

Instituto de Química de São Carlos

Vítor Fernandes Freire

**QUIMIOPROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE ESPONJAS
MARINHAS DO LITORAL NORTE DO BRASIL**

São Carlos

2021

Vítor Fernandes Freire

Exemplar revisado

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

QUIMIOPROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE ESPONJAS MARINHAS DO LITORAL NORTE DO BRASIL

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

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck

São Carlos

2021

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

Assinatura:

Data:

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

Freire, Vítor Fernandes

Quimioprospecção de metabólitos secundários de esponjas marinhas do litoral norte do Brasil / Vítor Fernandes Freire. — São Carlos, 2021.

373 f.

Tese (Doutorado em Química Orgânica e Biológica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2021.

Edição revisada

Sonia Alves - CRB: 4280/8



AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida (Processo 141464/2017-8). Agradeço também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida no primeiro mês do doutorado (Processo 1681546).

Agradeço ao Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck pela oportunidade de desenvolver pesquisas que contribuíram muito para o meu crescimento profissional.

Aos grupos dos Prof. Dr. Eduardo Hadju e Prof. Dr. Gilberto A. Filho pelas coletas das esponjas marinhas estudadas nessa tese.

Ao Prof. Dr. Antônio G. Ferreira pela realização das análises de RMN.

À Prof. Dr.^a Joanna Burdette pela realização dos ensaios de atividade citotóxica.

Ao Me. André L. Tognon, à Dr.^a Sylvana C. M. Agostinho e ao Sr. Aldimar T. J. Constante por todo auxílio com os equipamentos da CAQI.

À Seção de Pós-Graduação do IQSC por toda a ajuda ao longo desses anos.

Aos integrantes atuais e ex-integrantes do Grupo de Química Orgânica de Sistema Biológicos por todo o auxílio.

Aos meus amigos Mirelle Takaki, Laura Lôca, Jairo Quintana, Juliano Slivinski, Leandro Oliveira, Camila Crnkovic, Fabiana Rodrigues e Karen Nicácio por toda a ajuda e amizade ao longo de todo esse doutorado.

Aos meus pais, Petronilio e Tania, e à minha irmã e meu cunhado, Dayane e Rodrigo, pelo apoio incondicional e por nunca terem deixado de me apoiar e fazer todo o necessário para que eu conseguisse realizar esse sonho, que sempre pareceu tão distante de nossa realidade.

Agradeço à todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Muito Obrigado!

*“Você quer saber qual o sentido da vida?
Pra frente.”*

*A Cada Vento.
Emicida, P. Romero e Tixaman*

RESUMO

Pertencentes ao filo Porifera, esponjas são o grupo mais antigo de metazoários existentes. As esponjas apresentam uma grande quimiodiversidade de metabólitos secundários, ainda com vasto universo de compostos a ser explorado. Neste trabalho foram estudadas as esponjas marinhas *Clathria (Clathria) nicoleae* e *Oceanapia* sp., coletadas na foz do Rio Amazonas, e *Agelas dispar*, coletada em Fernando de Noronha. O estudo químico da fração acetato de etila de *C. nicoleae* possibilitou o isolamento do composto conhecido microcionamida A (**1**). O estudo da fração aquosa desta mesma esponja levou ao isolamento e a determinação estrutural de um hexapeptídeo inédito, a clathriamida (**2**), o qual apresentou IC₅₀ de 1,08 µM contra a linhagem de câncer de ovário OVCAR3. A partir da fração aquosa de espécimes de *Oceanapia* sp. foi realizado o isolamento de dois peptídeos potencialmente inéditos, oceanapiamidas A e B, ambos compostos com massa molecular acima de 3300 Da. A investigação do perfil de fragmentação por HRMS/MS dos alcalóides bromopirrólicos 4-desbromo-oroidina (**3**), himenidina (**4**) 4-desbromougibohlina (**5**), 5-desbromougibohlina (**6**) e monobromoisofakelina (**7**), previamente isolados da esponja *Dictyonella* sp., possibilitou a diferenciação estrutural de isômeros e proposição de rotas de fragmentação para os compostos estudados. Utilizando as análises por MS/MS desenvolvidas para os alcalóides bromopirrólicos isolados de *Dictyonella* sp., diferentes ferramentas quimioinformáticas foram utilizadas no estudo da esponja marinha *A. dispar*. Foi construída uma rede molecular utilizando *Feature-Based Molecular Networking* (FBMN) a partir de dados de LC-MS² da fração acetato de etila pré-fracionada. Utilizando a biblioteca pública do GNPS, bibliotecas *in-house* e *in-silico* e propagação de anotação, foram anotados os seguintes compostos: himenidina (**4**), oroidina, undecaetilenoglicol, dispacamida, monobromodispacamida, keramadina, longamida B, o éster-metílico da longamida B, hanishin, o éster metílico da 3-debromolongamida B e a 3-debromohanishin. Após a desreplcação, o estudo químico das frações de *Agelas dispar* possibilitou o isolamento/identificação dos compostos conhecidos dibromoageliferina (**8**), bromoageliferina (**9**), ageliferina (**10**), nagelamida H (**11**) e citrinamina B (**14**), além dos novos compostos nagelamidas H2 e H3 (**12**) e (**13**), dispirinas B-F (**15-19**) e do esqueleto inédito de carbono, as

disparamida A-C (**20-22**). A bromoageliferina (**9**) apresentou IC₅₀ de 0,010 µM contra a linhagem de células de câncer de ovário OVCAR3.

ABSTRACT

Belonging to the Porifera phylum, sponges are the oldest known metazoans. Sponges have a large chemodiversity of secondary metabolites and vast universe of compounds to be explored. In this work, the secondary metabolites of the marine sponges *Clathria (Clathria) nicoleae* and *Oceanapia* sp., collected at the Amazon River mouth, and *Agelas dispar*, collected at Fernando de Noronha, were investigated. Fractionation of the ethyl acetate fraction of *C. nicoleae* led to the isolation of the known compound microcionamide A (**1**). The fractionation of the aqueous fraction led to the isolation and structural determination of a novel hexapeptide, clathriamide (**2**), which displayed IC₅₀ of 1,08 μM against the ovarian cancer cell line OVCAR3. From the aqueous fraction of *Oceanapia* sp. specimens, two peptides were isolated, oceanapamides A and B, both compounds with molecular weight above 3300 Da. The investigation of the fragmentation profile by HRMS/MS of bromopyrrole alkaloids 4-debromooroidin (**3**), hymenidin (**4**), 4-debromougibohlin (**5**), 5-debromougibohlin (**6**) and monobromoisofakelin (**7**), previously isolated from *Dictyonella* sp., enabled the structural differentiation between isomers and the proposal of fragmentation routes for these compounds. Taking advantage of MS/MS analysis developed for the bromopyrrole alkaloids isolated from *Dictyonella* sp., different chemoinformatic tools were used to assess the identity of secondary metabolites from the marine sponge *Agelas dispar*. A molecular network was constructed using Feature-Based Molecular Networking (FBMN) with pre-processed LC-MS² data of a pre-fractionated ethyl acetate fraction. The use of the GNPS public library, *in-house* and *in-silico* libraries and by annotation propagation, it was possible to annotated the following compounds: hymenidin (**4**), oroidin, undecaethyleneglycol, dispacamide, monobromodispacamide, keramadine, longamide B, longamide B methyl ester, hanishin, 3-debromolongamide B and 3-debromohanishin methyl ester. After dereplication, separation of *Agelas dispar* fractions enabled the isolation and identification of the known compounds dibromoageliferin (**8**), bromoageliferin (**9**), ageliferin (**10**), nagelamide H (**11**) and citrinamine B (**14**), in addition to the new nagelamides H2 and H3 (**12-13**), dispyrins B-F (**15-19**) and the novel carbon skeleton, disparamides A-C (**20-22**). Bromoageliferin (**9**) displayed IC₅₀ of 0,010 μM against the ovarian cancer cell line OVCAR3.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática de uma esponja marinha.	17
Figura 2. Mapa da plataforma Amazônica mostrando o megahabitats e a influência da pluma do rio. (A) Distribuição dos recifes pesqueiros e estações oceanográficas. (B-D) Principais características estruturais e funcionais dos recifes Norte (120 m), Central (55 m) e Sul (25 m), respectivamente.	19
Figura 3. Estruturas das euripamidas A - D.....	20
Figura 4. Estruturas das microcionamidas A e B.....	21
Figura 5. Estrutura da gombamida A.....	21
Figura 6. Estruturas das microcionamidas C e D, gombamidas B - D.....	23
Figura 7. Compostos isolados de esponjas do gênero <i>Oceanapia</i>	24
Figura 8. Esquema de fragmentação do composto microcionamida A (1).	33
Figura 9. Correlações COSY e correlações chave HMBC da clathriamida 2.	34
Figura 10. Esquema de fragmentação da clathriamida (2).....	36
Figura 11. Cromatograma de separação dos aminoácidos L-Ile, L- <i>allo</i> -Ile e L-Leu derivatizados com L-FDTA e comparação com o hidrolisado da clathriamida (2) derivatizado com L-FDTA.....	39
Figura 12. Estrutura da clathriamida (2) com configuração absoluta.	39
Figura 13. Sequência por MS/MS dos resíduos de aminoácidos da oceanapiamida A.	43
Figura 14. Estruturas dos alcalóides dibromofakelina, 4-bromofakelina e oroidina...	45
Figura 15. Estrutura dos compostos 4-desbromo-oroidina (3), himenidina (4) 4-desbromougibohlina (5), 5-desbromougibohlina (6) e monobromoisofakelina (7).....	50
Figura 16. Árvore de fragmentação para o composto 3.	51
Figura 17. Íons fragmento A, B e C gerados a partir de 3.....	53
Figura 18. Formação dos íons fragmento D e E a partir de C.....	53
Figura 19. Formação dos íons F e G a partir de D.....	53
Figura 20. Rota de formação dos fragmentos A, B e C a partir de 6.	54
Figura 21. Formação dos fragmentos D-K a partir de A.	55
Figura 22. Formação dos fragmentos L e M a partir de B e C, respectivamente.	55
Figura 23. Árvore de fragmentação para o composto 6.	56
Figura 24. Imagem do holótipo <i>Agelas dispar</i> vista por lados opostos.....	61

Figura 25. Compostos isolados de <i>Agelas dispar</i> e estrutura do análogo não natural da dispirina.....	63
Figura 26. a) Redes moleculares são construídos pelo alinhamento dos espectros MS/MS. Os <i>edges</i> , ou linhas, que conectam os <i>nodes</i> , ou nodos (espectros MS/MS) são definidos por um esquema de <i>cosine score</i> o qual determina a similaridade de dois espectros MS/MS com um intervalo entre 0 (totalmente diferentes) a 1 (totalmente idênticos). Os espectros MS/MS também são pesquisados em uma biblioteca espectral do GNPS, propondo a identificação putativa de nodos na rede molecular. As redes podem ser visualizadas <i>online</i> ou usando um software externo, como o Cytoscape. b) Exemplo de alinhamento entre espectros MS/MS de compostos com modificações estruturais. c) Visualização <i>in-browse</i> da rede molecular permite o usuário explorar a rede molecular sem o uso de softwares externos.....	66
Figura 27. Métodos para a geração de redes moleculares a partir de dados de MS não-direcionados utilizando a plataforma do GNPS. <i>Classical molecular networking</i> , o qual pode ser gerado usando dado em formato <i>open source</i> , como mzXML, e sem pré-processamento dos dados. Para o FBMN o usuário deve utilizar o dado em formato <i>open source</i> e aplicar as ferramentas de <i>feature detection</i> e <i>alignment</i> anteriormente à submissão ao GNPS.	67
Figura 28. Feature-Based Molecular Networking de frações da esponja <i>Agelas dispar</i> . Os nodos foram coloridos segundo a sua presença nas frações: vermelho (M4A2), amarelo (M4A3) e azul (M4A4). Nodos anotados pelo GNPS estão mostrados como retângulos.....	78
Figura 29. Clusters e estrutura dos compostos anotados utilizando o GNPS e a biblioteca <i>in-house</i>	80
Figura 30. Clusters e estruturas dos compostos anotados utilizando a biblioteca <i>in-silico</i>	82
Figura 31 - Estrutura das agelifferinas (8-10), nagelamidas H (11-13), citrinamina B (14), dispirinas (15-19) e disparamidas A-C (20-22) identificadas na esponja marinha <i>Agelas dispar</i>	84
Figura 32 - Clusters contendo as agelifferinas (8-10).....	85
Figura 33 - A) Cromatograma do pico base por UPLC-MS da fração M4A4J. B) Espectro MS ¹ das agelifferinas (8-10).....	86
Figura 34. Estruturas das agelifferinas (8-10) e acoplamentos ¹ H e NOE para a determinação da estereoquímica relativa.....	87

Figura 35. (A) Expansão do espectro MS e de (B,C e D) três espectros MS/MS do composto dibromoageliferina (8).....	89
Figura 36. A) Expansão da árvore de fragmentação gerada pelo Sirius 4.4.29. B) Expansão do espectro MS/MS de 8	91
Figura 37. Espectros MS/MS do composto dibromoageliferina (8) a partir dos íons precursores de m/z 774,87, m/z 778,87 e m/z 782,86.	92
Figura 38. Estruturas propostas para os íons fragmentos das ageliferinas (8-10). ...	94
Figura 39. Cluster e estrutura das nagelamidas H-H3 e citrinamina B (11-14).	97
Figura 40. A) Cromatograma do pico base (BPI) e cromatogramas dos íons extraídos m/z 899,85 (11), m/z 821,94 (12/13) e m/z 742,03 (14) da fração M4A4L. B) Espectros MS ¹ dos compostos 11-14	98
Figura 41. Estrutura e correlações chave para as nagelamidas H-H3 (11-13).....	103
Figura 42. Estruturas propostas para os íons fragmentos das nagelamidas H-H3 (11-13) e citrinamina B (14).	105
Figura 43. <i>Cluster</i> contendo as dispirinas B-F (15-19).....	106
Figura 44. (A) Cromatogramas e (B) espectros de MS dos compostos 15-19	107
Figura 45. Estruturas das agelanesinas A-D e dispirina.....	110
Figura 46. Correlações-chave para as dispirinas B-D (15-17).....	110
Figura 47. Proposta de fragmentação das dispirinas B-F (15-19).....	112
Figura 48. Cluster das disparamidas A-C (20-22).	113
Figura 49. Correlações-chave para as disparamidas A-B (20-21) e estrutura da himenidina e oroidina.	115
Figura 50. (A) Cromatogramas e (B) espectros MS das disparamidas A-C (20-22).	117
Figura 51. Fragmentos propostos para as disparamidas A-C (20-22).....	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e HSQC-TOCSY (δ , ppm) para a clathriamida (2) em $\text{MeOH-}d_4$ (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz).....	35
Tabela 2. Tempo de retenção (t_R , min) e ordem de eluição para os derivados L-DTA e D-DTA dos padrões de aminoácidos.....	38
Tabela 3. Tempo de retenção (t_R , min) e ordem de eluição para os derivados L-DTA e D-DTA dos padrões de aminoácidos.....	41
Tabela 4. Íons fragmentos monoprotionados da oceanapiamida A.	42
Tabela 5. Íons fragmentos diprotionados da oceanapiamida A.	43
Tabela 6. Íons fragmentos triprotionados da oceanapiamida A.	43
Tabela 7. Íons observados nos espectros MS/MS dos alcaloides 4-desbromo-oroidina (3) e himenidina (4).	52
Tabela 8. Íons observados nos espectros MS/MS dos compostos 4-desbromougibohlina (5), 5-desbromougibohlina (6) e monobromoisofakelina (7) no modo positivo.	57
Tabela 9. Tabela de compostos anotados em automática na biblioteca do GNPS e confirmados por inspeção manual.....	79
Tabela 10. Tabela de compostos anotados em manual de metabólitos previamente relatados em <i>Agelas dispar</i> e propagação da anotação da longamida B.....	83
Tabela 11. Dados de RMN de ^1H para as agelifferinas (8-10), em $\text{MeOH-}d_4$ (^1H : 600 MHz).....	88
Tabela 12. Íons observados nos espectros MS/MS do composto dibromoagelifferina (8) a partir dos íons precursores de m/z 774,87, m/z 778,87 e m/z 782,86.	93
Tabela 13. Dados de RMN de ^1H para nagelamida H (11) e citrinamina B (14) em $\text{DMSO-}d_6$ (^1H : 600 MHz).	100
Tabela 14. Dados de RMN de ^1H para as nagelamidas H2 (12) e H3 (13), em $\text{DMSO-}d_6$ (^1H : 600 MHz).	102
Tabela 15. Dados de RMN para os compostos dispirinas B (15), C (16) e D (17) em $\text{DMSO-}d_6$ (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz).....	111
Tabela 16. Íons observados nos espectros MS/MS do composto dispirina B (15) a partir dos íons precursores de m/z 549,93 e m/z 553,94.	112

Tabela 17. Dados de RMN dos compostos disparamidas A (20) e B (21) em DMSO- d_6 (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz).....	118
Tabela 18. Íons observados nos espectros MS/MS do composto disparamida A (20) a partir dos íons precursores de m/z 645,06 e m/z 649,06.	119

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – ESTUDO QUÍMICO DAS ESPONJAS MARINHAS <i>Clathria</i> (<i>Clathria</i>) <i>nicoleae</i> e <i>Oceanapia</i> sp.....	17
1.1 Introdução	17
1.1.1 Esponjas marinhas.....	17
1.1.2 Foz do rio Amazonas.....	18
1.1.2 Peptídeos isolados de esponjas marinhas do gênero <i>Clathria</i> e suas relevâncias biológicas	19
1.1.3 Metabólitos isolados de esponjas marinhas do gênero <i>Oceanapia</i> e suas relevâncias biológicas	23
1.2 Objetivos	25
1.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
1.3.1 Material animal	25
1.3.2 Extração e fracionamento dos extratos	26
1.3.2.1 <i>Clathria</i> (<i>Clathria</i>) <i>nicoleae</i>	26
1.3.2.2 <i>Oceanapia</i> sp.	27
1.3.3 Hidrólise ácida e análise avançada de Marfey com 5-flúor-2,4-dinitrofenil-N α -L/D-triptofanamida (FDTA) da clathriamida (2).....	28
1.3.4 Hidrólise ácida e análise avançada de Marfey com 5-flúor-2,4-dinitrofenil-N α -L-triptofanamida (FDTA) da oceanapiamida A	29
1.3.5 Reação da oceanapiamida A com DTT.....	30
1.3.6 Avaliação da atividade citotóxica.....	30
1.3.7 Procedimentos experimentais gerais	31
1.4 Resultados e discussão.....	32
1.4.1 Estudo químico da esponja marinha <i>Clathria</i> (<i>Clathria</i>) <i>nicoleae</i>	32
1.4.1.1 Estudo químico da fração de acetato de etila da esponja <i>Clathria</i> (<i>Clathria</i>) <i>nicoleae</i>	32
1.4.1.2 Estudo químico da fração aquosa da esponja <i>Clathria</i> (<i>Clathria</i>) <i>nicoleae</i> ...	33

1.4.1.3 Sequenciamento por MS/MS da clathriamida (2)	36
1.4.1.4 Determinação da configuração absoluta da clathriamida (2).....	37
1.4.2.1 Análise avançada de Marfey do composto oceanapiamida A	40
1.4.2.2 Análise da oceanapiamida A por MS/MS	41
1.5 Conclusão	44
CAPÍTULO 2 – ESTUDO DE FRAGMENTAÇÃO DE ALCALÓIDES BROMOPIRRÓLICOS POR HRMS/MS	45
2.1 Introdução	45
2.2 Objetivos	46
2.3 Materiais e métodos	46
2.3.1 Amostras de alcalóides bromopirrólicos	46
2.3.2 Condições de análises por UPLC-QToF-MS/MS	47
2.3.3 Pré-processamento dos dados de UPLC-QToF-MS/MS empregando MZmine	47
2.3.4 Criação da árvore de fragmentação pelo Sirius e atribuição dos picos pelo CFM-ID.....	48
2.4 Resultados e discussão.....	48
2.4.1 Estudo de fragmentação por HRMS/MS de alcalóides bromopirrólicos	48
2.4.2 Análise perfil de fragmentação por MS/MS de 4-desbromo-oroidina (3) e himenidina (4).....	50
2.4.3 Análise perfil de fragmentação por MS/MS de 4-desbromougibohlina (5), 5-desbromougibohlina (6) e monobromoisofakelina (7)	53
2.4.4 Considerações sobre as propostas de fragmentações	59
2.5 Conclusões.....	59
CAPÍTULO 3 – ESTUDO QUÍMICO DA ESPONJA MARINHA <i>Agelas dispar</i>	61
3.1 Introdução	61
3.1.1 Metabólitos secundários isolados a partir de <i>Agelas dispar</i>	61
3.1.2 <i>Molecular networking</i>	63
3.2 Objetivos	67
3.3 Materiais e métodos	68

3.3.1 Material Animal.....	68
3.3.2 Extração e fracionamento do extrato da esponja marinha <i>Agelas dispar</i>	68
3.3.3 Análise das frações de M4A2-M4A4 por UPLC-QToF-MS/MS	69
3.3.4 Pré-processamento dos dados de LC-MS ² empregando MZmine	69
3.3.5 Construção e visualização da rede molecular	70
3.3.6 Criação das bibliotecas <i>in-house</i> e <i>in-silico</i>	71
3.3.6.1 Biblioteca <i>in-house</i>	71
3.3.6.2 Biblioteca <i>in-silico</i>	71
3.3.7 Isolamento dos alcaloides bromopirrólicos do extrato MeOH da esponja <i>Agelas dispar</i>	72
3.3.7.1 Isolamento das ageliferinas (8-10)	72
3.3.7.2 Isolamento das nagelamidas H (11), H2/H3 (12/13) e citrinamina B (14).....	73
3.3.7.3 Isolamento das dispirinas B-D (15-17)	73
3.3.7.4 Isolamento das disparamidas A (20) e B (21)	74
3.3.8 Procedimentos experimentais gerais	75
3.4 Resultados e discussões.....	76
3.4.1 Anotações utilizando o GNPS e a biblioteca <i>in-house</i>	77
3.4.2 Anotação de metabólitos de <i>Agelas dispar</i> utilizando biblioteca <i>in-silico</i>	80
3.4.3 Identificação das ageliferinas (8-10).....	84
3.4.4 Identificação das nagelamidas H-H3 e citrinamina B (11-14).....	97
3.4.5 Identificação das dispirinas B-F (15-19)	106
3.4.6 Identificação das disparamidas A-C (20-22).....	113
3.5 Conclusão	121
CONSIDERAÇÕES FINAIS	122
REFERÊNCIAS.....	123
APÊNDICE	136

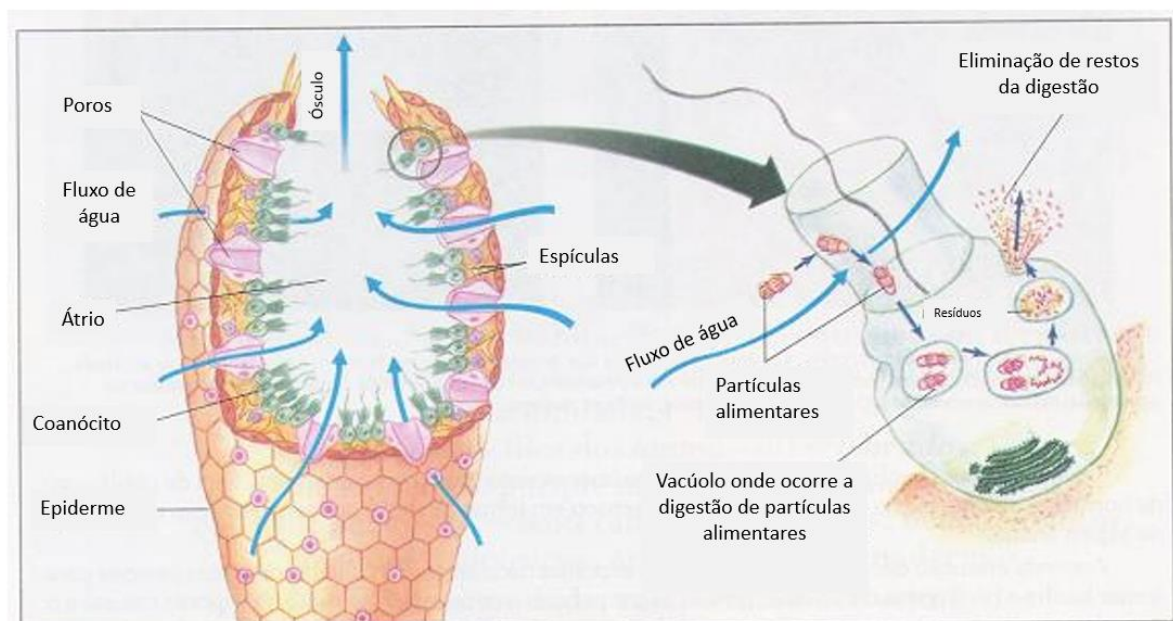
CAPÍTULO 1 – ESTUDO QUÍMICO DAS ESPONJAS MARINHAS *Clathria (Clathria) nicoleae* E *Oceanapia* sp.

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Esponjas marinhas

Os oceanos cobrem cerca de 70% de toda a extensão do planeta, sendo que apenas 5% da biodiversidade do oceano profundo foi explorada (NEWMAN; CRAGG, 2016). Pertencentes ao filo Porifera, esponjas são o grupo mais antigo de metazoários existentes. Estudo recente indica que as esponjas podem ter surgido há cerca de 650 milhões de anos, ainda na era neoproterozoica (ZUMBERGE *et al.*, 2018). Esponjas são animais exclusivamente aquáticos, sésseis e que se alimentam por filtração da água do mar, capturando micropartículas de matéria orgânica dissolvida (MUELLER *et al.*, 2014; VAN SOEST *et al.*, 2012). Esses organismos apresentam células especializadas para diversas funções vitais, no entanto, não são organizadas em tecidos ou órgãos (Figura 1) (VAN SOEST *et al.*, 2012).

Figura 1. Representação esquemática de uma esponja marinha.



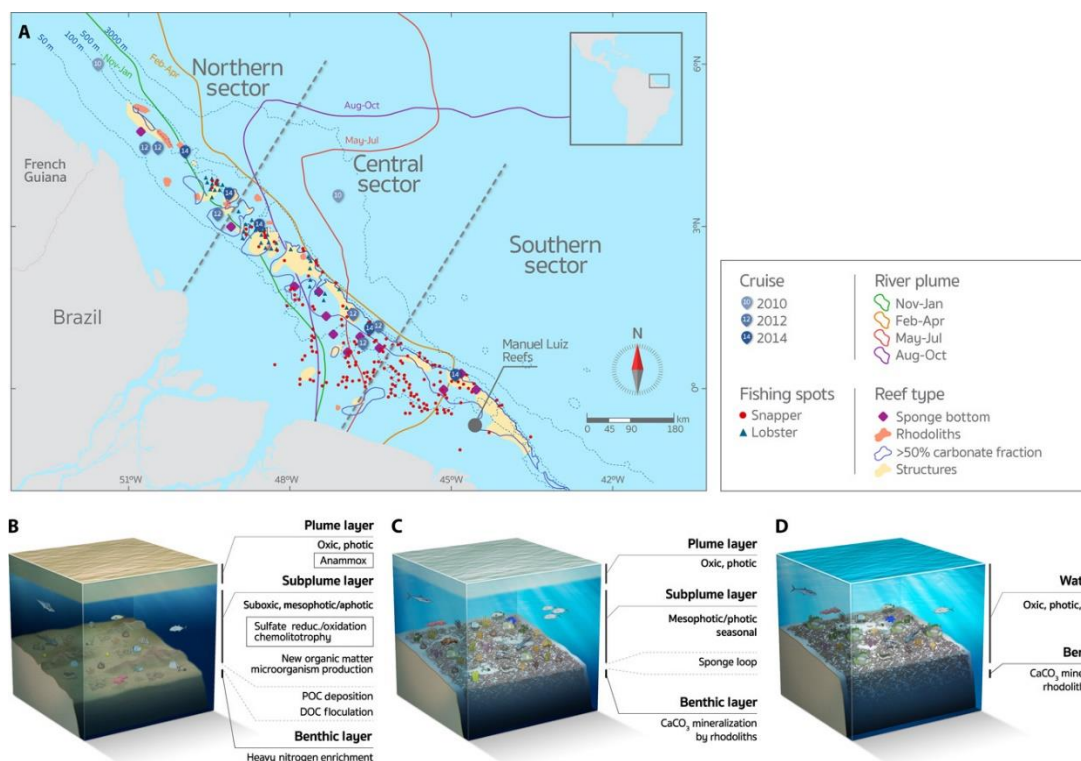
Fonte: Adaptado de “Poríferos” em *Só Biologia*, 2018

1.1.2 Foz do rio Amazonas

Um extensivo sistema de recife na foz do rio Amazonas foi descrito em 2016 (Figura 2) (MOURA *et al.*, 2016). Com cerca de 56.000 km², situado entre a fronteira entre Guiana Francesa-Brasil e o mar do estado do Maranhão, representa o maior sistema de recife do Brasil (MOURA *et al.*, 2016; THOMPSON *et al.*, 2018). O rio Amazonas representa cerca de 20% da descarga fluvial global no oceano, $\sim 120 \times 10^3 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ em dezembro e $\sim 300 \times 10^3 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ em maio, gerando mais de $1,3 \times 10^6 \text{ km}^2$ de pluma enriquecida com matéria orgânica dissolvida (MOURA *et al.*, 2016). Essa camada relativamente rasa e hiposalínica de 5 a 25 m de profundidade, é influenciada por ventos e correntes sazonais, fluindo em direção ao Caribe e retrofletindo para o leste durante setembro e outubro (MOURA *et al.*, 2016). A produtividade fitoplantônica é limitada pela baixa penetração de luz em uma plataforma interna e aumenta quando os sedimentos não estão presentes (MOURA *et al.*, 2016). Ali os níveis de oxigênio são reduzidos na subpluma e próximo ao fundo do oceano por causa das altas taxas de mineralização de matéria orgânica nas plataformas internas e intermediárias (MOURA *et al.*, 2016). As condições ambientais descritas tornam esse sistema recifal único.

A biodiversidade é a base da biotecnologia marinha e constitui um potencial ativo para a bioeconomia (THOMPSON *et al.*, 2018). Apesar da rica biodiversidade endêmica brasileira, uma grande porção continua significativamente inexplorada (THOMPSON *et al.*, 2018). A exploração da diversidade de esponjas do sistema de recife na foz do Rio Amazonas apresenta uma oportunidade única para a prospecção de novos compostos (DE SOUZA *et al.*, 2018; FREIRE *et al.*, 2019).

Figura 2. Mapa da plataforma Amazônica mostrando o megahabitats e a influência da pluma do rio. (A) Distribuição dos recifes pesqueiros e estações oceanográficas. (B-D) Principais características estruturais e funcionais dos recifes Norte (120 m), Central (55 m) e Sul (25 m), respectivamente.



FONTE: Adaptado de (MOURA *et al.*, 2016)

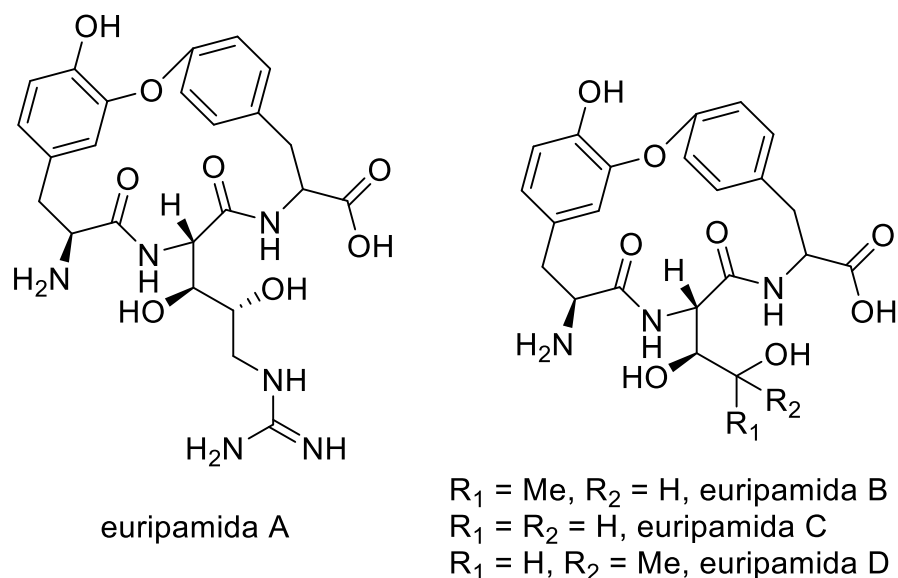
1.1.2 Peptídeos isolados de esponjas marinhas do gênero *Clathria* e suas relevâncias biológicas

As esponjas marinhas do gênero *Clathria* apresentam um metabolismo secundário bastante diversificado. Metabólitos de diferentes classes já foram reportados na literatura, como alcalóides (ZULETA *et al.*, 2002), policetídeos (EL-NAGGAR; CONTE; CAPON, 2010), terpenóides (GUPTA *et al.*, 2012) e peptídeos (DAVIS *et al.*, 2004; MOKHLESI *et al.*, 2017; REDDY, M. V. R.; HARPER; FAULKNER, 1998; WOO *et al.*, 2013).

O primeiro relato de isolamento de um peptídeo a partir do gênero *Clathria* foi realizado por Reddy, Harper e Faulkner (1998) a partir da esponja marinha *Clathria* (*Thalysias*) *eurypa*, à época classificada como *Microciona eurypa* (DAVIS *et al.*, 2004).

Foram isoladas as euripamidas A e uma mistura de três tripeptídeos, euripamidas B - D (Figura 3).

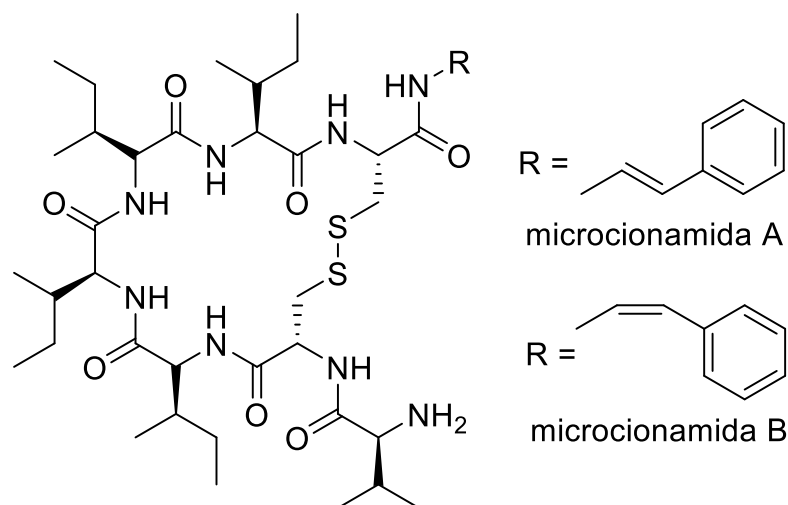
Figura 3. Estruturas das euripamidas A - D.



Fonte: Autoria Própria

A partir de extrato da esponja *Clathria (Thalysias) abietina*, Davis et al. (2004) isolaram as microcionamidas A e B, peptídeos ciclizados por ponte de cistina e contendo no C-terminal um resíduo de aminoácido modificado (2-feniletilamida, PEA) (Figura 4). A citotoxicidade das microcionamidas A e B foi avaliada contra linhagens de células de câncer de mama, tendo IC₅₀ de 125 nM para a microcionamida A, 177 nM para microcionamida B contra a linhagem MCF-7 e de 98 nM para microcionamida A e 172 nM para microcionamida B contra a linhagem SKBR-3. Os IC₅₀ apresentados pelas microcionamidas A e B foram comparáveis ao controle positivo dos testes (doxorubicina: MCF-7, 257 nM; SKBR-3, 33 nM). Ambos os compostos induziram apoptose em 24 h em células da linhagem MCF-7 na concentração 5,7 µM. A apoptose foi confirmada por investigações morfológicas nas células. Foi observada extensiva fragmentação de DNA para as linhagens celulares MCF-7 e SKBR-3 tratadas com as microcionamidas A e B. Ambos peptídeos também apresentaram atividade anti-tuberculose (utilizando a linhagem não virulenta *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Ra), com ambos compostos apresentando valores de MIC de 5,7 µM (controle positivo: rifampicina, MIC de 1,52 nM) (DAVIS et al., 2004).

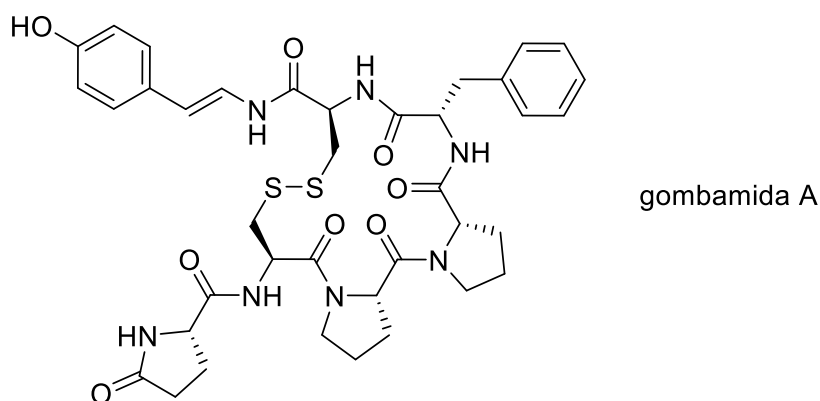
Figura 4. Estruturas das microcionamidas A e B.



Fonte: Autoria Própria

A gombamida A (Figura 5) foi isolada a partir de extrato da esponja *Clathria gombawiensis*, sendo um peptídeo ciclizado via ponte de cistina, contendo em sua extremidade N-terminal um resíduo de ácido piroglutâmico (Glp) e em sua extremidade C-terminal um resíduo de *para*-hidroxiestirilamida (pHSA) (WOO *et al.*, 2013). Esse peptídeo apresentou fraca atividade citotóxica contra as linhagens celulares humanas K562 (leucemia mieloide) e A549 (carcinoma pulmonar), com valores de LC₅₀ de 6,9 µM e 7,1 µM, respectivamente (controle positivo: doxorrubicina; LC₅₀ de 0,7 µM e 0,5 µM para K562 e A549, respectivamente). Woo e colaboradores (2013) também testaram gombamida A na inibição da ação de Na⁺/K⁺-ATPase, apresentando LC₅₀ de 17,8 µM (controle positivo: ouabaina; LC₅₀ de 9,4 µM).

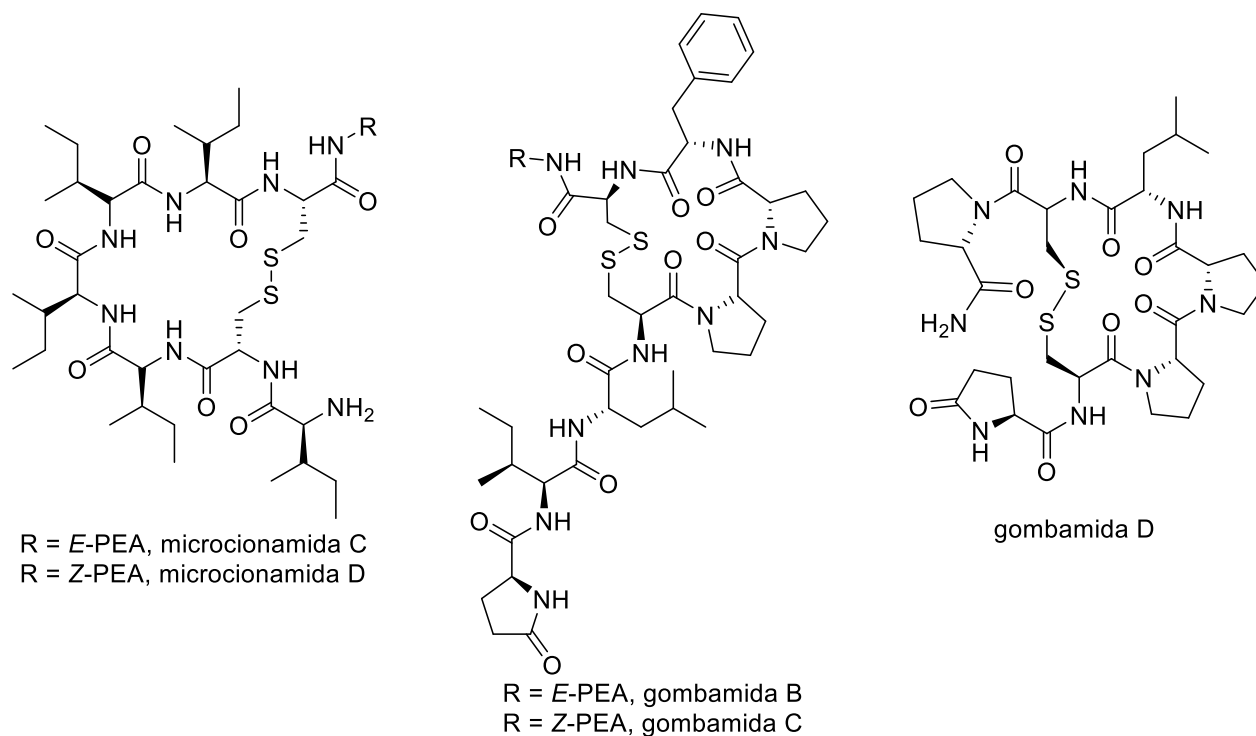
Figura 5. Estrutura da gombamida A.



Fonte: Autoria Própria

Cinco novos peptídeos contendo pontes de cistina foram isolados da esponja marinha *Clathria basilana*, as microcionamidas C e D e as gombamidas B - D (Figura 6) (MOKHLESI *et al.*, 2017). As microcionamidas C e D possuem um resíduo de isoleucina (Ile) na posição respectiva ao resíduo de valina (Val) das microcionamidas A e B, respectivamente. As gombamidas B e C possuem um resíduo de *E*-PEA e *Z*-PEA, respectivamente, além do característico resíduo de ácido piroglutâmico (Glp) existente nessa classe de peptídeos. A gombamida D possui o característico resíduo de Glp e sua extremidade C-terminal modificado por uma amina. As microcionamidas A-D e as gombamidas B-D tiveram suas atividades citotóxicas avaliadas frente à diferentes linhagens celulares, sendo elas Ramos (células de linfoma), HL-60, Nom-1 e Jurkat J16 (células de leucemia) e A2780 (células de carcinoma de ovário). Apenas as microcionamidas A, C e D apresentaram $IC_{50} \leq 10 \mu\text{M}$ em todas as linhagens avaliadas. Investigações sobre o mecanismo de ação das microcionamidas A, C e D nas células analisadas mostrou que o processo de apoptose causado pelos peptídeos se deve à ativação de proteases dependentes de cisteínas dependentes de aspartato (*caspases*). Além disso, os três compostos avaliados também foram testados como inibidores de autofagia na concentração $10 \mu\text{M}$, sendo que as microcionamidas C e D apresentam inibição da autofagia na concentração testada. A atividade antimicrobiana das microcionamidas A-D e as gombamidas B-D também foi testada contra linhagens de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Mycobacterium tuberculosis*. As microcionamidas A e C foram os compostos mais ativos, ambos com valores de MIC de $6,2 \mu\text{M}$ para *S. aureus* e $12 \mu\text{M}$ para *E. faecium*, ambas bactérias Gram-positivas (controle positivo: ciprofloxacina; MIC de $0,12 \mu\text{M}$ e $2,00 \mu\text{M}$ para *S. aureus* e *E. faecium*, respectivamente). Estudos de mecanismo de ação das microcionamidas A e B foram realizados utilizando-se o micro-organismo modelo *Bacillus subtilis*, demonstrando que o possível mecanismo de ação se dá pela despolarização da membrana citoplasmática bacteriana (MOKHLESI *et al.*, 2017).

Figura 6. Estruturas das microcionamidas C e D, gombamidas B - D.



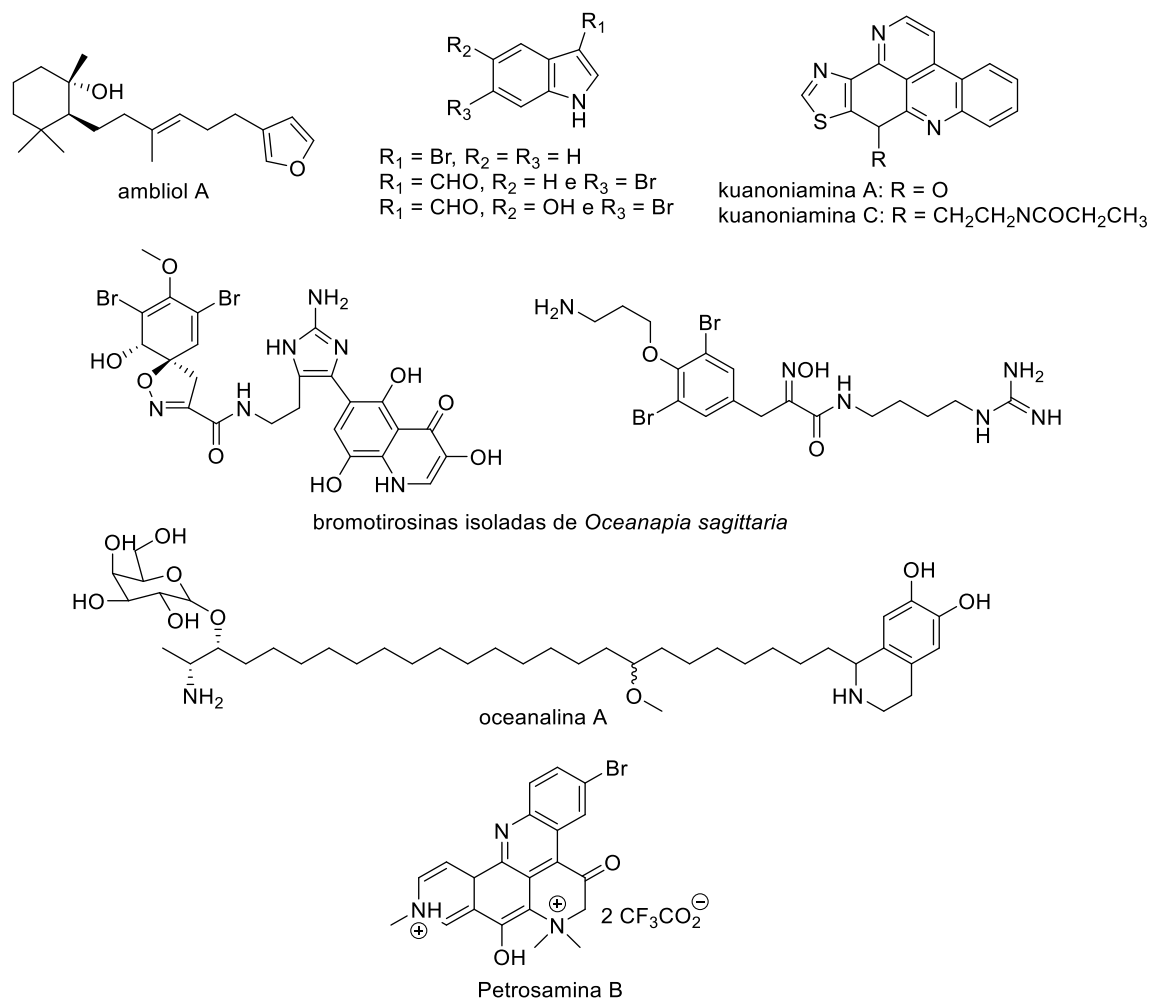
Fonte: Autoria Própria

Os estudos já realizados com peptídeos isolados de diferentes esponjas marinhas do gênero *Clathria* indicam diversas estruturas com atividades biológicas relevantes. Assim, espécies do gênero *Clathria* são boas candidatas para o isolamento de peptídeos biologicamente ativos.

1.1.3 Metabólitos isolados de esponjas marinhas do gênero *Oceanapia* e suas relevâncias biológicas

Em pesquisa realizada no *Dictionary of Natural Products* (DNP) um total de 64 metabólitos de *Oceanapia* foram identificados, de várias classes diferentes. A Figura 7 apresenta alguns dos metabólitos isolados.

Figura 7. Compostos isolados de esponjas do gênero *Oceanapia*.



Fonte: Autoria Própria

O estudo da esponja marinha *Oceanapia bartschi* possibilitou a identificação de três derivados bromoindólicos e do previamente descrito ambliol A (Figura 7) (CAFIERI *et al.*, 1993).

A partir da esponja marinha *Oceanapia sagittaria* foram isolados os compostos kuanoniamina A e C (Figura 7) (KIJJOA *et al.*, 2007). Ambos compostos apresentaram potente IC_{50} contra a linhagem MCF-7, 0,12 μM para a kuanoniamina A e 0,81 μM para a kuanoniamina C. A kuanoniamina C apresentou potente atividade citotóxica para as linhagens cancerígenas MDA-MB-231, NCI-H460 e MRC-5 com IC_{50} de 0,73 μM , 0,91 μM e 0,58 μM , respectivamente (KIJJOA *et al.*, 2007).

Dois derivados inéditos de bromotirosina (Figura 7) foram isolados de *Oceanapia* sp., ambos sendo os primeiros compostos com atividade de inibição da

enzima de micobacteria amidase micotiol S-conjugada (MCA) (NICHOLAS *et al.*, 2001).

Um esfingolípido contendo uma tetrahydroquinolina (Figura 7), a oceanalina A, foi isolado pela primeira vez de uma esponja do gênero *Oceanapia* (MAKARIEVA *et al.*, 2005). O composto apresentou MIC de 30 µg/mL contra *Candida glabrata* (MAKARIEVA *et al.*, 2005).

Um novo pigmento azul, a petrosamina B (Figura 7), foi isolada a partir de uma espécie de *Oceanapia* australiana (CARROLL *et al.*, 2005). O composto apresentou IC₅₀ de 306 µM da enzima semialdeído aspartato desidrogenase (ASD).

A alta variabilidade de estruturas e as atividades biológicas já relatadas a partir de metabólitos isolados de esponjas do gênero *Oceanapia* ilustra o potencial da quimiodiversidade que o gênero apresenta.

1.2 OBJETIVOS

O objetivo desse capítulo do trabalho foi o estudo químico dos extratos MeOH/EtOH das esponjas marinhas *Clathria* (*Clathria*) *nicoleae* e *Oceanapia* sp., coletadas na foz do rio Amazonas. O objetivo específico o isolamento, determinação estrutural e a avaliação da atividade biológica de metabólitos presentes nos extratos dessas esponjas.

1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1 Material animal

Espécimes das esponjas marinhas *Clathria* (*Clathria*) *nicoleae* (DE BARROS; SANTOS; PINHEIRO, 2013) e *Oceanapia* sp. foram coletadas por um grupo colaborador, coordenado pelo Prof. Dr. Gilberto M. A. Filho, em 27 de setembro de 2014, no estado do Pará, durante expedição oceanográfica na plataforma continental da margem equatorial na foz do rio Amazonas, abordo do navio da Marinha do Brasil *NHo Cruzeiro do Sul*. A coleta do espécime de *Clathria* (*Clathria*) *nicoleae* foi realizada em uma cama de rodólitos à 55 m de profundidade, usando rede de arraste. Os espécimes de *Clathria* (*Clathria*) *nicoleae* e *Oceanapia* sp. foram identificados pelo Dr. Gernando C. Moraes, baseado em comparação morfológica. Vouchers dos espécimes

foram depositados no Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob os números de registro MNRJ 18814 para *Clathria (Clathria) nicoleae* e MNRJ 18805, MNRJ 18808 e MNRJ 22873 para *Oceanapia* sp. A preparação dos extratos brutos foi realizada pelo mesmo grupo que coletou as amostras.

1.3.2 Extração e fracionamento dos extratos

1.3.2.1 *Clathria (Clathria) nicoleae*

Uma amostra (650 g) da esponja marinha *Clathria (Clathria) nicoleae*, a partir daqui denominada de W7, foi exaustivamente extraída com EtOH. Esse extrato foi evaporado até *secura*. O extrato EtOH (9,0 g) foi ressuscitado em MeOH:H₂O (9:1) e particionado com hexano (3 X 500 mL). A fração MeOH foi seca, ressuscitada e particionada três vezes entre AcOEt:H₂O. A fração AcOEt (W7A) resultou em 471,6 mg. A fração aquosa foi evaporada para remoção de AcOEt. À fase aquosa foram adicionados 50 g de resina Diaion HP-20 e mantida sob agitação em *shaker overnight*. Em seguida, a solução aquosa contendo a resina foi filtrada, sendo o filtrado descartado. Os compostos foram dessorvidos da resina com 100 mL MeOH, 100 mL de MeOH:acetona (1:1) e 100 mL de acetona em banho de ultrassom. Os solventes orgânicos foram reunidos e evaporados até *secura*. A fração proveniente da resina (W7B) resultou em 390,3 mg.

A fração W7A (471,6 mg) foi dividida em duas partes, W7A e W7A'. Ambas foram submetidas à cromatografia de permeação em gel Sephadex LH-20 (dimensões: 140 cm X 2,5 cm) e eluídas com MeOH. As frações reunidas foram nomeadas de W7AA - W7AN, e W7A'A - W7A'N. A fração W7A'D (18,1 mg) foi separada por HPLC-UV utilizando uma coluna X-Terra RP18 (4,6 x 250,0 mm, 5 µm, Waters), com MeCN:MeOH:H₂O + TFA 0,5% (23:33:44) como eluente, vazão de 0,8 mL min⁻¹ e detecção em λ de 287 nm e 254 nm, resultando no isolamento do composto microcionamida A (1, W7A'D1, 0,9 mg).

A fração W7B foi submetida à cromatografia de permeação em gel Sephadex LH-20 (dimensões: 140 X 2,5 cm) e eluída com MeOH, resultando nas frações de W7BA - W7BN. A fração W7BH (104 mg) foi separada por HPLC-ELSD usando uma coluna C₁₈ Inertsustain (10,0 x 250,0 mm, 5 µm, GL Science Inc.), modo gradiente, iniciando com um isocrático em MeCN:MeOH:H₂O (12:13:75) por 15 min, alterando

de MeCN:MeOH:H₂O (12:13:75) para MeCN:MeOH:H₂O (20:20:60) em 5 min, mantendo MeCN:MeOH:H₂O (20:20:60) por 15 min, alterando de MeCN:MeOH:H₂O (20:20:60) para MeCN:MeOH:H₂O (50:50:0) em 5 min e mantendo MeCN:MeOH:H₂O (50:50:0) por 10 min, totalizando 50 min de separação cromatográfica com vazão de 4,0 mL min⁻¹ e detecção por ELSD. A fração obtida no intervalo de t_R entre 26 e 28 min, W7BHI (18,6 mg), foi submetida a outra etapa de separação por HPLC-ELSD usando coluna X-Terra RP18 (4,6 x 250,0 mm, 5 µm, Waters), com eluição em modo isocrático MeCN:MeOH:H₂O (10:15:75), vazão de 0,8 mL min⁻¹ e detecção por ELSD, resultando no isolamento do composto clathriamida (**2**, W7BHI2, 2,6 mg).

1.3.2.2 *Oceanapia* sp.

Dois espécimes da esponja marinha *Oceanapia* sp. (MNRJ 18805 e MNRJ 18808), a partir daqui denominada de W8, foram exaustivamente extraídos com EtOH. Esse extrato foi evaporado até *secura*. O extrato etanólico (6,6 g) foi ressuspenso em MeOH:H₂O (9:1) e particionado com hexano (3 X 500 mL). A fração metanólica foi seca, ressuspenso e particionada três vezes entre AcOEt:H₂O. A fração AcOEt (W8A) resultou em 176,7 mg. A fração aquosa foi evaporada para remoção de AcOEt, 50 g da resina Diaion HP-20 foram adicionados à fração aquosa, a qual foi mantida sob agitação *overnight*. Em seguida, a solução aquosa contendo a resina foi filtrada, sendo o filtrado descartado. Os compostos foram dessorvidos da resina com 100 mL MeOH, 100 mL de MeOH:acetona (1:1) e 100 mL de acetona. Os solventes orgânicos foram reunidos e evaporados até *secura*, gerando a fração W8B.

Um espécime da esponja marinha identificada como *Oceanapia* sp. (MNRJ 22973), a partir daqui denominada de NB6/1, foi exaustivamente extraída com EtOH e esse extrato foi evaporado até *secura*. O extrato etanólico (6,5 g) foi ressuspenso em MeOH:H₂O (9:1) e particionado com hexano (3 X 500 mL). A fração metanólica foi seca, ressuspenso e particionada três vezes entre AcOEt:H₂O. A fração aquosa foi evaporada para remoção de AcOEt, à qual foram adicionados 50 g da resina Diaion HP-20 e mantida sob agitação em *shaker overnight*. Em seguida, a solução aquosa contendo a resina foi filtrada, sendo o filtrado descartado. Os compostos foram dessorvidos da resina com 100 mL MeOH, 100 mL de MeOH:acetona (1:1) e 100 mL de acetona, sendo os solventes orgânicos reunidos e evaporados até *secura*, gerando a fração NB6/1B.

A fração W8B (250 mg) foi submetida a fracionamento utilizando uma coluna pré-empacotada contendo fase estacionária C₁₈ (5 g). A eluição foi feita com um gradiente de MeOH em H₂O, com incrementos de 10% a quantidade de MeOH por fração, gerando dez frações (W8BA-W8BJ). A fração W8BF (12,8 mg) foi separada por HPLC-UV usando uma coluna semipreparativa C₁₈ Inertsustain (10,0 x 250,0 mm, 5 µm, GL Science Inc.) e eluição em modo gradiente, com H₂O + 0,1% de TFA, MeOH e MeCN, alterando de 60:20:20 para 26:37:37 de H₂O:MeOH:MeCN em 25 min, de 26:37:37 para 0:50:50 de H₂O:MeOH:MeCN em 1 min, mantendo em 0:50:50 de H₂O:MeOH:MeCN por 2 min, alterando de 0:50:50 para 60:20:20 de H₂O:MeOH:MeCN em 2 min e mantendo em 60:20:20 de H₂O:MeOH:MeCN por 10 min, totalizando 40 min de separação com vazão de 4,0 mL min⁻¹ e detecção nos λ 277 e 300 nm, resultando no isolamento do composto oceanampiamida A (1,2 mg, W8BF1), coletado entre 15,8 e 17,0 min.

A fração NB6/1B (576,5 mg) foi submetida a fracionamento cromatográfico utilizando uma coluna pré-empacotada com fase estacionária C₁₈ (10 g). A eluição foi feita em gradiente de MeOH em H₂O, com incrementos de 10% a quantidade de metanol por fração, gerando dez frações (NB6/1BA- NB6/1BJ). A fração NB6/1BG (45,5 mg) foi separada por HPLC-UV usando uma coluna semipreparativa C₁₈ Inertsustain (10,0 x 250,0 mm, 5 µm, GL Science Inc.) e eluição em modo gradiente, com H₂O + 0,1% de TFA, MeOH e MeCN, alterando de 60:20:20 para 26:37:37 de H₂O:MeOH:MeCN em 25 min, de 26:37:37 para 0:50:50 de H₂O:MeOH:MeCN em 1 min, mantendo em 0:50:50 de H₂O:MeOH:MeCN por 2 min, alterando de 0:50:50 para 60:20:20 de H₂O:MeOH:MeCN em 2 min e mantendo em 60:20:20 de H₂O:MeOH:MeCN por 10 min, totalizando 40 min de separação com vazão de 4,0 mL min⁻¹ e detecção nos λ 277 e 300 nm, resultando no isolamento do composto oceanampiamida B (1,7 mg, NB6/1BG2), coletado entre 20,2 e 21,5 min.

1.3.3 Hidrólise ácida e análise avançada de Marfey com 5-flúor-2,4-dinitrofenil-Nα-L/D-triptofanamida (FDTA) da clathriamida (**2**)

Uma alíquota de clathriamida (**2**, 0,7 mg) foi solubilizada em 500 µL de HCl 6 mol L⁻¹ em um *via*/fechado e mantido à 115 °C sob agitação por 12 h. Os hidrolisados foram secos, ressuspensos em água e seco novamente, repetindo essa etapa por 3 vezes para garantir a retirada de todo HCl.

O hidrolisado da clathriamida (**2**) foi ressuspendido em 1000 μL de água. Duas alíquotas de 50 μL do hidrolisado foram tratadas com 142 μL de L- e D-FDTA (1% em acetona) e 20 μL de NaHCO_3 (1 mol L^{-1}). Ambas reações de derivatização com L- e D-FDTA foram mantidas a 40 °C sob agitação por 1 h. As reações foram resfriadas até temperatura ambiente, neutralizadas com 10 μL de HCl 2 mol L^{-1} e secas. O resíduo de evaporação foi ressuspendido em 500 μL de MeOH .

