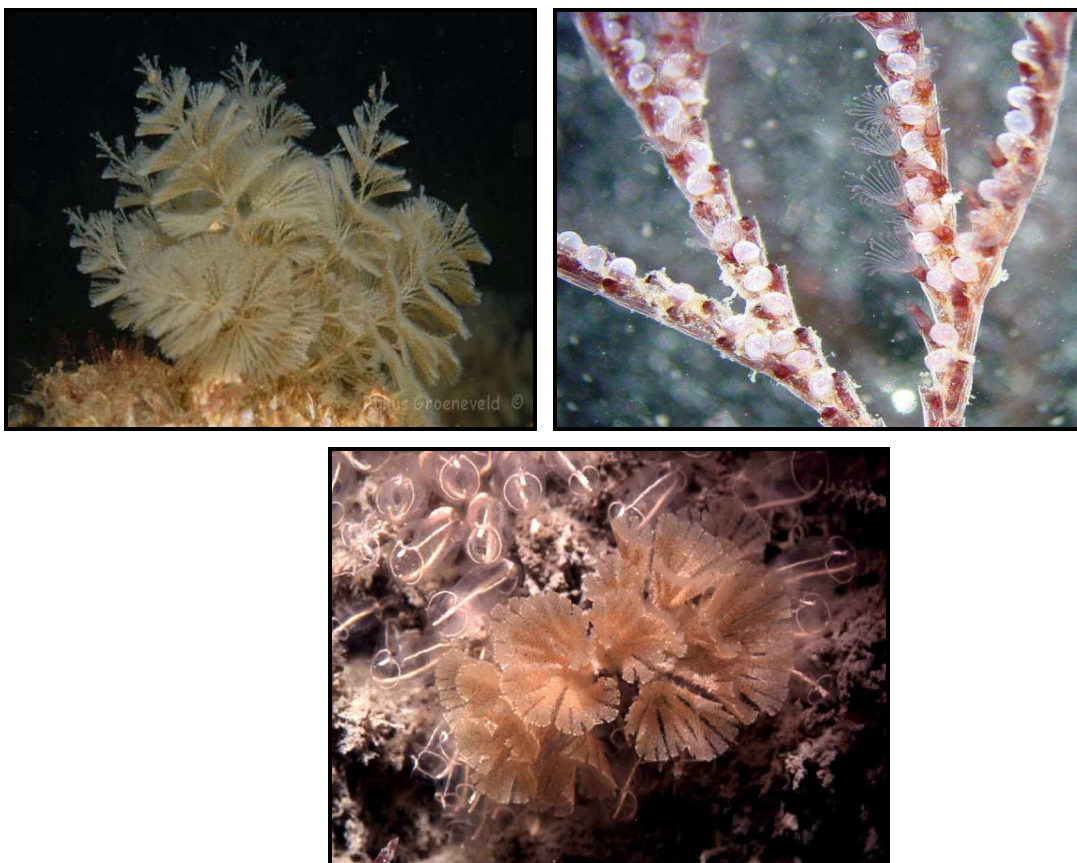


Figura 76: Fotografia dos briozoários *Bugula plumosa*

(<http://www.diverrosa.com/Nederland/Dreischor%20Zuidlangeweg/DZL-080829%20Gepluimde%20hoorncelpoliep,%20Bugula%20plumosa.html>), *B. neritina* (<http://researcharchive.calacademy.org/research/izg/SFBay2K/bugula.htm>) e *B. flabellata* (<http://www.marlin.ac.uk/speciesinformation.php?speciesID=2822>).

As tambjamins já foram isoladas de animais como briozoários, nudibrânquios e ascídias. Acredita-se que estes compostos podem ter sua origem relacionada às prodigiosinas, uma classe de alcalóides tripirrólicos já obtidos a partir de bactérias marinhas e terrestres (Blackman e Li, 1994). Estudo da via biossintética destes compostos pirrólicos indicam que estes podem ser formados a partir de uma unidade de prolina, uma unidade de glicina, uma de serina e várias de acetato, envolvendo uma condensação do 2,2'-bipirrol-5-carboxaldeído (Cerdeño et al., 2001). Outras vias propostas na literatura mostram que os anéis pirrólicos ainda podem ser formados a partir de outros precursores como tirosina, triptofano e ornitina (Pearce et al., 1988; Peschke et al., 2005). Diversas reações químicas, como hidrólise, ataque nucleofílico de alcoóis ou ainda formação de amida estão

diretamente ligadas à incorporação de um esqueleto pirrólico em produtos naturais (Walsh et al., 2006).

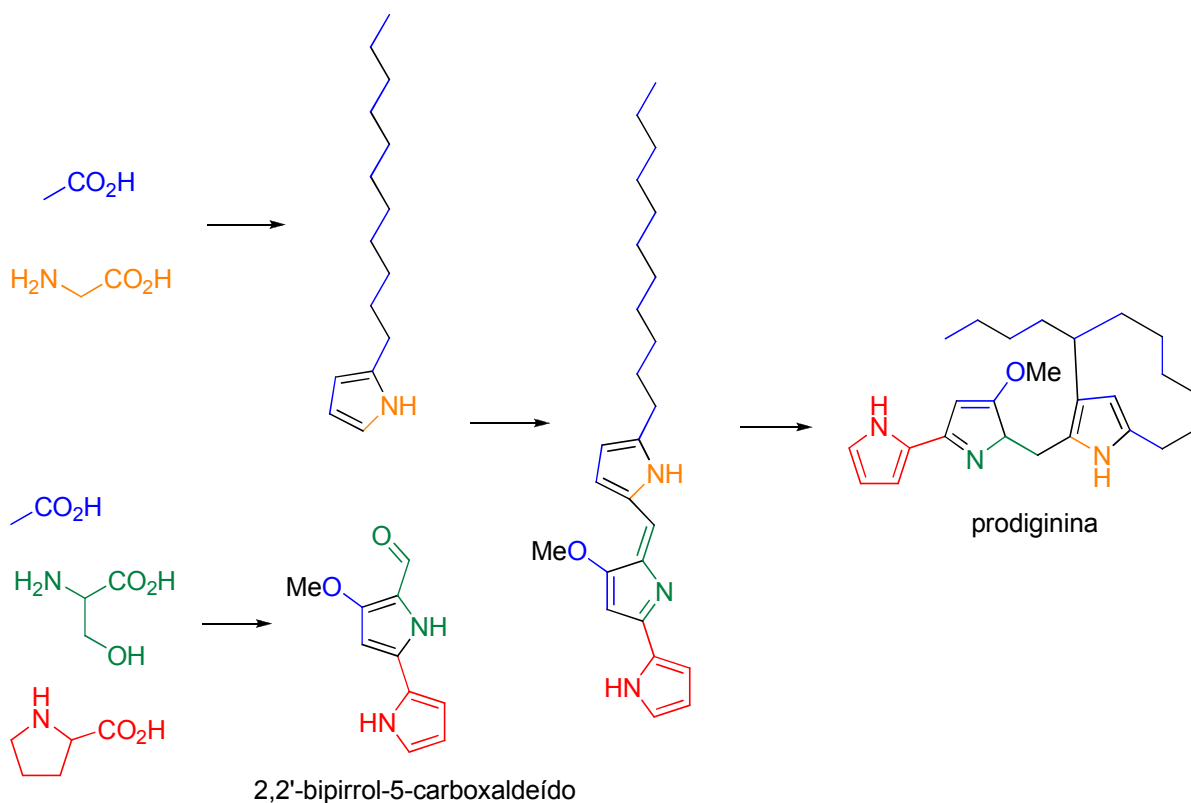


Figura 77: Origem biossintética de uma prodiginina deduzida a partir de precursores marcados (Cerdeño et al., 2001).

Do briozoário *Bugula dentata*, coletado na Tasmânia, foram isolados pela primeira vez quatro, as tambjamins G (122), H (123), I (119) e J (124) (Fig. 78), das cerca de 11 tambjamins atualmente conhecidas. Apesar de muitas vezes estes compostos serem encontrados em nudibrânquios do gênero *Tambja*, acredita-se que este fenômeno esteja relacionado ao fato destes animais serem frequentemente encontrados predando briozoários produtores das tambjamins.

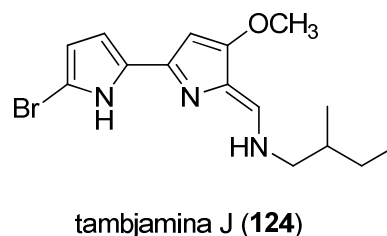
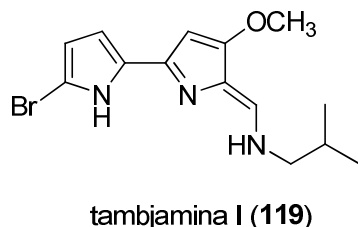
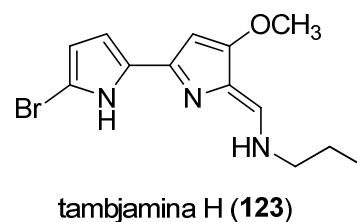
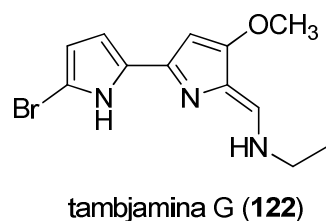


Figura 78: Estruturas das tambjamins G-J isolados do briozoário *Bugula dentata*.

5.2.2 – Procedimento Experimental: briozoário *Bugula* sp.

Espécimes do briozoário *Bugula* sp. foram coletados em Cabo Frio-RJ e liofilizados. O processo de extração foi realizado da seguinte forma: os espécimes (cerca de 32 g) foram triturados em liquidificador com MeOH; o material foi filtrado em uma cama de celite sobre papel de filtro, sendo a massa filtrada retirada do celite e colocada novamente em bquer com MeOH para nova extração; o procedimento foi repetido outras três vezes; todo o volume de MeOH filtrado foi então concentrado em evaporador rotativo até um volume de 300 mL; adicionou-se 10% deste volume de H₂O e então realizou-se uma partição com hexano (4 x 300 mL).

O extrato metanólico obtido (2,6 g) foi submetido a cromatografia em coluna pré-empacotada de sílica-gel derivatizada com grupos C₁₈ utilizando-se um gradiente de MeOH em H₂O (H₂O 100%, H₂O/MeOH 8:2, 7:3, 6:4, 1:1, 4:6, 3:7, 2:8, MeOH 100% e MeCN 100%) como fase móvel; as frações coletadas foram analisadas por CCD utilizando os reveladores ácido fosfomolíbico e ninidrina, e reunidas de acordo com os dados obtidos; o processo levou a obtenção de dez novas frações, CF11BRI-2A (1,9 g), CF11BRI-2B (86,5 mg), CF11BRI-2C (36,5 mg), CF11BRI-2D (40,1 mg), CF11BRI-2E (54,2 mg), CF11BRI-2F (50,3 mg), CF11BRI-2G (27,0 mg), CF11BRI-2H (34,0 mg), CF11BRI-2I (78,2 mg) e CF11BRI-lav

(126,7 mg), que foram analisadas por LC-UV-MS (utilizando-se as mesmas condições, parâmetros e coluna citadas na página 69) com o intuito de se observar seus perfis químicos e indícios da presença de tambjamins nas frações, comparando-se os espectros de UV-vis e massas obtidos nestas análises, com dados encontrados nas bases SciFinder e MarinLit.

Devido à similaridade dos perfis cromatográficos das frações CF11BRI-2C e -2D, e indícios da presença de tambjamins, estas foram reunidas e purificadas por HPLC em fase reversa, utilizando-se um gradiente de MeOH/MeCN 1:1 em H₂O (início com 40% de eluente orgânico; H₂O com 0,05% de TFA) em uma coluna semi-preparativa de sílica-gel derivatizada por grupos C₁₈ (CSC-Inertsil 150A/ODS2, 5 μm, 250 x 9,4 mm), obtendo-se 8 novas frações, CF11BRI-2CD1 (33,8 mg), -2CD2 (1,8 mg), -2CD3 (5,6 mg), -2CD4 (1,7 mg), -2CD5 (3,2 mg), -2CD6 (1,4 mg), -2CD7 (1,5 mg), -2CD8 (1,6 mg) e -2CD9 (18,2 mg) que foram analisadas por LC-UV-MS. Os resultados obtidos nestas análises mostraram que os compostos presentes nas frações -2CD2 e -2CD4 poderiam ser da classe das tambjamins, considerando-se os espectros de UV-vis observados. A busca realizada nos bancos de dados SciFinder e MarinLit das massas moleculares observadas nos espectros das respectivas amostras, cruzando com as informações das tambjamins conhecidas, não encontrou nenhum resultado, podendo indicar que se tratavam de compostos ainda não descritos na literatura. Entretanto, a completa identificação estrutural destes compostos ainda não foi concluída.

A fração CF11BRI-2G (27 mg) foi também submetida à purificação por HPLC em fase reversa, utilizando-se as mesmas condições cromatográficas (fase móvel e coluna) da fração CF11BRI-2CD citada anteriormente. O processo forneceu nove novas frações, CF11BRI-2G1 (2,6 mg), -2G2 (2,5 mg), -2G3 (1,3 mg), -2G4 (2,5 mg), -2G5 (2,4 mg), -2G6 (2,0 mg), -2G7 (2,4 mg), -2G8 (1,5 mg) e -2G9 (6,0 mg), identificando-se, após análises por LC-UV-MS, o aldeído da tambjamina B na fração CF11BRI-2G9. Espectros de RMN-¹H e ¹³C foram obtidos para esta fração.

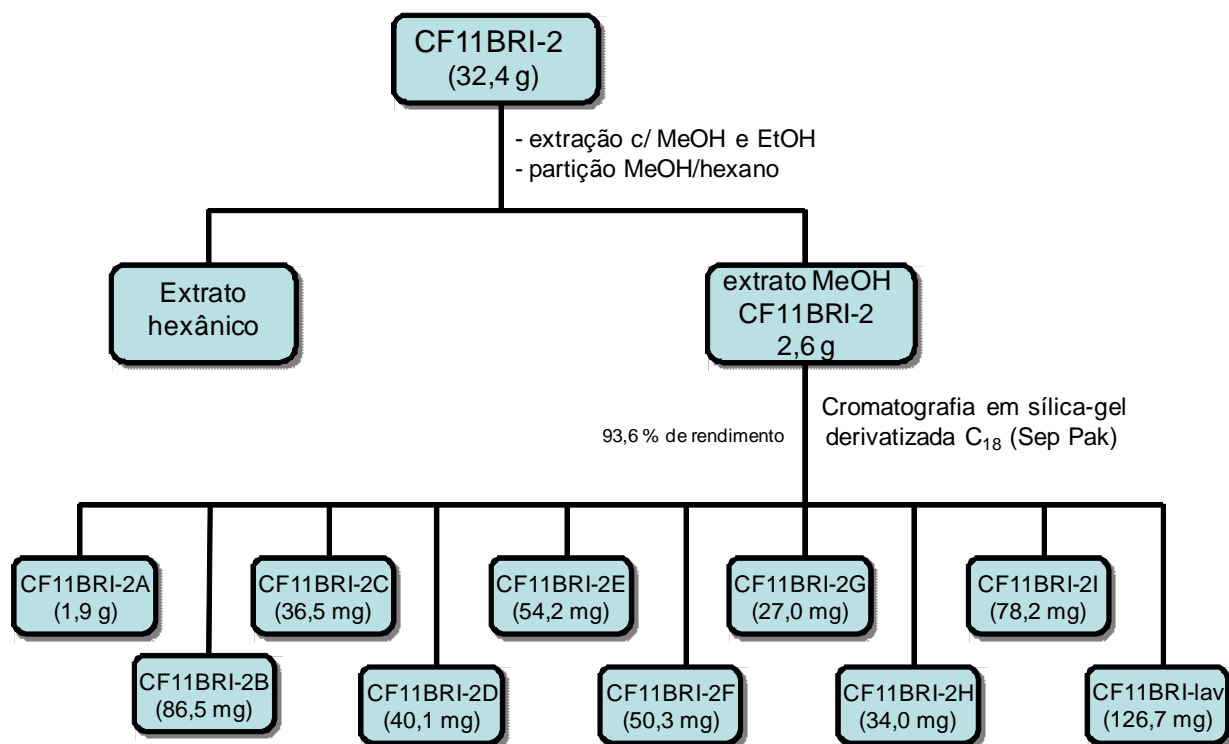


Figura 79: Processo de extração e fracionamento do briozoário *Bugula* sp.

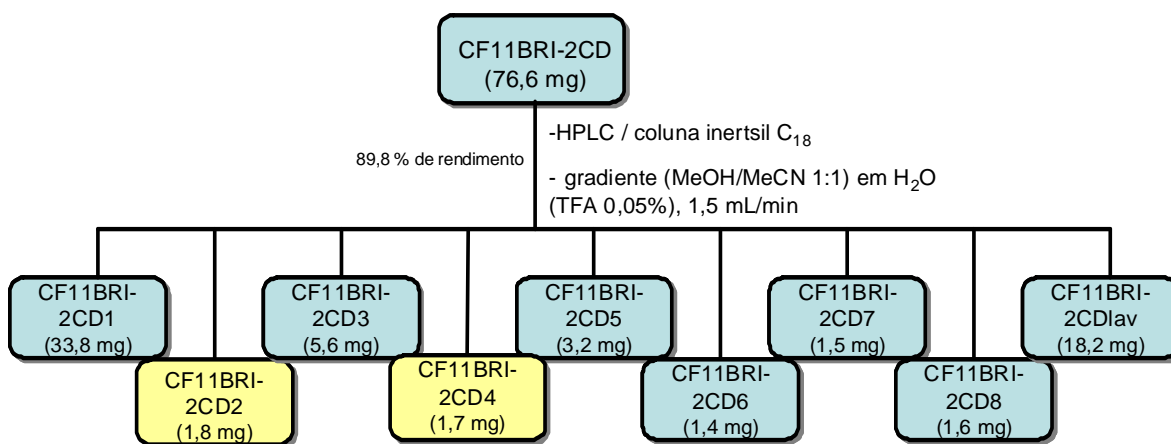


Figura 80: Fracionamento da amostra CF11BRI-2CD.

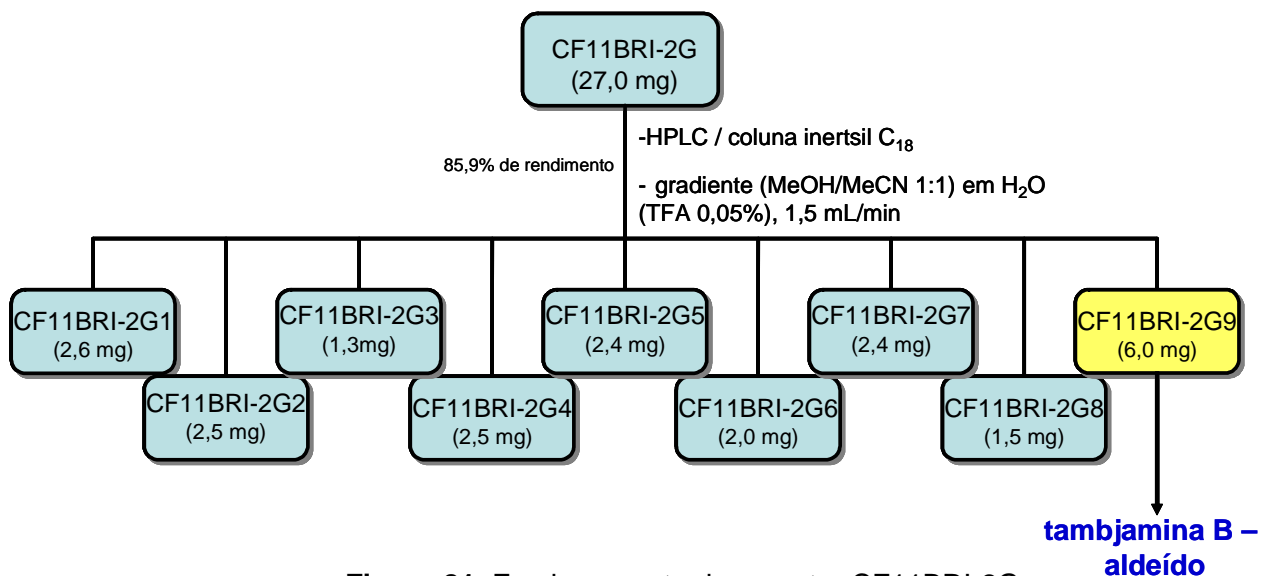


Figura 81: Fracionamento da amostra CF11BRI-2G.

Outra fração separada por HPLC nestas mesmas condições, foi a CF11BRI-2H (34,6 mg), fornecendo nove novas frações: CF11BRI-2H1 (3,2 mg), -2H2 (2,9 mg), -2H3 (1,0 mg), -2H4 (1,9 mg), -2H5 (4,0 mg), -2H6 (1,2 mg), -2H7 (2,0 mg), -2H8 (1,9 mg) e -2H9 (2,5 mg), e uma fração de lavagem da coluna com 9,8 mg. As tambjamins A e C, dois compostos já descritos na literatura, foram identificados nas frações CF11BRI-2H2 e -2H5, respectivamente, a partir dos dados obtidos por LC-UV-MS e comparação dos espectros de RMN-¹H e ¹³C com dados da literatura.

A fração CF11BRI-2I também foi separada por HPLC nas mesmas condições citadas acima. O processo forneceu as frações: CF11BRI-2I1 (13,1 mg), -2I2 (8,4 mg), -2I3 (7,4 mg), -2I4 (8,3 mg), -2I5 (4,0 mg), -2I6 (10,0 mg), -2I7 (1,1 mg), e -2I8 (12,8 mg). A tambjamina D foi identificada na fração -2I6 após comparação dos espectros de RMN-¹H, ¹³C e massas de baixa resolução (modo ESI⁺) com dados da literatura, assim como um isômero da tambjamina J, presente na fração -2I7. Após análise por LC-UV-MS, a fração CF11BRI-2I5 foi escolhida para ser purificada por HPLC em fase reversa (coluna Inertsil ODS-SP, 5 μm, 4,6 x 250 mm, GL Sciences Inc.) utilizando-se MeOH/MeCN/H₂O 3:2:5 como eluente em modo isocrático, fornecendo seis novas frações: CF11BRI-2I5a (0,7 mg), CF11BRI-2I5b (0,4 mg), CF11BRI-2I5c (1,2 mg), CF11BRI-2I5d (0,4 mg), CF11BRI-2I5e (0,7 mg) e CF11BRI-2I5f (0,4 mg), sendo possível a identificação da tambjamina K na fração -2I5c. Mais uma

vez, obtiveram-se os espectros de RMN-¹H e ¹³C, além dos dados de UV e massas das análises por LC-UV-MS, do composto isolado.

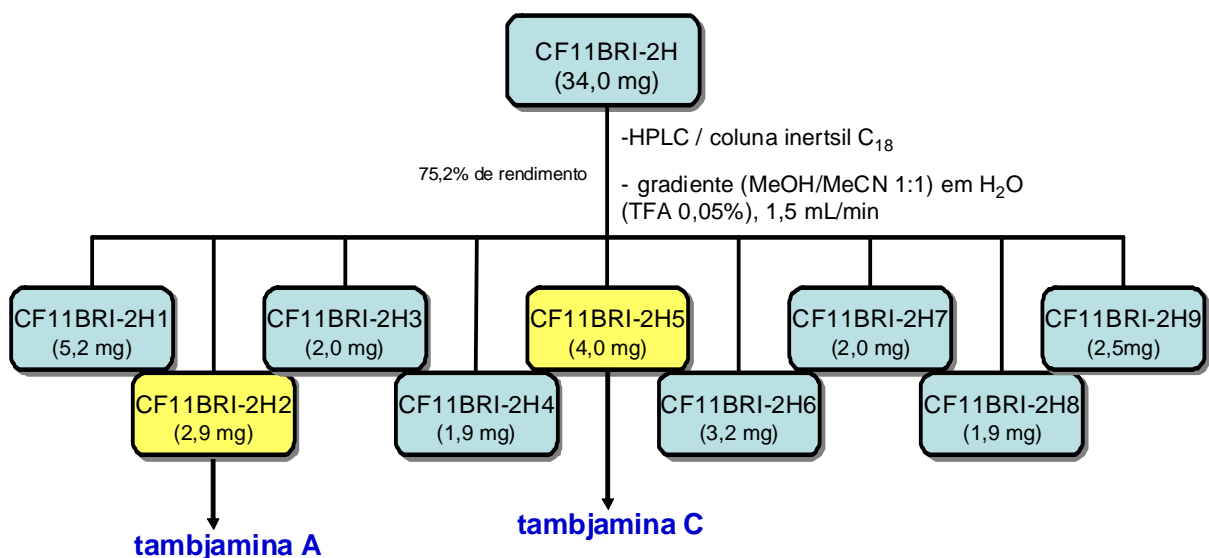


Figura 82: Fracionamento da amostra CF11BRI-2H.

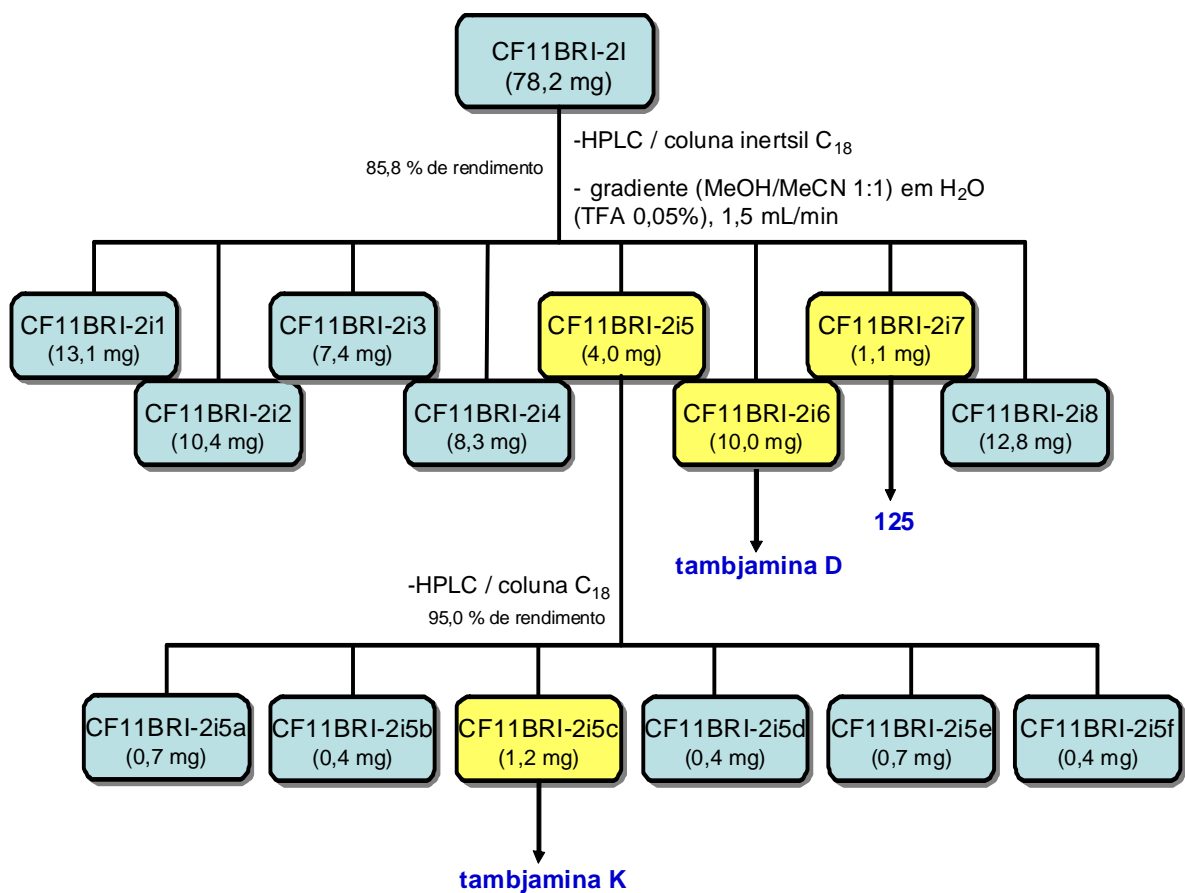


Figura 83: Fracionamento das amostras CF11BRI-2I e CF11BRI-2I5.

5.2.3 – Resultados: Compostos identificados no extrato metanólico do briozoário *Bugula* sp.

O fracionamento e purificação do extrato metanólico dos espécimes do briozoário *Bugula* sp. coletado em Cabo Frio – RJ, levou ao isolamento e identificação de seis compostos conhecidos da classe das tambjaminsas, além de outras duas substâncias que possivelmente pertençam a esta classe, mas que não tiveram sua identificação estrutural finalizada. O estudo químico deste briozoário foi realizado com o objetivo de se tentar observar possíveis semelhanças e diferenças, quanto à composição em tambjaminsas, com o extrato metanólico do nudibrânquio *Tambja stegosauriformis*, apresentado anteriormente, uma vez que esta espécie de nudibrânquio é frequentemente encontrada predando briozoários do gênero *Bugula* na região de Cabo Frio-RJ, podendo assim acumular estes metabólitos graças a sua dieta alimentar.

A identificação estrutural das tambjaminsas isoladas neste trabalho foi realizada comparando-se os dados de espectroscopia UV e massas de baixa resolução (ESI⁺) obtidos nas análises por LC-UV-MS realizadas, assim como seus espectros de RMN-¹H e ¹³C, com dados da literatura. Como pôde ser observado, a maioria das tambjaminsas isoladas a partir do extrato metanólico do briozoário *Bugula* sp, foram também encontradas no extrato metanólico do nudibrânquio *Tambja stegosauriformis*. Assim, os dados obtidos das frações contendo os compostos, dos respectivos animais, foram também comparados.

Na fração CF11BRI-2g9, foi identificado o composto 3'-bromo-4-metóxi-2,2'-bipirrol-5-carboxaldeído (**117**), que seria o composto de hidrólise da tambjamina B, formando seu aldeído. O composto foi encontrado também no extrato do nudibrânquio *T. stegosauriformis* estudado neste trabalho. A **Tabela 10** apresenta os valores de deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN-¹H (**Figura 5.9**, anexo) obtidos das frações contendo o composto, tanto do extrato do nudibrânquio como do briozoário, juntamente com dados da literatura.

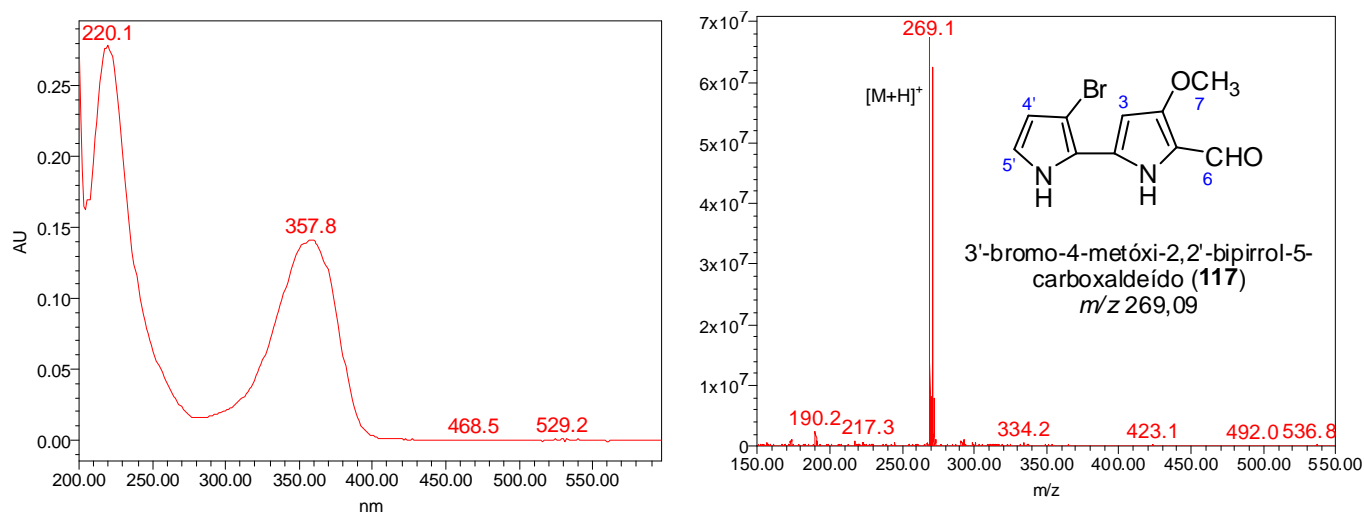


Figura 84: Espectros de UV e de massas (ESI^+ e ESI^-) do aldeído da tambjamina B.

Tabela 10: Comparação dos valores de deslocamentos químicos de ^1H (400 MHz) da fração CF11-2G9 com dados da literatura.

	CF11-2g9 ($\text{DMSO}-d_6$)	Tsme-8 ($\text{DMSO}-d_6$)	Literatura* (CDCl_3)
Posição	$\delta ^1\text{H}$ (mult., J/Hz)	$\delta ^1\text{H}$ (mult., J/Hz)	$\delta ^1\text{H}$ (mult., J/Hz)
3	6,53 (d, 2,7)	6,53 (d, 2,3)	6,74 (d, 2,6)
6	9,39 (s)	9,39 (s)	9,24 (s)
7	3,87 (s)	3,87 (s)	3,97 (s)
4'	6,28 (t, 2,6)	6,28 (t, 2,7)	6,33 (t, 2,7)
5'	7,01 (t, 3,0)	7,01 (t, 3,0)	6,89 (t, 2,7)
NH	11,30 (s)	11,28 (s)	11,70 (s)
NH	11,49 (s)	11,50 (s)	12,00 (s)

* Carté, B., 1983

Outro composto isolado no estudo deste extrato foi a tambjamina C (**112**), encontrada na fração CF11BRI-2H5, e que também foi identificada no extrato metanólico de *T. stegosauriformis*. Na **Tabela 11** a seguir temos os dados de RMN- ^1H (**Figura 5.11**, anexo) obtidos das frações do nudibrânquio e do briozoário juntamente com os dados da literatura.

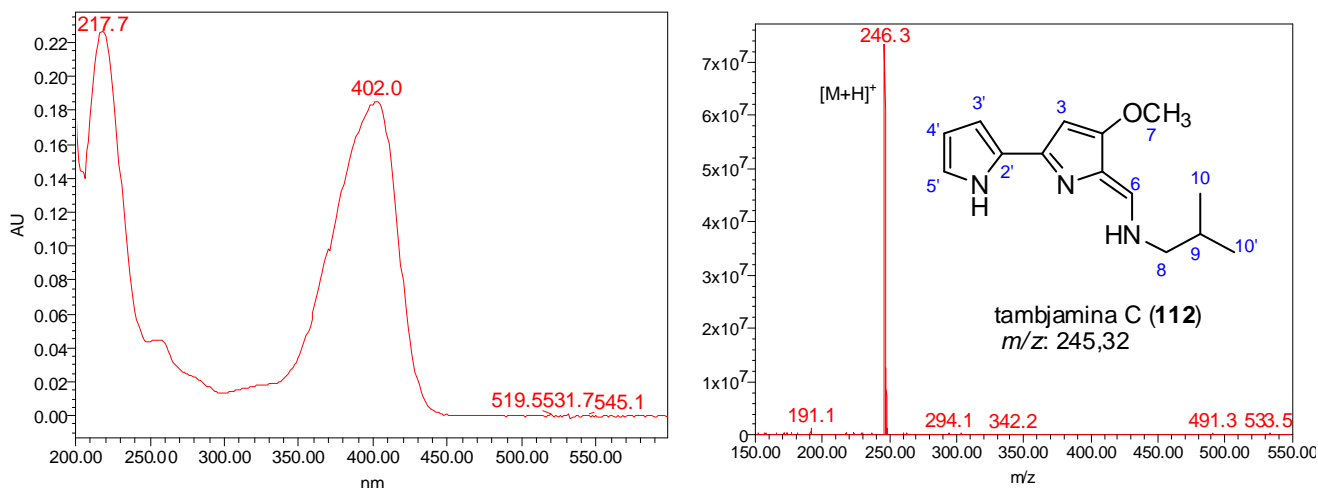


Figura 85: Espectros de UV e de massas (ESI⁺ e ESI⁻) da tambjamina C.