Análises por UPLC-QToF-MS dos derivados foram realizadas em uma coluna Acquity BEH C_{18} (2,1 X 50,0 mm, 1,7 μm ; Waters), utilizando-se H_2O + 0,1% de ácido fórmico e MeCN + 0,1% de ácido fórmico em um gradiente de eluição de 8:2 para 5:5 de $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ durante 8 min, de 5:5 para 8:2 de $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ durante 0,1 min e mantido em 8:2 de $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ por 1,9 min, totalizando 10,0 min de análise. As condições de detecção se mantiveram de acordo com o descrito no item 1.3.7, com excessão da faixa de varredura que foi de m/z 450 - 550. As derivatizações e análises por UPLC-QToF-MS foram realizadas para os seguintes padrões: L-Leu, L-Ile, L-*allo*-Ile, L-Thr, L-Pro, L-Hyp e L-Phe. No caso dos padrões L-Leu, L-Ile e L-*allo*-Ile derivatizados, foram necessárias análises por UPLC-QToF-MS complementares, utilizando-se uma coluna Acquity BEH C_8 (2,1 X 100,0 mm, 1,7 μm ; Waters), utilizando-se H_2O + 0,1% de ácido fórmico e MeCN + 0,1% de ácido fórmico e modo isocrático, mantendo 73:27 de $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ por 20 min, com vazão de 0,500 mL min^{-1} .

1.3.4 Hidrólise ácida e análise avançada de Marfey com 5-flúor-2,4-dinitrofenil- $\text{N}\alpha$ -L-triptofanamida (FDTA) da oceanapiamida A

Uma alíquota de oceanapiamida A (0,1 mg) foi hidrolisada sob as mesmas condições descritas no item 1.3.3. O hidrolisado de oceanapiamida A foi resuspendido em 50 μL de água e tratado com D-FDTA (1% em acetona) e 20 μL de NaHCO_3 (1 mol L^{-1}). A reação foi mantida à 40 °C sob agitação por 1 h. A reação foi resfriada até temperatura ambiente, neutralizada com 10 μL de HCl 2 mol L^{-1} e seca. O resíduo de evaporação foi ressuspendido em 500 μL de MeOH . O mesmo procedimento reacional foi realizado para derivatização com L- e D-FDTA dos padrões comerciais dos 20 aminoácidos proteínogênicos (configuração L), L-*trans*-hidroxiprolina e L-*allo*-isoleucina.

Análises por UPLC-QToF-MS dos derivados foram realizadas em uma coluna Acquity BEH C_{18} (2,1 X 100,0 mm, 1,7 μm ; Waters), utilizando-se H_2O + 0,1% de ácido

fórmico e MeCN + 0,1% de ácido fórmico em um gradiente de eluição de 8:2 para 5:5 de H₂O/MeCN durante 8 min, de 5:5 para 8:2 de H₂O/MeCN durante 0,1 min e mantido em 8:2 de H₂O/MeCN por 1,9 min, totalizando 10,0 min de análise. As condições de detecção se mantiveram de acordo com o descrito no item 1.3.6, com exceção da faixa de varredura que foi de *m/z* 400 - 650. No caso dos padrões L-Leu, L-Ile e L-*allo*-Ile derivatizados, foram necessárias análises por UPLC-QToF-MS complementares, utilizando uma coluna Acquity BEH C₈ (2,1 X 100,0 mm, 1,7 µm; Waters), utilizando-se H₂O + 0,1% de ácido fórmico e MeCN + 0,1% de ácido fórmico e modo gradiente linear de 65:35 para 60:40 H₂O/MeCN (+ 0,1% ácido fórmico) durante 17 min, com vazão de 0,500 mL min⁻¹.

1.3.5 Reação da oceanapiamida A com DTT

A redução das ligações de dissulfetos foi realizada utilizando o reagente ditioneitol (DTT) (SCIGELOVA et al., 2001). A oceanapiamida A (100 µg), solubilizada em 10 µL de MeOH, foi adicionada à 50 µL de DTT (10 mg/mL) em uma solução de tampão acetato de amônia (pH 4,5). A reação foi mantida sob agitação à 70 °C durante 10 min.

1.3.6 Avaliação da atividade citotóxica

Células de câncer de ovário humano (OVCAR3) foram adquiridas da *American Type Culture Collection* (Manassas, VA). A linhagem celular foi propagada à 37 °C e atmosfera com 5% de CO₂ em meio RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino (10%), penicilina (100 unidades/ mL) e estreptomicina (100 µg/mL). Tripsina foi utilizada para a retirada das células na fase log de crescimento, seguidas de duas lavagens para total remoção da enzima. Um total de 5000 células foram adicionadas a cada poço da placa de 96 poços e incubadas *overnight* (37 °C e 5% de CO₂). As amostras dissolvidas em DMSO foram adicionadas nos poços apropriados. As células foram incubadas na presença dos compostos por 72 h à 37°C e a viabilidade celular foi obtida por um ensaio de absorvância comercial (CellTiter-Blue® Cell Viability Assay, Promega Corp, Madison, WI). Os valores de IC₅₀ foram expressos em µM relativos ao controle (DMSO). O ensaio biológico foi realizado pelo grupo coordenado pela Prof.^a Dr.^a Joanna E. Burdette da University of Illinois em Chicago.

1.3.7 Procedimentos experimentais gerais

As rotações ópticas foram adquiridas em um polarímetro Polartronic H Schmidt+Haensch. Os espectros no ultravioleta (UV) foram obtidos em um espectrofotômetro UV-3600 Shimadzu. Espectros no infravermelho (IV) foram adquiridos utilizando pastilha de Si e um espectrofotômetro modelo IRAffinity da Shimadzu. Espectros de RMN foram adquiridos à 25 °C, com tetrametilsilano como padrão interno. Os experimentos foram conduzidos em um espectrômetro Bruker AVANCE III, operando em 600 MHz (¹H) ou 150 MHz (¹³C). Os deslocamentos químicos foram referenciados com MeOH residual em MeOH-*d*₄ para ¹H (δ 3,35) e ¹³C (δ 49,3).

As análises por HPLC-UV-ELSD-MS foram realizadas utilizando um módulo de separação Waters Alliance 2695 (HPLC), acoplado com um detector espectrofotômetro UV-vis com arranjo de fotodiodos Waters 2696 (PDA), tendo uma divisão 7:3 da vazão após PDA, acoplado sequencialmente um espectrômetro de massas Micromass ZQ 2000 (MS) da Waters e um ELSD 2424 Waters, respectivamente. A separação cromatográfica foi realizada usando uma coluna X-Terra RP₁₈ (4,6 X 250 mm, 5,0 μm, Waters), 0,1% de ácido fórmico em H₂O Milli-Q (A) e 0,1% de ácido fórmico em MeOH:MeCN (1:1) (B). O gradiente de eluição utilizado foi de 9:1 de A:B para 100% de B em 22 min, manteve-se em 100% de B de 22 min à 30 min, de 100% de B para 9:1 de A:B de 30 min à 31 min e manteve-se em 9:1 de A:B de 31 min à 40 min, com vazão de 1,00 mL min⁻¹. Amostras foram solubilizadas em MeOH com concentração de 1,00 mg mL⁻¹. O volume de injeção foi de 10 μL. A faixa de varredura utilizando detector PDA foi entre 200 e 800 nm. O espectrômetro de massas (MS) possui ionização por electrospray (ESI), analisador de massas quadrupolo (Q) e foram utilizadas as seguintes condições de análise: voltagem do capilar de 3 kV, temperatura da fonte de 100 °C, temperatura de dessolvatação de 350 °C, faixa de aquisição entre *m/z* 100 - 1000, vazão de gás no cone de 50 L h⁻¹ e vazão do gás de desolvatação de 350 L h⁻¹. O ELSD operou com ganho de 100, nebulizador em modo aquecimento em nível 60%, *drift tube* com temperatura 80 ± 5 °C, pressão do gás de 50 psi e com *output full scale* de 2000 mV.

Análises por UPLC-QToF-MS e MS/MS foram realizadas em um cromatógrafo líquido Waters® Acquity UPLC H-class acoplado com um espectrômetro de massas Waters Xevo G2-XS Q-ToF com interface *electrospray*. Coluna C₁₈ BEH (2,1 X 50,0

mm, 1,7 μm ; Waters), mantida a 40°C. O gradiente de eluição utilizado foi de 95:5 para 0:100 H₂O/MeCN (com 0,1% de ácido fórmico) durante 3,5 min, de 0:100 para 95:5 (com 0,1% de ácido fórmico) durante 0,1 min e mantido em 95:5 (com 0,1% de ácido fórmico) por 1,4 min, totalizando 5,0 min de análise, com vazão de 0,5 mL min⁻¹. O volume de injeção foi de 0,1 μL de uma solução metanólica 0,1 mg mL⁻¹, mantida a 15°C. Os dados dos espectros de massas foram adquiridos em MS e MS/MS, positivo, centróide, resolução, tempo de aquisição de 5 min, faixa de m/z 100-1200 para aquisição em modo MS e faixa de m/z 50–900 para aquisição em modo MS/MS, *scan time* de 0,2 s e energia de colisão de 0 eV para o modo MS e energia de colisão de 25 eV para o modo MS/MS. Condições do ESI: voltagem do capilar de 1,2 kV, voltagem do cone de 30 V, temperatura da fonte de 100 °C, temperatura de dessolvatação de 450 °C, vazão de gás no cone de 50 L h⁻¹ e vazão de gás de dessolvatação de 750 L h⁻¹. Para calibração interna, uma solução de leucina-encefalina 200 pg mL⁻¹ foi infundida pela sonda de *lock-mass* com vazão de 10 μL min⁻¹.

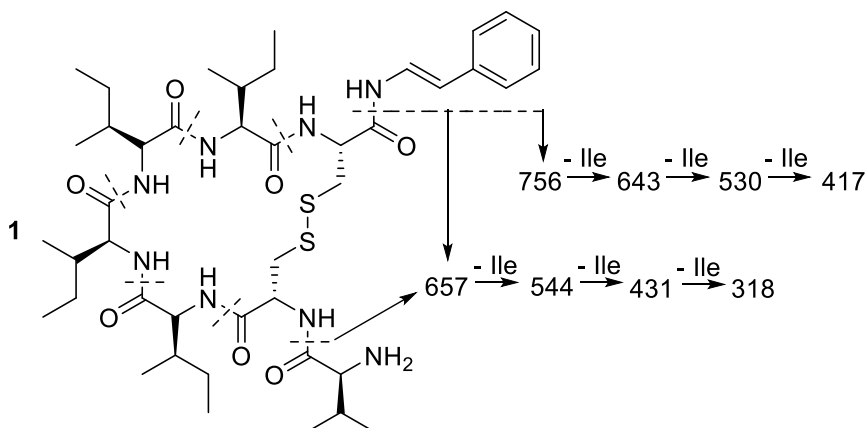
1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.4.1 Estudo químico da esponja marinha *Clathria (Clathria) nicoleae*

1.4.1.1 Estudo químico da fração de acetato de etila da esponja *Clathria (Clathria) nicoleae*

Seguidos fracionamentos da fração acetato de etila (W7A) levaram ao isolamento do composto **1**. Em análise por UPLC-QToF-MS, o composto **1** apresentou $[\text{M} + \text{H}]^+$ com massa acurada m/z 875,4894 (Figura A1, Apêndice), correspondente à fórmula molecular C₄₃H₇₁N₈O₇S₂⁺ (massa exata: 875,4887; erro de massa: 0,8 ppm). A análise por MS/MS de **1** (Figura A2, Apêndice) gerou íons fragmentos característicos condizentes com os descritos para o composto microcionamida A (**1**) (Figura 8) (DAVIS *et al.*, 2004). A comparação dos dados de RMN de ¹H de **1** (Figura A3, Apêndice) com os dados reportados por Davis e colaboradores (2004), permitiu confirmar a identidade do peptídeo microcionamida A (**1**), previamente isolado a partir de extrato da esponja marinha *Clathria abietina* (DAVIS *et al.*, 2004).

Figura 8. Esquema de fragmentação do composto microcionamida A (1).



Fonte: Adaptado de (Davis *et al.*, 2004)

1.4.1.2 Estudo químico da fração aquosa da esponja *Clathria (Clathria) nicoleae*

Sucessivos fracionamentos da fração aquosa (W7B) levaram ao isolamento da clathriamida (2). Análise por UPLC-QToF-MS de 2 apresentou $[M + H]^+$ com massa acurada de m/z 703.4047 (Figura A4, Apêndice) (massa exata: m/z 703.4031; erro de massa: 2,3 ppm; fórmula molecular: $C_{35}H_{55}N_6O_9^+$).

A Tabela 1 apresenta a atribuição dos sinais de RMN de 1H , ^{13}C e as correlações por HSQC-TOCSY para a clathriamida (2) (Figuras A5-A10, Apêndice). O espectro de RMN de 1H de 2 apresentou sinais em diferentes regiões do espectros: dois sinais na região entre δ_H 7,20 e δ_H 7,50, deslocamentos químicos típicos para hidrogênios aromáticos; seis sinais entre δ_H 4,00 e δ_H 4,60, característicos de hidrogênios- α de aminoácidos; treze sinais entre δ_H 1,24 e δ_H 3,70, referentes à CH e CH_2 das cadeias laterais dos aminoácidos; quatro sinais entre δ_H 0,95 e δ_H 1,23. O espectro de RMN de ^{13}C possui 32 sinais, sendo: 6 sinais na região entre δ_C 179,0 e δ_C 170,9, deslocamentos típicos de ácido carboxílico e amidas; 5 sinais na região entre δ_C 139,1 e δ_C 118,5, deslocamentos de carbonos de sistema aromático; 8 sinais na região entre δ_C 71,4 e δ_C 51,7, atribuídos a carbonos α ou carbonos substituídos por átomo de oxigênio; 13 sinais entre δ_C 41,0 e δ_C 12,6, atribuídos à carbonos de cadeia lateral de aminoácidos. A análise dos dados de HSQC permitiu a atribuição dos sinais de 1H com os respectivos carbonos (1J). O experimento de HSQC-TOCSY apresentou correlações até 4J . No entanto, o acoplamento de 1H com ^{13}C não é transmitido através de heteroátomos. Sendo assim, com esse experimento foi possível conectar os sinais

de cada uma das cadeias laterais dos aminoácidos. Com as correlações observadas no espectro COSY e as correlações observadas no espectro de HSQC-TOCSY, foi possível construir os resíduos de leucina (Leu), prolina (Pro), 4-hidroxiprolina (Hyp), treonina (Thr) e isoleucina (Ile), presentes na clathriamida (**2**). A cadeia lateral do resíduo de fenilalanina (Phe) foi posicionada observando-se as correlações presentes no espectro de HMBC, no qual os sinais em δ 7,41 e 7,32 (aromático) acoplam com o sinal em δ 38,9 (Phe- β). A conectividade entre os resíduos dos aminoácidos foi realizada utilizando-se o espectro de HMBC, observando os acoplamentos dos hidrogênios α com o carbono carbonílico dos resíduos vizinhos. As correlações por COSY e as correlações-chave do HMBC estão ilustradas na Figura 9. Dessa forma, o peptídeo elucidado possui a sequência Leu-Pro-Hyp-Phe-Thr-Ile.

Figura 9. Correlações COSY e correlações chave HMBC da clathriamida **2**.

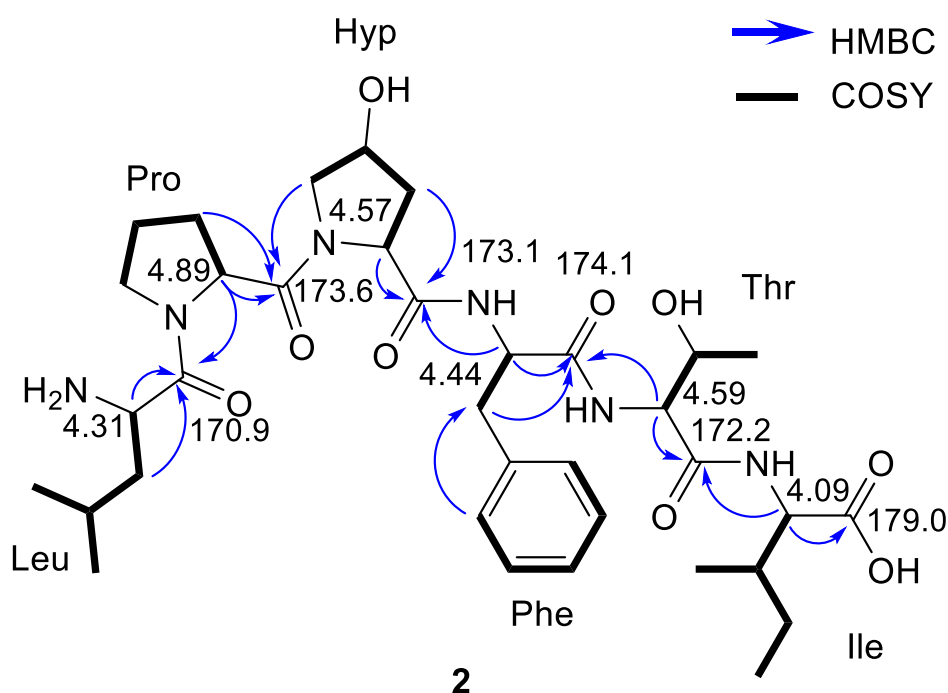


Tabela 1. Dados de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e HSQC-TOCSY (δ , ppm) para a clathriamida (**2**) em $\text{MeOH-}d_4$ (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz)

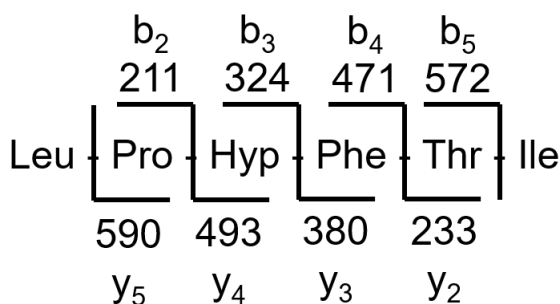
Unidade	Posição	δ_{C} , tipo	δ_{H} (J in Hz)	HSQC-TOCSY	
L-Leu	CO	170,9, C			
	α	51,7, CH	4,31, dd (9,8, 3,9)	Leu- β , Leu- γ , Leu- δ , Leu- δ'	
	β	40,9, CH ₂	1,80, m	Leu- α , Leu- γ , Leu- δ , Leu- δ'	
	γ	25,6, CH	1,91, m	Leu- α , Leu- β , Leu- δ , Leu- δ'	
	δ	24,0, CH ₃	1,12, d (6,4)	Leu- α , Leu- β , Leu- γ , Leu- δ'	
	δ'	21,8, CH ₃	1,14, d (6,4)	Leu- α , Leu- β , Leu- γ , Leu- δ	
L-Pro	CO	173,6, C			
	α	61,1, CH	4,89, sob signal da água	Pro- β , Pro- γ , Pro- δ	
	β	29,9, CH ₂	1,83, m; 2,45, m	Pro- α , Pro- γ , Pro- δ	
	γ	26,9, CH ₂	2,14, m; 2,21, m	Pro- α , Pro- β , Pro- δ	
	δ	49,5, CH ₂	3,58, m; 3,91, ddd (3,2, 7,8, 9,8)	Pro- α , Pro- β , Pro- γ	
4-trans-Hyp	CO	173,1, C			
	α	61,1, CH	4,57, dd (4,7, 7,9)	Hyp- β , Hyp- γ , Hyp- δ	
	β	40,5, CH ₂	2,13, m	Hyp- α , Hyp- γ , Hyp- δ	
	γ	68,4, CH	3,58, m	Hyp- α , Hyp- β , Hyp- δ	
	δ	54,4, CH ₂	3,13, dd (6,1, 11,9); 3,43, dd (5,1, 11,9)	Hyp- α , Hyp- β , Hyp- γ	
L-Phe	CO	174,1, C			
	α	59,1, CH	4,44, dd (4,1, 12,6)	Phe- β	
	β	38,9, CH ₂	3,27, dd (12,6, 13,7); 3,39, dd (3,9, 13,7)	Phe- α	
	aromático	1:	139,1, C		
		2:	130,4, CH	7,41, m	
		3:	128,5, CH	7,32, m	
		4:	130,1, CH	7,40, m	
	5:	128,5, CH	7,32, m		
	6:	130,4, CH	7,41, m		
L-Thr	CO	172,2, C			
	α	58,7, CH	4,59, d (2,7)	Thr- γ	
	β	71,4, CH	4,49, dd (2,7, 6,4)	Thr- α , Thr- γ	
	γ	19,3, CH ₃	1,22, d (6,4)	Thr- α , Thr- β	
L-Ile	CO	179,0, C			
	α	62,5, CH	4,09, d (4,8)	Ile- β , Ile- γ' , Ile- δ	
	β	37,9, CH	1,99, m	Ile- α , Ile- γ , Ile- γ' , Ile- δ	
	γ	26,1, CH ₂	1,29, m; 1,57, m	Ile- α , Ile- β , Ile- γ' , Ile- δ	
	γ'	17,0, CH ₃	1,02, d (6,4)	Ile- α , Ile- β , Ile- γ , Ile- δ	
	δ	12,6, CH ₃	0,98, d (7,3)	Ile- α , Ile- β , Ile- γ , Ile- γ'	

1.4.1.3 Sequenciamento por MS/MS da clathriamida (2)

O sequenciamento de peptídeos por MS/MS possui uma nomenclatura própria para representação de suas fragmentações, proposta inicialmente por Roepstorff e Fohlmann e modificada posteriormente por Biemann (CANTÚ *et al.*, 2008; SEIDLER *et al.*, 2010). O modelo de mobilidade do próton descreve como a energia interna adquirida pelo peptídeo durante sua passagem pela câmara de colisão induz a transferência intramolecular de prótons, levando à clivagem de ligações da cadeia peptídica, formando íons-fragmento: um contendo carga positiva no lado N-terminal (**a**, **b** ou **c**) e o outro no lado C-terminal (**x**, **y** ou **z**) (CANTÚ *et al.*, 2008; WYSOCKI *et al.*, 2000). De modo geral, os íons-fragmento mais abundantes e mais utilizados para o sequenciamento de peptídeos são os pertencentes às séries **b** e **y**, pois correspondem à clivagem da ligação peptídica.

Análise por UPLC-QToF-MS/MS foi realizada com o intuito de sequenciar o composto **2**. O íon de m/z 703,45 foi fragmentado na câmara de colisão gerando o espectro MS/MS (Figura A12, Apêndice). Foi possível identificar as séries **b** e **y** do peptídeo (Figura 10), sendo série **b** sendo composta pelos íons **b₂** (m/z 211,1448), **b₃** (m/z 324,1937), **b₄** (m/z 471,2613) e **b₅** (m/z 572,3097), enquanto que a série **y** é composta pelos íons **y₂** (m/z 233,1356), **y₃** (380,2187), **y₄** (m/z 493,2670), **y₅** (m/z 590,3203). A sequência de aminoácidos do peptídeo clathriamida conseguida por análise MS/MS foi Leu-Pro-Hyp-Phe-Thr-Ile, confirmando a sequência identificada por RMN.

Figura 10. Esquema de fragmentação da clathriamida (2).



1.4.1.4 Determinação da configuração absoluta da clathriamida (**2**)

A configuração absoluta de **2** foi estabelecida por análise avançada de Marfey, usando o reagente 5-flúor-2,4-dinitrofenil-N α -L-triptofanamida (FDTA) (SALIB; MOLINSKI, 2017). Primeiramente foi realizada a hidrólise ácida do peptídeo para posterior derivatização com L- e D-FDTA, separadamente. Foi desenvolvido um método de análise por UPLC-QToF-MS utilizando coluna C₁₈ (Figuras A13-A17, Anexo), em que a ordem de eluição observada foi L-L para L-D (Tabela 2) para todos os padrões derivatizados com FDTA, exceto pela Hyp, como previamente descrito por Bornancin *et al.* (2019). A derivatização com FDTA permitiu excelente resolução cromatográfica na análise por LC-MS para as misturas diastereoméricas L-L e L-D dos aminoácidos derivatizados (Tabela 2). Ao comparar os t_R dos derivados da hidrólise de **2** com os t_R dos padrões de aminoácidos derivatizados (Tabela 2), foi possível estabelecer a estereoquímica absoluta de quatro aminoácidos: L-Pro, 4-*trans*-L-Pro, L-Phe e L-Thr. Para a separação dos isômeros L-Leu, L-Ile e L-*allo*-Ile derivatizados com L-FDTA foi necessário o desenvolvimento de um novo método cromatográfico utilizando uma coluna Acquity BEH C₈ (Figura 11 e Tabela 2), sendo então possível estabelecer os aminoácidos L-Leu e L-Ile presentes na estrutura de **2** (Figura 12).

A utilização da coluna C₈ permitiu a separação da mistura de L-Leu, L-Ile e L-*allo*-Ile (Figura 11), previamente não conseguida utilizando derivados de FDAA (N α -(2,4-dinitro-5-fluorofenil)-L-alaninamida) (SALIB; MOLINSKI, 2017). O uso do reagente de Marfey modificado (FDTA), recentemente desenvolvido por Salib e Molinski (2017), se provou como a melhor solução para a separação cromatográfica dos estereoisômeros L-Ile e L-*allo*-Ile modificados.

Não somente a estrutura de **2** é nova, como sua sequência de aminoácidos é única. Uma pesquisa detalhada na base de dados do SciFinder não relatou nenhum hexa-, penta-, tetra- ou tripeptídeo, considerando qualquer possível variação, mantendo a mesma sequência dos aminoácidos. O dipeptídeo L-4Hyp-L-Phe se apresentou como um eficiente catalisador para reações assimétricas aldol (SHI *et al.*, 2004), enquanto que o L-Pro-L-4Hyp promoveu o crescimento de fibroblastos em ratos (SHIGEMURA *et al.*, 2009).

A caracterização química complementar da clathriamida (**2**) é: sólido amorfo branco; $[\alpha]_D -2,97^\circ$ (c 0.27, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log e) 202 (4.78) nm; IV (filme

em pastilha de Si) v_{\max} 3304, 2958, 2931, 2875, 2547, 1645, 1533, 1452, 1392, 1201, 1083, 700, 609 cm^{-1} ; Espectro de IV está disponível na Figuras A11 do Apêndice.

O composto **2** apresentou IC_{50} de 1,08 μM em atividade citotóxica avaliada contra a linhagem de câncer de ovário OVCAR3.

Tabela 2. Tempo de retenção (t_R , min) e ordem de eluição para os derivados L-DTA e D-DTA dos padrões de aminoácidos.

Aminoácido	Ordem de eluição	t_R , min		Δt
		L	D	
4-trans-L-Hyp	D \rightarrow L	2,50 ^a	2,41 ^a	-0,09
L-Thr	L \rightarrow D	3,03 ^a	3,99 ^a	0,96
L-Pro	L \rightarrow D	4,08 ^a	4,63 ^a	0,55
L-Phe	L \rightarrow D	5,79 ^a	6,88 ^a	1,09
L-Ile	L \rightarrow D	5,73 ^a	7,11 ^a	1,38
L- <i>allo</i> -Ile	L \rightarrow D	5,77 ^a	7,15 ^a	1,38
L-Leu	L \rightarrow D	5,90 ^a	7,27 ^a	1,37
L-Ile	L \rightarrow D	17,05 ^b		
L- <i>allo</i> -Ile	L \rightarrow D	17,49 ^b		
L-Leu	L \rightarrow D	19,28 ^b		

^aCondições cromatográficas: coluna ACQUITY BEH C₁₈ (2,1 x 50,0 mm, 1,7 μm); fase móvel: gradiente linear de 8:2 para 5:5 H₂O/MeCN (+ 0,1% ácido fórmico) durante 8 min; vazão: 0,500 mL min⁻¹. ^bCondições cromatográficas: coluna ACQUITY BEH C₈ (2,1 x 100 mm, 1,7 μm , Waters); fase móvel: 73:27 H₂O/MeCN (+ 0,1% ácido fórmico) durante 20 min; vazão: 0,500 mL min⁻¹.

Figura 11. Cromatograma de separação dos aminoácidos L-Ile, L-*allo*-Ile e L-Leu derivatizados com L-FDTA e comparação com o hidrolisado da clathriamida (**2**) derivatizado com L-FDTA.

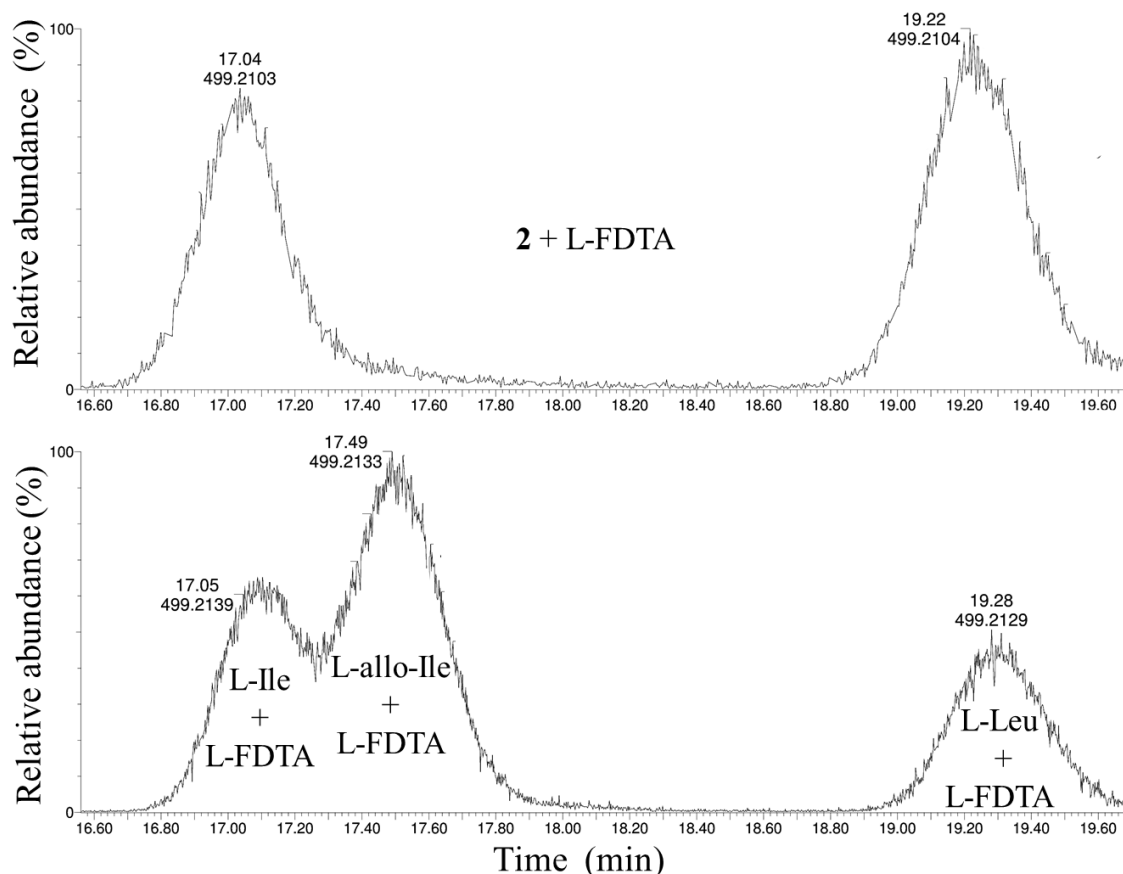
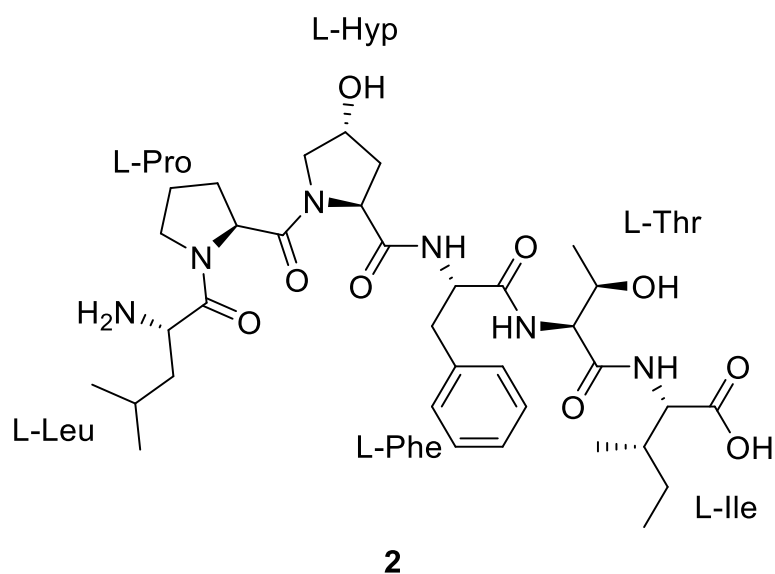


Figura 12. Estrutura da clathriamida (**2**) com configuração absoluta.



1.4.2 Estudo químico da esponja marinha *Oceanapia* sp.

Sucessivos fracionamentos da fração aquosa (W8B) levaram ao isolamento da oceanapiamida A (W8BF1). Análise por UPLC-QToF-MS apresentou $[M + 3H]^{+3}$ com massa acurada de m/z 1131,4912 (Figuras A18-A19, Apêndice) (massa monoisotópica calculada: 3394,4752; fórmula molecular proposta: $C_{131}H_{221}N_{48}O_{46}S_6$; erro de massa: -0,04 ppm).

Optou-se por adquirir os espectros de RMN de 1H , ^{13}C e bidimensionais utilizando $MeOH-d_4$ para evitar observar os sinais de hidrogênios ligados a héteroátomos, com a finalidade de simplificar o espectro para a determinação dos resíduos de aminoácidos presentes (Figuras A19-A33). Foi montada uma tabela a partir dos dados de HQSC e HSQC-TOCSY, sendo os espectros de HMBC e COSY consultados para finalizar a dedução do resíduo de aminoácido presente. Utilizando essa estratégia foi possível elucidar a presença de 25 resíduos de aminoácidos, sendo duas Ile, seis Leu, três Val, uma Ala, quatro Tyr, uma Met, quatro Cys, duas Pro, uma Ser e uma Arg (Tabela A1, Apêndice).

1.4.2.1 Análise avançada de Marfey do composto oceanapiamida A

A análise avançada de Marfey foi realizada com dois objetivos. O primeiro objetivo foi prospectar outros aminoácidos proteinogênicos no composto que não foram possíveis de serem identificados por RMN. O segundo objetivo determinar a estereoquímica absoluta dos resíduos previamente elucidados por RMN.

A prospecção dos aminoácidos utilizando-se análise avançada de Marfey foi feita por comparação do t_R dos padrões de aminoácidos proteinogênicos derivatizados com L- e D-FDTA com o t_R do hidrolisado derivatizado com D-FDTA. Além dos aminoácidos previamente observados, foi possível postular a presença de glicina (Figuras A34, Apêndice). No entanto, essa abordagem não nos permite inferir o número de resíduos de aminoácidos presentes na estrutura.

Com relação à determinação da estereoquímica absoluta dos resíduos previamente elucidados por RMN, todos apresentaram configuração L, exceto a cisteína que apresentou os resíduos L e D. Também foi possível assinalar a presença de L-Ile e a ausência de L-*allo*-Ile (Tabela 3) (Figuras A35-A43).

Tabela 3. Tempo de retenção (t_R , min) e ordem de eluição para os derivados L-DTA e D-DTA dos padrões de aminoácidos.

Aminoácido	Ordem de eluição	t_R , min		Δt
		L	D	
L-Val	L → D	6,02 ^a	7,45 ^a	1,43
L-Ala	L → D	4,85 ^a	5,74 ^a	0,89
L-Tyr	L → D	3,89 ^a	3,98 ^a	0,09
L-Cistina	D → L	5,96 ^a	5,85 ^a	-0,11
L-Pro	L → D	5,01 ^a	5,72 ^a	0,71
L-Ser	L → D	3,65 ^a	3,84 ^a	0,19
L-Arg	D → L	2,90 ^a	2,62 ^a	-0,28
L-Ile	L → D	6,87 ^a	8,35 ^a	1,48
L-Leu	L → D	7,06 ^a	8,49 ^a	1,43
L-Ile	L → D		7,81 ^b	
L- <i>allo</i> -Ile	L → D		7,98 ^b	
L-Leu	L → D		8,36 ^b	

^aCondições cromatográficas: coluna ACQUITY BEH C₁₈ (2,1 x 100.0 mm, 1.7 μ m); fase móvel: gradiente linear de 8:2 para 5:5 H₂O/MeCN (+ 0,1% ácido fórmico) durante 8 min; vazão: 0,500 mL min⁻¹. ^bCondições cromatográficas: coluna ACQUITY BEH C₈ (2,1 x 100 mm, 1,7 μ m, Waters); fase móvel: gradiente linear de 65:35 para 60:40 H₂O/MeCN (+ 0,1% ácido fórmico) durante 17 min; vazão: 0,500 mL min⁻¹.

1.4.2.2 Análise da oceanapiamida A por MS/MS

O espectro MS/MS da oceanapiamida A foi adquirido com a finalidade de sequenciar os aminoácidos presentes. O íon de m/z 1131,48 foi escolhido para fragmentação por ser o íon mais intenso (Figura A44, Apêndice). Como o íon fragmentado foi o $[M + 3H]^{+3}$ foi possível observar no espectro diferentes protonações. Entre m/z 50-500 são íons monoprotonados, entre m/z 1200-1650 são íons diprotonados e entre m/z 800-1135 são íons triprotonados. A fragmentação do $[M + 3H]^{+3}$ permitiu a identificação de íons imônios, íons relacionados, perdas de água, íons *a*, *b*, *x* e *y* assim como a proposição de curtas sequências de íons *b* e *y* (Tabelas 4-6).

Foi possível observar no espectro MS/MS da oceanapiamida A (Figura A44, Apêndice), a existência de regiões sem informação de íons entre cada região com diferentes graus de protonção. Não foi possível assinalar, com confiança, íons monoprotonados acima de m/z 550, ou íons diprotonados abaixo de m/z 1400. Isso pode ser resultado de ciclizações no peptídeo. As análises de RMN permitiram a proposição de quatro resíduos de cisteína. Cisteína é um resíduo de aminoácido que comumente promove ciclizações por meio de ligações entre as cadeias laterais, formando cistinas. Foi promovida uma reação entre a oceanapiamida A e o ditioneitol (DTT), um reagente com especificidade para redução de cistinas (SCIGELOVA et al., 2001). O produto da reação foi o esperado, a adição de quatro hidrogênios à oceanapiamida A (Figuras A44-A46, Apêndice). Prosseguiu-se então para a aquisição de um novo espectro de MS/MS a partir do produto da reação. Infelizmente, o espectro de MS/MS apresentou o mesmo perfil de fragmentação que o MS/MS anteriormente adquirido para a oceanapiamida A (Figura A44, Apêndice). A Figura 13 apresenta a sequência por MS/MS dos resíduos de aminoácidos da oceanapiamida A.

Tabela 4. Íons fragmentos monoprotonados da oceanapiamida A.

Íon	Massa acurada	Perda neutra	Identidade
Íon ou Relacionado	70,0670	-	Pro ou Asn/Lys/Arg
Íon	86,0981	-	Leu/Ile
Relacionado	91,0561	-	Tyr
Relacionado	107,0504	-	Tyr
a_2	233,1303	27,9950	CO
b_2	261,1253	-	Leu/Ile + Met*
-	280,1670	18,0106	H ₂ O
y_3	298,1776	163,0607	Tyr
b_3	318,1466	57,0213	Gly
a_4	403,2351	27,9950	CO
b_4	431,2301	113,0835	Leu/Ile
y_4	461,2383	163,0606	Tyr
a_5	516,3192	27,9950	Leu/Ile
b_5	544,3105	113,0804	Leu/Ile

*Metionina oxidada

determinação da estrutura da oceanapiamida B, outro peptídeo com massa molecular acima de 3300 g mol⁻¹.

1.5 CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente estudo químico da esponja marinha *Clathria* (*Clathria*) *nicoleae*, coletada no extenso sistema de recifes da Foz do Rio Amazonas, levou ao isolamento da microcionamida A (**1**) a partir da fração AcOEt do extrato MeOH da esponja. O estudo da fração aquosa do extrato MeOH da esponja, utilizando resina de sorção HP-20, levou ao isolamento do peptídeo inédito clathriamida (**2**). O estabelecimento da estereoquímica absoluta dos resíduos de aminoácidos de **2** foi possível pelo uso do recentemente descrito reagente modificado de Marfey (FDTA) e o uso das colunas de UPLC com fases estacionárias C₈ e C₁₈.

O estudo químico de espécimes da esponja marinha *Oceanapia* sp., coletada na Foz do Rio Amazonas, permitiu o isolamento das oceanapiamida A e B, ambos peptídeos com massa molecular superior a 3300 Da. As análises de RMN, LC-MS e MS/MS não se mostraram suficientes para a caracterização completa da oceanapiamida A. Outras abordagens deverão ser utilizadas com a finalidade de determinar a estrutura completa de ambos compostos isolados.

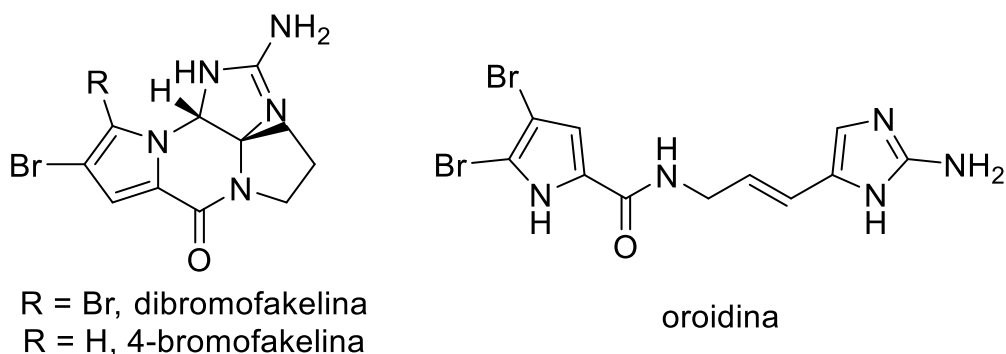
Os compostos apresentados nesse capítulo, em conjunto com os alcalóides bromopirrólicos inéditos reportados por De Souza *et al.* (2018), trazem luz ao potencial de quimiodiversidade que espécies do sistema de recife da foz do rio Amazonas apresenta.

CAPÍTULO 2 – ESTUDO DE FRAGMENTAÇÃO DE ALCALÓIDES BROMOPIRRÓLICOS POR HRMS/MS

2.1 INTRODUÇÃO

O estudo químico da esponja marinha *Phakellia flabellata* por Sharma e Burkholder (1971) levou ao isolamento e elucidação estrutural dos dois primeiros alcalóides bromopirrólicos, a dibromofakelina, com sua configuração absoluta determinada por análise de difração de raios-X, e a 4-bromofakelina (Figura 14) (SHARMA; BURKHOLDER, 1971). No mesmo ano, Forenza, Minale e Riccio (1971) estudaram a esponja marinha *Agelas oroides* e isolaram o principal composto representante desta classe de alcalóides, a oroidina (Figura 14) (FORENZA *et al.*, 1971).

Figura 14. Estruturas dos alcalóides dibromofakelina, 4-bromofakelina e oroidina.



Fonte: Autoria Própria

Atualmente, mais de 230 compostos dessa classe foram isolados (LINDEL, 2017; DE SOUZA *et al.*, 2018), com variados esqueletos carbônicos, oriundos de esponjas marinhas. Diversas atividades biológicas e ecológicas já foram descritas para essa classe de compostos. Dentre as atividades biológicas, os alcalóides bromopirrólicos já foram testados como inibidores do proteassomo (DE SOUZA *et al.*, 2018; LANSDELL *et al.*, 2012), antivirais (O'ROURKE *et al.*, 2016), antimicrobianos (GJORGJIEVA; MASIC; KIKELJ, 2018; HERTIANI *et al.*, 2010; PARRA *et al.*, 2018; RODRIGUEZ *et al.*, 2014), antiprotozoários (PARRA *et al.*, 2018; SCALA *et al.*, 2010), agentes citotóxicos (D'AMBROSIO *et al.*, 1993; KINNEL; GEHRKEN; SCHEUER, 1993), entre outras atividades biológicas. Somente em 2018, 21 compostos

bromopirrólicos inéditos foram isolados, todos oriundos de esponjas marinhas (DE SOUZA *et al.*, 2018; KWON *et al.*, 2018; PARRA *et al.*, 2018; SUN *et al.*, 2018). Isso demonstra que, embora essa classe seja estudada desde a década de 1970, compostos com novas estruturas continuam a ser descritos.

Estudos de fragmentação por HRMS/MS de compostos conhecidos têm se mostrado extremamente úteis para anotações mais precisas em estudos metabolômicos e para a proposição de estruturas de compostos minoritários com estruturas semelhantes as já previamente descritas. Por exemplo, com a análise do perfil de fragmentação dos ácidos anacárdicos previamente caracterizados, ácido merulínico C, (17:2) $\Delta^{8,11}$, (17:3) $\Delta^{8,11,14}$ e (15:1) Δ^{10} , foi possível estabelecer um protocolo para o estabelecimento da localização de insaturações para seis ácidos anacárdicos minoritários, inclusive um deles sendo inédito (RODRIGUES-COSTA *et al.*, 2020). O estudo metabolômico de uma cadeia alimentar de invertebrados marinhos mostrou a presença das tambjamins A, C, D e K, além dos aldeídos das tambjamins A e B. Juntamente com os compostos conhecidos, foram propostas as estruturas inéditas das tambjamins M-O com base nos dados de HRMS/MS, sendo as estruturas posteriormente confirmadas por síntese total (TAKAKI *et al.*, 2021). Desta forma, o estudo de fragmentação por HRMS/MS tem se mostrado uma importante ferramenta para a identificação de compostos conhecidos e também para a prospecção de compostos inéditos.

2.2 OBJETIVOS

Esse capítulo teve por objetivo investigar o perfil de fragmentação por HRMS/MS dos alcalóides bromopirrólicos 4-desbromo-oroidina (**3**), himenidina (**4**) 4-desbromougibohlina (**5**), 5-desbromougibohlina (**6**) e monobromoisofakelina (**7**), tendo como objetivos específicos a proposição de árvores de fragmentação e de estruturas para os íons fragmentos.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Amostras de alcalóides bromopirrólicos

As amostras de alcalóides bromopirrólicos 4-desbromo-oroidina (**3**), himenidina (**4**) 4-desbromougibohlina (**5**), 5-desbromougibohlina (**6**) e monobromoisofakelina (**7**) são pertencentes a biblioteca de compostos do grupo de Química Orgânica de Sistemas Biológicos (QOSBio). Todos os compostos aqui estudados foram previamente isolados a partir do extrato MeOH da esponja marinha *Dictyonella* sp. e completamente caracterizados (DE SOUZA *et al.*, 2018). As amostras foram preparadas em MeOH na concentração de 0,01 mg mL⁻¹.

2.3.2 Condições de análises por UPLC-QToF-MS/MS

As análises por UPLC-QToF-MS/MS foram realizadas em um cromatógrafo líquido Waters® Acquity UPLC H-class acoplado com um espectrômetro de massas Waters® Xevo® G2-XS Q-ToF com interface *electrospray*. Foi utilizada uma coluna BEH C₁₈ (dimensões: 2,1 x 100 mm, 1,7 µm; Waters®) e fase móvel de 0,1% de ácido fórmico em água Milli-Q (A) e 0,1% de ácido fórmico em MeCN (B). O gradiente de eluição utilizado foi de 90% para 70% de A em 4,0 min, de 70% para 90% de A em 0,1 min e mantida em 90% de A por 0,9 min, totalizando 5,0 min de análise cromatográfica com vazão de 0,350 mL min⁻¹. O volume de injeção foi de 1 µL. A coluna foi mantida a 40 °C e as amostras a 15 °C. Condições do ESI: voltagem do capilar de 1,2 kV, voltagem do cone de 30 V, temperatura da fonte de 100 °C, temperatura de dessolvatação de 450 °C, vazão de gás no cone de 50 L h⁻¹ e vazão de gás de dessolvatação de 750 L h⁻¹. Para calibração interna foi infundida uma solução de leucina-encefalina 200 pg mL⁻¹ pela sonda de *lock-mass* com vazão de 10 µL min⁻¹ em intervalos de 20 s, scan de 0,1 s e com aplicação de correção em tempo real. Os dados foram adquiridos em MS/MS, modo positivo, contínuo, resolução, tempo de scan de 0,200 s⁻¹, tempo de aquisição 5,0 min, faixa de massa de *m/z* 50 - 400 e aplicada rampa de energia de colisão 20 - 30 eV.

2.3.3 Pré-processamento dos dados de UPLC-QToF-MS/MS empregando MZmine

Os dados adquiridos das cinco amostras foram convertidos utilizando o *software* MSConvert, pré-processados empregando o *software* MZmine. O *scan* selecionado foi utilizado no *software* Sirius para gerar as árvores de fragmentação e

também foi utilizado na plataforma *Competitive Fragmentation Modeling for Metabolite Identification* (CFM-ID) para atribuição dos picos.

Os dados brutos adquiridos em modo MS/MS foram convertidos utilizando o *software* MSConvert versão 3.0. Os dados .raw foram convertidos para .mzXML utilizando *binary encoding precision* 32-bit, *write index* e o filtro *peak picking* aplicado com algoritmo *continuous wavelet transform* (CWT) MS levels 1-2. Para o pré-processamento dos dados utilizando o MZmine versão 2.51 foi realizado o *mass detection* para a função MS² (*centroid; noise level* 1,0 x 10²). O *scan* com o pico base mais intenso foi selecionado e exportado como .mgf. O valor de íon precursor foi corrigido manualmente em cada .mgf para *m/z* 310,0298.

2.3.4 Criação da árvore de fragmentação pelo Sirius e atribuição dos picos pelo CFM-ID

O *software* Sirius versão 4.4.17 foi utilizado para a criação das árvores de fragmentação. Os arquivos .mgf foram processados com massa do íon precursor *m/z* 310,0298, aduto [M +H]⁺ e fórmula molecular C₁₁H₁₂BrN₅O, utilizando a ferramenta SIRIUS (*Instrument*: Q-TOF; *MS2 MassDev* (ppm): 10; *Candidates*: 10; *Candidates per ion*: 1).

Foi utilizada a ferramenta de *Peak Assignment* disponível na plataforma do CFM-ID 3.0 (<https://cfmid.wishartlab.com/>) foi utilizada para atribuição de picos. O SMILES de cada composto, sem protonação, foi gerado pelo ChemBioDraw Ultra versão 13.0. Os parâmetros utilizados no *Peak Assignment* foram: *Spectra type*: ESI, *Ion mode*: Positive, *Mass tolerance*: 10.0 ppm. A lista de picos presente no arquivo .mgf foi inserida na opção *Medium Energy*.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Estudo de fragmentação por HRMS/MS de alcalóides bromopirrólicos

A proposição das rotas de fragmentação utilizou-se de espectros de HRMS/MS experimentais aliados ao uso de ferramentas *in-silico* para a exploração dos espectros adquiridos. Os dados brutos (.raw) das análises realizadas foram convertidos em

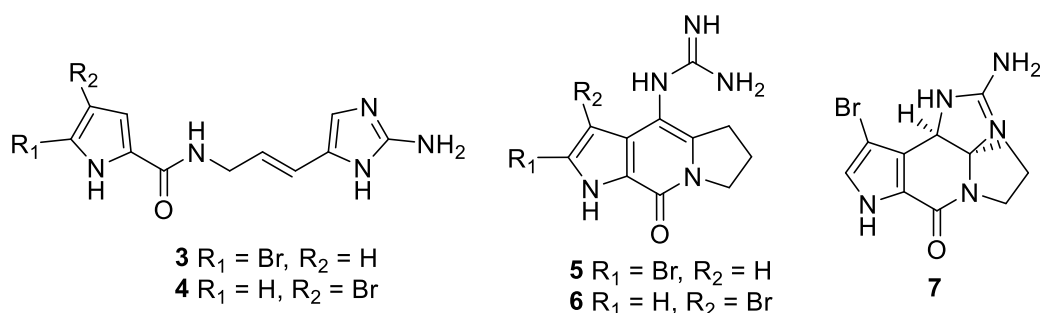
.mzXML utilizando o MSConvert 3.0. Os dados convertidos foram processados utilizando o MZmine 2.51 e os *scans* selecionados foram exportados como .mgf. Os arquivos .mgf foram utilizados no Sirius 4.17 para a construção da árvore de fragmentação, a qual anota os espectros experimentais com fórmulas moleculares e identifica as perdas entre os íons fragmentos. A lista de íons dos arquivos .mgf também foram utilizados na plataforma do CFM-ID 3.0. A ferramenta de *peak assignment* do CFM-ID 3.0 permite a anotação em um espectro de uma molécula com estrutura conhecida (DJOUMBOU-FEUNANG *et al.*, 2019). Uma lista completa de íons fragmentos é gerada, após isso, os fragmentos mais prováveis são determinados pelo modelo *in-silico* utilizado. Como resultado temos o espectro original anotado, com cada pico anexado com uma lista de ID's correspondentes a qualquer fragmento com determinada massa exata, listado em ordem do fragmento mais provável ao fragmento menos provável. Uma hipótese de fragmentação também é oferecida, contendo os fragmentos anotados e as possíveis transições entre os íons fragmentos. A estratégia utilizada para a proposição das rotas de fragmentação se baseou na busca das *m/z* dos íons fragmentos observados, HRMS/MS experimentais, na da predição espectral do CFM-ID e posterior racionalização estrutural. Utilizando essa abordagem, foram apresentadas as propostas estruturais dos íons fragmentos para os alcalóides bromopirrólicos.

Os alcalóides aqui investigados, 4-desbromo-oroidina (**3**), himenidina (**4**) 4-desbromougibohlina (**5**), 5-desbromougibohlina (**6**) e monobromoisofakelina (**7**) (Figura 15), foram previamente isolados e completamente caracterizados por RMN e HRMS (DE SOUZA *et al.*, 2018). A análise do perfil de fragmentação se torna particularmente interessante ao observar que os alcalóides **3-7** são isômeros.

Para a análise do perfil de fragmentação usou-se um equipamento de UPLC-QToF-MS/MS. A energia de colisão foi otimizada para o composto **3** e posteriormente aplicada para os demais compostos. Foram avaliadas diferentes energias na câmara de colisão, variando entre 5 e 30 eV. Os perfis de fragmentação observados entre as energias mais altas e as energias mais baixas foram distintos. Dessa forma, optou-se por realizar uma rampa de energia de colisão entre 20 e 30 eV.

Com a aquisição dos espectros de HRMS/MS dos compostos isolados, foi possível observar dois perfis de fragmentação distintos para o grupo de compostos estudados. Assim, a discussão sobre a fragmentação dos compostos será separada por similaridade estrutural entre os compostos **3** e **4** e entre os compostos **5**, **6** e **7**.

Figura 15. Estrutura dos compostos 4-desbromo-oroidina (**3**), himenidina (**4**) 4-desbromougibohlina (**5**), 5-desbromougibohlina (**6**) e monobromoisofakelina (**7**).



2.4.2 Análise perfil de fragmentação por MS/MS de 4-desbromo-oroidina (**3**) e himenidina (**4**)

Os compostos **3** e **4** são isômeros, com fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{BrN}_5\text{O}$. A inspeção manual dos espectros de HRMS/MS para os compostos **3** e **4** (Figuras A47-A48, Apêndice) mostrou que os mesmos íons fragmentos são observados para ambos compostos (Tabela 7). A Figura 16 apresenta a árvore de fragmentação de **3** construída com dados experimentais de HRMS/MS no software Sirius 4.17.

A árvore de fragmentação de **3** sugere que a fragmentação do composto gera primeiramente os íons m/z 214 (**A**), m/z 172 (**B**) e m/z 139 (**C**) (Figura 17). O fragmento **A** é formada a partir das perdas de NH_3 e Br^\cdot . A clivagem da ligação amida de **3** é responsável pela formação de **B** e **C**. O íon fragmento m/z 139 (**C**) pode se fragmentar de duas maneiras distintas (Figura 18): a perda de NH_3 promove a formação do íon fragmento m/z 122 (**D**); já a perda de CH_3N é a responsável pela formação do íon fragmento m/z 110 (**E**). A decomposição do fragmento m/z 122 (**D**) forma os íons fragmentos m/z 96 (**F**) e m/z 80 (**G**) (Figura 19): A formação do íon fragmento m/z 96 (**F**) ocorre pela perda de C_2H_2 ; enquanto que a perda de CH_2N_2 promove a formação do íon m/z 86 (**G**).

Figura 16. Árvore de fragmentação para o composto 3.

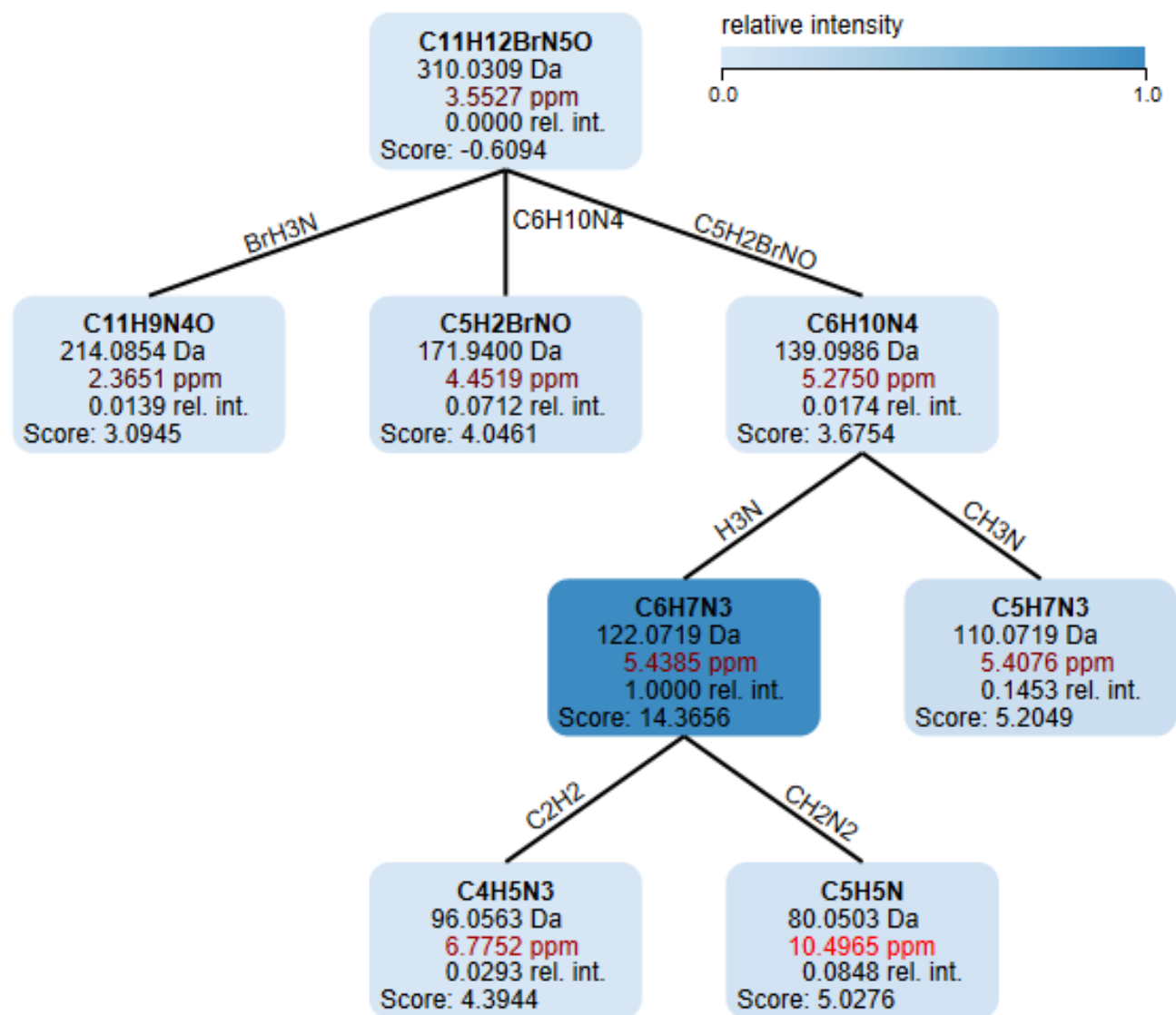


Tabela 7. Íons observados nos espectros MS/MS dos alcaloides 4-desbromo-oroidina (**3**) e himenidina (**4**).