Tabela 11: Comparação dos valores de deslocamentos químicos de ¹H (400 MHz) da fração CF11-2H5 com dados da literatura.

	CF11-2H5 (CDCl ₃)	Tsme-4 (CDCl ₃)	Literatura* (CDCl ₃)
Posição	δ ¹ H (mult., J/Hz)	δ ¹ H (mult., J/Hz)	δ ¹ H (mult., J/Hz)
3	5,98 (d, 2,1)	5,98 (m)	5,95 (s)
6	7,28 (s)	7,27 (d, 19,4)	7,28 (s)
7	3,94 (s)	3,93 (s)	3,90 (s)
8	3,29 (t, 6,4)	3,28 (t, 6,4)	3,24 (d, 6,6)
9	2,00 (m)	1,99 (m)	1,98 (m)
10 e 10'	1,01 (d, 6,7)	1,00 (d, 6,7)	0,99 (d, 6,6)
3'	6,76 (m)	6,75 (m)	6,70 (m)
4'	6,29 (m)	6,28 (m)	6,24 (m)
5'	7,10 (m)	7,09 (m)	7,04 (m)

* Pinkerton, D.M., 2007

Da fração CF11BRI-2I6 foi isolado outra tambjamina conhecida, a tambjamina D (**113**). Este composto, como dito anteriormente, já havia sido isolado em nosso grupo de pesquisa a partir do extrato de outra espécie de nudibrânquio do gênero *Tambja*, o *T. eliora*. Os dados espectroscópicos obtidos para o composto isolado a partir do briozoário *Bugula* sp., e a comparação com dados da literatura estão a seguir (**Tabela 12**).

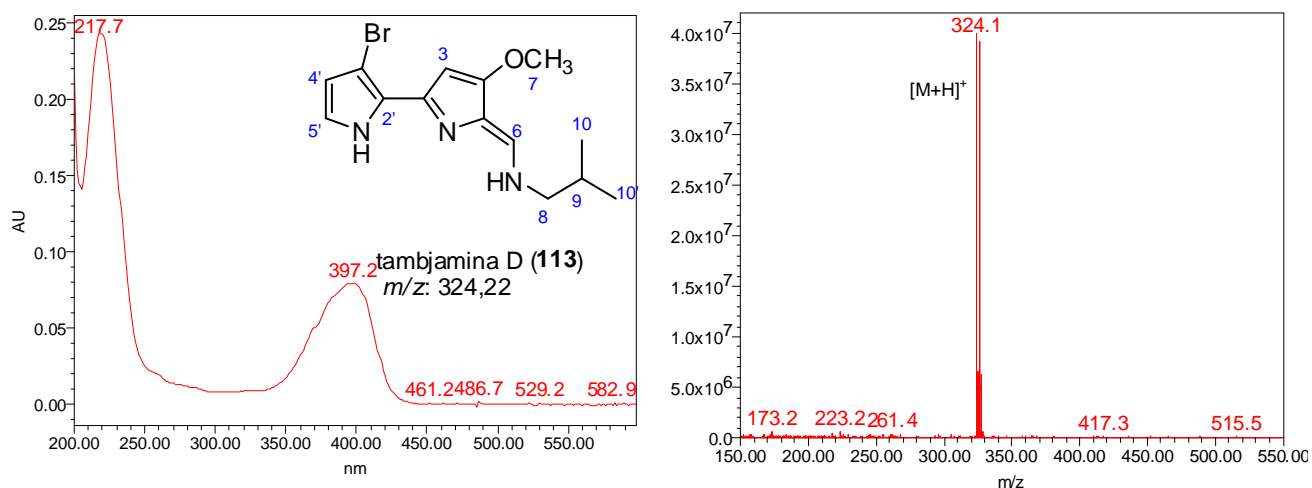


Figura 86: Espectros de UV e de massas (ESI⁺ e ESI⁻) da tambjamina D.

Tabela 12: Comparação dos valores de deslocamentos químicos de ¹H (400 MHz) da fração CF11-216 (**Figura 5.13**, anexo) com dados da literatura.

	CF11-216 (CDCl ₃)	Tsme-7 (CDCl ₃)	Literatura* (CDCl ₃)
Posição	δ ¹ H (mult., J/Hz)	δ ¹ H (mult., J/Hz)	δ ¹ H (mult., J/Hz)
3	6,71 (d, 2,3)	6,71 (d, 2,3)	6,64 (s)
6	7,40 (d, 15,0)	7,40 (d, 15,0)	7,39 (d, 14,0)
7	3,97 (s)	3,97 (s)	3,97 (s)
8	3,31 (t, 6,4)	3,30 (m)	3,32 (m)
9	2,01 (m)	2,01 (m)	2,05 (m)
10 e 10'	1,01 (d, 6,7)	1,01 (d, 6,7)	1,04 (d, 6,6)
4'	6,35 (m)	6,34 (m)	6,33 (m)
5'	7,03 (m)	7,02 (m)	7,00 (m)

* Carté, B., 1983

Da fração CF11-2H2 foi identificada a tambjamina A (**114**), um composto isolado pela primeira vez em um trabalho com os nudibrânquios *Tambja abdere*, *T. eliora* e *Roboastra tigris* coletados no golfo da Califórnia (Carté e Faulkner, 1983). Este alcalóide não foi encontrado no extrato metanólico do nudibrânquio *T. stegosauriformis* analisado neste projeto.

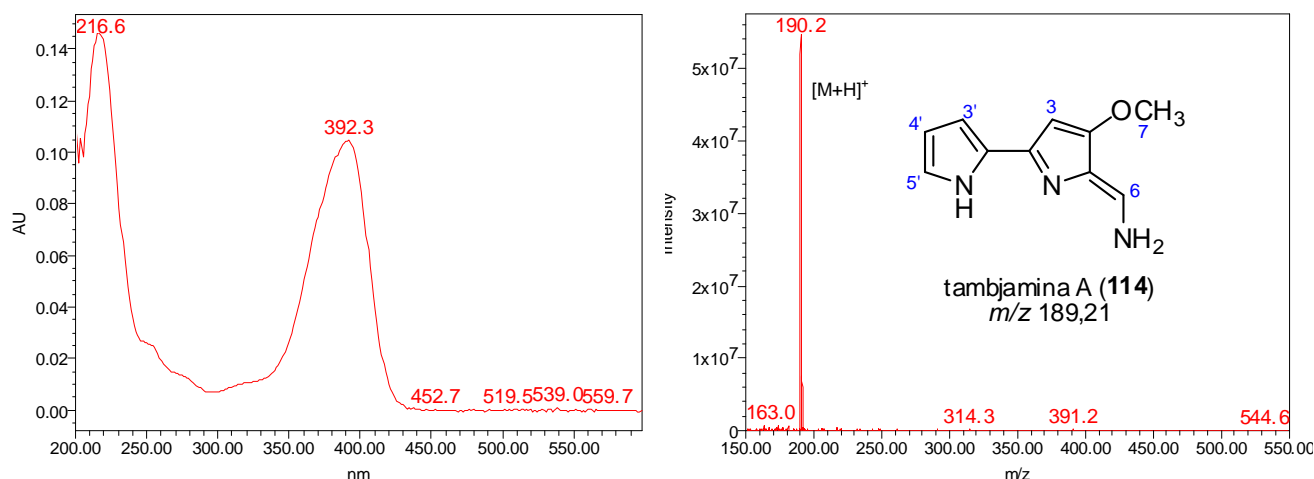


Figura 87: Espectros de UV e de massas (ESI⁺ e ESI⁻) da tambjamina A.

Tabela 13: Comparação dos valores de deslocamentos químicos de ¹H (400 MHz) e ¹³C (100 MHz) da fração CF11-2H2 (**Figuras 5.15 e 5.16**, anexo) com dados da literatura.

Posição	CF11-2H2 (DMSO- <i>d</i> ₆)		Literatura* (DMSO- <i>d</i> ₆)	
	$\delta^{13}\text{C}$ (mult., J/Hz)	$\delta^1\text{H}$ (mult., J/Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (mult., J/Hz)	$\delta^1\text{H}$ (mult., J/Hz)
2	141,6	-	141,2	-
3	91,7	6,51 (d, 2,0)	92,1	6,50 (d, 2,2)
4	164,1	-	163,8	-
5	122,1	-	121,8	-
6	142,0	7,82 (dd, 8,7 e 16,0)	141,8	7,82 (dd, 8,7 e 16,0)
7	58,5	3,93 (s)	59,0	3,69 (s)
2'	110,4	-	110,1	-
3'	123,6	7,14 (m)	124,1	7,14 (dd, 2,6 e 4,0)
4'	110,9	6,27 (m)	110,5	6,28 (dt, 2,3 e 3,6)
5'	111,3	7,09 (m)	111,7	7,07 (m)

* Granato, A.C., 2005

Outro alcalóide isolado no estudo químico de *Bugula* sp. foi a tambjamina K (**118**), isolado recentemente a partir de nudibrânquios *Tambja ceutae* coletados na região dos Açores (Carbone et al., 2010). Os dados espectroscópicos obtidos para o composto isolado podem ser vistos na **Tabela 14** e **Figura 88** a seguir. O composto foi identificado no extrato de *T. stegosauriformis*, porém em uma quantidade mínima, não sendo possível a obtenção

dos espectros de RMN-¹H e ¹³C, sendo analisado por seus espectros de UV-vis e massas de baixa resolução obtidos nas análises por LC-UV-MS, e ainda por MS/MS.

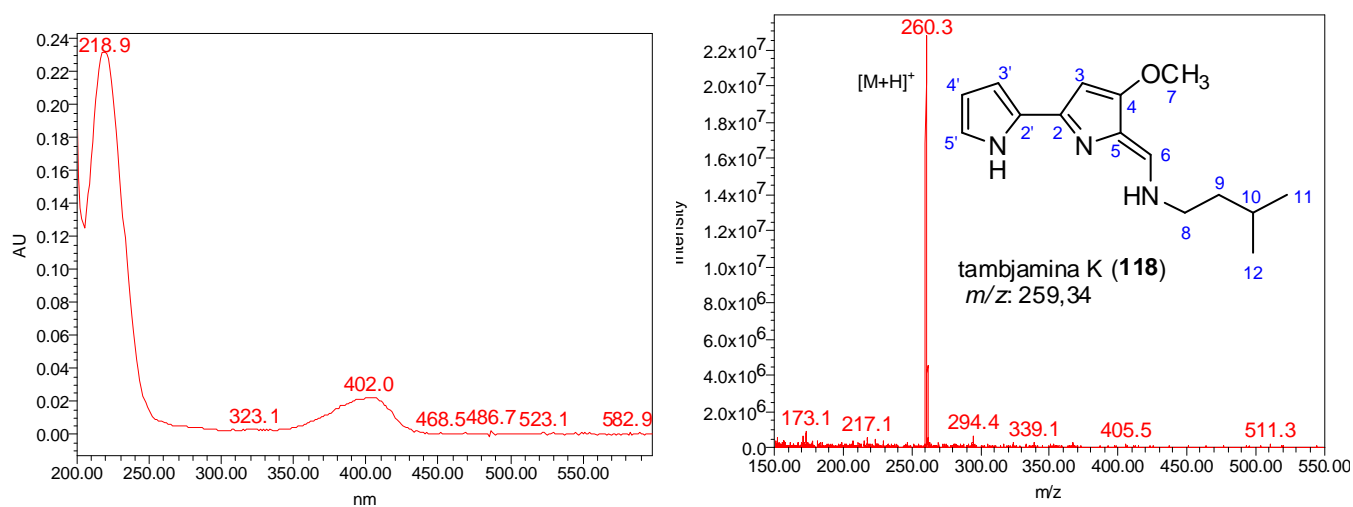


Figura 88: Espectros de UV e de massas (ESI⁺ e ESI⁻) da tambjamina K.

Tabela 14: Comparação dos valores de deslocamentos químicos de ¹H (400 MHz) e ¹³C (100 MHz) da fração CF11-215c (**Figuras 5.17 e 5.18**, anexo) com dados da literatura.

Posição	CF11-215c (CDCl ₃)		Literatura* (CDCl ₃)	
	$\delta^{13}\text{C}$ (mult., J/Hz)	$\delta^1\text{H}$ (mult., J/Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (mult., J/Hz)	$\delta^1\text{H}$ (mult., J/Hz)
2	143,0	-	143,8	-
3	91,4	5,98 (s)	91,5	6,00 (s)
4	164,0	-	164,1	-
5	110,7	-	110,8	-
6	140,6	7,30 (d, 14,9)	140,1	7,36 (d, 15,0)
7	58,4	3,94 (s)	58,4	3,95 (s)
8	57,1	3,49 (m)	49,4	3,49 (m)
9	35,8	1,63 (m)	38,9	1,64 (m)
10	26,6	1,77 (m)	25,5	1,70 (m)
11	22,3	0,95 (d, 6,8)	22,3	0,96 (d, 6,4)
12	22,3	1,00 (d, 6,8)	22,3	0,96 (d, 6,4)
NH	-	9,60; 11,40; 13,50	-	9,23; 10,70; 12,50
2'	122,4	-	122,3	-
3'	113,6	6,75 (m)	113,7	6,77 (m)
4'	110,7	6,29 (m)	110,7	6,30 (m)
5'	124,5	7,09 (m)	124,5	7,07 (m)

* Carbone et al., 2010

Na fração CF11-217 foi identificado um composto que apresentou, no espectro de massas obtido nas análises por LC-UV-MS (modo ESI⁺), dois picos de mesma intensidade em *m/z* 338 e 340 indicando a presença de um átomo de bromo em sua estrutura. Essas características apontam para a tambjamina J (**124**), um composto dessa classe isolado originalmente a partir do briozoário *Bugula dentata* coletado na Tasmânia (Blackman e Li, 1994). Os dados de RMN-¹H e ¹³C (CDCl₃, 400MHz) obtidos foram comparados com a literatura. Porém, ao compararmos os valores de deslocamento químico dos espectros de RMN-¹H, notou-se uma discrepância entre os valores relativos aos hidrogênios pirrólicos (região entre δ 6,00 e 7,00 aproximadamente) do composto presente na fração CF11-217 com a tambjamina J.

Ao analisarmos as estruturas das tambjaminsas descritas na literatura, nota-se a existência de dois tipos de esqueletos quando o átomo de bromo se faz presente no composto, sendo um deles com o bromo ligado ao carbono pirrólico C-3', e o outro tipo quando este se liga ao carbono C-5'. Observando-se os valores de deslocamento químico dos hidrogênios pirrólicos das tambjaminsas que possuem um átomo de bromo em sua estrutura, pode-se notar que estes valores seguem uma tendência conforme a posição (C-3' ou C-5') em que este se encontra em determinada tambjamina. As **Tabelas 15 e 16** ilustram esse fato.

Tabela 15: Valores de deslocamento químico dos hidrogênios pirrólicos das tambjaminsas G, I e J.

δ ¹ H (CDCl ₃) – compostos com Br na posição C-5'			
Posição	tambjamina I (119)*	tambjamina G (122)*	tambjamina J (124)**
C-3	5,93	5,92	5,87
C-3'	6,40	6,44	6,56
C-4'	6,09	6,12	6,15

* Blackman, A.J., 1994

** Pinkerton, D.M., 2007

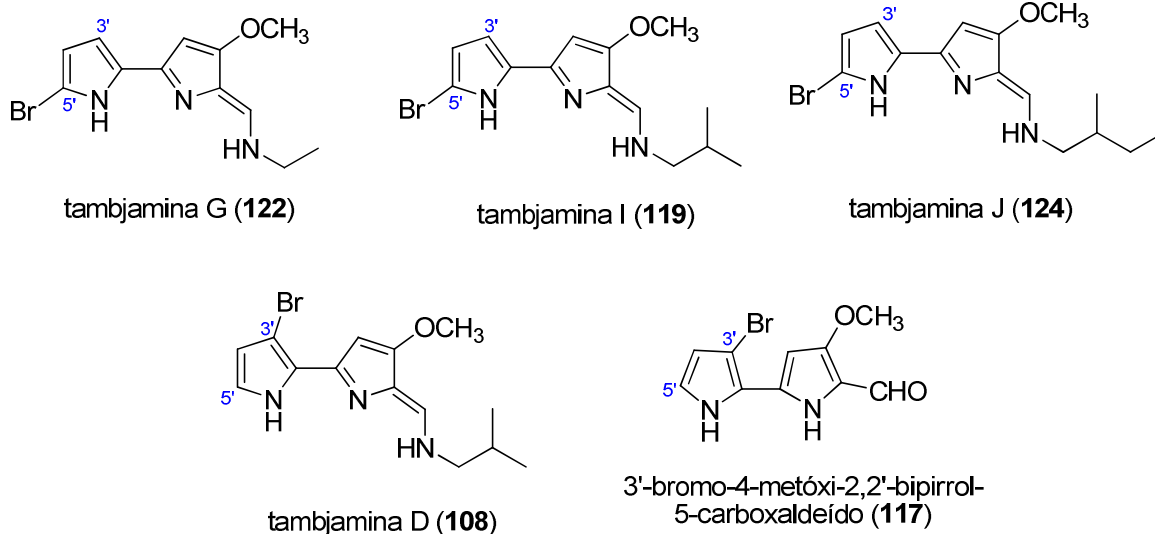


Figura 89: Estruturas dos compostos **113**, **117**, **119**, **122** e **124**.

Tabela 16: Valores de deslocamento químico dos hidrogênios pirrólicos das tambjamins B (aldeído), D e do composto da fração CF11-217.

δ ^1H (CDCl_3) – compostos com Br na posição C-3'			
Posição	tambjamina D (113)*	tambjamina B - aldeído (117)*	CF11-217 (125)
C-3	6,64	6,74	6,66
C-4'	6,33	6,33	6,34
C-5'	7,00	6,89	7,01

* Carté, B., 1983

Com base nestas informações, e nos deslocamentos químicos observados na região dos hidrogênios pirrólicos do composto presente na fração CF11-217, δ 6,34; 6,66 e 7,01, sugere-se que este composto apresenta o átomo de bromo ligado ao carbono C-3', e não ao C-5' como na molécula da tambjamina J (**124**), sendo, neste caso, um isômero deste alcalóide ainda não descrito na literatura. Esta hipótese é reforçada pelos dados obtidos nos espectros de RMN bidimensionais para a substância na fração CF11-217, de acordo com as correlações observadas, e ainda com a comparação dos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C (novos espectros obtidos em $\text{DMSO}-d_6$) referentes às posições C-3, C-4' e C-5' deste

composto com os dados da tambjamina D (Granato et al., 2005). Estas informações podem ser vistas na **Tabela 17** e **Figura 90**.

Tabela 17: Valores de deslocamento químico dos hidrogênios e carbonos pirrólicos da tambjamina D e do composto da fração CF11-2I7 (**Figuras 5.19** e **5.20**, anexo) (DMSO- d_6 , 600 MHz).

Posição	CF11-2I7 (DMSO- d_6)		tambjamina D* (DMSO- d_6)	
	$\delta^{13}\text{C}$ (mult., J/Hz)	$\delta^1\text{H}$ (mult., J/Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (mult., J/Hz)	$\delta^1\text{H}$ (mult., J/Hz)
3	93,7	6,56 (d, 2,2)	92,8	6,61 (d, 2,4)
4'	113,5	6,41 (t, 2,4)	114,7	6,33 (t, 2,7)
5'	123,7	7,20 (t, 3,1)	124,0	7,00 (t, 3,0)

* Granato, A.C., 2005

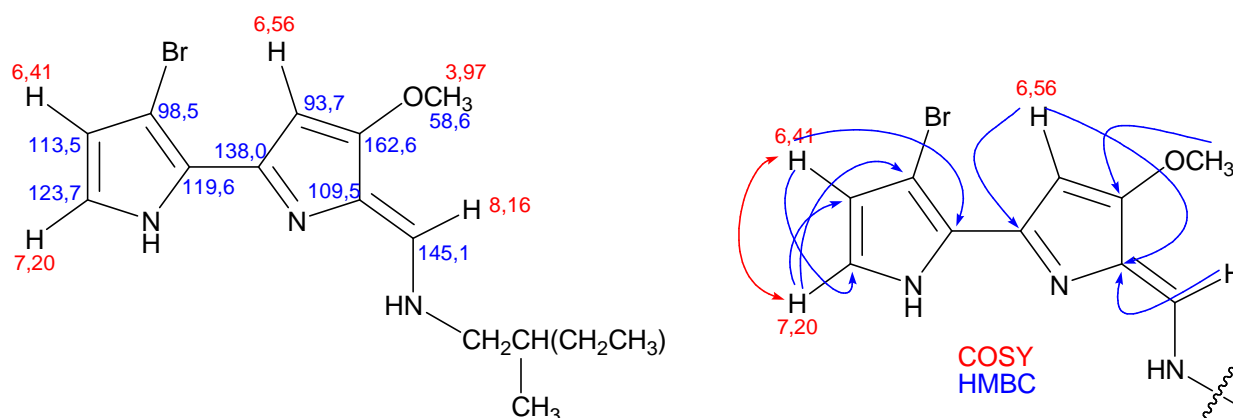


Figura 90: Estrutura proposta do composto **125** e correlações observadas nos espectros de RMN do tipo COSY e HMBC.

A total elucidação estrutural do composto **125** foi dificultada pela pouca massa disponível da fração CF11-2I7 (1,1 mg) e pelo fato desta não se encontrar totalmente pura, dificultando principalmente a observação das correlações da porção da molécula em que se encontra a cadeia alquila ligada ao nitrogênio da enamina. O espectro de massas de baixa resolução e o espectro no UV-vis obtido nas análises por LC-UV-MS deste composto (**125**) podem ser observados na **Figura 91**.

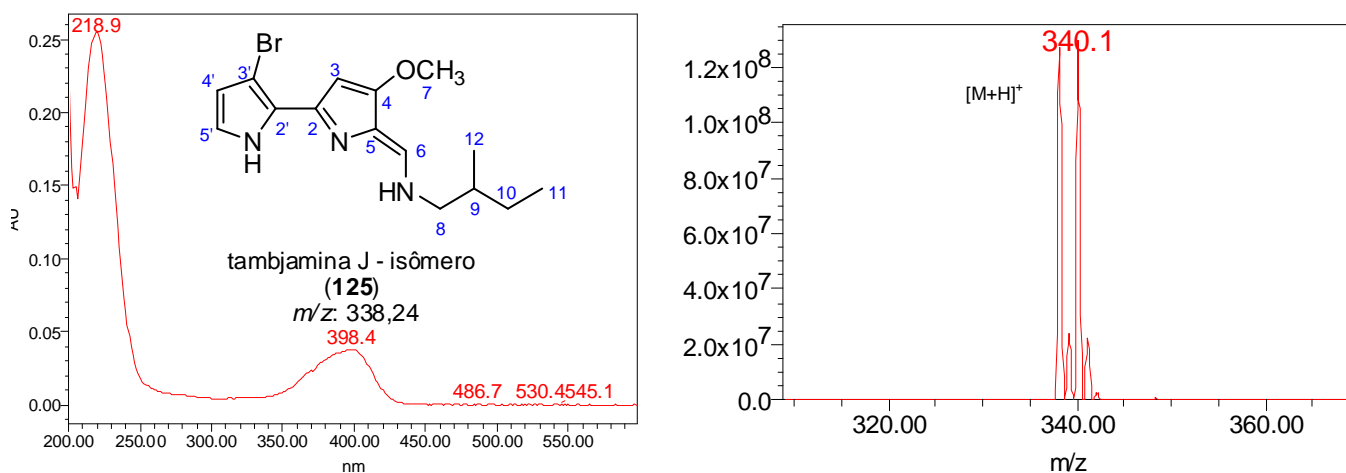


Figura 91: Espectros de UV e de massas (ESI^+) do composto (125).

Além das tambjaminsas já descritas na literatura isoladas a partir do extrato metanólico deste briozoário, foram observados, com o auxílio das análises realizadas por LC-UV-MS, outros dois compostos que apresentaram espectros de UV-vis característicos da classe das tambjaminsas, porém apresentando massas moleculares (de acordo com os espectros de massas do tipo ESI^+ obtidos) diferentes de quaisquer compostos desta classe já descritos. O composto presente na fração CF11BRI-2CD2, apresentou o pico do íon *quasi*-molecular em m/z 298, e uma banda de absorção intensa em aproximadamente 398 nm, típico desta classe de compostos. O composto ainda não identificado da fração CF11BRI-2CD4, apresentou dois sinais de intensidades semelhantes em m/z 376 e 378, indicando a presença de um átomo de bromo em sua estrutura. Os espectros de UV-vis e de massas de baixa resolução (ESI^+) obtidos nas análises por LC-UV-MS para os dois compostos encontram-se nas **Figuras 92 e 93**.

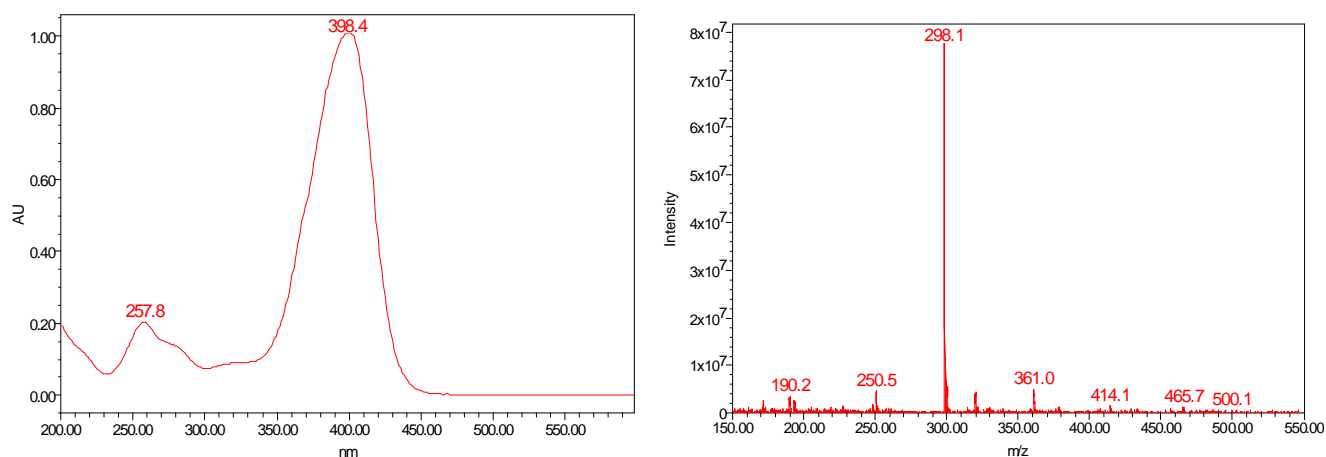


Figura 92: Espectros de UV e de massas (ESI⁺) do composto não identificado da fração CF11-2CD2.

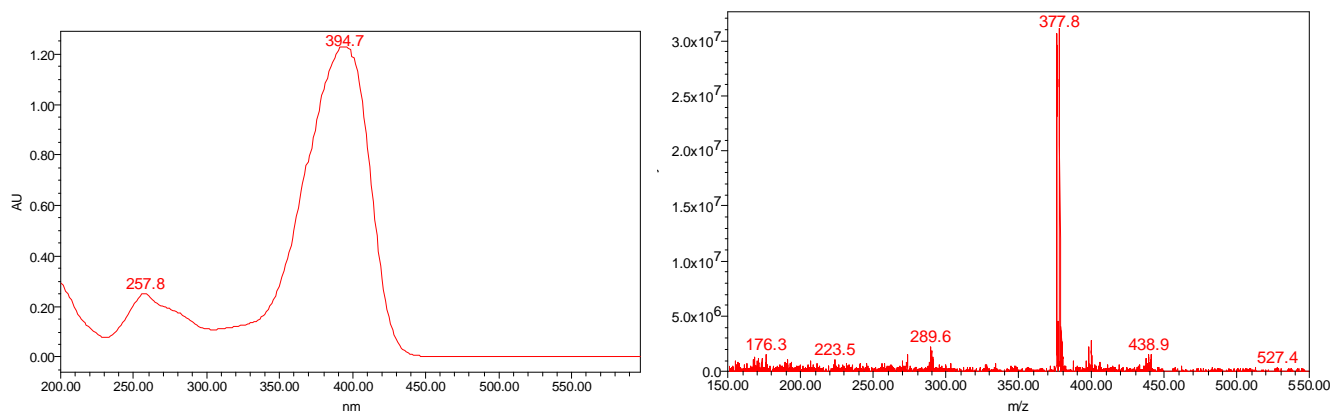


Figura 93: Espectros de UV e de massas (ESI⁺) do composto não identificado da fração CF11-2CD4.

Entretanto, a completa identificação estrutural dos compostos presentes nestas duas frações não pôde ser realizada. Devido ao fato dessas frações não se encontrarem totalmente puras e estarem disponíveis em uma pequena quantidade (1,8 e 1,7 mg respectivamente), estas frações foram enviadas a colaboradores no Canadá com o intuito de se realizar a purificação final destas, e a obtenção de novos dados de RMN. No entanto, a obtenção destes novos dados não foi adquirida em tempo, impossibilitando uma discussão acerca da identificação estrutural destes compostos.

Ao compararmos as tambjamins isoladas do nudibrânquio *T. stegosauriformis* e do briozoário *Bugula* sp., nota-se que a maioria deles foram observados nos extratos

metanólicos dos dois animais, que é o caso das tambjamins C, D, K e o aldeído relativo a tambjamina B. Estes resultados indicam fortemente que esta espécie de nudibrânquio deve adquirir e acumular estes alcalóides, quando esse se alimenta de briozoários produtores destes compostos. Vale ressaltar que os espécimes do nudibrânquios *T. stegosauriformis* coletados foram encontrados sobre o briozoário do gênero *Bugula* estudado também neste trabalho. A **Figura 94** ilustra as tambjamins identificadas nos extratos do briozoário *Bugula* sp. e do nudibrânquio *Tambja stegosauriformis*.

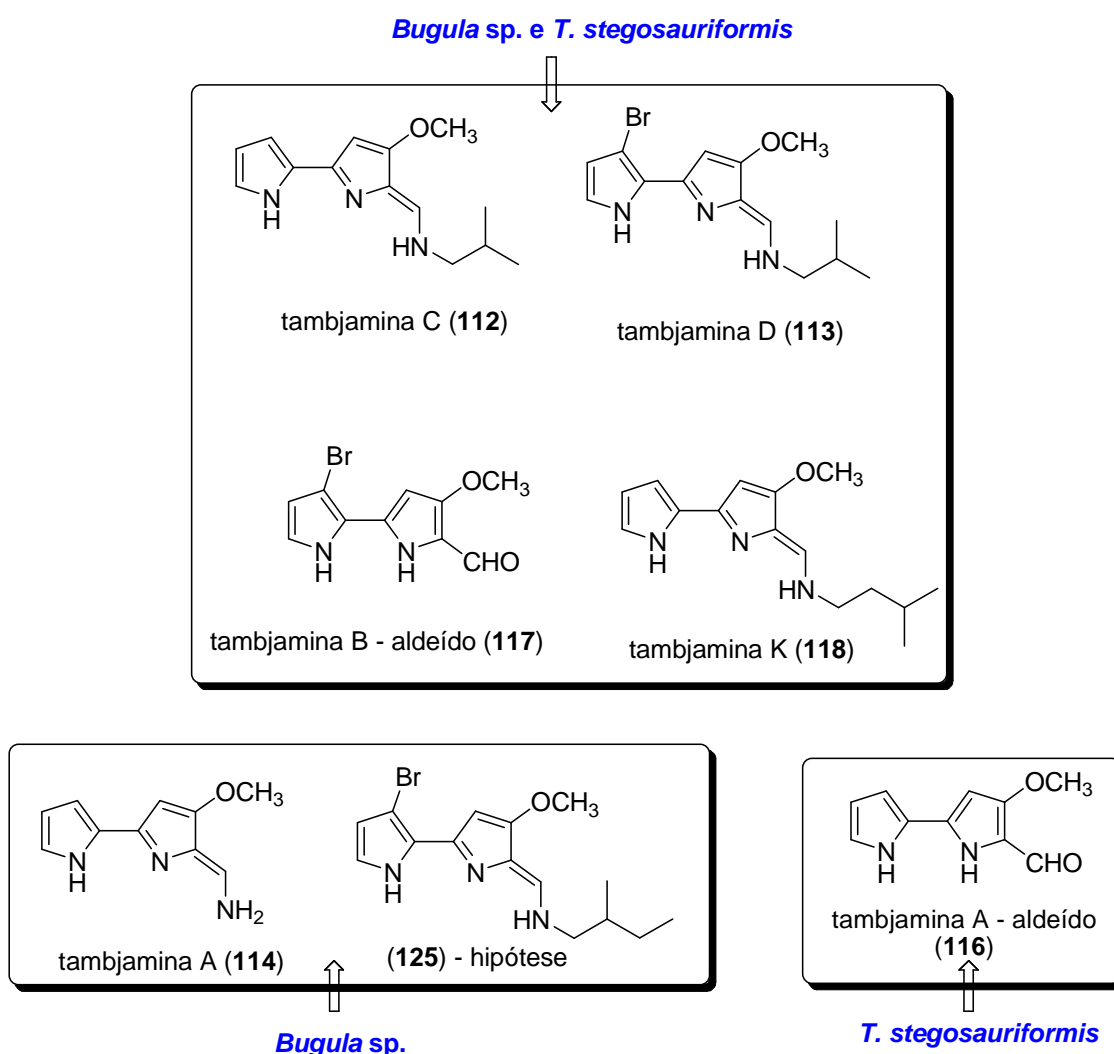


Figura 94: Tambjamins identificadas no briozoário *Bugula* sp. e no nudibrânquio *T. stegosauriformis*.