Íon fragmento	Fórmula	3			4		
		Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)	Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)
A [M + H - Br - (NH ₃)] ²⁺	C ₁₁ H ₁₀ N ₄ O ⁺	214,0853	1,87	2,76	214,0846	-1,40	1,56
B [M + H - (C ₆ H ₁₀ N ₄)] ⁺	C ₅ H ₃ BrNO ⁺	171,9397	2,33	10,15	171,9394	0,58	8,11
		173,9377	2,87	9,80	173,9375	1,72	7,75
C [M + H - (C ₅ H ₂ NOBr)] ⁺	C ₆ H ₁₁ N ₄ ⁺	139,0982	2,88	2,76	139,0982	2,88	2,74
D (C - NH ₃)	C ₆ H ₈ N ₃ ⁺	122,0718	4,10	100,00	122,0716	2,46	100,00
E (C - CH ₃ N)	C ₅ H ₈ N ₃ ⁺	110,0718	4,54	18,55	110,0717	3,63	17,15
F (C - C ₂ H ₅ N)	C ₄ H ₆ N ₃ ⁺	96,0562	6,25	4,43	96,0561	5,21	4,75
G (C - CH ₅ N ₃)	C ₅ H ₆ N ⁺	80,0502	8,74	11,28	80,0500	6,25	12,76

Figura 17. Íons fragmento **A**, **B** e **C** gerados a partir de **3**.

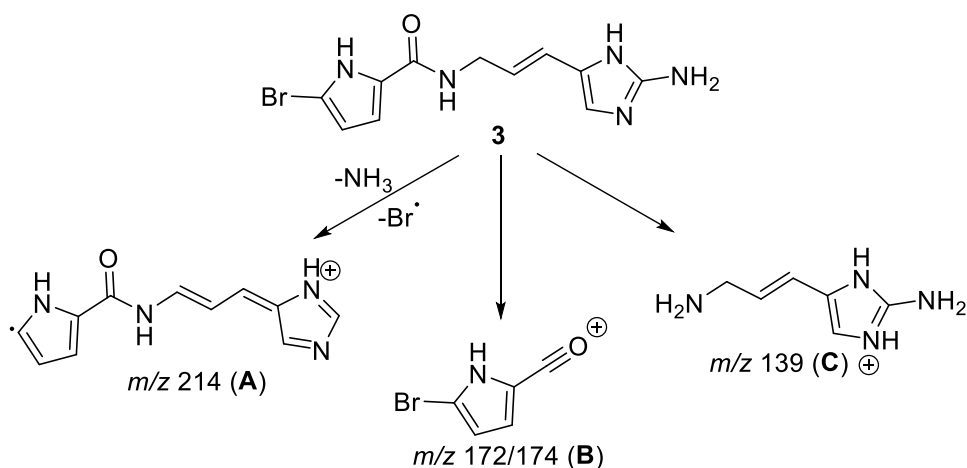


Figura 18. Formação dos íons fragmento **D** e **E** a partir de **C**.

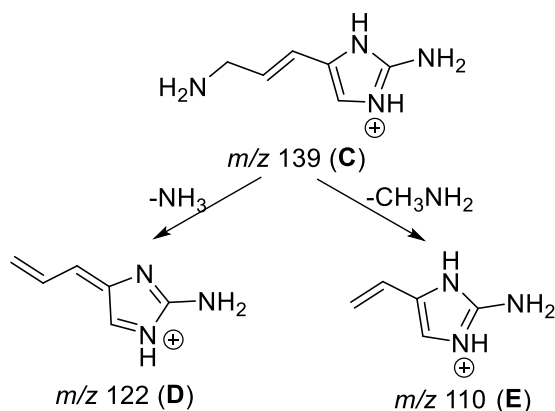
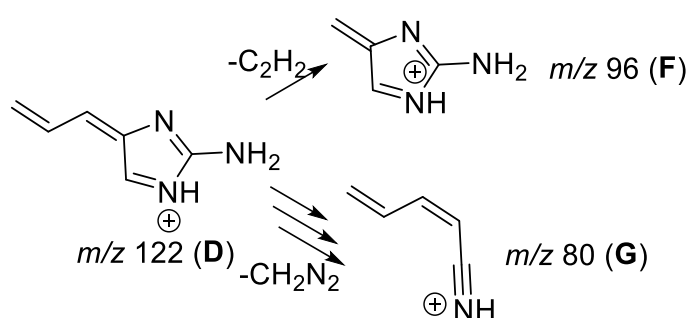


Figura 19. Formação dos íons **F** e **G** a partir de **D**.



2.4.3 Análise perfil de fragmentação por MS/MS de 4-desbromougibohlina (**5**), 5-desbromougibohlina (**6**) e monobromoisofakelina (**7**)

Os compostos **5-7** são isômeros de fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{BrN}_5\text{O}$ previamente conhecida. A inspeção manual dos espectros de HRMS/MS para os compostos **5-7** (Figuras A49-52, Apêndice) mostrou que os mesmos íons fragmentos

são observados para os três compostos (Tabela 8). A Figura 23 apresenta a árvore de fragmentação de **6** construída pelo Sirius 4.17 utilizando os dados experimentais.

A árvore de fragmentação para o composto **6** (Figura 23) sugere a formação dos íons m/z 293 (**A**), m/z 231 (**B**) e m/z 230 (**C**) através das perdas de NH_3 , Br^\bullet e HBr , respectivamente. O íon fragmento **A** pode se decompor em três íons fragmentos distintos m/z 265 (**D**), m/z 250 (**E**) e m/z 214 (**F**), através das perdas de CHN , CH_2N_2 e Br^\bullet , respectivamente (Figura 21). O íon fragmento de **E** pode perder Br^\bullet ou HBr e formar os íons fragmentos m/z 172 (**H**) e m/z 171 (**I**), os quais posteriormente eliminar CO e formar os íons fragmentos m/z 144 (**J**) e m/z 143 (**K**) (Figura 21). O fragmento **B** pode perder CH_2N_2 , formando o íon fragmento m/z 189 (**L**) (Figura 22). Embora a árvore de fragmentação sugira a formação do íons fragmento m/z 174 pela perda de CH_3 , a estrutura proposta para o fragmento **L** não sugere nenhuma metila facilmente removível. Acredita-se que esse íon seja apenas oriundo do perfil isotópico do muito intenso íon fragmento m/z 172 (**H**) (Figura A51, Apêndice). O fragmento **C** pode perder CH_2N_2 , formando o íon fragmento m/z 188 (**M**) (Figura 22).

Figura 20. Rota de formação dos fragmentos **A**, **B** e **C** a partir de **6**.

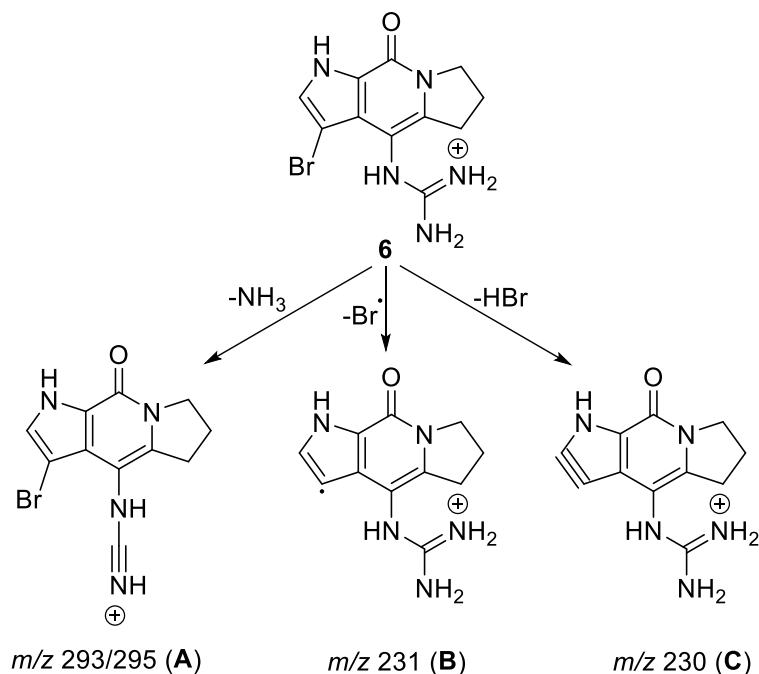


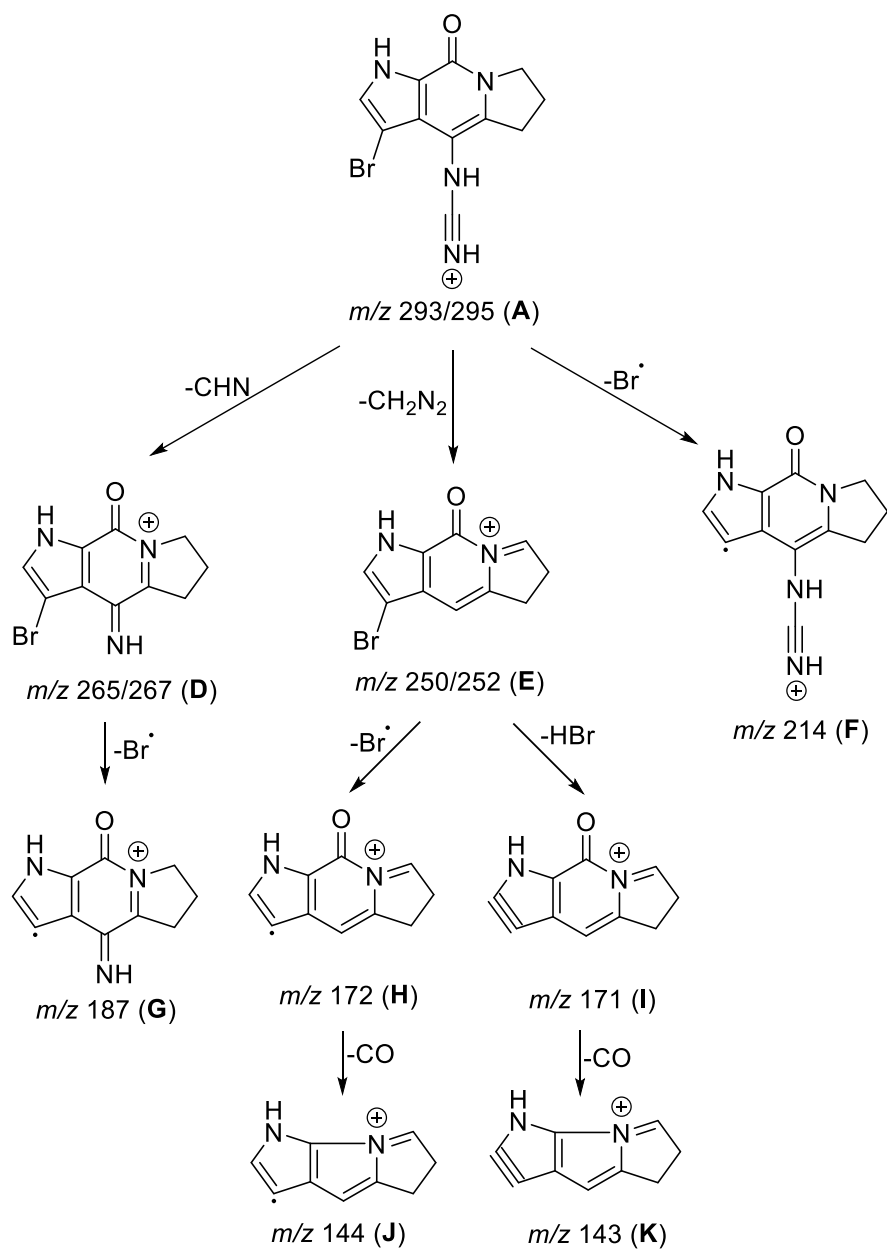
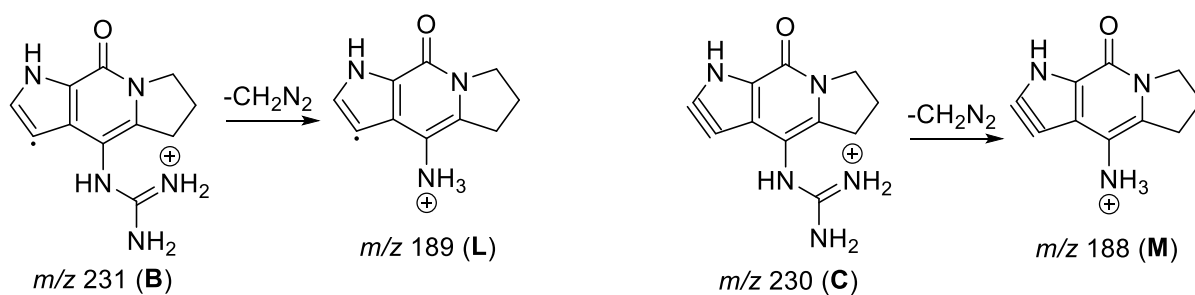
Figura 21. Formação dos fragmentos **D-K** a partir de **A**.Figura 22. Formação dos fragmentos **L** e **M** a partir de **B** e **C**, respectivamente.

Figura 23. Árvore de fragmentação para o composto 6.

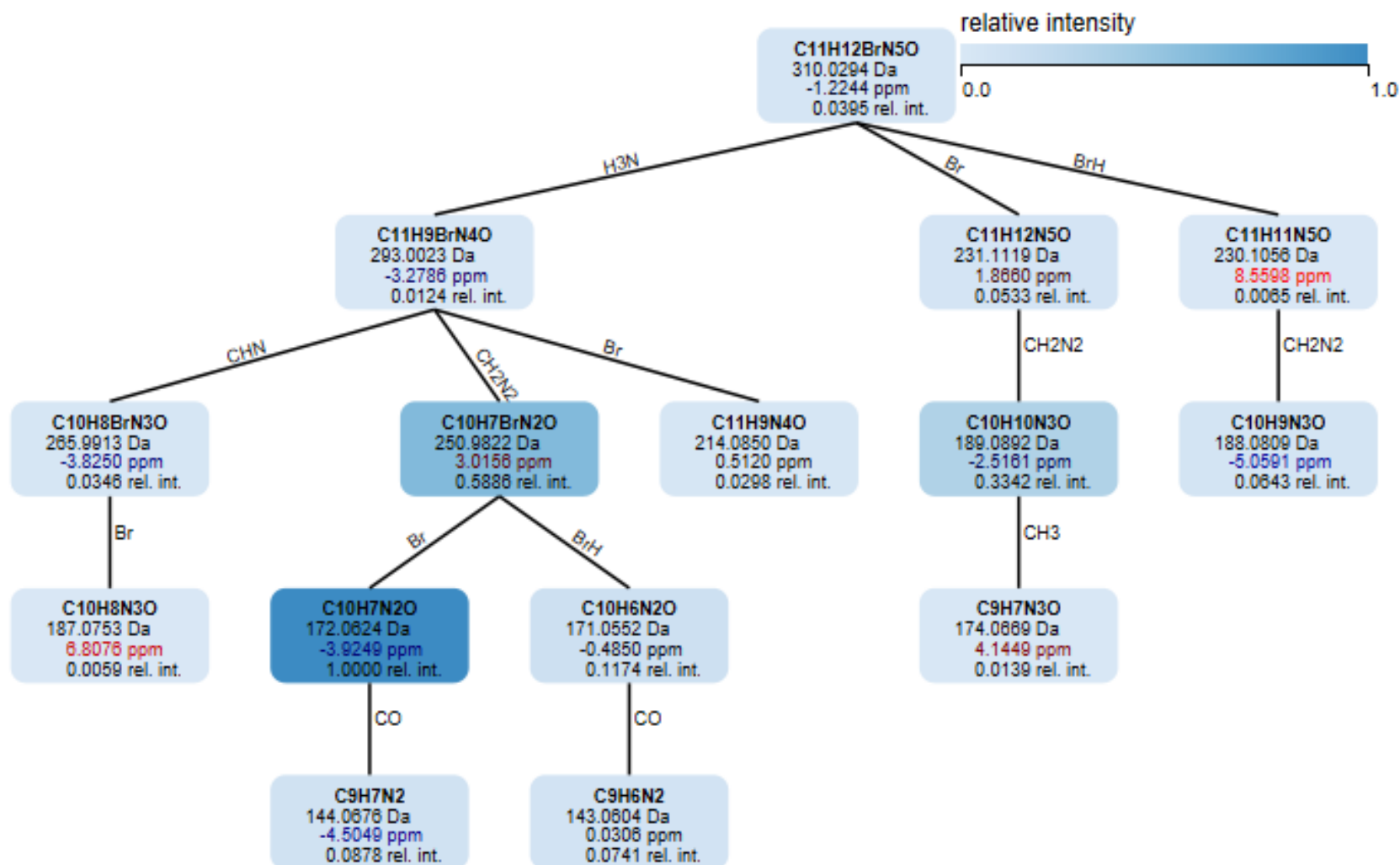


Tabela 8. Íons observados nos espectros MS/MS dos compostos 4-desbromougibohlina (**5**), 5-desbromougibohlina (**6**) e monobromoisofakelina (**7**) no modo positivo.

Íon fragmento	Fórmula	5			6			7		
		Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)	Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)	Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)
A [M + H - (NH ₃)] ⁺	C ₁₁ H ₁₀ BrN ₄ O ⁺	293,0038	2,05	6,67	293,0030	-0,68	2,49	293,0025	-2,39	2,41
		295,0020	2,71	6,97	295,0012	0,00	2,53	295,0010	-0,68	2,44
B [M + H - (Br [•])] ⁺⁺	C ₁₁ H ₁₃ N ₅ O ⁺⁺	231,1126	4,76	0,19	231,1115	0,00	8,50	231,1116	0,43	8,31
C [M + H - (HBr)] ⁺	C ₁₁ H ₁₂ N ₅ O ⁺⁺	230,8926	2,60	0,11	230,1038	0,87	1,21	230,1031	-2,17	1,17
D [A - (CHN)] ⁺	C ₁₀ H ₉ BrN ₃ O ⁺	265,9932	3,01	5,23	265,9921	-1,13	5,57	265,9919	-1,88	4,81
		267,9937	12,69	6,45	267,9933	11,19	6,91	267,9935	11,94	6,17
E [A - (CH ₂ N ₂)] ⁺	C ₁₀ H ₈ BrN ₂ O ⁺	250,9823	3,19	86,81	250,9813	-0,79	67,01	250,9817	0,79	66,04
		252,9803	3,56	89,06	252,9794	0,00	68,37	252,9797	1,19	69,31
F [A - (Br [•])] ⁺⁺	C ₁₁ H ₁₀ N ₄ O ⁺⁺	214,0854	2,33	8,23	214,0848	-0,47	4,76	214,0846	-1,40	4,60
G [D - (Br [•])] ⁺⁺	C ₁₀ H ₉ N ₃ O ⁺⁺	187,0746	3,21	1,37	187,0731	-4,81	1,11	187,0742	1,09	1,37

H [E - (Br [•])] ^{•+}	C ₁₀ H ₈ N ₂ O ^{•+}	172,0637	3,49	100,00	172,0630	-0,58	100,00	172,0632	0,58	100,00
I [E - (HBr)] ⁺	C ₁₀ H ₇ N ₂ O ⁺	171,0560	4,09	17,19	171,0551	-1,17	14,18	171,0554	0,58	15,11
J [H - (Br [•])] ^{•+}	C ₉ H ₈ N ₂ ^{•+}	144,0685	2,08	11,65	144,0680	-1,39	11,24	144,0678	-2,78	11,90
K [I - (Br [•])] ^{•+}	C ₉ H ₇ N ₂ ^{•+}	143,0607	2,09	8,40	143,0603	-0,70	8,12	143,0605	0,70	8,70
L [B - (CH ₂ N ₂)] ^{•+}	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ^{•+}	189,0902	2,64	6,57	189,0895	-1,06	32,21	189,0898	0,53	32,60

2.4.4 Considerações sobre as propostas de fragmentações

Os isômeros lineares (**3** e **4**) apresentam espectros MS/MS muito distintos dos isômeros cíclicos (**5-7**). Essas distinções são estruturalmente justificáveis. A fragmentação de **3** e **4** se caracteriza pela clivagem da ligação amida (fragmentos B e C, Figura 17) e subsequentes decomposições a partir desses íons, formando fragmentos com baixa massa molecular (fragmentos D-G, com m/z entre 122-80, Figuras 18 e 19). Enquanto que as fragmentações de **5-7** têm como característica perdas clássicas de compostos guanidínicos (BERLINCK, 1995; NIKOLIĆ, 2017; (NIKOLIĆ et al., 2012; KIND; FIEHN, 2017), como perdas de CH_2N_2 (fragmentos E, L e M, Figuras 21 e 22), mantendo a estrutura base do composto intacta, com exceção da perda de CO (fragmentos J e K, Figura 21), gerando com fragmentos com massa molecular maior (fragmentos F-M, com m/z entre 214-143, Figuras 21 e 22).

Vários íons fragmentos propostos são radicalares. Isso é incomum de se observar em estudos de fragmentações por ESI-MS/MS. No entanto, há alguns relatos de íons fragmentos radicalares na literatura, provenientes de variados esqueletos carbônicos diferentes (CAI *et al.*, 2018; NIKOLIĆ, 2017), inclusive com algumas das propostas corroboradas por cálculos teóricos (VESSECCHI *et al.*, 2011). Outros aspectos que conferem segurança às proposições é o baixo erro de massa dos íons fragmentos descritos e a existência de bromo nas estruturas dos compostos a partir das quais os íons fragmentos foram formados.

Esse foi o primeiro estudo sistemático sobre fragmentação por MS/MS dos compostos **3-7**. Esses resultados podem auxiliar na desreplicação dos compostos estudados e/ou identificação da classe de compostos, servir como base para estudos de fragmentação de outros esqueletos da classe dos imido e guanido-bromopirrólicos, além de ser ferramenta que auxilia para prospecção por LC-MS/MS de diferentes esqueletos de carbono dessa classe. Além de auxiliar na criação de uma biblioteca *in-house* de compostos para o grupo QOSBio.

2.5 CONCLUSÕES

O estudo de fragmentação por MS/MS de alcalóides bromopirrólicos possibilitou a discriminação dos esqueletos base dos monômeros da classe, diferenciando os esqueletos himenidínicos e isofakelínico/ugibohlínicos. As

ferramentas de processamento para criação de árvores de fragmentação e atribuição de estruturas a picos em espectros MS/MS reais se mostraram úteis na racionalização das rotas de fragmentação de cada esqueleto carbônico analisado. Esse estudo de fragmentação possibilita maior grau de confiança para anotações dos compostos bromopirrólicos estudados em análises metabolômicas por LC-MS².

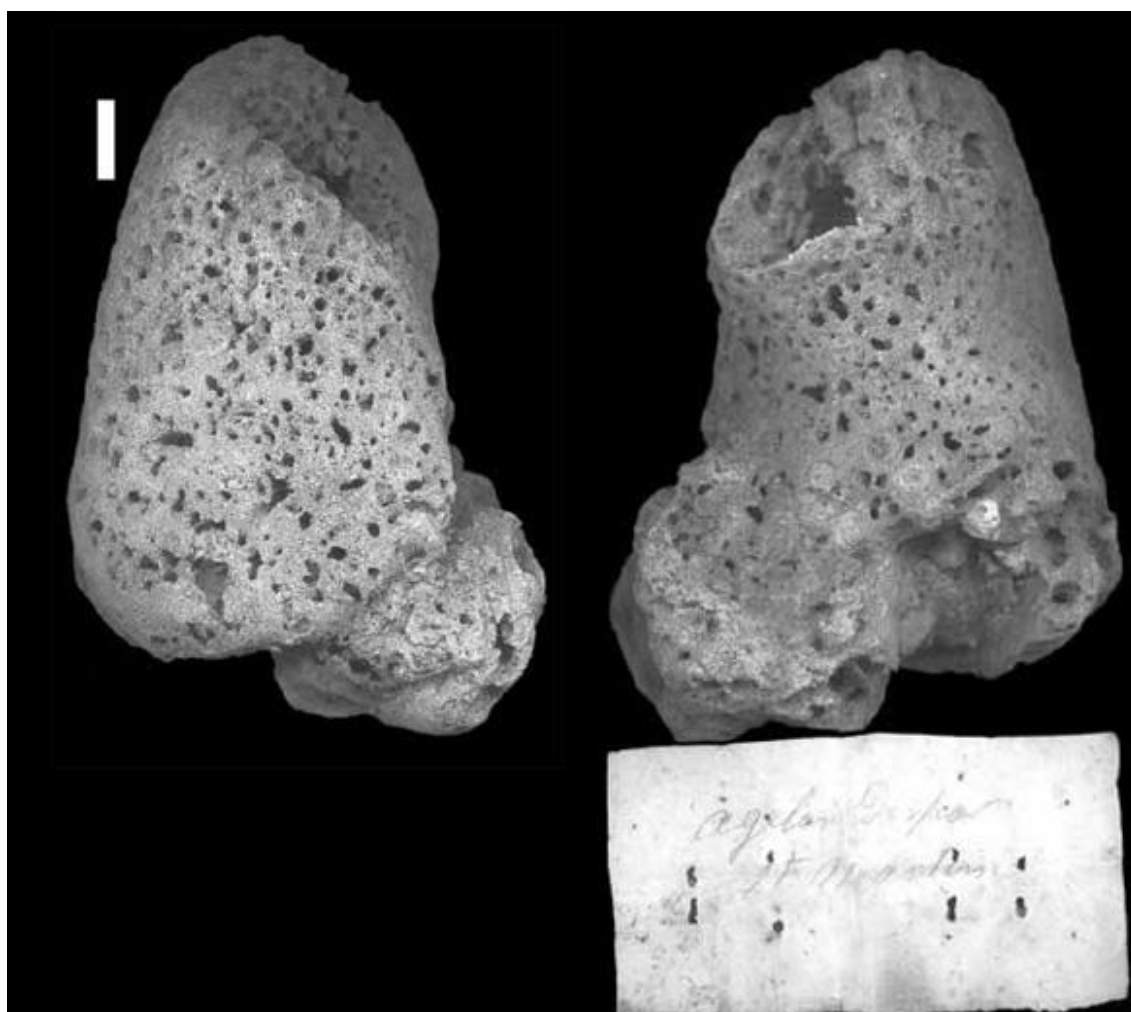
CAPÍTULO 3 – ESTUDO QUÍMICO DA ESPONJA MARINHA *Agelas dispar*

3.1 INTRODUÇÃO

3.1.1 Metabólitos secundários isolados a partir de *Agelas dispar*

A espécie de esponja marinha *Agelas dispar* (Figura 24) foi descrita pela primeira vez por Duchassaing e Michelotti em 1864 (van Soest et al, 2021). Pertencente ao filo Porifera, classe Demospongiae, sub-classe Heteroscleromorpha, ordem Agelasida e família Agelasidae, a espécie *Agelas dispar* possui distribuição geográfica entre a Bahamas, mar do Caribe, e o Brasil.

Figura 24. Imagem do holótipo *Agelas dispar* vista por lados opostos.



FONTE: van Soest, 2011. WoRMS

A química da esponja *Agelas dispar* foi estudada pela primeira vez por Cafieri e colaboradores (1996). Os pesquisadores isolaram os compostos inéditos dispacamida e monobromodispacamida (Figura 25) de quatro espécies diferentes de *Agelas*: *A. dispar*, *A. clathrodes*, *A. longissima* e *A. conifera*. Ambos compostos foram inativos quando testados como agentes anticolinérgicos e antiserotonérgicos, mesmo em concentrações na ordem de milimolar. No entanto, a dispacamida exibiu uma atividade antihistamínica reversível na concentração de 3 μM (CAFIERI *et al.*, 1996).

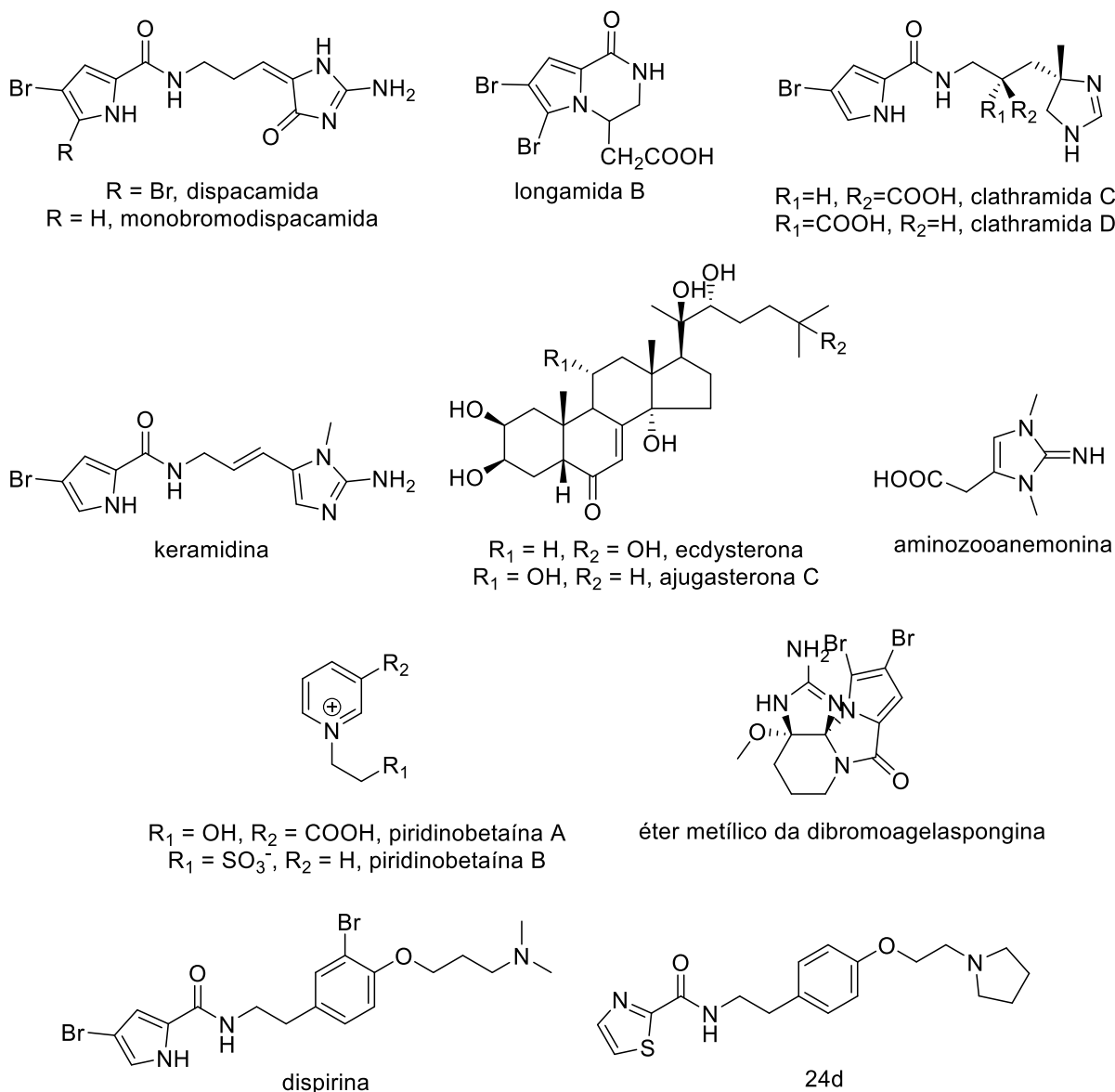
Cafieri e colaboradores (1998b) publicaram uma investigação mais detalhada sobre *A. dispar*, descrevendo o isolamento dos compostos inéditos longamida B, clathramida C e clathramida D, além dos compostos já conhecidos keramadina, ecdysterona e ajugasterona C (Figura 25). Os compostos longamida B e keramadina apresentaram moderada atividade antibacteriana com MIC em torno de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra *Bacillus subtilis* (ATCC #6633) e *Staphylococcus aureus* (ATCC #6538). Os compostos clathramida C e D não apresentaram atividade antibacteriana para as linhagens acima mencionadas. No entanto, apresentaram atividade contra o fungo *Aspergillus niger* em que 100 μg da mistura dos dois compostos causou uma zona de inibição de quase 7 mm no teste de difusão em disco de ágar (CAFIERI; FATTORUSSO; TAGLIALATELA-SCAFATI, 1998b).

O isolamento de três betaínas inéditas foi reportado por Cafieri e colaboradores (1998a), sendo os compostos aminozooanemonina, piridinobetaínas A e B (Figura 25). Os três compostos foram testados contra as bactérias Gram-positivas *Bacillus subtilis* (ATCC #6633) e *Staphylococcus aureus* (ATCC #6538) e contra a bactéria Gram-negativa *Salmonella typhi* (ATCC #19430). O composto aminozooanemonina apresentou atividades de 2,5 e 8,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra *B. subtilis* e *S. aureus*, respectivamente, enquanto que o composto piridobetaína A apresentou atividades de 3,5 e 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra *B. subtilis* e *S. aureus*, respectivamente (CAFIERI; FATTORUSSO; TAGLIALATELA-SCAFATI, 1998a).

Os compostos inéditos dispirina e éter metílico da dibromoagelaspongina (Figura 25) foram isolados de *A. dispar* (PIÑA *et al.*, 2007). A atividade antagonista da dispirina nos receptores adrenérgicos, adren $\alpha 1\text{D}$ e adren $\alpha 2\text{A}$, e histamínicos H2 e H3 foi testada e apresentou IC_{50} de 0,56, 0,18, 1,25 e 2,35 μM com K_i de 0,27, 0,07, 1,02 e 1,04 μM , respectivamente (KENNEDY; BROGAN; LINDSLEY, 2008). Foram realizadas sínteses de diversos análogos não naturais da dispirina, resultando em um

modelo de relação estrutura/atividade (SAR), e em um composto, 24d (Figura 25), com IC_{50} de $0,07 \mu\text{M}$ e um K_i de $0,03 \mu\text{M}$ (KENNEDY; CONN; LINDSLEY, 2009).

Figura 25. Compostos isolados de *Agelas dispar* e estrutura do análogo não natural da dispirina.



Fonte: Autoria Própria

3.1.2 Molecular networking

A diversidade química dos produtos naturais está diretamente associada com a alta variabilidade nas propriedades físico-químicas das substâncias, algo que torna a separação, a detecção e a identificação desafiadoras (BERLINCK *et al.*, 2019;

WOLFENDER *et al.*, 2015), especialmente quando trata-se de composto minoritários (BERLINCK *et al.*, 2019). Nesse contexto, a cromatografia líquida acoplada com a espectrometria de massas (LC-MS) permite a análise de misturas complexas, contribuindo com informações importantes como tempo de retenção, massa molecular do íon precursor e perfil de fragmentação. Muitos métodos quimioinformáticos para a análise de resultados de experimentos de LC-MS² têm sido desenvolvidos. Dentre eles, o *molecular networking* é destaque por ser uma abordagem computacional moderna para a identificação de similaridade estrutural entre compostos, inferido pela relação entre seus espectros MS/MS (FOX RAMOS *et al.*, 2019; MEDEMA; FISCHBACH, 2015; SCARPATO *et al.*, 2020).

O *molecular networking* se baseia na observação que moléculas estruturalmente similares compartilham similaridade nos padrões de fragmentação por MS/MS (YANG *et al.*, 2013). As redes moleculares são visualizações do espaço químico presente em experimentos de MS/MS. Essa abordagem se baseia em três etapas fundamentais (Figura 26): os espectros MS/MS são coletados; uma rede molecular é gerada usando um *cosine score*, que se trata de uma análise de similaridades entre os espectros MS/MS; análise manual do íon precursor e do perfil de fragmentação dos nodos conectados (WANG, M. *et al.*, 2016).

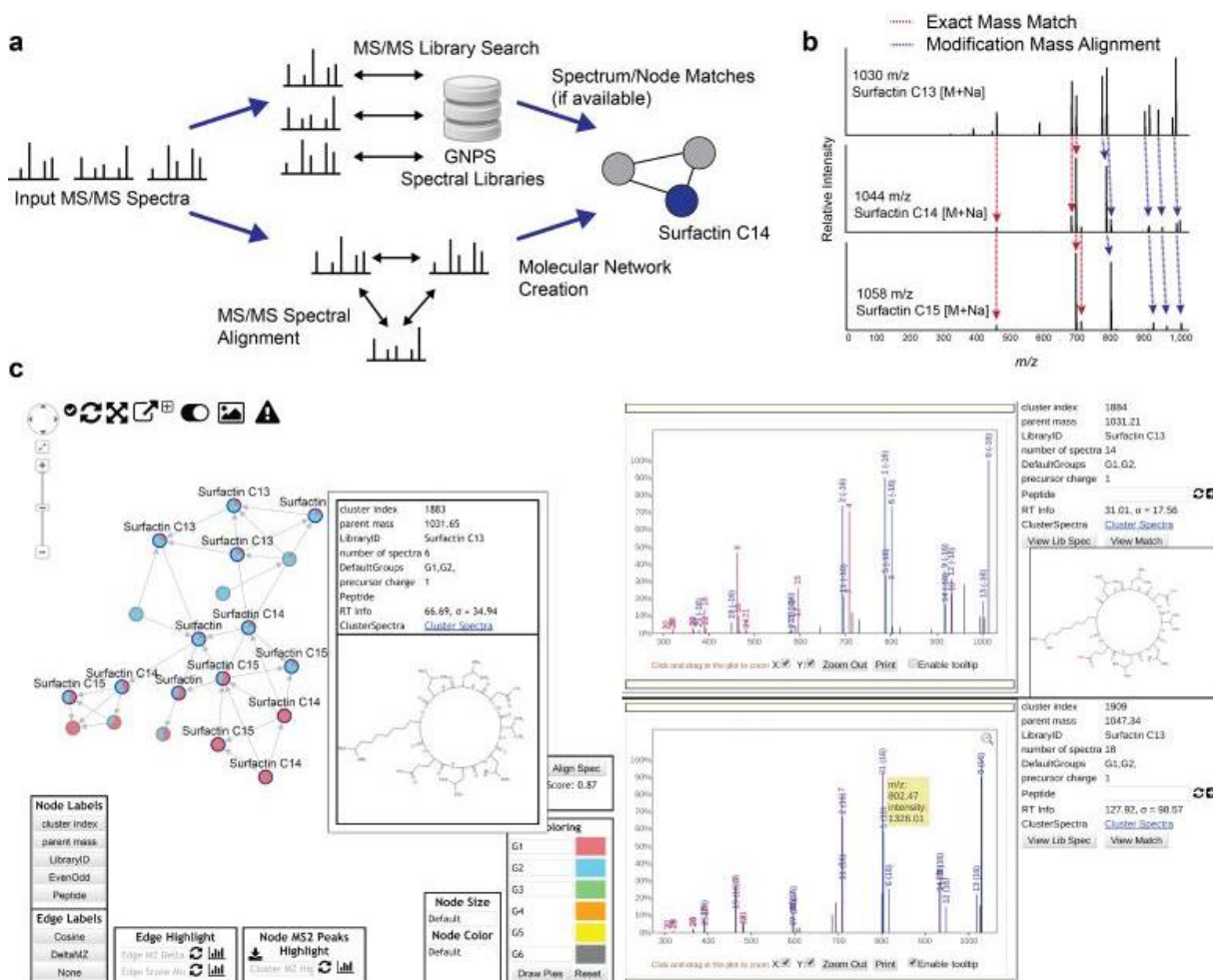
A plataforma *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS) permite analisar um conjunto de dados e compará-lo a todos os dados públicos disponíveis na plataforma. O GNPS proporciona o depósito e/ou reobtenção de conjuntos de dados públicos por meio do repositório de dados do *Mass Spectrometry Virtual Environment* (MassIVE). A infraestrutura de análise do GNPS possibilita a desreplicação *online*, análise automática por *molecular networking* e curadoria dos espectros MS/MS depositados (WANG, M. *et al.*, 2016).

Estudos anteriores mostraram uma melhora significativa nos resultados quando os dados de LC-MS² são pré-processados antes da geração da rede, usando ferramentas como o MZmine, OpenMS e MS-Dial (OLIVON, F. *et al.*, 2018; OLIVON, FLORENT *et al.*, 2017; SCARPATO *et al.*, 2020; WANG, Z. *et al.*, 2019). O *Feature-based molecular networking* (FBMN) é uma ferramenta presente na plataforma do GNPS que possibilita unir a capacidade bem estabelecida de softwares de pré-processamento com a análise de *molecular networking*. Com o uso de softwares de pré-processamento, o FBMN incorpora não somente informações de MS¹ como padrão isotópico e tempo de retenção, mas também separação por mobilidade iônica,

quando presente. No quesito de informação espectral processada, redes moleculares com FBMN podem (1) distinguir isômeros que produzem espectros MS² similares mas que são resolvidos por separações cromatográficas ou de mobilidade iônica, (2) facilita a anotação espectral, (3) incorpora a informação de quantidade relativa, o que torna análises estatísticas mais robustas. Enquanto no uso do *classical molecular networking* o usuário deve fazer a análise do *molecular networking* e análise dos espectros MS¹ separadas, o FBMN aceita um *output* de ferramentas de *feature detection* e *alignment*., tornando-os diretamente compatíveis com ferramentas de anotação (Figura 27) (NOTHIAS et al., 2020).

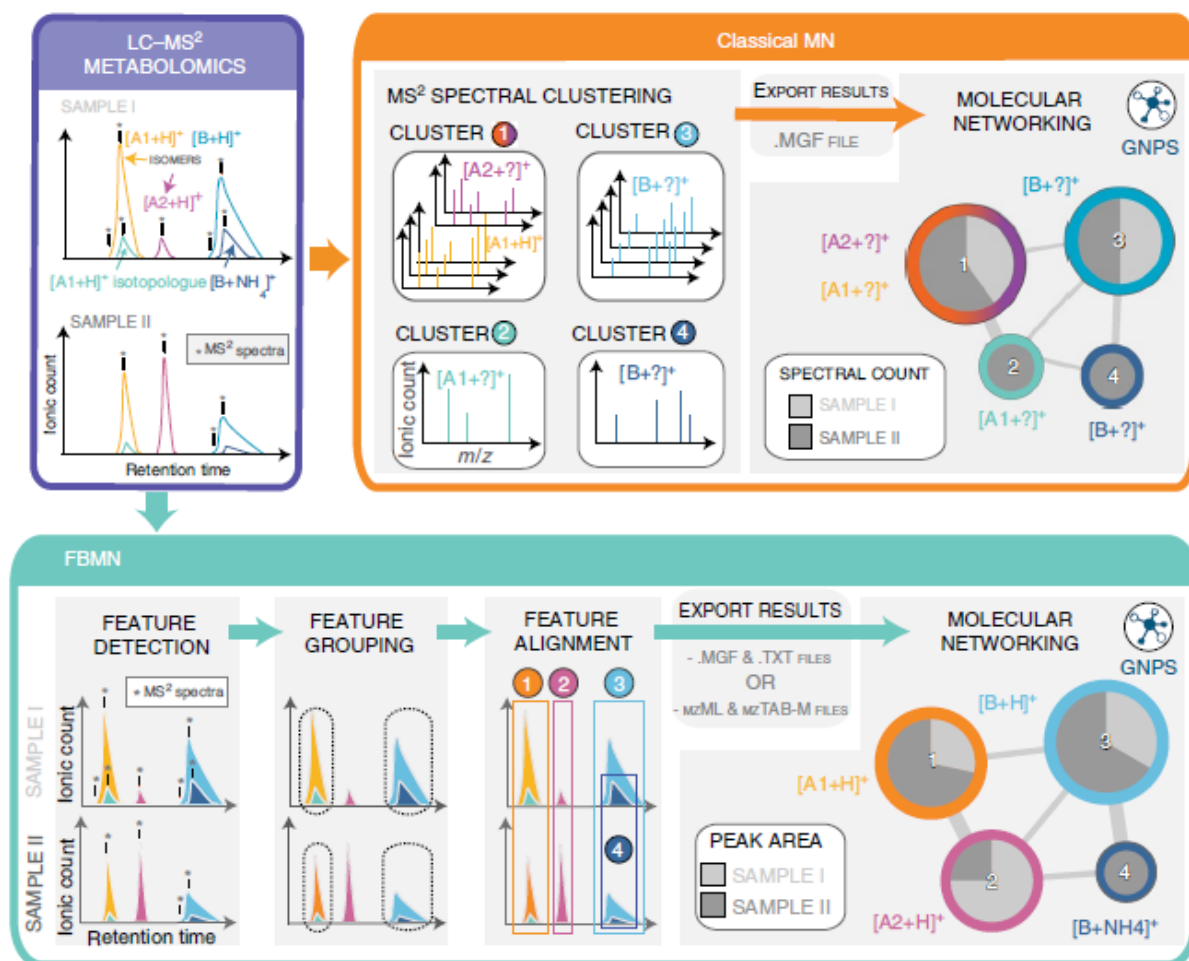
O FBMN foi utilizado por alguns grupos como ferramenta para guiar quimicamente o isolamento/identificação de compostos inéditos. O re-estudo químico da esponja marinha *Stylissa caribica* utilizando o FBMN revelou a presença de treze peptídeos nunca antes relatados na esponja (SCARPATO et al., 2020). O peptídeo majoritário isolado foi identificado como um heptapeptídeo inédito, a stilissamida L (SCARPATO et al., 2020). O estudo químico por FBMN da batata yacon, *Smallanthus sonchifolius*, possibilitou a identificação de três potenciais novos metabólitos, sendo o ácido 5-O-caffeoil-2,7-anidro-D-glicero-β-D-galacto-oct-2-ulopiranosônico isolado e completamente caracterizado, juntamente com outros oito ésteres de ácido cafeico (PADILLA-GONZÁLEZ et al., 2020). O estudo do chá verde Hangjinya por FBMN possibilitou o isolamento de uma nova neolignana, juntamente com outros quinze compostos conhecidos (WU et al., 2019). A análise por FBMN do cultivo pré-fracionado de três linhagens probióticas, *Bifidobacterium anamalis*, *B. longum* e *B. pseudolongum*, possibilitou a identificação de vinte e cinco novos peptídeos, sendo um deles sintetizado para a comprovação estrutural (CHEN et al., 2021). Diversos outros usos do FBMN já foram descritos, como para a anotação de derivados de phorbol como possíveis responsáveis pela atividade contra o vírus da Chikungunya (REMY et al., 2019), para anotação de marcadores químicos de espécies crípticas de *Sarcophyton glaucom* (MALONEY et al., 2020), anotação de marcadores químicos em preparados de ervas da Medicina Tradicional Chinesa (HOURIET et al., 2020) e para a visualização das mudanças do quimiotipo de matéria orgânica em água do mar da costa (PETRAS et al., 2021).

Figura 26. **a)** Redes moleculares são construídos pelo alinhamento dos espectros MS/MS. Os *edges*, ou linhas, que conectam os *nodes*, ou nodos (espectros MS/MS) são definidos por um esquema de *cosine score* o qual determina a similaridade de dois espectros MS/MS com um intervalo entre 0 (totalmente diferentes) a 1 (totalmente idênticos). Os espectros MS/MS também são pesquisados em uma biblioteca espectral do GNPS, propondo a identificação putativa de nodos na rede molecular. As redes podem ser visualizadas *online* ou usando um software externo, como o Cytoscape. **b)** Exemplo de alinhamento entre espectros MS/MS de compostos com modificações estruturais. **c)** Visualização *in-browser* da rede molecular permite o usuário explorar a rede molecular sem o uso de softwares externos.



FONTE: Adaptado de (WANG, M. *et al.*, 2016)

Figura 27. Métodos para a geração de redes moleculares a partir de dados de MS não-direcionados utilizando a plataforma do GNPS. *Classical molecular networking*, o qual pode ser gerado usando dado em formato *open source*, como mzXML, e sem pré-processamento dos dados. Para o FBMN o usuário deve utilizar o dado em formato *open source* e aplicar as ferramentas de *feature detection* e *alignment* anteriormente à submissão ao GNPS.



FONTE: Adaptada de (NOTHIAS et al., 2020)

3.2 OBJETIVOS

O objetivo desse capítulo foi o estudo químico da esponja marinha *Agelas dispar*, coletada em Fernando de Noronha, tendo como objetivos específicos a aplicação de ferramentas modernas de análise de dados de LC-MS², o isolamento e determinação estrutural e a avaliação da atividade biológica de alcalóides bromopirrólicos presentes no extrato da esponja.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Material Animal

A esponja marinha *Agelas dispar* foi coletada por um grupo colaborador, coordenado pelo Prof. Dr. Eduardo Hajdu, na Ilha do Meio em Fernando de Noronha-PE em 21 de abril de 2016, durante uma viagem de coleta de diversas esponjas. A coleta foi realizada por mergulho autônomo. O espécime foi identificado pelos Dr. André Bispo e Dr.^a Sula Salani. Um voucher do espécime foi depositado no Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob o número de registro MNRJ 20217.

3.3.2 Extração e fracionamento do extrato da esponja marinha *Agelas dispar*

Cerca de 1150 g da esponja marinha *Agelas dispar* coletada foi imediatamente preservada em EtOH 96%. No laboratório, a esponja foi retirada do EtOH e extraída exaustivas vezes com MeOH. Os extratos EtOH e MeOH foram reunidos e secos, gerando o extrato bruto (M4). O extrato bruto foi então ressuspendido em MeOH e particionado com hexano (3 x 500 mL). A fração MeOH foi evaporada, ressuspendida e particionada entre AcOEt:H₂O (3 x 500 mL). A fração AcOEt resultante (M4A) foi seca e resultou em 12 g da fração. A fração M4A foi separada em doze partes de 1 g cada, as quais foram submetidas a separação usando colunas pré-empacotadas de 10 g com fase estacionária C₈. A fase móvel utilizada foi 0,5% de TFA em água Milli-Q (A) e 0,5% de TFA em MeOH (B). Foram utilizados 150 mL de fase móvel por fração coletada em cada separação, sendo as frações coletadas nas seguintes proporções: 100:0 de A:B (M4A1, massa total da fração: 1,2 g), 75:25 de A:B (M4A2, massa total da fração: 3,2 g), 50:50 de A:B (M4A3, massa total da fração: 3,8 g), 25:75 de A:B (M4A4, massa total da fração: 1,9) e 0:100 (M4A5, massa total da fração: 2,2 g). As frações M4A2-M4A4 foram submetidas, separadamente, à cromatografia de permeação em gel com Sephadex LH-20 e eluídas com MeOH. A fração M4A2 resultou em 9 frações (M4A2A-M4A2I, massa total das frações: 3,2 g), enquanto que a fração M4A3 resultou em 22 frações (M4A3A-M4A3V, massa total das frações: 4,0 g) e a fração M4A4 resultou em 32 frações (26 de M4A4A-M4A4Z e 6 frações de M4A4A2-M4A4F2, massa total das frações: 1,4 g).

3.3.3 Análise das frações de M4A2-M4A4 por UPLC-QToF-MS/MS

Todas as 63 frações geradas a partir do fracionamento das frações M4A2-M4A4 por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 foram analisadas em um UPLC-QToF-MS. As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido Waters® Acquity UPLC H-class acoplado com um espectrômetro de massas Waters® Xevo® G2-XS Q-ToF com interface *electrospray*. A coluna foi uma C₁₈ BEH (2,1 X 50,0 mm, 1,7 µm; Waters) foi mantida à 40°C. Os solventes grau MS utilizados foram: 0,1% de ácido fórmico em água (A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (B). O gradiente de eluição utilizado foi de 9:1 para 2:8 de A:B em 4,0 min, de 2:8 para 9:1 de A:B em 0,1 min e um condicionamento mantendo 9:1 de A:B por 0,9 min, totalizando 5 min de análise com vazão de 0,5 mL min⁻¹. O volume de injeção foi de 4 µL de uma solução 1,0 mg mL⁻¹, mantida à 15 °C. As condições do ESI foram: voltagem do capilar de 1,2 kV, voltagem do cone de 30 V, temperatura da fonte em 100 °C, temperatura de dessolvatação em 450 °C, vazão no cone de gás em 50 L h⁻¹ e vazão do gás de dessolvatação em 750 L h⁻¹. Para calibração interna foi infundida uma solução de leucina-encefalina 200 pg mL⁻¹ pela sonda de *lock-mass* com vazão de 10 µL min⁻¹ em intervalos de 20 s, scan de 0,1 s e com aplicação de correção em tempo real. Os dados foram adquiridos em modo de aquisição dependente de dados (DDA), positivo, centróide, resolução, tempo de aquisição de 5 min, faixa de *m/z* 50-2000, tempo de scan no MS de varredura e nos MS/MS de 0,2 s, MS *threshold* de 50.000 de intensidade s⁻¹, 3 MS/MS por MS de varredura, habilitada a exclusão de massa com diferença entre ± 10 ppm para MS/MS em tempo real por 3 s, para MS/MS foi utilizada uma rampa de energia de colisão iniciando de 10-30 eV para a menor massa (*m/z* 50) indo até 30-50 eV para a maior massa (*m/z* 2000) (média: *m/z* 1025 com energia de colisão de 20-40 eV).

3.3.4 Pré-processamento dos dados de LC-MS² empregando MZmine

Os dados adquiridos das 63 frações em modo DDA foram convertidos utilizando o *software* MSConvert, pré-processados empregando o *software* MZmine para posterior geração do rede molecular utilizando a plataforma *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS) e visualização dos dados utilizando o *software* Cytoscape.

A primeira etapa foi a conversão dos dados utilizando o MSConvert onde os dados brutos .raw foram convertidos para .mzXML, com *binary encoding precision* 32-bit, *write index* e o filtro *peak picking* aplicado com algoritmo *Vendor MS levels* 1-2. Para o pré-processamento dos dados utilizando MZmine versão 2.51 foi realizado o *mass detection* para a função MS¹ (*centroid; noise level* $1,0 \times 10^4$) e para a função MS² (*centroid; noise level* $1,0 \times 10^3$), o cromatograma foi contruído utilizando a função *ADAP Chromatogram builder* (*retention time* 0,50-3,20 min; *MS level* 1; *Min group size in # of scans* 2; *Group highest intensity* $1,0 \times 10^3$; *Min height* $5,0 \times 10^4$; *m/z tolerance* 0,005 *m/z* or 20,0 ppm), a deconvolução cromatográfica foi realizada (*Baseline cut-off: Min height* $5,0 \times 10^4$, *Peak duration range* 0,01-1,50 min, *Baseline level* 0; *center calculation* auto; *m/z range for MS² scan pairing* 0,5 Da; *RT range for MS² scan pairing* 0,1 min) e o agrupamento isotópico usando a função *Isotopic peak grouper* (*m/z tolerance* 0,005 *m/z* or 20,0 ppm; *Retention time tolerance* 0,5 min; *maximum charge* 3; *representative isotope: most intense*). Posteriormente os dados foram reunidos utilizando a função *join aligner* (*m/z tolerance* 0,005 *m/z* or 20,0 ppm; *weight for m/z*: 75; *retention time tolerance* 0,5 min; *weight for RT*: 25), filtrado utilizando a função *feature list rows filter* (*m/z* 150-2000; *keep rows that match all criteria; keep only peaks with MS² scan*) e os íons foram buscados nos dados brutos usando a função *peak finder* (*intensity tolerance* 90%; *m/z tolerance* 0,00 *m/z* or 5,0 ppm; *Retention time tolerance* 0,1 min). A *feature list* gerada após a etapa do *peak finder* foi exportada usando a função *Export for/Submit to GNPS*, gerando um arquivo .mgf para os espectros MS² e um arquivo .csv para os dados quantitativos.

3.3.5 Construção e visualização da rede molecular

Os arquivos .mgf, .csv e um metadafile construído (.tsv) foram carregados no servidor do GNPS utilizando o *FTP Filezilla*. Foi construída uma rede molecular utilizando a ferramenta *Feature-Based Molecular Networking* (FBMN) presente na plataforma do GNPS. Os parâmetros utilizados para gerar a rede foram: tolerância de massa do íon precursor 0,02 Da, tolerância de massa do íon fragmento 0,02 Da. A rede molecular foi criada com as linhas com *cosine score* superior a 0,7 e mais de 6 picos correspondentes. As linhas entre dois nodos foram mantidas na rede quando ambos os nodos apareceram entre os 10 nodos mais similares um do outro. O tamanho máximo de uma família molecular foi definido em 100. O modo de busca de

análogos foi usado buscando espectros MS/MS com uma diferença máxima de 500 do valor do íon precursor. A biblioteca espectral foi filtrada da mesma forma que os dados inseridos. O DEREPLICATOR foi usado para anotar espectros MS/MS. Após a rede ser criada, foi realizado o download do *Cytoscape Data*.

No *software* Cytoscape versão 3.7.2 foi importado o arquivo .graphml utilizando a função *Import Network from File System*. Os nodos foram coloridos em formatos de gráfico de pizza segundo sua fração de origem, M4A2 vermelho, M4A3 amarelo e M4A4 azul. O formato circular do nodo foi utilizado para todos os compostos não identificados na busca automática na biblioteca do GNPS enquanto que os nodos retangulares são os nodos identificados com os compostos presentes na biblioteca do GNPS.

3.3.6 Criação das bibliotecas *in-house* e *in-silico*

3.3.6.1 Biblioteca *in-house*

Análises dos alcalóides bromopirrólicos, nomeadamente 4-desbromo-oroidina (**3**), himenidina (**4**) 4-desbromougibohlina (**5**), 5-desbromougibohlina (**6**) e monobromoisofakelina (**7**), foram realizadas por UPLC-QToF-MS/MS em modo DDA com os mesmos parâmetros descritos no item 3.3.3. A identificação dos compostos nas amostras de *Agelas dispar* foi realizada manualmente por comparação de t_R e espectro MS/MS.

3.3.6.2 Biblioteca *in-silico*

A biblioteca *in-silico* foi criada usando a ferramenta de predição espectral do CFM-ID 3.0 (DJOUMBOU-FEUNANG *et al.*, 2019) para os compostos previamente isolados de *Agelas dispar*, nomeadamente dispacamida (massa exata: m/z 403,9353, m/z 405,9332 e m/z 407,9312), monobromodispacamida (massa exata: m/z 326,0248 e m/z 328,0227), longamida B (massa exata: m/z 350,8975, m/z 352,8954 e m/z 354,8934), clathramida C e D (massa exata: m/z 357,0557 e m/z 359,0537), keramadina (massa exata: m/z 324,0455 e m/z 326,0435), ecdysterona e ajugasterona C (massa exata: m/z 481,3160), aminozooanemonina (massa exata: m/z 170,0924), piridinobetaína A (massa exata: m/z 168,0656), piridinobetaína B (massa

exata: m/z 188,0376), dispirina (massa exata: m/z 472,0230, m/z 474,0210 e m/z 476,0189) e éter-metílico da dibromoagelaspongina (massa exata: m/z 417,9509, m/z 419,9488 e m/z 421,9468). O SMILES ou o InChI de cada composto foi submetido à ferramenta *Spectra Prediction* presente no CFM-ID 3.0. Espectros MS/MS de média energia (20 V) foram usados para gerar um arquivos .mgf. Os arquivos .mgf foram convertidos em .mzXML usando o software MSConvert 3.0. Os arquivos .mzXML foram visualizados usando o software MZmine 2.51. A correspondência espectral foi realizada manualmente, comparando o espectro *in-silico* com o espectro real do FBMN. A propagação de anotação foi realizada manualmente por comparação entre os espectros MS/MS real do composto anotado e *in-silico* e real dos nodos correlacionados.

3.3.7 Isolamento dos alcaloides bromopirrólicos do extrato MeOH da esponja *Agelas dispar*

3.3.7.1 Isolamento das ageliferinas (**8-10**)

A fração M4A4J (139,7 mg) foi separada por HPLC-UV utilizando-se uma coluna C₁₈ InertSustain (10,0 x 250,0 mm, 5 µm, GL Science), com fase móvel de H₂O + 0,5% de TFA (A) e MeCN:MeOH + 0,5% de TFA (B) no modo gradiente, diminuindo-se de 50-38,5% de A em 23 min, de 38,5-0% de A em 1 min, mantendo-se em 0% de A por 2 min, aumentando-se de 0-50% A em 1 min e mantendo-se 50% de A por 10 min, utilizando-se vazão de 4,0 mL min⁻¹ e detecção em λ de 270 nm e 290 nm, sendo coletadas sete frações (M4A4J1-M4A4J7, massa total das frações: 117,4 mg). A fração M4A4J6 (25,5 mg), coletada entre 17-22 min, foi separada por HPLC-UV usando coluna XBridge BEH amida (10,0 X 250,0 mm, 5 µm, Waters), com fase móvel de H₂O + 0,5% de TFA (A) e MeCN + 0,5% de TFA (B) no modo gradiente, mantendo inicialmente 8% de A por 15 min, aumentando-se de 8-50% de A em 1 min, mantendo-se em 50% de A por 2 min, reduzindo-se de 50-8% de A em 1 min e mantendo-se 8% de A por 10 min, utilizando-se vazão de 4,0 mL min⁻¹ e detecção de 270 nm e 315 nm, levando ao isolamento da dibromoageliferina (**8**, M4A4J6A, 15,5 mg), coletada entre 16,0-21,0 min. A fração M4A4J4 (18,9 mg), coletada entre 11,5-14,5 min, foi separada por HPLC-UV utilizando-se uma coluna XBridge BEH amida (10,0 X 250,0 mm, 5 µm, Waters), com fase móvel de H₂O + 0,5% de TFA (A) e MeCN + 0,5% de TFA (B) no

modo gradiente. Manteve-se inicialmente 6% de A por 22 min, aumentando-se de 6-50% de A em 1 min, mantendo-se em 50% de A por 3 min, reduzindo-se de 50-6% de A em 1 min e mantendo-se 6% de A por 10 min, utilizando-se uma vazão de 4,0 mL min⁻¹ e detecção de 270 nm e 315 nm, levando ao isolamento da bromoageliferina (**9**, M4A4J4A, 6,2 mg), coletada entre 15,0-20,0 min. A fração M4A4J2 (10,6 mg), coletada entre 8,5-10,0 min, foi separada por HPLC-UV usando coluna XBridge BEH amida (10,0 X 250,0 mm, 5µm, Waters), com fase móvel de H₂O + 0,5% de TFA (A) e MeCN + 0,5% de TFA (B) no modo gradiente. Manteve-se inicialmente 6% de A por 22 min, aumentando-se de 6-50% de A em 1 min, mantendo-se em 50% de A por 3 min, reduzindo-se de 50-6% de A em 1 min e mantendo-se 6% de A por 10 min, utilizando-se vazão de 4,0 mL min⁻¹ e detecção de 270 nm e 315 nm, levando ao isolamento da ageliferina (**10**, M4A4J2A, 2,3 mg), coletada entre 20,5-22,5 min.

3.3.7.2 Isolamento das nagelamidas H (**11**), H2/H3 (**12/13**) e citrinamina B (**14**)

A fração M4A4L (150,8 mg) foi por separada por HPLC-UV utilizando-se uma coluna XBridge BEH amida (10,0 X 250,0 mm, 5 µm, Waters), com fase móvel de H₂O + 0,5% de TFA (A) e MeCN + 0,5% de TFA (B) no modo gradiente. Manteve-se inicialmente 8% de A por 10 min, aumentando-se de 8-16% de A em 10 min, mantendo-se em 16% de A por 5 min, aumentando-se de 16-35% de A em 14 min, reduzindo-se de 35-8% de A em 1 min e mantendo-se 8% de A por 10 min, utilizando-se vazão de 4,0 mL min⁻¹ e detecção de 277 nm e 300 nm, sendo coletadas nove frações (M4A4L1-M4A4L9, massa total das frações: 150,7 mg). A fração M4A4L6 (9,6 mg), coletada em 25-27 min, foi separada por HPLC-UV utilizando-se coluna C₁₈ X-Terra (7,8 x 250,0 mm, 5 µm, Waters), com fase móvel H₂O (A), MeOH (B) MeCN (C) no modo gradiente. Alterou-se de 67:16:17 para 56:20:24 de A:B:C, utilizando-se vazão de 2,5 mL min⁻¹ e detecção em λ de 260 nm e 290 nm, levando ao isolamento de citrinamina B (**14**, M4A4L6A, 0,5 mg), nagelamidas H2 e H3 (**12/13**, M4A4L6B, 1,2 mg) e nagelamida H (**11**, M4A4L6C, 3,0 mg), sendo coletados entre 9,8-12,2 min, 15,8-19,5 min e 25,6-28,2 min, respectivamente.

3.3.7.3 Isolamento das dispirinas B-D (**15-17**)

A fração M4A3G (1,2 g) foi submetida a um fracionamento em coluna C₁₈ (15 g de fase estacionária) e eluída com gradiente de metanol (A) em água (B), ambas as fases acidificadas com 0,5% de ácido fórmico, sendo coletadas oito frações: 10:90 de A:B (M4A3GA, 39,3 mg), 20:80 de A:B (M4A3GB, 75,7 mg), 30:70 de A:B (M4A3GC, 670,4 mg), 35:65 de A:B (M4A4GD, 66,2 mg), 40:60 de A:B (M4A3GE, 106,3 mg), 45:55 de A:B (M4A3GF, 121,2 mg), 50:50 de A:B (M4A3GG, 286,4 mg) e 100:0 de A:B (M4A3GH, 20,6 mg). As frações M4A3GE (106,3 mg) e M4A3GF (121,2 mg) foram reunidas e separadas por HPLC-UV utilizando-se uma coluna XBridge BEH amida (10,0 x 250,0 mm, 5 µm, Waters), fase móvel de H₂O + 0,5% de TFA (A) e MeCN + 0,5% de TFA (B) no modo gradiente. Manteve-se inicialmente 8% de A por 10 min, aumentando-se de 8-16% de A em 10 min, mantendo-se em 16% de A por 5 min, aumentando-se de 16-28% de A em 7 min, reduzindo-se de 28-8% de A em 3 min e mantendo-se 8% de A por 10 min, utilizando-se vazão de 4,0 mL min⁻¹ e detecção de 277 nm e 300 nm, sendo coletadas treze frações (M4A3GEA-M4A3GEM, massa total das frações: 236,9 mg). A fração M4A3GEA (40,1 mg) foi separada por HPLC-UV utilizando-se uma coluna C₁₈ X-Terra (7,8 x 150,0 mm, 5 µm, Waters), com H₂O:MeCN + 0,5% de TFA (73:27), vazão de 2,5 mL min⁻¹ e detecção em λ de 277 nm e 300 nm, levando ao isolamento dos compostos dispirina B (**15**, M4A3GEA3, 2,5 mg), dispirina C (**16**, M4A3GEA5, 1,8 mg) e dispirina D (**17**, M4A3GEA7, 1,0 mg), coletados entre 27,5-34,0 min, 36,8-43,5 min e 47,0-52,7 min, respectivamente.

3.3.7.4 Isolamento das disparamidas A (**20**) e B (**21**)

A fração M4A4K (164,6 mg) foi separada por HPLC-UV utilizando-se uma coluna C₁₈ Inertsustain (10,0 x 250,0 mm, 5 µm, GL Science), com fase móvel de H₂O + 0,5% de TFA (A) e MeCN:MeOH + 0,5% de TFA (B) no modo gradiente. Diminuindo-se de 50-40% de A em 24 min, diminuindo-se de 40-0% de A em 1 min, mantendo-se em 0% de A por 4 min, aumentando-se de 0-50% A em 1 min e mantendo-se 50% de A por 10 min, utilizando-se vazão de 4,0 mL min⁻¹ e detecção em λ de 277 nm e 300 nm, sendo coletadas dez frações (M4A4KA-M4A4KJ, massa total das frações: 158,8 mg). A fração M4A4KB (12,8 mg), coletada entre 8,5-10,1 min, foi posteriormente separada por HPLC-UV utilizando-se uma coluna C₁₈ X-Terra (7,8 X 150 mm, 5 µm, Waters), com fase móvel de H₂O:MeCN + 0,5% de TFA (75:25), vazão de 3,00 mL min⁻¹ e detecção λ de 277 nm e 300 nm, levando ao isolamento do composto

disparamida A (**20**, M4A4KB5, 1,5 mg), coletado entre 41,9-46,2 min. A fração M4A4KD (19,8 mg), coletada entre 11,8-13,9 min foi posteriormente separada por HPLC-UV utilizando-se coluna C₁₈ X-Terra (7,8 X 150 mm, 5 µm, Waters), utilizando-se H₂O:MeCN + 0,5% de TFA (72:28), vazão de 3,00 mL min⁻¹ e detecção λ de 277 nm e 300 nm, levando ao isolamento do composto disparamida B (**21**, M4A4KD6, 1,8 mg), coletado entre 33,0-37,0 min.

3.3.8 Procedimentos experimentais gerais

As rotações ópticas foram medidas em um polarímetro Polartronic H Schmidt+Haensch. Os espectros no ultravioleta (UV) foram obtidos em um espectrofotômetro UV-3600 Shimadzu. Espectros no infravermelho (IV) foram adquiridos utilizando pastilha de Si e um espectrofotômetro modelo IRAffinity da Shimadzu. Espectros de RMN foram adquiridos à 25 °C, com tetrametilsilano como padrão interno. Os experimentos foram conduzidos em um espectrômetro Bruker AVANCE III, operando em 600 MHz (¹H) ou 150 MHz (¹³C).

As análises por HPLC-UV-ELSD-MS foram realizadas utilizando-se um módulo de separação Waters[®] Alliance 2695 (HPLC), acoplado com um detector espectrofotômetro UV-vis com arranjo de fotodiodos Waters[®] 2696 (PDA), tendo uma divisão 7:3 da vazão após PDA, acoplando-se sequencialmente um espectrômetro de massas Micromass ZQ 2000 (MS) da Waters[®] e um ELSD 2424 Waters[®], respectivamente. A separação cromatográfica foi realizada usando uma coluna XTerra RP18 da Waters[®] (250 X 4,6 mm, 5,0 µm), 0,1% de ácido fórmico em H₂O Milli-Q (A) e 0,1% de ácido fórmico em MeOH:MeCN (1:1) (B). O gradiente de eluição utilizado foi de 9:1 de A:B para 100% de B em 22 min, manteve-se em 100% de B de 22 min à 30 min, de 100% de B para 9:1 de A:B de 30 min à 31 min e manteve-se em 9:1 de A:B de 31 min à 40 min, com vazão de 1,00 mL min⁻¹. Foram injetados 10 µL das amostras solubilizadas em MeOH na concentração de 1,00 mg mL⁻¹. A faixa de varredura utilizando detector PDA foi entre 200 e 400 nm. O espectrômetro de massas (MS) possui ionização por electrospray (ESI), analisador de massas quadrupolo (Q) e foram utilizadas as seguintes condições de análise: voltagem do capilar de 3 kV, temperatura da fonte de 100 °C, temperatura de dessolvatação de 350 °C, faixa de aquisição entre *m/z* 100 - 1000, vazão de gás no cone de 50 L h⁻¹ e vazão do gás de dessolvatação de 350 L h⁻¹. O ELSD operou com ganho de 100, nebulizador em modo

aquecimento em nível 60%, *drift tube* com temperatura 80 ± 5 °C, pressão do gás de 50 psi e com *output full scale* de 2000 mV.

As análises dos compostos puros por UPLC-QToF-MS e MS/MS foram realizadas em um cromatógrafo à líquido Waters® Acquity UPLC H-class acoplado com um espectrômetro de massas Waters® Xevo® G2-XS Q-ToF com interface *electrospray*. Coluna C₁₈ BEH (2,1 X 100,0 mm, 1,7 µm; Waters), mantida à 40°C. Os solventes grau MS utilizados foram: 0,1% de ácido fórmico em água (A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (B). O gradiente de eluição utilizado foi de 9:1 para 2:8 de A:B em 4,0 min, de 2:8 para 9:1 de A:B em 0,1 min e um acondicionamento mantendo 9:1 de A:B por 0,9 min, totalizando 5 min de análise com vazão de 0,5 mL min⁻¹. O volume de injeção foi de 0,5 µL de uma solução 0,01 mg mL⁻¹, mantida à 15 °C. Condições do ESI: voltagem do capilar de 1,2 kV, voltagem do cone de 30 V, temperatura da fonte de 100 °C, temperatura de dessolvatação de 450 °C, vazão de gás no cone de 50 L h⁻¹ e vazão de gás de dessolvatação de 750 L h⁻¹. Para calibração interna, uma solução de leucina-encefalina 200 pg mL⁻¹ foi infundida pela sonda de *lock-mass* com vazão de 10 µL min⁻¹. Os dados dos espectros de massas foram adquiridos em MS e MS/MS, centróide, resolução, positivo, tempo de aquisição de 5 min, faixa de *m/z* 50 -1200 para aquisição em modo MS e faixa de *m/z* variável para aquisição em modo MS/MS de acordo com a massa do composto, *scan time* de 0,2 s e energia de colisão de 0 eV para o modo MS e energia de colisão de 25 eV para o modo MS/MS, exceto para os compostos dispirinas B-F (15-19) em que foi utilizado 50 eV.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A esponja marinha *Agelas dispar* foi coletada na ilha de Fernando de Noronha em 2016. A extração da esponja foi realizada com MeOH e EtOH. O extrato bruto (aqui nomeado como M4) foi submetido a uma partição entre MeOH e hexano. Após evaporação, o resíduo da fração MeOH foi solubilizado e particionado entre AcOEt e H₂O. A fração AcOEt (M4A) foi fracionada em cinco frações usando colunas pré-empacotadas com fase C₈: 100% de H₂O (M4A1), 75:25 de H₂O:MeOH (M4A2), 50:50 de H₂O:MeOH (M4A3), 25:75 de H₂O:MeOH (M4A4) e 100% de MeOH (M4A5). Diversos alcalóides já foram isolados da esponja *Agelas dispar* (CAFIERI *et al.*, 1996; CAFIERI; FATTORUSSO; TAGLIALATELA-SCAFATI, 1998b; PIÑA *et al.*, 2007). As

análises por HPLC-PDA-MS possibilitaram a detecção de compostos bromados nas frações M4A2, M4A3 e M4A4. Cada uma das três frações foi submetida a um fracionamento utilizando coluna empacotada com Sephadex LH-20, levando à obtenção de 63 frações.

Com o uso de dois mecanismos de separação, por polaridade na C₈ e por exclusão de tamanho na Sephadex LH-20, foi possível atingir uma amplitude na separação dos compostos, melhorando a qualidade do perfil metabólico (SCARPATO *et al.*, 2020). Foi desenvolvido um rápido método cromatográfico por UPLC-QToF-MS/MS para a análise das 63 frações. Um método cromatográfico de 5 minutos de duração foi desenvolvido usando uma coluna C₁₈ para UPLC (2,1 X 50 mm, 1,7 µm) sendo a detecção foi realizada em modo DDA (*data dependent acquisition*). O pré-processamento dos dados de LC-MS² foi realizado com o software MZmine v. 2.51 (PLUSKAL *et al.*, 2010). Os dados pré-processados foram utilizados para gerar um *Feature-Based Molecular Networking* (FBMN) (NOTHIAS *et al.*, 2020) (Figura 28) na plataforma GNPS (WANG, M. *et al.*, 2016) e posterior visualização usando Cytoscape 3.7 (SHANNON, 2003). O FBMN pode ser acessado em:

<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=ee371a2687af42f1bed2744d9bfc94d2>

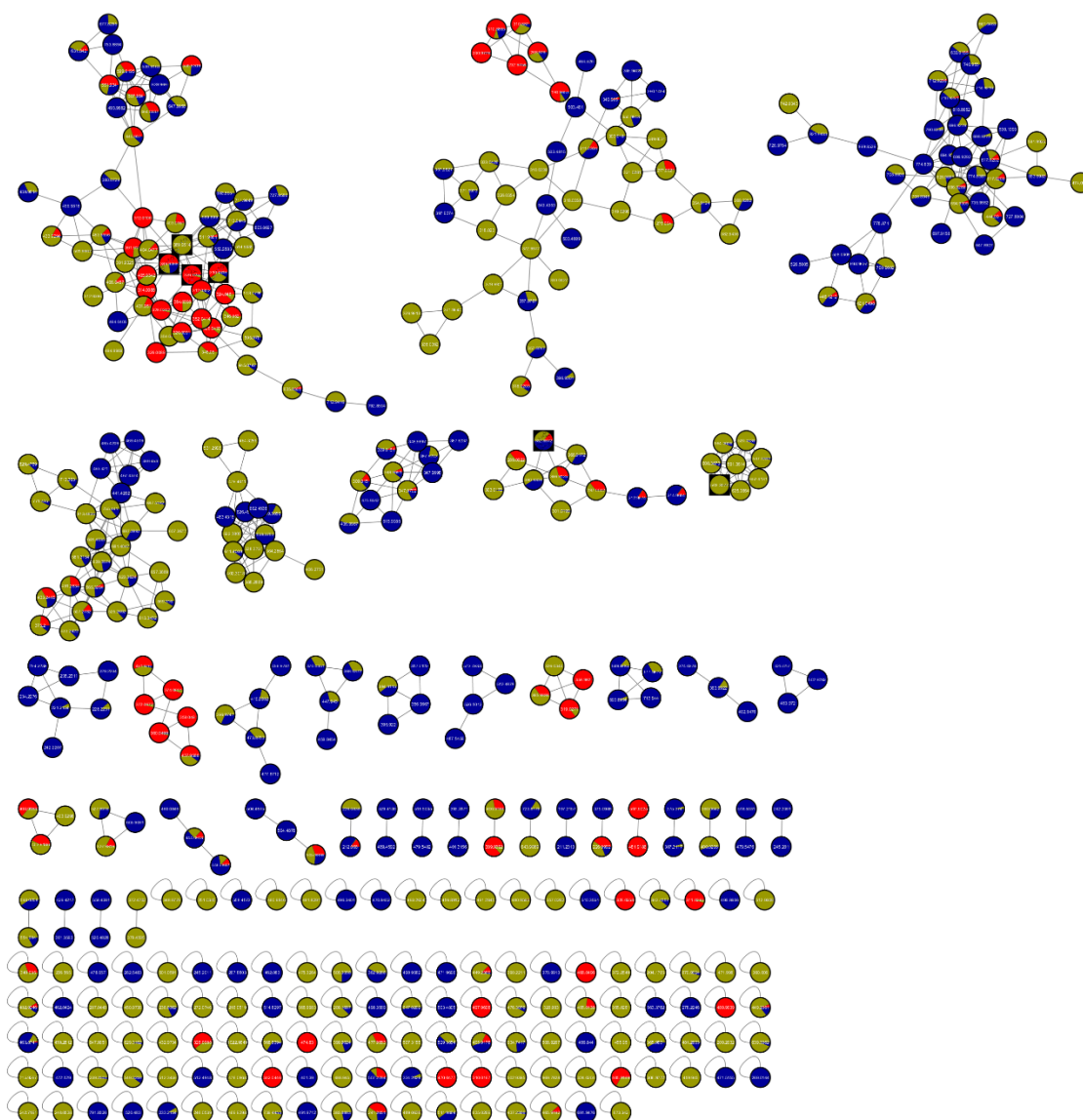
3.4.1 Anotações utilizando o GNPS e a biblioteca *in-house*

A busca na biblioteca espectral do GNPS anotou cinco compostos: himenidina (**4**), oroidina, dihidrohimenialdesina, undecaetilenoglicol e himenamida B.

A himenidina (**4**) (Figura 29) é um composto previamente isolado e identificado pelo nosso grupo (DE SOUZA *et al.*, 2018). O perfil de fragmentação de **4** foi discutido no Capítulo 2 dessa tese. Ao comparar o perfil de fragmentação de **4** com o *m/z feature* 310,0319 anotado pelo GNPS (Figura A53, Apêndice) foi possível confirmar a presença de himenidina (**4**). A anotação do *m/z feature* 389,9398 como oroidina (Figura 29) foi confirmada pela comparação entre os espectros MS e MS/MS do nodo anotado com os espectros MS e MS/MS do seu análogo monobromado, a himenidina (**4**) (Figura A56-A57, Apêndice), tendo como diferença no perfil de fragmentação apenas o íon fragmento da porção bromopirrólica (himenidina: *m/z* 171/173; oroidina: *m/z* 249/251/253). A inspeção manual do *m/z feature* 503,3077 e a comparação com

a fragmentação *in-silico* confirmou a anotação do undecaetilenoglicol (Figura 29) realizada pelo GNPS (Figuras A58-A60).

Figura 28. Feature-Based Molecular Networking de frações da esponja *Agelas dispar*. Os nodos foram coloridos segundo a sua presença nas frações: vermelho (M4A2), amarelo (M4A3) e azul (M4A4). Nodos anotados pelo GNPS estão mostrados como retângulos.



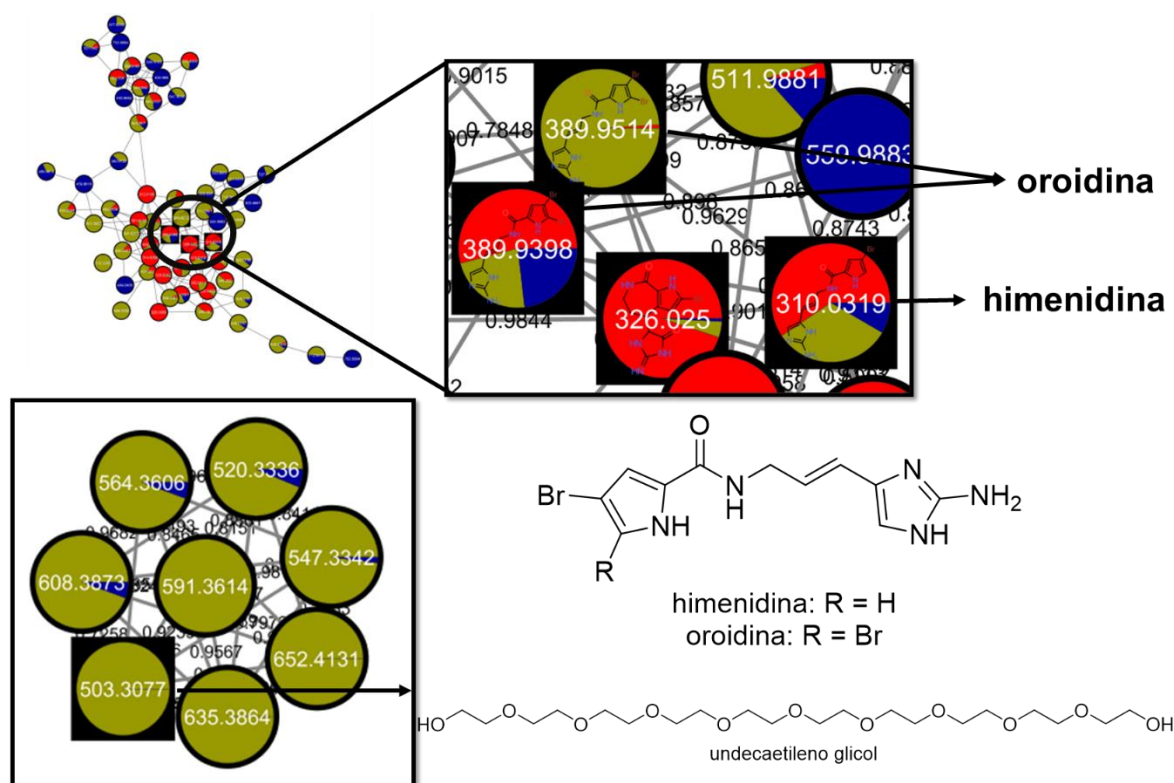
A anotação do nodo de m/z 326,0250 apontado como dihidrohimenialdesina pelo GNPS não foi confirmada e será discutida posteriormente. A anotação de himenamida B também não foi confirmada na investigação dos dados de MS¹. O espectro MS¹ referente ao m/z feature 352,8972 claramente apresenta um um padrão

isotópico típico de composto com dois bromos (Figura A61, Apêndice), enquanto que o composto himenamida B não possui nenhum bromo em sua estrutura (Figura A62, Apêndice). Nenhum composto, além da himenidina (**4**), da biblioteca *in-house* foi observado. As informações das anotações utilizando o GNPS e a biblioteca *in-house* estão sumarizadas na Tabela 9 e Figura 29.

Tabela 9. Tabela de compostos anotados em automática na biblioteca do GNPS e confirmados por inspeção manual.

Composto	Massa acurada [M + H] ⁺	Erro de massa (ppm)	Fórmula Molecular	Fração	
Himenidina	310,0319	9	C ₁₁ H ₁₃ BrN ₅ O ⁺	M4A2C	M4A3H
				M4A3I	M4A3K
				M4A3M	M4A3O
				M4A3P	M4A4N
				M4A4O	
Oroidina	389,9398	4	C ₁₁ H ₁₂ Br ₂ N ₅ O ⁺	M4A2C	M4A3F
				M4A3H	M4A3J
				M4A3L	M4A3M
				M4A3N	M4A3O
				M4A3P	M4A4I
				M4A4J	M4A4K
				M4A4L	M4A4M
M4A4N	M4A4O				
Undecaetilenoglicol	503,3077	3	C ₂₀ H ₄₃ O ₁₁ ⁺	M4A3B	

Figura 29. Clusters e estrutura dos compostos anotados utilizando o GNPS e a biblioteca *in-house*.



3.4.2 Anotação de metabólitos de *Agelas dispar* utilizando biblioteca *in-silico*

Foi criada uma biblioteca *in-silico*, utilizando o CFM-ID 3.0, de compostos descritos na literatura para a esponja marinha *A. dispar*. Os compostos utilizados para a criação da biblioteca foram: dispacamida, monobromodispacamida, longamida B, clathramida C e D, keramadina, ecdysterona e ajugasterona C, aminozooanemonina, piridinobetaína A, piridinobetaína B, dispirina e éter-metílico da dibromoagelaspongina. Para a anotação dos compostos foi realizada comparação manual dos espectros MS/MS reais dos *m/z features* com os espectro MS/MS *in-silico*.

O *m/z feature* 326,0250 foi anotado pelo GNPS como dihidrohimenialdesina (Figura A63, Apêndice). A inspeção manual do espectro MS/MS do *m/z feature* 326,0250 comprovou a alta similaridade quando comparado ao espectro MS/MS depositado na biblioteca espectral do GNPS para o composto dihidrohimenialdesina. No entanto, o espectro MS/MS depositado não é característico para a dihidrohimenialdesina. O *m/z feature* 326,0250 está clusterizado com os compostos himenidina (4) e oroidina, ambos alcalóides imido-bromopirrólicos lineares e com íons

característicos distintos de alcalóides imido-bromopirrólicos ciclizados, conforme discutido no Capítulo 2 dessa tese. O espectro MS/MS do *m/z feature* 326,0250 possui alta similaridade com o *m/z feature* 310,0319 (himenidina, *cosine score* de 0,90). A investigação manual dos dados MS/MS confirmou a similaridade entre os espectros da himenidina (4) e do *m/z feature* 326,0250 (Figura A64-A66, Apêndice). Desse modo, suspeitou-se que a estrutura atribuída ao espectro MS/MS disponível como dihidrohimenialdesina na biblioteca do GNPS estivesse errada. O composto dihidrohimenialdesina possui um isômero linear descrito na literatura e previamente isolado de *Agelas dispar*, a monobromodispacamida (Figura A63, Apêndice) (CAFIERI *et al.*, 1996). A fragmentação *in-silico* da dihidrohimenialdesina e da monobromodispacamida (Figuras A67-A68, Apêndice) confirmou que o espectro do *m/z feature* 326,0250 corresponde à monobromodispacamida e não à dihidrohimenialdesina, conforme previamente anotado.

O composto dispacamida trata-se de um análogo dibromado da monobromodispacamida, assim foi possível anotá-lo após inspeção manual dos espectros MS e MS/MS do *m/z feature* 405,9342 e comparação com o espectro MS/MS do *m/z feature* 389,9398 (oroidina, *cosine score* de 0,90), do *m/z feature* 326,0250 (monobromodispacamida, *cosine score* de 0,98) (Figuras A69-A71, Apêndice) e com a fragmentação *in-silico* (Figura A72, Apêndice).

A comparação do espectro MS/MS do *m/z feature* 324,0461 com o espectro MS/MS do *m/z feature* 310,0319 (himenidina, *cosine score* 0,94) (Figura A73-A75, Apêndice) e com o espectro de fragmentação *in-silico* (Figura A76, Apêndice), permitiu a anotação do nodo de *m/z* 324,0461 como a keramadina.

O *m/z feature* 352,8972, cuja anotação como himenamida B não foi comprovada, passou a ser anotado como longamida B após comparação com o espectro de fragmentação *in-silico* da longamida B (Figura A80, Apêndice) com o MS² do nodo de *m/z* 352,8972 (Figura A77-A79, Apêndice). A partir da análise dos espectros MS e MS/MS dos demais nodos do cluster da longamida B, foi possível propagar a anotação para compostos previamente isolados de esponjas: éster-metílico da longamida B (*m/z feature* 366,9125) (UMEYAMA *et al.*, 1998), hanishin (*m/z feature* 380,9306) (MANCINI *et al.*, 1997), éster-metílico da 3-debromolongamida B (*m/z features* 287,0042 e 289,0022) (REDDY, N. S.; VENKATESWARLU, 2000); e o composto nunca identificado em matriz biológica, 3-debromohanishin (*m/z features* 303,0179 e 301,0199) (Figuras A81-A96, Apêndice).

Os demais compostos, clathramidas C e D, ecdysterona, ajugasterona C, aminozooanemonina, piridinobetaína A e B, dispirina e o éter-metílico da dibromoagelaspongina não foram encontrados nas frações utilizadas para construir a rede molecular da *Agelas dispar*. As informações das anotações estão sumarizadas na Figura 30 e Tabela 10.

Figura 30. Clusters e estruturas dos compostos anotados utilizando a biblioteca *in-silico*.

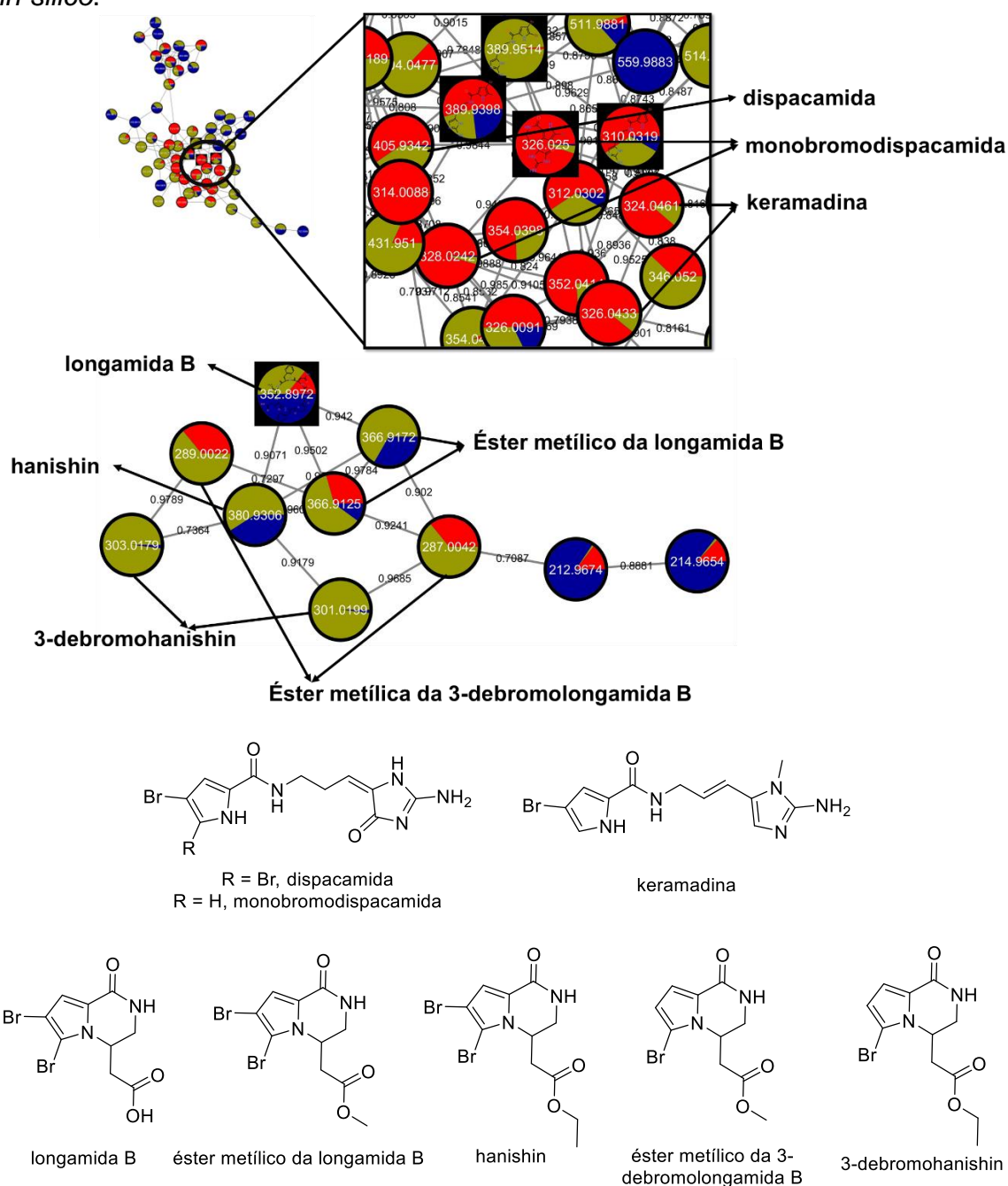
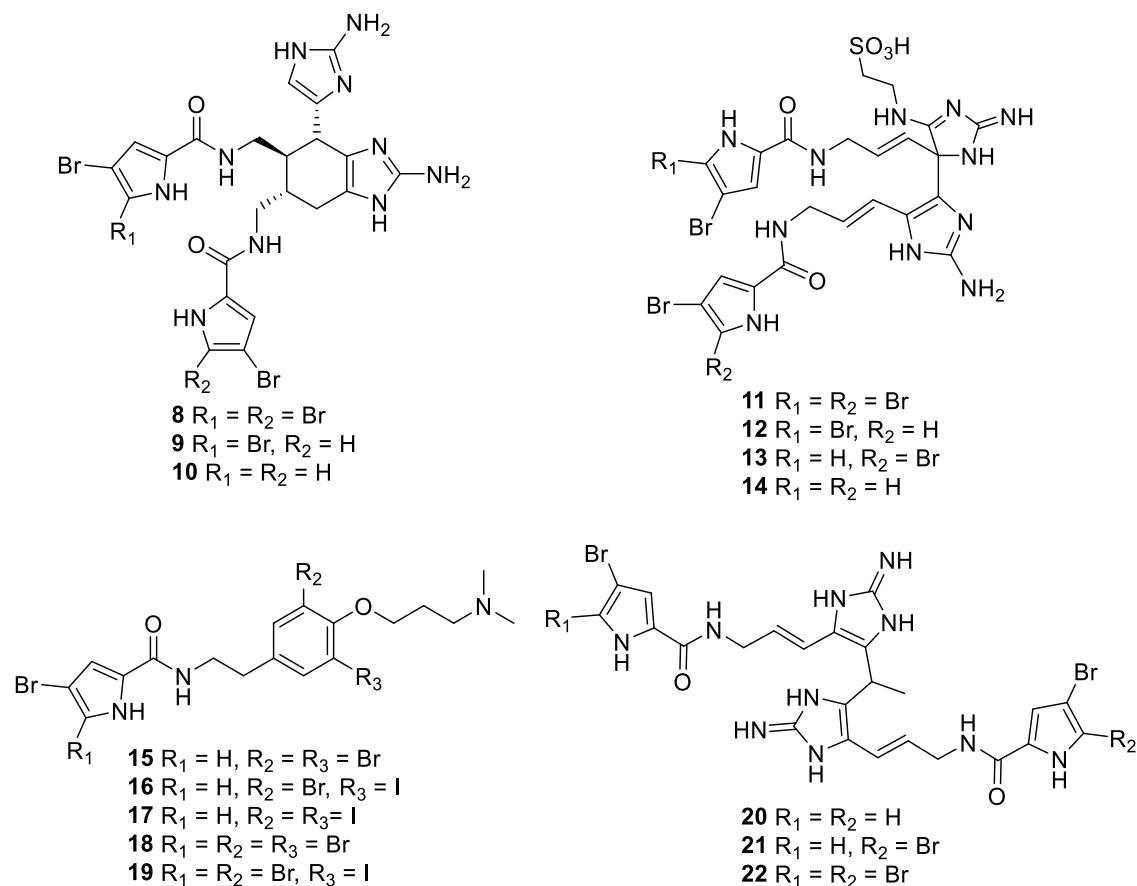


Tabela 10. Tabela de compostos anotados em manual de metabólitos previamente relatados em *Agelas dispar* e propagação da anotação da longamida B.

Composto	Massa acurada [M + H] ⁺	Erro de massa (ppm)	Fórmula Molecular	Fração	
Dispacamida	403,9359	1,48	C ₁₁ H ₁₂ Br ₂ N ₅ O ₂ ⁺	M4A2C	M4A2D
				M4A3H	M4A3I
				M4A4N	
Monobromodis pacamida	326,0250	1,84	C ₁₁ H ₁₃ BrN ₅ O ₂ ⁺	M4A2C	M4A2D
				M4A3H	M4A3I
				M4A4N	
Keramadina	324,0461	4,01	C ₁₂ H ₁₅ BrN ₅ O ⁺	M4A2B	M4A3G
				M4A3H	
Longamida B	350,8988	3,70	C ₉ H ₉ Br ₂ N ₂ O ₃ ⁺	M4A2E	M4A2F
				M4A3P	M4A4Y
				M4A4W	M4A4Z
Éster-metílico da longamida B	364,9147	4,38	C ₁₀ H ₁₁ Br ₂ N ₂ O ₃ ⁺	M4A3N	M4A4X
Hanishin	378,9305	4,48	C ₁₁ H ₁₃ Br ₂ N ₂ O ₃ ⁺	M4A3L	M4A3M
				M4A4T	M4A4U
Éster metílico da 3- debromolonga mida B	287,0042	4,87	C ₁₀ H ₁₂ BrN ₂ O ₃ ⁺	M4A2D	M4A3K
3- debromohanis hin	301,0199	3,98	C ₁₁ H ₁₄ BrN ₂ O ₃ ⁺	M4A3L	M4A3M
				M4A3N	
				M4A3J	M4A3K
				M4A3L	M4A3R
				M4A3S	M4A4T
				M4A4B2	

A investigação da rede molecular manualmente permitiu a identificação de quatro famílias de bromopirrólicos, sendo elas as ageliferinas (**8-10**), nagelamidas H-H3 e citrinamina B (**11-14**), dispirinas (**15-19**) e as disparamidas (**20-22**) (Figura 31).

Figura 31 - Estrutura das ageliferinas (**8-10**), nagelamidas H (**11-13**), citrinamina B (**14**), dispirinas (**15-19**) e disparamidas A-C (**20-22**) identificadas na esponja marinha *Agelas dispar*.



3.4.3 Identificação das ageliferinas (**8-10**)

A investigação do segundo e do terceiro maiores *clusters* (Figura 32) presente na rede molecular da esponja *Agelas dispar*, permitiu a identificação dos *m/z features* 389,9408, 390,1454, 349,9850, 350,9848 e 311,0304 no segundo *cluster* e dos *m/z features* 778,8710, 700,9602, 698,9627, 621,0498, 528,0308 e 448,1212 no terceiro *cluster*. Os dados MS¹ da fração M4A4J mostrou que existem três conjuntos de *m/z features* que representam três compostos diferentes (Figura 33): *m/z features* 778, 528, 390 e 389; *m/z features* 700, 698, 528, 350 e 349; *m/z features* 621, 448 e 311. Os *m/z features* entre 311-390 representam o $[M + 2H]^+$, enquanto que os *m/z features* entre 621-778 representam o $[M + H]^+$ e os *m/z features* 528 e 448 representam fragmentação na fonte a partir do $[M + H]^+$. Assim, os *m/z features* 389 e

390 correspondem à um composto com padrão isotópico típico para compostos contendo 4 bromos na estrutura (Figura 33B, composto 8), tendo $[M + H]^+$ de m/z 774, 776, 778, 780 e 782. A mesma observação foi feita para os m/z features 349 e 350 e para m/z features 310 e 311, que possuem perfil isotópico 3 e 2 bromos, respectivamente. A desreplcação manual dos compostos utilizando o *Dictionary of Natural Products* (DNP) indicou como possibilidade para compostos com 4 bromos: dibromoageliferina, nagelamida G, nagelamida A e a dibromosceptrina; para compostos com 3 bromos: bromoageliferina, nagelamida F e a bromosceptrina; para compostos com 2 bromos: ageliferina, nagelamida E, didebromonagelamida A e a sceptrina.

Figura 32 - Clusters contendo as ageliferinas (8-10).

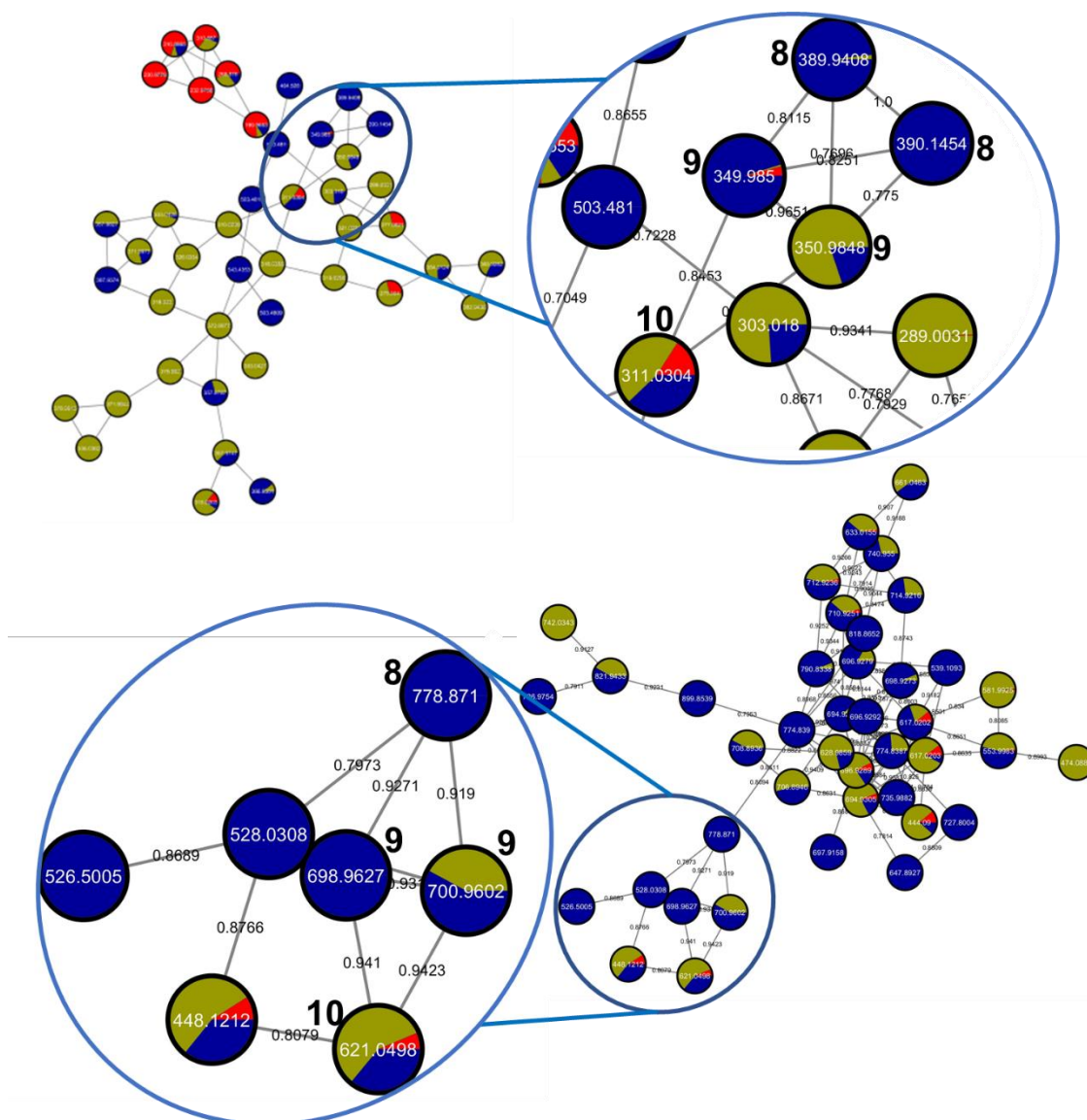
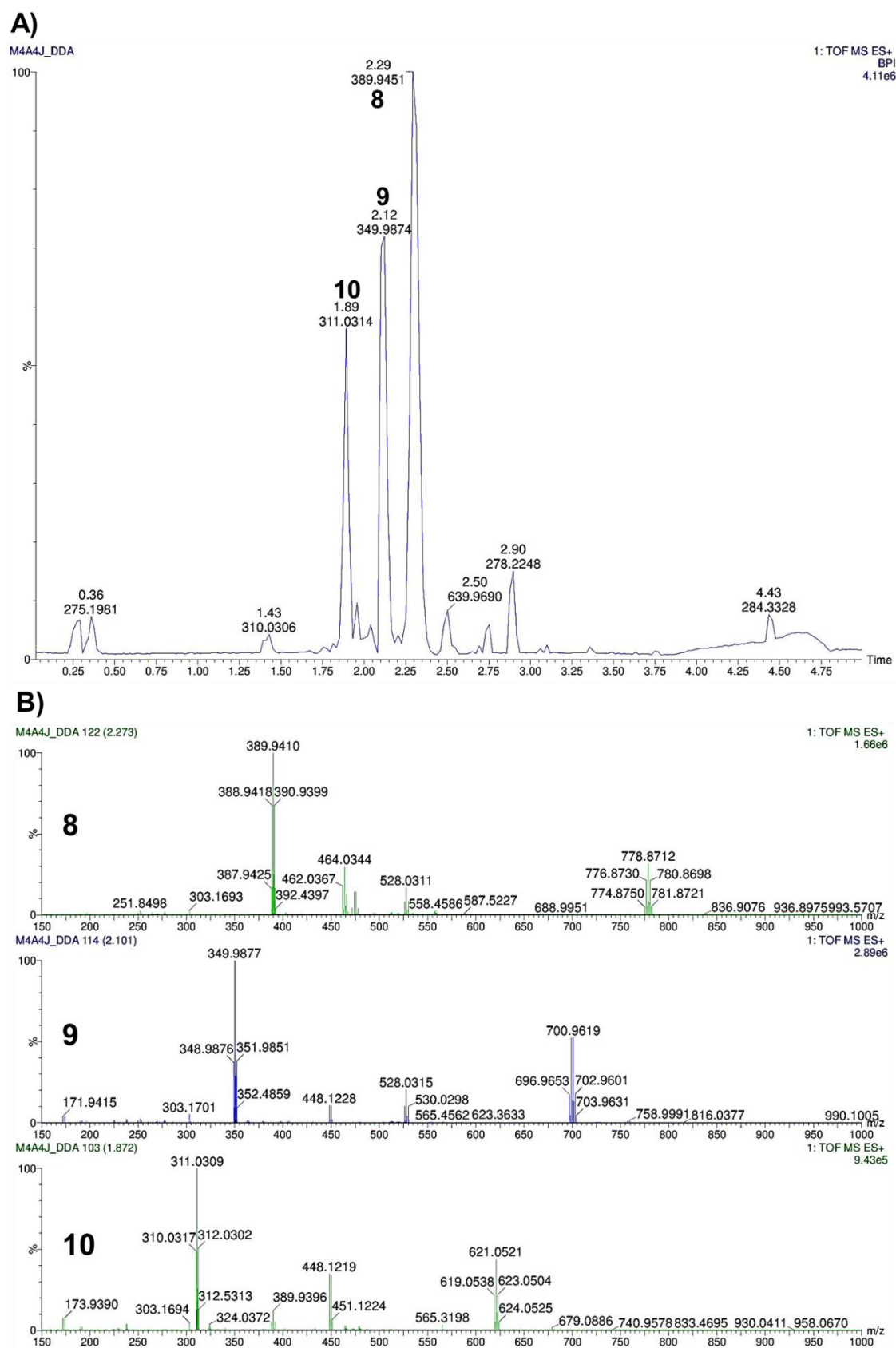


Figura 33 - A) Cromatograma do pico base por UPLC-MS da fração M4A4J. B) Espectro MS¹ das ageliferinas (8-10).



Após duas etapas de fracionamento a partir da fração M4A4J, utilizando HPLC-UV, foi possível o isolamento e a identificação dos compostos dibromoageliferina (**8**, M4A4J6A), bromoageliferina (**9**, M4A4J4A) e ageliferina (**10**, M4A4J2A), que tiveram suas identidades confirmadas por análises de RMN de ^1H , HRMS (Figuras A97-A105, Apêndice) e comparação com a literatura (KOBAYASHI et al., 1990) (Tabela 11). Análise por UPLC-QToF-MS dos compostos dibromoageliferina (**8**), bromoageliferina (**9**) e ageliferina (**10**) apresentaram $[\text{M} + \text{H}]^+$ com massa acurada de m/z 774,8721 (massa exata: m/z 774,8733; erro de massa: -1,55 ppm; fórmula molecular: $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{Br}_4\text{N}_{10}\text{O}_2^+$), m/z 696,9628 (massa exata: m/z 696,9628; erro de massa: 0,00 ppm; fórmula molecular: $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{Br}_3\text{N}_{10}\text{O}_2^+$) e m/z 619,0522 (massa exata: m/z 619,0523; erro de massa: -0,16 ppm; fórmula molecular: $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{Br}_2\text{N}_{10}\text{O}_2^+$), respectivamente. Os substituintes do anel ciclohexeno entre C-9, C-9' e C-10 são todos equatoriais, uma vez que as constantes de acoplamento para esses centros são típicas para prótons trans-diaxiais ($J_{9,10} = 8 \text{ Hz}$ e $J_{9',10'a} = 8 \text{ Hz}$). Além disso, foi realizado um experimento de NOE em que ao irradiar H-10 pode-se observar acoplamento entre H-10/H-9 para cada ageliferina isolada (**8-10**), sendo assim, as estereoquímicas relativas de **8-10** são as mesmas das reportada por Kobayashi (1990).

Figura 34. Estruturas das ageliferinas (**8-10**) e acoplamentos ^1H e NOE para a determinação da estereoquímica relativa.

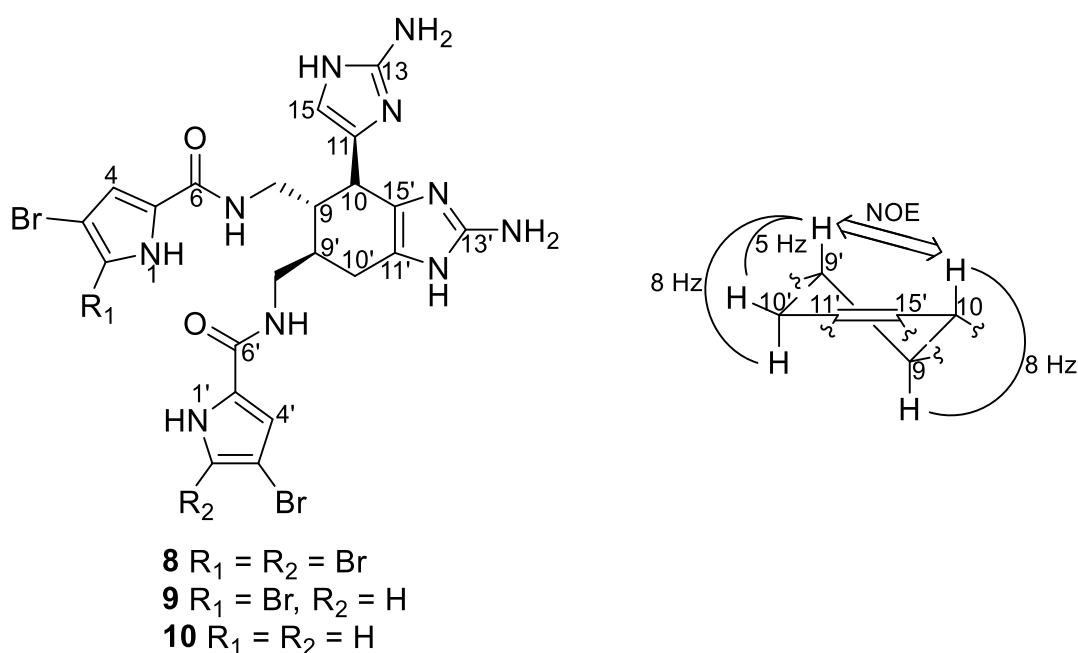


Tabela 11. Dados de RMN de ^1H para as ageliferinas (**8-10**), em $\text{MeOH-}d_4$ (^1H : 600 MHz).

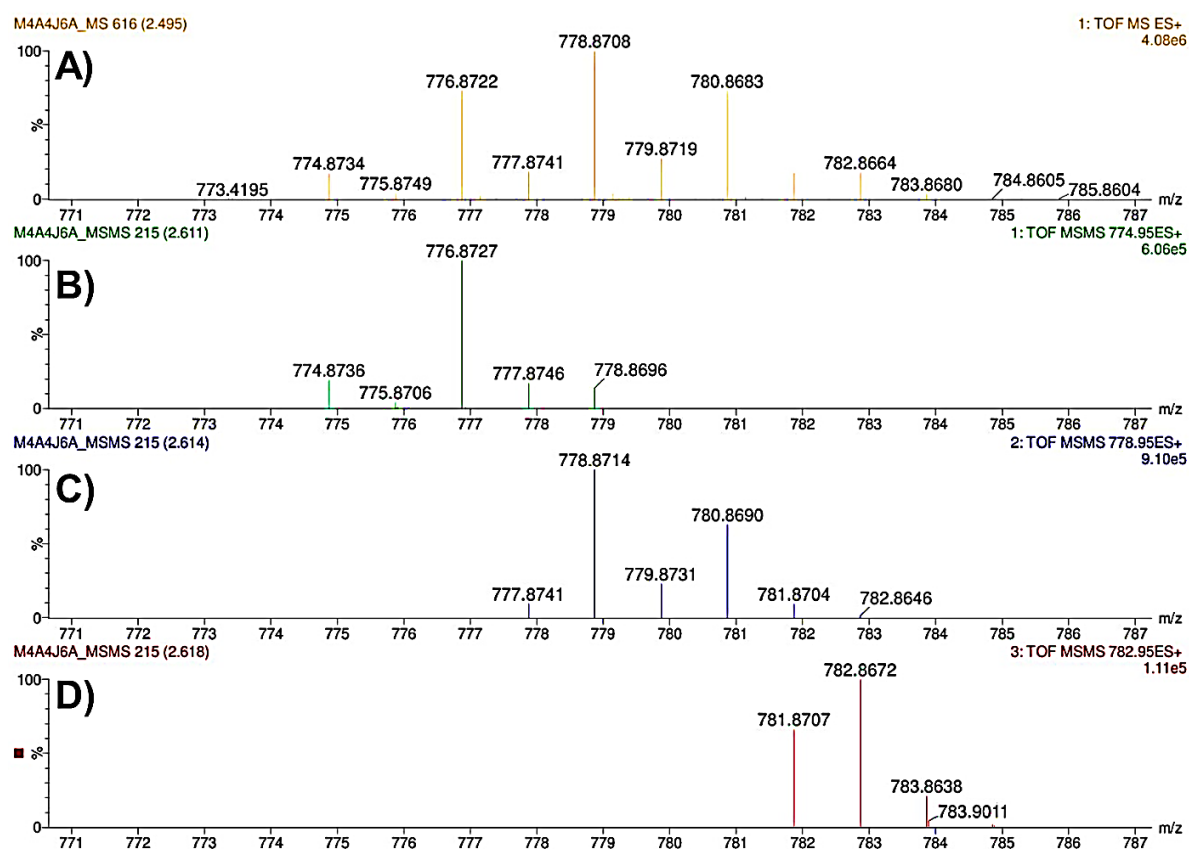
Posição	8		9		10	
	δ_H (J in Hz) Experimental	δ_H (J in Hz) Literatura ^a	δ_H (J in Hz) Experimental	δ_H (J in Hz) Literatura ^a	δ_H (J in Hz) Experimental	δ_H (J in Hz) Literatura ^a
2					6,97, d (1,5)	6,96, d (1,5)
2'			6,98, d (1,4)	6,95, brs	7,01, d (1,4)	6,97, d (1,5)
4	6,91, s	6,92, brs	7,02, s	7,02, brs	6,87, d (1,5)	6,85, d (1,5)
4'	7,02, s	7,05, brs	6,87, d (1,4)	6,85, brs	6,98, d (1,4)	6,94, d (1,5)
8a	3,54, dd (14,5; 5,1)	3,55, dd (14,5; 4,5)	3,54, dd (14,7; 5,2)	3,51, dd (14,5; 5,0)	3,54, dd (14,6; 5,2)	3,50, dd (14,0; 5,0)
8b	3,78, dd (14,6; 4,5)	3,76, dd (14,5; 4,0)	3,79, dd (14,3; 4,3)	3,74, dd (14,5; 4,5)	3,81, dd (14,4; 4,3)	3,77, dd (14,0; 4,5)
8'a	3,35 ^b	3,30 ^b	3,35 ^b	3,30 ^b	3,30 ^b	3,33, dd (14,0; 4,5)
8'b	3,70, dd (13,9; 3,4)	3,66, dd (14,0; 3,0)	3,70, dd (14,1; 3,6)	3,64, dd (14,0; 3,5)	3,70, dd (13,9; 3,4)	3,64, dd (14,0; 3,0)
9	2,17, m	2,20, m	2,17, m	2,17, m	2,17, m	2,16, m
9'	2,30, m	2,30, m	2,30, m	2,27, m	2,30, m	2,27, m
10	3,86, d (7,5)	3,87, brd (7,0)	3,86, d (7,8)	3,83, brd (7,5)	3,86, d (7,3)	3,83, brd (7,0)
10'a ^c	2,50, ddd (16,4; 8,1; 2,7)	2,51, dd (16,0; 8,0)	2,50, ddd (16,6; 8,4; 2,8)	2,48, ddd (16,0; 8,0; 2,0)	2,51, ddd (16,5; 8,2; 2,6)	2,48, ddd (16,0; 8,0; 2,5)
10'b ^d	2,79, dd (16,4; 5,8)	2,81, dd (16,0; 5,5)	2,80, dd (16,2; 5,5)	2,77, ddd (16,0; 5,0; 1,5)	2,81, dd (16,4; 5,4)	2,78, ddd (16,0; 5,5; 1,5)
15	6,82, s	6,83, brs	6,82, s	6,81, brs	6,82, s	6,79, brs

^aDados reportados sobre análises realizadas em $\text{MeOH-}d_4$ em um equipamento de 500 MHz. ^bSob o sinal do $\text{MeOH-}d_3$ ^cHidrogênio axial. ^dHidrogênio equatorial.

Os espectros de fragmentação das ageliferinas por UPLC-QToF-MS/MS possuem algumas características específicas de compostos polibromados. A Figura 35A apresenta uma expansão do espectro MS^1 do composto **8**, enquanto que a Figura 35B apresenta uma expansão do espectro de fragmentação da massa monoisotópica, m/z 774,87, de **8**. Na região da entre m/z 774-782 da Figura 35B é possível observar picos de m/z 774,8736, m/z 775,8706, m/z 776,8727, m/z 777,8746 e m/z 778,8696 que são íons pertencentes ao mesmo agregado isotópico. Ao comparar com o espectro MS^1 de **8** (Figura 35A) com o MS/MS do íon m/z 774,87 (Figura 35B), pode-se observar que os picos m/z 774,8722, m/z 775,8706, m/z 776,8727 e m/z 777,8746 mantiveram suas intensidades relativas em comparação ao observado no espectro MS (Figura 35A), enquanto que o pico m/z 778,8696 diminuiu drasticamente sua

intensidade relativa em comparação com o espectro MS (Figura 35A). Ao fragmentar a m/z 778,87 (Figura 35C), observou-se que os picos m/z 777,8741, m/z 778,8714, m/z 779,8731, m/z 780,8690 e m/z 781,8704 mantiveram sua intensidade relativa em comparação ao espectro MS (Figura 35A), enquanto que o pico m/z 782,8646 diminuiu drasticamente sua intensidade relativa. A fragmentação do íon m/z 782,86 (Figura 35D) manteve o mesmo padrão observado no espectro MS (Figura 35A) para os íons m/z 781,8707, m/z 782,8672 e m/z 783,8638. Esse mesmo comportamento foi observado para todos os compostos polibromados estudados nesse trabalho. Dessa forma, deduziu-se que o quadrupólo do equipamento utilizado transmite em uma região entre A-1 e A+3 do íon precursor escolhido. Os indícios apontam que o íon A+4 observado seja apenas um resquício de transmissão do quadrupólo, não devendo considerando a interpretação dos espectros MS.

Figura 35. (A) Expansão do espectro MS e de (B,C e D) três espectros MS/MS do composto dibromoageliferina (**8**).



Observada essa característica específica dos espectros MS/MS dos compostos polibromados, optou-se por fragmentar além das massas monoisotópicas, os íons A+4

e A+8 (sendo A a massa monoisotópica do composto), quando presentes. A Figura 37 e Tabela 12 mostram os espectros de fragmentação em 25 eV do composto **8**. Os compostos **9** e **10** também foram analisados da mesma forma (Figuras A105-A106 e Tabela A2-A3, Apêndice). Após conversão do dado bruto (.raw) da análise MS/MS das ageliferinas, o MZmine 2.51 foi usado para realizar o *mass detection* (10^3) e posteriormente, os scans selecionados, um para cada íon precursor, foram exportados como arquivo único .mgf para cada composto. O arquivo .mgf foi importado no Sirius 4.4.29 com a finalidade de gerar uma árvore de fragmentação para os compostos **8-10**. Parâmetros gerais, *Instrument* e *MS/MS isotope score*, foram testados, sem sucesso, buscando que as árvores de fragmentação filtrassem os íons referentes ao padrão isotópico dos bromos. Como pode ser observado na Figura 36, os diferentes picos do padrão isotópico de um mesmo íon fragmento aparecem como íons fragmentos distintos na árvore de fragmentação gerada. Como não foi possível obter uma proposta de árvore de fragmentação utilizando o Sirius, optou-se por propor apenas as estruturas dos íons fragmentos das ageliferinas **8-10**, utilizando a fórmula molecular predita através da massa acurada.