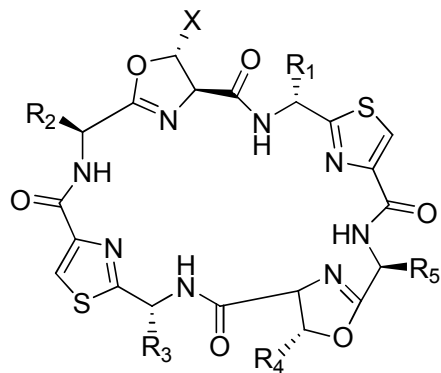
Capítulo 6

Estudo químico da ascídia *Didemnum* sp. e do nudibrânquio *Pleurobranchus areolatus*

6.1 Ascídia *Didemnum* sp.

6.1.1 Introdução

Os didemnídeos constituem a maior família de ascídias em termos de número de espécies, e são considerados uma fonte excepcional de compostos naturais com diversidade química e potente propriedade biológica (Takeara et al., 2007). Estudos apontam que ascídias coloniais pertencentes à família Didemnidae frequentemente apresentam associações com microalgas simbióticas fotossintetizadoras dos gêneros *Synechocystis* e *Prochloron*, (Kott et al. 1984; Lewin e Cheng, 1989; Monniot et al. 1991; Sings e Rinehart 1996). Em decorrência destas associações entre ascídias e cianobactérias, surgem discussões sobre a verdadeira origem de alguns compostos isolados a partir de ascídias da família Didemnidae, se estes são produtos do metabolismo secundário da ascídia, do organismo simbiótico ou ainda resultado da interação de ambos. Em estudos químicos realizados com a ascídia *Lissoclinum patella*, geralmente encontrada associada a alga *Prochloron* sp., coletada em vários locais, foram isolados diversas classes de peptídeos cíclicos, dentre elas as patellamidas. Porém, enquanto o extrato de uma ascídia coletada na Ilha Eil Malak (Palau) apresentou as patellamidas A (126), B (127) e C (128) (Fig. 95), aquela coletada na Grande Barreira de Corais apresentou apenas a patellamida D (129) (Fig. 95), sendo que essas variações foram observadas em outras coleções da ascídia. Este pode ser um indicativo de que a origem de alguns destes metabólitos esteja relacionada com o organismo simbiote (Sings e Rinehart, 1996).



- (126) R₁= D-Val, R₂= L-Ile, R₃= D-Val, R₄= Me, R₅= L-Ile, X= H
 (127) R₁= D-Ala, R₂= L-Leu, R₃= D-Phe, R₄= Me, R₅= L-Ile, X= Me
 (128) R₁= D-Ala, R₂= L-Val, R₃= D-Phe, R₄= Me, R₅= L-Ile, X= Me
 (129) R₁= D-Ala, R₂= L-Ile, R₃= D-Phe, R₄= Me, R₅= L-Ile, X= Me

Figura 95: Estruturas dos compostos 126-129.

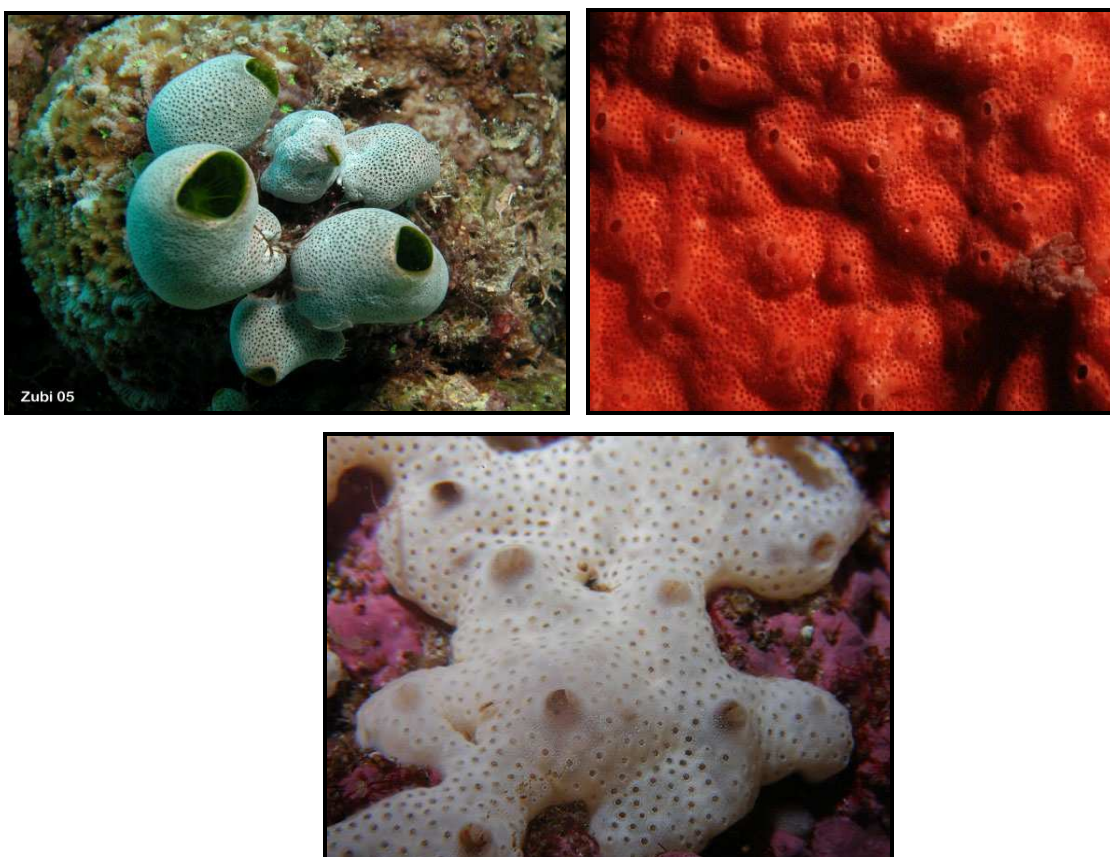


Figura 96: Fotografias das ascídias *Didemnum molle*

(<http://www.frogfish.ch/image/invertebrates/Didemnum-molle1.jpg>), *D. granulatum*

(<http://qopn.iqsc.usp.br/publicacoes/>) e *D. albidum*

(http://www.tauchprojekt.de/fauna/didemnum_albidum.htm).

As ascídias da família Didemnidae são reconhecidas como uma fonte única de compostos nitrogenados, derivados de aminoácidos, peptídeos cíclicos modificados e alcalóides, dentre os quais se incluem as tamandarinas, didemninas, aplidina e outros compostos relacionados, que já apresentaram potentes atividades antitumorais e imunossupressivas (Kossuga et al, 2009). Como exemplos de compostos isolados de ascídias do gênero *Didemnum* podemos citar a plakinidina D (**130**) (**Fig. 97**), um alcalóide pirroloacridínico isolado das ascídias *Didemnum* sp. e *Didemnum rubeum*. O composto apresentou atividade citotóxica contra a linhagem de célula tumoral HCT-116 de câncer do cólon (Smith et al., 1997; Ford e Davidson, 1997).

Recentemente dois novos alcalóides indólicos, didemnidinas A (**131**) e B (**132**) (**Fig. 97**), foram isolados da ascídia *Didemnum* sp. coletada na Nova Zelândia. A didemnidina B apresentou moderada atividade inibitória frente ao crescimento de *Plasmodium falciparum*, com um IC₅₀ de 15 μ M (Finlayson et al., 2011).

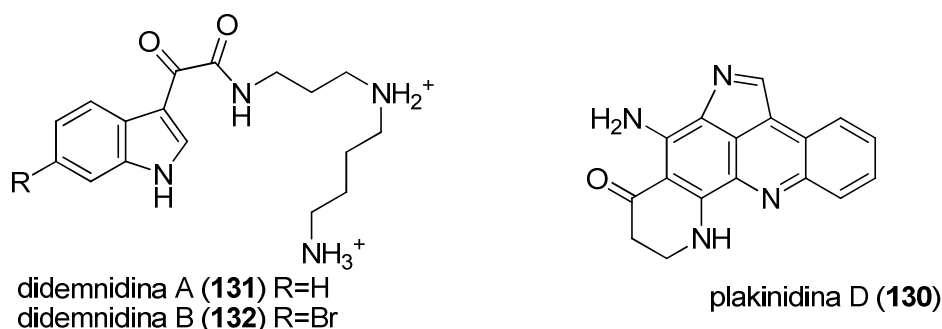


Figura 97: Estruturas dos compostos **130-132**.

Em um estudo realizado com um extrato citotóxico de uma ascídia *Didemnum rubeum*, foram isolados seis novos derivados de iodo-tiraminas (**133-138**) (**Fig. 98**). Aparentemente, esses derivados que são muitas vezes encontrados em amostras de ascídias do gênero *Didemnum*, são produzidos pela associação do tunicado com algas simbiotes procarióticas devido à facilidade destas de fixar nitrogênio (Solano et al., 2009).

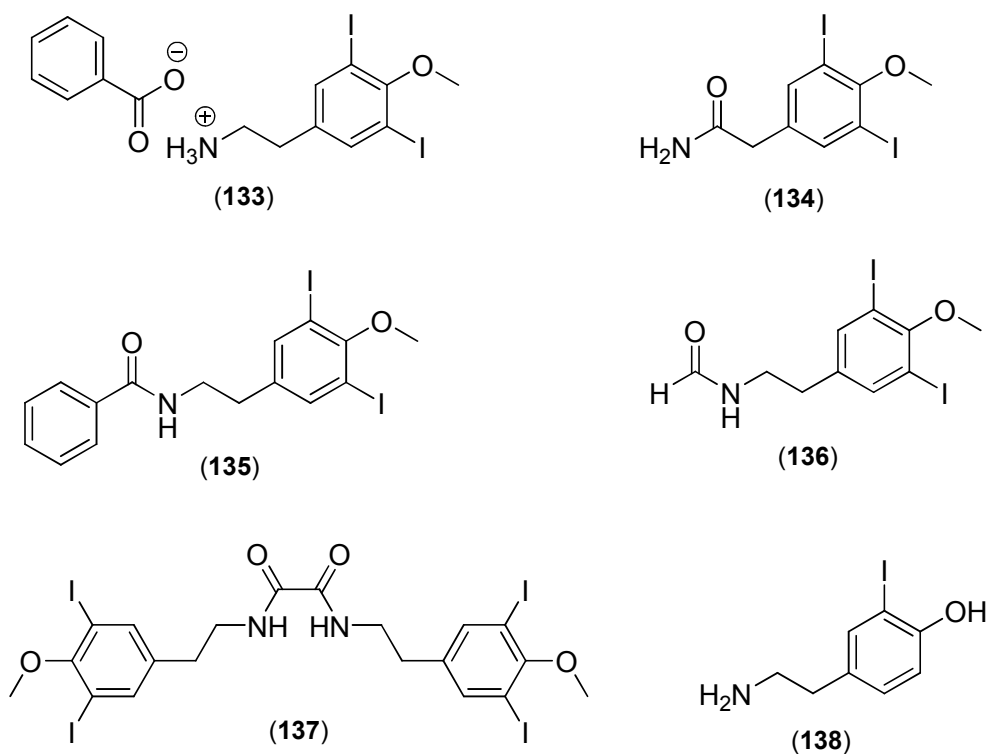
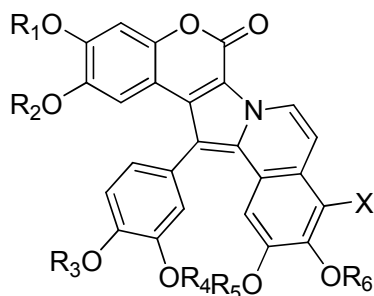


Figura 98: Estruturas dos compostos **133-138**.

Uma classe de compostos muito encontrada em ascídias do gênero *Didemnum* são as lamellarinas, uma série de alcalóides isolados pela primeira vez de moluscos do gênero *Lamellaria* em 1985 por Faulkner e colaboradores (Andersen, 1985). Desde então mais de 30 compostos dessa classe foram isolados a partir de ascídias. As lamellarinas não somente possuem interessante característica estrutural, como também exibem as mais diversas atividades biológicas que incluem a inibição de divisão celular, citotoxicidade, imunomodulatória e ainda função reversa de resistência multidrogas (Reddy et al., 2005).

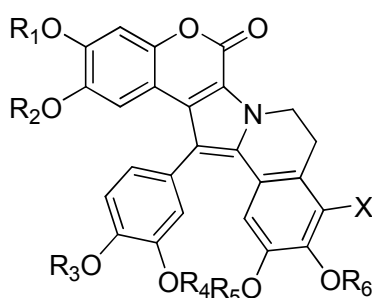
O trabalho mais recente de isolamento de novas lamellarinas foi realizado com extratos da ascídia *Didemnum obscurum* coletada na costa da Índia. Neste estudo foram isoladas as lamellarinas- ζ , η , ϕ e χ (**139-142**) (**Fig. 99**) juntamente com outras já conhecidas. As novas lamellarinas isoladas apresentaram atividade citotóxica frente a uma linhagem de células de câncer COLO-205, com IC_{50} de 0,0056; 0,178; 0,056 e 0,0002 μM respectivamente (Reddy et al., 2005).



(139) R₁= H, R₂= Me, R₃= Me, R₄= Me, R₅= Me, R₆= Me, X= OMe

(140) R₁= H, R₂= Me, R₃= Me, R₄= Me, R₅= Me, R₆= Me, X= H

(141) R₁= Ac, R₂= Me, R₃= Ac, R₄= Me, R₅= Ac, R₆= Me, X= OMe



(142) R₁= Ac, R₂= Me, R₃= Ac, R₄= Me, R₅= Me, R₆= Ac, X= H

Figura 99: Estruturas dos compostos 139-142.

Em um estudo realizado em nosso grupo de pesquisa com duas amostras de ascídias do gênero *Didemnum*, foram isoladas duas diketopiperazinas modificadas, as rodriguesinas A (143) e B (144) (Fig. 100), como uma mistura de homólogos, além da *N*-acetil-rodriguesina A (145) e B (146) (Fig. 100). A mistura contendo os compostos (143) e (144) apresentou atividade antibiótica moderada contra um isolado clínico de *Streptococcus mutans*, *S. mutans* UA159 e *S. aureus* ATCC6538 (Kossuga et al., 2009). As diketopiperazinas são os menores peptídeos cíclicos conhecidos, sendo tipicamente consideradas como metabólitos secundários de fungos, aumentando ainda mais a dúvida sobre sua real origem biossintética (Martins e Carvalho, 2007; Thomson, 1985). Dentre vários exemplos de compostos desta classe estrutural que apresentaram atividade biológica, podemos citar a fenilhistina (147) (Fig. 101), um metabólito isolado de *Aspergillus ustus* que mostrou ser citotóxico em diversas linhagens de células tumorais (Kano et al., 1999), as

ciclomarazinas A (**148**) e B (**149**) (**Fig. 101**) obtidos da bactéria marinha *Salinispora arenicola* CNS-205 com moderada atividade antimicrobiana (Schultz et al., 2008), entre outros.

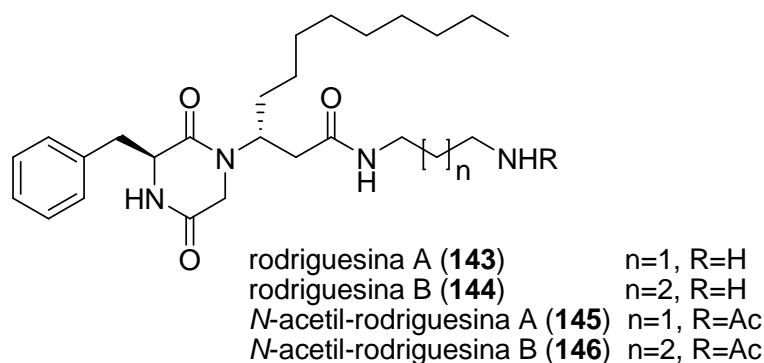


Figura 100: Estruturas dos compostos **143-146**.

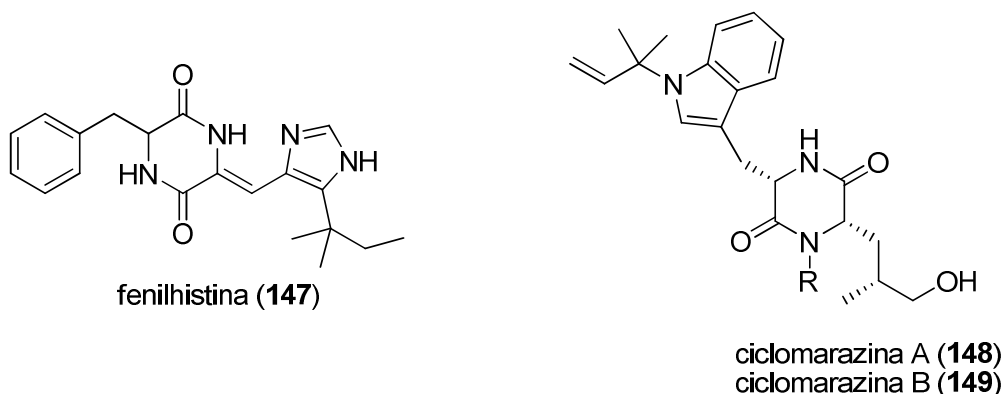


Figura 101: Estruturas dos compostos **147-149**.

Em outro trabalho, foi verificado que o extrato metanólico da ascídia *Didemnum granulatum*, coletada no Brasil, apresentou atividade em um novo teste para detectar substâncias inibidoras do ponto de checagem G2 do ciclo celular. O fracionamento deste extrato levou ao isolamento das didemnimidas A-D (**150** e **153**) (**Fig. 102**), anteriormente isoladas da ascídia *Didemnum conchyliatum*, de um novo alcalóide denominado didemnimida E (**154**) e de um novo composto inibidor do ponto de checagem G2 do ciclo celular, posteriormente identificado como isogranulatimida (**155**). O posterior estudo do extrato de *D.granulatum* levou ao isolamento da granulatimida (**156**) e da 6-bromogranulatimida (**157**) (**Fig. 102**). Os compostos isogranulatimida (**155**) e granulatimida (**156**), produtos da ciclização da didemnimida A (**150**), constituem os primeiros exemplos de

uma nova classe de compostos inibidores do ponto de checagem G2 do ciclo celular (Berlinck et al., 1998; Britton et al., 2001).

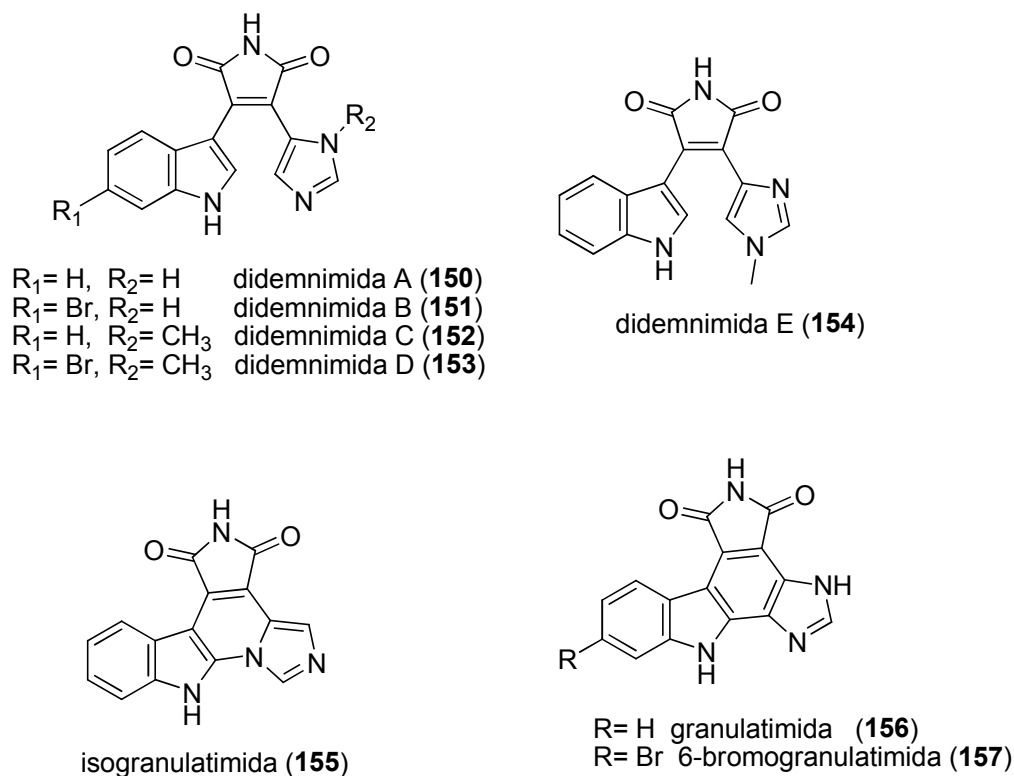


Figura 102: Estruturas dos compostos **150-157**.

6.1.2 Procedimento experimental: ascídia *Didemnum* sp.

A ascídia *Didemnum* sp. foi coletada em 2007 na Baía de Todos os Santos, Salvador-BA, sendo liofilizada para preservação. A amostra estudada no trabalho (160,0 g do animal seco) foi triturada em liquidificador com MeOH para uma primeira extração. A massa foi filtrada em celite + papel de filtro e o sólido foi extraído com aproximadamente 700 mL de uma mistura MeOH/EtOH 1:1 durante algumas horas. Filtrou-se novamente e o procedimento de extração com MeOH/EtOH repetido mais duas vezes, sendo realizada posteriormente uma última extração com MeOH 100% (400 mL). O volume total obtido foi concentrado em evaporador rotativo até obter-se aproximadamente 400 mL da suspensão alcoólica; adicionou-se cerca de 10% do volume de H₂O e realizou-se uma partição com hexano (6 x 300 mL). O extrato metanólico obtido foi concentrado para remoção do solvente

orgânico, completando-se o volume com H₂O até 200 mL para realização de uma partição com AcOEt (5 x 200 mL), obtendo-se assim, os extratos aquoso e de AcOEt.

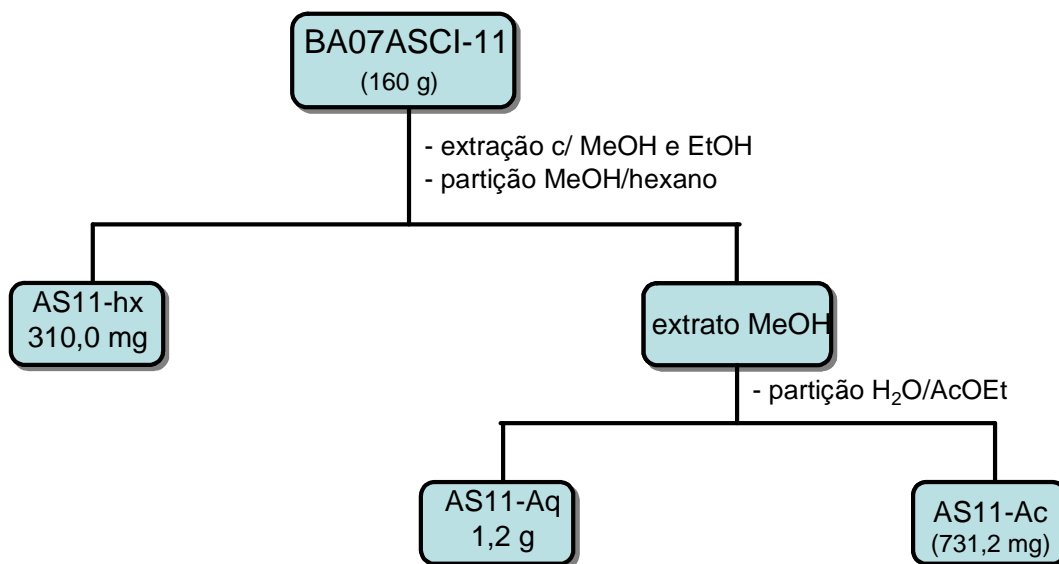


Figura 103: Processo de extração da ascídia *Didemnum* sp.

O extrato AS11-Ac (731,2 mg) da ascídia *Didemnum* sp. foi submetido a uma cromatografia de permeação em gel (Sephadex-LH20), utilizando-se MeOH como eluente. As diversas frações coletadas foram analisadas por CCD utilizando os reveladores ácido fosfomolibdico e ninidrina, e reunidas de acordo com a similaridade cromatográfica. Este processo forneceu 6 novas frações, ASAc-1 (179,2 mg), ASAc-2 (288,1 mg), ASAc-3 (102,0 mg), ASAc-4 (40,0 mg), ASAc-5 (19,4 mg) e ASAc-6 (41,6 mg), que foram analisadas por LC-UV-MS.

Com base nos dados obtidos nestas análises, a fração ASAc-2 foi separada por cromatografia em coluna pré-empacotada de sílica-gel derivatizada com grupos C₁₈, utilizando-se um gradiente de MeOH em H₂O (H₂O/MeOH 8:2, 7:3, 6:4, 1:1, 4:6, 3:7, 2:8 e MeOH 100%) como fase móvel. As frações coletadas foram analisadas por CCD da mesma forma como descrita para o extrato AS11-Ac, reunindo-se de acordo com o perfil cromatográfico apresentado. Oito novas frações foram obtidas: ASAc-2a (27,2 mg), ASAc-2b (5,4 mg), ASAc-2c (1,5 mg), ASAc-2d (78,5 mg), ASAc-2e (17,1 mg), ASAc-2f (15,8 mg), ASAc-2g (71,1 mg) e ASAc-2h (42,5 mg). Após análise por LC-UV-MS, a fração ASAc-2d foi

selecionada para ser purificada por HPLC. Utilizou-se uma coluna de sílica-gel derivatizada com grupos C₁₈ (CSC-Inertsil 150A/ODS2, 5 μm, 250 x 9,4 mm) e um gradiente de MeOH/MeCN 1:1 em H₂O como fase móvel (fluxo de 1,5 mL/min). Obteve-se seis novas frações: ASAc-2d1 (2,0 mg), ASAc-2d2 (2,4 mg), ASAc-2d3 (61,3 mg), ASAc-2d4 (3,4 mg), ASAc-2d5 (2,0 mg) e ASAc-2d6 (0,4 mg), que foram analisadas por LC-UV-MS. Uma mistura de duas dicetopiperazinas modificadas, as rodriguesinas A (143) e B (144), foram identificadas na fração ASAc-2d3, sendo obtidos seus espectros de RMN-¹H e ¹³C e os dados comparados com a literatura.

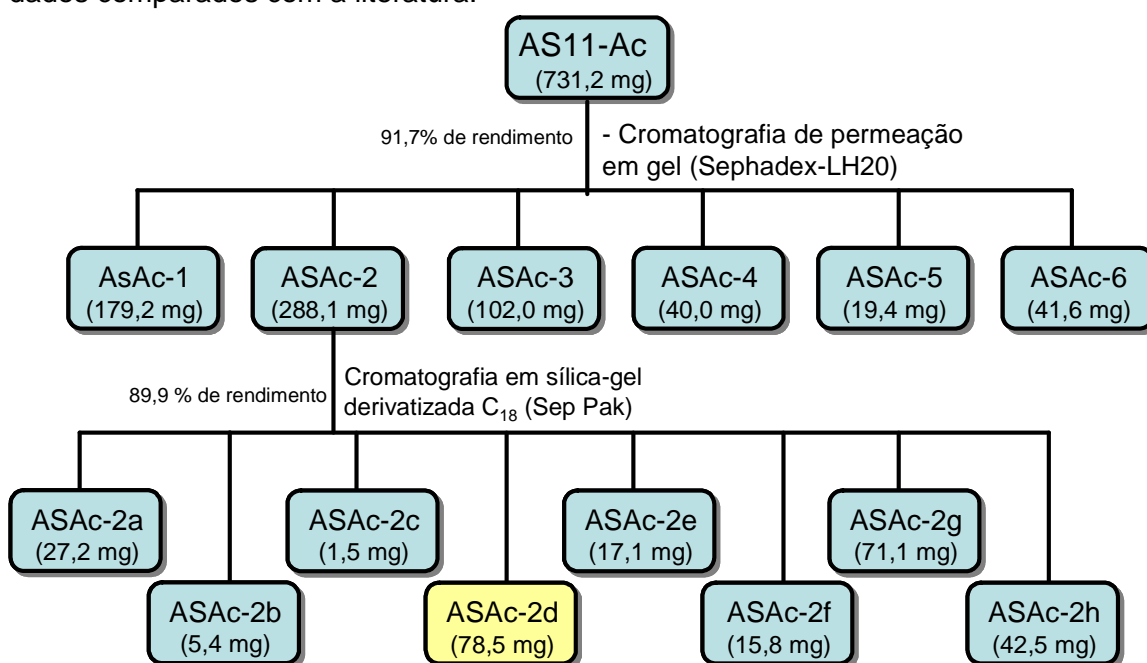


Figura 104: Fracionamento do extrato acetato de etila da ascídia *Didemnum* sp.

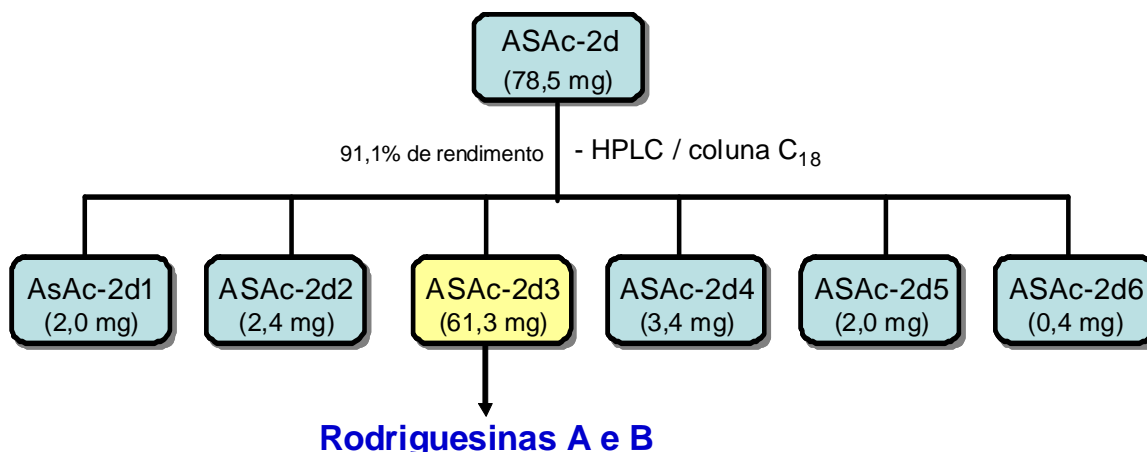


Figura 105: Fracionamento da amostra ASAc-2d.

O extrato aquoso (AS11-Aq) foi submetido a uma cromatografia em coluna pré-empacotada de sílica-gel derivatizada com grupos C₁₈, utilizando como eluentes H₂O 100%, MeOH/ H₂O 1:1 e MeOH 100%, obtendo-se três novas frações no processo: AS11-Aq1, AS11-Aq2 (431,0 mg) e AS11-Aq3 (377,0 mg) os quais foram analisados por LC-UV-MS. A fração AS11-Aq1 foi descartada.

A fração AS11-Aq2 foi submetida a uma nova cromatografia em coluna pré-empacotada (C₁₈), utilizando-se um gradiente de MeOH em H₂O, com início em MeOH/H₂O 1:9 até MeOH 100%, como fase móvel. As diversas frações obtidas foram analisadas por CCD, utilizando ácido fosfomolibdico e ninidrina como reveladores, e posteriormente reunidas em 7 novas frações: AS11-Aq2a (73,7 mg), AS11-Aq2b (37,7 mg), AS11-Aq2c (91,0 mg), AS11-Aq2d (42,7 mg), AS11-Aq2e (55,1 mg), AS11-Aq2f (27,7 mg) e AS11-Aq2g (53,0 mg), que foram analisadas por LC-UV-MS. A fração AS11-Aq2c foi selecionada para ser purificada por HPLC, utilizando-se coluna de sílica-gel derivatizada com grupos C₁₈ (CSC-Inertsil 150A/ODS2, 5 μ m, 250 x 9,4 mm) e um gradiente de MeOH/MeCN 1:1 em H₂O (0,1% de ácido fórmico) como fase móvel. O processo forneceu nove novas frações: AS11-Aq2c1 (2,4 mg), AS11-Aq2c2 (1,8 mg), AS11-Aq2c3 (1,4 mg), AS11-Aq2c4 (2,3 mg), AS11-Aq2c5 (1,3 mg), AS11-Aq2c6 (4,5 mg), AS11-Aq2c7 (55,3 mg), AS11-Aq2c8 (1,2 mg) e AS11-Aq2c9 (8,4 mg), as quais foram novamente analisadas por LC-UV-MS. O espectro de massas de baixa resolução (ESI⁺) obtido para a fração AS11-Aq2c5 mostrou dois picos de em *m/z* 457 e 471, podendo indicar a presença de uma mistura de dois compostos estruturalmente muito parecidos. Devido a grande dificuldade em se purificar a amostra, esta foi enviada a colaboradores no Canadá. No entanto a completa identificação estrutural destes compostos ainda não foi finalizada.

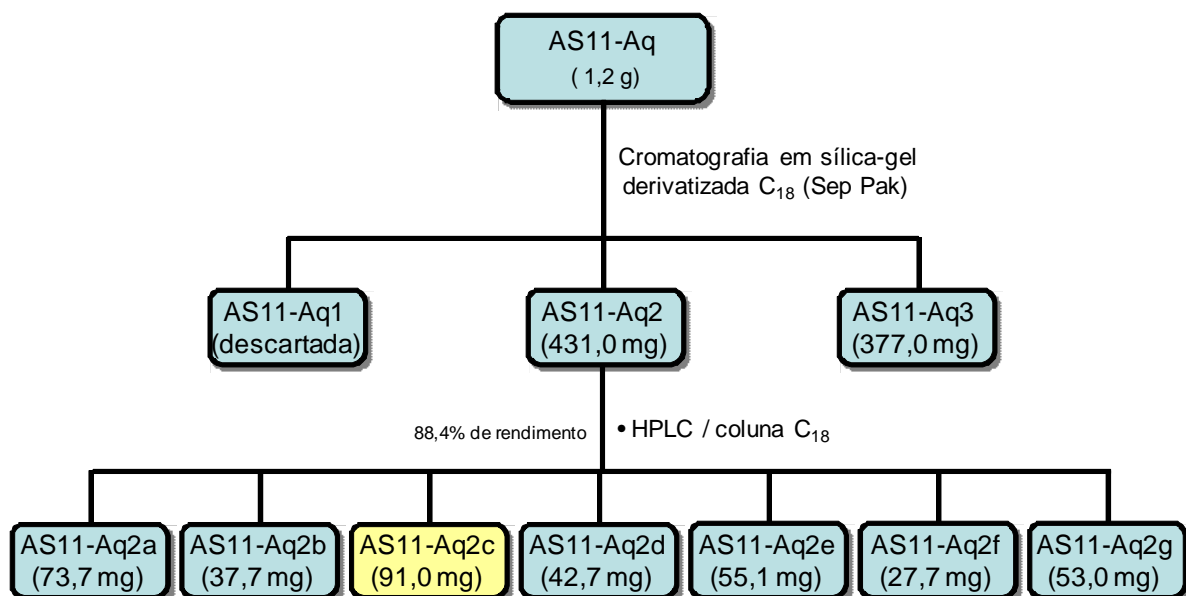


Figura 106: Fracionamento do extrato aquoso da ascídia *Didemnum* sp.

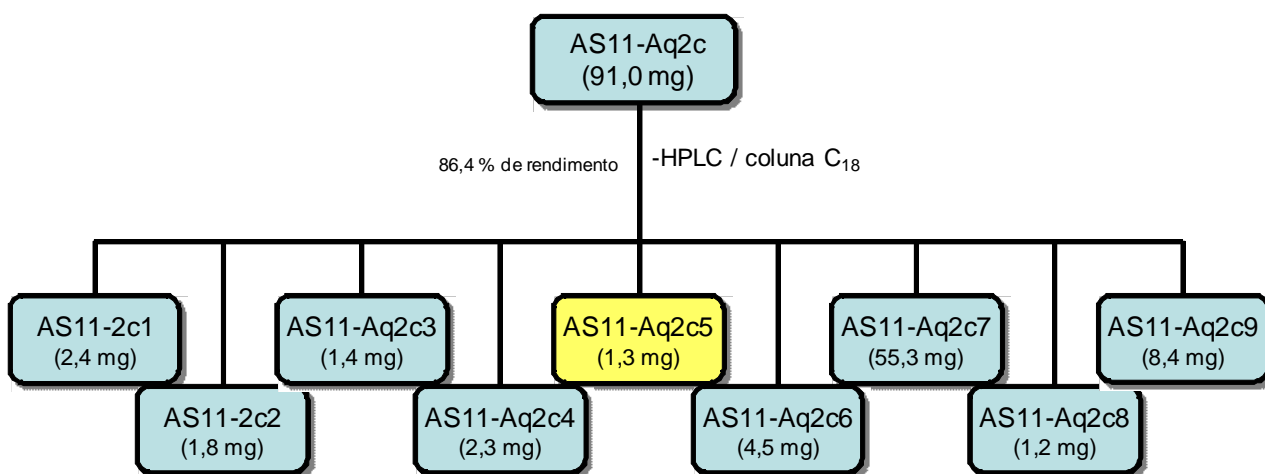


Figura 107: Fracionamento da amostra AS11-Aq2c.