A Figura 37 e a Tabela 12 apresentam os dados de fragmentação do composto **8** por UPLC-QToF-MS/MS a partir dos íons precursores 774,87, m/z 778,87 e m/z 782,86, enquanto que as tabelas de fragmentação e os espectros MS/MS dos compostos **9** e **10** encontram-se no Apêndice (Figuras A105-A106 e Tabela A2-A3). A Figura 38 apresenta as estruturas propostas para os fragmentos observados. Como é possível observar na Tabela 12 e na Figura 38, foram propostas duas estruturas diferentes para os íons fragmentos A, B e C que se originam a partir da cisão da ligação amida do monômero superior (C6-N7) ou do monômero inferior (C6'-N7').

Figura 36. A) Expansão da árvore de fragmentação gerada pelo Sirius 4.4.29. B) Expansão do espectro MS/MS de **8**.

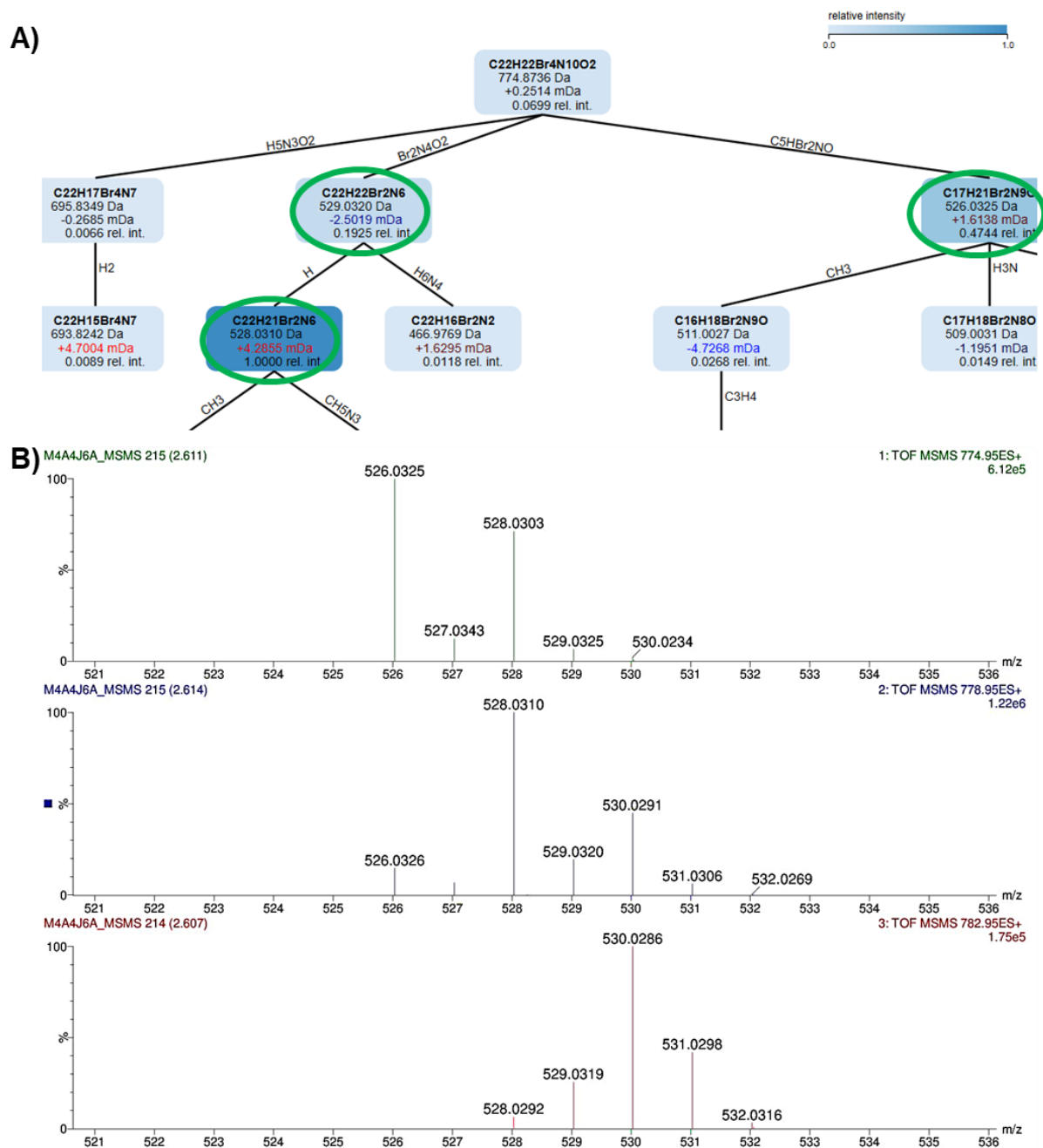


Figura 37. Espectros MS/MS do composto dibromoageliferina (**8**) a partir dos íons precursores de m/z 774,87, m/z 778,87 e m/z 782,86.

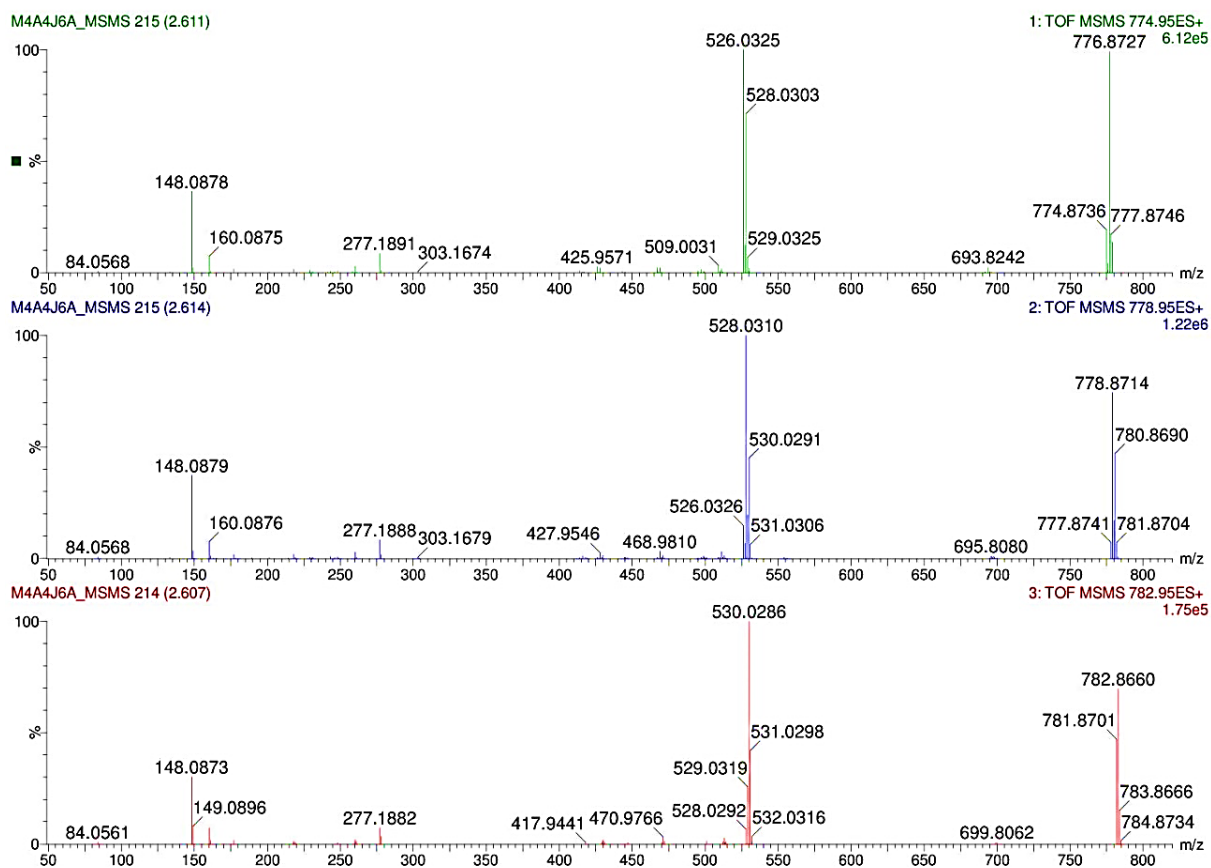
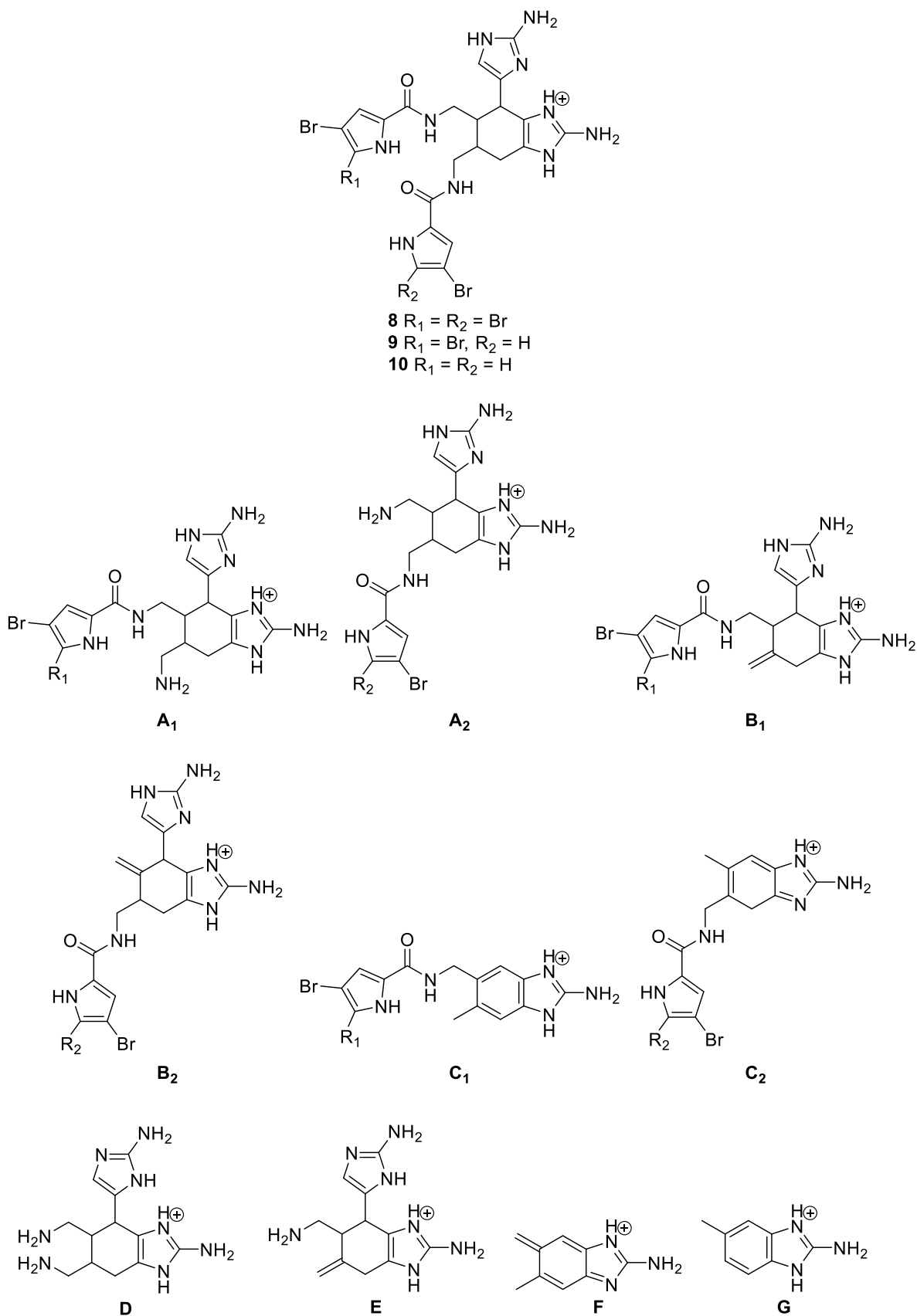


Tabela 12. Íons observados nos espectros MS/MS do composto dibromoageliferina (**8**) a partir dos íons precursores de m/z 774,87, m/z 778,87 e m/z 782,86.

Íon fragmento	Fórmula	m/z 774,87			m/z 778,87			m/z 782,86		
		Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)	Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)	Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)
[M + H]⁺	$C_{22}H_{23}Br_4N_{10}O_2^+$	774,8736	0,26	19,06	778,8714	2,70	74,30	782,8672	2,55	68,22
		776,8727	1,81	99,02	780,8690	2,18	46,87			
A₁/A₂	$C_{17}H_{22}Br_2N_9O^+$	526,0325	3,04	100,00	526,0326	3,23	14,66	530,0286	3,40	100,00
		528,0303	2,65	71,15	528,0310	3,98	100,00			
B₁/B₂	$C_{17}H_{19}Br_2N_8O^+$	509,0031	-2,55	3,08	508,9995	-9,63	0,49	512,9984	-3,70	2,56
		510,9987	-7,04	1,71	511,0027	0,78	2,80			
					513,0016	2,53	1,16			
C₁/C₂	$C_{14}H_{14}Br_2N_5O^+$	425,9571	2,58	2,68	425,9530	-7,04	0,37	429,9426	-21,63	1,37
		427,9534	-1,40	2,02	427,9546	1,40	2,35			
					429,9516	-0,70	1,13			
D	$C_{12}H_{21}N_8^+$	277,1891	2,53	8,50	277,1888	1,44	8,24	277,1879	-1,80	6,89
E	$C_{12}H_{18}N_7^+$	260,1610	-3,08	2,75	260,1624	2,31	2,64	260,1623	1,92	2,47
F	$C_9H_{10}N_3^+$	160,0875	3,12	7,10	160,0876	3,75	7,27	160,0879	5,62	7,37
G	$C_8H_{10}N_3^+$	148,0875	3,38	36,31	148,0879	6,08	37,09	148,0879	6,08	33,48

Figura 38. Estruturas propostas para os íons fragmentos das ageliferinas (**8-10**).

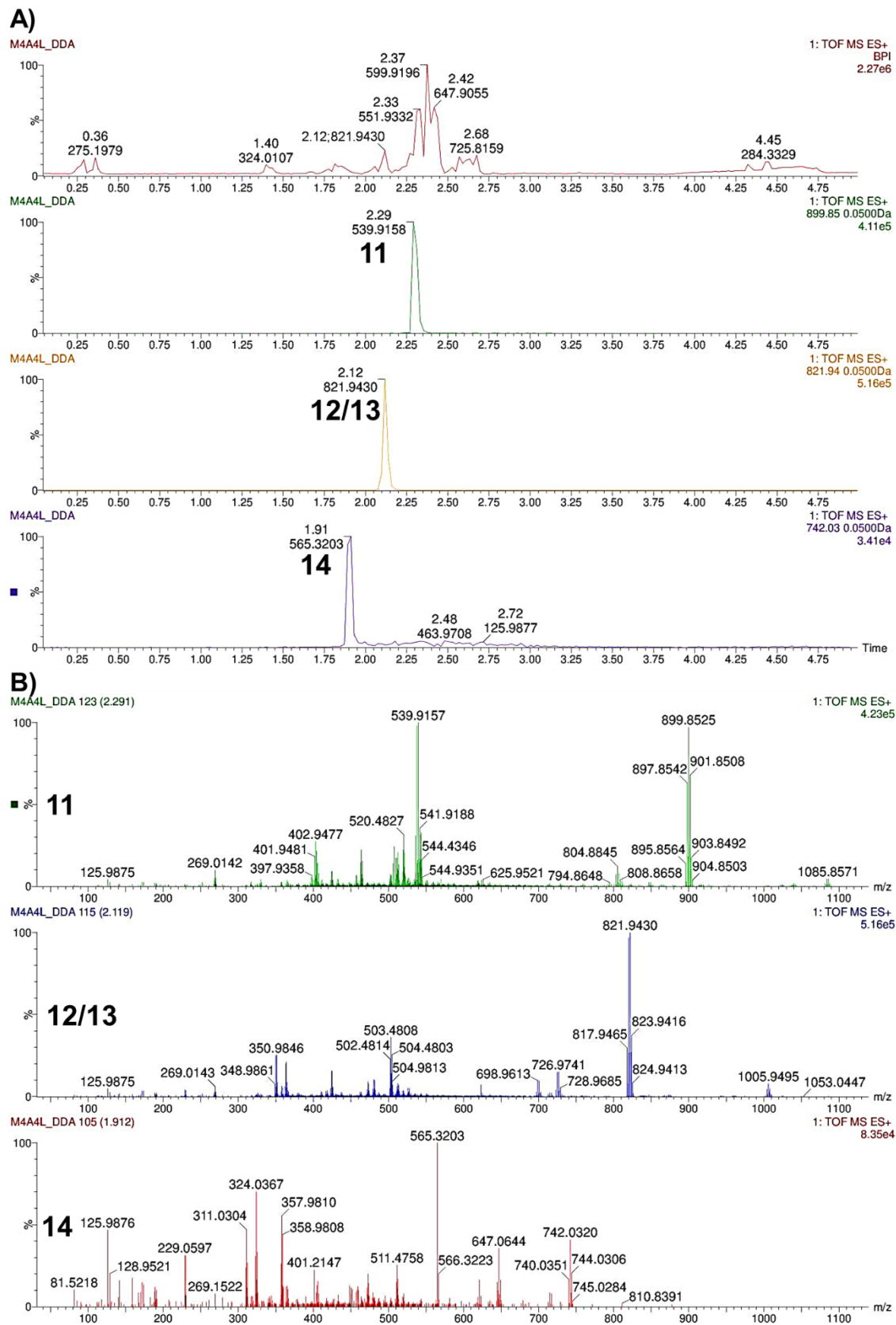


Após completamente identificados por análises de RMN, HRMS e MS/MS, a citotoxicidade dos compostos **8-10** foi avaliada contra a linhagem de células de câncer de ovário (OVCAR3), apresentando IC₅₀ de 2,619 µM, 0,010 µM e de 2,619 µM, respectivamente, conforme procedimento descrito no item 1.3.6 Avaliação da atividade citotóxica.

O levantamento bibliográfico de atividade biológica das ageliferinas mostrou que a ageliferina (**10**) foi previamente isolada a partir da esponja marinha *Agelas nakamurai* e apresentou atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis* (168), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e duas linhagens de *Escherichia coli* (ATCC 25922 e HB101) em ensaios de zonas de difusão em placas de ágar, com zonas de inibição de 14, 11, 8 e 11 mm, respectivamente (EDER *et al.*, 1999). O composto **10** foi também isolado de *Stylissa carteri*, mas não apresentou atividade citotóxica contra a linhagem celular de linfoma (L5178Y) e também foi inativo em ensaio enzimático de inibição da proteína quinase VEGFR-2. Na concentração de 50 µM o composto **10** foi capaz de inibir 50% da viabilidade celular de uma linhagem de célula de carcinoma de cólon (HCT116) (HAMED *et al.*, 2018). Os compostos bromoageliferina (**9**) e dibromoageliferina (**8**) foram capazes de reduzir a entrada de cálcio dependente de voltagem em células PC12 na concentração de 6,61 µM e de 4,44 µM, respectivamente, no entanto, não alteraram a entrada de cálcio operada por estoque (BICKMEYER, 2005). O composto bromoageliferina (**9**), previamente isolado de *Agelas* sp., apresentou IC₅₀ 1,7 µg cm⁻² contra a linhagem bacteriana marinha *Rhodospirillum salexigens* (SCRC 113) (YAMADA *et al.*, 1997). Os compostos **8-10**, previamente isolados de *Agelas conifera*, também apresentaram inibição do crescimento em disco de *Bacillus subtilis* em 10 µg/disco, sendo que **9** e **10** apresentaram a mesma inibição contra *Escherichia coli* (KEIFER *et al.*, 1991). Os três compostos também apresentaram atividade contra o vírus da *Herpes simplex* tipo 1 na concentração de 20 µg/disco e na concentração de 100 µg/disco contra *Vesicular stomatitis* (KEIFER *et al.*, 1991). Todos foram inativos contra *Penicillium atrovirens* e *Saccharomyces cerevisiae*, não apresentaram toxicidade contra células de rim de macacos na concentração de 200 µg/disco e apresentaram baixa atividade no ensaio indução bioquímica (BIA) na concentração de 50 µg/disco (KEIFER *et al.*, 1991). A ageliferina (**10**) apresentou EC₅₀ de 21 µg/mL na inibição do recobrimento pela craca *Balanus amphitrite amphitrite*, demonstrando potencial atividade anti-incrustante (KEIFER *et al.*, 1991). As três ageliferinas (**8-10**) apresentaram uma elevação na

atividade de ATPase de miofibrilas de músculos esqueléticos de coelho em 200, 190 e 150% utilizando as concentrações de $3,0 \times 10^{-5}$, $2,0 \times 10^{-6}$ e $1,3 \times 10^{-5}$ M, respectivamente (KOBAYASHI *et al.*, 1990). O composto **10**, também isolado de *Agelas novaecaledoniae*, apresentou alta afinidade pelos neurotransmissores somatostatina e VIP na concentração de 2,2 μ M e 19,2 μ M (VASSAS *et al.*, 1996). Nenhuma atividade foi detectada para **8-10** isolados de *Agelas cerebrum* contra células antitumorais contra três linhagens celulares (câncer de pulmão A549, câncer de cólon HT29 e câncer de mama MDA-MB-231) (REGALADO *et al.*, 2011). Os compostos **8** e **9** apresentaram atividade de inibição de predação de peixes em ensaios realizados em aquário (Assmann *et al.*, 2000). Nenhuma atividade contra a proteína fosfatase 2A foi observada para as agelifferinas **8-10**, no entanto, a atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas *Micrococcus luteus* e *Bacillus subtilis* e Gram-negativa *Escherichia coli*, apresentou MIC de de 2, 2 e 4 μ g/mL para *M. luteus*, 4, 2 e 8 μ g/mL para *B. subtilis* e 16, 16 e 33 μ g/mL para *E. coli* (ENDO *et al.*, 2004). O composto **9** isolado de *Agelas* sp. apresentou IC₅₀ de 28,3 e 10,6 μ M na inibição de formação de biofilme de *Acinetobacter baumannii* (19606) e de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA BAA-1685), respectivamente (MELANDER *et al.*, 2016). O composto **9** também foi capaz de diminuir o MIC de antibióticos contra linhagens resistentes. O MIC de β -lactâmicos foi de 32 μ g/mL para 8 μ g/mL na concentração de 10 μ M de **9** contra linhagem *A. baumannii* (AB5075), enquanto que a resistência a oxacilina foi suprimida na linhagem ATCC BAA-1556 na concentração de 10 μ M de **9** (MELANDER *et al.*, 2016). Os compostos **8-10**, previamente isolados de *Agelas dilatata*, foram testados contra três diferentes espécies de bactérias cada uma com duas linhagens distintas, uma referência e uma isolada clínica (*Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 e RYC 52763/97, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 e KP 1803 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e PAO1), sendo destaque o MIC contra a linhagem ATCC 27853 de 8 mg L⁻¹ para **9** (PECH-PUCH *et al.*, 2020). O composto **9** também apresentou moderada atividade, MIC 32 mg L⁻¹, contra as linhagens de isolados clínicos de *P. aeruginosa* PAO1, 29-200 SV, 30-127 VI 30-223 SV e 30-230 SV, além de reduzir a formação de biofilme contra as linhagens 27853 e PAO1 nas concentrações de 8 e 16 mg L⁻¹, respectivamente (PECH-PUCH *et al.*, 2020). A atividade antimicrobiana de **9** contra *P. aeruginosa* também foi avaliada *in vivo* em um modelo de *Galleria mellonella*, mostrando que o tempo de sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectada aumentou de 13,5 h para 18,3 h utilizando **9** na

Figura 40. A) Cromatograma do pico base (BPI) e cromatogramas dos íons extraídos m/z 899,85 (**11**), m/z 821,94 (**12/13**) e m/z 742,03 (**14**) da fração M4A4L. B) Espectros MS¹ dos compostos **11-14**.



Após duas etapas de fracionamento a partir da fração M4A4L, utilizando HPLC-UV, foi possível o isolamento e a identificação dos compostos nagelamida H (**11**, M4A4L6C), uma mistura entre nagelamida H2 (**12**, M4A4L6B) e nagelamida H3 (**13**, M4A4L6B) e de citrinamina B (**14**, M4A4L6C) através de análises de RMN de ^1H , ^{13}C , bidimensionais, HRMS, MS/MS e comparação com a literatura (CYCHON; LICHTTE; KÖCK, 2015; ENDO *et al.*, 2004).

Análise por UPLC-QToF-MS do composto nagelamida H (**11**) apresentou $[\text{M} + \text{H}]^+$ com massa acurada de m/z 895,8553 (Figuras A107-A108) (massa exata: m/z 895,8568; erro de massa: -1,67 ppm; fórmula molecular: $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{Br}_4\text{N}_{11}\text{O}_5\text{S}^+$). A confirmação da estrutura de **11** foi possível pela comparação entre os dados de RMN de ^1H , ^{13}C (Tabela 13), bidimensionais (Figuras A107-A113, Apêndice) e comparação com a literatura (ENDO *et al.*, 2004). Embora o deslocamento químico dos carbonos e hidrogênios entre C-8 e C-11 e entre C-8' e C-11' tenha diferenças de atribuições do proposto neste trabalho, acredita-se que houve erro do artigo original (ENDO *et al.*, 2004) nas atribuições entre os sinais citados. Para atribuir os sinais sem ambiguidade foram adquiridos os espectros bidimensionais, confirmando a estrutura inicialmente proposta por Endo et al. (2004), mas com atribuições distintas. Tal equívoco nas atribuições foi também observado por Cychon, Lichte e Köck (2015) na descrição da citrinamina B (**14**), análogo da com dois bromos da nagelamida H (**11**). A Figura 42 apresenta as propostas de estruturas dos íons fragmentos de análises MS/MS observados para o composto **11** (Figura A114 e Tabela A4, Apêndice).

Análises por UPLC-QToF-MS do composto citrinamina B (**14**) apresentou $[\text{M} + \text{H}]^+$ com massa acurada de m/z 740,0355 (massa exata: m/z 740,0357; erro de massa: -0,27 ppm; fórmula molecular: $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{Br}_2\text{N}_{11}\text{O}_5\text{S}^+$) (Figura A125-A126, Apêndice). A estrutura da citrinamina B (**14**) foi confirmada pela comparação dos dados de RMN de ^1H (Figura A127, Apêndice) com a literatura (CYCHON; LICHTTE; KÖCK, 2015) (Tabela 13). Os dados de fragmentação por MS/MS desse composto estão descritos no Apêndice (Figura A128 e Tabela A7), enquanto que as estruturas dos íons fragmentos de **14** estão na Figura 42.

Tabela 13. Dados de RMN de ^1H para nagelamida H (**11**) e citrinamina B (**14**) em DMSO- d_6 (^1H : 600 MHz).

Posição	11		14			
	δ_{C} , tipo Experimental	δ_{C} , tipo Literatura ^a	δ_{H} (J em Hz) Experimental	δ_{H} (J em Hz) Literatura ^a	δ_{H} (J em Hz) Experimental	δ_{H} (J em Hz) Literatura ^a
NH-1	-	-	12,68, s	12,71, s		11,81, s
NH-1'	-	-	12,68, s	12,72, s		11,80, s
2	105,1, C	104,7, C	-	-	7,05, dd (3,0, 1,5)	7,05, dd (2,8, 1,4)
2'	105,2, C	104,8, C	-	-	7,01, dd (3,0, 1,5)	7,01, dd (2,8, 1,4)
3	98,2, C	97,9, C	-	-		-
3'	98,3, C	97,9, C	-	-		-
4	113,1, CH	127,7, C	7,01, d (2,5)	7,00, s	6,91, dd (2,6, 1,8)	6,90, dd (2,4, 1,7)
4'	113,3, CH	127,8, C	6,98, d (2,7)	6,97, s	6,93, dd (2,6, 1,8)	6,93, dd (2,3, 1,7)
5	128,1, C	158,7, C	-	-		-
5'	127,9, C	158,7, C	-	-		-
6	159,3, C	-	-	-		-
6'	159,0, C	-	-	-		-
NH-7	-	-	8,46, t (5,7)	8,12, t (5,9)	8,47, m	8,44, t (5,7)
NH-7'	-	-	8,49, t (6,1)	8,21, t (5,9)	8,49, m	8,48, t (5,8)
8	39,4, CH ₂	40,1 ^c , CH ₂	3,90, brs	3,86 ^c , m 4,04 ^c , m	3,93, m	3,92, m
8'a			3,90, m		3,89, m	3,91, m
8'b	40,4, CH ₂	39,3 ^c , CH ₂	4,08, m	3,92 ^c , m	4,15, m	4,15, m
9	130,8, CH	124,7 ^c , CH	5,93, m	6,02 ^c , dt (15,2, 6,0)	5,93, brs	5,95, m
9'	130,2, CH	130,8 ^c , CH	6,14, m	5,99 ^c , dt (15,3, 6,2)	6,26, brs	6,14, m
10	124,9, CH	115,4 ^c , CH	5,93, m	6,15 ^c , d (15,2)	5,93, m	5,95, m
10'	115,5, CH	129,6 ^c , CH	6,14, m	5,90 ^c , d (15,3)	6,28, brs	6,26, d (16,1)
11	68,1, C	112,8 ^c , C	-	-		-
11'	124,0, C	69,72 ^c , C	-	-		-
NH-12	-	-	-	-		-
NH-12'	-	-	-	12,60, brs		-
13	167,5, C	167,3, C	-	-		-
13'	147,9, C	148,3, C	-	7,74, brs		-
NH-14	-	-	10,05, s	10,19, brs	9,98, s	10,04, s
NH-14'	-	-	-	13,02, brs	-	-
15	177,8, C	177,4, C	-	-		-
15'	123,8, C	123,1, C	-	-		-
NH-16	-	-	8,60 ^b , s 9,11 ^b , s	8,79, brs 9,11, brs	8,55, s 9,11, s	8,59, s 9,10, s
NH-16'	-	-	-	-		-

NH-1''	-	-	9,88, s	9,89, brs	-	9,85, s
2''a	40,6, CH ₂	40,3, CH ₂	3,53, m	3,56, m	3,54, m	3,55, m
2''b			3,67, m	3,65, m	3,68, m	3,69, m
3''a	48,7, CH ₂	48,2, CH ₂	2,78, m	2,81, t (7,1)	2,77, m	2,80, m
3''b			2,88, m		2,89, m	2,89, m

^aDados reportados sobre análises realizadas em DMSO-*d*₆ em um equipamento de 600 MHz. ^bNão foi possível atribuir os hidrogênios por ausência de correlações no HMBC. ^cPossibilidade de erros de atribuição.

Análise por UPLC-QToF-MS da mistura entre os compostos nagelamidas H2/H3 (**12/13**) apresentou [M + H]⁺ com massa acurada de *m/z* 817,9448 (Figuras A115-A116, Apêndice) (massa exata: *m/z* 817,9462; erro de massa: -1,71 ppm; fórmula molecular: C₂₄H₂₇Br₃N₁₁O₅S⁺). Apesar de estar em mistura, os dados de RMN de ¹H e ¹³C (Tabela 14 e Figuras A117-A122, Apêndice) mostraram claramente a semelhança entre a mistura de compostos **12/13** com o composto **11**. Foi possível observar que os compostos **12** e **13**, apesar de estarem em mistura, possuíam como única diferença a quantidade de bromos em cada anel pirrólico. Através das análises de RMN de ¹H e de HMBC, foi possível observar acoplamentos entre δ_H 7,04/δ_C 121,9 (CH-2') e δ_H 6,88/δ_C 112,3 (CH-4'), além de um acoplamento entre δ_H 7,01 (H-4) e δ_C 105,3 (C-2), mostrando a existência de dois bromos no pirrol do monômero superior (C-2 e C-3) e um bromo no pirrol do monômero inferior (C-3'), identificando assim a nagelamida H2 (**12**). No entanto, também foram observados acoplamentos entre δ_H 6,99/δ_C 121,8 (CH-2) e δ_H 6,92/δ_C 112,0 (CH-4), além de um acoplamento entre δ_H 6,97 (H-4') e δ_C 105,3 (C-2'), mostrando a existência de um bromo no pirrol do monômero superior (C-3) e dois bromos no monômero inferior (C-2' e C-3'), identificado como nagelamida H3 (**13**). Os íons fragmentos das análises MS/MS (Figura A123 e Tabelas A5-A6, Apêndice) foram extremamente úteis para a proposição das estruturas de **12** e **13**, uma vez que os íons fragmentos D e E (Figura 42) apresentam estruturas únicas para cada monômero observado, sendo possível diferenciar as estruturas **12** e **13** através desses íons fragmentos.

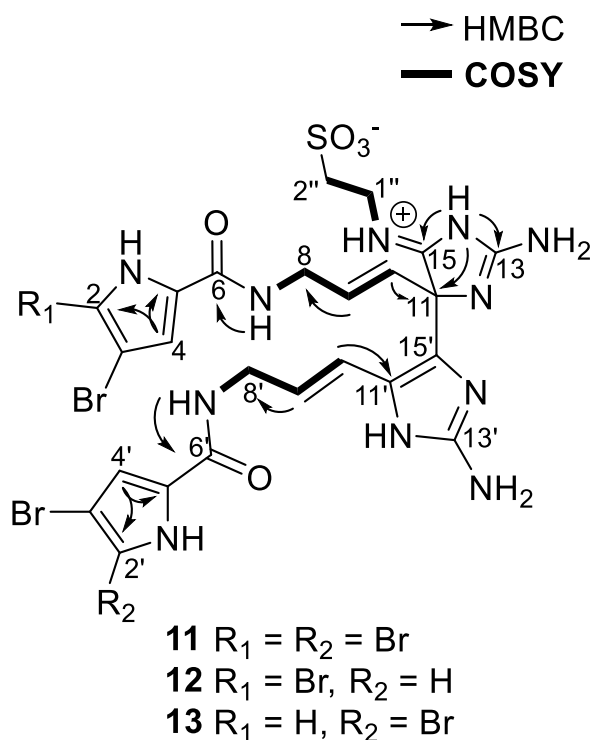
Tabela 14. Dados de RMN de ^1H para as nagelamidas H2 (**12**) e H3 (**13**), em DMSO- d_6 (^1H : 600 MHz).

Posição	12		13	
	δ_{C} , tipo	δ_{H} (<i>J</i> em Hz)	δ_{C} , tipo	δ_{H} (<i>J</i> em Hz)
NH-1	-	12,68, s	-	12,68, s
NH-1'	-	11,80, s	-	11,80, s
2	105,3, C	-	121,8, CH	6,99, m
2'	121,9, CH	7,04, dd (2,8, 1,3)	105,3, C	-
3	98,3, C	-	94,5, C	-
3'	95,4	-	98,4, C	-
4	113,2, CH	7,01, d (2,8)	112,0, CH	6,92, dd (2,6, 1,9)
4'	112,3, CH	6,88, dd (2,5, 1,3)	113,4, CH	6,97, m
5	128,1, C	-	126,8, C	-
5'	126,7, C	-	127,9, C	-
6	160,1, C	-	159,4, C	-
6'	158,9, C	-	159,9, C	-
NH-7	-	8,52, m	-	8,46, m
NH-7'	-	8,52, m	-	8,46, m
8	39,7, CH ₂	3,90, m	39,7, CH ₂	3,90, m
8'a	40,4, CH ₂	3,90, m	40,4, CH ₂	3,90, m
8'b	-	4,08, m	-	4,08, m
9	130,9, CH	5,93, m	130,9, CH	5,93, m
9'	130,6, CH	6,17, m	130,6, CH	6,17, m
10	124,9, CH	5,93, m	124,9, CH	5,93, m
10'	115,4, CH	6,17, m	115,4, CH	6,17, m
11	68,0, C	-	68,0, C	-
11'	124,2, C	-	124,2, C	-
NH-12	-	-	-	-
NH-12'	-	-	-	-
13	167,6, C	-	167,6, C	-
13'	147,9, C	-	147,9, C	-
NH-14	-	10,04 ^a , s	-	10,04 ^a , s
NH-14'	-	-	-	-
15	177,9, C	-	177,9, C	-
15'	124,2, C	-	124,2, C	-
NH-16	-	8,60 ^a , s 9,11 ^a , s	-	8,60 ^a , s 9,11 ^a , s
NH-16'	-	7,73 ^a , s	-	7,73 ^a , s
NH-1''	-	9,86, brs	-	9,86, brs
2''a	40,6, CH ₂	3,54, m	40,6, CH ₂	3,54, m

2''b	-	3,67, m	-	3,67, m
3''a	48,9, CH ₂	2,78, m	48,9, CH ₂	2,78, m
3''b	-	2,85, m	-	2,85, m

^aNão foi possível atribuir os hidrogênios por ausência de correlações no HMBC.

Figura 41. Estrutura e correlações chave para as nagelamidas H-H3 (**11-13**).



A caracterização química complementar da mistura entre a nagelamida H2 (**12**) e a nagelamida H3 (**13**) é: sólido amorfo marrom; $[\alpha]_D +61,66^\circ$ (c 0.12, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log e) 275 (4,54) nm; IV (filme em pastilha de Si) ν_{\max} 3649 3309 3130 2362 2339 2258 1652 1560 1521 1458 1436 1419 1365 1319 1132 1024 977 920 864 821 738 609 565 cm⁻¹. O espectro no IV dessa mistura está disponível na Figura A124, Apêndice.

A nagelamida H, a mistura das nagelamidas H2/H3 e a citrinamina B (**11-14**) não apresentaram atividade contra células de câncer de ovário (OVCAR3), IC₅₀ > 40 μM.

A literatura mostra que o composto nagelamida H (**11**) apresentou atividades antimicrobianas com MIC de 16,7, 33,3 e 33,3 μg/mL contra *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*, respectivamente, além de apresentar IC₅₀ de 46 μM na inibição da atividade da proteína fosfatase tipo 2A (ENDO *et al.*, 2004). A citrinamina B (**14**) foi testada pelo ensaio de difusão em ágar contra *Aspergillus niger*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* e *Micrococcus luteus*, sem atividade, no

entanto, contra *Mycobacterium phlei* foi observado zona de inibição. Além disso, nenhuma atividade para **14** foi observada em atividade de inibição de proliferação de células de fibroblastos de rato (L929) (CYCHON; LICHTER; KÖCK, 2015).

Figura 42. Estruturas propostas para os íons fragmentos das nagelamidas H-H3 (11-13) e citrinamina B (14).

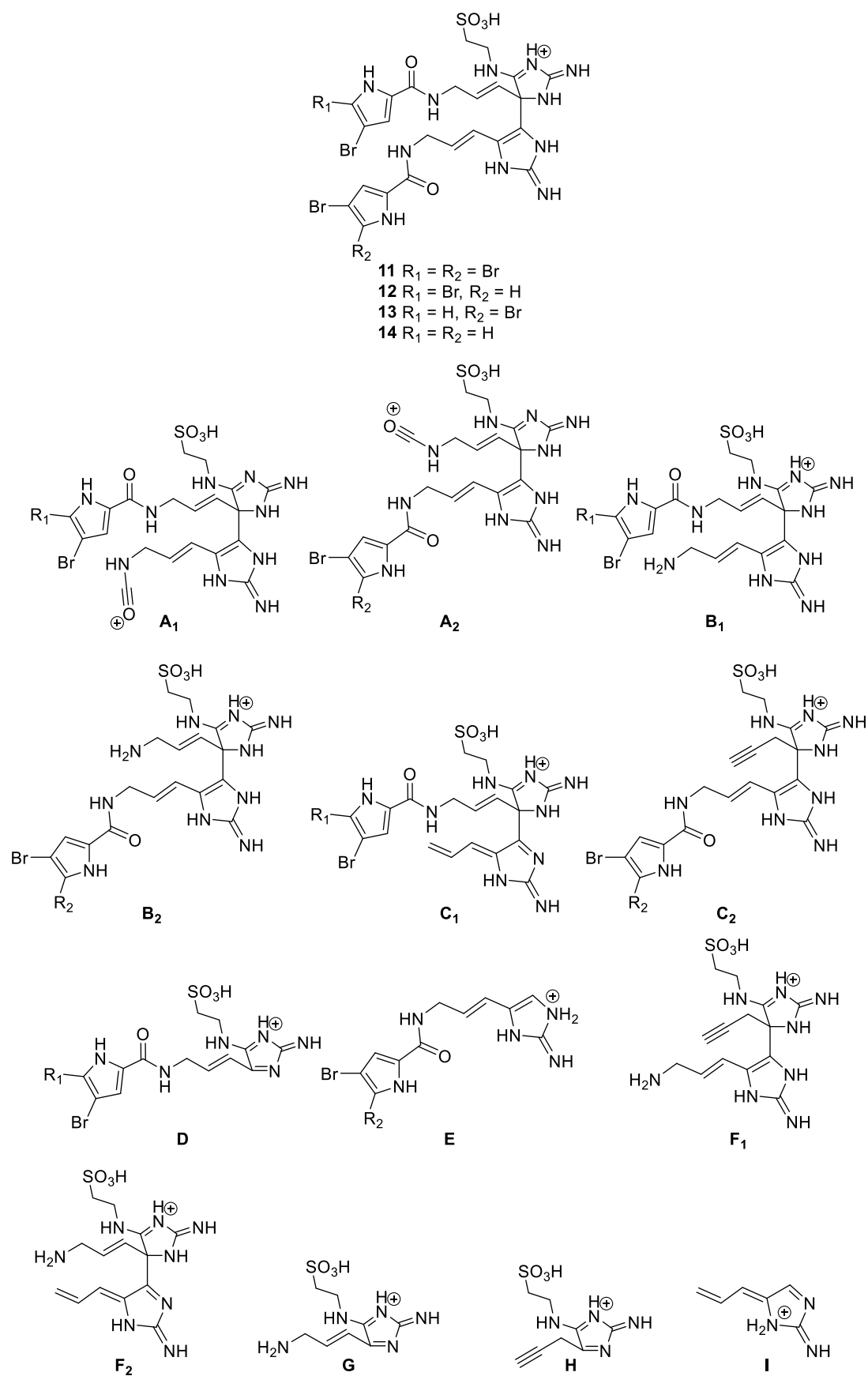
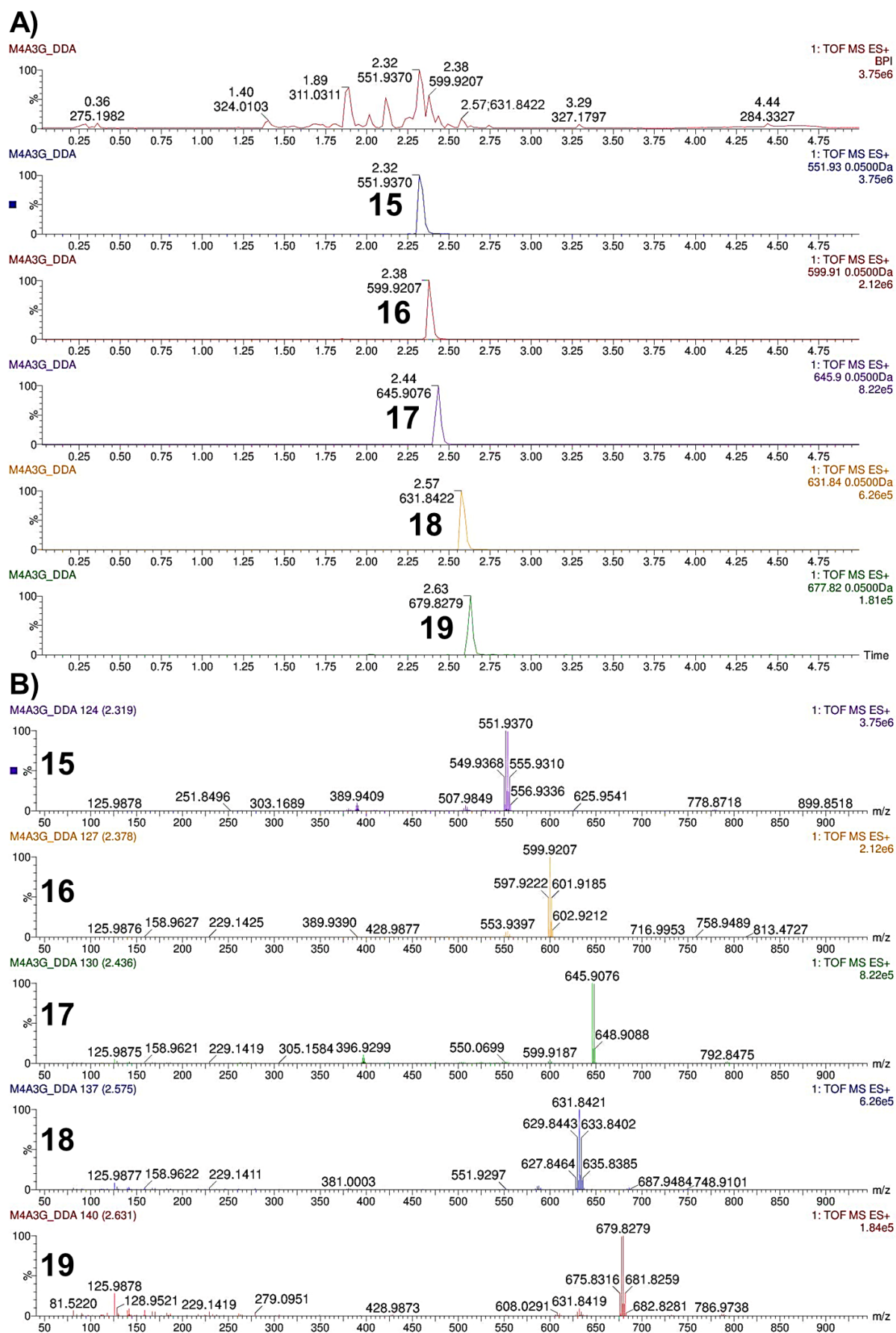


Figura 44. (A) Cromatogramas e (B) espectros de MS dos compostos 15-19.



Após três etapas de fracionamento a partir da fração M4A3G, foi possível o isolamento e a identificação dos compostos dispirina B (**15**), C (**16**) e D (**17**) através de análises de HRMS, HRMS/MS e RMN de ^1H , ^{13}C , bidimensionais e comparação com a literatura. As dispirinas E (**18**) e F (**19**) foram identificadas apenas por análises por HRMS e MS/MS.

A análise por UPLC-QToF-MS do composto dispirina B (**15**) apresentou $[\text{M} + \text{H}]^+$ com padrão isotópico 1:3:3:1 típico para três bromos e massa acurada de m/z 549,9341 (Figuras A129-A130, Apêndice) (massa exata: m/z 549,9335; erro de massa: 1,09 ppm; fórmula molecular: $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{Br}_3\text{N}_3\text{O}_2^+$). A desreplicação utilizando o DNP indicou como possibilidade o composto agelanesina C (Figura 45) (HERTIANI *et al.*, 2010). No entanto, a comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **15** (Tabela 15) (Figuras A132-A141) com os dados reportados na literatura para agelanesina C, indicaram que não se tratava do mesmo composto, embora houvesse semelhança estrutural. Os dados de **15** apresentaram maior semelhança quando comparados com o primeiro análogo isolado dessa classe, o composto dibromado dispirina (Figura 45). A análise dos espectros mono e bidimensionais de **15** mostra claramente a presença da porção carbonil 3-bromopirrólica (NH-1–C-6) e sua conexão com a amida NH-7 (ENDO *et al.*, 2004). O espectro COSY mostrou a conectividade de H-7–H-9, assim como entre H-17–H-22. A análise dos espectros de ^1H e ^{13}C mostrou a existência de um anel aromático 1,3,4,5-tetrassubstituído, com os deslocamentos químicos de ^{13}C sugerindo a presença de bromo nas posições C-12 e C-14 e oxigênio na posição C-15, além do espectro de RMN de ^1H mostrar dois hidrogênios singlete em δ_{H} 7,53 (H-11 e H-15). As correlações no espectro de HMBC entre H-9 e C-10, C-11 e C-15 permitiram conectar a porção etilamina (H-7–H-9) com o anel aromático (C-10–C-15), assim como a correlação entre H-17–C-15 permitiu a conexão entre o anel aromático (C-10–C-15) e a porção N,N-dimetilpropanamina (H-17–H-22). Após a elucidação estrutural foi possível afirmar que **15** se trata de um análogo inédito da dispirina com dois bromos no anel aromático. A análise do perfil de fragmentação por MS/MS (Figura A131, Apêndice) de **15** permitiu a identificação de alguns íons fragmentos característicos (Tabela 16 Figura 47), como as porções 3-(4-(2-aminoetil)-2,6-dibromofenoxi)-N,N-dimetilpropanamina (fragmento A) e porção bromopirrólica (fragmento D), os quais ajudam a localizar a posição dos bromos na estrutura.

A análise por UPLC-QToF-MS do composto dispirina C (**16**) apresentou $[\text{M} + \text{H}]^+$ com padrão isotópico 1:2:1 típico para dois bromos e massa acurada de m/z

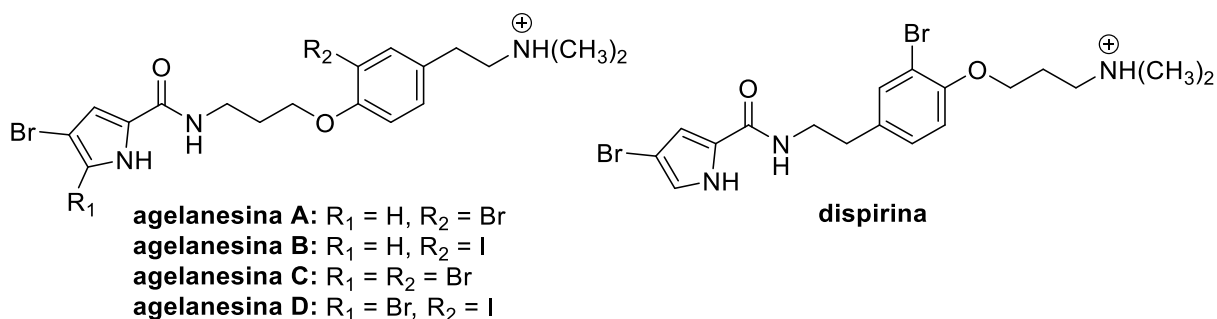
597,9210 (massa exata: m/z 597,9197; erro de massa: 2,17 ppm; fórmula molecular: $C_{18}H_{23}Br_2IN_3O_2^+$) (Figuras A143-A144, Apêndice). Os dados de RMN de 1H e ^{13}C de **16** (Figuras A145-A154, Apêndice) mostram alta similaridade com **15**, diferenciando-se apenas nos deslocamentos químicos do anel aromático tetrasubstituído. O deslocamento químico e multiplicidade de H-11 e H-15 sugeriu um anel aromático 1,3,4,5-tetrasubstituído, porém, com quatro substituintes distintos. Análise conjunta dos espectros mono e bidimensionais sugeriram que C-12 (δ_c 115,8) continua substituído por um átomo de bromo, enquanto que C-14 (δ_c 93,2) está substituído por um átomo de iodo. Tal afirmação encontra subsídio nos compostos iodados já descritos para a classe, como as agelanesinas B e D, as quais também apresentam deslocamento químico de ^{13}C inferior ao observado para os carbonos substituídos por bromo (HERTIANI *et al.*, 2010). A análise por perfil de fragmentação por MS/MS (Figura A155 e Tabela A8, Apêndice) também sugere a presença de um bromo e um iodo no anel aromático tetrasubstituído (fragmentos A, B1, B2, C1 e C2) (Figura 47).

A análise por UPLC-QToF-MS do composto dispirina D (**17**) apresentou $[M + H]^+$ com padrão isotópico 1:1 típico para um bromo e massa acurada de m/z 645,9065 (Figuras A157-A158, Apêndice) (massa exata: m/z 645,9058; erro de massa: 1,08 ppm; fórmula molecular: $C_{18}H_{23}BrI_2N_3O_2^+$). Os dados de RMN de 1H e ^{13}C de **17** (Figuras A159-A167, Apêndice) mostram alta similaridade com **15** e **16**, diferenciando apenas nos deslocamentos químicos do anel aromático tetrasubstituído. Assim como em **15**, o espectro de RMN de 1H de **17** mostra dois hidrogênios singleto em δ_H 7,71 (H-11 e H-15) no anel aromático 1,3,4,5-tetrasubstituído. O deslocamento químico no espectro de ^{13}C para os carbonos C-12 e C-14 em δ_c 91,6 sugerem a presença de iodo nessas posições. A análise por perfil de fragmentação por MS/MS (Figura A168 e Tabela A9, Apêndice) também sugere a presença de bromo apenas na porção pirrólica (fragmento D) (Figura 47). Esse é o primeiro relato de um análogo de dispirina ou agelanesina com dois átomos de iodo na estrutura.

Outros dois compostos, dispirinas E (**18**) e F (**19**), foram identificados apenas por análises por UPLC-QToF-MS e MS/MS. O composto dispirina E (**18**) apresentou $[M + H]^+$ com padrão isotópico 1:4:6:4:1 típico para quatro bromos e massa acurada m/z 627,8464 (massa exata: m/z 627,8441; erro de massa: 3,66 ppm; fórmula molecular: $C_{18}H_{22}Br_4N_3O_2^+$) (Figuras A170-A171, Apêndice). A análise do perfil de fragmentação de **18** (Figura A172 e Tabela A10 em Apêndice) mostrou que a porção bromopirrólica, fragmento D (Figura 47), possui dois bromos, enquanto que os outros

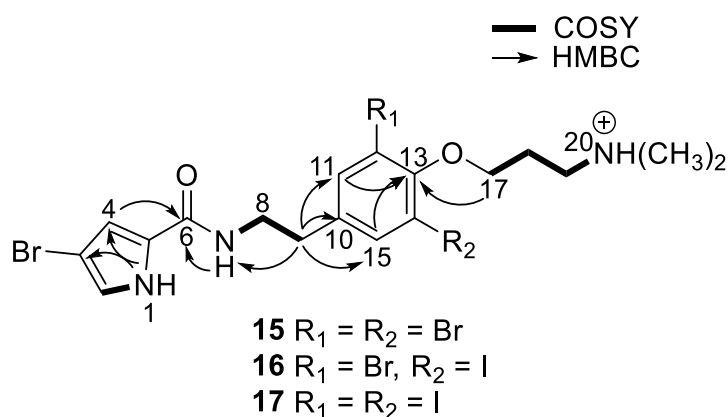
dois bromos estão presentes no anel aromático tetrasubstituído, fragmentos A-C (Figura 47). O composto dispirina F (**19**) apresentou $[M + H]^+$ com padrão isotópico 1:3:3:1 típico para três bromos e massa acurada de m/z 675,8316 (massa exata: m/z 675,8302; erro de massa: 2,07 ppm; fórmula molecular: $C_{18}H_{22}Br_3IN_3O_2^+$) (Figura A173-A174, Apêndice). A análise do perfil de fragmentação de **19** (Figura A175 e Tabela A11, Apêndice) mostrou que a porção bromopirrólica possui dois bromos, fragmento D (Figura 47), enquanto que o anel aromático tetrassubstituído possui um bromo e um iodo, fragmentos A-C (Figura 47).

Figura 45. Estruturas das agelanesinas A-D e dispirina.



Fonte: Adaptado de (PIÑA et al., 2007; HERTIANI et al., 2010)

Figura 46. Correlações-chave para as dispirinas B-D (**15-17**).



A caracterização química complementar das dispirinas B-D (**15-17**) é descrita a seguir:

Dispirina B (**15**): sólido amorfo marrom; UV (MeOH) λ_{max} (log e) 269 (4,41) nm; IV (filme em pastilha de Si) ν_{max} 3500-2900, 2885, 2713, 2486, 1693, 1631, 1568, 1531,

1384, 1323, 1255, 1172, 1128, 1006, 921, 829, 798, 738, 719, 605, 553, 518 cm^{-1} ; Espectro no IV está disponível na Figura A142, Apêndice.

Dispirina C (**16**): sólido amorfo marrom; UV (MeOH) λ_{max} (log e) 214 (4,77), 269 (4,36) nm; IV (filme em pastilha de Si) ν_{max} 3450-3060, 2935, 2879, 2708, 2385, 2127, 1789, 1710, 1568, 1531, 1469, 1384, 1323, 1249, 1199, 1026, 920, 833, 721, 605, 518 cm^{-1} ; Espectro no IV está disponível na Figura A156, Apêndice.

Dispirina D (**17**): sólido amorfo marrom; UV (MeOH) λ_{max} (log e) 223 (4,42), 269 (4,13) nm; IV (filme em pastilha de Si) ν_{max} 3360-3196, 2935, 2873, 2713, 2522, 2254, 1693, 1568, 1529, 1440, 1384, 1327, 1180, 1128, 1026, 921, 833, 721, 603; Espectro no IV está disponível na Figura A169, Apêndice.

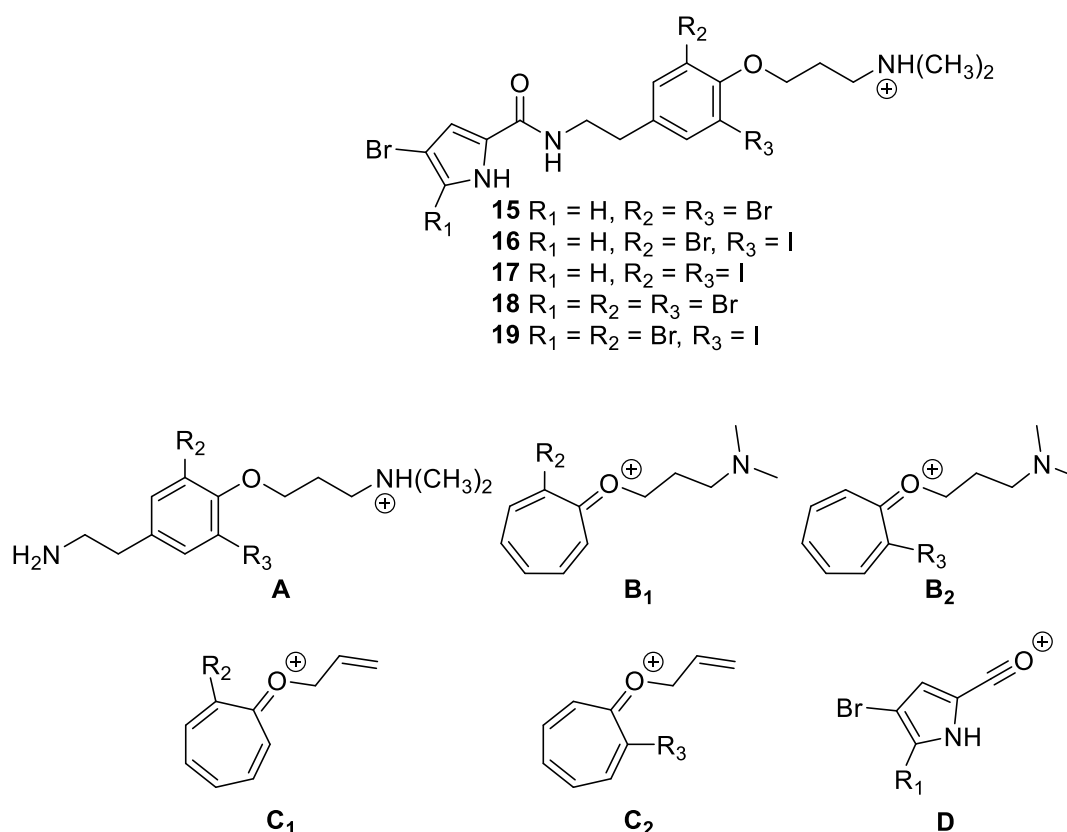
Tabela 15. Dados de RMN para os compostos dispirinas B (**15**), C (**16**) e D (**17**) em $\text{DMSO-}d_6$ (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz).

Posição	15		16		17	
	δ_{C} , tipo	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C} , tipo	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C} , tipo	δ_{H} (J em Hz)
NH-1		11.79, s		11.77, s		11.78, s
2	121.3, CH	6.95, dd (1.6, 3.0)	121.4, CH	6.95, dd (1.6, 3.0)	121.4, CH	6.95, dd (1.6, 2.9)
3	95.1, C		95.1, C		95.1, C	
4	111.6, CH	6.80, dd (1.6, 2.6)	111.6, CH	6.79, dd (1.6, 2.6)	111.6, CH	6.79, dd (1.6, 2.6)
5	127.0, C		127.0, C		127.0, C	
6	159.8, C		159.8, C		159.8, C	
NH-7		8.16, t (5.7)		8.15, t (6.0)		8.13, t (5.7)
8	39.6, CH_2	3.42, td (5.7, 6.8)	39.8, CH_2	3.40, td (6.0, 6.4)	39.7, CH_2	3.38, m
9	33.8, CH_2	2.77, t (6.8)	33.6, CH_2	2.74, t (6.4)	33.3, CH_2	2.71, t (6.5)
10	139.6, C		140.2, C		140.5, C	
11	133.2, CH	7.53, s	134.1, CH	7.53, d (2.0)	140.0, CH	7.71, s
12	117.3, C		115.8, C		91.6, C	
13	150.4, C		152.9, C		155.3, C	
14	117.3, C		93.2, C		91.6, C	
15	133.2, CH	7.53, s	139.2, CH	7.70, d (2.0)	140.0, CH	7.71, s
17	70.3, CH_2	3.97, t (5.8)	70.1, CH_2	3.94, t (5.8)	69.9, CH_2	3.92, t (5.6)
18	24.9, CH_2	2.15, m	25.0, CH_2	2.17, m	25.1, CH_2	2.19, m
19	54.5, CH_2	3.33, m	54.6, CH_2	3.34, t (8.3)	54.7, CH_2	3.36, m
NH-20		9.91, s		9.74, s		9.65, s
21 e 22	45.5, CH_3	2.83, s	42.5, CH_3	2.83, s	42.5, CH_3	2.84, s

Tabela 16. Íons observados nos espectros MS/MS do composto dispirina B (**15**) a partir dos íons precursores de m/z 549,93 e m/z 553,94.