6.1.3 Resultados obtidos no estudo do extrato metanólico da ascídia *Didemnum* sp.

Do extrato de acetato de etila obtido da ascídia *Didemnum* sp. analisado neste trabalho, isolou-se da fração ASAc-2d3 uma mistura de dois compostos já descritos na literatura, as rodriguesinas A (143) e B (144). Estes compostos foram originalmente isolados em um outro estudo com uma ascídia do gênero *Didemnum*, coletadas na Baía de Todos os

Santos (Salvador-BA), em trabalho realizado em nosso grupo de pesquisa (Kossuga et al., 2009). A identificação estrutural foi realizada por comparação dos dados espectroscópicos obtidos [RMN-¹H (**Figura 6.1**, anexo), ¹³C (**Figura 6.2**, anexo), UV-vis e massas (ESI⁺)] da fração contendo a mistura das dicetopiperazinas com os dados da literatura (Kossuga et al., 2009).

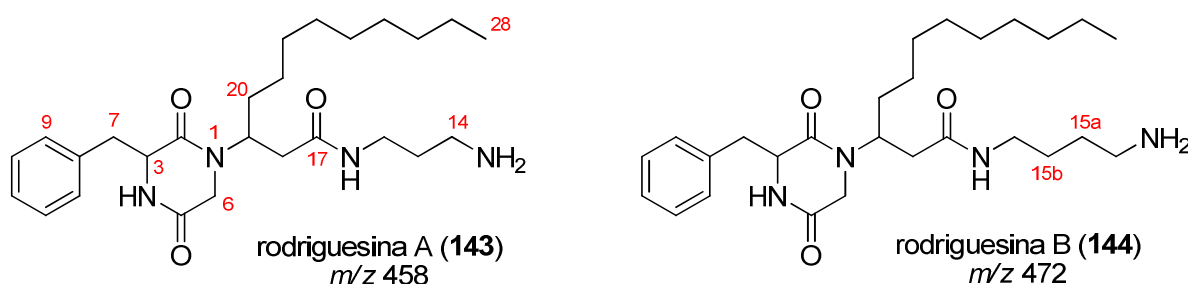


Figura 108: Estruturas das rodriguesinas A e B.

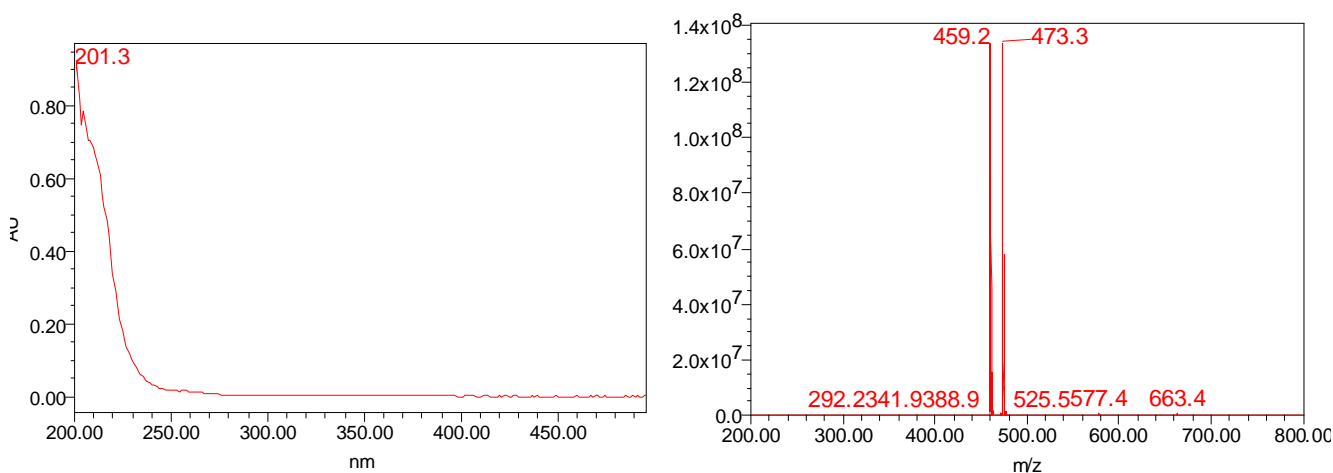


Figura 109: Espectros no ultravioleta e de massas (ESI⁺) da fração ASAc-2d3.

As rodriguesinas A e B na forma de mistura foram testadas, no trabalho realizado anteriormente, de acordo com sua atividade antibacteriana contra um isolado clínico de *Streptococcus mutans*, *S. mutans* UA159 e *S. aureus* ATCC6538, apresentando atividade moderada (Kossuga, 2009). No presente trabalho, as atividades leishmanicida e tripanomicida foram avaliadas *in vitro* para a mistura dos compostos.

A atividade leishmanicida contra *Leishmania chagasi* na forma promastigota mostrou que os compostos apresentaram um valor de IC₅₀ de 31,87 µg/mL, enquanto que para o teste com amastigotas intracelulares, o valor de IC₅₀ foi de 46,01 µg/mL. Geralmente, a atividade leishmanicida é avaliada em promastigotas. Entretanto, amastigotas intracelulares de *L.chagasi* são patologicamente mais relevantes, por apresentarem um metabolismo distinto e uma elevada resistência no tratamento terapêutico se comparados aos promastigotas extracelulares (Rabinovitch et al., 1987). A mistura dos compostos **143** e **144** foi testada ainda quanto a sua atividade tripanossomicida, apresentando um IC₅₀ de 34,06 µg/mL, e citotoxicidade de CC₅₀ 33,88 µg/mL. Os dados dos ensaios mostram que, apesar da mistura de compostos ter apresentado uma interessante atividade contra células tripomastigotas, quando comparado ao fármaco padrão (IC₅₀ 34,06 e 114,7 µg/mL respectivamente), esta mostra um padrão de relativa citotoxicidade, que é indesejável. A **Tabela 18** ilustra os dados obtidos nos bioensaios realizados.

Tabela 18 – Resultado do teste leishmanicida contra o parasita *Leishmania chagasi* e da atividade tripanossomicida contra *T.cruzi* dos compostos (**143-144**) isolados da ascídia *Didemnum* sp..

Composto	IC ₅₀ µg/mL promastigotas (<i>L. chagasi</i>) (C.I.95%)	IC ₅₀ µg/mL amastigotas (<i>L. chagasi</i>) (C.I.95%)	IC ₅₀ µg/mL tripomastigotas (<i>T. cruzi</i>) (C.I.95%)	CC ₅₀ µg/mL NCTC (C.I.95%)	Concentração maxima testada (µg/mL)
143 e 144	31,87	46,01	34,06	33,88	100 (ama) 150 (pro e tripo) 100 (NCTC)
Pentamidina	0,089			11,69	
Glucantima		25,01			
Benznidazol			114,7	122,3	

A partir do fracionamento do extrato aquoso (AS11-Aq) da ascídia *Didemnum* sp., obteve-se na fração AS11-Aq2c5 uma mistura de compostos que apresentaram picos dos

íons *quasi*-moleculares em m/z 457 e 471 em seu espectro de massas (ESI⁺) obtido nas análises por LC-UV-MS, indicando que os compostos teriam massas moleculares de 456 e 470 Da. (**Figura 110**). Ao compararmos esses valores (m/z 457 e 471) com as massas das rodriguesinas A e B (m/z 459 e 473) isoladas no extrato acetato de etila desta ascídia, nota-se uma diferença de duas unidades de massa para cada um dos picos, podendo significar que as estruturas dos compostos presentes nesta fração se diferenciem por uma insaturação (ligação dupla), em relação às estruturas das rodriguesinas.

O espectro de RMN-¹H da fração AS11-Aq2c5 foi obtido (**Figura 6.3**, anexo), ainda que esta não se encontrasse totalmente pura. É possível observar no espectro obtido um sinal em δ 5,29, região do espectro onde se observa sinais de hidrogênios ligados a carbonos do tipo sp^2 , sendo que nenhum sinal é visto nessa região do espectro da mistura das rodriguesinas A (**143**) e B (**144**). Nas demais regiões, os espectros tanto dos compostos não identificados, quanto da mistura da rodriguesinas, apresentam perfis praticamente idênticos, indicando uma similaridade estrutural. Devido à dificuldade em se purificar totalmente esta fração e a pouca quantidade de massa disponível (1,3 mg), esta amostra foi enviada para colaboradores no Canadá com o intuito de se realizar a purificação final destas, e a obtenção de novos dados espectroscópicos que possibilitem a elucidação estrutural destes compostos. No entanto esses dados não foram adquiridos em tempo suficiente para a discussão no presente trabalho.

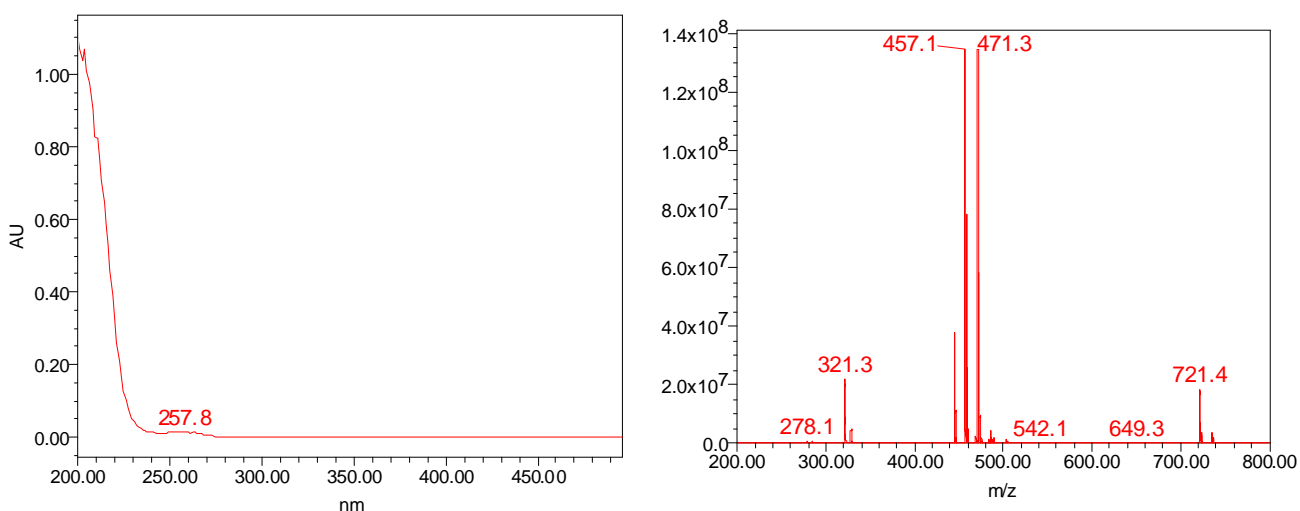


Figura 110: Espectros no ultravioleta e de massas (ESI⁺) da fração AS11-Aq2c5.

6.2 Nudibrânquio *Pleurobranchus areolatus*

6.2.1 Introdução

Moluscos pertencentes à Família Pleurobranchidae se caracterizam por possuírem apenas uma concha interna bem reduzida, enquanto que sua estratégia de defesa é geralmente descrita como sendo devido a uma descarga de uma secreção ácida, quando estes são molestados (Spinella et al., 1997). Normalmente, os moluscos desta família são relativamente grandes (já sendo descritos espécimes com até 20 cm de comprimento), quando comparados à maioria das espécies de nudibrânquios. Estes animais são muitas vezes encontrados predando animais sésseis como esponjas marinhas e ascídias, acumulando alguns de seus metabólitos em seu organismo.

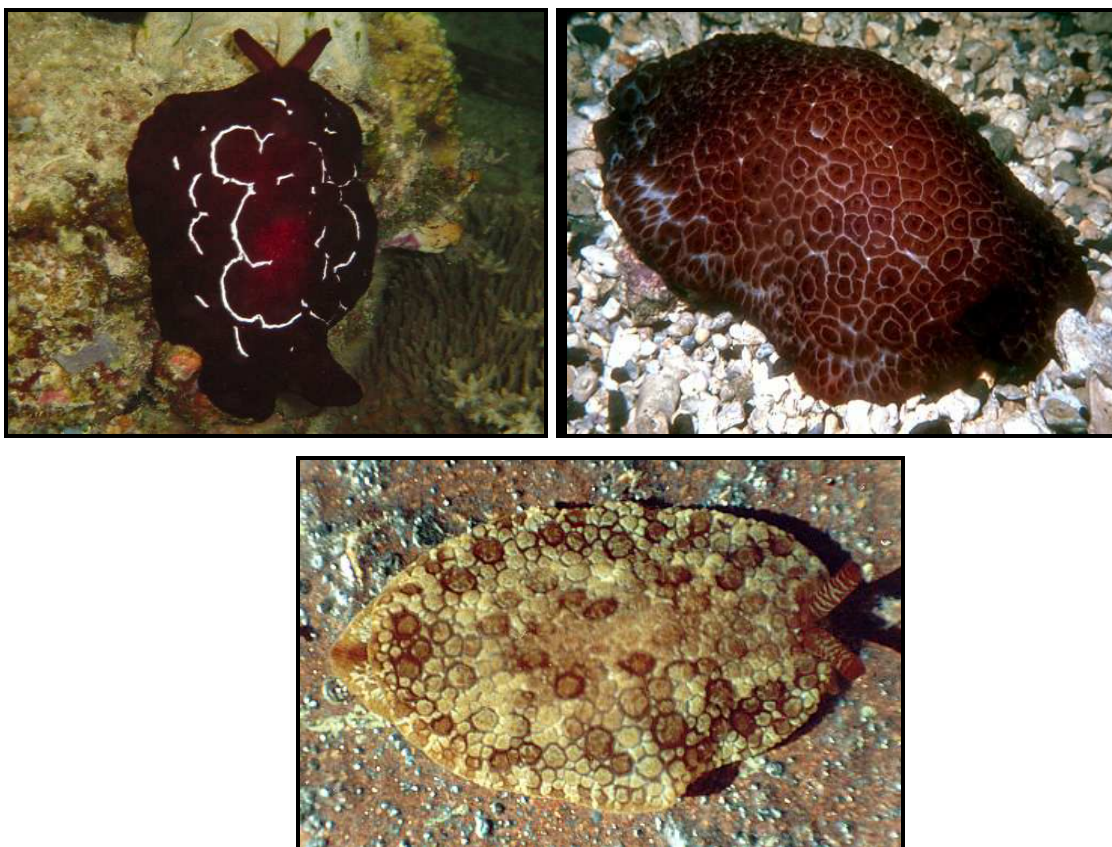


Figura 111: Fotografias dos nudibrânquios *Pleurobranchus forskalii* (http://www.nudipixel.net/species/pleurobranchus_forskalii), *P. grandis* (<http://seaslugsofhawaii.com/species/Pleurobranchus-grandis-a.html>) e *P. areolatus* (<http://www.seaslugforum.net/find/pleuareo>).

Diversos trabalhos encontrados na literatura mostram que os nudibrânquios do gênero *Pleurobranchus* podem se apresentar como uma fonte de compostos biologicamente ativos. A keenamida A (**158**) (**Fig. 112**), um hexapeptídeo cíclico citotóxico, foi isolado a partir de extratos do nudibrânquio *Pleurobranchus forskalii*. O composto apresentou atividade contra várias linhagens de células tumorais, com um $IC_{50} = 2,5 \mu\text{g/mL}$ frente a P-388, A-549 e MEL-20, e $IC = 5,0 \mu\text{g/mL}$ contra HT-29 (Wesson e Hamann, 1996).

Uma série de diterpenos clorados, sendo três novos (**159-161**) (**Fig. 112**) e cinco conhecidos na literatura, foi isolada a partir dos moluscos *Pleurobranchus albiguttatus* e *P. forskalii* coletados nas Filipinas. Presume-se que os diterpenos encontrados nestes animais foram adquiridos a partir de ascídias do gênero *Lissoclinum*, das quais se alimentam, e que se apresentaram como fonte de compostos relacionados. Os compostos clorolissoclimida (**162**) e diclorolissoclimida (**163**) se mostraram potentes citotoxinas em um ensaio do National Cancer Institute, contra 60 linhagens de células tumorais, e apresentando alguma seletividade por melanomas (Fu et al, 2004).

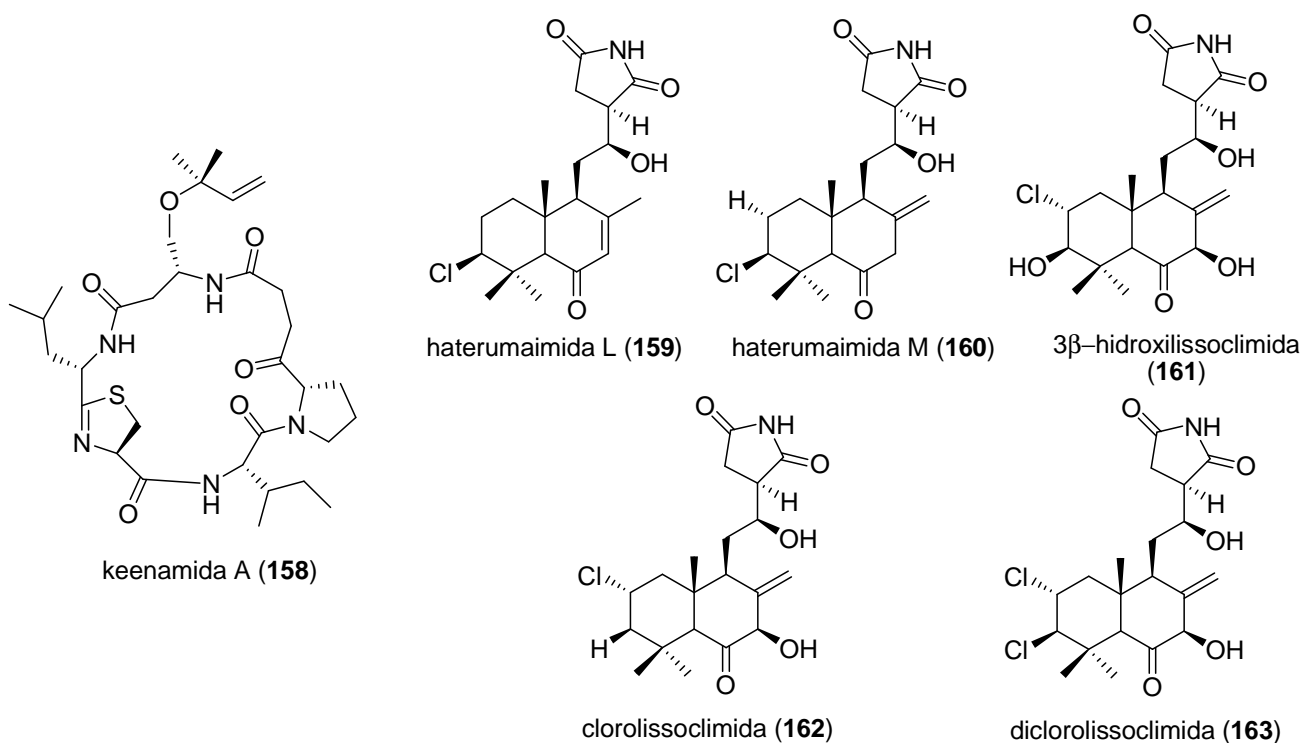


Figura 112: Estruturas dos compostos **158-163**.

Dois triterpenos, testudinariol A (**164**) e B (**165**) (**Fig. 113**), foram isolados de espécimes do nudibrânquio *Pleurobranchus testudinarius* coletados no sul da Itália. A presença destes compostos na parte mais exposta destes espécimes e também em seu muco é um forte indicativo de que são utilizados como defensores do animal. O testudinariol A apresentou atividade ictiotóxica frente ao peixe *Gambusia affinis* em uma concentração de 9 ppm (Spinella et al, 1997).

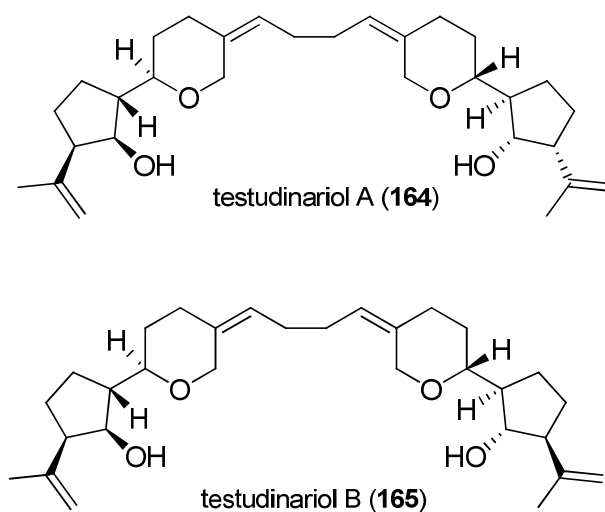


Figura 113: Estruturas dos compostos **164** e **165**.

6.2.2 Procedimento experimental: nudibrânquio *Pleurobranchus areolatus*

Um único indivíduo do nudibrânquio *Pleurobranchus areolatus* foi coletado na Ilha do Papagaio, em Cabo Frio-RJ e preservado em EtOH. O procedimento de extração utilizado foi semelhante ao do nudibrânquio *Tambja stegosauriformis* (Capítulo 5, pag. 68), onde os extratos MeOH (Pame), acetona/diclorometano 1:1 (PaAD) e diclorometano/MeOH 1:1 (PaMD) foram reunidos e então realizada uma partição líquido-líquido com MeOH e hexano, dando origem aos extratos metanólico (Pame) e hexânico (Pahx).

O extrato metanólico foi submetido a uma separação por cromatografia em coluna pré-empacotada contendo sílica-gel derivatizada com grupos C₁₈ como fase estacionária, utilizando-se um gradiente de MeOH em H₂O como eluente. O procedimento gerou 8 novas

frações: Pame-1 (137,8 mg), Pame-2 (29,5 mg), Pame-3 (16,0 mg), Pame-4 (22,4 mg), Pame-5 (25,4 mg), Pame-6 (95,3 mg), Pame-7 (44,0 mg) e Pame-8 (10,5 mg), as quais foram analisadas por LC-UV-MS. Todas as análises por LC-UV-MS das frações do extrato metanólico de *P. areolatus* foram realizadas em fase reversa utilizando uma coluna analítica de sílica-gel derivatizada com grupos C₁₈ (Waters X-Terra MS C₁₈, 3,5 μm, 2,1 x 50 mm, com fluxo de 0,5 mL/min), e um gradiente de MeOH/MeCN 1:1 em H₂O (com 0,1% de ácido fórmico) como eluente; espectros de UV-vis obtidos para a região entre 200-400 nm no detector de arranjo de fotodiodos (PDA); espectros de massas de baixa resolução obtido em modo de ionização por eletrospray positivo utilizando-se a voltagem do cone em 25V, observando-se íons de massa entre *m/z* 180-700.

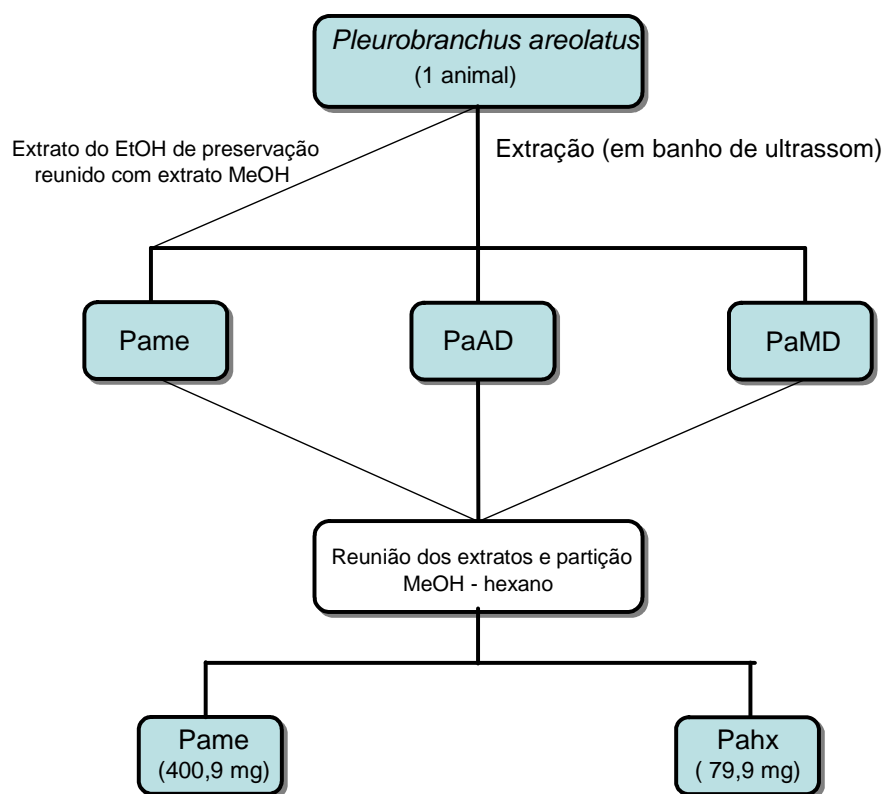


Figura 114: Extração e fracionamento do extrato metanólico do nudibrânquio *Pleurobranchus areolatus*

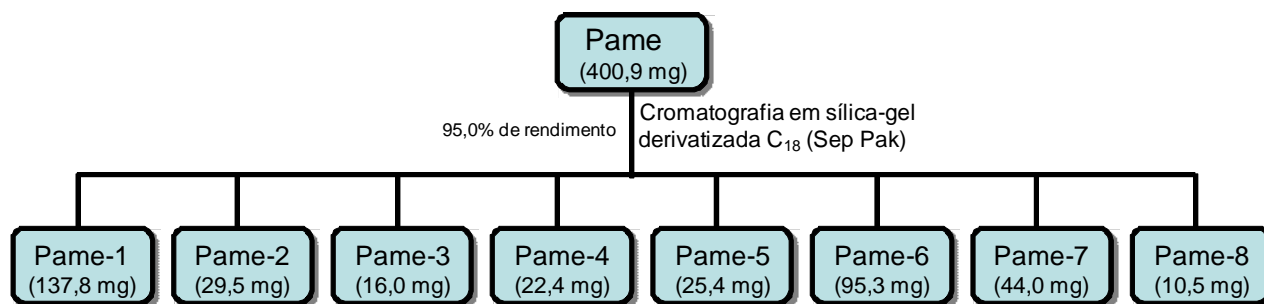


Figura 115: Fracionamento do extrato metanólico do nudibrânquio *Pleurobranchus areolatus*.

Com base nos dados obtidos, as frações Pame-3 e -4 foram reunidas devido a grande semelhança de seus perfis químicos, e a nova fração Pame-3 (48,0 mg) foi então submetida a uma separação cromatográfica em HPLC em fase reversa, utilizando uma coluna de sílica-gel derivatizada com grupos fenila (Inertsil Ph, 5 μ m, 4,6 x 250 mm, GL Sciences Inc.), e um gradiente de MeOH/MeCN em água como fase móvel.

A separação forneceu cinco novas frações, Pame-3a (2,9 mg), Pame-3b (1,1 mg), Pame-3c (2,0 mg), Pame-3d (40,0 mg), e Pame-3e (0,5 mg), que foram mais uma vez analisadas por LC-UV-MS. A fração Pame-3d apresentou o perfil mais interessante nas análises por LC-UV-MS, e desta forma uma nova purificação por HPLC em fase reversa foi realizada, utilizando uma coluna analítica (Inertsil ODS-3, 5 μ m, 4,6 x 250 mm, GL Sciences Inc.) de sílica-gel derivatizada com grupos C₁₈ e uma mistura de MeOH/MeCN/H₂O (com 0,1% TFA) como eluente em modo isocrático. As seis novas frações obtidas, Pame-3d1 (6,3 mg), Pame-3d2 (8,9 mg), Pame-3d3 (7,1 mg), Pame-3d4 (2,3 mg), Pame-3d5 (5,5 mg) e Pame-3d6 (7,9 mg) foram analisadas por LC-UV-MS e, com os dados de massas obtidos, realizou-se buscas nos bancos de dados SciFinder e MarinLit com o objetivo de se encontrar informações sobre compostos já conhecidos e identificar as frações mais interessantes para serem purificadas.

Após purificação por HPLC da fração Pame-3d5, foi possível o isolamento do composto (**166**) (**Fig. 119**, pg. 129), que apresentou pico do íon *quasi*-molecular em m/z 503. A identificação estrutural foi realizada a partir da análise de espectros de RMN-¹H e

^{13}C , mono e bi-dimensional (COSY, HSQC e HMBC), e espectrometria de massas de alta resolução.

A fração Pame-3d6 também foi purificada por HPLC utilizando coluna de sílica-gel derivatizada com grupo C_{18} (Inertsil ODS-EP, $5\ \mu\text{m}$, $4,6 \times 250\ \text{mm}$, GL Sciences Inc.) e um gradiente de MeOH/MeCN em H_2O como eluente. O processo resultou no isolamento de um composto que apresentou um espectro de UV-vis com um perfil muito semelhante ao do composto **166** citado acima, e o pico do íon *quasi*-molecular em m/z 519, indicando possuir uma massa molecular de 518 Da. A estrutura do composto **167** (Fig. 125, pg. 136) foi determinada usando as mesmas técnicas espectroscópicas e procedimento semelhante ao utilizado para o composto **166**, devido a similaridade estrutural entre ambas as substâncias.

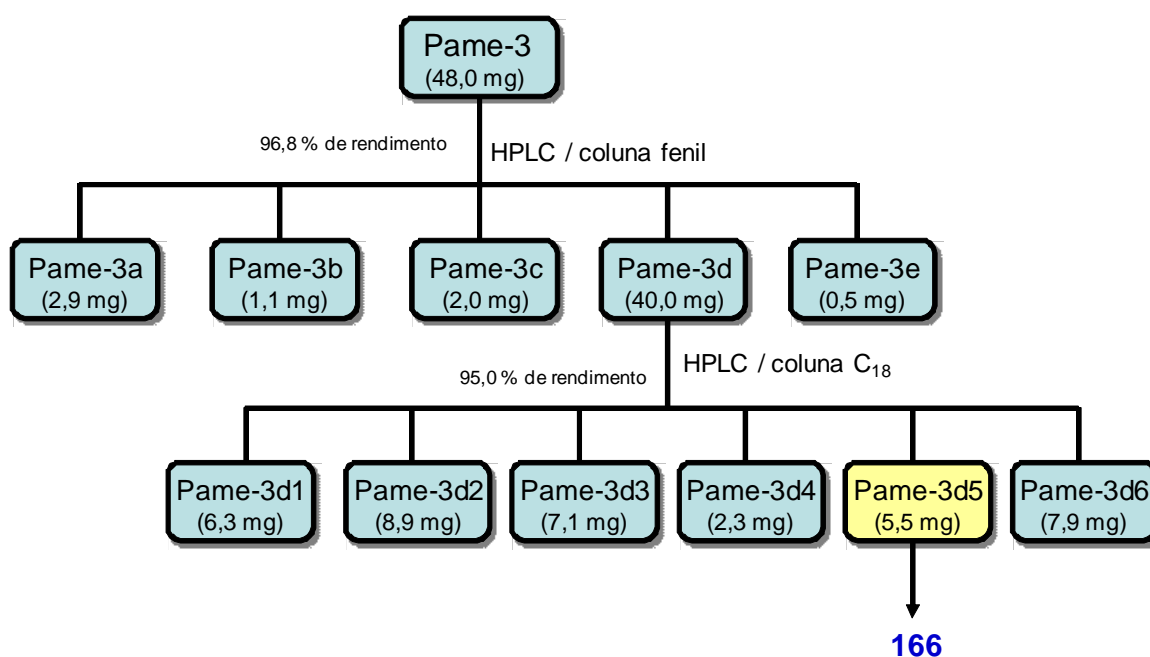


Figura 116: Fracionamento da amostra Pame-3.

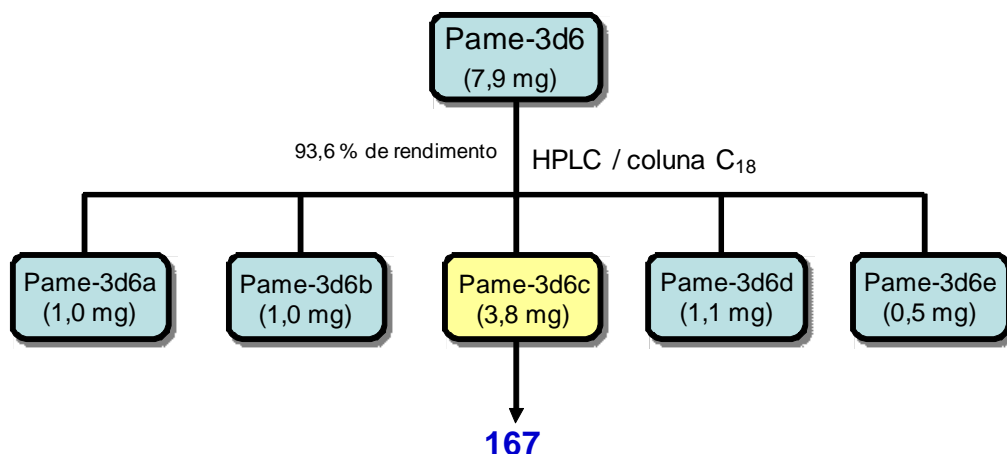


Figura 117: Fracionamento da amostra Pame-3d6.

6.2.3 Resultados: extrato metanólico do nudibrânquio *Pleurobranchus areolatus*

A elucidação estrutural do composto (**166**) foi realizada com base na análise dos espectros de RMN-¹H, RMN-¹³C, HMQC, HMBC e COSY ¹H-¹H (**Figuras 6.4 a 6.9**, anexo), e ainda seu espectro de massas de alta resolução (**Figura 6.10**, anexo). Devido à semelhança estrutural, os dados obtidos para este composto foram também comparados com os dados espectroscópicos das rodriguesinas A e B, duas dicetopiperazinas isoladas a partir do extrato de uma ascídia *Didemnum* sp.

A partir da análise do espectro de RMN-¹H (**Figura 6.4**, anexo), podemos observar sinais em valores de δ entre 7,14 e 7,27, seguindo um padrão de acoplamento em que se propõe tratar-se de um anel benzênico monossustituído. No espectro de RMN-¹³C observa-se sinais entre δ 126,8 e 129,9 que apresentam acoplamento com esses hidrogênios citados, segundo o espectro do tipo HSQC (acoplamento ¹H-¹³C de curta distância). No espectro de RMN-¹H observa-se ainda:

- sinais entre δ 8,25 e 7,69 referentes a hidrogênios ligados a N;
- singlete em δ 3,56 referente a hidrogênios metílicos de um grupo éster;
- diversos sinais entre δ 3,08 e 1,21 referentes a hidrogênios ligados a carbonos do tipo sp^3 ;
- sinal em δ 4,07 referente a hidrogênio ligado a carbono ligado a grupos eletronegativos (carbonilas, N).

No espectro de RMN-¹³C (**Figura 6.5**, anexo) obtido a partir da fração Pame-3d5 é possível se observar sinais em δ 173,4; 169,9; 165,9 e 165,5 que podem ser atribuídos a carbonos de carbonila; observa-se ainda sinais em δ 136,0; 129,9; 128,2 e 126,8 referentes a carbonos de anel aromático; o sinal em δ 51,2 pode ser atribuído a um carbono de grupo metoxila de éster; os inúmeros sinais entre δ 37,9 e δ 24,4 são referentes a carbonos de cadeia alquila do tipo sp^3 .

A partir da análise dos espectros de RMN bidimensionais (COSY, HSQC e HMBC, **Figuras 6.7 a 6.9** do anexo), pode-se sugerir que o anel benzênico é parte constituinte de um resíduo de fenilalanina. No espectro COSY, o hidrogênio em δ 4,07 (H-3; δ_c 56,0) apresentou acoplamento com os hidrogênios em δ 2,88 e 3,03 (CH₂-7; δ_c 39,0). Ainda, no espectro HMBC, tanto H-3 como os hidrogênios CH₂-7 apresentaram acoplamento à longa distância com o carbono aromático em δ 136,0. Além do mais, um dos hidrogênios H-7 (δ 3,03) apresentou acoplamento à longa distância com o sinal de carbonila em δ 165,5, tipicamente atribuído à uma carbonila de amida, enquanto o outro H-7 (δ 2,88) apresentou acoplamento à longa distância com outra carbonila de amida em δ 165,9. Tais resultados sugerem a possibilidade de o resíduo de fenilalanina ser parte de uma dicetopiperazina. A observação de acoplamento de um dos hidrogênios H-6 em δ 3,4 (sinal um pouco encoberto pelo sinal de DMSO) com os mesmos carbonos carbonílicos ajuda na identificação deste fragmento (**Figura 118a**).

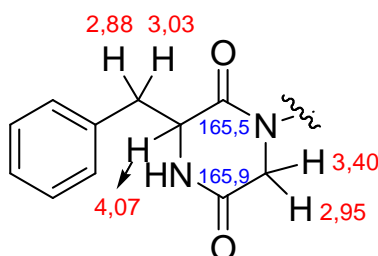


Figura 118a: Fragmento estrutural do composto **166**.

Um outro fragmento estrutural ligado ao nitrogênio da dicetopiperazina pôde ser identificado analisando-se os espectros COSY, HMQC e HMBC. No espectro COSY o metileno CH₂-18 (δ 2,12) apresentou correlação com o sinal largo do hidrogênio em δ 4,50 (δ_C 50,5), enquanto que no espectro HMBC o metileno CH₂-18 apresentou correlação com o sinal de carbonila em δ 169,9. Por sua vez, o hidrogênio metínico em δ 4,50 (H-19) apresentou acoplamento com o metileno em δ 1,35 e 1,47 (CH₂-20; δ_C 29,7), o qual está acoplado com outro grupo metileno em δ 1,02 (CH₂-21; δ_C 25,3). Este CH₂-21 é substituído pela cadeia alifática que apresenta seus sinais de hidrogênio em δ 1,21 (CH₂-22 a 25; δ_C 28,7/28,6/28,5/28,4), que apresentam acoplamento com hidrogênios metilênicos em δ 1,50 (CH₂-26; δ_C 24,4) e na seqüência com CH₂-27 (δ_C 33,2; H-27 δ 2,26). Observa-se no espectro HMBC que estes hidrogênios H-27 acoplam com um carbono carbonílico em δ 173,4, que pode ser associado a um grupo éster. Corroborando com essa sugestão, observa-se que os hidrogênios de grupo metila em δ 3,56 (CH₃-30; δ_C 51,2), com deslocamentos típicos de grupo metoxila, também acoplam com este carbono carbonílico.

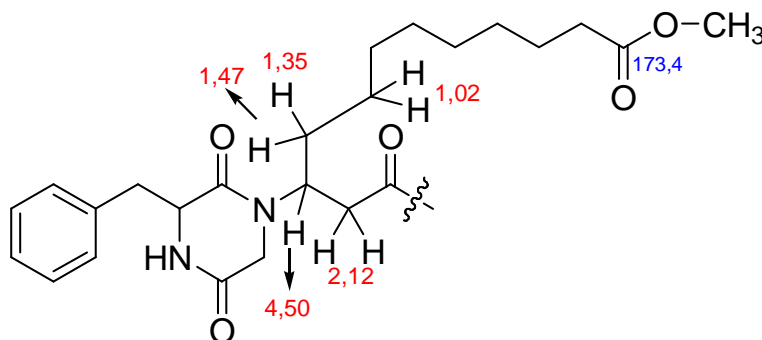


Figura 118b: Fragmento estrutural do composto 166.

O último fragmento estrutural indicou ser formado por um grupo do tipo 1,3-diamino propano. Observa-se que os hidrogênios em δ 2,76 (CH₂-14; δ_C 36,8) acoplam com outro grupo metileno em δ 1,64 (CH₂-15; δ_C 27,4), que por sua vez apresenta acoplamento com um grupo metileno em δ 3,08 (CH₂-16; δ_C 35,6). Considerando-se os valores de deslocamento químico dos hidrogênios (δ 2,76 e 3,08) e de carbono (δ 35,6 e 36,8)

observados para esses grupos metilênicos CH₂-14 e -16, pode-se dizer que se tratam de metilenos *N*-substituídos. Outra informação importante é o fato de observarmos um acoplamento a longa distância dos hidrogênios CH₂-16 com o carbono de carbonila em δ 169,9 (H17), encontrando-se a ligação deste fragmento com o restante da molécula. A **Figura 119** mostra a estrutura do composto e seus deslocamentos químicos.

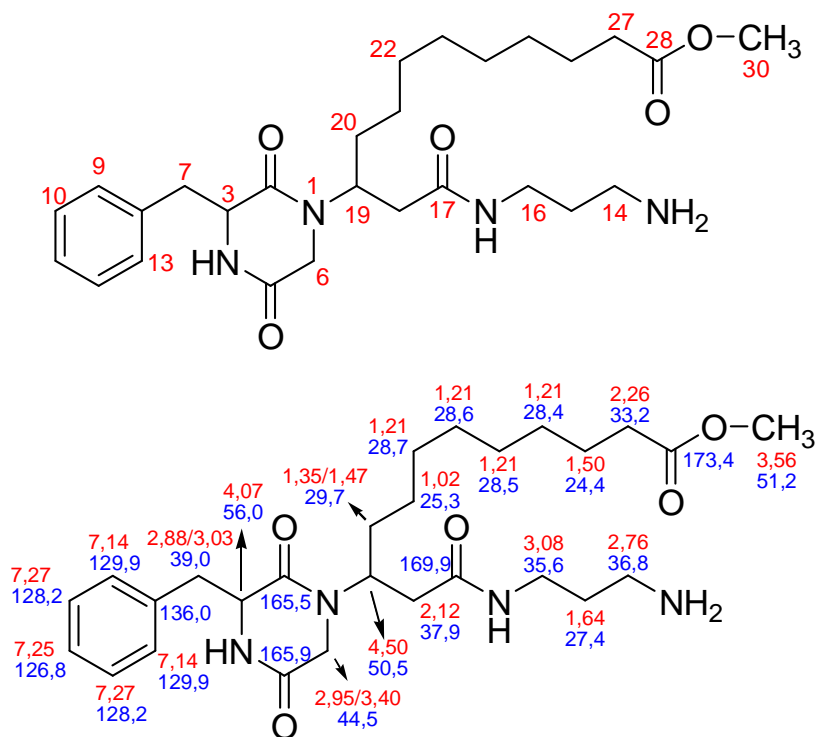


Figura 119: Estrutura e deslocamentos químicos de ¹H e ¹³C do composto **166**.

As principais correlações observadas nos espectros de RMN bidimensionais COSY (**Figura 6.7**, anexo) e HMBC (**Figura 6.9**, anexo), estão ilustradas nas **Figuras 120** e **121** respectivamente.

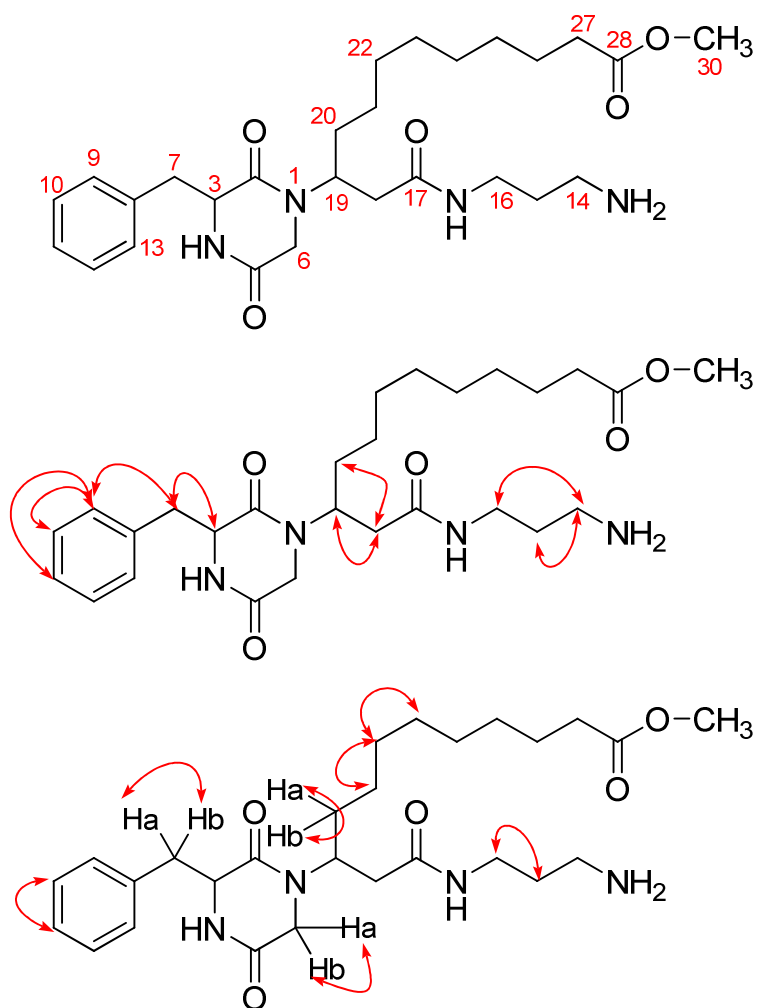


Figura 120: Correlações observadas no espectro do tipo COSY do composto **166**.

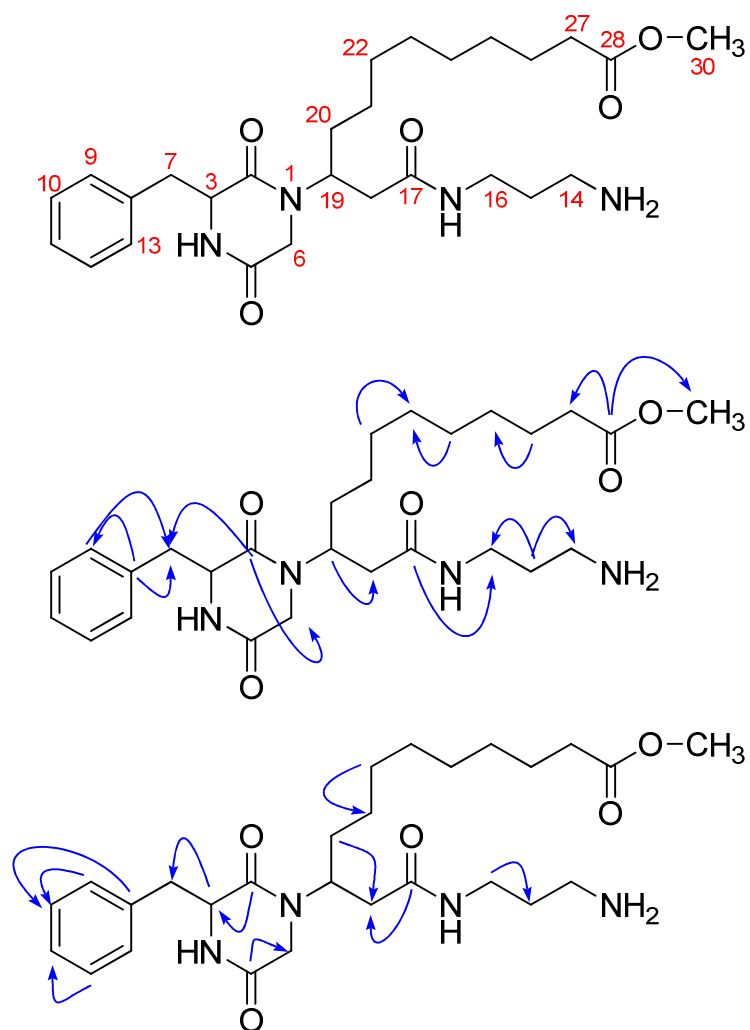


Figura 121: Correlações observadas no espectro do tipo HMBC do composto 166.

Tabela 19 – Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400 Hz) e ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 Hz) bem como as correlações observadas nos espectros COSY e HMBC do composto **166**.

Pame-3d5 (DMSO- d_6)				
Posição	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult., J/Hz)	HMBC	COSY
1	-	-	-	-
2	165,5	-	H3, H6ab, H7ab	-
3	56,0	4,07 (q, 3,3)	H7	H7
4	-	-	-	-
5	165,9	-	H6ab	-
6	44,5	a) 2,95 (d, 17); b) 3,40 (d, 17)	-	a) H6b b) H6a
7	39,0	a) 2,88 (m); b) 3,03 (m)	H3, H9	
8	136,1	-	H3, H7, H9, H10, H12, H13	-
9	129,9	7,14 (m)	H7, H10, H11, H12	H10, H11
10	128,2	7,27 (m)	H9, H11	H9, H11
11	126,8	7,25 (m)	H9, H10, H12, H13	H9, H10
12	128,2	7,27 (m)	H9, H11	H11, H13
13	129,9	7,14 (m)	H7, H10, H11, H12	H12, H11
14	36,8	2,76 (m)	H15, H16	H15
15	27,4	1,64 (q, 7,4)	H14, H16	H14, H16
16	35,6	3,08 (m)	H15	H15
17	169,9	-	H16, H18	-
18	37,9	2,12 (d, 7,4)	-	
19	50,5	4,50 (sl)	H18	H18, H20
20	29,7	a) 1,47 (m); b) 1,35 (m)	H18	a) H19, H20b b) H19, H20a
21	25,3	1,02 (m)	-	H20, H22
22	28,7	1,21 (m)	H21, H23	H21
23	28,6	1,21 (m)	H22, H24	-
24	28,5	1,21 (m)	H23, H25	-
25	28,4	1,21 (m)	H24, H26, H27	H26
26	24,4	1,50 (m)	H27	H25, H27
27	33,2	2,26 (t, 7,4)	H26	H26
28	173,4	-	H27, H30	-
29	-	-	-	-
30	51,2	3,56 (s)	-	-

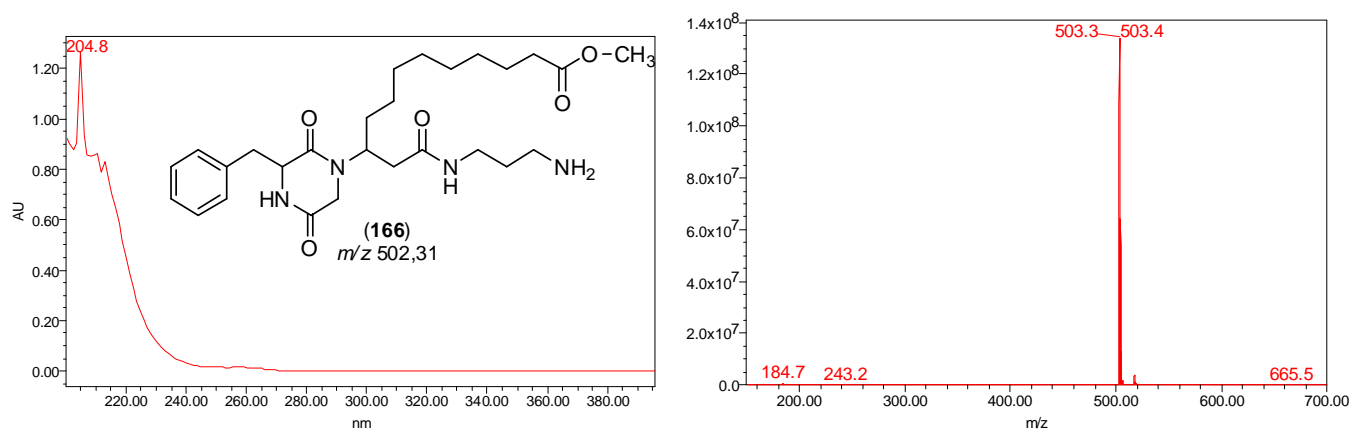


Figura 122: Espectros no ultravioleta e de massas de baixa resolução (ESI⁺) do composto **(166)**.

A identificação estrutural do composto **167** (presente na fração Pame-3d6c), outra dicetopiperazina modificada, foi realizada de forma análoga ao do composto **166** mostrada anteriormente, utilizando-se também as mesmas técnicas espectroscópicas (**Figuras 6.11 a 6.18**, anexo). Em seu espectro de absorção no infravermelho (**Figura 6.17**, anexo) (filme em disco de silício) foram observadas bandas na região entre 1.730 e 1.660 cm⁻¹ atribuídas a grupos carbonílicos; entre 2.850 e 2.930 cm⁻¹ referentes a ligação C-H alifáticos; região em 3.280 cm⁻¹ atribuídas a N-H de amina.

O espectro de RMN-¹H (**Figura 6.11**, anexo) do composto **167** apresentou um perfil quase idêntico ao observado no espectro do composto **166**, sendo observadas as principais diferenças na região entre δ 8,0 e 8,5, onde observa-se um tripleto e um dubleto em δ 8,01 e 8,25 respectivamente para a substância discutida anteriormente, enquanto que apenas um tripleto em δ 7,99 é observado no espectro de **167**. A outra principal diferença está relacionada ao quarteto em δ 4,07 no espectro de **166**, e que é observado como um tripleto em δ 4,38 na análise da segunda dicetopiperazina. Com relação ao espectro de RMN-¹³C (**Figura 6.12**, anexo) da fração Pame-3d6c, nota-se igualmente uma grande similaridade de perfil quando comparado ao espectro obtido para o composto **166**. O desvio mais aparente ocorre com o sinal que era observado em δ 56,0 no espectro de **166** e que aparece deslocado para a região

de campo baixo, em δ 64,4, na análise para o composto **167**, indicando que este carbono encontra-se um pouco mais desblindado nesta estrutura.

A análise dos espectros de RMN bidimensionais (COSY, HSQC e HMBC, **Figuras 6.14 a 6.16** do anexo), possibilitou a identificação de fragmentos estruturais do composto, de forma análoga à discutida anteriormente para o composto **166**. No espectro do tipo COSY, o hidrogênio em δ 4,37 (H-3; δ_c 64,4) apresentou acoplamento com os hidrogênios em δ 3,04 e 3,23 (CH₂-7; δ_c 35,1). Ainda, tanto H-3 como os hidrogênios CH₂-7 apresentaram acoplamento à longa distância com o carbono aromático em δ 135,0. Um dos hidrogênios H-7 (δ 3,23) apresentaram acoplamento à longa distância com o sinal de carbonila em δ 164,4, tipicamente atribuído à uma carbonila de amida. Novamente, os resultados sugerem a possibilidade de o resíduo de fenilalanina ser parte de uma dicetopiperazina. A observação de acoplamento dos hidrogênios H-6 em δ 3,41 e 2,39 com os carbonos carbonílicos em δ 159,8 e 164,4 auxilia na identificação deste fragmento (**Figura 123a**).

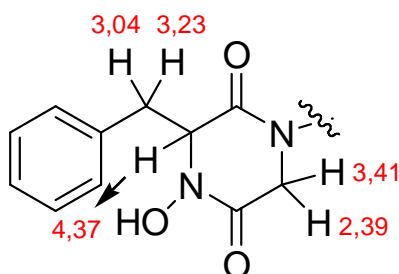


Figura 123a: Fragmento estrutural do composto **167**.

As correlações observadas para o segundo fragmento estrutural ligado ao nitrogênio da dicetopiperazina, e ainda o fragmento ligado ao carbono carbonílico C-17 são basicamente as mesmas vistas para o composto **166**, sendo a análise totalmente similar à citada anteriormente e, portanto, não será repetida para o composto **167**.

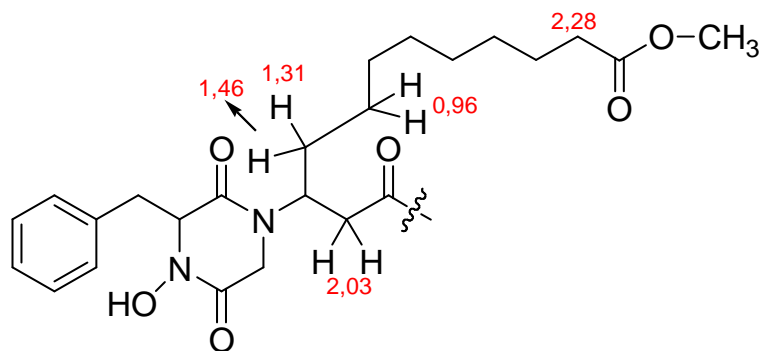
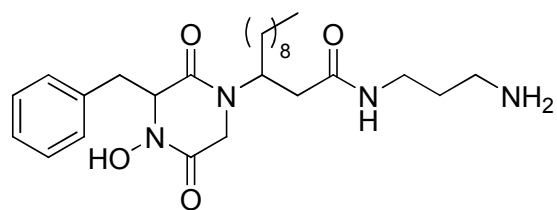


Figura 123b: Fragmento estrutural do composto **167**.

Sabendo-se que o espectro de massas obtido por LC-UV-MS (ESI⁺) para este composto apresentou um pico do íon *quasi*-molecular em m/z 519, temos uma diferença de 16 unidades de massa em relação ao composto **166**. Como citado anteriormente, a diferença mais visível entre os espectros de RMN-¹³C das duas dicetopiperazinas ocorre com o sinal do carbono C-3, que aparece em δ 64,4 para o composto **167**, e em δ 56,0 para o **166**, ou seja, mais desblindado. Os deslocamentos químicos referentes aos hidrogênios ligados a eles seguem a mesma diferença de comportamento. Somando-se a isso, é possível observar no espectro do tipo HMBC do composto **166**, um acoplamento a longa distância do C-3 com um hidrogênio em δ 8,25, ligado ao N vizinho na porção da dicetopiperazina. No entanto, este acoplamento, assim como o sinal referente a este hidrogênio no espectro de RMN-¹H de **167** não é observado. Assim, sugere-se que um grupo hidroxila esteja ligado á este átomo de N, formando uma função hidroxamato, de forma semelhante a encontrada na estrutura da etzionina (**168**), uma dicetopiperazina com atividade antifúngica, isolada de um tunicado não identificado coletado no golfo de Eilat (Mar Vermelho) (Hirsch et al., 1989). Segundo os dados de RMN-¹³C (em CDCl₃) da etzionina, o carbono C-3 aparece em δ 64,5, praticamente o mesmo deslocamento químico em que se observa o mesmo carbono no composto **167**, enquanto para **166** este é observado em δ 56,0, fato que reforça a hipótese de que a função hidroxamato esteja presente na estrutura do composto **167**.



etzionina (**168**)

Figura 124: Estrutura da etzionina.

A estrutura e os deslocamentos químicos observados para o composto **167**, podem ser vistos na **Figura 125**.

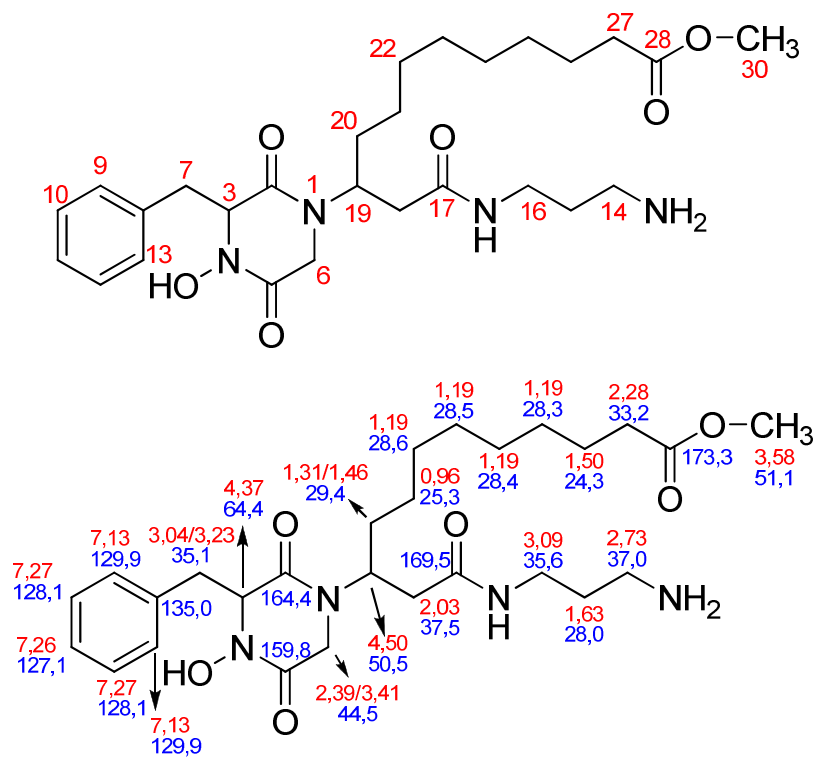


Figura 125: Estrutura e deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C do composto **167**.

Tabela 20 – Valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 400 Hz) e ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 Hz) bem como as correlações observadas nos espectros COSY e HMBC do composto **167**.

Pame-3d6c (DMSO- d_6)				
Posição	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (mult., J/Hz)	HMBC	COSY
1	-	-	-	-
2	164,4	-	H3, H6b, H7b	-
3	64,4	4,37 (q, 4,0)	H7	H7
4	-	-	-	-
5	159,8	-	H3, H6ab	-
6	44,5	a) 2,49 (d, 16,9); b) 3,41 (d, 16,9)	-	a) H6b b) H6a
7	35,1	a) 3,04 (m); b) 3,23 (m)	H9	H3
8	135,0	-	H3, H7, H10	-
9	129,9	7,13 (m)	H7ab, H10, H11	H10, H11
10	128,1	7,27 (m)	H9, H11	H9, H11
11	127,1	7,26 (m)	H9, H13	H9, H10
12	128,1	7,27 (m)	H9, H11	H11, H13
13	129,9	7,13 (m)	H7ab, H10, H11	H12, H11
14	37,0	2,73 (m)	H15, H16	H15
15	28,0	1,63 (q, 7,3)	H14, H16	H14, H16
16	35,6	3,09 (m)	H14, H15	H15
17	169,5	-	H16, H18	-
18	37,5	2,03 (dl, 7,7)	-	H19
19	50,5	4,50 (sl)	-	H18, H20
20	29,4	a) 1,46 (m); b) 1,31 (m)	-	H19, H21
21	25,3	0,96 (m)	-	H20, H22
22	28,6	1,19 (m)	H21	H21
23	28,5	1,19 (m)	H22, H24	-
24	28,4	1,19 (m)	H23, H25	-
25	28,3	1,19 (m)	H24, H26, H27	H26
26	24,3	1,50 (m)	H27	H25, H27
27	33,2	2,28 (t, 7,4)	H26	H26
28	173,3	-	H27, H30	-
29	-	-	-	-
30	51,1	3,58 (s)	-	-

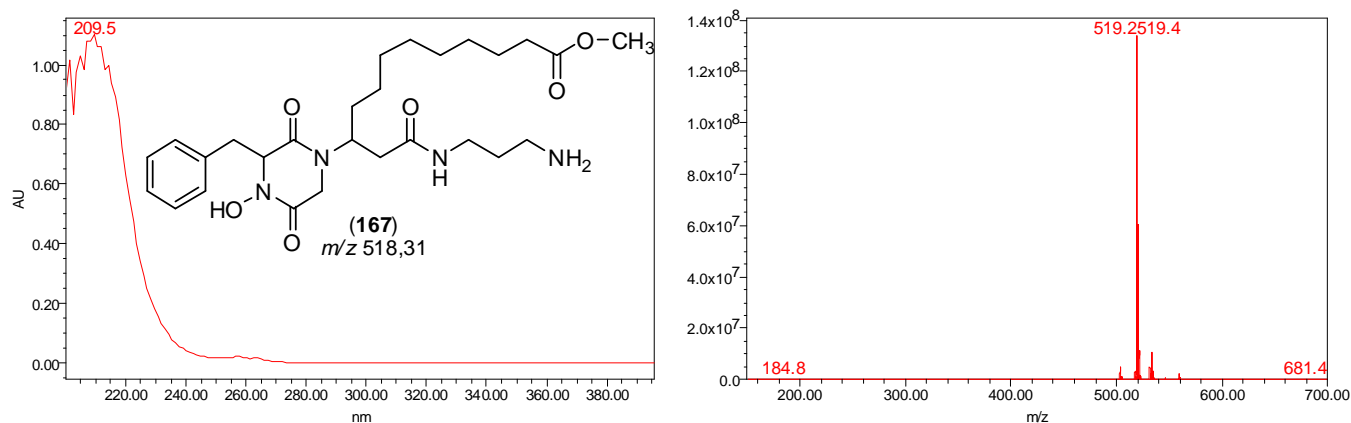


Figura 126: Espectros no ultravioleta e de massas de baixa resolução (ESI+) do composto **(167)**.

O isolamento destas duas novas dicetopiperazinas modificadas, possuindo grande similaridade estrutural com as rodriguesinas A e B, que são compostos isolados de uma presa deste nudibrânquio, a ascídia *Didemnum* sp., é um fato interessante. O nudibrânquio pode ser capaz de acumular compostos majoritários de sua presa e modificá-lo metabolicamente para seu interesse, realizando uma biossíntese *de novo* do composto, podendo ser uma forma de defesa do animal. Ainda que seja um fato relativamente raro, exemplos são encontrados na literatura como pôde ser visto anteriormente para os nudibrânquios *Archidoris montereyensis* (Gustafson et al., 1984) e *Ascobulla fragilis* (Cimino et al., 1990), indicando a possibilidade de que *Pleurobranchus areolatus* modifique a dicetopiperazina adquirida a partir de sua presa (ascídia do gênero *Didemnum*).

Capítulo 7

Estudo químico dos nudibrânquios *Hypselodoris picta lajensis* e *Okenia zoobotryon* e do briozoário *Zoobotryon verticillatum*

7.1. Nudibrânquio *Hypselodoris picta lajensis*

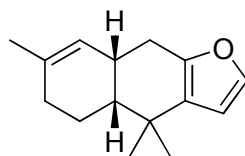
7.1.1 Introdução

O nudibrânquio *Hypselodoris picta lajensis* é um membro da família Chromodorididae, um grupo de moluscos opistobrânquios de corpo mole e conhecidos por sua coloração intensa (McPhail et al., 1998). Embora estes nudibrânquios adultos sejam um dos mais coloridos animais marinhos e não possuam mecanismos de defesa física, eles têm poucos predadores, indicando possuírem defesa química, que é adquirida a partir da dieta alimentar, selecionando e concentrando metabólitos bioativos de esponjas marinhas (Hochlowski et al., 1981).

Estudos químicos realizados com nudibrânquios do gênero *Hypselodoris* mostram que estes se protegem com furanosesquiterpenos. Por exemplo, a furodisinina (**169**) (**Fig. 128**) isolada a partir do nudibrânquio *Hypselodoris zebra* e da esponja marinha *Dysidea etheria* da qual se alimenta (Grode e Cardellina, 1984; Avila et al., 1991; Fontana et al., 1994).



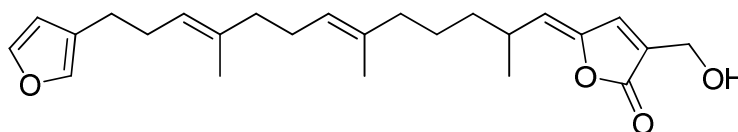
Figura 127: Fotografia do nudibrânquio *Hypselodoris picta lajensis* (fonte: <http://www.seaslugforum.net/factsheet.cfm?base=hypslaje>)



furodisinina (169)

Figura 128: Estrutura da furodisinina (169).

Outro estudo que mostra o relacionamento presa-predador com nudibrânquios, foi realizado com espécimes de *Hypselodoris capensis* e a esponja *Fasciospongia* sp., do qual o nudibrânquio se alimenta. Juntamente com quatro terpenos já conhecidos, foi isolado um novo sesterterpeno, o 22-deoxi-23-hidroximetilvariabilina (170) (Fig. 129), do extrato deste nudibrânquio coletado na costa sul-africana. O mesmo composto foi isolado também do extrato da esponja estudado, mostrando que muito provavelmente o *Hypselodoris* o acumulou graças a sua dieta baseada nesta esponja (McPhail et al., 1998).



22-deoxi-23-hidroximetilvariabilina (170)

Figura 129: Estrutura da 22-deoxi-23-hidroximetilvariabilina (170).

7.1.2. Procedimento Experimental – *Hypselodoris picta lajensis*

Os espécimes do nudibrânquio *Hypselodoris picta lajensis* (5 indivíduos) foram coletados na Ilha do Papagaio, em Cabo Frio-RJ e preservados em EtOH. O processo de extração foi realizado da seguinte forma: após separação do EtOH de preservação, os animais foram transferidos para 40 mL de EtOH. Os animais em EtOH foram sonicados em banho de ultrassom por 2 minutos, deixando-se em repouso por mais 30 minutos. Removeu-se o EtOH e adicionou-se mais 40 mL do mesmo solvente, repetindo-se esta operação mais uma vez. Após a extração, todo o EtOH, de preservação e de extração, foi reunido e evaporado, resultando no extrato etanólico (Hyet, 278,5 mg) do nudibrânquio. Os animais foram re-extraídos com MeOH (3 x 40 mL) e CH₂Cl₂ (3 x 40 mL), obtendo-se os extratos

metanólico (HyMe, 30,0 mg) e diclorometano (HyDM, 9,1 mg). Os três extratos obtidos foram analisados por LC-UV-MS com o objetivo de se observar seus perfis químicos.