Íon fragmento	Fórmula	m/z 549,93			m/z 553,94		
		Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)	Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)
A	$C_{13}H_{21}Br_2N_2O^+$	379,0031	3,96	9,49	381,0011	4,19	13,53
		381,0007	3,14	8,41	382,9995	5,22	6,84
B1/B2	$C_{12}H_{17}BrNO^+$	270,0504	5,55	17,41	270,0501	4,44	11,67
		272,0484	5,88	5,08	272,0486	6,61	17,13
C1/C2	$C_{10}H_{10}BrO^+$	224,9927	7,55	100,00	224,9924	6,22	70,41
		226,9906	7,04	28,71	226,9906	7,05	100,00
D	$C_5H_3BrNO^+$	171,9404	6,39	4,48	171,9403	5,81	3,45
		173,9382	5,17	1,25	173,9383	5,75	4,67

Figura 47. Proposta de fragmentação das dispirinas B-F (**15-19**)



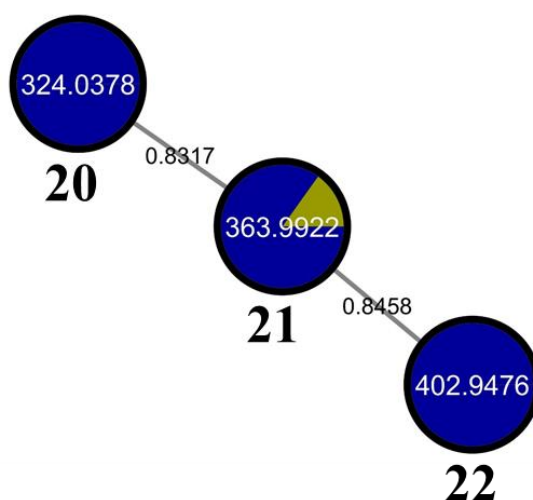
As dispirinas B-D (**15-17**) não apresentaram atividade contra células de câncer de ovário (OVCAR3), $IC_{50} > 40 \mu M$.

3.4.6 Identificação das disparamidas A-C (**20-22**)

A investigação de um pequeno *cluster* (Figura 48) permitiu a identificação dos *m/z feature* 342,0378, 363,9922 e 402,9476. Os dados MS¹ da fração M4A4K (Figura 50) mostraram que os *m/z features* 342,0378, 363,9922 e 402,9476 observados correspondem às [M + 2H]²⁺, tendo como [M + H]⁺ *m/z* 645,0680, *m/z* 722,9786 e *m/z* 800,8871 de composto com 2, 3 e 4 bromos, respectivamente. A desreplicação manual dos compostos no DNP não indicou nenhuma possibilidade para alcalóides bromopirrólicos.

Após duas etapas de fracionamento a partir da fração M4A4K, foi possível o isolamento e a identificação dos compostos disparamidas A (**20**) e B (**21**) através de análises de HRMS, HRMS/MS e RMN de ¹H, ¹³C e bidimensionais. O composto disparamida C (**22**) foi identificado apenas por análises de HRMS e HRMS/MS.

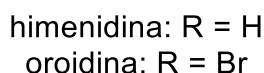
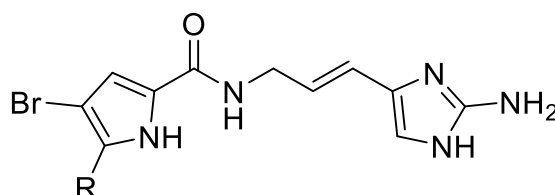
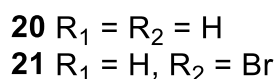
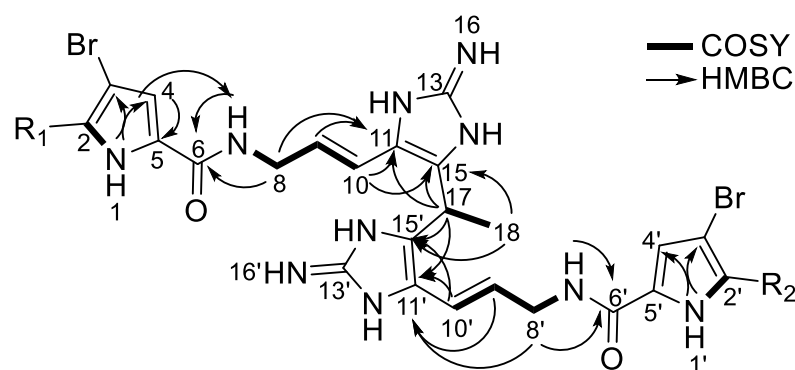
Figura 48. Cluster das disparamidas A-C (**20-22**).



A análise por UPLC-QToF-MS do composto disparamida A (**20**) apresentou [M + H]⁺ com padrão isotópico 1:2:1 típico para dois bromos e massa acurada de *m/z* 645,0662 (Figuras A176-A177, Apêndice) (massa exata: *m/z* 645,0680; erro de massa: -2,79 ppm; fórmula molecular: C₂₄H₂₇Br₂N₁₀O₂⁺). O espectro de RMN de ¹H (Tabela 17) (Figuras A178-A187, Apêndice) mostrou um singleto em δ_H 11,79 (NH-1 e 1'), um tripleto em 8,37 (NH-7 e 7'), três singletos em δ_H 7,20 (NH-12 e 12'), δ_H 7,03 (NH-14 e 14') e δ_H 7,11 (NH-16 e 16'), dois duplos dubletos aromáticos em δ_H 6,98 (H-2 e 2') e δ_H 6,85 (H-4 e 4'), dois sinais de dupla ligação em δ_H 6,33 (H-10 e 10') e δ_H 6,03 (H-9 e 9'), um sinal metínico em δ_H 4,47 (H-17), um sinal metilênico em δ_H 3,93

(H-8 e 8') e uma metila em δ_H 1,49 (H-18). O espectro de RMN de ^{13}C revelou doze sinais, sendo um sinal de carbono de amida δ_C 159,7 (C-6 e 6'), um sinal carbono guanidínico em δ_C 147,7 (C-13 e 13'), oito sinais de carbonos aromáticos e de duplas ligações entre δ_C 127,5 – 95,2, um carbono de metínico em δ_C 25,1 (C-17) e uma metila em δ_C 18,7 (C-18). A integração dos sinais dos hidrogênios sugeriu um plano de simetria. A análise dos espectros de RMN mono- e bidimensionais mostrou as correlações da porção carbonil-3-bromopirrólica (NH-1–C-6 and NH-1'–C-6') (ENDO *et al.*, 2004). O espectro COSY mostrou a conexão entre NH-7–H-10 e entre NH-7'–H-10'. As duplas ligações C-9–C-10 e C-9'–C-10' foi deduzida como possuindo configuração geométrica *E* por conta da constante de acoplamento $^1H-^1H$ (15,8 Hz). O espectro HMBC mostrou correlações entre H-8/H-8', H-9/H-9', H-10/H-10' e H-17 com C-11/C-11', além de correlações entre H-10/H-10', H-17 e H-18 com C-15/C-15', revelando uma conexão entre um grupo etilideno e dois grupos 2-aminoimidazol, presentes em duas subestruturas de himenidina (Figura 49). A análise do perfil de fragmentação por MS/MS de **20** (Tabela 18) (Figura A188, Apêndice) permitiu a identificação de íons característicos com um bromo, fragmentos A-C, e íons característicos do dímero, fragmentos D-H (Figura 51). Com a estrutura elucidada, disparamida A (**20**) se apresenta como um dímero bromopirrólico com esqueleto inédito.

Figura 49. Correlações-chave para as disparamidas A-B (**20-21**) e estrutura da himenidina e oroidina.



A análise por UPLC-QToF-MS do composto disparamida B (**21**) apresentou $[M + H]^+$ com padrão isotópico 1:3:3:1 típico para três bromos e massa acurada de m/z 722,9767 (Figuras A190-A191, Apêndice) (massa exata: m/z 722,9785; erro de massa: -2,49 ppm; fórmula molecular: $C_{24}H_{26}Br_3N_{10}O_2^+$). Os espectros de RMN de 1H e ^{13}C de **21** (Figuras A192-A202, Apêndice) mostraram grande similaridade quando comparados com os espectros de **20**. O espectro de RMN de 1H de **21** mostrou um duplete em δ_H 6,93 (H-4') que não foi observado para **20**. O espectro de RMN de ^{13}C de **21** mostrou sinais em δ_C 98,1 (C-3'), δ_C 104,9 (C-2') e δ_C 112,9 (C-4') que não foram observados para **20**. A análises dos dados de RMN mono e bidimensionais mostraram que os sinais adicionais observados são de uma porção carbonil-2,3-dibromopirrólica. Os demais sinais observados tanto nos espectros de 1H e ^{13}C , como nos espectros de HSQC, COSY e HMBC coincidem com a estrutura elucidada para **20**. Assim, a estrutura **21** se trata de um dímero composto por um monômero de himenidina (**4**) e um monômero de oroidina (Figura 49) unidos por um grupo etilideno. A análise do perfil de fragmentação por MS/MS de **21** (Figura A203 e Tabela A12,

Apêndice) apresentou íons fragmentos com um e com dois bromos, fragmentos A-C, e íons fragmentos característicos para o dímero, fragmentos D-H (Figura 51). O composto disparamida B (**21**) se apresenta como um composto inédito, possuindo o mesmo esqueleto da disparamida A (**20**).

A análise por UPLC-QToF-MS do composto disparamida C (**22**) apresentou $[M + H]^+$ com padrão isotópico 1:4:6:4:1 típico para quatro bromos e massa acurada de m/z 800,8874 (Figuras A205-A206) (massa exata: m/z 800,8890; erro de massa: -1,99 ppm; fórmula molecular: $C_{24}H_{25}Br_4N_{10}O_2^+$). Não foi possível isolar o composto **22** em quantidade o suficiente para realizar as análises por RMN necessárias para a caracterização completa do composto. Portanto, a estrutura do composto **22** foi proposta apenas pela análise do perfil de fragmentação por MS/MS (Figura A206 e Tabela A13, Apêndice) e comparação com os perfis de fragmentação observados para os compostos **20** e **21** (Figura 51). Os íons fragmentos de A-C observados correspondem apenas a subunidades contendo dois átomos de bromo, enquanto que os demais íons fragmentos, fragmentos D-H, coincidem com os íons fragmentos D-H observados para os compostos **20-21** (Figura 51). Assim, foi proposto que a disparamida C (**22**) é um dímero de duas subunidade de oroidina unidos por um etilideno, sendo um análogo das disparamidas A-B (**20-21**) com quatro bromos.

Figura 50. (A) Cromatogramas e (B) espectros MS das disparamidas A-C (20-22).

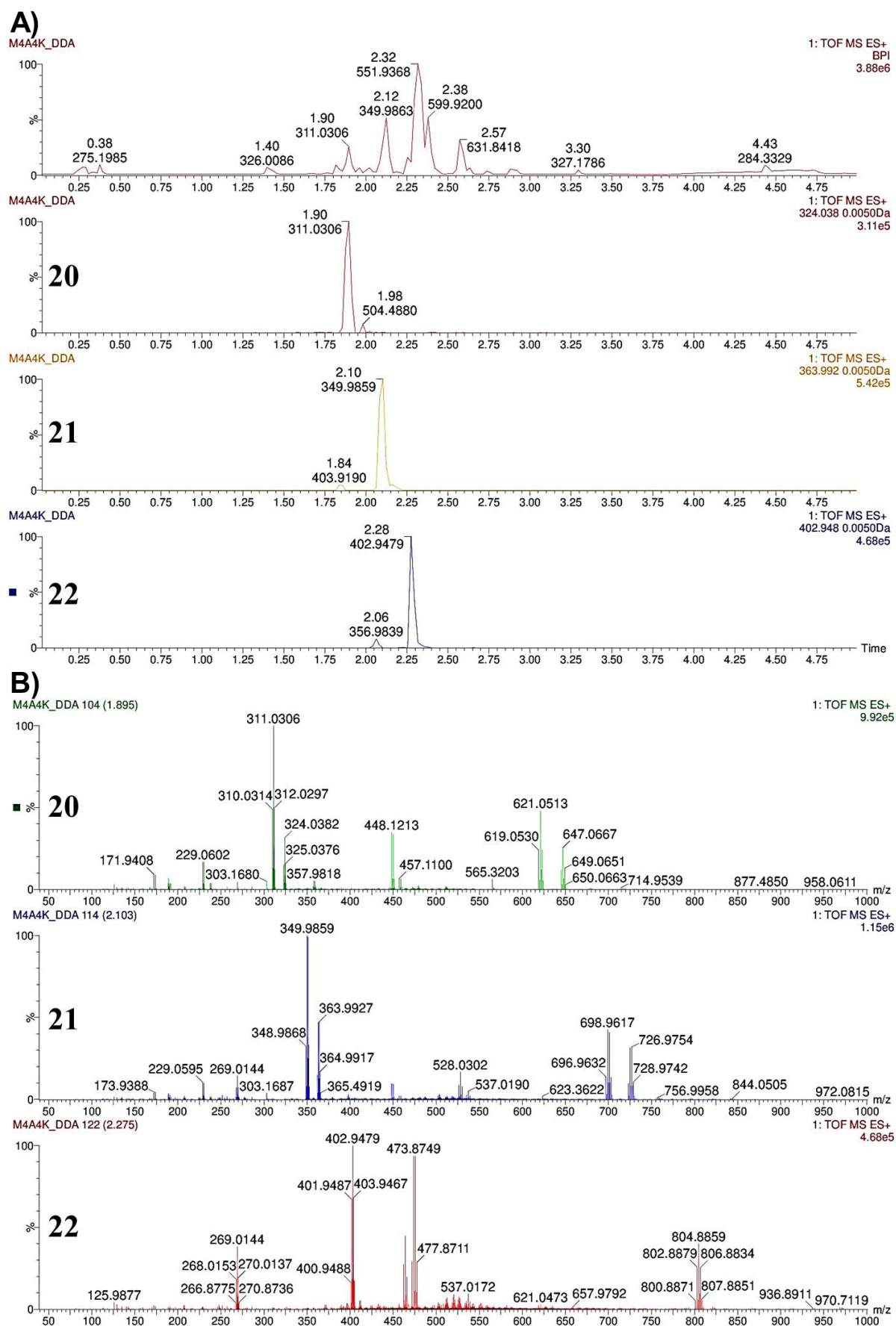


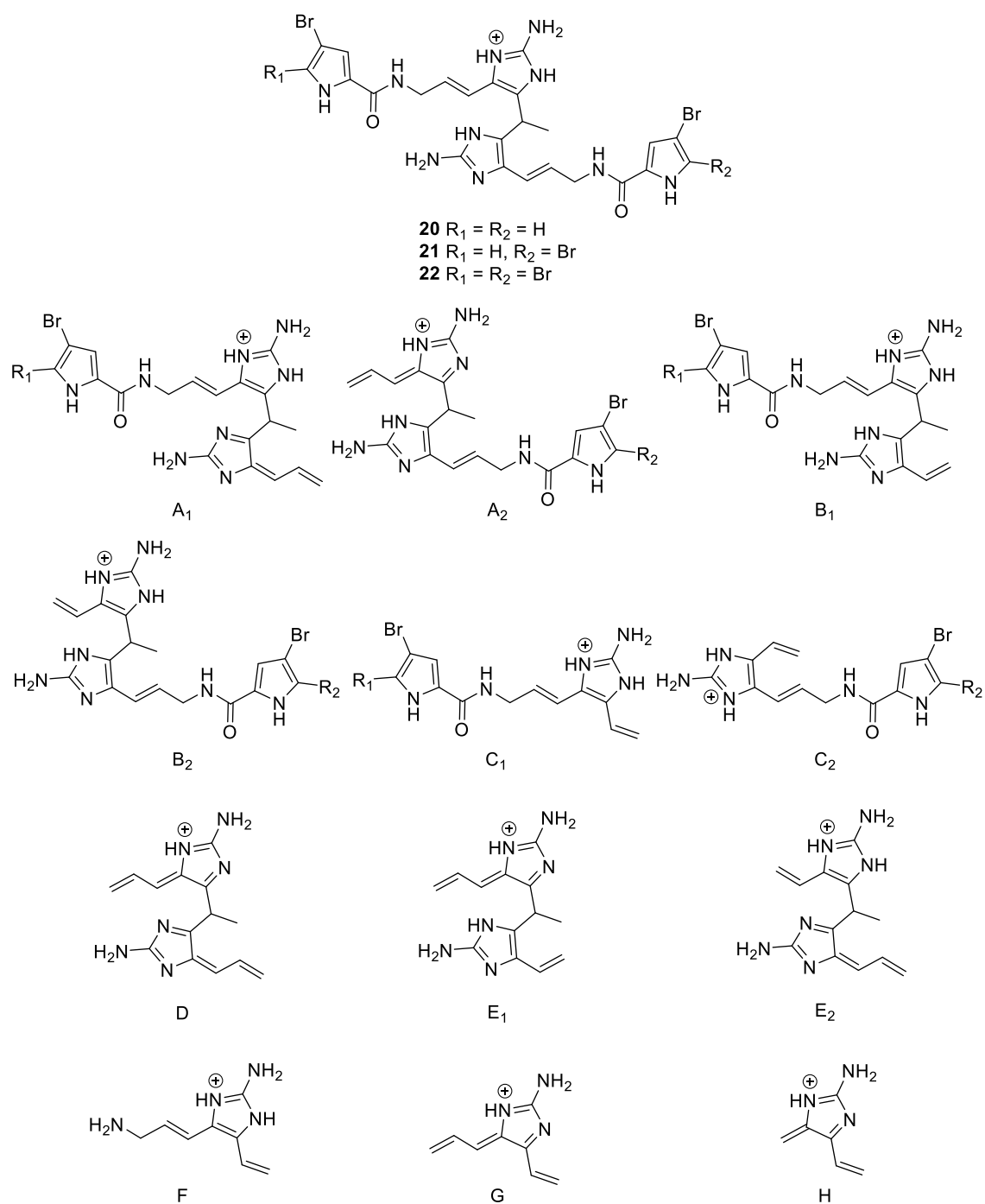
Tabela 17. Dados de RMN dos compostos disparamidás A (**20**) e B (**21**) em DMSO- d_6 (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz)

Posição	20		21	
	δ_{C} , tipo	δ_{H} (J em Hz)	δ_{C} , tipo	δ_{H} (J em Hz)
NH-1		11.78, s		11.79, s
NH-1'		11.78, s		12.59, s
2	121.6, CH	6.98, dd (1.6, 2.9)	121.5, CH	6.98, dd (1.6, 2.9)
2'	121.6, CH	6.98, dd (1.6, 2.9)	104.9, C	
3	95.2, C		95.1, C	
3'	95.2, C		98.1, C	
4	111.8, CH	6.85, dd (1.6, 2.6)	111.7, CH	6.85, dd (1.6, 2.6)
4'	111.8, CH	6.85, dd (1.6, 2.6)	112.9, CH	6.93, d (2.5)
5	126.8, C		126.8, C	
5'	126.8, C		128.1, C	
6	159.7, C		159.6, C	
6'	159.7, C		158.2, C	
NH-7		8.37, t (5.7)		8.37, t (5.7)
NH-7'		8.37, t (5.7)		8.40, t (5.8)
8 e 8'	40.3, CH ₂	3.93, dd (5.7, 6.0)	40.6, CH ₂	3.94, dd (5.3, 5.7)
9 e 9'	127.5, CH	6.03, dt (6.0, 15.8)	127.4, CH	6.03, m
10	115.7, CH	6.33, d (15.8)	115.8, CH	6.33, dd (5.7, 15.9)
10'	115.7, CH	6.33, d (15.8)	115.7, CH	6.33, dd (5.7, 15.9)
11 e 11'	120.2, C		120.2, C	
NH-12 e NH-12'		7.20 ^a , s		7.21 ^a , s
13 e 13'	147.7, C		147.8, C	
NH-14 e NH-14'		7.03 ^a , s		7.04 ^a , s
15 e 15'	123.9, C		123.9, C	
NH-16 e NH-16'		7.11 ^a , s		7.13 ^a , s
17	25.1, CH	4.47, qua (7.2)	25.0, CH	4.47, qua (7.2)
18	18.7, CH ₃	1.49, d (7.2)	18.7, CH ₃	1.48, d (7.2)

^a Sinais dos NH-12, NH-14 e NH-16, NH-12', NH-14' e NH-16' podem ser intercambiáveis.

Tabela 18. Íons observados nos espectros MS/MS do composto disparamida A (**20**) a partir dos íons precursores de m/z 645,06 e m/z 649,06.

Íon fragmento	Fórmula	m/z 645,06			m/z 649,06		
		Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)	Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)
[M + H]⁺	C ₂₄ H ₂₇ Br ₂ N ₁₀ O ₂ ⁺	645,0657	-3,56	2,22	649,0624	-2,31	5,57
		647,0657	-0,46	5,05			
A₁/A₂	C ₁₉ H ₂₂ BrN ₈ O ⁺	457,1098	0,66	30,24	459,1081	1,52	38,45
		459,1082	1,74	17,88			
B₁/B₂	C ₁₈ H ₂₂ BrN ₈ O ⁺	445,1098	0,67	3,43	447,1071	-0,67	4,05
		447,1057	-3,80	1,80			
C₁/C₂	C ₁₃ H ₁₅ BrN ₅ O ⁺	336,0458	0,89	49,00	338,0442	2,07	63,57
		338,0445	2,96	28,59			
D	C ₁₄ H ₁₇ N ₆ ⁺	269,1516	2,60	62,57	269,1515	2,23	54,46
E₁/E₂	C ₁₃ H ₁₇ N ₆ ⁺	257,1510	0,39	10,63	257,1514	1,94	9,55
F	C ₈ H ₁₃ N ₄ ⁺	165,1143	4,84	32,99	165,1141	3,63	32,43
G	C ₈ H ₁₀ N ₃ ⁺	148,0880	7,43	100,00	148,0879	6,75	100,00
H	C ₆ H ₈ N ₃	122,0722	7,39	37,91	122,0722	7,37	38,54

Figura 51. Fragmentos propostos para as disparamidas A-C (**20-22**).

A caracterização química complementar das disparamidas A (**20**) e B (**21**) estão descritas à seguir:

Disparamida A (**20**): sólido amorfo marrom; UV (MeOH) λ_{max} (log e) 273 (4,12) nm; IV (filme em pastilha de Si) ν_{max} 3630-2600, 1714, 1429, 1199, 1024, 1002, 921, 835, 800, 721, 599 cm^{-1} ; Espectro no IV está disponível na Figura A189, Apêndice.

Disparamida B (**21**): sólido amorfo marrom; $[\alpha]_D -0,89^\circ$ (c 0,18, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log e) 275 (4,11), 269 (4,36) nm; IV (filme em pastilha de Si) ν_{\max} 3660-2540, 1714, 1633, 1435, 1319, 1199, 1024, 837, 763, 723, 518 cm^{-1} ; Espectro no IV está disponível na Figura A204, Apêndice.

Levantamento bibliográfico realizado utilizando as revisões *Marine Natural Products* entre 1984-2021 (BLUNT *et al.*, 2021; FAULKNER, 2002) indicou que a dimerização de subunidades de himenidina/oroidina pode ocorrer de diversas maneiras, como via ciclizações, ligações diretas ou indiretas entre as subunidades. Nas ageliferinas (**8-10**) ocorre a ciclização do 2-aminoimidazol de uma subunidade com dupla ligação entre C-9 e C-10 da outra subunidade. Nas nagelamidas H-H3 e citrinamina B (**11-14**), existe uma ligação direta entre as subunidades via C-11 e C-15'. Enquanto isso, as disparamidas A-C (**20-22**) constituem o primeiro relato de dímeros de himenidina/oroidina com ambas subunidades conectadas, indiretamente, apenas por C-15/C-15'.

As disparamidas A e B (**20** e **21**) não apresentaram atividade contra células de câncer de ovário (OVCAR3), $\text{IC}_{50} > 40 \mu\text{M}$.

3.5 CONCLUSÃO

O FBMN se mostrou muito eficiente como ferramenta de processamento e visualização de dados de LC-MS² de um extrato de *Agelas dispar* largamente pré-fracionado. O uso concomitante do FBMN e ferramentas de desreplicação como as bibliotecas *in-silico*, *in-house* e do GNPS, possibilitaram a anotação de diversos compostos já conhecidos, possibilitando a priorização de composto não descritos para a espécie. Esse é o primeiro relato de identificação das previamente descritas ageliferinas (**8-10**), nagelamida H (**11**), citrinamina B (**14**), das inéditas nagelamidas H2-H3 (**12-13**), dispirinas B-F (**15-19**) e do esqueleto inédito das disparamidas A-C (**20-22**). Esse estudo da esponja marinha *Agelas dispar* mostrou que ferramentas quimioinformáticas podem ser muito úteis para a desreplicação e para a descoberta de metabólitos inéditos, mesmo em espécies já previamente estudadas. Além disso, o composto bromoageliferina (**9**) apresentou relevante atividade citotóxica.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As esponjas marinhas do litoral brasileiro apresentam um relevante potencial biotecnológico. A recorrente descoberta de novos metabólitos secundários demonstra o potencial químico desses animais para a prospecção de compostos bioativos. O estudo quimicamente guiado de esponjas marinhas é uma relevante contribuição para exploração da quimiodiversidade brasileira, podendo ser útil para futuros estudos taxonômicos, ecológicos e farmacológicos. A exploração de compostos minoritários se torna importante para o reestudo químico de espécies, uma vez que os compostos majoritários já foram descritos. Embora tenhamos ferramentas extremamente úteis para elucidação estrutural, como RMN, MS e derivatizações químicas, a determinação estrutural de produtos naturais complexos segue sendo desafiadora.

A utilização de ferramentas metabolômicas permite avaliar tanto uma grande quantidade de amostras, quanto explorar com maior profundidade um determinado organismo escolhido. Isto possibilita uma vasta gama de aplicações dessas ferramentas e abre caminhos até então dificilmente exploráveis, como o mapeamento químico das espécies de esponjas do litoral brasileiro, a investigação do metabolismo de espécies invasoras, a influência das mudanças climáticas na fauna marinha brasileira, a bioprospecção de novos candidatos a fármacos a partir de grandes coleções de organismos e/ou da exploração de compostos minoritários, entre outros. O contínuo desenvolvimento de novas ferramentas e diferentes abordagens de ferramentas já desenvolvidas são extremamente relevantes para a contínua exploração de recursos genéticos da Amazônia Azul.

REFERÊNCIAS

ARNDT, H.-D.; RIEDRICH, M. Synthesis of marine alkaloids from the oroidin family. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 47, n. 26, p. 4785–4788, 2008.

ASSMANN, M.; LICHTER, E.; PAWLIK, J.; KOECK, M. Chemical defenses of the Caribbean sponges *Agelas wiedenmayeri* and *Agelas conifera*. **Marine Ecology Progress Series**, Oldendorf, v. 207, p. 255-262, 2000

BARAN, P. S.; LI, K.; O'MALLEY, D. P.; MITSOS, C. Short, enantioselective total synthesis of sceptrin and ageliferin by programmed oxaquadracyclane fragmentation. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 45, n. 2, 249–252, 2006.

BARAN, P. S.; O'MALLEY, D. P.; ZOGRAFOS, A. L. Sceptrin as a potential biosynthetic precursor to complex pyrrole–imidazole alkaloids: the total synthesis of ageliferin. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 43, n. 20, p. 2674–2677, 2004.

BERLINCK, R. G. S.; HATANO, T.; OKUDA, T.; YOSHIDA, T. Some aspects of guanidine secondary metabolites. *In*: FORTSCHRITTE der Chemie organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Wien: Springer-Verlag, 1995. p. 119-295.

BERLINCK, R. G. S.; MONTEIRO, A. F.; BERTONHA, A. F.; BERNARDI, D. I.; GUBIANI, J. R.; SLIVINSKI, J.; MICHALISKI, L. F.; TONON, L. A. C.; VENANCIO, V. A.; FREIRE, V. F. Approaches for the isolation and identification of hydrophilic, light-sensitive, volatile and minor natural products. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 36, n. 7, p. 981–1004, 2019.

BICKMEYER, U. Bromoageliferin and dibromoageliferin, secondary metabolites from the marine sponge *Agelas conifera*, inhibit voltage-operated, but not store-operated calcium entry in PC12 cells. **Toxicon**, Oxford, v. 45, n. 5, p. 627–632, 2005.

BLUNT, J. W.; CARROLL, A. R.; COPP, B. R.; DAVIS, R. A.; KEYZERS, R. A.; PRINSEP. Marine natural products. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 38, p. 362-413, 2021 e anteriores.

BORNANCIN, L.; ALONSO, E.; ALVARIÑO, R.; INGUIMBERT, N.; BONNARD, I.; BOTANA, L. M.; BANAIGS, B. Structure and biological evaluation of new cyclic and acyclic laxaphycin-A type peptides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 27, n. 10, p. 1966–1980, 2019.

CAFIERI, F.; FATTORUSSO, E.; MAHAJNAH, Y.; MANGONI, A. 6-Bromo-5-hydroxy-3-indolecarboxyaldehyde from the Caribbean sponge *Oceanapia bartschi*. **Zeitschrift fur Naturforschung. Section B: journal of chemical sciences**, Berlin, v. 48, n. 10, p. 1408–1410, 1993.

CAFIERI, F.; FATTORUSSO, E.; MANGONI, A.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. Dispacamides, anti-histamine alkaloids from Caribbean *Agelas* sponges.

Tetrahedron Letters, Oxford, v. 37, n. 20, p. 3587–3590, 1996.

CAFIERI, F.; FATTORUSSO, E.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. Novel betaines from the marine sponge *Agelas dispar*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 61, n. 9, p. 1171–1173, 1998a.

CAFIERI, F.; FATTORUSSO, E.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. Novel bromopyrrole alkaloids from the sponge *Agelas dispar*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 61, n. 1, p. 122–125, 1998b.

CAI, T.; GUO, Z.-Q.; XU, X.-Y.; WU, Z.-J. Recent (2000-2015) developments in the analysis of minor unknown natural products based on characteristic fragment information using LC-MS. **Mass Spectrometry Reviews**, Hoboken, v. 37, n. 2, p. 202–216, 2018.

CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; WULFF, N. A.; PALMA, M. S. Sequenciamento de peptídeos usando espectrometria de massas: um guia prático. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 669–675, 2008.

CARROLL, A. R.; NGO, A.; QUINN, R. J.; REDBURN, J.; HOOPER, J. N. A. Petrosamine B, an inhibitor of the *Helicobacter pylori* enzyme aspartyl semialdehyde dehydrogenase from the Australian sponge *Oceanapia* sp. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 68, n. 5, p. 804–806, 2005.

CHEN, S.; HUANG, G.; LIAO, W.; GONG, S.; XIAO, J.; BAI, J.; WENDY HSIAO, W. L.; LI, N.; WU, J. L. Discovery of the bioactive peptides secreted by *Bifidobacterium* using integrated MCX coupled with LC-MS and feature-based molecular networking. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 347, 2021.

CYCHON, C.; LICHTÉ, E.; KÖCK, M. The marine sponge *Agelas citrina* as a source of the new pyrrole-imidazole alkaloids citrinamines A-D and N-methylagelongine. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, Frankfurt am Main, v. 11, p. 2029–2037, 2015.

D'AMBROSIO, M.; GUERRIERO, A.; DEBITUS, C.; RIBES, O.; PUSSET, J.; LEROY, S.; PIETRA, F. Agelastatin a, a new skeleton cytotoxic alkaloid of the oroidin family. Isolation from the axinellid sponge *Agelas dendromorpha* of the coral sea. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, Cambridge, n. 16, p. 1305, 1993.

DAVIS, R. A.; MANGALINDAN, G. C.; BOJO, Z. P.; ANTEMANO, R. R.; RODRIGUEZ, N. O.; CONCEPCION, G. P.; SAMSON, S. C.; DE GUZMAN, D.; CRUZ, L. J.; TASDEMIR, D.; HARPER, M. K.; FENG, X.; CARTER, G. T.; IRELAND, C. M. Microcionamides A and B, bioactive peptides from the philippine sponge *Clathria (Thalysias) abietina*. **The Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 69, n. 12, p. 4170–4176, 2004.

DE BARROS, L. V.; SANTOS, G. G.; PINHEIRO, U. *Clathria (Clathria)* Schmidt,

1862 from Brazil with description of a new species and a review of records (Poecilosclerida: Demospongiae: Porifera). **Zootaxa**, Auckland, v. 3640, n. 2, p. 284–295, 2013.

DE SOUZA, R. T. M. P.; FREIRE, V. F.; GUBIANI, J. R.; FERREIRA, R. O.; TRIVELLA, D. B. B.; MORAES, F. C.; PARADAS, W. C.; SALGADO, L. T.; PEREIRA, R. C.; AMADO FILHO, G. M.; FERREIRA, A. G.; WILLIAMS, D. E.; ANDERSEN, R. J.; MOLINSKI, T. F.; BERLINCK, R. G. S. Bromopyrrole alkaloid inhibitors of the proteasome isolated from a *Dictyonella* sp. Marine sponge collected at the Amazon River mouth. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 81, n. 10, p. 2296–2300, 2018.

DING, H.; ROBERTS, A. G.; HARRAN, P. G. Total synthesis of ageliferin via acyl N-amidinylium ion rearrangement. **Chemical Science**, Cambridge, v. 4, n. 1, p. 303–306, 2013.

DJOUMBOU-FEUNANG, Y.; PON, A.; KARU, N.; ZHENG, J.; LI, C.; ARNDT, D.; GAUTAM, M.; ALLEN, F.; WISHART, D. S. CFM-ID 3.0: Significantly improved ESI-MS/MS prediction and compound identification. **Metabolites**, Basel, v. 9, n. 4, p. 1–23, 2019.

EDER, C.; PROKSCH, P.; WRAY, V.; VAN SOEST, R. W. M.; FERDINANDUS, E.; PATTISINA, L. A.; SUDARSONO. New bromopyrrole alkaloids from the Indopacific sponge *Agelas nakamurai*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 62, n. 9, p. 1295–1297, 1999.

EL-NAGGAR, M.; CONTE, M.; CAPON, R. J. Mirabilins revisited: polyketidealkaloids from a southern Australian marine sponge, *Clathria* sp. **Organic and Biomolecular Chemistry**, Cambridge, v. 8, n. 2, p. 407–412, 2010.

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**, Washington, v. 67, n. 8, p. 1262–1267, 2004.

FAULKNER, D. J. Marine natural products. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 19, p. 1-48, 2002 e anteriores.

FORENZA, S.; MINALE, L.; RICCIO, R.; FATTORUSSO, E. New bromopyrrole derivatives from the sponge *Agelas oroides*. **Journal of the Chemical Society D: chemical communications**, Cambridge, v. 285, n. 18, p. 1129–1130, 1971.

FOX RAMOS, A. E.; EVANNO, L.; POUPON, E.; CHAMPY, P.; BENIDDIR, M. A. Natural products targeting strategies involving molecular networking: different manners, one goal. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 36, n. 7, p. 960–980, 2019.

FREIRE, V. F.; SLIVINSKI, J.; QUINTANA-BULLA, J.; MORAES, F. C.; PARADAS, W. C.; SALGADO, L. T.; PEREIRA, R. C. MOURA, R. L.; AMADO-FILHO, G. M.; FERREIRA, A. G.; BERLINCK, R. G. S. Clathriamide, an hexapeptide isolated from the marine sponge *Clathria (Clathria) nicoleae*.

Revista Brasileira de Farmacognosia, João Pessoa, v. 29, n. 6, p. 715-719, 2019.

GJORGJIEVA, M.; MASIC, L. P.; KIKELJ, D. Antibacterial and antibiofilm potentials of marine pyrrole-2-aminoimidazole alkaloids and their synthetic analogs. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, Sharjah, v. 18, n. 19, p. 1640–1658, 2018.

GUPTA, P.; SHARMA, U.; SCHULZ, T. C.; MCLEAN, A. B.; ROBINS, A. J.; WEST, L. M. Bicyclic C 21 terpenoids from the marine sponge *Clathria compressa*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 75, n. 6, p. 1223–1227, 2012.

HAMED, A. N. E.; SCHMITZ, R.; BERGERMANN, A.; TOTZKE, F.; KUBBUTAT, M.; MÜLLER, W. E. G.; YOUSSEF, D. T. A.; BISHR, M. M.; KAMEL, M. S.; EDRADA-EBEL, R.; WÄTJEN, W.; PROKSCH, P. Bioactive pyrrole alkaloids isolated from the Red Sea: marine sponge *Stylissa carteri*. **Zeitschrift fur Naturforschung. Section C: journal of biosciences**, Berlin, v. 73, n. 5–6, p. 199–210, 2018.

HERTIANI, T.; EDRADA-EBEL, R.; ORTLEPP, S.; VAN SOEST, R. W. M.; DE VOOGD, N. J.; WRAY, V.; HENTSCHEL, U.; KOZYTSKA, S.; MÜLLER, W. E. G.; PROKSCH, P. From anti-fouling to biofilm inhibition: new cytotoxic secondary metabolites from two Indonesian *Agelas* sponges. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 1297–1311, 2010.

HOURIET, J.; ALLARD, P. M.; QUEIROZ, E. F.; MARCOURT, L.; GAUDRY, A.; VALLIN, L.; LI, S.; LIN, Y.; WANG, R.; KUCHTA, K.; WOLFENDER, J. L. A Mass spectrometry based metabolite profiling workflow for selecting abundant specific markers and their structurally related multi-component signatures in traditional chinese medicine multi-herb formulae. **Frontiers in Pharmacology**, Lausanne, v. 11, p. 1–23, 2020.

KEIFER, P. A.; SCHWARTZ, R. E.; KOKER, M. E. S.; HUGHES, R. G.; RITTSCHOF, D.; RINEHART, K. L. Bioactive bromopyrrole metabolites from the Caribbean sponge *Agelas conifera*. **The Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 56, n. 9, p. 2965–2975, 1991.

KENNEDY, J. P.; BROGAN, J. T.; LINDSLEY, C. W. Total synthesis and biological evaluation of the marine bromopyrrole alkaloid dispyrin: elucidation of discrete molecular targets with therapeutic potential. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 71, n. 10, p. 1783–1786, 2008.

KIJJOA, A.; WATTANADILOK, R.; CAMPOS, N.; NASCIMENTO, M. S. J.; PINTO, M.; HERZ, W. Anticancer activity evaluation of kuanoniamines A and C isolated from the marine sponge *Oceanapia sagittaria*, collected from the Gulf of Thailand. **Marine Drugs**, Basel, v. 5, n. 2, p. 6–22, 2007.

KIND, T.; FIEHN, O. Strategies for dereplication of natural compounds using

high-resolution tandem mass spectrometry. **Phytochemistry Letters**, Amsterdam, v. 21, p. 313–319, 2017.

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

KOBAYASHI, J.; TSUDA, M.; MURAYAMA, T.; NAKAMURA, H.; OHIZUMI, Y.; ISHIBASHI, M.; IWAMURA, M.; OHTA, T.; NOZOE, S. Ageliferins, potent actomyosin Atpase activators from the Okinawan marine sponge *Agelas* sp. **Tetrahedron**, Oxford, v. 46, n. 16, p. 5579–5586, 1990.

KWON, O.-S.; KIM, D.; KIM, H.; LEE, Y.-J.; LEE, H.-S.; SIM, C. J.; OH, D.-C.; LEE, S. K.; OH, K.-B.; SHIN, J. Bromopyrrole alkaloids from the Sponge *Agelas kosrae*. **Marine drugs**, Basel, v. 16, n. 12, p. 10–13, 2018.

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

LINDEL, T. Chemistry and biology of the pyrrole–imidazole alkaloids. *In*: THE ALKALOIDS. San Diego: Elsevier, 2017. v. 77, p. 117-219.

MAKARIEVA, T. N.; DENISENKO, V. A.; DMITRENOK, P. S.; GUZII, A. G.; SANTALOVA, E. A.; STONIK, V. A.; MACMILLAN, J. B.; MOLINSKI, T. F. Oceanalin A, a hybrid α,ω -bifunctionalized sphingoid tetrahydroisoquinoline β -glycoside from the marine sponge *Oceanapia* sp. **Organic Letters**, Washington, v. 7, n. 14, p. 2897–2900, 2005.

MALONEY, K. N.; BOTTS, R. T.; DAVIS, T. S.; OKADA, B. K.; MALONEY, E. M.; LEBER, C. A.; ALVARADO, O.; BRAYTON, C.; CARABALLO-RODRÍGUEZ, A. M.; CHARI, J. V.; CHICOINE, B.; CROMPTON, J. C.; DAVIS, S. R.; GROMEK, S. M.; KURNIANDA, V.; QUACH, K.; SAMPLES, R. M.; SHIEH, V.; SULTANA, C. M.; TANAKA, J.; DORRESTEIN, P. C.; BALUNAS, M. J.; MCFADDEN, C. S. Cryptic species account for the seemingly idiosyncratic secondary metabolism of *sarcophyton glaucum* specimens collected in Palau. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 83, n. 3, p. 693–705, 2020.

MANCINI, I.; GUELLA, G.; AMADE, P.; ROUSSAKIS, C.; PIETRA, F. Hanishin, a semiracemic, bioactive C, alkaloid of the axinellid sponge *Acanthella carteri* from the Hanish Islands, a shunt metabolite? **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 38, n. 35, p. 6271–6274, 1997.

MEDEMA, M. H.; FISCHBACH, M. A. Computational approaches to natural product discovery. **Nature Chemical Biology**, London, v. 11, n. 9, p. 639–648, 2015.

MELANDER, R. J.; LIU, H. bing; STEPHENS, M. D.; BEWLEY, C. A.; MELANDER, C. Marine sponge alkaloids as a source of anti-bacterial adjuvants. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 26, n. 24, p. 5863–5866, 2016.

MOKHLESI, A.; STUHLREIER, F.; WEX, K. W.; BERSCHIED, A.; HARTMANN, R.; REHBERG, N.; SUREECHATCHAIYAN, P.; CHAIDIR, C.; KASSACK, M. U.; KALSCHEUER, R.; BRÖTZ-OESTERHELT, H.; WESSELBORG, S.; STORK, B.; DALETOS, G.; PROKSCH, P. Cyclic cystine-bridged peptides from the marine sponge *Clathria basilana* induce apoptosis in tumor cells and depolarize the bacterial cytoplasmic membrane. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 80, n. 11, p. 2941–2952, 2017.

MOURA, R. L.; AMADO-FILHO, G. M.; MORAES, F. C.; BRASILEIRO, P. S.; SALOMON, P. S.; MAHIQUES, M. M.; BASTOS, A. C.; ALMEIDA, M. G.; SILVA, J. M.; ARAUJO, B. F.; BRITO, F. P.; RANGEL, T. P.; OLIVEIRA, B. C. V.; BAHIA, R. G.; PARANHOS, R. P.; DIAS, R. J. S.; SIEGLE, E.; FIGUEIREDO, A. G.; PEREIRA, R. C.; LEAL, C. V.; HAJDU, E.; ASP, N. E.; GREGORACCI, G. B.; NEUMANN-LEITAO, S.; YAGER, P. L.; FRANCINI-FILHO, R. B.; FROES, A.; CAMPEAO, M.; SILVA, B. S.; MOREIRA, A. P. B.; OLIVEIRA, L.; SOARES, A. C.; ARAUJO, L.; OLIVEIRA, N. L.; TEIXEIRA, J. B.; VALLE, R. A. B.; THOMPSON, C. C.; REZENDE, C. E.; THOMPSON, F. L. An extensive reef system at the Amazon River mouth. **Science Advances**, Washington, v. 2, n. 4, p. 1501252–1501252, 2016.

MUELLER, B.; DE GOEIJ, J. M.; VERMEIJ, M. J. A.; MULDER, Y.; VAN DER ENT, E.; RIBES, M.; VAN DUYL, F. C. Natural diet of coral-excavating sponges consists mainly of dissolved organic carbon (DOC). **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 2, p. 90152, 2014.

MURICY, G., ESTEVES, E.L., MORAES, F., SANTOS J.P., SILVA, S.M., KLAUTAU, M., LANNA, E. **Biodiversidade marinha da Bacia Potiguar** : porifera. 29. ed. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2008.

NEWMAN, D.; CRAGG, G. Drugs and drug candidates from marine sources: an assessment of the current “State of Play”. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 82, p. 775–789, 2016.

NICHOLAS, G. M.; NEWTON, G. L.; FAHEY, R. C.; BEWLEY, C. A. Novel bromotyrosine alkaloids: inhibitors of mycothiol S-conjugate amidase. **Organic Letters**, Washington, v. 3, n. 10, p. 1543–1545, 2001.

NIKOLIĆ, D.; GÖDECKE, T.; CHEN, S-N; WHITE, J.; LANKIN, D. C.; PAULI, G. F.; van BREEMEN, R. B. Mass spectrometric dereplication of nitrogen-containing constituents of black cohosh (*Cimicifuga racemosa* L.). **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 83, n. 3, p. 441–460, 2012.

NIKOLIĆ, D. CASMI 2016: A manual approach for dereplication of natural products using tandem mass spectrometry. **Phytochemistry Letters**,

Amsterdam, v. 21, p. 292–296, 2017.

NOTHIAS, L.-F.; PETRAS, D.; SCHMID, R.; DÜHRKOP, K.; RAINER, J.; SARVEPALLI, A.; PROTSYUK, I.; ERNST, M.; TSUGAWA, H.; FLEISCHAUER, M.; AICHELER, F.; AKSENOV, A. A.; ALKA, O.; ALLARD, P.-M.; BARSCH, A.; CACHET, X.; CARABALLO-RODRIGUEZ, A. M.; DA SILVA, R. R.; DANG, T.; GARG, N.; GAUGLITZ, J. M.; GUREVICH, A.; ISAAC, G.; JARMUSCH, A. K.; KAMENÍK, Z.; KANG, K. BIN; KESSLER, N.; KOESTER, I.; KORF, A.; LE GOUELLEC, A.; LUDWIG, M.; MARTIN H., C.; MCCALL, L.-I.; MCSAYLES, J.; MEYER, S. W.; MOHIMANI, H.; MORSY, M.; MOYNE, O.; NEUMANN, S.; NEUWEGER, H.; NGUYEN, N. H.; NOTHIAS-ESPOSITO, M.; PAOLINI, J.; PHELAN, V. V.; PLUSKAL, T.; QUINN, R. A.; ROGERS, S.; SHRESTHA, B.; TRIPATHI, A.; VAN DER HOOFT, J. J. J.; VARGAS, F.; WELDON, K. C.; WITTING, M.; YANG, H.; ZHANG, Z.; ZUBEIL, F.; KOHLBACHER, O.; BÖCKER, S.; ALEXANDROV, T.; BANDEIRA, N.; WANG, M.; DORRESTEIN, P. C. Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. **Nature Methods**, London, v. 17, n. 9, p. 905–908, 2020.

O'MALLEY, D. P.; LI, K.; MAUE, M.; ZOGRAFOS, A. L.; BARAN, P. S. Total synthesis of dimeric pyrrole–imidazole alkaloids: scep trin, ageliferin, nagelamide e, oxyscep trin, nakamuric acid, and the axinellamine carbon skeleton. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 129, p. 7702–7702, 2007.

O'ROURKE, A.; KREMB, S.; BADER, T. M.; HELFER, M.; SCHMITT-KOPPLIN, P.; GERWICK, W. H.; BRACK-WERNER, R.; VOOLSTRA, C. R. Alkaloids from the sponge *Stylissa carteri* present prospective scaffolds for the inhibition of human immunodeficiency virus 1 (HIV-1). **Marine Drugs**, Basel, v. 14, n. 2, p. 1–10, 2016.

OLIVON, F.; ALLARD, P. M.; KOVAL, A.; RIGHI, D.; GENTA-JOUVE, G.; NEYTS, J.; APEL, C.; PANNECOUQUE, C.; NOTHIAS, L. F.; CACHET, X.; MARCOURT, L.; ROUSSI, F.; KATANAIEV, V. L.; TOUBOUL, D.; WOLFENDER, J. L.; LITAUDON, M. Bioactive natural products prioritization using massive multi-informational molecular networks. **ACS Chemical Biology**, Washington, v. 12, n. 10, p. 2644–2651, 2017.

OLIVON, F.; APEL, C.; RETAILLEAU, P.; ALLARD, P. M.; WOLFENDER, J. L.; TOUBOUL, D.; ROUSSI, F.; LITAUDON, M.; DESRAT, S. Searching for original natural products by molecular networking: detection, isolation and total synthesis of chloroaustralasines. **Organic Chemistry Frontiers**, Cambridge, v. 5, n. 14, p. 2171–2178, 2018.

PADILLA-GONZÁLEZ, G. F.; SADGROVE, N. J.; CCANA-CCAPATINTA, G. V.; LEUNER, O.; FERNANDEZ-CUSIMAMANI, E. Feature-based molecular networking to target the isolation of new caffeic acid esters from yacon (*Smallanthus sonchifolius*, Asteraceae). **Metabolites**, Basel, v. 10, n. 10, p. 1–13, 2020.

PARRA, L. L. L.; BERTONHA, A. F.; SEVERO, I. R. M.; AGUIAR, A. C. C.; DE

SOUZA, G. E.; OLIVA, G.; GUIDO, R. V. C.; GRAZZIA, N.; COSTA, T. R.; MIGUEL, D. C.; GADELHA, F. R.; FERREIRA, A. G.; HAJDU, E.; ROMO, D.; BERLINCK, R. G. S. Isolation, derivative synthesis, and structure–activity relationships of antiparasitic bromopyrrole alkaloids from the marine sponge *Tedania brasiliensis*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 81, n. 1, p. 188–202, 2018.

PECH-PUCH, D.; PÉREZ-POVEDANO, M.; MARTINEZ-GUITIAN, M.; LASARTE-MONTEERRUBIO, C.; VÁZQUEZ-UCHA, J. C.; BOU, G.; RODRÍGUEZ, J.; BECEIRO, A.; JIMENEZ, C. In vitro and in vivo assessment of the efficacy of bromoageliferin, an alkaloid isolated from the sponge *Agelas dilatata*, against *Pseudomonas aeruginosa*. **Marine Drugs**, Basel, v. 18, n. 6, 2020.

PETRAS, D.; MINICH, J. J.; CANCELADA, L. B.; TORRES, R. R.; KUNSELMAN, E.; WANG, M.; WHITE, M. E.; ALLEN, E. E.; PRATHER, K. A.; ALUWIHARE, L. I.; DORRESTEIN, P. C. Non-targeted tandem mass spectrometry enables the visualization of organic matter chemotype shifts in coastal seawater. **Chemosphere**, Oxford, v. 271, p. 129450, 2021.

PHILLIP KENNEDY, J.; JEFFREY CONN, P.; LINDSLEY, C. W. A novel class of H3 antagonists derived from the natural product guided synthesis of unnatural analogs of the marine bromopyrrole alkaloid dispyrin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v. 19, n. 12, p. 3204–3208, 2009.

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**, Washington, v. 70, n. 4, p. 613–617, 2007.

PLUSKAL, T.; CASTILLO, S.; VILLAR-BRIONES, A.; OREŠIČ, M. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. **BMC Bioinformatics**, London, v. 11, n.1, p. 1-395, 2010.

PORÍFEROS. **Só Biologia**. Porto Alegre: Virtuoso Tecnologia da Informação, 2008. Disponível em <https://www.sobiologia.com.br/conteudos/Reinos2/porifero.php>. Acesso em: 12 jan. 2019.

REDDY, M. V. R.; HARPER, M. K.; FAULKNER, D. J. Euryamide A, a cyclic tripeptide from the Palauan sponge *Microciona eurya*. **Tetrahedron**, Oxford, v. 54, n. 36, p. 10649–10656, 1998.

REDDY, N. S.; VENKATESWARLU, Y. A new bromopyrrole alkaloid from the sponge *Axinella tenuidigitata*. **Indian Journal of Chemistry**, New Delhi, v. 39, p. 971–972, 2000.

REGALADO, E. L.; LAGUNA, A.; MENDIOLA, J.; THOMAS, O. P.; NOGUEIRAS, C. Bromopyrrole alkaloids from the caribbean sponge *Agelas*

cerebrum. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 289–291, 2011.

REMY, S.; SOLIS, D.; SILLAND, P.; NEYTS, J.; ROUSSI, F.; TOUBOUL, D.; LITAUDON, M. Isolation of phenanthrenes and identification of phorbol ester derivatives as potential anti-CHIKV agents using FBMN and NAP from *Sagotia racemosa*. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 167, n. May, p. 112101, 2019.

RODRIGUES-COSTA, F.; SLIVINSKI, J.; IÓCA, L. P.; BERTONHA, A. F.; DE FELÍCIO, R.; CUNHA, M. G. Da; DA MATA MADEIRA, P. V.; CAUZ, A. C. G.; TRINDADE, D. M.; FREIRE, V. F.; ROPKE, C. D.; GALES, A.; BROCCHI, M.; FERREIRA, A. G.; GUEIROS-FILHO, F.; TRIVELLA, D. B. B.; BERLINCK, R. G. S.; DESSEN, A. Merulinic acid C overcomes gentamicin resistance in *Enterococcus faecium*. **Bioorganic Chemistry**, Maryland Heights, v. 100, p. 103921, 2020.

RODRIGUEZ, R. A.; BARRIOS STEED, D.; KAWAMATA, Y.; SU, S.; SMITH, P. A.; STEED, T. C.; ROMESBERG, F. E.; BARAN, P. S. Axinellamines as broad-spectrum antibacterial agents: scalable synthesis and biology. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 136, n. 43, p. 15403–15413, 2014.

SALIB, M. N.; MOLINSKI, T. F. Cyclic hexapeptide dimers, antatollamides A and B, from the ascidian *Didemnum molle*. A tryptophan-derived auxiliary for L- and D-amino acid assignments. **The Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 82, n. 19, p. 10181–10187, 2017.

SCALA, F.; FATTORUSSO, E.; MENNA, M.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O.; TIERNEY, M.; KAISER, M.; TASDEMIR, D. Bromopyrrole alkaloids as lead compounds against protozoan parasites. **Marine Drugs**, Basel, v. 8, n. 7, p. 2162–2174, 2010.

SCARPATO, S.; TETA, R.; DELLA SALA, G.; PAWLIK, J. R.; COSTANTINO, V.; MANGONI, A. New tricks with an old sponge: feature-based molecular networking led to fast identification of new stylissamide L from *Stylissa caribica*. **Marine Drugs**, Basel, v. 18, n. 9, 2020.

SCIGELOVA, M.; GREEN, P. S.; GIANNAKOPULOS, A. E.; RODGER, A.; CROUT, D. H. G.; DERRICK, P. J. A practical protocol for the reduction of disulfide bonds in proteins prior to analysis by mass spectrometry. **European Journal of Mass Spectrometry**, London, v. 7, n. 1, p. 29–34. 2001

SEIDLER, J.; ZINN, N.; BOEHM, M. E.; LEHMANN, W. D. De novo sequencing of peptides by MS/MS. **Proteomics**, Weinheim, v. 10, n. 4, p. 634–649, 2010.

SHANNON, P. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 13, n. 11, p. 2498–2504, 2003.

SHARMA, G. M.; BURKHOLDER, P. R. Structure of dibromophakellin, a new bromine-containing alkaloid from the marine sponge *Phakellia flabellata*.

Journal of the Chemical Society D: chemical communications, Cambridge, n. 3, p. 151, 1971.

SHENVI, R. A.; O'MALLEY, D. P.; BARAN, P. S. Chemoselectivity: the mother of invention in total synthesis. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v. 42, n. 4, p. 530–541, 2009.

SHI, L.-X.; SUN, Q.; GE, Z.-M.; ZHU, Y.-Q.; CHENG, T.-M.; LI, R.-T. Dipeptide-catalyzed direct asymmetric aldol reaction. **Synlett**, Stuttgart, n. 12, p. 2215–2217, 2004.

SHIGEMURA, Y.; IWAI, K.; MORIMATSU, F.; IWAMOTO, T.; MORI, T.; ODA, C.; TAIRA, T.; PARK, E. Y.; NAKAMURA, Y.; SATO, K. Effect of prolyl-hydroxyproline (Pro-Hyp), a food-derived collagen peptide in human blood, on growth of fibroblasts from mouse skin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 57, n. 2, p. 444–449, 2009.

SUN, J.; WU, J.; AN, B.; VOOGD, N.; CHENG, W.; LIN, W. Bromopyrrole alkaloids with the inhibitory effects against the biofilm formation of Gram negative bacteria. **Marine Drugs**, Basel, v. 16, n. 1, p. 9, 2018.

TAKAKI, M.; FREIRE, V. F.; NICACIO, K. J.; BERTONHA, A. F.; NAGASHIMA, N.; SARPONG, R.; PADULA, V.; FERREIRA, A. G.; BERLINCK, R. G. S. Metabolomics reveals minor tambjamines in a marine invertebrate food chain. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 84, n. 3, p. 790–796, 2021.

THOMPSON, F.; KRÜGER, R.; THOMPSON, C. C.; BERLINCK, R. G. S.; COUTINHO, R.; LANDELL, M. F.; PAVÃO, M.; MOURÃO, P. A. S.; SALLES, A.; NEGRI, N.; LOPES, F. A. C.; FREIRE, V.; MACEDO, A. J.; MARASCHIN, M.; PÉREZ, C. D.; PEREIRA, R. C.; RADIS-BAPTISTA, G.; REZENDE, R. P.; VALENTI, W. C.; ABREU, P. C. Marine biotechnology in Brazil: recent developments and its potential for innovation. **Frontiers in Marine Science**, Lausanne, v. 5, p. 236, 2018.

UMEYAMA, A.; ITO, S.; YUASA, E.; ARIHARA, S.; YAMADA, T. A new bromopyrrole alkaloid and the optical resolution of the racemate from the marine sponge *Homaxinella* sp. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 61, n. 11, p. 1433–1434, 1998.

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

VAN SOEST, R.W.M. **Agelas dispar Duchassaing & Michelotti, 1864 Holotype**. 25 december 2011. 1 fotografia. Disponível em: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=image&tid=164827&pic=47519>. Acesso em: 20 abr. 2021.

VAN SOEST, R.W.M.; BOURY-ESNAULT, N.; HOOPER, J.N.A.; RÜTZLER, K.; DE VOOGD, N.J.; ALVAREZ, B.; HAJDU, E.; PISERA, A.B.; MANCONI, R.; SCHÖNBERG, C.; KLAUTAU, M.; KELLY, M.; VACELET, J.; DOHRMANN, M.; DÍAZ, M.-C.; CÁRDENAS, P.; CARBALLO, J.L.; RÍOS, P.; DOWNEY, R.; MORROW, C.C. **World Porifera Database**. *Agelas dispar* Duchassaing & Michelotti, 1864. [S. l.], 2021. Disponível em: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=164827>. Acesso em: 20 abr. 2021.

VASSAS, A.; BOURDY, G.; PAILLARD, J.; LAVAYRE, J.; PAÏS, M.; QUIRION, J.; DEBITUS, C. Naturally occurring somatostatin and vasoactive intestinal peptide inhibitors. isolation of alkaloids from two marine sponges. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 62, n. 01, p. 28–30, 1996.

VESSECCHI, R.; JULIÃO ZOCOLO, G.; RUBIO GOUVEA, D.; HÜBNER, F.; CRAMER, B.; RODRIGUES DE MARCHI, M. R.; HUMPF, H.-U.; LOPES, N. P. Re-examination of the anion derivatives of isoflavones by radical fragmentation in negative electrospray ionization tandem mass spectrometry: experimental and computational studies. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Oxford, v. 25, n. 14, p. 2020–2026, 2011.