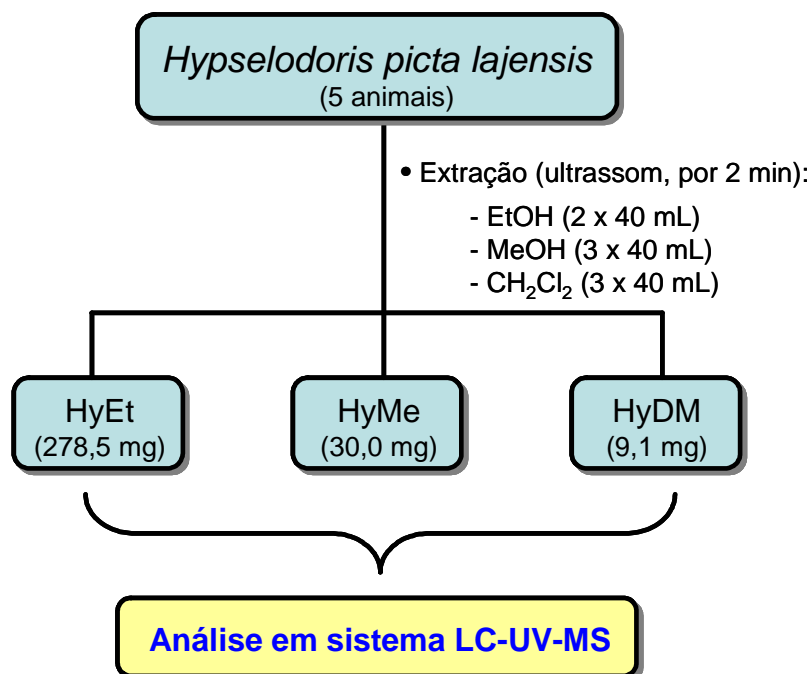


Figura 130: Processo de extração do nudibrânquio *Hypselodoris picta lajensis*.

Com base nos resultados obtidos das análises por LC-UV-MS, o extrato etanólico (Hyet, 278,5 mg) do animal foi submetido a uma separação por cromatografia em coluna pré-empacotada contendo sílica-gel derivatizada com grupos C_{18} como fase estacionária, utilizando-se um gradiente de MeOH e H_2O como eluente. Foram obtidas 5 novas frações: HyEt-1 (199,1 mg), -2 (20,1 mg), -3 (4,6 mg), -4 (7,8 mg) e -5 (18,9 mg), as quais foram analisadas por LC-UV-MS. Com base nos resultados obtidos, a amostra Hyet-4 (7,8 mg) foi purificada por HPLC, utilizando mais uma vez uma coluna de sílica-gel derivatizada com grupos C_{18} (Phenomenex RP18, 4μ , 250 x 4,6 mm), MeOH e H_2O 6:4 em modo isocrático como eluente, com fluxo de 0,9 mL/min. A separação forneceu quatro novas frações: HyEt-4a (2,8 mg), -4b (1,8 mg), -4c (1,4 mg) e -4d (1,1 mg), obtendo-se 1,4 mg do composto conhecido como lactona da furodisinina (**171**) na amostra Hyet-4c.

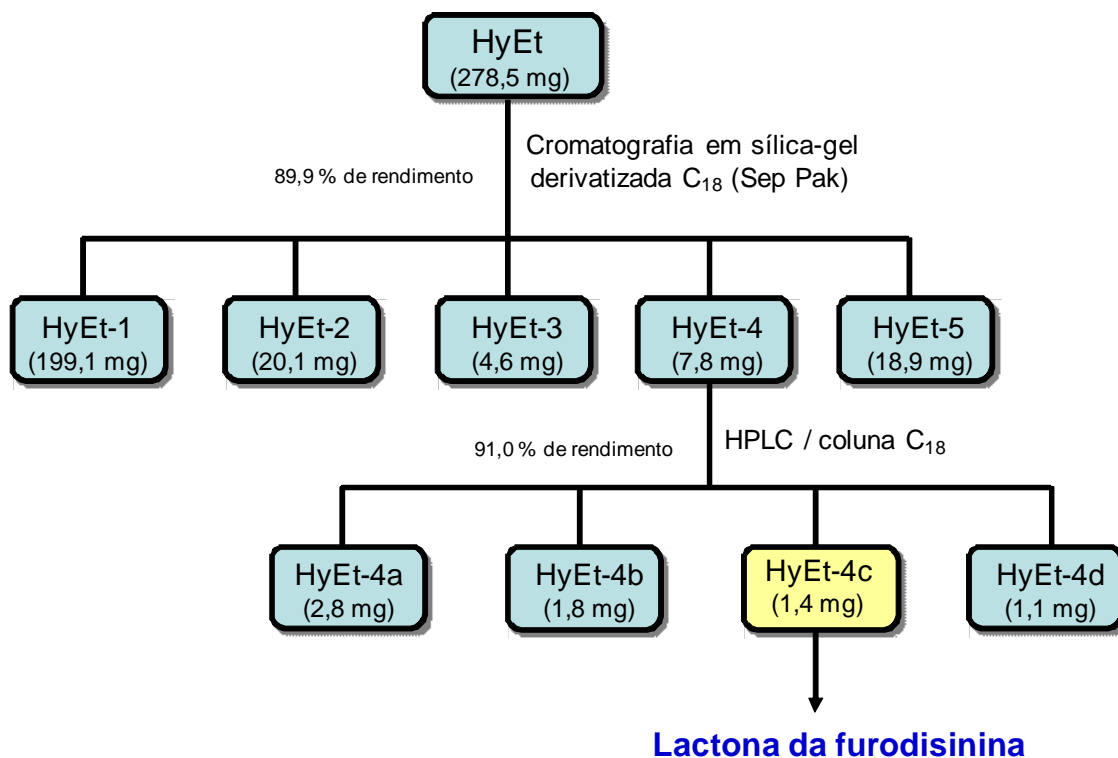


Figura 131: Fracionamento e purificação do extrato etanólico do nudibrânquio *Hypselodoris picta lajensis*.

7.1.3. Resultados: composto isolado no extrato etanólico do nudibrânquio *Hypselodoris picta lajensis*

O fracionamento do extrato etanólico do nudibrânquio *Hypselodoris lajensis* por diversas separações cromatográficas resultou no isolamento da lactona da furodisinina (171), um composto originalmente isolado da esponja *Dysidea etheria*. Este sesquiterpeno teve sua estrutura elucidada após a análise de seus dados espectroscópicos (RMN ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC, **Figuras 7.1 a 7.6**, anexo) e a comparação destes com dados da literatura, com os quais apresentou total concordância. As **Figuras 132 e 133** mostram as correlações observadas nos espectros do tipo COSY e HMBC, respectivamente, para a lactona da furodisinina.

O espectro de RMN- ^1H (400 MHz) (**Figura 7.1**, anexo) obtido da fração Hyet-4c em DMSO- d_6 apresentou os seguintes sinais:

- singleto em δ 5,79 e dubleto em δ 5,35 referentes a hidrogênios ligados a carbonos sp^2 ;

- dubletos em δ 2,68 e δ 1,91, duplo-dubleteo em δ 2,18, multipleteo em δ 1,1 referentes a hidrogênios metilênicos;

- singletos em δ 1,58; δ 1,31 e δ 1,16 referentes a hidrogênios de grupos metila.

No espectro de RMN- ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) (**Figura 7.2**, anexo) pôde-se observar sinais de carbonos sp^2 em δ 114,4; δ 124,0; δ 133,3; δ 169,7 e δ 174,3. Os outros sinais em δ 46,6; 40,8; 37,9; 30,5; 30,1; 26,5; 25,0; 22,9 e 18,1 são referentes a carbonos do tipo sp^3 . O sinal em δ 104,9 provavelmente se refere a um carbono sp^3 funcionalizado com dois oxigênios.

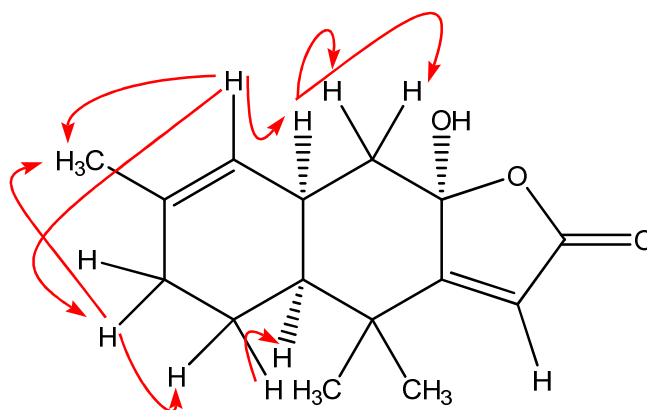


Figura 132: Correlações ^1H - ^1H observadas para a lactona da furodisinin (COSY).

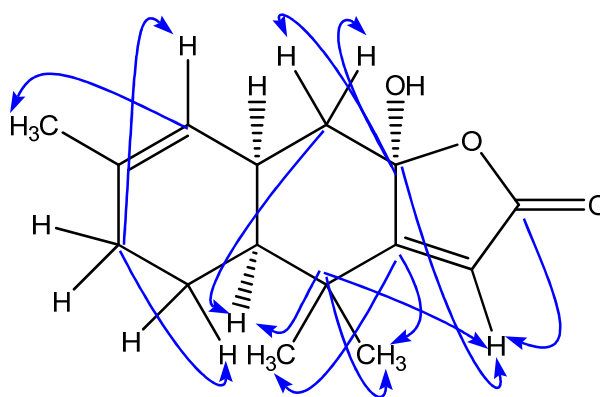


Figura 133: Correlações ^{13}C - ^1H observadas para a lactona da furodisinin (HMBC).

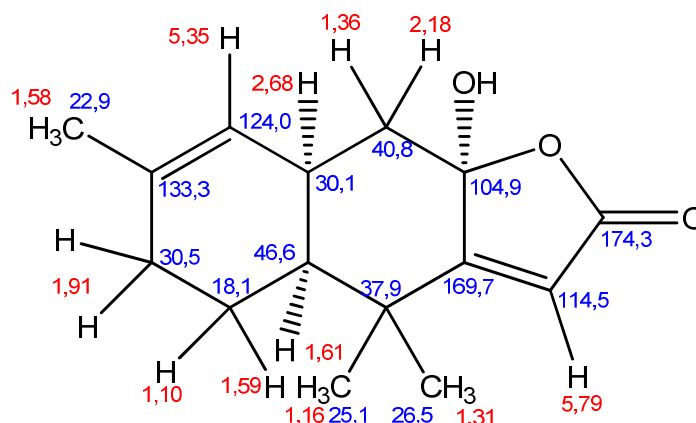


Figura 134: Estrutura da lactona da furodisinina (**171**) e os deslocamentos químicos observados no RMN-¹³C e ¹H.

Tabela 21: Comparação dos valores de deslocamentos químicos de ¹H e ¹³C da fração Hyet-4c, do composto isolado da esponja *Dysidea* sp. e dados da literatura.

	Hyet-4c (DMSO- <i>d</i> ₆)		<i>Dysidea</i> sp.* (DMSO- <i>d</i> ₆)		Literatura** (CDCl ₃)	
	δ ¹³ C	δ ¹ H	δ ¹³ C	δ ¹ H	δ ¹³ C	δ ¹ H (mult, J/Hz)
1	174,3		175,0		174,7	
2	114,5	5,79 (s)	114,5	5,78 (s)	115,2	5,67 (s)
3	169,7		169,7		169,8	
4	104,9		n.o.		104,9	
5	40,8	2,18 (dd, 13,2 e 3,5) e 1,36 (d, 13,0)	40,8	2,17 (dd, 13,2 e 3,6) e 1,35 (dd, 13,2 e 13,2)	41,2	2,28 (dd, 14,0 e 3,8) e 1,57 (dd, 14,0 e 13,0)
6	30,1	2,68 (d, 8,5)	30,1	2,67 (d, 8,9)	30,3	2,8 (m, 13,0 e 5,7)
7	124,0	5,35 (d, 4,7)	123,9	5,34 (d, 4,9)	123,5	5,36 (dd, 5,7 e 1,4)
8	133,3		133,4		134,5	
9	30,5	1,91 (m, 4,9)	30,5	1,87 (dd, 6,5 e 18,1) e 1,92 (m)	30,9	1,96 (m, 9,5 e 1,4)
10	18,1	1,10 (m) e 1,59 (m)	18,1	1,07 (m) e 1,58 (m)	18,6	1,12 (ddd, 12,6; 12,6 e 9,5) e 1,70 (ddd, 12,6; 3,7 e 3,1)
11	46,6	1,61 (m)	46,7	1,59 (m)	47,3	1,63 (m, 12,6; 3,1 e 2,5)
12	37,9		44,7		38,5	
13	25,1	1,16 (s)	25,1	1,14 (s)	25,3	1,21 (s)
14	26,5	1,31 (s)	26,5	1,58 (s)	26,8	1,38 (s)
15	22,9	1,58 (s)	22,9	1,58 (s)	23,0	1,61 (s)

* Gandolfi, R., 2010; ** Grode, S., 1984

A fração contendo o composto puro foi ainda analisada em um sistema LC-UV-MS, obtendo-se assim o espectro de massas para o composto em modo de ionização por eletrospray positivo e também negativo, onde foi observado o sinal do pico do íon *quasi*-molecular M+1 em m/z 249, e o sinal M-1 em m/z 247, indicando então que a massa molecular do composto é de 248 Da, que corresponde ao composto citado. No espectro de ultravioleta observa-se uma única banda em 226 nm, sendo que na literatura o resultado mostra absorção máxima em 221 nm (Grode e Cardellina, 1984).

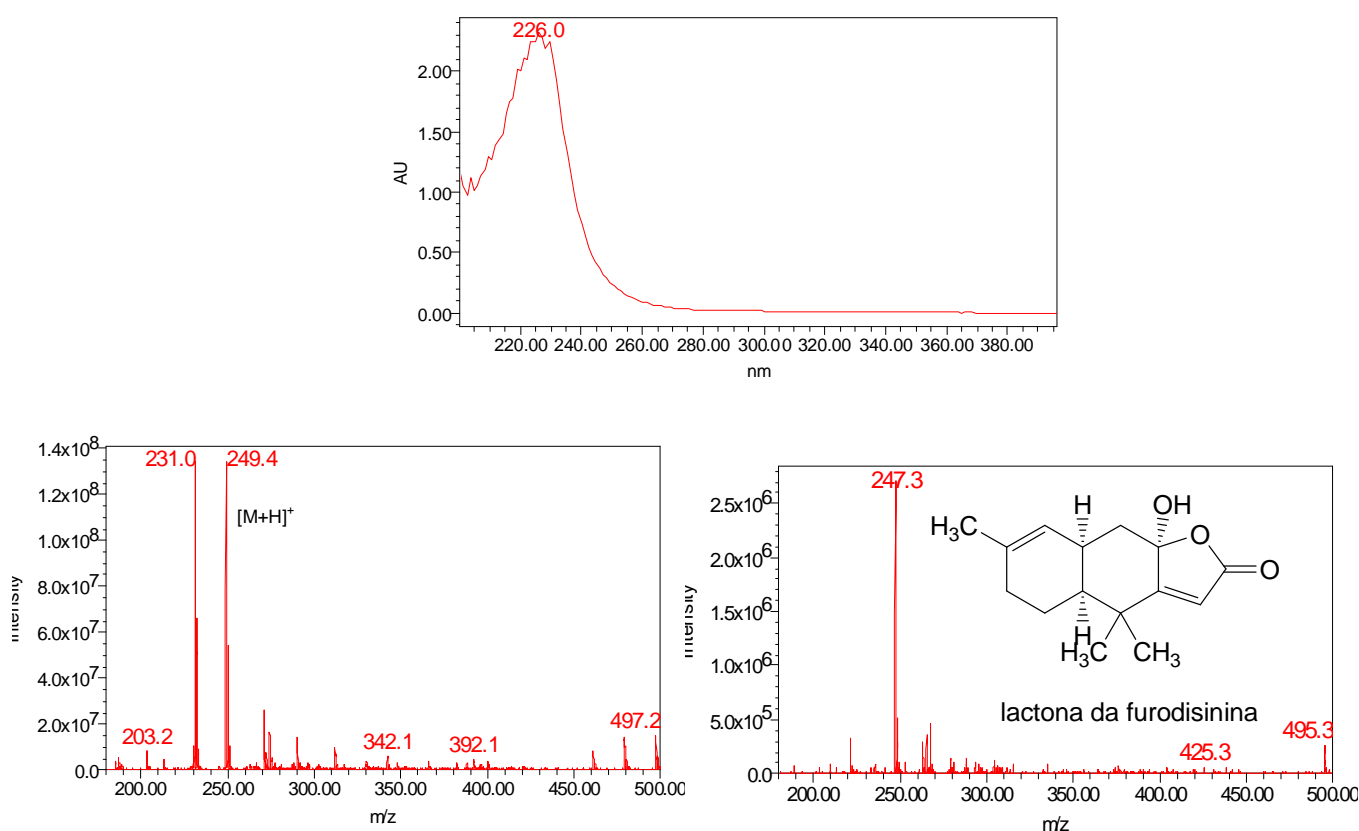


Figura 135: Espectros de UV e de massas (ESI⁺ e ESI⁻) da lactona da furodisinina (171).

A lactona da furodisinina já havia sido recentemente isolada em nosso grupo de pesquisa, em um estudo com a esponja marinha *Dysidea* sp. (Gandolfi et al., 2010). Desta forma, os dados de RMN-¹H e ¹³C obtidos foram comparados com os dados do composto isolado da esponja e também com os dados da literatura, como visto na **Tabela 21**. Além disso, foram realizadas medidas de rotação específica para o composto isolado, obtendo-se o valor de $[\alpha]_D^{20} = + 100$ ($c = 1,0$ mg/mL, MeOH). O isolamento deste composto neste

trabalho indica que o nudibrânquio possivelmente capturou o metabólito a partir da mesma esponja *Dysidea* sp. Embora isolado previamente de esponjas do gênero *Dysidea*, este é o primeiro trabalho que mostra o isolamento da lactona da furodisinina a partir de um nudibrânquio.

7.2. Nudibrânquio *Okenia zoobotryon* (Smallwood, 1910)

7.2.1 Introdução e Procedimento Experimental

A espécie *Okenia zoobotryon* (com 7 a 8 mm de comprimento) é conhecida por interagir com o briozoário *Zoobotryon* sp., vivendo, se alimentando e até se reproduzindo sempre fixado neste animal (Robinson, 2000). Este briozoário é conhecido por apresentar compostos bromados bioativos, como o 2,5,6-tribromo-*N*-metilgramina (**172**) (Sato e Fenical, 1983) ou o 2,5,6-tribromo-*N*-metilindol-3-carbaldeído (**173**) (Fig. 137) (Ortega et al., 1993).



Figura 136: Fotografias do nudibrânquio *Okenia zoobotryon*
(fonte: <http://www.seaslugforum.net/factsheet.cfm?base=okenzoob>)

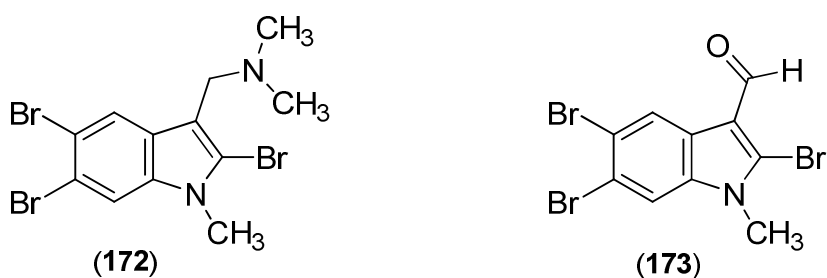


Figura 137: Estruturas dos compostos **172** e **173**.

Os espécimes do nudibrânquio *Okenia zoobotryon* (50 indivíduos) foram coletados na Ilha do Papagaio, em Cabo Frio-RJ por Vinícius Padula (Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro) e preservados em EtOH.

O processo de extração para este animal foi realizado de maneira análoga ao procedimento utilizado na extração do *Hypselodoris picta lajensis*, resultando nos extratos etanólico (OkEt, 190 mg), metanólico (OkMe, 12,8 mg) e diclorometano (OkDM, 1,1 mg), os quais foram analisados por LC-UV-MS com o objetivo de se observar o perfil químico das amostras. A partir dos dados obtidos, pôde-se identificar a presença de compostos bromados no extrato etanólico do animal. Este extrato (OkEt, 190 mg) foi submetido a uma separação por HPLC, utilizando-se uma coluna semi-preparativa com fase estacionária C₁₈ (MeOH e H₂O contendo 0,1% de TFA; fluxo 1,1 mL/min; coluna Waters Delta Pak C₁₈, 15 μm, 300 x 7,8 mm). A separação forneceu oito novas frações: OkEt-1 (117,5 mg), -2 (11,0 mg), -3 (1,6 mg), -4 (1,0 mg), -5 (1,3 mg), -6 (1,8 mg), -7 (1,1 mg) e -lav (18,3 mg), que foram novamente analisadas em sistema LC-UV-MS. Os dados obtidos foram analisados com informações dos bancos de dados MarinLit e SciFinder com o objetivo de se tentar identificar os compostos presentes nas frações.

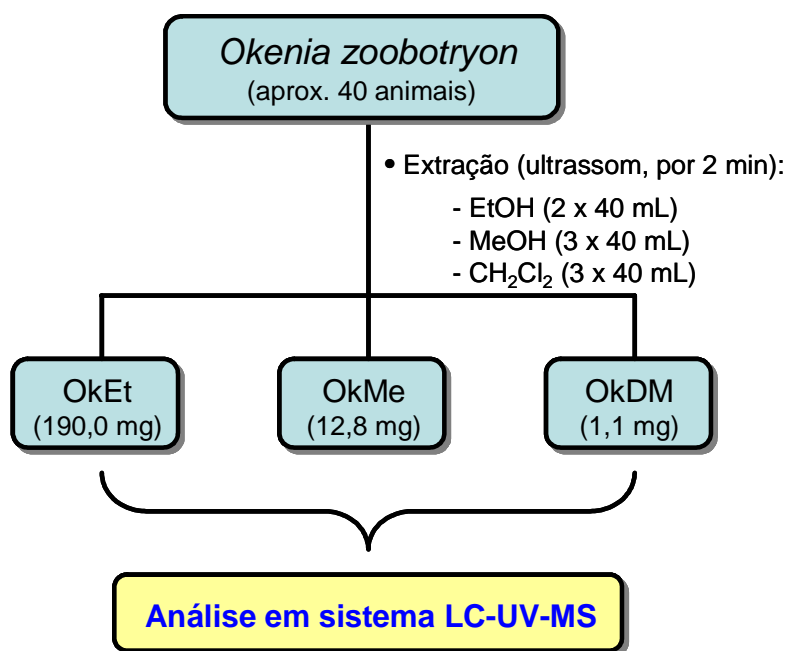


Figura 138: Processo de extração do nudibrânquio *Okenia zoobotryon*.

Com base nos dados obtidos no sistema LC-UV-MS, decidiu-se reunir as frações Oket-5, -6 e -7 devido a semelhança dos perfis cromatográficos observados para estas amostras. A análise dos dados de massas e ultravioleta destas frações indicou a presença de um composto contendo três átomos de bromo com sinais em m/z 422, 424, 426 e 428 e duas bandas de absorção em λ 229 e 295 nm nas três amostras. Assim, a fração Oket-5 (4,2 mg) foi submetida a uma separação por HPLC em fase reversa, utilizando uma coluna analítica de sílica-gel derivatizada com grupos fenila (MeOH e H₂O contendo 0,1% de TFA; fluxo 0,8 mL/min), gerando três novas frações: OkEt-5a (2,0 mg), -5b (1,0 mg) e -5c (0,5 mg). O processo resultou no isolamento de 1,0 mg do composto conhecido 2,5,6-tribromo-*N*-metilgramina (**172**), identificado a partir da comparação do seu espectro de massas obtido, com dados dos bancos de dados MarinLit e SciFinder, além da comparação do seu espectro de RMN-¹H com dados da literatura.

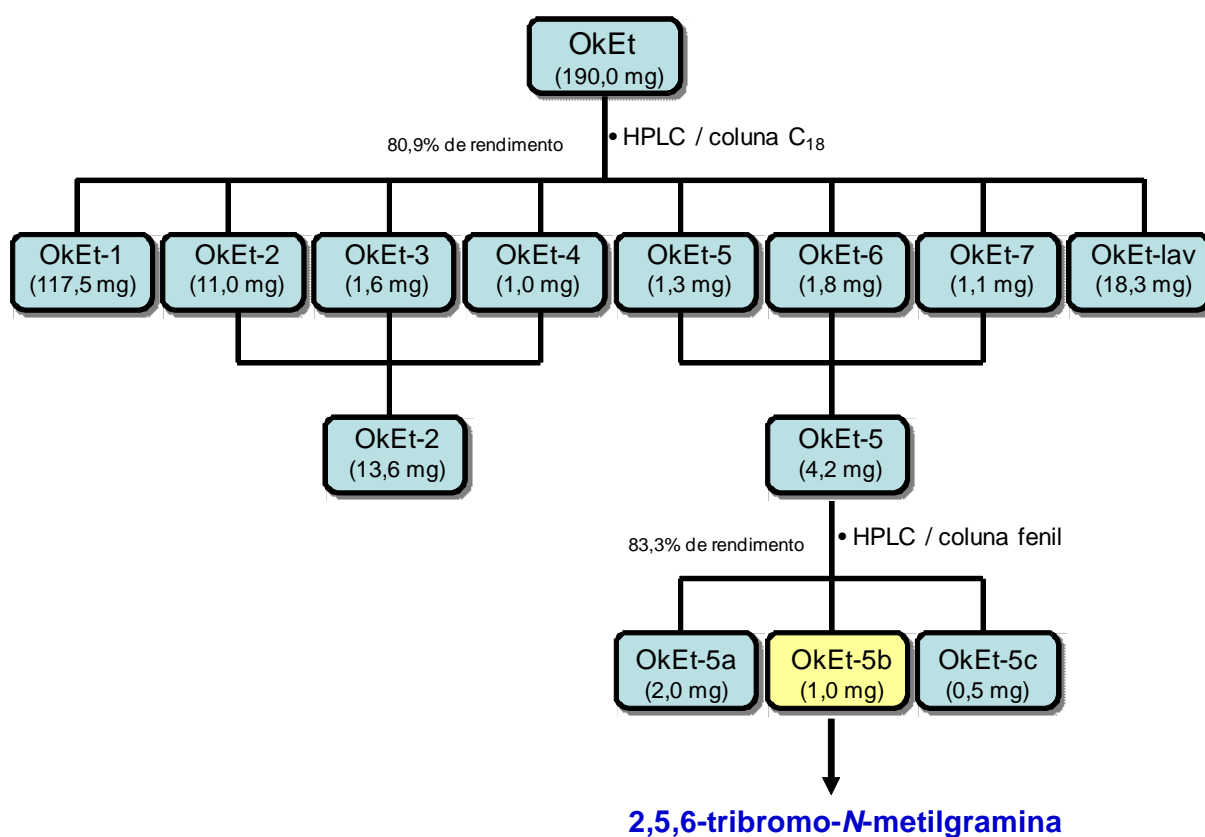


Figura 139: Fracionamento do extrato etanólico do nudibrânquio *Okenia zoobotryon*.

As frações OkEt-2, -3 e -4 também foram reunidas seguindo o mesmo processo realizado com as frações OkEt-5, -6 e -7 citadas anteriormente. A nova fração mostrou a presença de um composto bromado minoritário com sinais em m/z 300, 302 e 304, que não foi encontrado após busca nos bancos de dados utilizados. A fração OkEt-2 (13,6 mg) foi submetida a uma separação cromatográfica em HPLC, utilizando-se uma coluna analítica de sílica-gel derivatizada com grupos fenila (MeOH e H₂O com 0,1% de TFA 45:55; fluxo de 1,0 mL/min) resultando em seis novas frações. Após realizar a análise destas seis amostras por LC-UV-MS, observou-se a presença do composto nas frações OkEt-2d e -2e, que ainda não se encontravam totalmente puras. Deste modo, estas frações foram reunidas e submetidas a uma nova purificação por HPLC, com uma coluna de sílica-gel derivatizada com grupos C₁₈, utilizando-se MeOH/MeCN/H₂O 52:24:24 como eluente, e fluxo de 0,7 mL/min, obtendo-se quatro novas frações. Porém, devido a pouca quantidade de massa obtida das frações purificadas (0,3 mg), não foi possível determinar a estrutura do composto bromado de interesse.

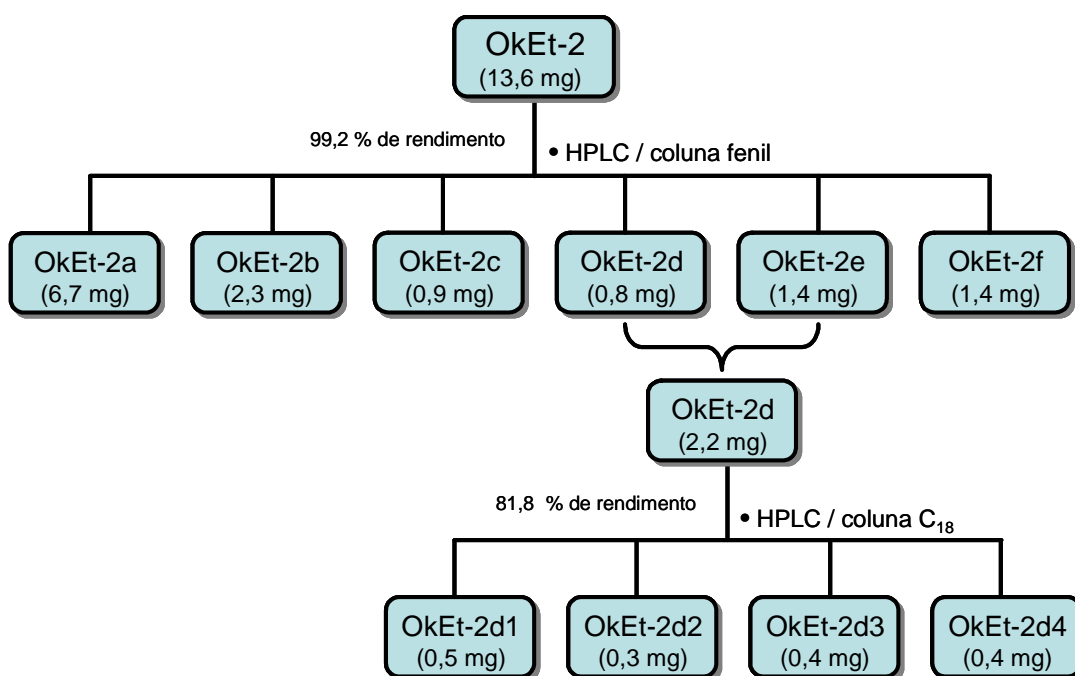


Figura 140: Purificação da fração Oket-2 do nudibrânquio *Okenia zoobotryon*.

7.3. Briozoário *Zoobotryon verticillatum*

7.3.1 Introdução e Procedimento Experimental

Zoobotryon verticillatum (Delle Chiaje, 1828) é um briozoário distribuído em águas temperadas e tropicais no oeste do Atlântico e no Caribe, frequentemente encontrado em regiões de portos e fazendas de peixes. O *Zoobotryon verticillatum* é conhecido por conter alcalóides bromados como o 2,5,6-tribromo-*N*-metilgramina (**172**), que é uma substância de defesa do animal (Robinson, 2004).

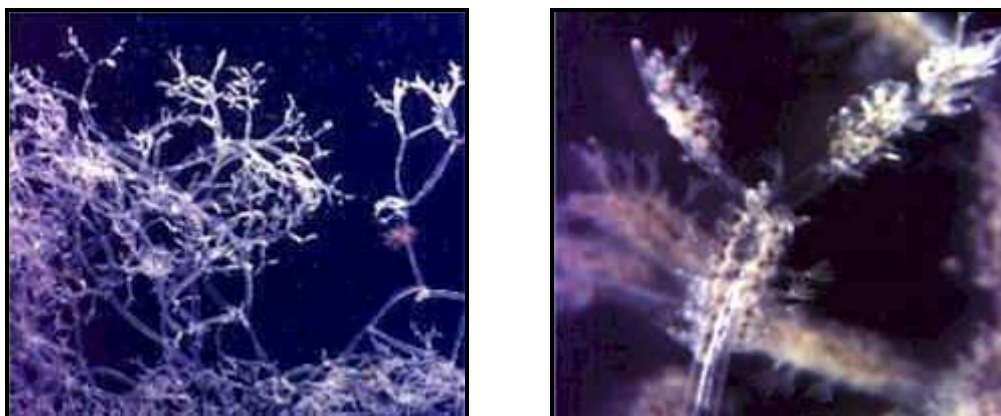


Figura 141: Fotografia do briozoário *Zoobotryon verticillatum*

(fonte: <http://www.sms.si.edu/irfieldguide/Bryozoans.htm>)

Espécimes do briozoário *Zoobotryon verticillatum*, também foram coletados na Ilha do Papagaio, em Cabo Frio-RJ e preservados em EtOH. Após remoção do EtOH de preservação, o briozoário foi re-extraído com 100 mL de MeOH em banho de ultrassom por 2 minutos, e sob repouso durante uma hora. Repetiu-se este procedimento mais duas vezes. A seguir, os 300 mL de MeOH utilizados na extração foram reunidos com o EtOH de preservação do animal e o solvente foi evaporado até redução do volume para aproximadamente 200 mL. A suspensão hidroalcoólica foi submetida a uma partição líquido-líquido com hexano (4 x 200 mL), resultando nos extratos metanólico (1,15 g) e hexânico (93,7 mg).

O extrato metanólico foi submetido a uma separação por cromatografia em coluna pré-empacotada contendo sílica-gel derivatizada com grupos C₁₈ como fase estacionária e utilizando-se um gradiente de H₂O e MeOH como eluente (H₂O 100%, H₂O/MeOH 8:2, 6:4, 4:6 e MeOH 100%). Após análises por CCD (CH₂Cl₂/MeOH 9:1 e 7:3 como eluentes e ácido fosfomolibdico, ninidrina e Dragendorff como reveladores) das diversas frações obtidas, estas foram reunidas em seis novas frações: Zvme-1 (930 mg), -2 (14,3 mg), -3 (8,0 mg), -4 (3,8 mg), -5 (43,2 mg) e -6 (52,2 mg), as quais foram analisadas por LC-UV-MS.

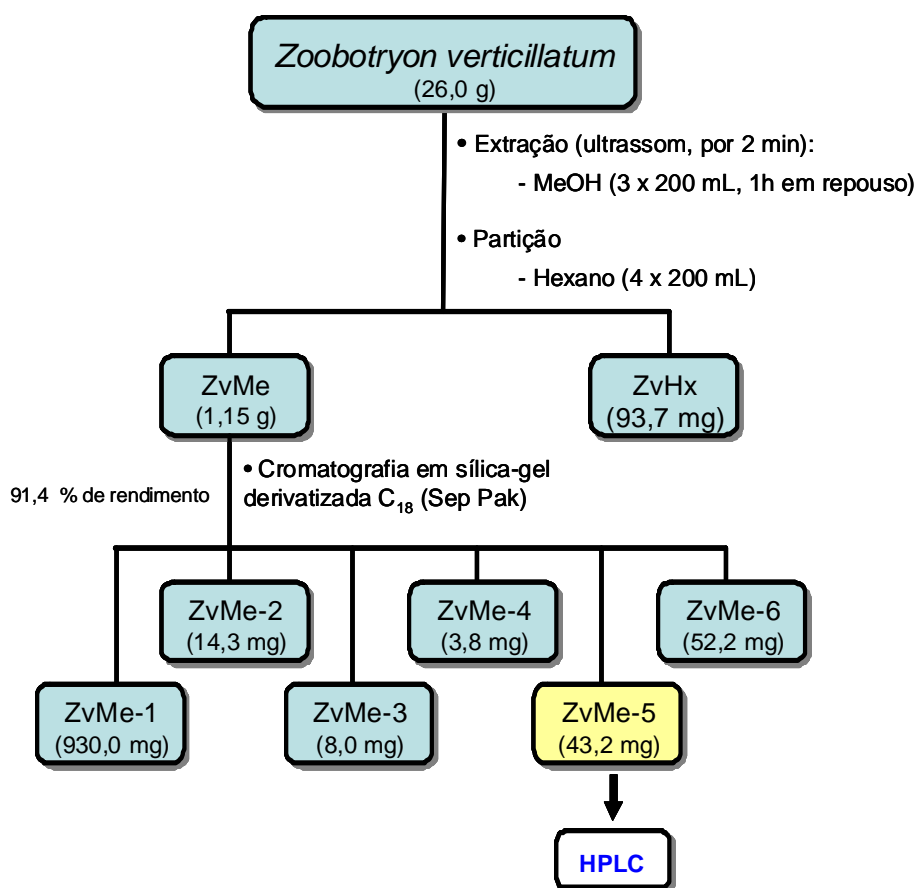


Figura 142: Processo de extração do briozoário *Zoobotryon verticillatum* e fracionamento de seu extrato metanólico.

Observando os dados obtidos das injeções realizadas no sistema LC-UV-MS, notou-se que a fração Zvme-5 continha um composto bromado com sinais em *m/z* 422, 424, 426 e 428 em seu espectro de massas, semelhante ao composto isolado do extrato do nudibrânquio *Okenia zoobotryon*. A fração Zvme-5 (43,2 mg) foi então separada por HPLC

em fase reversa, utilizando uma coluna analítica com fase estacionária de sílica-gel derivatizada com grupos fenila (Waters μ Bondapak Phenyl, 10 μ m, 3,9 x 300 mm), um gradiente de MeOH e H₂O como eluente e fluxo de 1,0 mL/min. A separação forneceu 5 novas frações: Zvme-5a (5,4 mg), -5b (3,7 mg), -5c (14,3 mg), -5d (15,0 mg) e -5e (2,3 mg). Pôde-se identificar na fração Zvme-5b o mesmo composto isolado do nudibrânquio *Okenia zoobotryon*, a 2,5,6-tribromo-*N*-metilgramina (**172**). A identidade do composto isolado foi confirmada por comparação do espectro de RMN-¹H desta fração, com o mesmo espectro da fração OkEt-5b de *O. zoobotryon*, além da comparação do espectro de massas obtido no sistema LC-UV-MS.

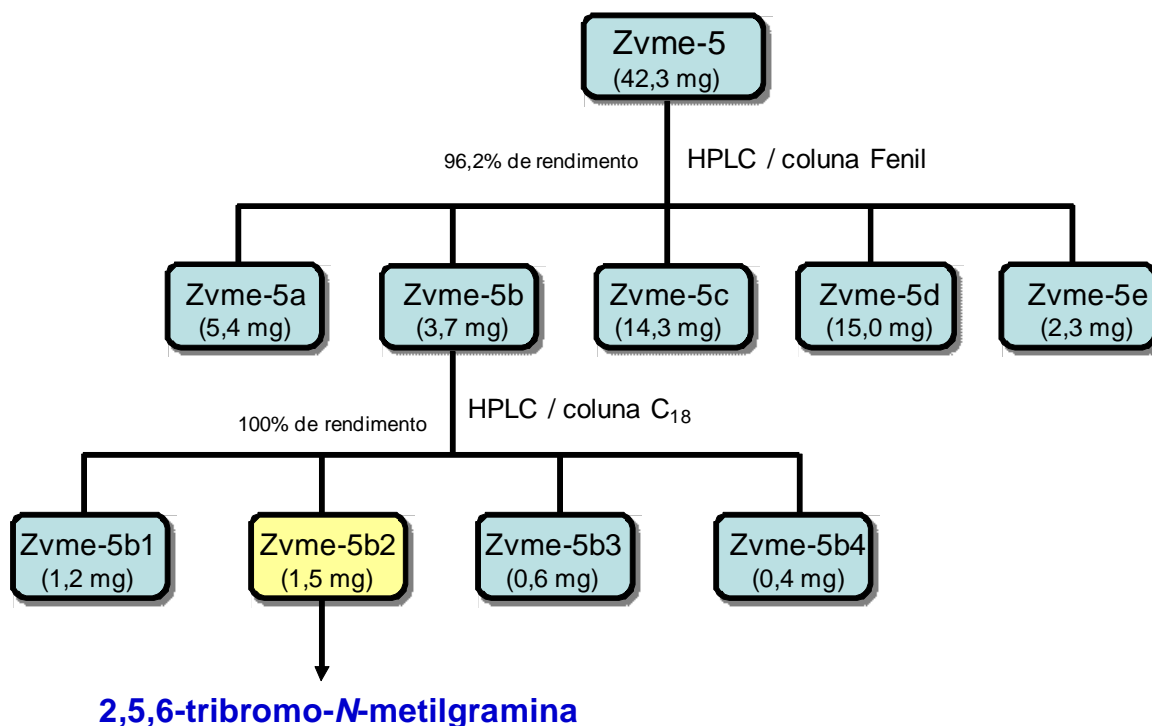


Figura 143: Separação da fração Zvme-5 do briozoário *Zoobotryon verticillatum*.

7.4 Determinação estrutural do composto isolado do extrato etanólico do nudibrânquio *Okenia zoobotryon* e do extrato metanólico do briozoário *Zoobotryon verticillatum*

A purificação da fração Oket-5 por HPLC em resultou no isolamento da 2,5,6-tribromo-*N*-metilgramina (**172**). A identificação do composto foi realizada a partir da obtenção do espectro de massas em um sistema LC-UV-MS e por comparação do seu espectro de RMN-¹H com dados da literatura (Sato e Fenical, 1983).

Sabendo-se que o nudibrânquio *Okenia zoobotryon* é conhecido por se alimentar do briozoário *Zoobotryon verticillatum*, e que este contém compostos bromados como metabólitos, analisou-se o extrato desse animal em um sistema LC-UV-MS em busca de sinais característicos de compostos que contém bromo nos espectros de massas obtidos. Nas frações Oket-5, -6 e -7 foi observado um sinal no cromatograma que apresentava em seu espectro de massas o pico do íon *quasi*-molecular em m/z 424 com 4 sinais separados por 2 unidades de massa com proporção 1:3:3:1, indicando um composto com três átomos de bromo. Ao realizar uma busca no banco de dados MarinLit, procurando por um composto com essas características, o único composto encontrado foi justamente a 2,5,6-tribromo-*N*-metilgramina. Desta forma realizou-se a purificação da fração Oket-5, obtendo-se novas frações que foram mais uma vez analisadas no sistema LC-UV-MS, observando-se o composto na fração Oket-5b. O cromatograma de massas e o espectro de massas obtido para a fração estão ilustrados a seguir.

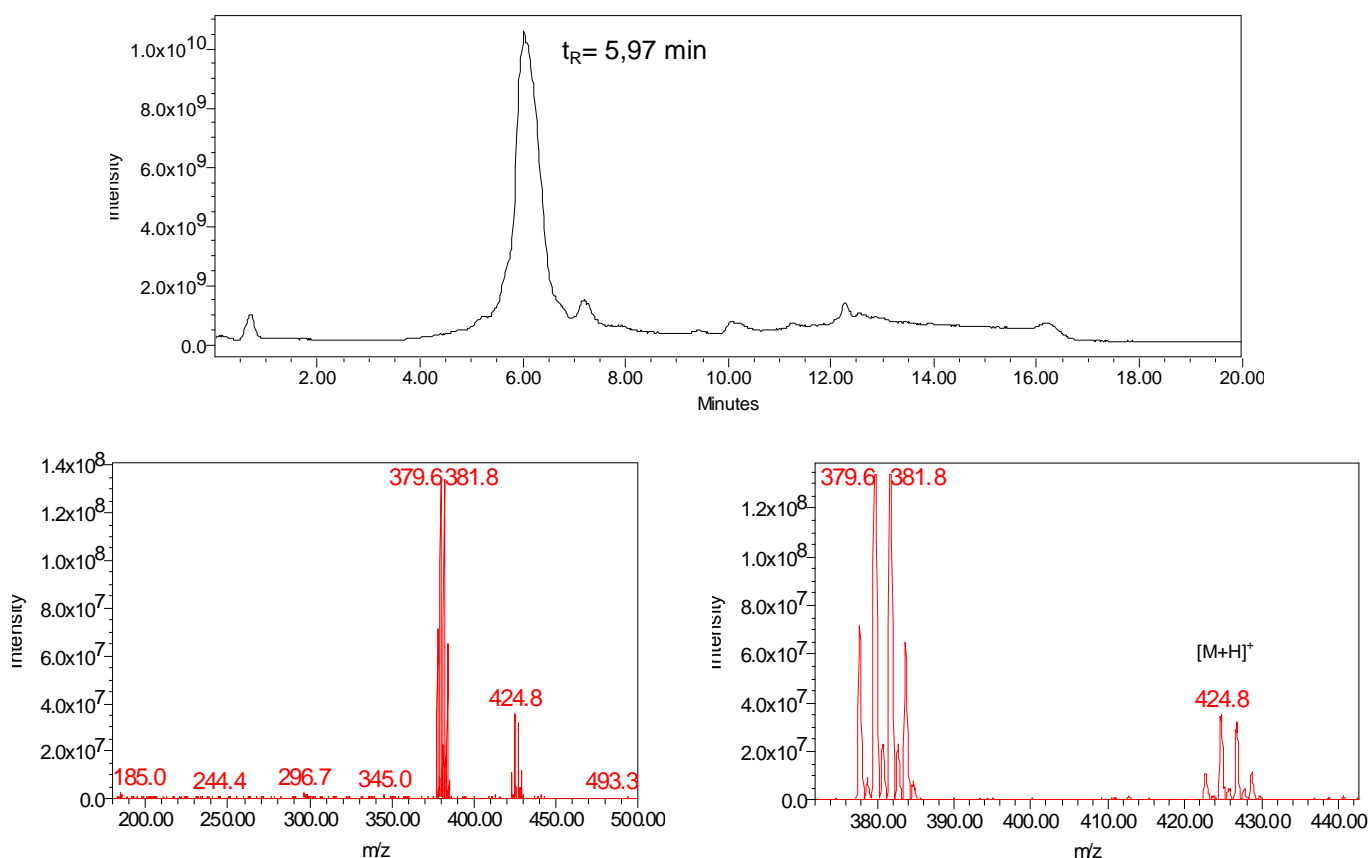


Figura 144: Cromatograma e espectro de massas da fração Oket-5b (ESI⁺). Condições: coluna Waters X-Terra MS C₁₈, 3,5 μm, 2,1 x 50 mm; gradiente de MeOH em H₂O (início em MeOH/H₂O 2:8, curva linear) e fluxo de 0,5 mL/min.; MS: 25 V de voltagem do cone; modo ESI⁺.

O espectro de RMN-¹H da fração Oket-5b foi obtido (**Figura 7.7**, anexo) (DMSO-*d*₆, 400 MHz) e comparado com a literatura (Sato, 1983).

O extrato metanólico do briozoário *Zoobotryon verticillatum* também foi analisado no mesmo sistema LC-UV-MS buscando identificar a presença do composto bromado. Após uma primeira etapa de separação do extrato, as frações resultantes foram analisadas, sendo observada a possível presença de um composto bromado na fração Zvme-5, que foi então purificada por HPLC em fase reversa. As novas frações foram analisadas, observando-se a possível presença do composto 2,5,6-tribromo-*N*-metilgramina na fração Zvme-5b2. Comparando-se o espectro de massas obtido para esta fração com o outro obtido da fração do nudibrânquio pôde-se atestar que se tratava do mesmo composto. O espectro de RMN-

^1H (Figura 7.8, anexo) ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz) da fração Zvme-5b2 foi também obtido e comparado com aquele do composto isolado do *Okenia zoobotryon*, e estão ilustrados a seguir.

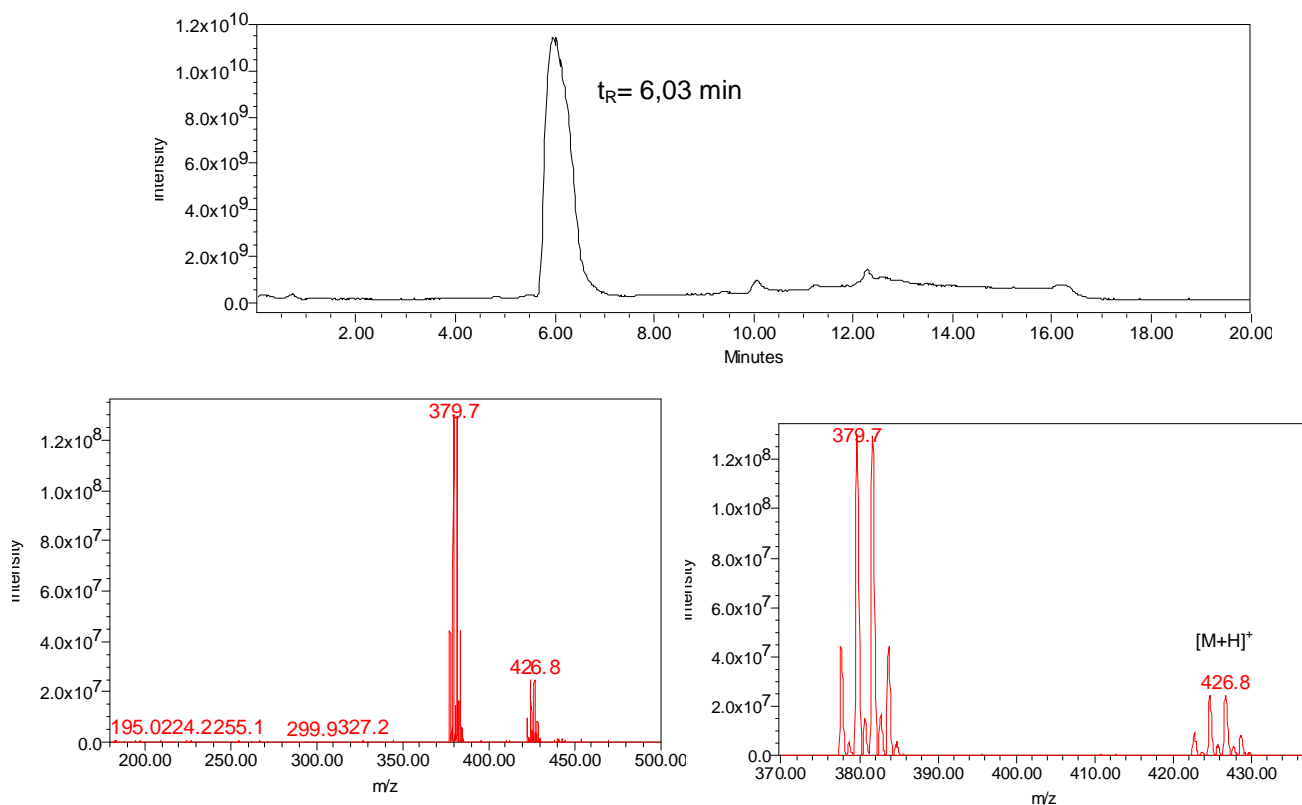
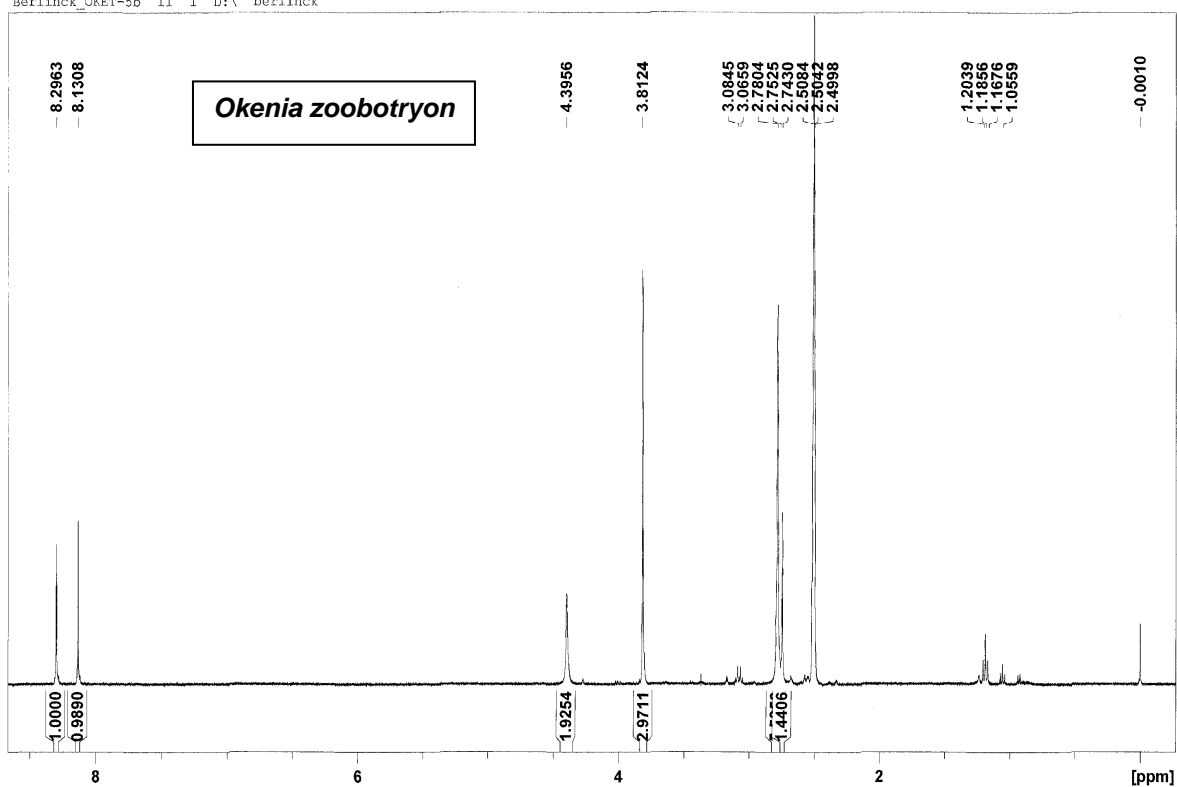


Figura 145: Cromatograma e espectro de massas da fração Zvme-5b2 (ESI^+). Condições: coluna Waters X-Terra MS C_{18} , $3,5 \mu\text{m}$, $2,1 \times 50$ mm; gradiente de MeOH em H_2O (início em MeOH/ H_2O 2:8, curva linear) e fluxo de $0,5 \text{ mL/min.}$; MS: 25 V de voltagem do cone; modo ESI^+ .

Berlinck_OKET-5b 11 1 D:\ berlinck



Berlinck_Zme-5b2 11 1 D:\ berlinck

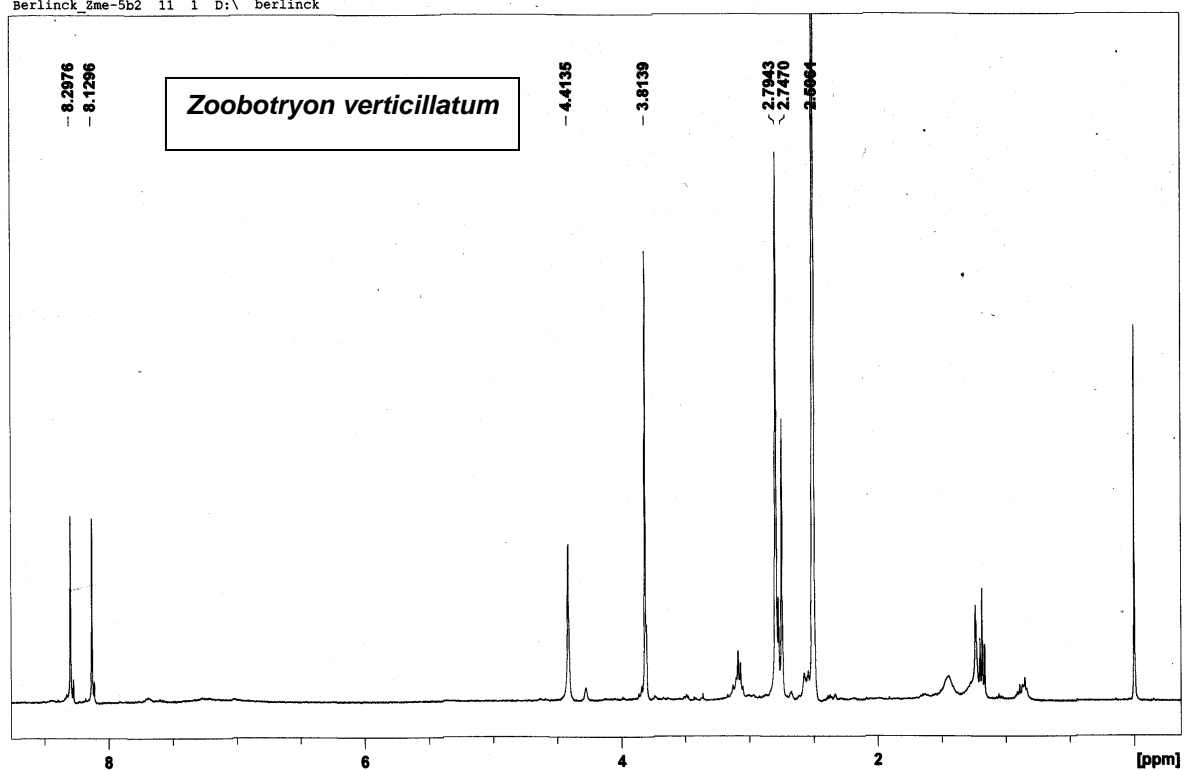
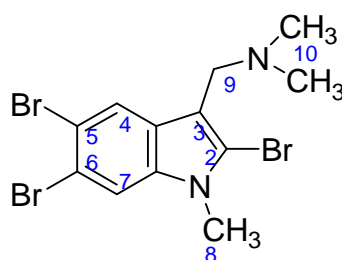


Figura 146: Espectros de RMN-¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz) das frações Oket-5b (*Okenia zoobotryon*) e Zvme-5b2 (*Zoobotryon verticillatum*).

Analisando-se os espectros de RMN-¹H pôde-se notar que são idênticos. Nota-se que a fração que contém o composto isolado do briozoário encontra-se ligeiramente mais impura que a fração do nudibrânquio, porém não interferindo na comparação dos dois.

Desta forma, com base nos espectros de massas e espectros de RMN-¹H obtidos, pôde-se afirmar que o composto isolado nestas frações é o 2,5,6-tribromo-*N*-metilgramina. Embora outros estudos já tivessem relatado a interação entre esses animais, e até mesmo observações de que o nudibrânquio se alimentasse do briozoário, este é o primeiro estudo que mostra o isolamento deste composto a partir do nudibrânquio *Okenia zoobotryon*, indicando que o animal assimila e armazena este composto como uma possível fonte de defesa química.



2,5,6-tribromo-*N*-metilgramina

Figura 147: Estrutura da 2,5,6-tribromo-*N*-metilgramina.

A **Tabela 21** mostra uma comparação direta dos dados de RMN-¹H do composto isolado tanto do nudibrânquio quanto do briozoário (ambos obtidos em DMSO-*d*₆) com os dados da literatura (obtidos em CDCl₃) (Sato, 1983).

Tabela 22: Comparação dos valores de deslocamentos químicos de ^1H das frações Oket-5b e Zvme-5b2 com dados da literatura.

	Oket-5b (DMSO- d_6)	Zvme-5b2 (DMSO- d_6)	Literatura* (CDCl $_3$)
Posição	δ ^1H (mult.)	δ ^1H (mult.)	δ ^1H (mult.)
5	8,29 (s)	8,28 (s)	7,94 (s)
8	8,13 (s)	8,12 (s)	7,58 (s)
10	4,39 (s)	4,41 (s)	3,51 (s)
11	3,81 (s)	3,81 (s)	3,71 (s)
12	2,78 (s)	2,79 (s)	2,25 (s)

*Sato, A., 1983

Na fração Oket-2 de *O. zoobotryon* pôde ser observada a presença de outro composto bromado, de acordo com as análises realizadas por LC-UV-MS. O composto apresentou o pico do íon *quasi*-molecular em m/z 302 com 3 sinais separados por 2 unidades de massa com proporção 1:2:1, indicando um composto com dois átomos de bromo. A busca realizada nos bancos de dados MarinLit e SciFinder não forneceu nenhum composto com estas características. Sendo assim, a fração Oket-2 foi separada por HPLC em fase reversa e enviada a colaboradores no Canadá. Porém, devido a pouca quantidade de massa obtida das frações purificadas (0,3 mg), não foi possível determinar a estrutura do composto bromado de interesse. O espectro de massas do composto desconhecido presente na fração Oket-2d, obtido no sistema LC-UV-MS, está ilustrado a seguir.

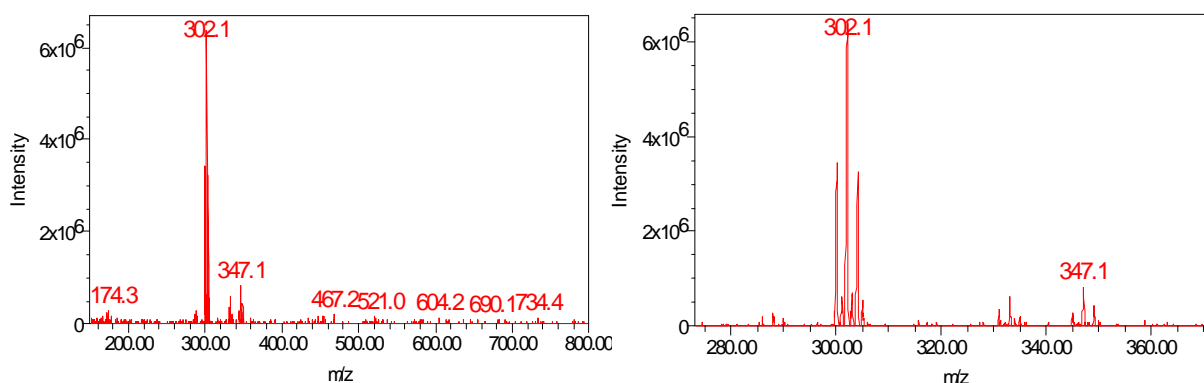


Figura 148: Espectro de massas do composto não identificado da fração Oket-2d (ESI $^+$).

Os resultados obtidos no estudo químico do nudibrânquio *Okenia zoobotryon*, mostram que este acumula substâncias bromadas em seu organismo. A observação do composto com massa molecular de 301 Da, que não foi identificado, apenas no extrato do nudibrânquio (e não no briozoário *Z. verticillatum*) pode levar à discussão se o molusco adquiriu este composto a partir de outra fonte, ou se este é capaz de realizar biossíntese *de novo* produzindo assim outros metabólitos.

Capítulo 8

Conclusões

Neste trabalho foi apresentada a investigação química de extratos de 8 animais marinhos, sendo uma esponja (*Agelas sventres*), uma ascídia (*Didemnum* sp.), dois briozoários (*Bugula* sp. e *Zoobotryon verticillatum*) e quatro nudibrânquios (*Pleurobranchus areolatus*, *Okenia zoobotryon*, *Tambja stegosauriformis* e *Hypselodoris picta lajensis*), todos coletados na costa brasileira. O estudo dos extratos dos nudibrânquios foi realizado sempre com o objetivo de também se comparar seu perfil de metabólitos, com aquele observado para sua respectiva presa.

O estudo realizado com os extratos AcOEt, MeOH e CH₂Cl₂ da esponja *A. sventres* resultou na identificação de uma série de alcalóides bromopirrólicos, sendo a maioria identificados apenas através de análises por LC-UV-MS, MS/MS e comparação dos dados com informações nos bancos de dados SciFinder e Marinlit. O composto oroidina apresentou atividade inibitória frente à enzima Pdr5p de levedura, um resultado ainda não descrito na literatura.

O estudo dos extratos metanólicos do nudibrânquio *Tambja stegosauriformis* e de sua presa, o briozoário *Bugula* sp., resultou no isolamento de seis compostos da classe da tambjamins, todos eles já descritos na literatura. Destes, as tambjamins C, D, K e ainda o composto de hidrólise da tambjamina B, foram identificados nos extratos dos dois animais, indicando que provavelmente o nudibrânquio acumula estas substâncias a partir de sua presa.

A partir do extrato metanólico do nudibrânquio *Pleurobranchus areolatus* foram isolados duas dicetopiperazinas modificadas inéditas na literatura, estruturalmente muito similares a outras duas dicetopiperazinas isoladas de uma ascídia *Didemnum*, as rodriguesinas A e B. A mistura destes compostos apresentou moderada atividade leishmanicida e tripanomicida, porém não seletiva.

A partir do extrato etanólico do nudibrânquio *O. zoobotryon* foi isolado o 2,3,5-tribromo-*N*-metilgramina, um composto conhecido e previamente isolado do briozoário *Zoobotryon verticillatum*. O extrato metanólico deste briozoário, que conhecidamente serve de alimento para *O. zoobotryon*, também foi analisado, de onde obteve-se o mesmo composto. Este é o primeiro estudo de isolamento realizado com o nudibrânquio *Okenia zoobotryon*.

Do molusco *Hypselodoris picta lajensis* foi isolado a lactona da furodisinina, um terpeno já descrito na literatura. Este composto foi isolado também em um trabalho com uma esponja marinha do gênero *Dysidea*, realizado anteriormente em nosso grupo de pesquisa.

Estes resultados, obtidos nos estudos de espécies de nudibrânquios e suas respectivas presas, mostram que estes moluscos são predadores versáteis que podem acumular ou biotransformar diversos metabólitos secundários, pertencentes a classes estruturais distintas, de acordo com sua dieta alimentar, sendo que muitas vezes essas substâncias encontradas nestes animais apresentam importantes atividades biológicas, sendo geralmente utilizados como uma forma de defesa química pelos nudibrânquios. Desta forma, o estudo químico destes animais, juntamente com um maior entendimento da química e da biologia destes organismos, se mostra importante na busca por novos produtos naturais bioativos.

Vale ressaltar a utilização de análises por LC-UV-MS e MS/MS neste trabalho, que auxiliaram na identificação de uma série de compostos presentes nos extratos das espécies de nudibrânquios do presente trabalho, mesmo sem realizar o isolamento de todos eles, fazendo-se comparação de dados com a literatura. Diversos estudos utilizando o método de desreplicação de metabólitos secundários podem ser encontrados na literatura, dentre eles podemos citar a investigação por LC-UV-MS de uma série de espécimes de esponjas do gênero *Aplysina* a fim de se detectar derivados da dibromotirosina (Silva et al., 2010), a desreplicação de glicosídeos presentes nos extratos da planta *Sapindus saponaria* utilizando-se LC-UV-MS/MS (Murgu e Rodrigues-Filho, 2006), ou ainda a desreplicação de

metabólitos de fungos (*Penicilium ochrochloron*, *P. crateriforme* e *Stachybotrys chartarum*) por LC-UV-MS (Nielsen e Smedsgaard, 2003). Tendo-se em vista a limitação de material biológico disponível, esta pode ser considerada uma abordagem sensível e confiável para se conhecer a química de nudibrânquios e suas prêsas.

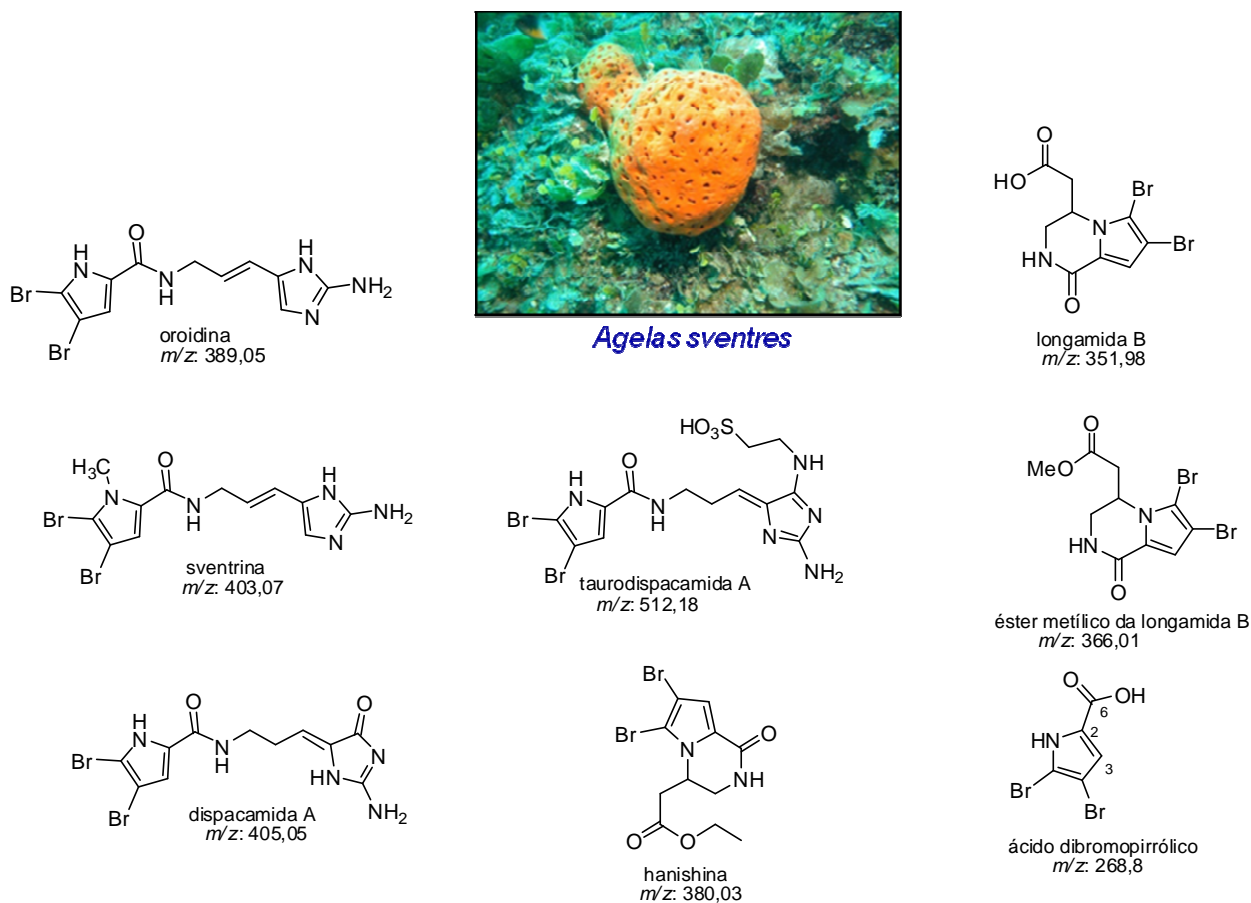
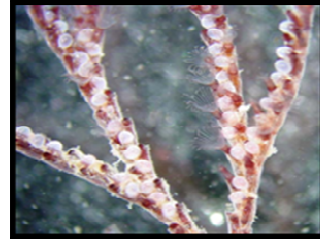


Figura 149: Compostos identificados nos extratos da esponja marinha *Agelas sventres*.



Tambja stegosauriformis



Bugula sp.