WANG, M.; CARVER, J. J.; PHELAN, V. V.; SANCHEZ, L. M.; GARG, N.; PENG, Y.; NGUYEN, D. D.; WATROUS, J.; KAPONO, C. A.; LUZZATTO-KNAAN, T.; PORTO, C.; BOUSLIMANI, A.; MELNIK, A. V.; MEEHAN, M. J.; LIU, W.-T.; CRÜSEMANN, M.; BOUDREAU, P. D.; ESQUENAZI, E.; SANDOVAL-CALDERÓN, M.; KERSTEN, R. D.; PACE, L. A.; QUINN, R. A.; DUNCAN, K. R.; HSU, C.-C.; FLOROS, D. J.; GAVILAN, R. G.; KLEIGREWE, K.; NORTHEN, T.; DUTTON, R. J.; PARROT, D.; CARLSON, E. E.; AIGLE, B.; MICHELSEN, C. F.; JELLSBAK, L.; SOHLENKAMP, C.; PEVZNER, P.; EDLUND, A.; MCLEAN, J.; PIEL, J.; MURPHY, B. T.; GERWICK, L.; LIAW, C.-C.; YANG, Y.-L.; HUMPF, H.-U.; MAANSSON, M.; KEYZERS, R. A.; SIMS, A. C.; JOHNSON, A. R.; SIDEBOTTOM, A. M.; SEDIO, B. E.; KLITGAARD, A.; LARSON, C. B.; BOYA P, C. A.; TORRES-MENDOZA, D.; GONZALEZ, D. J.; SILVA, D. B.; MARQUES, L. M.; DEMARQUE, D. P.; POCIUTE, E.; O'NEILL, E. C.; BRIAND, E.; HELFRICH, E. J. N.; GRANATOSKY, E. A.; GLUKHOV, E.; RYFFEL, F.; HOUSON, H.; MOHIMANI, H.; KHARBUSH, J. J.; ZENG, Y.; VORHOLT, J. A.; KURITA, K. L.; CHARUSANTI, P.; MCPHAIL, K. L.; NIELSEN, K. F.; VUONG, L.; ELFEKI, M.; TRAXLER, M. F.; ENGINE, N.; KOYAMA, N.; VINING, O. B.; BARIC, R.; SILVA, R. R.; MASCUCH, S. J.; TOMASI, S.; JENKINS, S.; MACHERLA, V.; HOFFMAN, T.; AGARWAL, V.; WILLIAMS, P. G.; DAI, J.; NEUPANE, R.; GURR, J.; RODRÍGUEZ, A. M. C.; LAMSA, A.; ZHANG, C.; DORRESTEIN, K.; DUGGAN, B. M.; ALMALITI, J.; ALLARD, P.-M.; PHAPALE, P.; NOTHIAS, L.-F.; ALEXANDROV, T.; LITAUDON, M.; WOLFENDER, J.-L.; KYLE, J. E.; METZ, T. O.; PERVEA, T.; NGUYEN, D.-T.; VANLEER, D.; SHINN, P.; JADHAV, A.; MÜLLER, R.; WATERS, K. M.; SHI, W.; LIU, X.; ZHANG, L.; KNIGHT, R.; JENSEN, P. R.; PALSSON, B. Ø.; POGLIANO, K.; LININGTON, R. G.; GUTIÉRREZ, M.; LOPES, N. P.; GERWICK, W. H.; MOORE, B. S.; DORRESTEIN, P. C.; BANDEIRA, N. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**,

New York, v. 34, n. 8, p. 828–837, 2016.

WANG, Z.; KIM, U.; LIU, J.; CHENG, C.; WU, W.; GUO, S.; FENG, Y.; QUINN, R. J.; HOU, Y.; BAI, G. Comprehensive TCM molecular networking based on MS/MS in silico spectra with integration of virtual screening and affinity MS screening for discovering functional ligands from natural herbs. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 411, n. 22, p. 5785–5797, 2019.

WILSON, D. M.; PUYANA, M.; FENICAL, W.; PAWLIK, J. R. Chemical defense of the Caribbean reef sponge *Axinella corrugata* against predatory fishes. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 25, n. 12, p. 2811–2823, 1999.

WOLFENDER, J.-L.; MARTI, G.; THOMAS, A.; BERTRAND, S. Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1382, p. 136–164, 2015.

WOO, J.-K.; JEON, J.; KIM, C.-K.; SIM, C. J.; OH, D.-C.; OH, K.-B.; SHIN, J. Gombamide A, a cyclic thiopeptide from the sponge *Clathria gombawuiensis*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 76, n. 7, p. 1380–1383, 2013.

WU, H.-Y.; KE, J.-P.; WANG, W.; KONG, Y.-S.; ZHANG, P.; LING, T.-J.; BAO, G.-H. Discovery of neolignan glycosides with acetylcholinesterase inhibitory activity from huangjinya green tea guided by ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry data and Global Natural Product Social Molecular Networking. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 67, n. 43, p. 11986–11993, 2019.

WYSOCKI, V. H.; TSAPRAILIS, G.; SMITH, L. L.; BRECI, L. A. Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation. **Journal of Mass Spectrometry**, Oxford, v. 35, n. 12, p. 1399–1406, 2000.

YAMADA, A.; KITAMURA, H.; YAMAGUCHI, K.; FUKUZAWA, S.; KAMIJIMA, C.; YAZAWA, K.; KURAMOTO, M.; WANG, G.-Y.-S.; FUJITANI, Y.; UEMURA, D. Development of chemical substances regulating biofilm formation. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, Tokyo, v. 70, n. 12, p. 3061–3069, 1997.

YANG, J. Y.; SANCHEZ, L. M.; RATH, C. M.; LIU, X.; BOUDREAU, P. D.; BRUNS, N.; GLUKHOV, E.; WODTKE, A.; DE FELICIO, R.; FENNER, A.; WONG, W. R.; LININGTON, R. G.; ZHANG, L.; DEBONSI, H. M.; GERWICK, W. H.; DORRESTEIN, P. C. Molecular networking as a dereplication strategy. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 76, n. 9, p. 1686–1699, 2013.

ZULETA, I. A.; VITELLI, M. L.; BAGGIO, R.; GARLAND, M. T.; SELDES, A. M.; PALERMO, J. A. Novel pteridine alkaloids from the sponge *Clathria* sp. **Tetrahedron**, Oxford, v. 58, n. 22, p. 4481–4486, 2002.

ZUMBERGE, J. A.; LOVE, G. D.; CÁRDENAS, P.; SPERLING, E. A.; GUNASEKERA, S.; ROHRSEN, M.; GROSJEAN, E.; GROTZINGER, J. P.; SUMMONS, R. E. Demosponge steroid biomarker 26-methylstigmastane

provides evidence for Neoproterozoic animals. **Nature Ecology & Evolution**, London, v. 2, n. 11, p. 1709–1714, 2018.

APÊNDICE

Lista de Figuras

Figura A 1. Espectro MS da microcionamida A (1).....	147
Figura A 2. Espectro MS/MS da microcionamida A (1).	148
Figura A 3. RMN de ¹ H da microcionamida A (1) (600 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄).....	149
Figura A 4. Espectro MS da clathriamida (2).....	150
Figura A 5. Espectro de RMN de ¹ H da clathriamida (2) (600 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄).	151
Figura A 6. Espectro de RMN de ¹³ C da clathriamida (2) (150 MHz, MeOH- <i>d</i> ₄).	152
Figura A 7. Espectro COSY da clathriamida (2) (MeOH- <i>d</i> ₄).....	153
Figura A 8. Espectro HMBC da clathriamida (2) (MeOH- <i>d</i> ₄).	154
Figura A 9. Espectro HSQC da clathriamida (2) em (MeOH- <i>d</i> ₄).....	155
Figura A 10. Espectro de HSQC-TOCSY da clathriamida (2) em MeOH- <i>d</i> ₄ ...	156
Figura A 11. Espectro no IV da clathriamida (2) em filme em pastilha de Si..	157
Figura A 12. Espectro MS/MS da clathriamida (2).	158
Figura A 13. XIC <i>m/z</i> 499,18 da análise do padrão 4- <i>trans</i> -L-Hyp e da clathriamida (2) derivatizados com L e D-FDTA.....	159
Figura A 14. XIC <i>m/z</i> 487,18 da análise do padrão L-Thr e da clathriamida (2) derivatizados com L e D-FDTA.	160
Figura A15. XIC <i>m/z</i> 483,19 da análise do padrão L-Pro derivatizado com L- FDTA e da clathriamida (2) derivatizados com L e D-FDTA.....	161
Figura A 16. XIC <i>m/z</i> 533,21 da análise do padrão L-Phe e da clathriamida (2) derivatizados com L e D-FDTA.	162
Figura A 17. XIC <i>m/z</i> 499.22 da análise dos padrões L- <i>allo</i> -Ile, L-Ile e L-Leu e da clathriamida (2) derivatizados com L e D-FDTA.....	163
Figura A 18. Espectro MS da oceanapiamida A.....	164
Figura A 19. Expansão do espectro MS da oceanapiamida A.	165
Figura A 20. Espectro de RMN de ¹ H da oceanapiamida A em MeOH- <i>d</i> ₄ (¹ H: 600 MHz).....	166
Figura A 21. Expansão do espectro de RMN de ¹ H da oceanapiamida A em MeOH- <i>d</i> ₄ (¹ H: 600 MHz).....	167

Figura A 22. Expansão do espectro de RMN de ^1H da oceanapiamida A em MeOH- d_4 (^1H : 600 MHz).....	168
Figura A 23. Expansão do espectro de RMN de ^1H da oceanapiamida A em MeOH- d_4 (^1H : 600 MHz).....	169
Figura A 24. Expansão do espectro de RMN de ^1H da oceanapiamida A em MeOH- d_4 (^1H : 600 MHz).....	170
Figura A 25. Expansão do espectro de RMN de ^1H da oceanapiamida A em MeOH- d_4 (^1H : 600 MHz).....	171
Figura A 26. Expansão do espectro de RMN de ^1H da oceanapiamida A em MeOH- d_4 (^1H : 600 MHz).....	172
Figura A 27. Expansão do espectro de RMN de ^1H da oceanapiamida A em MeOH- d_4 (^1H : 600 MHz).....	173
Figura A 28. Expansão do espectro de RMN de ^1H da oceanapiamida A em MeOH- d_4 (^1H : 600 MHz).....	174
Figura A 29. Espectro de RMN de ^{13}C da oceanapiamida A em MeOH- d_4 (^1H : 150 MHz).....	175
Figura A 30. Espectro COSY da oceanapiamida A em MeOH- d_4	176
Figura A 31. Espectro <i>Selective</i> HSQC da oceanapiamida A em MeOH- d_4 ...	177
Figura A 32. Espectro HSQC-TOCSY da oceanapiamida A em MeOH- d_4	178
Figura A 33. Espectro de RMN de <i>Selective</i> HMBC da oceanapiamida A em MeOH- d_4	179
Figura A 34. XIC m/z 443 da análise do padrão glicina derivatizado com D-FDTA e da oceanapiamida A derivatizada com D-FDTA.....	183
Figura A 35. XIC m/z 457 da análise do padrão L-alanina derivatizado com L e D-FDTA e da oceanapiamida A derivatizada com D-FDTA.	184
Figura A 36. XIC m/z 499 da análise dos padrões L-Leu, L-Ile e L- <i>allo</i> -Ile derivatizado com L e D-FDTA e da oceanapiamida A derivatizada com D-FDTA.	185
Figura A 37. XIC m/z 542 da análise do padrão L-arginina derivatizado com L e D-FDTA e da oceanapiamida A derivatizada com D-FDTA.	186
Figura A 38. XIC m/z 600 da análise do padrão L-cistina derivatizado com L e D-FDTA e da oceanapiamida A derivatizada com D-FDTA.	187
Figura A 39. XIC m/z 549 da análise do padrão L-tirosina derivatizado com L e D-FDTA e da oceanapiamida A derivatizada com D-FDTA.	188

Figura A 40. XIC m/z 485 da análise do padrão L-valina derivatizado com L e D-FDTA e da oceanapiamida A derivatizada com D-FDTA.	189
Figura A 41. XIC m/z 473 da análise do padrão L-serina derivatizado com L e D-FDTA e da oceanapiamida A derivatizada com D-FDTA.	190
Figura A 42. XIC m/z 483 da análise do padrão L-prolina derivatizado com L e D-FDTA e da oceanapiamida A derivatizada com D-FDTA.	191
Figura A 43. XIC m/z 499 da análise dos padrões L-leucina e L-isoleucina derivatizados com L e D-FDTA e da oceanapiamida A derivatizada com D-FDTA.	192
Figura A 44. Comparação entre os espectro MS/MS da oceanapiamida A e do produto de reação oceanapiamida A + DTT.....	193
Figura A 45. Comparação entre os cromatogramas do produto de reação oceanapiamida A + DTT e da oceanapiamida A.	194
Figura A 46. Comparação entre os espectros MS do produto de reação oceanapiamida A + DTT e da oceanapiamida A.	195
Figura A 47. Espectro MS/MS do composto 4-desbromo-oroidina (3).	196
Figura A 48 - Espectro MS/MS do composto himenidina (4).....	197
Figura A 49 - Espectro MS/MS do composto 4-desbromougibohlina (5).....	198
Figura A 50 - Espectro MS/MS do composto 5-desbromougibohlina (6).....	199
Figura A 51. Expansão do espectro MS/MS do composto 5-desbromougibohlina (6).....	200
Figura A 52 - Espectro MS/MS do composto monobromoisofakelina (7).	201
Figura A 53. Espectros MS e MS/MS da himenidina (4).	202
Figura A 54. Espectro MS da oroidina.....	203
Figura A 55 Expansão do espectro MS da oroidina	204
Figura A 56. Espectros MS/MS da himenidina (4) e da oroidina.	205
Figura A 57. Espectro de fragmentação MS/MS <i>in-silico</i> da oroidina.....	206
Figura A 58. Espectro MS da undecaetilenoglicol.	207
Figura A 59. Espectro MS/MS do undecaetilenoglicol.....	208
Figura A 60. Espectro de fragmentações <i>in-silico</i> do compostos undecaetilenoglicol.....	209
Figura A 61. Expansão do espectro MS referente ao nodo de m/z 352,89....	210
Figura A 62. Estrutura do composto himenamida B.	211

Figura A 63. Estrutura dos compostos monobromodispacamida e dihidrohimenialdesina.....	211
Figura A 64. Espectro MS da monobromodispacamida	212
Figura A 65. Expansão do espectro MS da monobromodispacamida.....	213
Figura A 66. Espectros MS/MS dos compostos himenidina (4) e monobromodispacamida.	214
Figura A 67. Espectro de fragmentação <i>in-silico</i> para o composto monobromodispacamida.	215
Figura A 68. Espectro de fragmentação <i>in-silico</i> para o composto dihidrohimenialdesina.....	216
Figura A 69. Espectro MS da dispacamida.	217
Figura A 70. Expansão do espectro MS da dispacamida.	218
Figura A 71. Espectros MS/MS da monobromodispacamida, dispacamida e oroidina.	219
Figura A 72. Espectro de fragmentação <i>in-silico</i> da dispacamida.....	220
Figura A 73. Espectro MS da keramadina.....	221
Figura A 74. Expansão do espectro MS da keramadina.	222
Figura A 75. Espectros MS/MS da himenidina (4) e da keramadina.	223
Figura A 76. Espectro de fragmentação <i>in-silico</i> para o composto keramadina	224
Figura A 77. Espectro MS da longamida B.	225
Figura A 78. Expansão do espectro MS da longamida B.	226
Figura A 79. Espectro MS/MS da longamida B.	227
Figura A 80. Espectro de fragmentação <i>in-silico</i> para o composto longamida B.	228
Figura A 81. Espectro MS do éster metílico da longamida B.	229
Figura A 82. Expansão do espectro MS do éster metílico da longamida B....	230
Figura A 83. Espectro MS/MS do éster metílico da longamida B.....	231
Figura A 84. Espectro de fragmentação <i>in-silico</i> para o composto éster metílico da longamida B.	232
Figura A 85. Espectro MS do hanishin.	233
Figura A 86. Expansão do espectro MS do hanishin.....	234
Figura A 87. Espectro MS/MS do hanishin.....	235
Figura A 88. Espectro de fragmentação <i>in-silico</i> para o composto hanishin. .	236

Figura A 89. Espectro MS do éster metílico da 3-debromolongamida B.	237
Figura A 90. Expansão do espectro MS do éster metílico da 3-debromolongamida B.....	238
Figura A 91. Espectro MS/MS do éster metílico da 3-debromolongamida B..	239
Figura A 92. Espectro de fragmentação <i>in-silico</i> do éster metílico da 3-debromolongamida B.	240
Figura A 93. Espectro MS da 3-debromohanishin.....	241
Figura A 94. Expansão do espectro MS da 3-debromohanishin.	242
Figura A 95. Espectro MS/MS da 3-debromohanishin.	243
Figura A 96. Espectro de fragmentação <i>in-silico</i> para o 3-debromohanishin.	244
Figura A 97. Espectros MS dos compostos dibromoageliferina (8), bromoageliferina (9) e ageliferina (10).	245
Figura A 98. Expansão dos espectros MS dos compostos dibromoageliferina (8), bromoageliferina (9) e ageliferina (10).	246
Figura A 99. Espectro de RMN de ¹ H da dibromoageliferina (8) (600 MHz, em MeOH- <i>d</i> ₄).	247
Figura A 100. Espectro de NOESY 1D da dibromoageliferina (8) irradiado em H-10 (600 MHz, em MeOH- <i>d</i> ₄).....	248
Figura A 101. Espectro de RMN de ¹ H da monobromoageliferina (9) (600 MHz, em MeOH- <i>d</i> ₄).	249
Figura A 102. Espectro de NOESY 1D da bromoageliferina (9) irradiado em H-10 (600 MHz, em MeOH- <i>d</i> ₄).....	250
Figura A 103. Espectro de RMN de ¹ H da ageliferina (10) (600 MHz, em MeOH- <i>d</i> ₄).....	251
Figura A 104. Espectro de NOESY 1D da ageliferina (10) irradiado em H-10 (600 MHz, em MeOH- <i>d</i> ₄).....	252
Figura A 105. Espectros MS/MS do composto bromoageliferina (9) a partir dos íons precursores de <i>m/z</i> 696,95 e <i>m/z</i> 700,96.	253
Figura A 106. Espectros MS/MS do composto ageliferina (10), a partir dos íons precursores <i>m/z</i> 619,05 e <i>m/z</i> 623,05.	254
Figura A 107. Espectro MS do composto nagelamida H (11).	258
Figura A 108. Expansão do espectro MS do composto nagelamida H (11)... ..	259
Figura A 109. Espectro de RMN de ¹ H da nagelamida H (11) (600 MHz, em DMSO- <i>d</i> ₆).....	260

Figura A 110. Espectro de RMN de ^{13}C da nagelamida H (11) (150 MHz, em DMSO- d_6).....	261
Figura A 111. Espectro COSY da nagelamida H (11) (600 MHz, em DMSO- d_6).	262
Figura A 112. Espectro HSQC da nagelamida H (11) (600 MHz, em DMSO- d_6).	263
Figura A 113. Espectro HMBC da nagelamida H (11) (600 MHz, em DMSO- d_6).	264
Figura A 114. Espectros MS/MS do composto nagelamida H (11) a partir dos íons precursores de m/z 895,85, m/z 899,85 e m/z 903,85.....	265
Figura A 115. Espectro MS dos compostos nagelamida H2/H3 (12/13).	268
Figura A 116. Expansão do espectro MS dos compostos nagelamida H2/H3 (12/13).....	269
Figura A 117. Espectro de RMN de ^1H da nagelamida H2/H3 (12/13) (600 MHz, em DMSO- d_6).....	270
Figura A 118. Expansão do espectro de RMN de ^1H da nagelamida H2/H3 (12/13) (600 MHz, em DMSO- d_6).	271
Figura A 119. Espectro de RMN de ^{13}C da nagelamida H2/H3 (12/13) (150 MHz, em DMSO- d_6).....	272
Figura A 120. Espectro COSY da nagelamida H2/H3 (12/13) (600 MHz, em DMSO- d_6).....	273
Figura A 121. Espectro HSQC da nagelamida H2/H3 (12/13) (600 MHz, em DMSO- d_6).....	274
Figura A 122. Espectro HMBC da nagelamida H2/H3 (12/13) (600 MHz, em DMSO- d_6).....	275
Figura A 123. Espectros MS/MS dos compostos nagelamidas H2 e H3 (12/13), a partir dos íons precursores m/z 817,94 e m/z 821,94.	276
Figura A 124. Espectro de IV de nagelamida H2/H3 (12/13) em filme em pastilha de Si.	281
Figura A 125. Espectro MS do composto citrinamina B (14).....	282
Figura A 126. Expansão do espectro MS do composto citrinamina B (14). ...	283
Figura A 127. Espectro de RMN de ^1H da citrinamina B (14) (600 MHz, em DMSO- d_6).....	284

Figura A 128. Espectro MS/MS do composto citrinamina B (14), a partir dos íons precursores m/z 740,03 e m/z 744,03.	285
Figura A 129. Espectro MS da dispirina B (15).	287
Figura A 130. Expansão do espectro MS da dispirina B (15).	288
Figura A 131. Espectros MS/MS da dispirina B (15).	289
Figura A 132. Espectro de RMN de ^1H da dispirina B (15) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).	290
Figura A 133. Expansão do espectro de RMN de ^1H da dispirina B (15) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).	291
Figura A 134. Expansão do espectro de RMN de ^1H da dispirina B (15) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).	292
Figura A 135. Expansão do espectro de RMN de ^1H da dispirina B (15) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).	293
Figura A 136. Expansão do espectro de RMN de ^1H da dispirina B (15) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).	294
Figura A 137. Expansão do espectro de RMN de ^1H da dispirina B (15) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).	295
Figura A 138. Espectro de RMN de ^{13}C da dispirina B (15) (150 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).	296
Figura A 139. Espectro de COSY da dispirina B (15) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).	297
Figura A 140. Espectro de HMBC da dispirina B (15) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).	298
Figura A 141. Espectro de HSQC da dispirina B (15) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).	299
Figura A 142. Espectro de IV da dispirina B (15) em filme em pastilha de Si.	300
Figura A 143. Espectro MS da dispirina C (16).	301
Figura A 144. Expansão do espectro MS da dispirina C (16).	302
Figura A 145. Espectro de RMN de ^1H da dispirina C (16) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).	303
Figura A 146. Expansão do espectro de RMN de ^1H da dispirina C (16) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).	304
Figura A 147. Expansão do espectro de RMN de ^1H da dispirina C (16) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).	305

Figura A 148. Expansão do espectro de RMN de ^1H da dispirina C (16) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).....	306
Figura A 149. Expansão do espectro de RMN de ^1H da dispirina C (16) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).....	307
Figura A 150. Expansão do espectro de RMN de ^1H da dispirina C (16) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).....	308
Figura A 151. Espectro de RMN de ^{13}C da dispirina C (16) (150 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).....	309
Figura A 152. Espectro COSY da dispirina C (16) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$). 310	
Figura A 153. Espectro COSY da dispirina C (16) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$). 311	
Figura A 154. Espectro HSQC da dispirina C (16) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$). 312	
Figura A 155. Espectros MS/MS da dipirina C (16).....	313
Figura A 156. Espectro IV da dispirina C (16) em filme em pastilha de Si.	315
Figura A 157. Espectro MS da dispirina D (17).	316
Figura A 158. Expansão do espectro MS da dispirina D (17).....	317
Figura A 159. Espectro de RMN de ^1H da dispirina D (17) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).....	318
Figura A 160. Expansão do espectro de RMN de ^1H da dispirina D (17) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).....	319
Figura A 161. Expansão do espectro de RMN de ^1H da dispirina D (17) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).....	320
Figura A 162. Expansão do espectro de RMN de ^1H da dispirina C (17) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).....	321
Figura A 163. Expansão do espectro de RMN de ^1H da dispirina C (17) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).....	322
Figura A 164. Espectro de RMN de ^{13}C da dispirina D (17) (150 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).....	323
Figura A 165. Espectro COSY da dispirina D (17) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$). 324	
Figura A 166. Espectro HMBC da dispirina D (17) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$). 325	
Figura A 167. Espectro HMBC da dispirina D (17) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$). 326	
Figura A 168. Espectros MS/MS da dispirina D (17).....	327
Figura A 169. Espectro de IV da dispirina D (17) em filme em pastilha de Si. 329	
Figura A 170. Espectro MS da dispirina E (18).	330
Figura A 171. Expansão do espectro MS da dispirina E (18).....	331

Figura A 172. Espectros MS/MS da dispirina D (18).....	332
Figura A 173. Espectro MS da dispirina F (19).....	334
Figura A 174. Expansão do espectro MS da dispirina F (19).....	335
Figura A 175. Espectros MS/MS da dispirina F (19).	336
Figura A 176. Espectro MS da dispiramida A (20).	338
Figura A 177. Expansão do espectro MS da dispiramida A (20).....	339
Figura A 178. Espectro de RMN de ^1H da dispiramida A (20) (600 MHz, em DMSO- d_6).....	340
Figura A 179. Expansão do espectro de RMN de ^1H da dispiramida A (20) (600 MHz, em DMSO- d_6).....	341
Figura A 180. Expansão do espectro de RMN de ^1H da dispiramida A (20) (600 MHz, em DMSO- d_6).....	342
Figura A 181. Expansão do espectro de RMN de ^1H da dispiramida A (20) (600 MHz, em DMSO- d_6).....	343
Figura A 182. Expansão do espectro de RMN de ^1H da dispiramida A (20) (600 MHz, em DMSO- d_6).....	344
Figura A 183. Expansão do espectro de RMN de ^1H da dispiramida A (20) (600 MHz, em DMSO- d_6).....	345
Figura A 184. Espectro de RMN de ^{13}C da dispiramida A (20) (150 MHz, em DMSO- d_6).....	346
Figura A 185. Espectro COSY da dispiramida A (20) (600 MHz, em DMSO- d_6).	347
Figura A 186. Espectro HMBC da dispiramida A (20) (600 MHz, em DMSO- d_6).	348
Figura A 187. Espectro HSQC da dispiramida A (20) (600 MHz, em DMSO- d_6).	349
Figura A 188. Espectros MS/MS da dispiramida A (20).....	350
Figura A 189. Espectro de IV da dispiramida A (20) em filme em pastilha de Si.	351
Figura A 190. Espectro MS da dispiramida B (21).	352
Figura A 191. Expansão dos espectro MS da dispiramida B (21).....	353
Figura A 192. Espectro de RMN de ^1H da dispiramida B (21) (600 MHz, em DMSO- d_6).....	354

Figura A 193. Espectro de RMN de ^1H da disparamida B (21) (600 MHz, em DMSO- d_6).....	355
Figura A 194. Expansão do espectro de RMN de ^1H da disparamida B (21) (600 MHz, em DMSO- d_6).....	356
Figura A 195. Expansão do espectro de RMN de ^1H da disparamida B (21) (600 MHz, em DMSO- d_6).....	357
Figura A 196. Expansão do espectro de RMN de ^1H da disparamida B (21) (600 MHz, em DMSO- d_6).....	358
Figura A 197. Expansão do espectro de RMN de ^1H da disparamida B (21) (600 MHz, em DMSO- d_6).....	359
Figura A 198. Expansão do espectro de RMN de ^1H da disparamida B (21) (600 MHz, em DMSO- d_6).....	360
Figura A 199. Espectro de RMN de ^{13}C da disparamida B (21) (150 MHz, em DMSO- d_6).....	361
Figura A 200. Espectro COSY da disparamida B (21) (600 MHz, em DMSO- d_6).	362
Figura A 201. Espectro HMBC da disparamida B (21) (600 MHz, em DMSO- d_6).	363
Figura A 202. Espectro HSQC da disparamida B (21) (600 MHz, em DMSO- d_6).	364
Figura A 203. Espectro MS/MS da disparamida B (21).....	365
Figura A 204. Espectro IV da disparamida B (21) em filme em pastilha de Si.	368
Figura A 205. Espectro MS da diparamida C (22).....	369
Figura A 206. Expansão do espectro MS da disparamida C (22).....	370
Figura A 207. Espectros MS/MS da disparamida C (22).....	371

Lista de Tabelas

Tabela A 1. Dados de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C (δ , ppm) para os resíduos de aminoácidos identificados para a oceanapiamida A em $\text{MeOH-}d_4$ (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz).....	180
Tabela A 2. Íons observados nos espectros MS/MS do composto bromoageliferina (9) a partir dos íons precursores de m/z 696,95 e m/z 700,96	255
Tabela A 3. Íons observados nos espectros MS/MS do composto ageliferina (10) a partir dos íons precursores de m/z 619,05 e m/z 623,05.	257
Tabela A 4. Íons observados nos espectros MS/MS do composto nagelamida H (11) a partir dos íons precursores de m/z 895,85, m/z 899,85 e m/z 903,85.	266
Tabela A 5. Íons observados nos espectros MS/MS do composto nagelamide H2 (12) a partir dos íons precursores de m/z 817,94 e m/z 821,94.	277
Tabela A 6. Íons observados nos espectros MS/MS do composto nagelamide H3 (13) a partir dos íons precursores de m/z 817,94 e m/z 821,94.	279
Tabela A 7. Íons observados nos espectros MS/MS do composto citrinamina B (14) a partir dos íons precursores de m/z 740,03 e m/z 744,03.	286
Tabela A 8. Íons observados nos espectros MS/MS do composto dispirina C (16) a partir dos íons precursores de m/z 597,92 e m/z 601,91.	314
Tabela A 9. Íons observados nos espectros MS/MS do composto dispirina D (17) a partir do íon precursor de m/z 645,91.	328
Tabela A 10. Íons observados nos espectros MS/MS do composto dispirina E (18) a partir dos íons precursores de m/z 627,84, m/z 631,84 e m/z 635,84.	333
Tabela A 11. Íons observados nos espectros MS/MS do composto dispirina F (19) a partir dos íons precursores de m/z 675,83 e m/z 679,82.	337
Tabela A 12. Íons observados nos espectros MS/MS do composto disparamida B (21) a partir dos íons precursores de m/z 722,97 e m/z 726,97.....	366
Tabela A 13. Íons observados nos espectros MS/MS do composto disparamida C (22) a partir dos íons precursores de m/z 800,88, m/z 804,88 e m/z 808,87	372

Figura A 1. Espectro MS da microcionamida A (1).

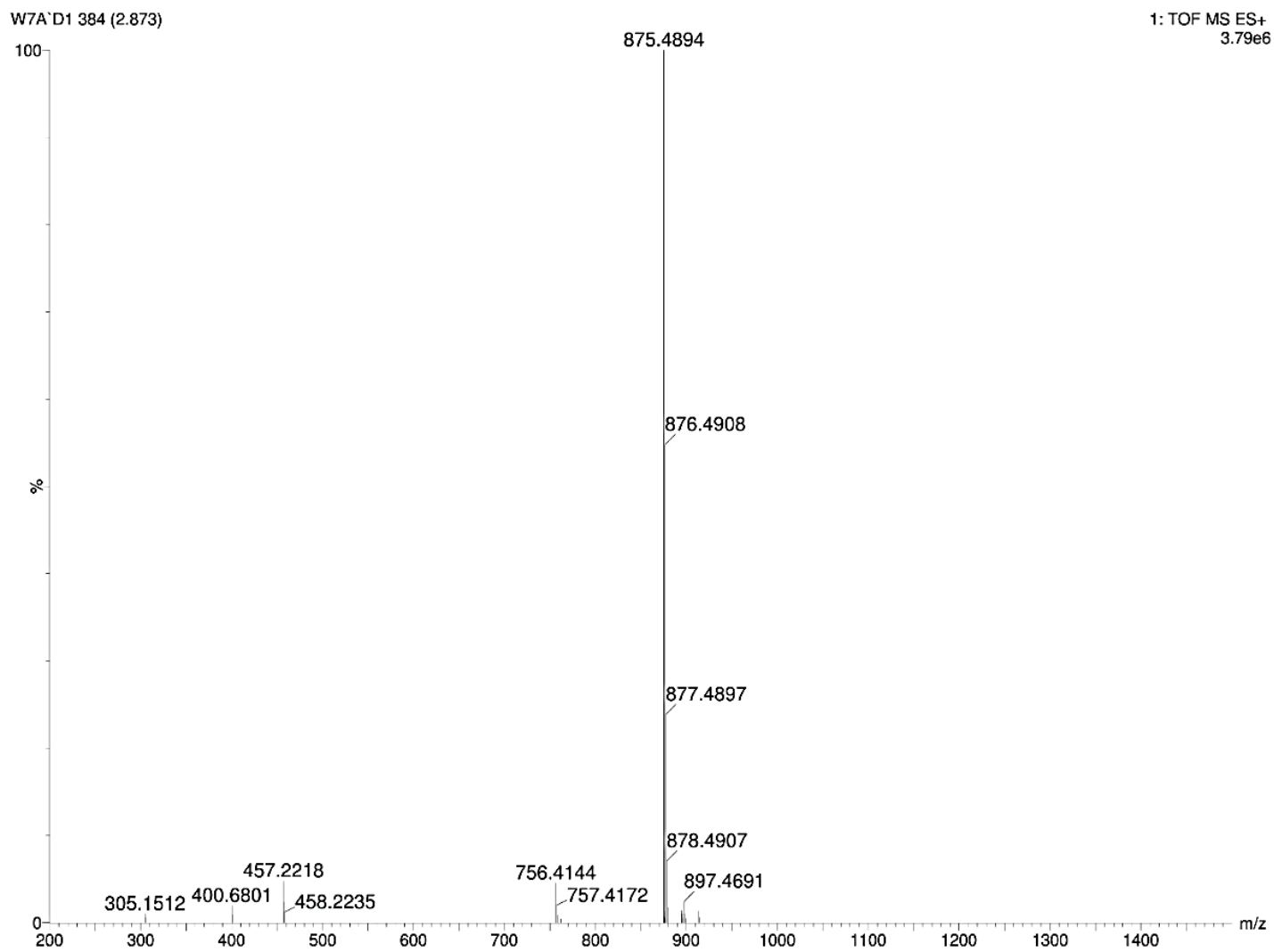


Figura A 2. Espectro MS/MS da microcionamida A (1).

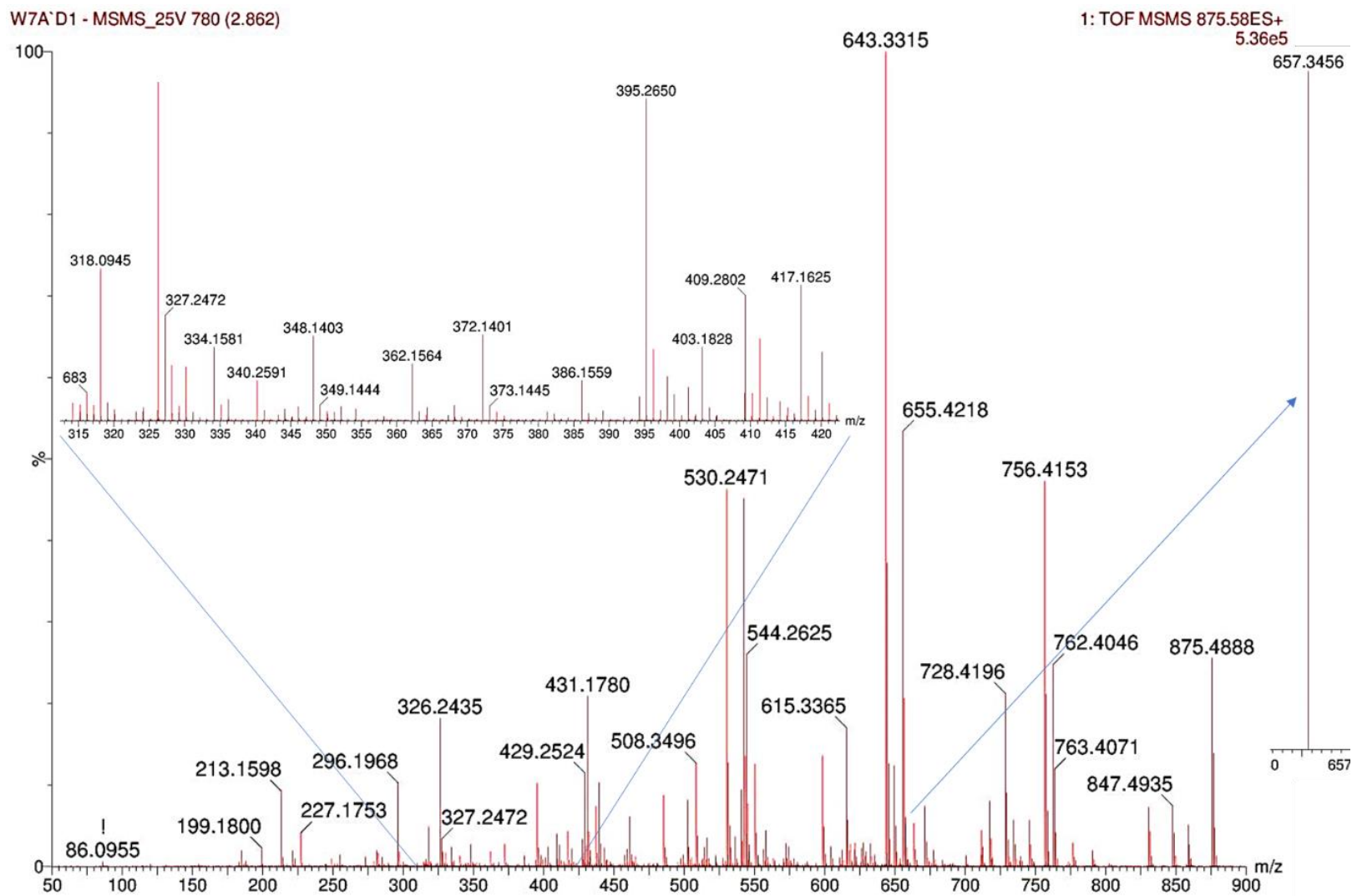


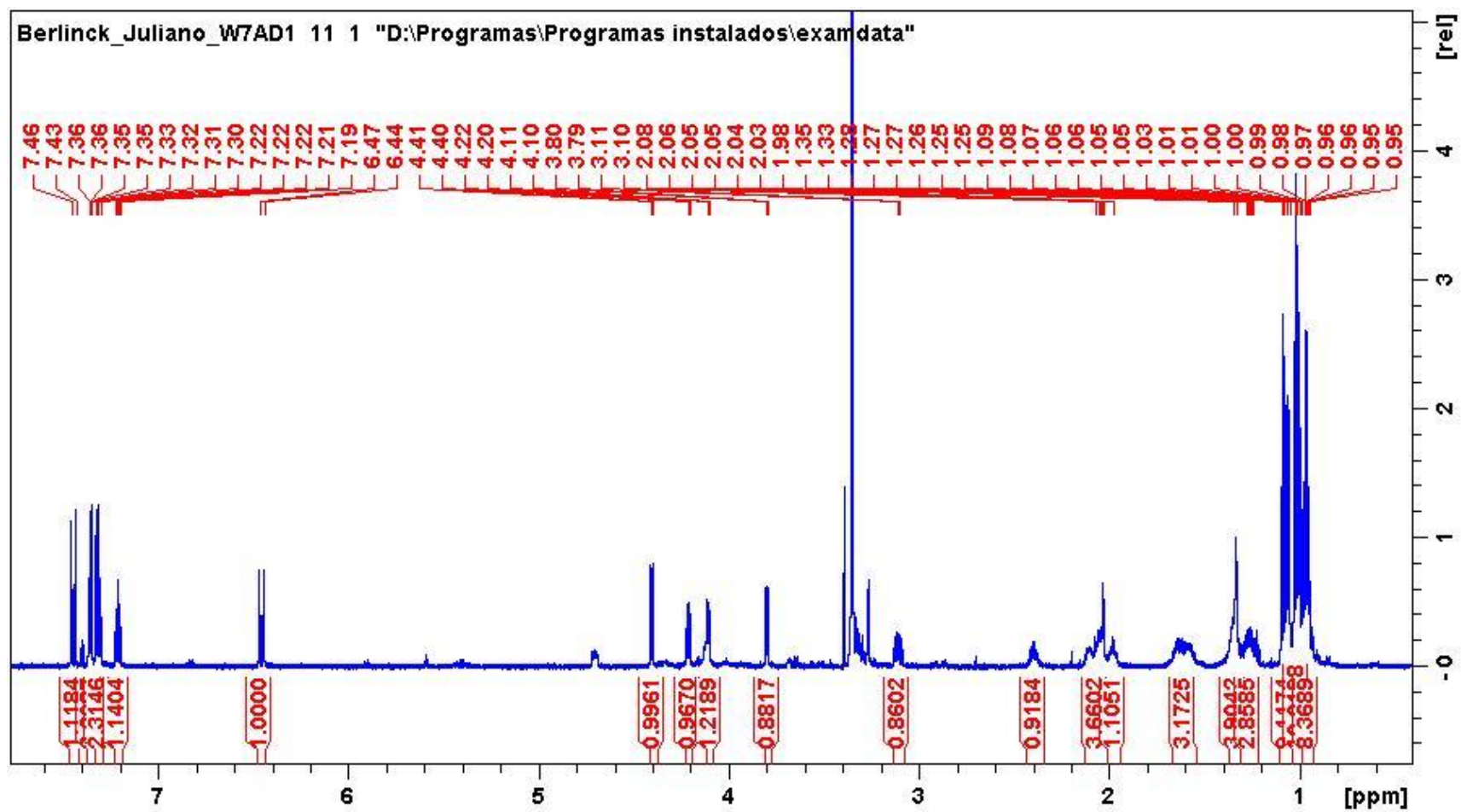
Figura A 3. RMN de ^1H da microcionamida A (1) (600 MHz, $\text{MeOH-}d_4$).

Figura A 4. Espectro MS da clathriamida (2).

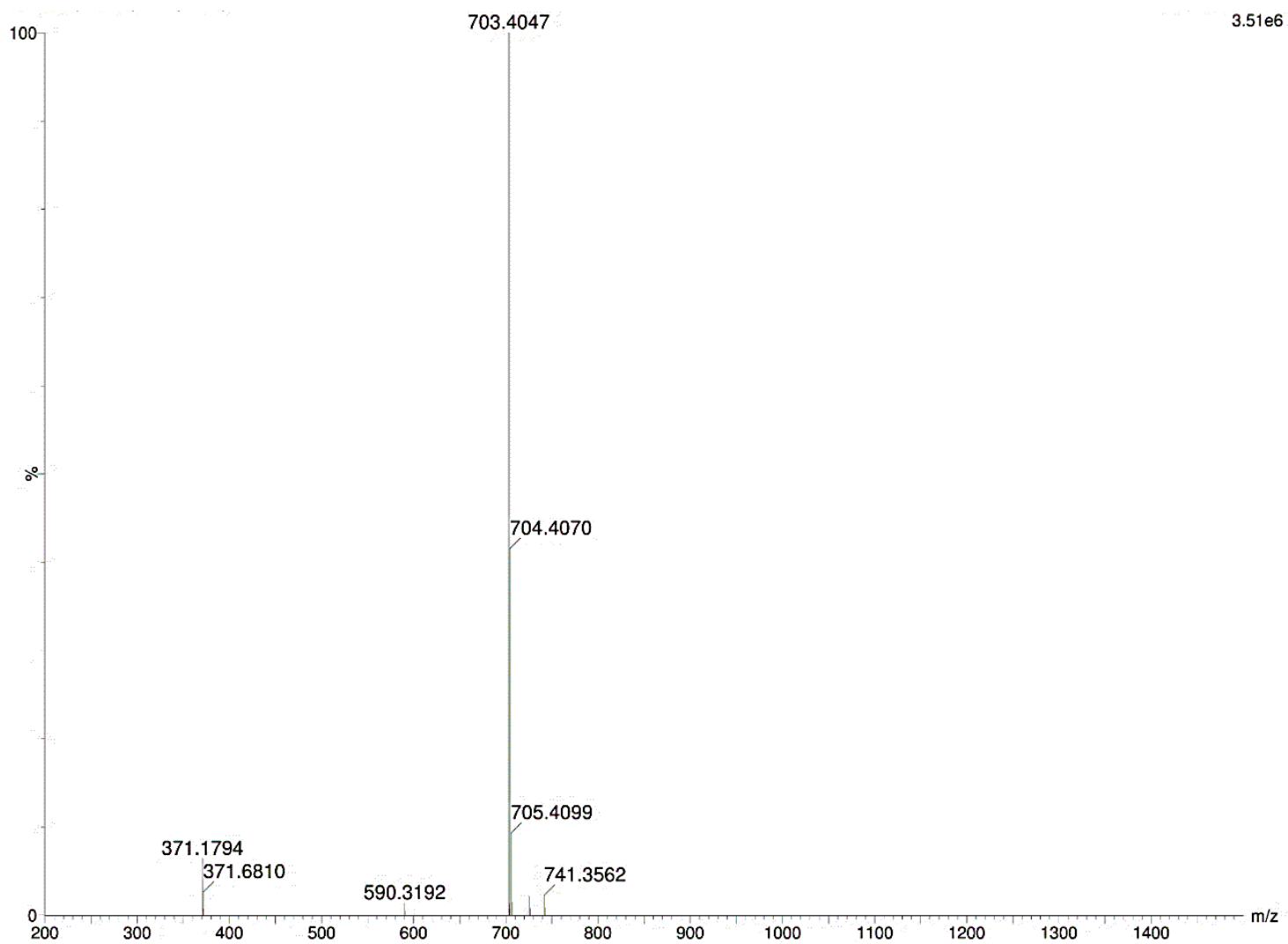


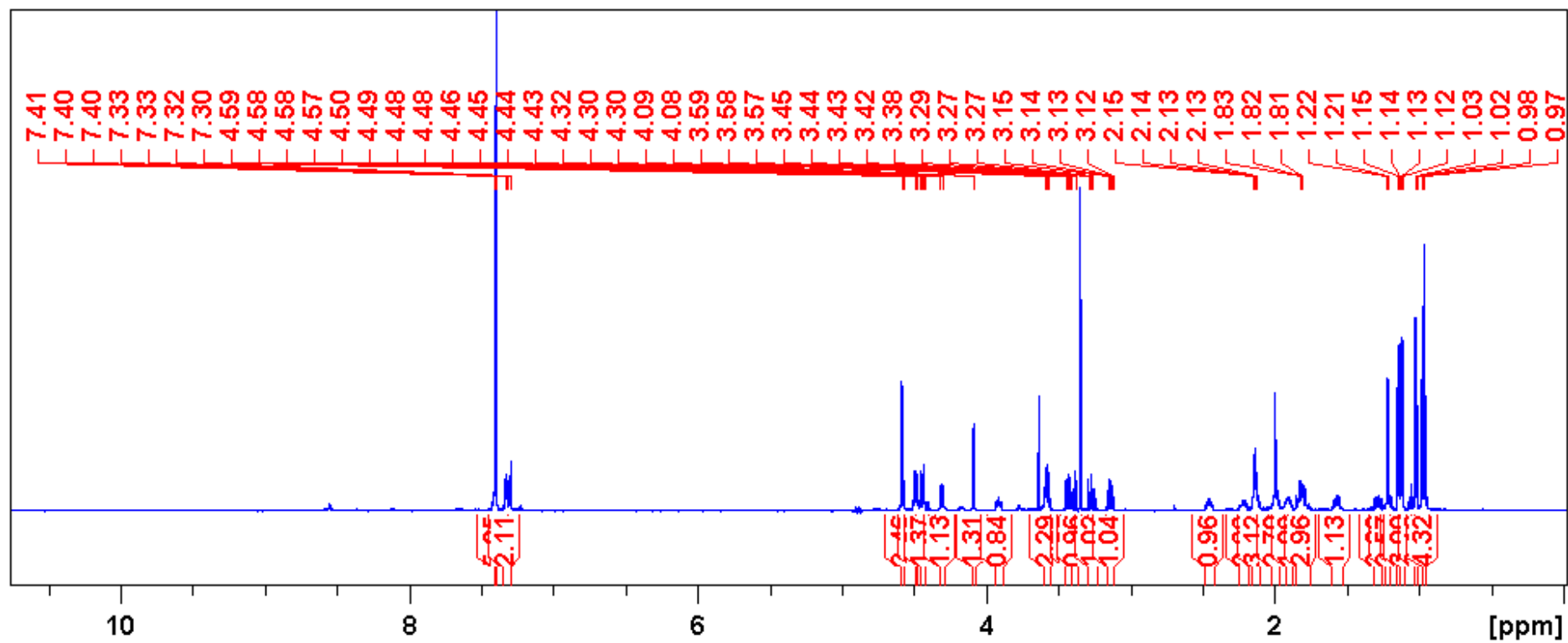
Figura A 5. Espectro de RMN de ^1H da clathriamida (**2**) (600 MHz, $\text{MeOH-}d_4$).

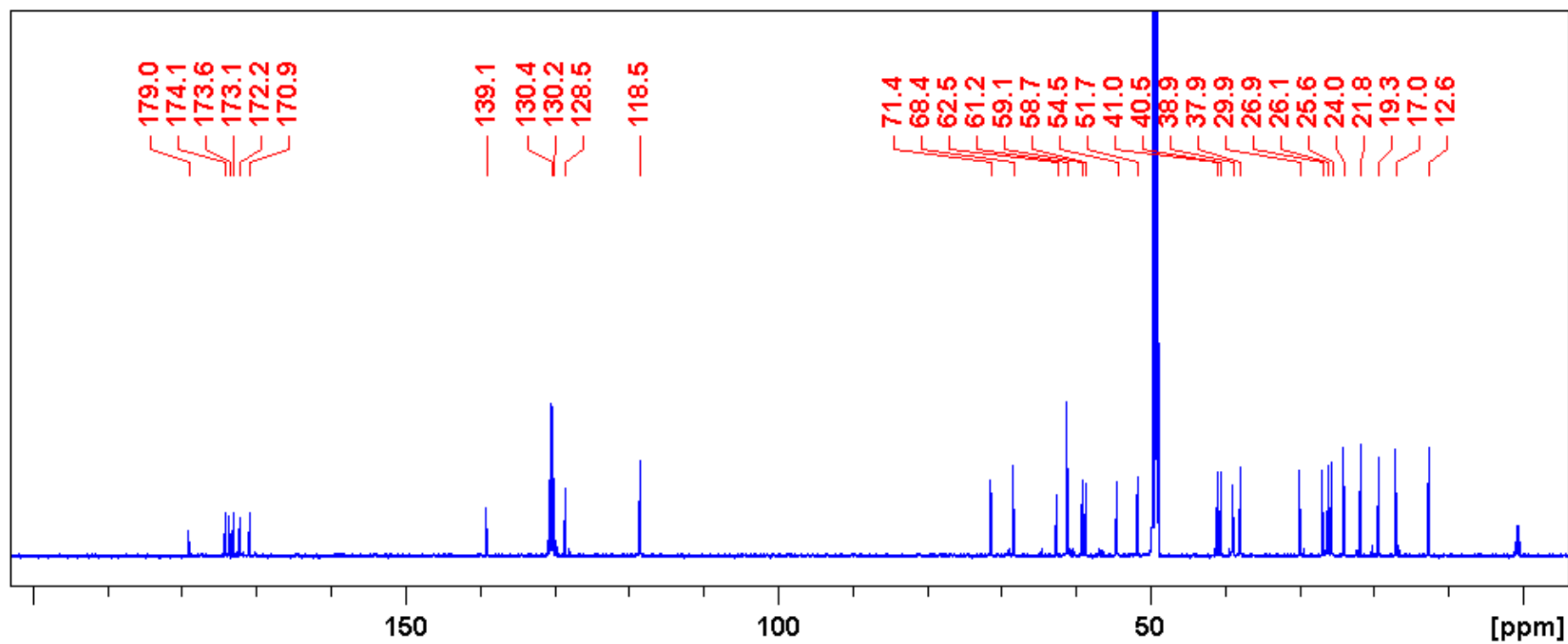
Figura A6. Espectro de RMN de ^{13}C da clathriamida (**2**) (150 MHz, $\text{MeOH-}d_4$).

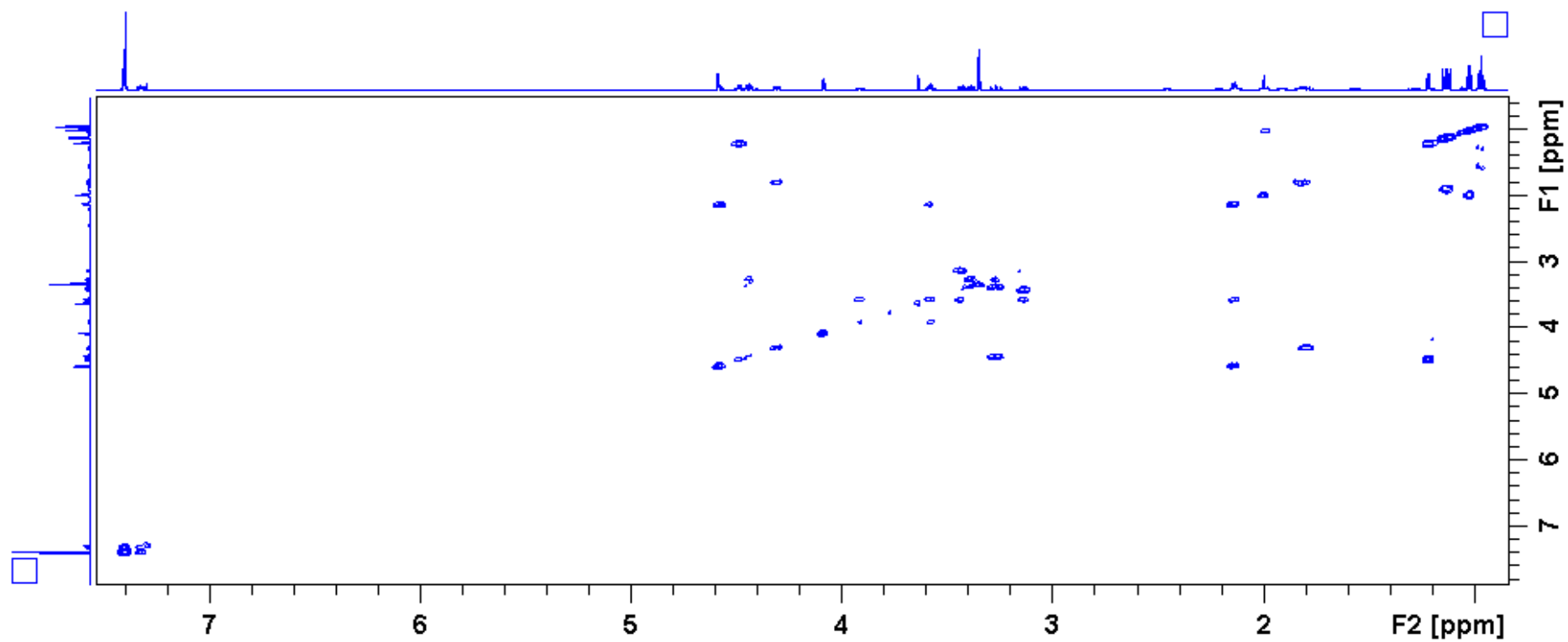
Figura A 7. Espectro COSY da clathriamida (2) (MeOH- d_4).

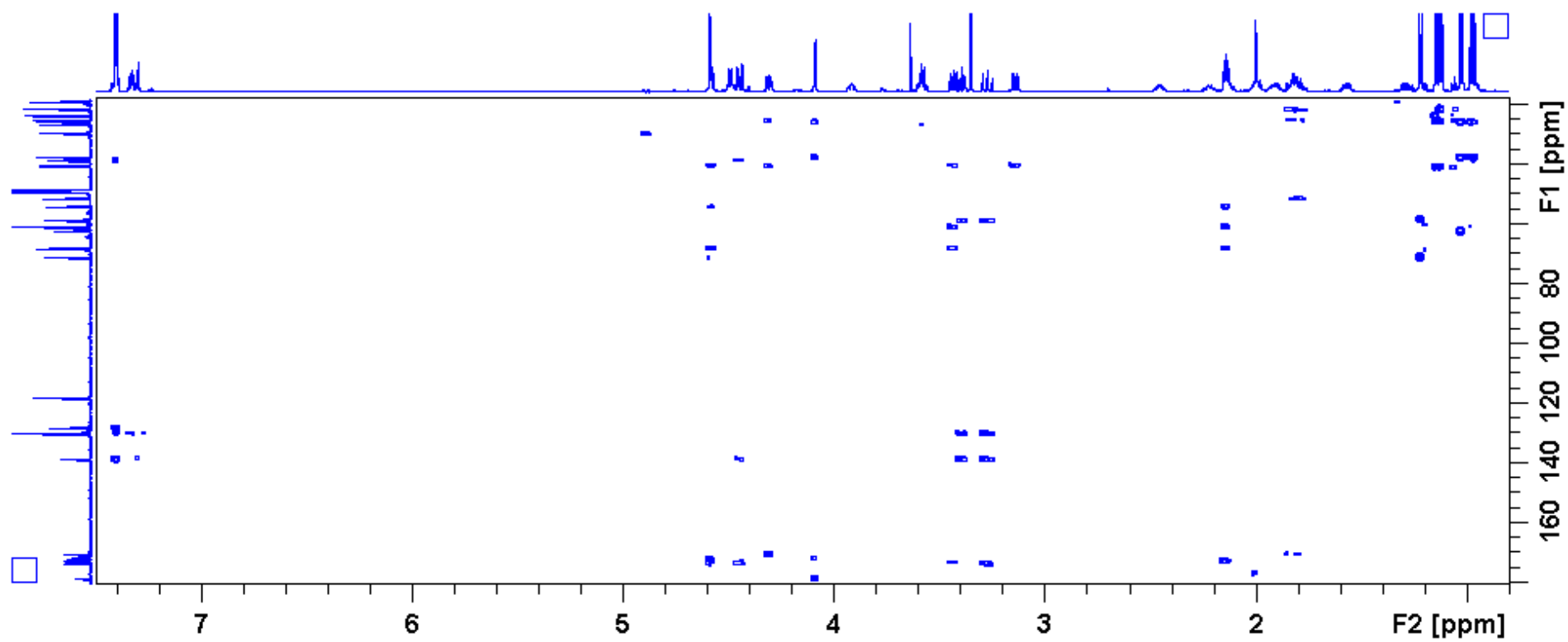
Figura A 8. Espectro HMBC da clathriamida (2) (MeOH- d_4).

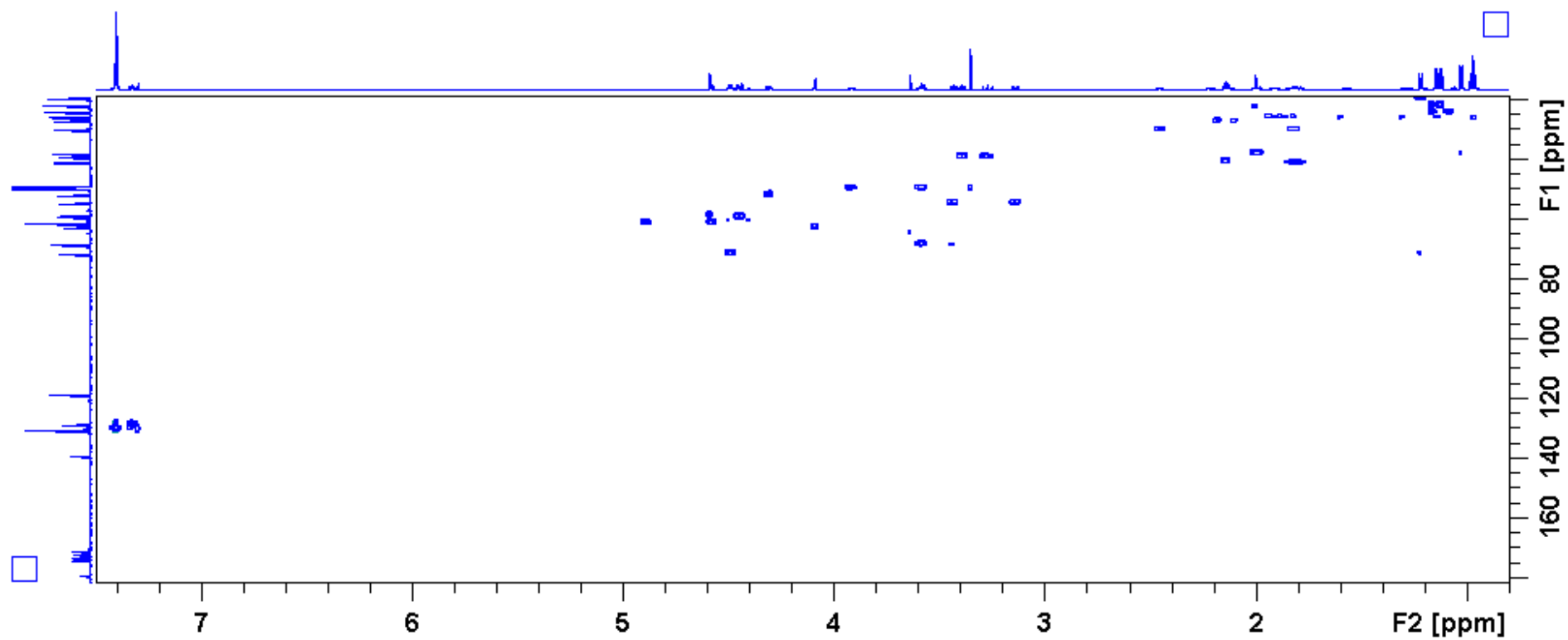
Figura A 9. Espectro HSQC da clathriamida (2) em (MeOH- d_4).