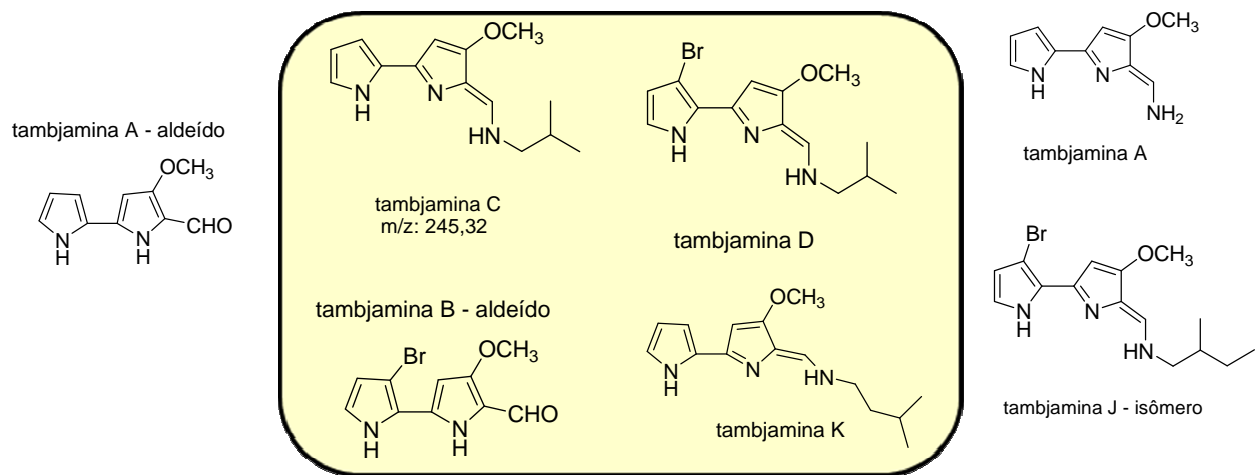
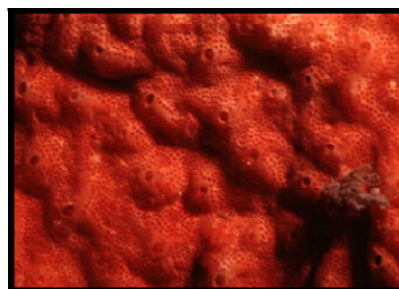


Figura 150: Compostos identificados nos extratos do nudibrânquio *T. stegosauriformis* e sua presa, o briozoário *Bugula sp.*



Pleurobranchus areolatus



Didemnum sp.

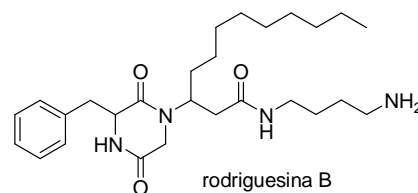
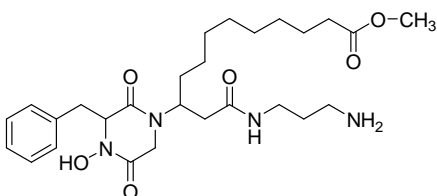
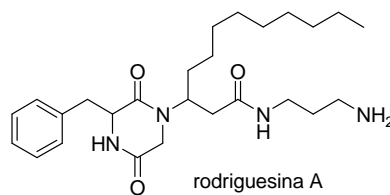
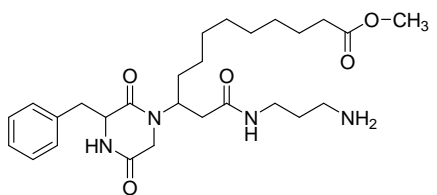
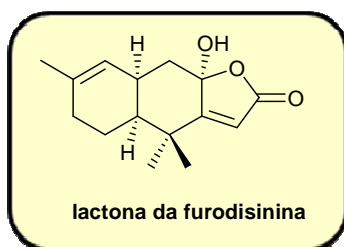


Figura 151: Compostos identificados nos extratos do nudibrânquio *P. areolatus* e sua presa, a ascídia *Didemnum* sp.



Hypselodoris lajensis

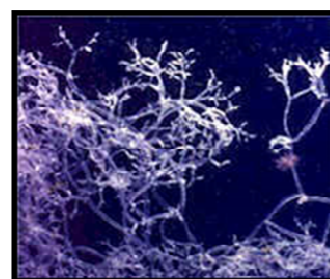
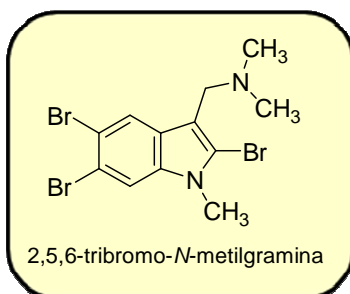


Dysidea sp.

Figura 152: Compostos identificados nos extratos do nudibrânquio *H. lajensis* e sua presa, a esponja marinha *Dysidea* sp.



Okenia zoobotryon



Zoobotryon verticillatum

Figura 153: Compostos identificados nos extratos do nudibrânquio *O. zoobotryon* e sua presa, o briozoário *Z. verticillatum*.

Capítulo 9

Referências Bibliográficas

ALDRICH, L.N.; STOOPS, S.L.; CREWS, B.C.; MARNETT, L.J.; LINDSLEY, C.W. Total synthesis and biological evaluation of tambjamine K and a library of unnatural analogs, **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, 20, 5207-5211, 2010.

ANDERSEN, R.J.; FAULKNER, D.J.; CUN-HENG, H.; van DUYN, G.D.; CLARDY, J. Metabolites of the marine prosobranch mollusc *Lamellaria* sp., **Journal of the American Society**, 107, N.19, 5492-5495, 1985.

APPENZELLER, J.; TILVI, S.; MARTIN, M.; GALLARD, J.; EL-BITAR, H.; DAU, E.T.; DEBITUS, C.; LAURENT, D.; MORIOU, C.; AL-MOURABIT, A. Benzosceptrins A and B with a unique benzocyclobutane skeleton and Nagelamide S and T from Pacific sponges, **Organic Letters**, 11, N.21, 4874-4878, 2009.

APPLETON, D.R.; CHUEN, C.S.; BERRIDGE, M.V.; WEBB, V.L.; COPP, B.R. Rossinones A and B, Biologically active meroterpenoids from the Antarctic ascidian, *Aplidium* species, **Journal of Organic Chemistry**, 74, 9195-9198, 2009.

ARAKI, A.; TSUDA, M.; KUBOTA, T.; MIKAMI, Y.; FROMONT, J.; KOBAYASHI, J. Nagelamide J, a novel dimeric bromopyrrole alkaloid from sponge *Agelas* species, **Organic Letters**, 9, N.12, 2369-2371, 2007.

ARAKI, A.; KUBOTA, T.; TSUDA, M.; MIKAMI, Y.; FROMONT, J.; KOBAYASHI, J. Nagelamides K and L, dimeric bromopyrrole alkaloids from sponge *Agelas* species, **Organic Letters**, 10, N.11, 2099-2102, 2008.

ARAKI, A.; KUBOTA, T.; AOYAMA, K.; MIKAMI, Y.; FROMONT, J.; KOBAYASHI, J. Nagelamides Q and R, novel dimeric bromopyrrole alkaloids from sponges *Agelas* sp., **Organic Letters**, 11, N.8, 1785-1788, 2009.

AVILA, C.; CIMINO, G.; FONTANA, A.; GAVAGNIN, M.; ORTEA, J.; TRIVELLONE, Defensive strategy of two *Hypselodoris* nudibranchs from Italian and Spanish coasts, **Journal of Chemical Ecology**, 17, 625-636, 1991.

BERGMANN, W., Comparative biochemical studies on the lipids of marine Invertebrates, with special reference to the sterols, **Journal of Marine Research**, 8, 2, 137-171, 1949.

BERGMANN, W.; FEENEY, R.J., Contributions of the study of marine products, XXXII, The nucleosides of sponges, **Journal of Organic Chemistry**, 16, 6, 981-987, 1951.

BERGMANN, W.; FEENEY, R.J., The isolation of a new thymine pentoside from sponges, **Journal of the American Chemical Society**, 72, 6, 2809-2810, 1950.

BERGMANN, W., WATKINS, J.C., STEMPIEN, H.F., Contributions of the study of marine products, XIV, Sponges nucleic acids, **Journal of Organic Chemistry**, 22, 1308, 1957.

BERLINCK, R.G.S., BRITTON, R., PIERS, E., LIM, L., ROBERGE, M., DA ROCHA, M.R., ANDERSEN, R.J., Granulatimide and isogranulatimide, aromatic alkaloids with G2 checkpoint inhibition isolated from the Brazilian ascidian *Didemnum granulatum*: structure elucidation and synthesis. **Journal of Organic Chemistry**, 63, 9850-9856, 1998.

BISHARA, A.; RUDI, A.; GOLDBERG, I.; AKNIN, M.; NEUMANN, D.; BEN-CALIFA, N.; KASHMAN, Y., Tausalarin C: A new bioactive marine sponge-derived nitrogenous bismacrolide, **Organic Letters**, 11, N.16, 3538-3541, 2009.

BLACKMAN, A.J.; LI, C. New tambjamine alkaloids from the marine bryozoan *Bugula dentata*, **Australian Journal of Chemistry**, 47, 1625-1629, 1994.

BLUNT, J.W., COPP, B.R., HU, W.P., MUNRO, M.H.G., NORTHCOTE, P.T., PRINSEP, M.R., Marine Natural Products, **Natural Product Reports**, 28, 196-268, 2011.

BRITTON, R., DE OLIVEIRA, J.H.H.L., ANDERSEN, R.J. E BERLINCK, R.G.S., Granulatimide and 6-bromogranulatimide, minor alkaloids of the Brazilian ascidian *Didemnum granulatum*, **Journal of Natural Products**, 64, 254-255, 2001.

BURKE, C.; THOMAS, T.; EGAN, S.; KJELLEBERG, S. The use of functional genomics for the identification of a gene cluster encoding for the biosynthesis of an antifungal tambjamine in the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*, **Environmental Microbiology**, 9, 814-818, 2007.

BUTLER, A.; CARTER-FRANKLIN, J.N. The role of vanadium bromoperoxidase in the biosynthesis of halogenated marine natural products, **Natural Products Reports**, 21, 180-188, 2004.

CAFIERI, F.; FATTORUSSO, E.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. Novel bromopyrrole alkaloids from the sponge *Agelas dispar*, **Journal of Natural Products**, 61, 122-125, 1998.

CARBONE, M.; IRACE, C.; COSTAGLIOLA, F.; CASTELLUCCIO, F.; VILLANI, G.; CALADO, G.; PADULA, V.; CIMINO, G.; CERVERA, J.L.; SANTAMARIA, R.; GAVAGNIN, M. A new cytotoxic tambjamine alkaloid from the Azorean nudibranch *Tambja ceutae*, **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, 20, 2668-2670, 2010.

CARROL, A.R.; DUFFY, S.; AVERY, V.M. Aplidiopsamina A, an antiplasmodial alkaloid from the temperate Australian ascidian, *Aplidiopsis confluata*, **Journal of Organic Chemistry**, 75, 8291-8294, 2010.

CARTÉ, B.; FAULKNER, D.J. Defensive metabolites from three nembrotid nudibranchs, **Journal of Organic Chemistry**, 48, N.14, 2314-2318, 1983.

CARTER-FRANKLIN, J.N.; PARRISH, J.D.; TSCHIRRET-GUTH, R.A.; LITTLE, R.D.; BUTLER, A. Vanadium haloperoxidase-catalyzed bromination and cyclization of terpenes, **Journal of the American Chemical Society**, 125, 3688-3689, 2003.

- CAVALCANTI, B.C.; JÚNIOR, H.V.N.; SELEGHIM, M.H.R.; BERLINCK, R.G.S.; CUNHA, G.M.A.; MORAES, M.O.; PESSOA, C. Cytotoxic and genotoxic effects of tambjamine D, an alkaloid isolated from the nudibranch *Tambja eliora*, on Chinese hamster lung fibroblasts, **Chemico-Biological Interactions**, 174, 155-162, 2008.
- CERDEÑO, A.M.; BIBB, M.J.; CHALLIS, G.L. Analysis of the prodiginine biosynthesis gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2): new mechanisms for chain initiation and termination in modular multienzymes, **Chemistry and Biology**, 8, 817-829, 2001.
- CIAVATTA, M.L.; MANZO, E.; NUZZO, G.; VILLANI, G.; VARCAMONTI, M.; GAVAGNIN, M. Crucigasterins A-E, antimicrobial amino alcohols from the Mediterranean colonial ascidian *Pseudodistoma crucigaster*, **Tetrahedron**, 66, 7533-7538, 2010.
- CORLEY, D.G.; HERB, R.; MOORE, R.E.; SCHEUER, P.J. New potent cytotoxic macrolides from a marine sponge and a nudibranch predator, **Journal of Organic Chemistry**, 53, 3644-3646, 1988.
- CRAGG, G.M., NEWMAN, D.J., SNADER, K.M., Natural products in drug discovery and development, **Journal of Natural Products**, 60, 52-60, 1997.
- ENDO, T.; TSUDA, M.; OKADA, T.; MITSUHASHI, S.; SHIMA, H.; KIKUCHI, K.; MIKAMI, Y.; FROMONT, J.; KOBAYASHI, J. Nagelamides A-H, New dimeric bromopyrrole alkaloids from marine sponge *Agelas* species, **Journal of Natural Products**, 67, 1262-1267, 2004.
- FATTORUSSO, E.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. Two novel pyrrole-imidazole alkaloids from the Mediterranean sponge *Agelas oroides*, **Tetrahedron Letters**, 41, 9917-9922, 2000.
- FAULKNER, D.J.; MOLINSKI, T.F.; ANDERSEN, R.J.; DUMDEI, E.J.; DILIP de SILVA, E. Geographical variation in defensive chemicals from Pacific coast dorid nudibranchs and some related marine mollusks, **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology**, 97, 233-240, 1990.
- FENG, Y.; DAVIS, R.A.; SYKES, M.; AVERY, V.M.; CAMP, D.; QUINN, R.J. Antitrypanosomal cyclic polyketide peroxides from the Australian marine sponge *Plakortis* sp., **Journal of Natural Products**, 73, 716-719, 2010.
- FINLAYSON, R.; PEARCE, A.N.; PAGE, M.J.; KAISER, M.; BOURGUET-KONDRACKI, M.; HARPER, J.L.; WEBB, V.L.; COPP, B.R. Didemnidines A and B, indole spermidine alkaloids from the New Zealand ascidian *Didemnum* sp., **Journal of Natural Products**, 74, 888-892, 2011.
- FONTANA, A.; TRIVELLONE, E.; MOLLO, E.; CIMINO, G. Further chemical studies of Mediterranean and Atlantic *Hypselodoris* nudibranchs: A new furanosesquiterpenoid from *Hypselodoris webbi*, **Journal of Natural Products**, 57, 510-513, 1994.
- FONTANA, A.; CAVALIERE, P.; UNGUR, N.; D'SOUZA, L.; PARAMESWARAM, P.S.; CIMINOM G. New scalarenes from the nudibranch *Glossodoris atromarginata* and its sponge prey, **Journal of Natural Products**, 62, 1367-1370, 1999.

- FONTANA, A.; CAVALIERE, P.; WAHIDULLA, S.; NAIK, C.H.; CIMINO, G. A new antitumor isoquinoline alkaloid from the marine nudibranch *Jorunna funebris*, **Tetrahedron**, 56, 7305-7308, 2000.
- FRANKS, A.; HAYWOOD, P.; HOLMSTROM, C.; EGAN, S.; KJELLEBERG, S.; KUMAR, N. Isolation and structure elucidation of a novel yellow pigment from the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*, **Molecules**, 10, 1286-1291, 2005.
- FUJITA, M.; NAKAO, Y.; MATSUNAGA, S.; SEIKI, M.; ITOH, Y.; YAMASHITA, J.; van SOEST, R.W.; FUSETANI, N. Ageladine A: An antiangiogenic matrixmetalloproteinase inhibitor from the marine sponge *Agelas nakamurai*, **Journal of the American Chemical Society**, 125, 15700-15701, 2003.
- FU, X.; PALOMAR, A.J.; HONG, E.P.; SCHMITZ, F.J.; VALERIOTE, F.A. Cytotoxic lissoclimide-type diterpenes from the mollusks *Pleurobranchus albiguttatus* e *Pleurobranchus forskalii*, **Journal of Natural Products**, 67, 1415-1418, 2004.
- GANDOLFI, R.C.; MEDINA, M.B.; BERLINCK, R.G.S.; LIRA, S.P.; GALETTI, F.C.; SILVA, C.L.; VELOSO, K.; FERREIRA, A.G.; HAJDU, E.; PEIXINHO, S. Metabólitos secundários das esponjas *Aplysina fistularis* e *Dysidea* sp. e atividade antituberculose da 11-cetofistularina-3, **Química Nova**, 33, N.9, 1853-1858, 2010.
- GASPAR, H.; GAVAGNIN, M.; CALADO, G.; CASTELLUCCIO, F.; MOLLO, E.; CIMINO, G. Pelseneeriol-1 and -2: new furanosesquiterpene alcohols from porostome nudibranch *Doriopsilla pelseneeri*, **Tetrahedron**, 61, 11032-11037, 2005.
- GOTTESMAN, M.M.; FOJO, T.; BATES, E. Multidrug resistance in Cancer: role of ATP-dependent transporters, **Nature Reviews Cancer**, 2, 48-58, 2002.
- GRANATO, A.C.; OLIVEIRA, J.H.H.L.; SELEGHIM, M.H.R.; BERLINCK, R.G.S.; MACEDO, M.L.; FERREIRA, A.G.; ROCHA, R.M.; HAJDU, E.; PEIXINHO, S.; PESSOA, C.O.; MORAES, M.O.; CAVALCANTI, B.C. Produtos naturais da ascídia *Botrylloides giganteum*, das esponja *Verongula gigantea*, *Ircinia felix*, *Cliona delitrix* e do nudibrânquio *Tambja eliora*, da costa do Brasil, **Química Nova**, 28, n. 2, 192-198, 2005.
- GRODE, S.H.; CARDELLINA, J.H. Sesquiterpenes from the sponge *Dysidea etheria* and the nudibranch *Hypselodoris zebra*, **Journal of Natural Products**, 47, n. 1, 76-83, 1984.
- GUSTAFSON, K.; ANDERSEN, R.J.; CHEN, M.H.M.; CLARDY, J.; HOCHLOWSKI, J.E. Terpenoic acid glycerides from the dorid nudibranch *Archidoris montereyensis*, **Tetrahedron Letters**, 25, 11-14, 1984.
- GUSTAFSON, K.; ANDERSEN, R.J. Chemical studies of British Columbia nudibranchs, **Tetrahedron**, 41, 1101-1108, 1985.
- HIROTA, H.; OKINO, T.; YOSHIMURA, T.; FUSETANI, N. Five new antifouling sesquiterpenes from two marine sponges of the genus *Axinyssa* and the nudibranch *Phyllidia pustulosa*, **Tetrahedron**, 54, 13971-13980, 1998.
- HIRSCH, S.; MIROZ, A.; MCCARTHY, P.; KASHMAN, Y. Etzionin, a new antifungal metabolite from a Red Sea tunicate, **Tetrahedron Letters**, 30, 4291-4294, 1989.

HOCHLOWSKI, J.E.; WALKER, R.P.; IRELAND, C.; FAULKNER, D.J. Metabolites of four nudibranchs of the Genus *Hypselodoris*, *Journal of Organic Chemistry*, 47, 88-91, 1982.

HOSTETTMANN, K., QUIEROZ, E.F., VIEIRA, P.C., **Princípios de Plantas Superiores**, São Carlos: EdUFSCar, 9-13, 2003.

KANO, K., KOHNO, S., KATADA, J., TAKAHASHI, J., UNO, I. (-)-Phenylahistin arrests cells in mitosis by inhibiting tubulin polymerization, *Journal of Antibiotics*, 52, 134-141, 1999.

KELECOM, A., Marine Natural Products in Brazil, Par 1, Isolation and Structure Determination, *Ciência e Cultura*, **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, 49, 5/6, 321-330, 1997

KOSSUGA, M.H.; LIRA, S.P.; McHUGH, S.; TORRES, Y.R.; LIMA, B.A.; GONÇALVES, R.; VELOSO, K.; FERREIRA, A.G.; ROCHA, R.M.; BERLINCK, R.G.S. Antibacterial modified diketopiperazines from two ascidians of the Genus *Didemnum*, *Journal of Brazilian Chemical Society*, 20, N.4, 704-711, 2009.

KOTT, P., PARRY, D.L. E COX, G.C., Prokaryotic symbionts with a range of ascidians hosts, *Bulletin of Marine Science*, 34, 308-312, 1984.

KUBOTA, T.; ARAKI, A.; ITO, J.; MIKAMI, Y.; FROMONT, J.; KOBAYASHI, J. Nagelamides M and N, new bromopyrrole alkaloids from sponge *Agelas* species, *Tetrahedron*, 64, 10810-10813, 2008.

KUBOTA, T.; ARAKI, A.; YASUDA, T.; TSUDA, M.; FROMONT, J.; AOYAMA, K.; MIKAMI, Y.; WÄLCHLI, M.R.; KOBAYASHI, J. Benzosceptrin C, a new dimeric bromopyrrole alkaloid from sponge *Agelas* sp., *Tetrahedron Letters*, 50, 7269-7270, 2009.

KOJIRI, K.; NAKAJIMA, S.; SUZUKI, H.; OKURA, A.; SUDA, H. A new antitumor substance, BE-18591, produced by a Streptomyces; fermentation, isolation, physico-chemical and biological properties, *Journal of Antibiotics*, 46, 1799-1803, 1993.

IRELAND, C.M., COPP, B.R., FOSTER, M.P., Biomedical Potential of Marine Natural Products, **Marine Biotechnology**, editado por D.H. Attaway and O R. Zaborsky, Plenum Press, New York and London, 1-43, 1993.

JEON, J.; BAE, J.; LEE, K.J.; OH, K.; SHIN, J. Scalarane sesterterpenes from the sponge *Hyatella* sp., *Journal of Natural Products*, 74, 847-851, 2011.

JEONG, S.; HIGUCHI, R.; MIYAMOTO, T.; ONO, M.; KUWANO, M.; MAWATARI, S.F. Bryoathratiophene, a new antiangiogenic constituent from the bryozoan *Watersipora subtorquata*, *Journal of Natural Products*, 65, 1344-1345, 2002.

LAMPING, E.; BARET, P.V.; HOLMES, A.R.; MONK, B.C.; GOFFEAU, A.; CANNON, R.D. Fungal DPR transporters: Phylogeny, topology, motifs and function, **Fungal Genetics and Biology**, 2, 127-142, 2010.

- LANE, J.E.; RIBEIRO-RODRIGUES, R.; SUAREZ, C.C.; BOGITSH, B.J.; JONES, M.M.; SINGH, P.K.; CARTER, C.E. In vitro trypanocidal activity of tetraethylthiuram disulfide and sodium diethylamine-N-carbodithioate on *Trypanosoma cruzi*, **Am. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 55, 3, 263-266, 1996.
- LEWIN, R.A. E CHENG, L., **Collection and handling of *Prochloron* and its ascidian host**, In: Lewin, R.A.; Cheng, L., eds. *Prochloron: a microbial enigma*. New York, Chapman and Hall, 9-18, 1989.
- LIMA, L.M., Química medicinal moderna: Desafios e contribuição brasileira, **Química Nova**, 30, 6, 1456-1468, 2007.
- MANCINI, I.; GUELLA, G.; AMADE, P.; ROUSSAKIS, C.; PIETRA, F. Hanishin, a semiracemic, bioactive C₉ alkaloid of the Axinellide sponge *Acanthella carteri* from the Hanish Islands. A shunt metabolite?, **Tetrahedron Letters**, 38, N.35, 6271-6274, 1997.
- MANZO, E.; CIAVATTA, M.L.; GAVAGNIN, M.; MOLLO, E.; GUO, Y.; CIMINO, G. Isocyanide terpene metabolites of *Phyllidiella pustulosa*, a nudibranch from the south China sea, **Journal of Natural Products**, 67, 1701-1704, 2004.
- MARTINEZ, J.S.; CARROLL, G.L.; TSCHIRRET-GUTH, A.; ALTENHOFF, G.; LITTLE, R.D.; BUTLER, A. On the regiospecificity of vanadium bromoperoxidase, **Journal of the American Chemical Society**, 123, 3289-3294, 2001.
- MARTINS, M.B., CARVALHO, I. Diketopiperazines: biological activity and synthesis, **Tetrahedron**, 63, 9923-9932, 2007.
- McCONNELL, O.J., LONGLEY, R.E., KOEHN, F.E., The discovery of marine natural products with therapeutic potential, in **The Discovery of Natural Products With Potential**, 109-174, 1994.
- McPHAIL, K.; DAVIES-COLEMAN, M.T.; COETZEE, P. A new furanosesterterpene from the South African nudibranch *Hypselodoris capensis* and a Dictyoceratida sponge, **Journal of Natural Products**, 61, 961-964, 1998.
- MILANOWSKI, D.J.; GUSTAFSON, K.R.; KELLEY, J.A.; McMAHON, J.B. Caulibugulones A-F, novel cytotoxic isoquinoline quinones and iminoquinones from the marine bryozoan *Caulibugula intermis*, **Journal of Natural Products**, 67, 70-73, 2004.
- MOLINSKI, T.F.; DALISAY, D.S.; LIEVENS, S.L.; SALUDES, J.P. Drug developments from marine natural products, **Nature Reviews Drug Discovery**, 8, 69-85, 2009.
- MONNIOT, C., MONNIOT, F. E LABOUTE, P., General organization of an ascidian. In: **Coral reef ascidians of New Caledonia**, Paris, Orston, 9-78, 1991.
- MURGU, M.; RODRIGUES-FILHO, E. Dereplication of glycosides from *Sapindus saponaria* using liquid chromatography-mass spectrometry, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 17, 12181-1290, 2006.

- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M., Natural products as sources of new drugs over the last 25 years, **Journal of Natural Products**, 70, 461-477, 2007.
- NIELSEN, K.F.; SMEDSGAARD, J. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology, **Journal of Chromatography A**, 1002, 111-136, 2003.
- NIIMI, K.; HARDING, D.R.; PARSHOT, R.; KING, A.; LUN, D.J.; DECOTTIGNIES, A.; NIIMI, M.; LIN, S.; CANNON, R.D.; GOFFEAU, A.; MONK, B.C. Chemosensitization of fluconazole resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and pathogenic fungi by a D-octapeptide derivative, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 48, 1256-1271, 2004.
- ORTEGA, M.J.; ZUBÍA, E.; SALVÁ, J. A new brominated indole-3-carbaldehyde from the marine bryozoan *Zoobotryon verticillatum*, **Journal of Natural Products**, 56, 633-636, 1993.
- PEARCE, C.J.; DOYLE, T.W.; FORENZA, S.; LAM, K.S.; SCHROEDER, D.R. The biosynthetic origins of rebeccamycin, **Journal of Natural Products**, 51, 937-940, 1988.
- PESCHKE, J.D.; HANEFELD, U.; LAATHSC, H. Biosynthesis of the marine antibiotic pentabromopseudilin. 2. The pyrrole ring, **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 69, 628-630, 2005.
- PIÑA, I.C.; WHITE, K.N.; CABRERA, G.; RIVERO, E.; CREWS, P. Bromopyrrole carboxamide biosynthetic products from the Caribbean sponge *Agelas dispar*, **Journal of Natural Products**, 70, 613-617, 2007.
- PINKERTON, D.M.; BANWELL, M.G.; WILLIS, A.C. Total syntheses of tambjamines C, E, F, G, H, I and J, BE-18591, and a related alkaloid from the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicata*, **Organic Letters**, 9, N.24, 5127-5130, 2007.
- PROKSCH, P.; EDRADA, R.A.; EBEL, R. Drugs from the seas: current status and microbiological implications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 59, 125-134, 2002.
- RABINOVITCH, M.; ALFIERI, S. C., From Lysosomes To Cells, From Cells To Leishmania - Amino-Acid Esters As Potential Chemotherapeutic-Agents, **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, 20, 665-674, 1987.
- RATEB, M.E.; HOUSSEN, W.E.; SCHUMACHER, M.; HARRISON, W.T.A.; DIEDERICH, M.; EBEL, R.; JASPARS, M. Bioactive diterpene derivatives from the marine sponge *Spongionella* sp., **Journal of Natural Products**, 72, 1471-1476, 2009
- REDDY, S.M.; SRINIVASULU, M.; SATYANARAYANA, N.; KONDAPI, A.K.; VENKATESWARLU, Y. New potent cytotoxic lamellarin alkaloids from Indian ascidian *Didemnum obscurum*, **Tetrahedron**, 61, 9242-9247, 2005.
- REGALADO, E.L.; LAGUNA, A.; MENDIOLA, J.; THOMAS, O.P.; NOGUEIRAS, C. Bromopyrrole alkaloids from the Caribbean sponge *Agelas cerebrum*, *Química Nova*, 34, N.2, 289-291, 2011.
- REISWIG, H.M. Population dynamics of three Jamaican Demospongiae. **Bulletin of Marine Science**, 23, 2, 191-226, 1973.

RHO, J.; HWANG, B.S.; SIM, C.J.; JOUNG, S.; LEE, H.; KIM, H. Phorbaketals A, B and C, sesterterpenoids with a spiroketal of hydrobenzopyran moiety isolated from the marine sponge *Phorbas* sp.. **Organic Letters**, 11, No.24, 5590-5593, 2009.

ROBINSON, N.M. Interactions between the nudibranch *Okenia zoobotryon* and its bryozoan prey *Zoobotryon verticillatum*. B.S. University of Central Florida, 2000.

ROCHA, A.B.; LOPES, R.M., SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. **Current Opinion in Pharmacology**, 1, N.4, 364-369, 2001.

RUPPERT, E.E., BARNES, R.D., **Zoologia dos invertebrados**, Editora Roca Ltda., Rio de Janeiro. 353-385, 972-995, 1994.

RUPPERT, E.E.; BARNES, R.D. **Zoologia dos Invertebrados**. 6. ed. São Paulo: Editora Roca, 1996. 72-93.

SAKIO, Y.; HIRAO, Y.J.; HAYASHI, M.; KOMIYAMA, K.; ISHIBASHI, M. Dendocarbins A-N, new drimane sesquiterpenes from the nudibranch *Dendrodoris carbunculosa*, **Journal of Natural Products**, 64, 726-731, 2001.

SATO, A.; FENICAL, W. Gramine-derived bromo-alkaloids from the marine bryozoan *Zoobotryon verticillatum*, **Tetrahedron Letters**, 24, N.5, 481-484, 1983.

SCHULTZ, A.W., OH, D-C., CARNEY, J.R., WILLIAMSON, R.T., UDWARAY, D.W., JENSEN, P.R., GOULD, S.J., FENICAL, W., MOORE, B.S., Biosynthesis and structures of cyclomarins and cyclomarazines, prenylated cyclic peptides of marine actinobacterial origin, **Journal of the American Chemical Society**, 130, 4507-4516, 2008.

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**, 63, 886-894, 2010.

SILVA, S.R.; TESSIS, A.C.; FERREIRA, P.F.; RANGEL, L.P.; GARCIA-GOMES, A.S.; PEREIRA, F.R.; BERLINCK, R.G.S.; MURICY, G.; FERREIRA-PEREIRA, A. Oroidin inhibits the activity of the multidrug resistance target Pdr5p from yeast plasma membranes, **Journal of Natural Products**, 74, 279-282, 2011.

SINGS, H.L. E RINEHART, K.L., Compounds produced from potencial tunicate-blue-green algal symbiosis: a review, **Journal of Industrial Microbiology**, 17, 385-396, 1996.

SOLANO, G.; MOTTI, C.A.; JASPARS, M. New iodotyramine derivatives from *Didemnum rubeum*, **Tetrahedron**, 65, 7482-7486, 2009.

SOUZA, M.V.N., PINHEIRO, A.C., FERREIRA, M.L., GONÇALVES, R.S.B., LIMA, C.H.C., Produtos naturais em fase avançada de testes clínicos no tratamento contra o câncer, **Revista Fitos**, 3, 2, 25-42, 2007.

SPINELLA, A.; MOLLO, E.; TRIVELLONE E.; CIMINO, G. Testudinariol A and B, two unusual triterpenoids from the skin and the mucus of the marine Mollusc *Pleurobranchus testudinarius*, **Tetrahedron**, 53, 16891-16896, 1997.

TADA, H.; SHIHO, O.; KUROSHIMA, K.; KOYAMA, M.; TSUKAMOTO, K. An improved colorimetric assay for interleukin-2, **Journal of Immunological Methods**, 93, 157-165, 1986.

TADESSE, M.; STROM, M.B.; SVENSON, J.; JASPARS, M.; MILNE, B.F.; TORFOSS, V.; ANDERSEN, J.H.; HANSEN, E.; STENSVAG, K.; HAUG, T. Synoxazolidinones A and B: Novel bioactive alkaloids from the ascidian *Synoicum pulmonaria*, **Organic Letters**, 12, N.21, 4752-4755, 2010.

TAKEARA, R., LOPES, J.L.C., LOPES, N.P., JIMENEZ, P.C., COSTA-LOTUFO, L.V., LOTUFO, T.M.C., Constituintes químicos da ascídia *Didemnum psammatoedes* (Sluiter, 1985) coletada na costa cearense, **Química Nova**, 30, 5, 1179-1181, 2007

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

TEMPONE, A.G., PEREZ, D.; RATH, S.; VILARINHO, A.L.; MORTARA, R.A.; ANDRADE JR, H.F. Targeting *Leishmania (L.) chagasi* amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 54, 60-68, 2004.

THOMSON, R.H., "The Chemistry of Natural Products", Edited by R. H. Thom-. son. The Blackie Publishing Group, Glasgow,. 467 p, 1985.

TILL, M.; PRINSEP, M.R.; 5-Bromo-8-methoxy-1-methyl- β -carboline, an alkaloid from the New Zealand marine bryozoa *Pterocella vesiculosa*, **Journal of Natural Products**, 72, 796-798, 2009.

TISCHLER, M.; ANDERSEN, R.J. Terpenoids from the sponge *Aplysilla glacialis* and specimens of the nudibranch *Cadlina luteomarginta* found on the sponge, **Journal of Organic Chemistry**, 56, 42-47, 1991.

UDDIN, M.H.; OTSUKA, M.; MUROI, T.; ONO, A.; HAIF, N.; MATSUDA, S.; HIGA, T.; TANAKA, J. Deoxymanoalides from the nudibranch *Chromodoris willani*, **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 57, 885-887, 2009.

VIEGAS, C.J., BOLZANI, V.S., BARREIRO, E.J., Os produtos naturais e a Química medicinal moderna, **Química Nova**, 29, 2, 326-337, 2006.

WALSH, C.T.; GARNEAU-TSODIKOVA, S.; HOWARD-JONES, A.R. Biological formation of pyrroles: nature's logic and enzymatic machinery, **Natural Products Reports**, 23, 517-531, 2006.

WESSON, K.J.; HAMANN, M.T. Keenamides A, a bioactive cyclic peptide from the marine mollusk *Pleurobranchus forskalii*, **Journal of Natural Products**, 59, 629-631, 1996.

YAO, B., PRINSEP, M.R., NICHOLSON, B.K., GORDON, D.P. The Pterocellins, novel bioactive alkaloids from the marine bryozoan *Pterocella vesiculosa*, **Journal of Natural Products**, 66, 1074-1077, 2003.

YONG, K.W.L.; SALIM, A.A.; GARSON, M.J. New oxygenated diterpenes from an Australian nudibranch of the genus *Chromodoris*, **Tetrahedron**, 64, 6733-6738, 2008.

YUNES, R.A., PEDROSA, R.C., CECHINEL FILHO, V., Pharmaceuticals and phytotherapies: The need for development of the industry of phytopharmaceuticals and phytotherapies in Brazil, **Química Nova**, 24, 147-152, 2001.