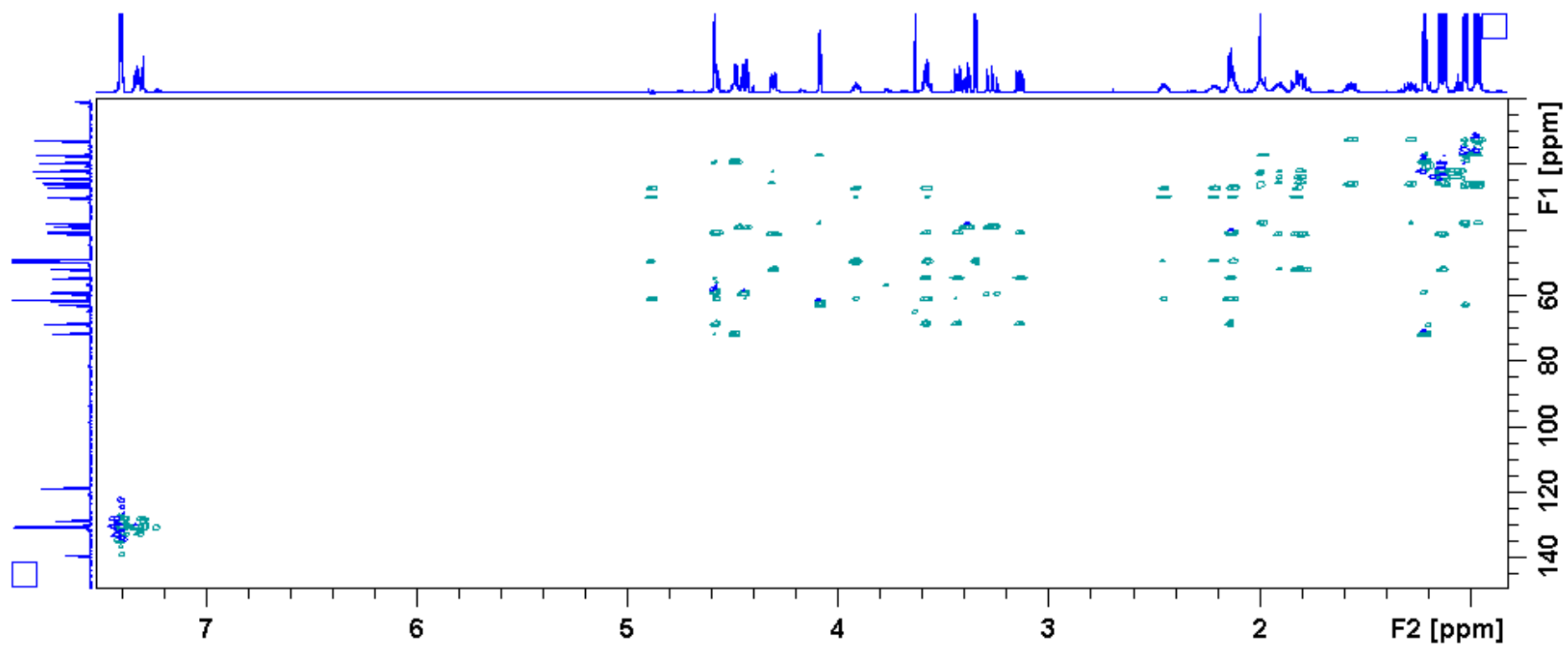
Figura A 10. Espectro de HSQC-TOCSY da clathriamida (2) em MeOH- d_4 .

Figura A 11. Espectro no IV da clathriamida (2) em filme em pastilha de Si.

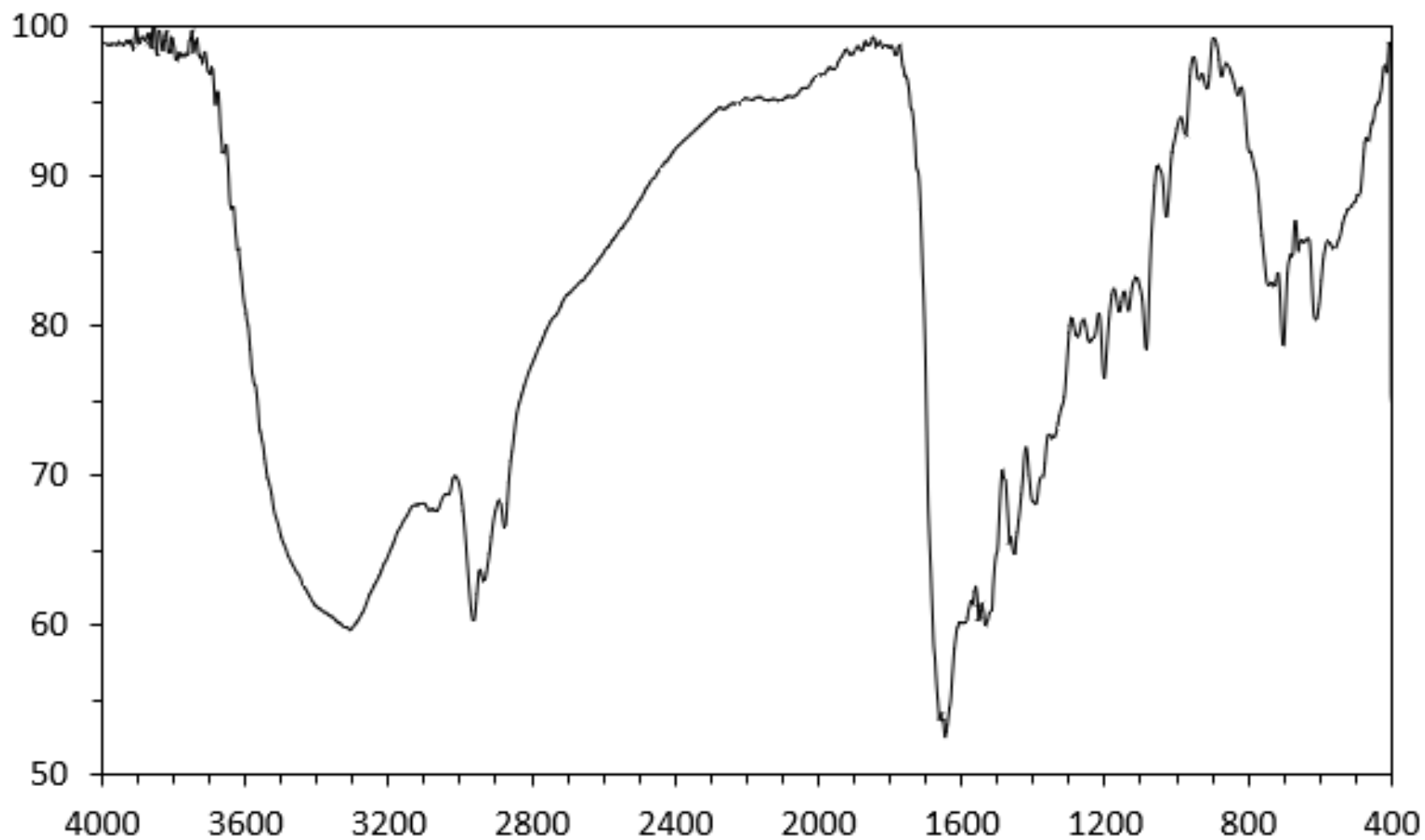


Figura A 12. Espectro MS/MS da clathriamida (2).

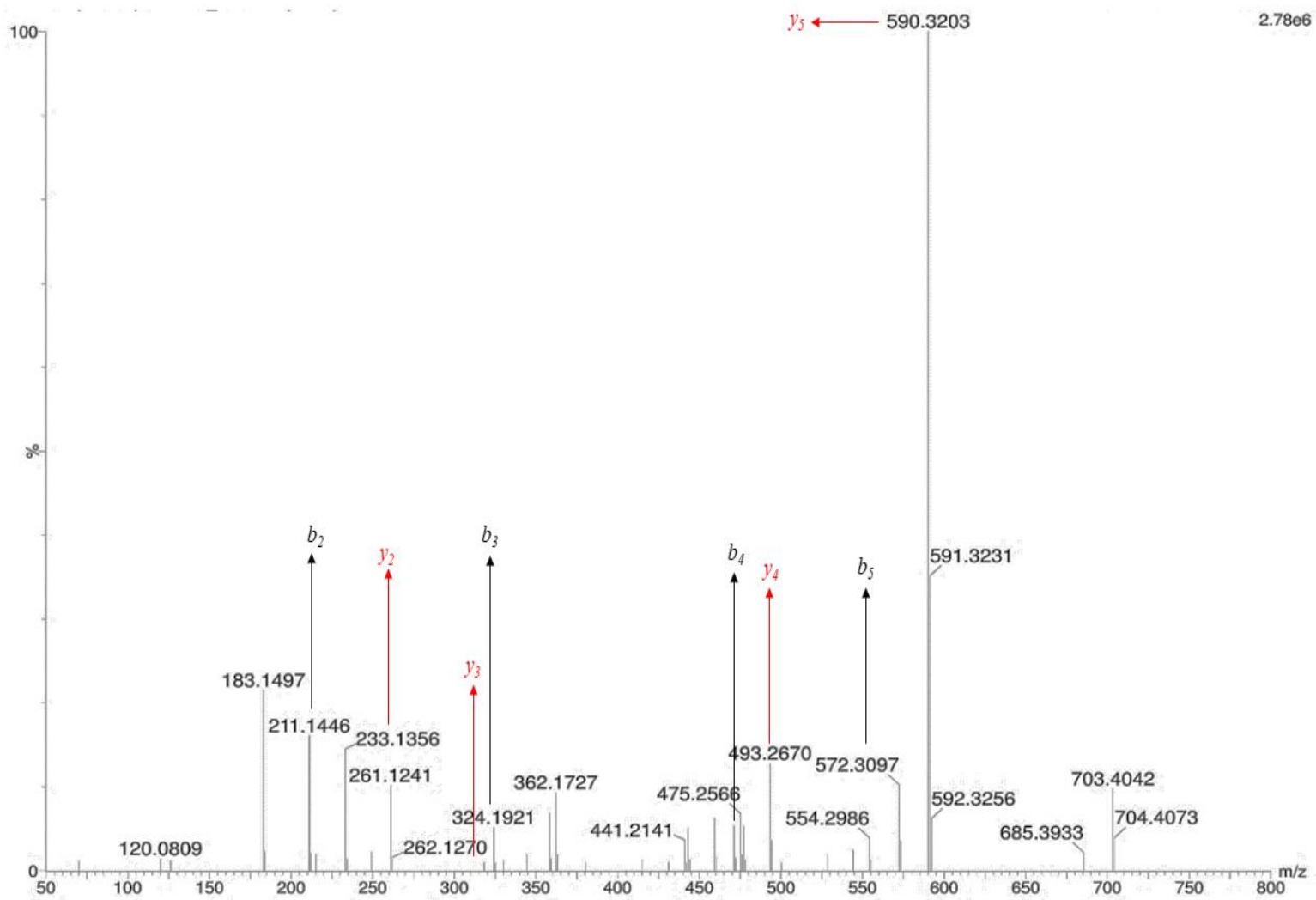


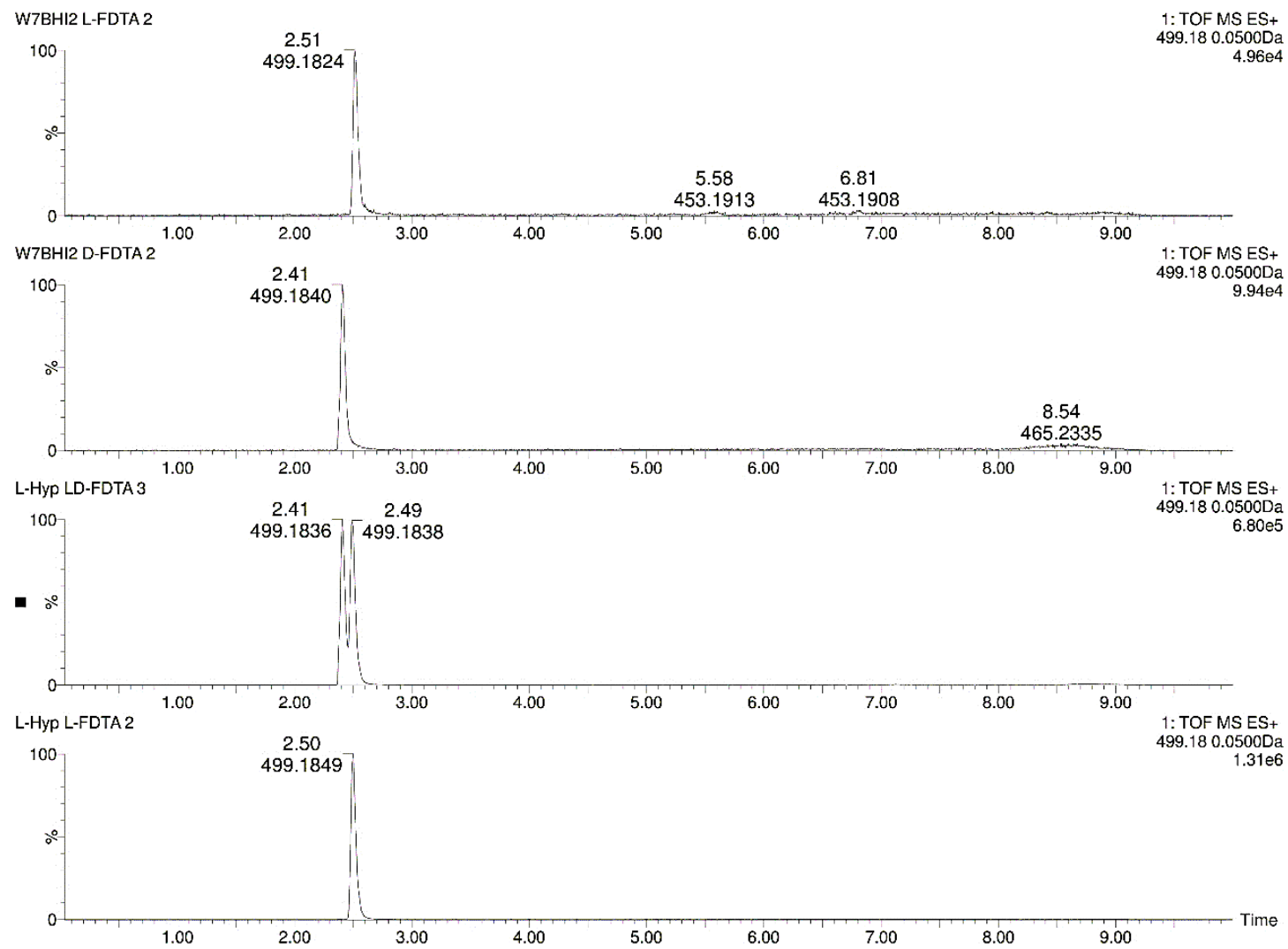
Figura A 13. XIC m/z 499,18 da análise do padrão 4-*trans*-L-Hyp e da clathriamida (2) derivatizados com L e D-FDTA.

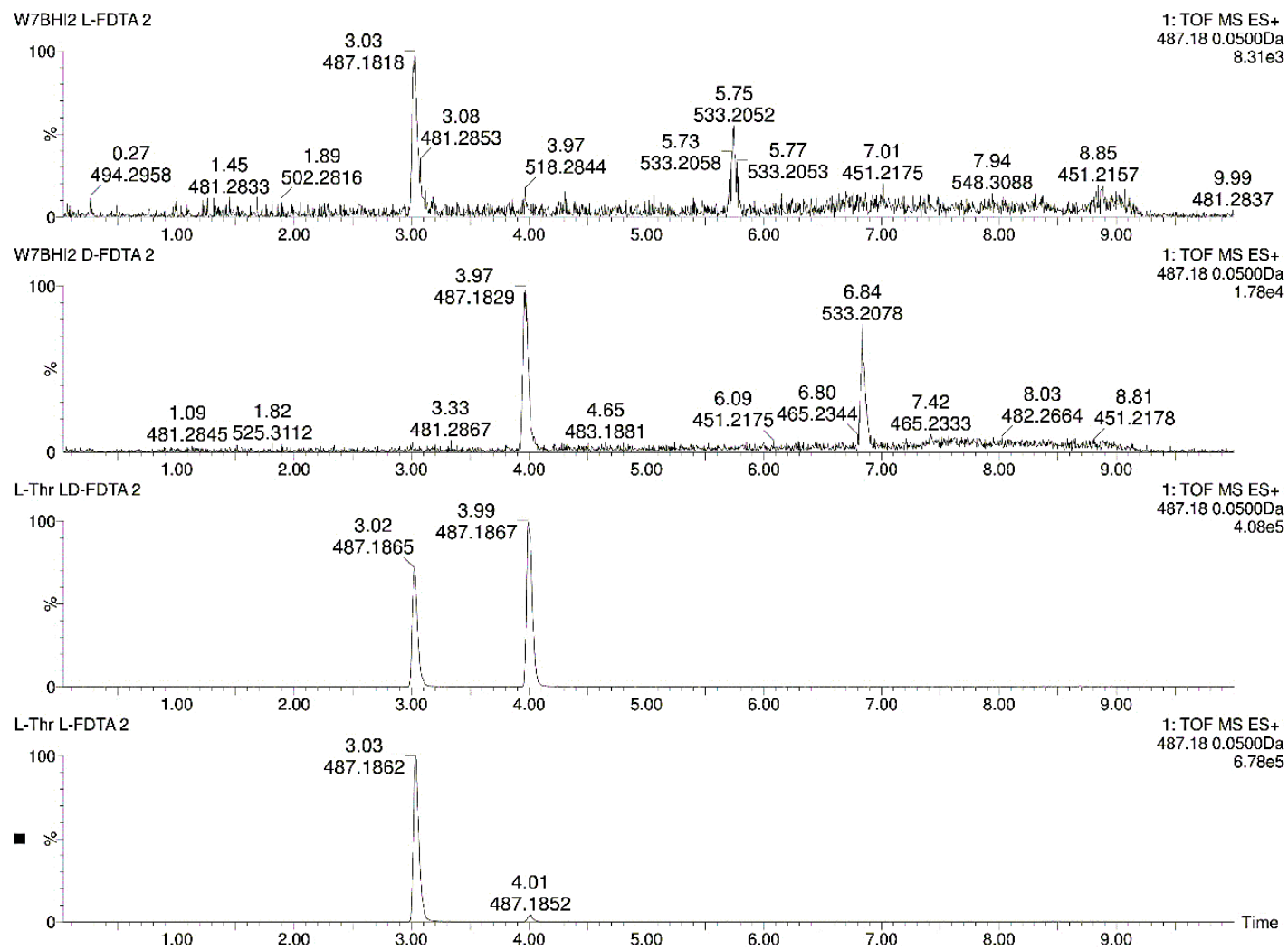
Figura A 14. XIC m/z 487,18 da análise do padrão L-Thr e da clathriamida (2) derivatizados com L e D-FDTA.

Figura A15. XIC m/z 483,19 da análise do padrão L-Pro derivatizado com L-FDTA e da clathriamida (2) derivatizados com L e D-FDTA.

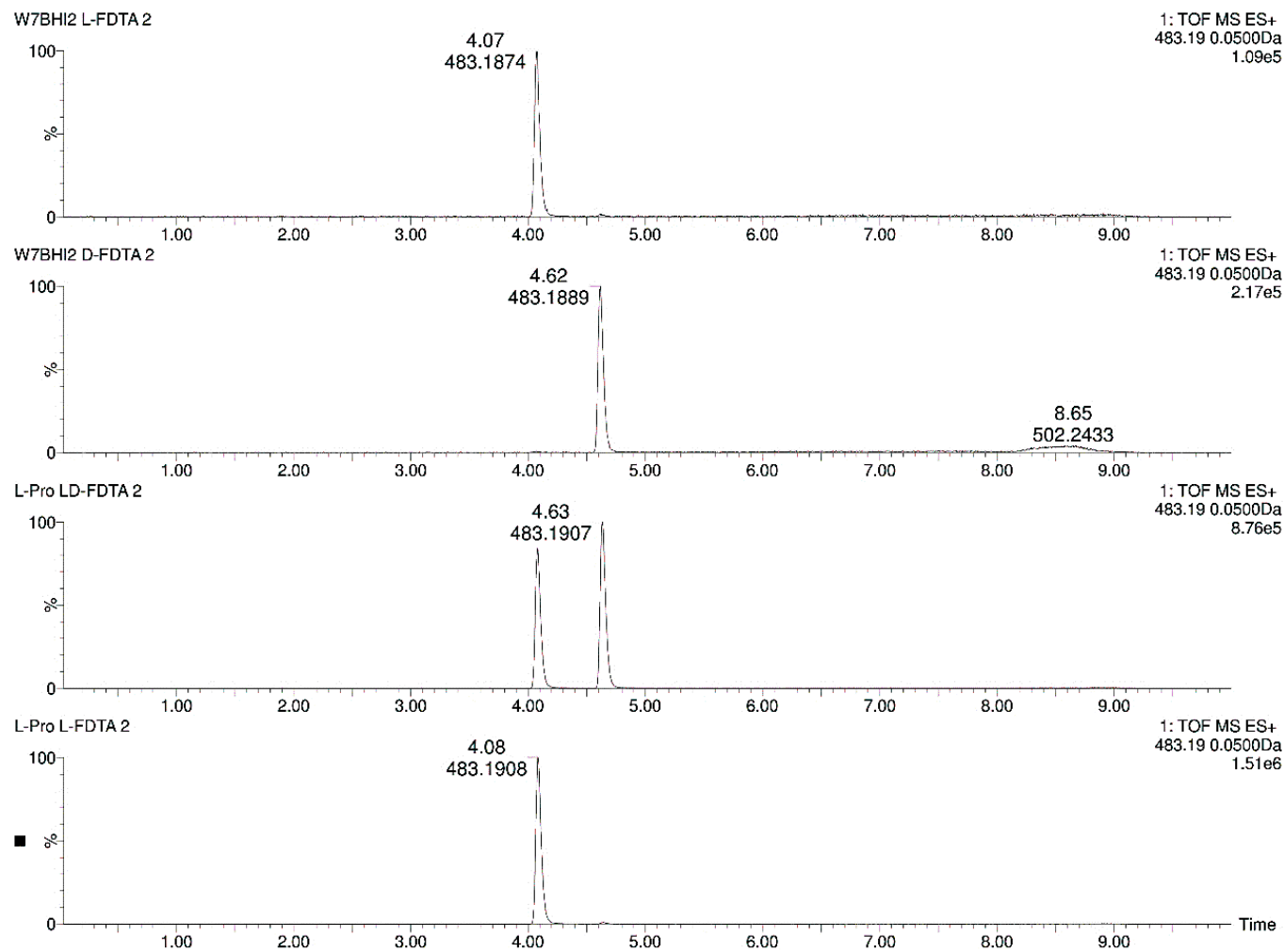


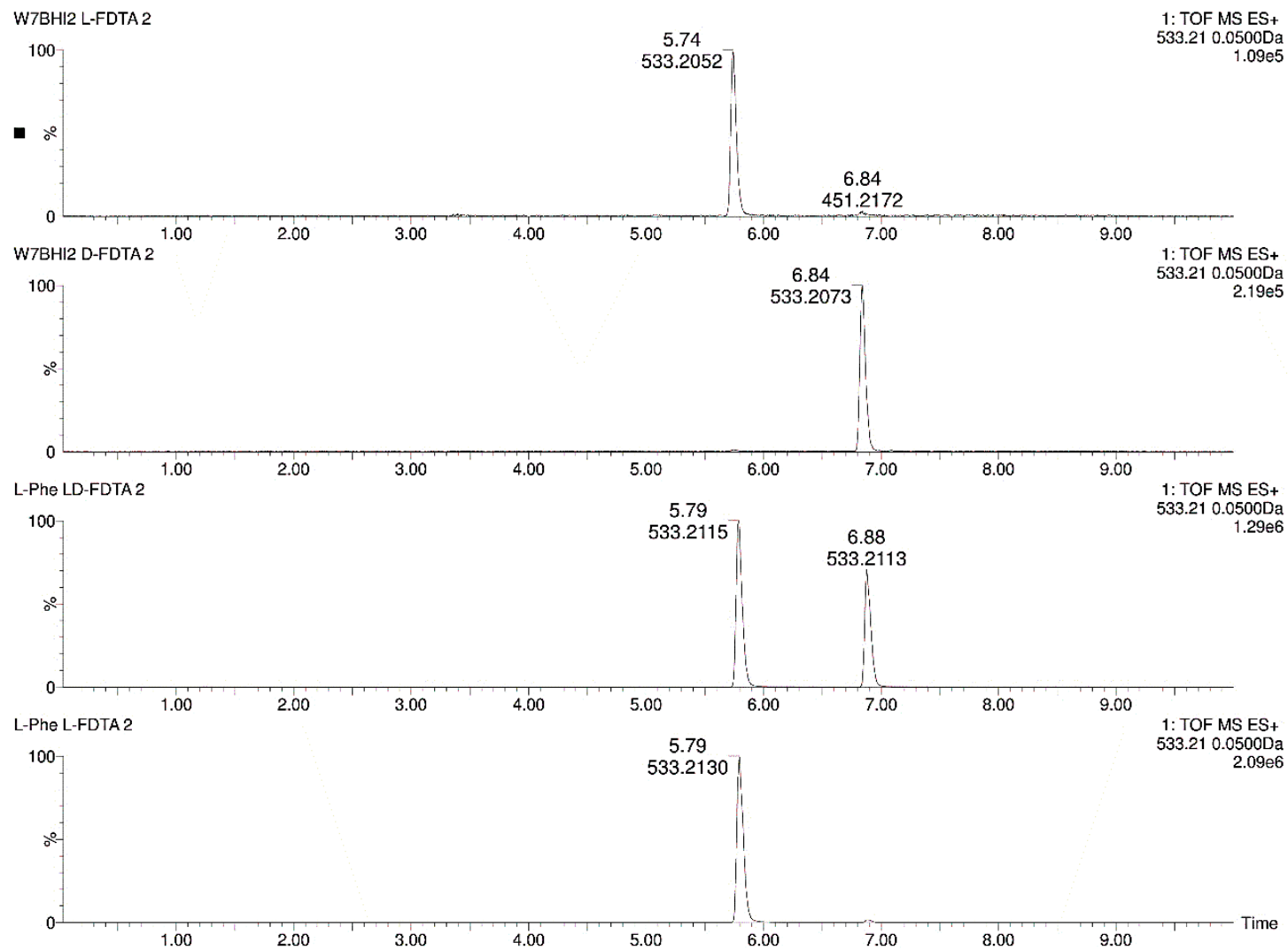
Figura A 16. XIC m/z 533,21 da análise do padrão L-Phe e da clathriamida (2) derivatizados com L e D-FDTA.

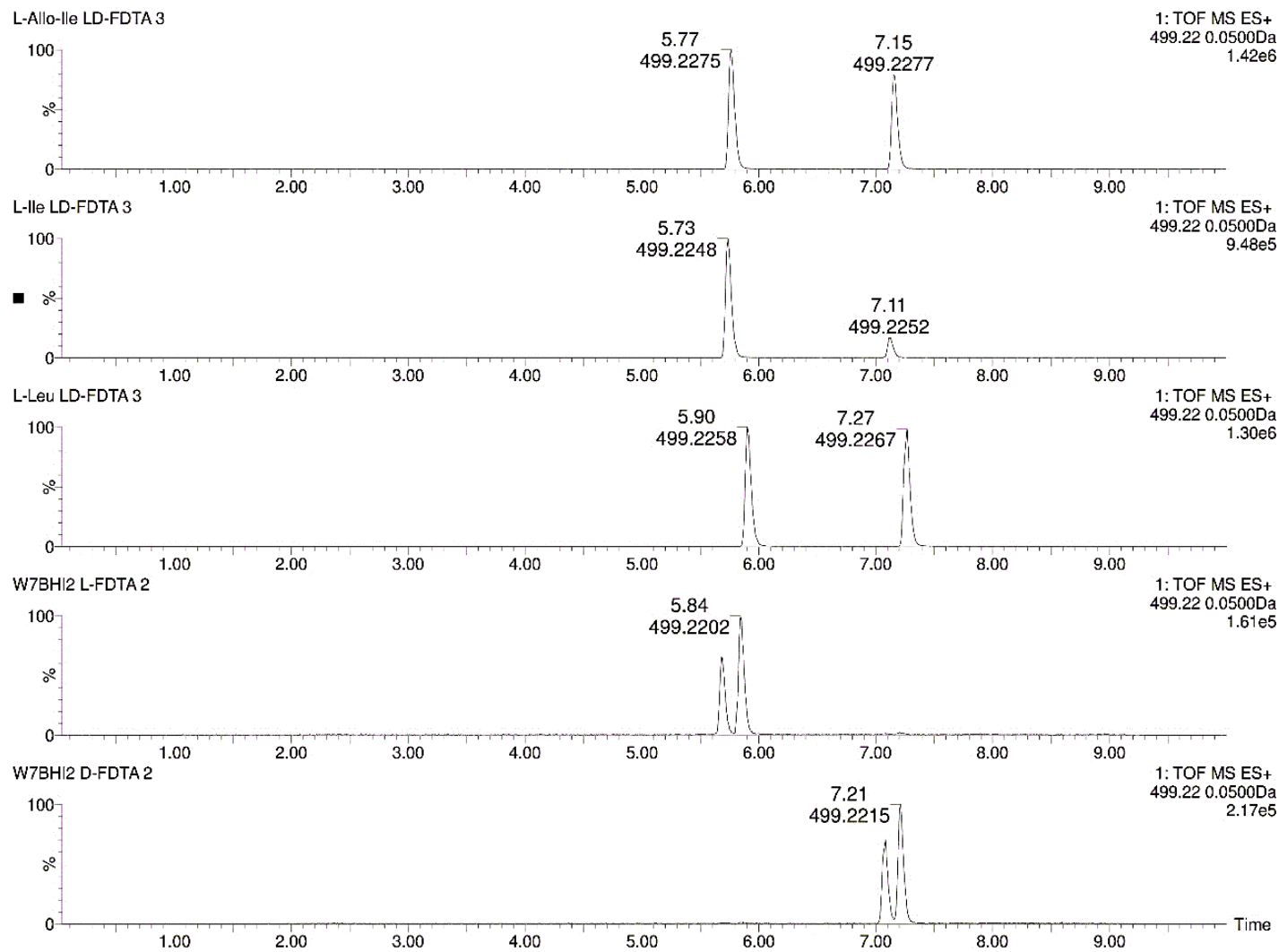
Figura A 17. XIC m/z 499.22 da análise dos padrões L-*allo*-Ile, L-Ile e L-Leu e da clathriamida (**2**) derivatizados com L e D-FDTA.

Figura A 18. Espectro MS da oceanapiamida A.

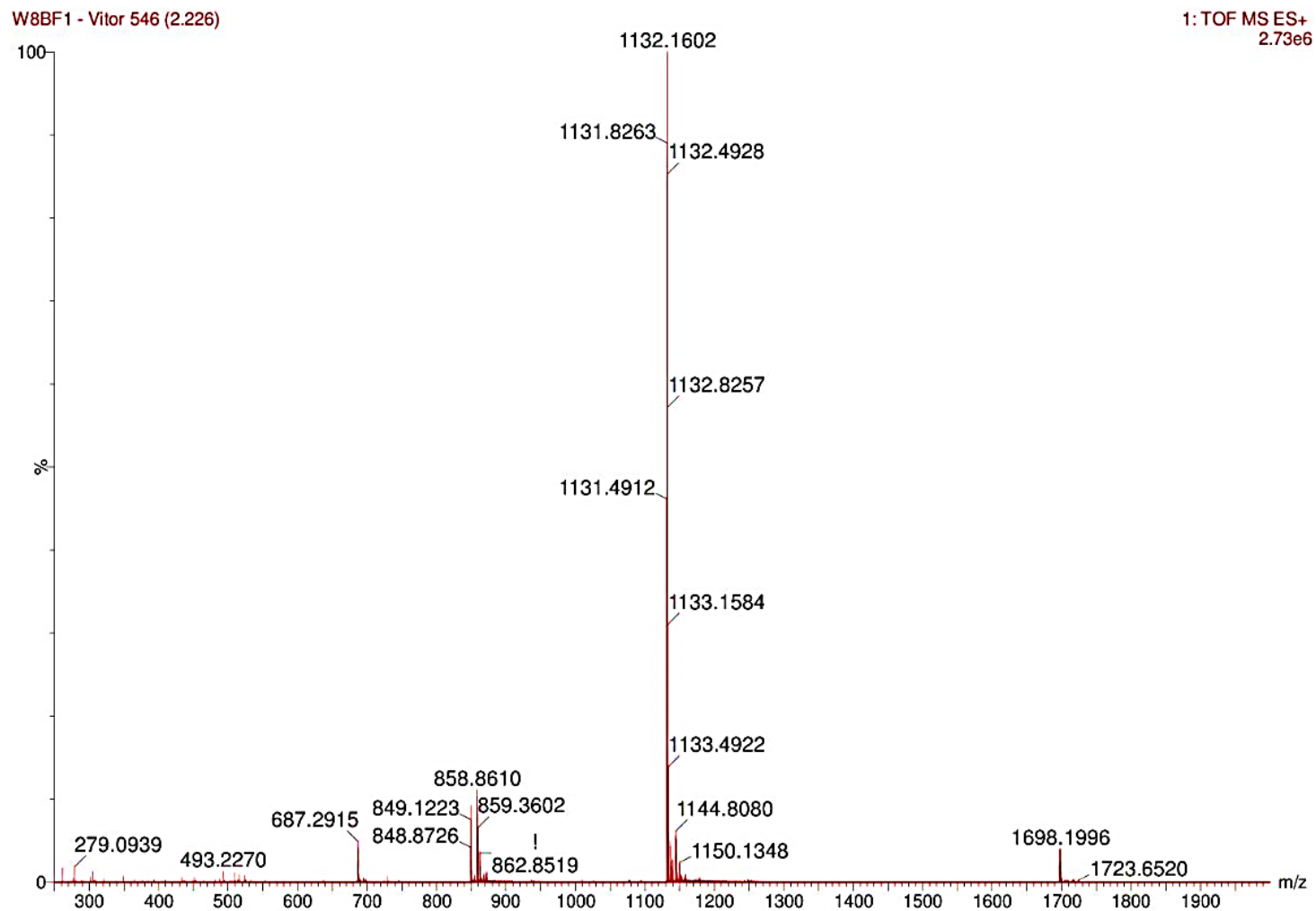


Figura A 19. Expansão do espectro MS da oceanapiamida A.

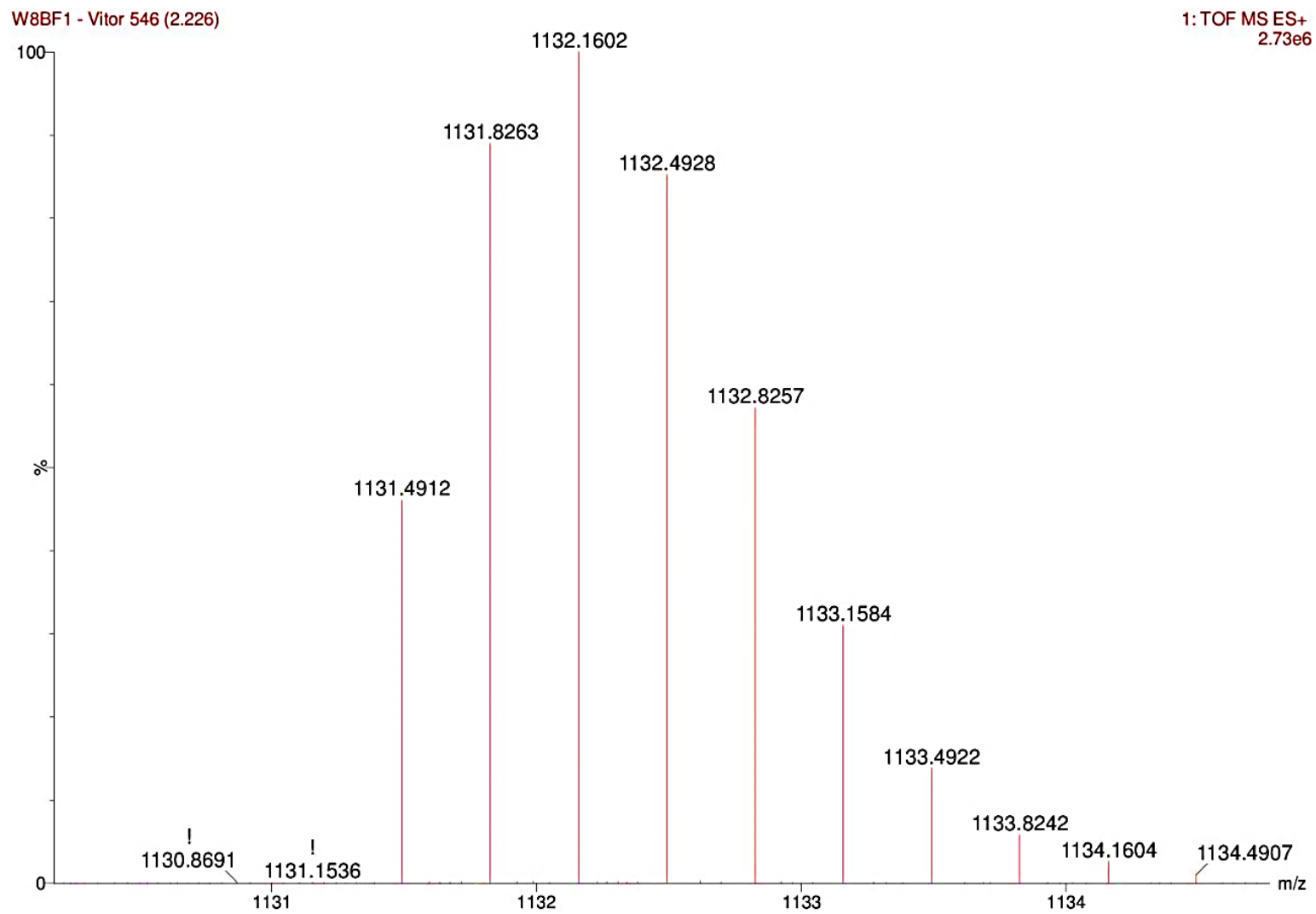


Figura A 20. Espectro de RMN de ^1H da oceanapiamida A em $\text{MeOH-}d_4$ (^1H : 600 MHz).

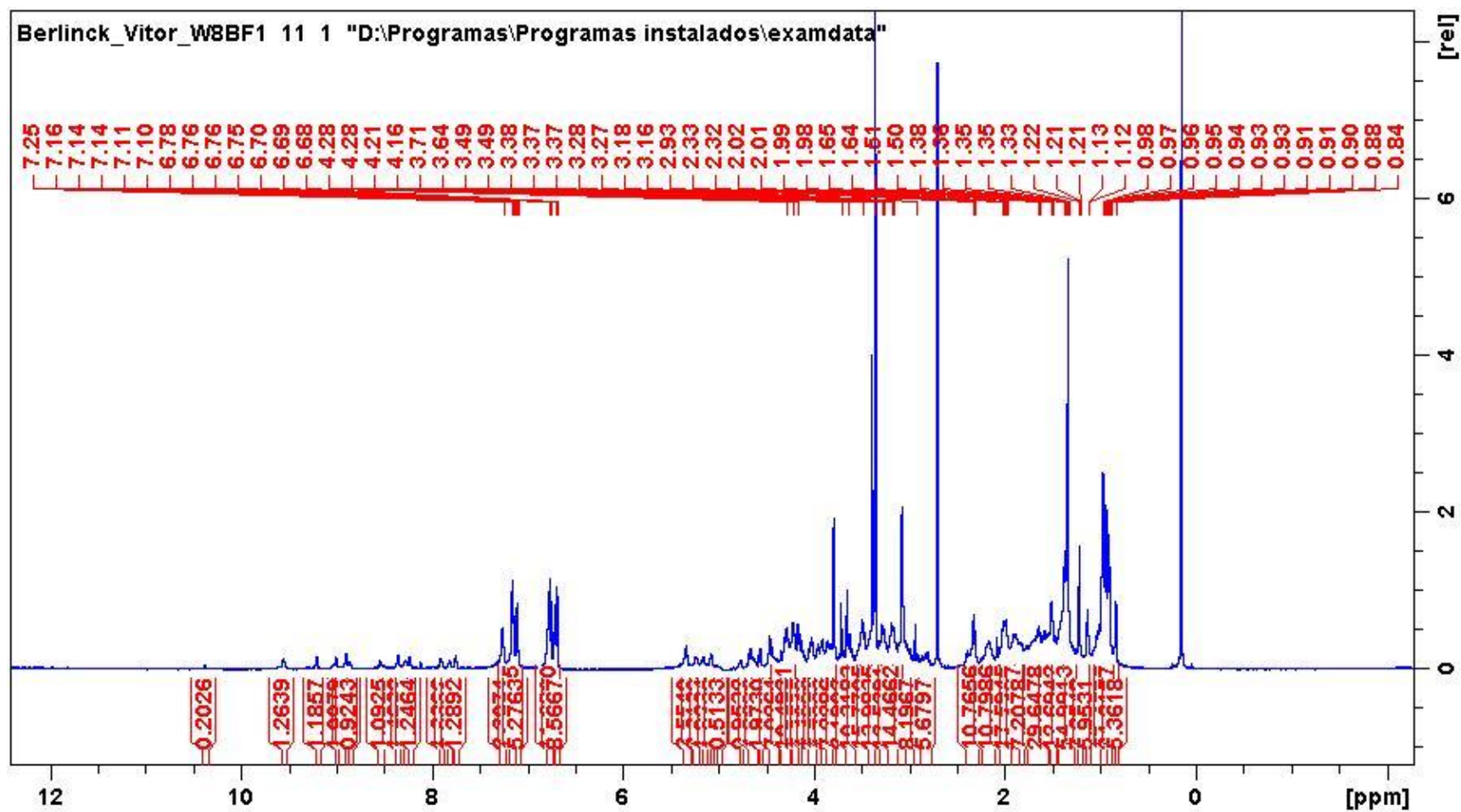


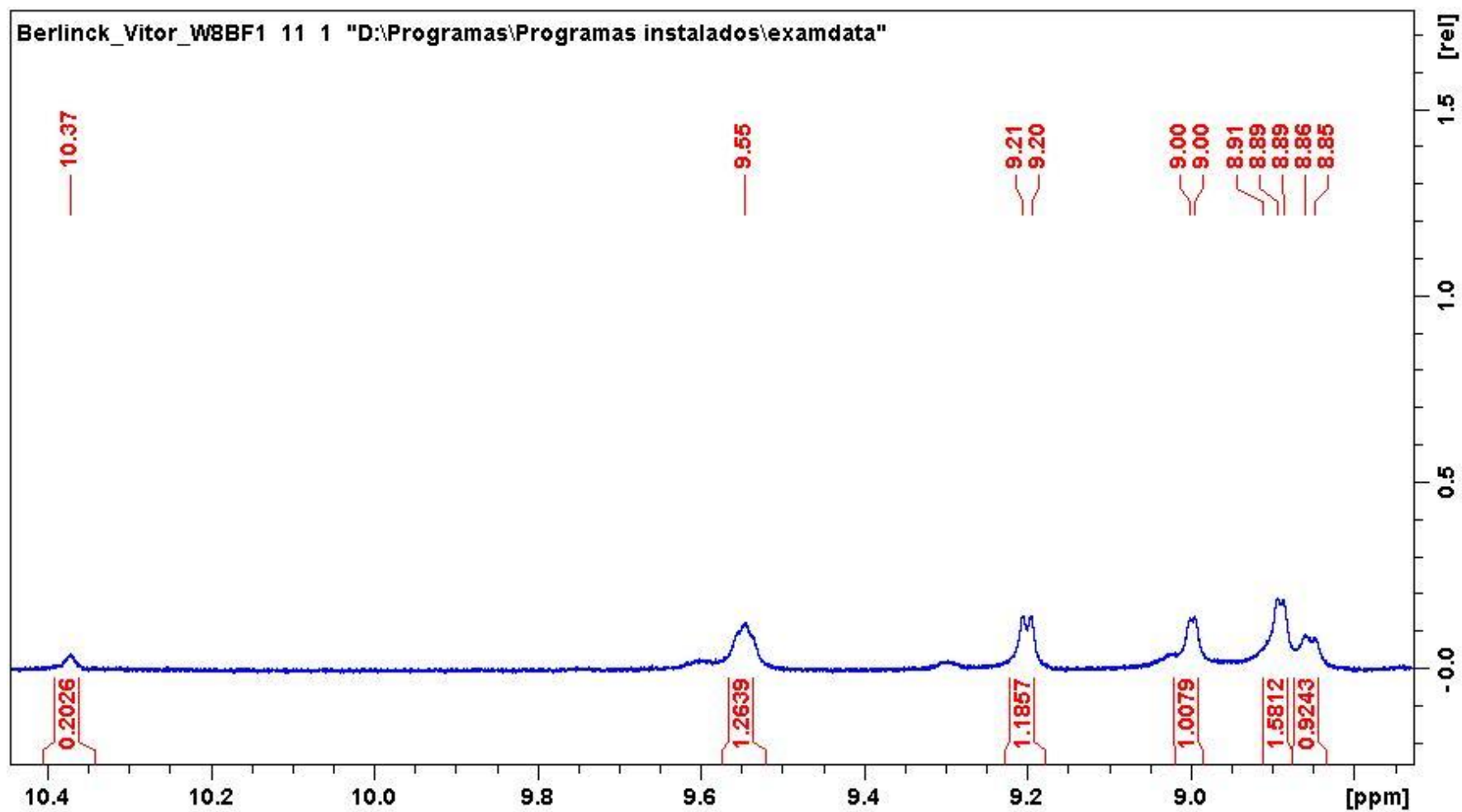
Figura A 21. Expansão do espectro de RMN de ^1H da oceanapiamida A em $\text{MeOH-}d_4$ (^1H : 600 MHz).

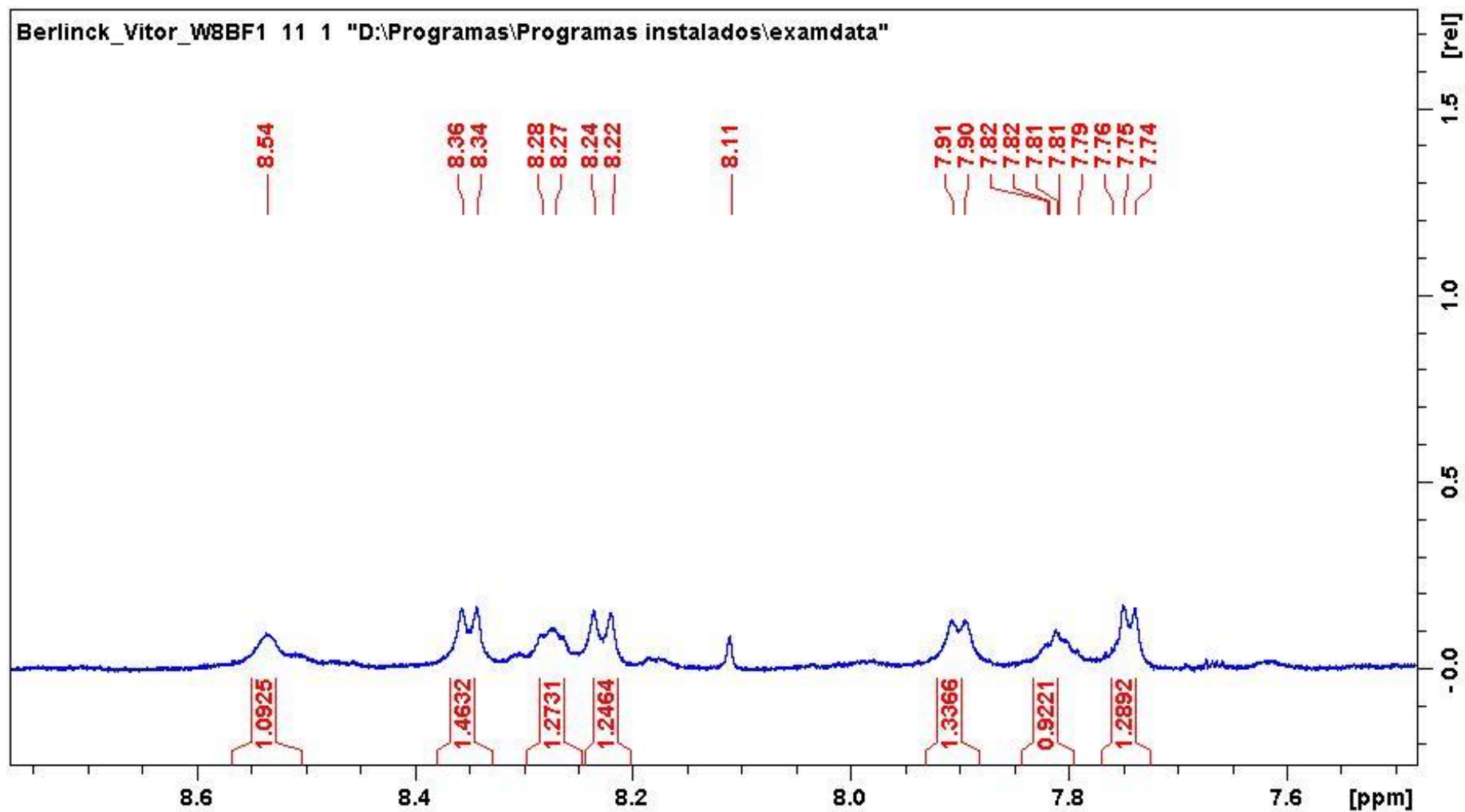
Figura A 22. Expansão do espectro de RMN de ^1H da oceanapiamida A em $\text{MeOH-}d_4$ (^1H : 600 MHz).

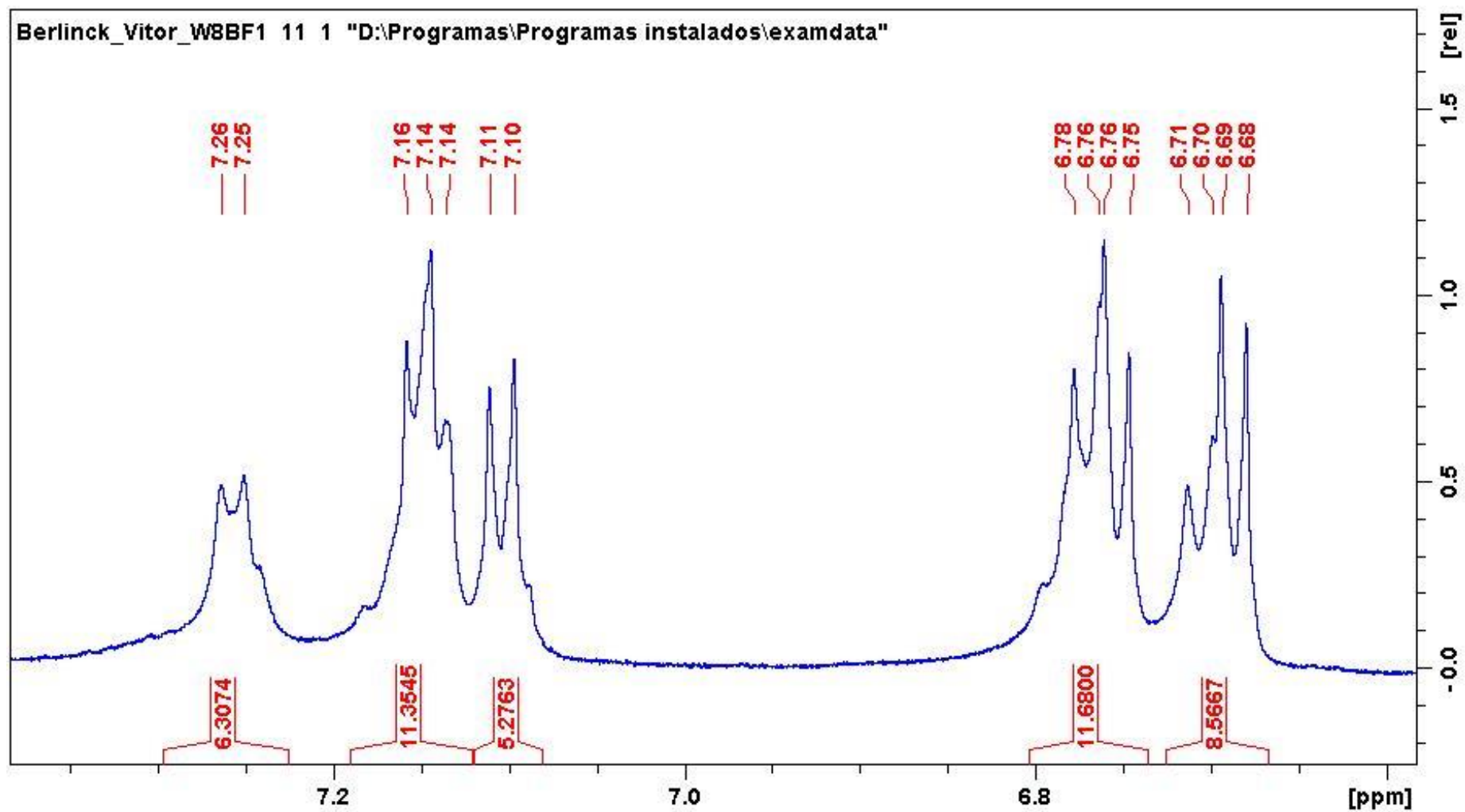
Figura A 23. Expansão do espectro de RMN de ^1H da oceanapiamida A em $\text{MeOH-}d_4$ (^1H : 600 MHz).

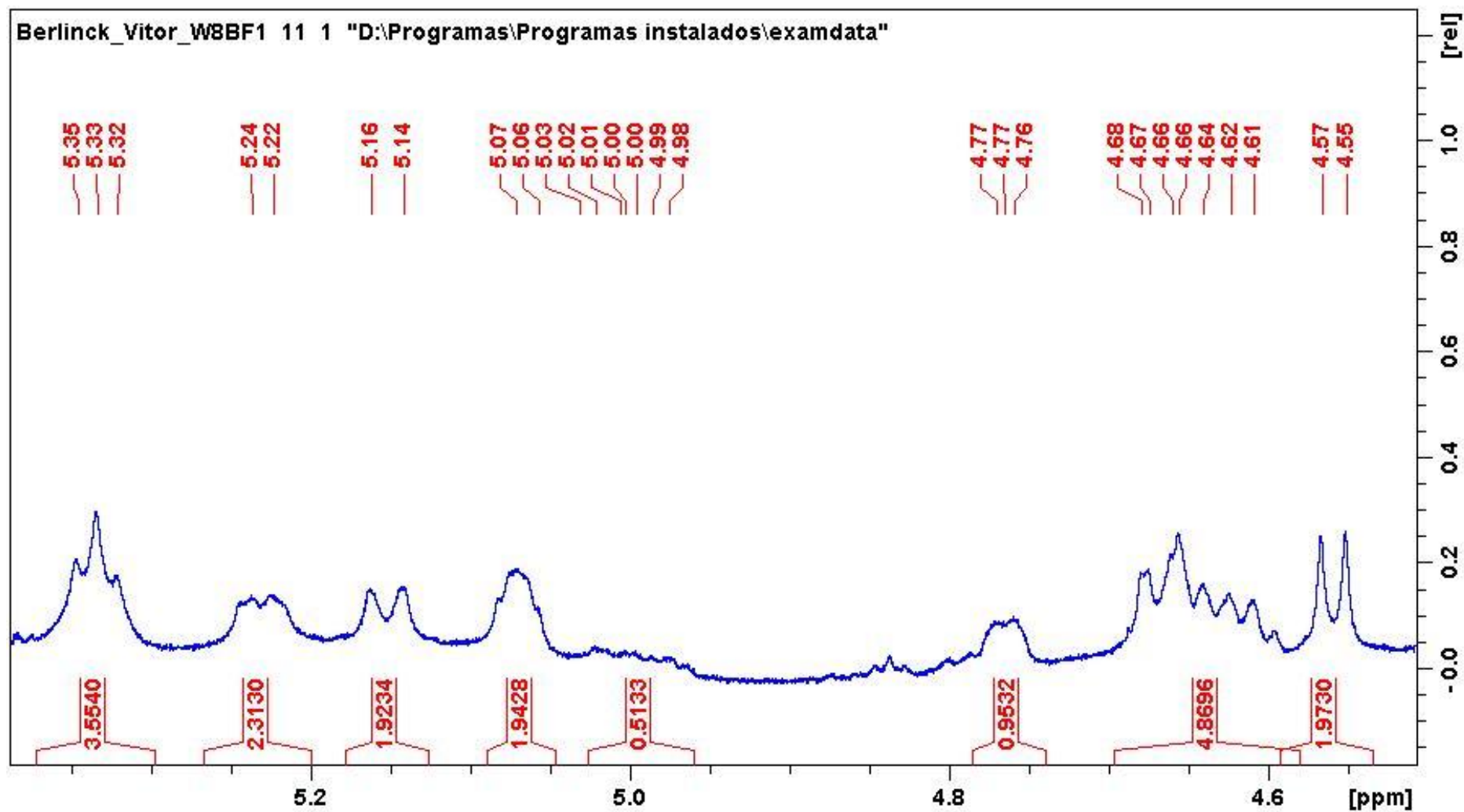
Figura A 24. Expansão do espectro de RMN de ^1H da oceanapiamida A em $\text{MeOH-}d_4$ (^1H : 600 MHz).

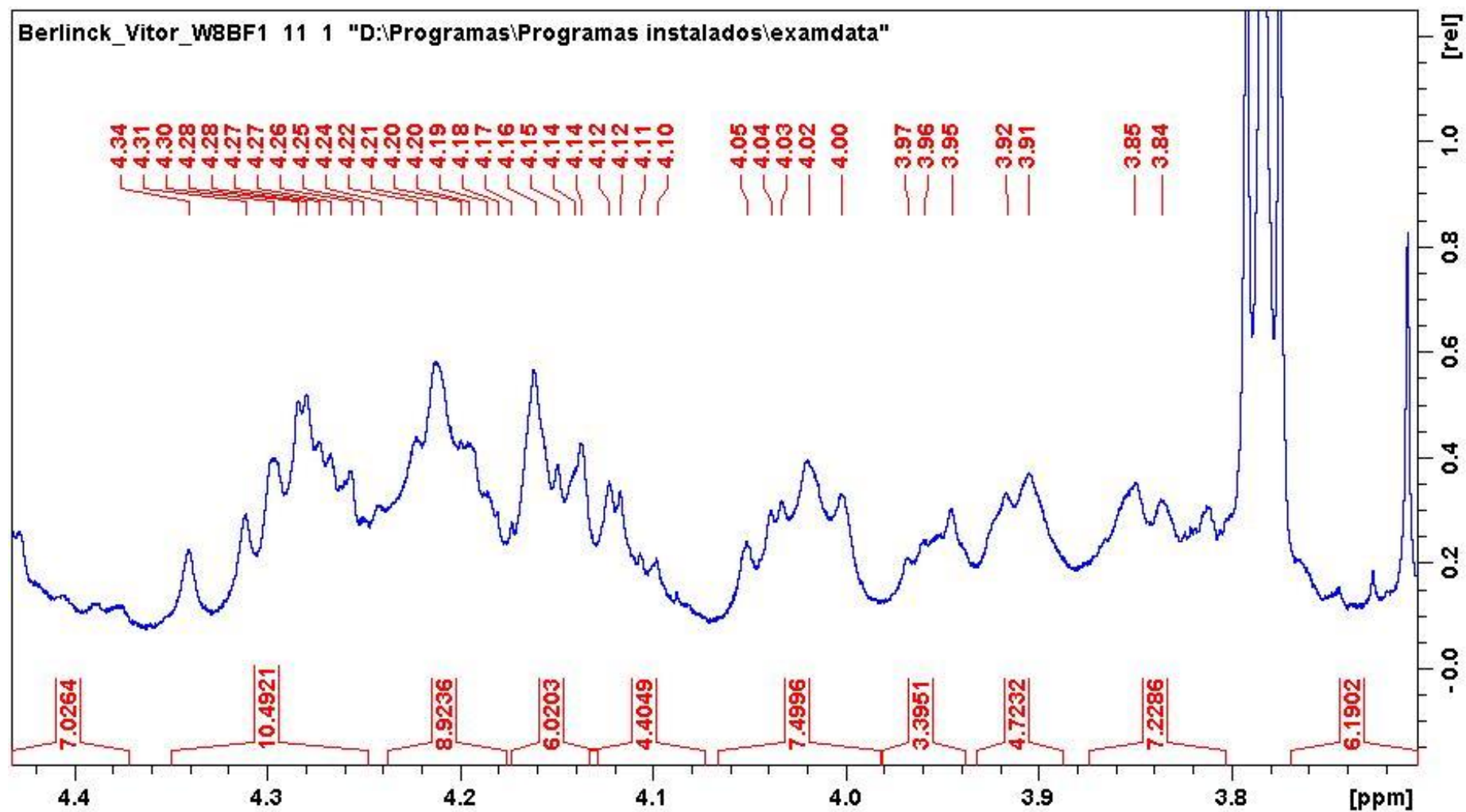
Figura A 25. Expansão do espectro de RMN de ^1H da oceanapiamida A em $\text{MeOH-}d_4$ (^1H : 600 MHz).

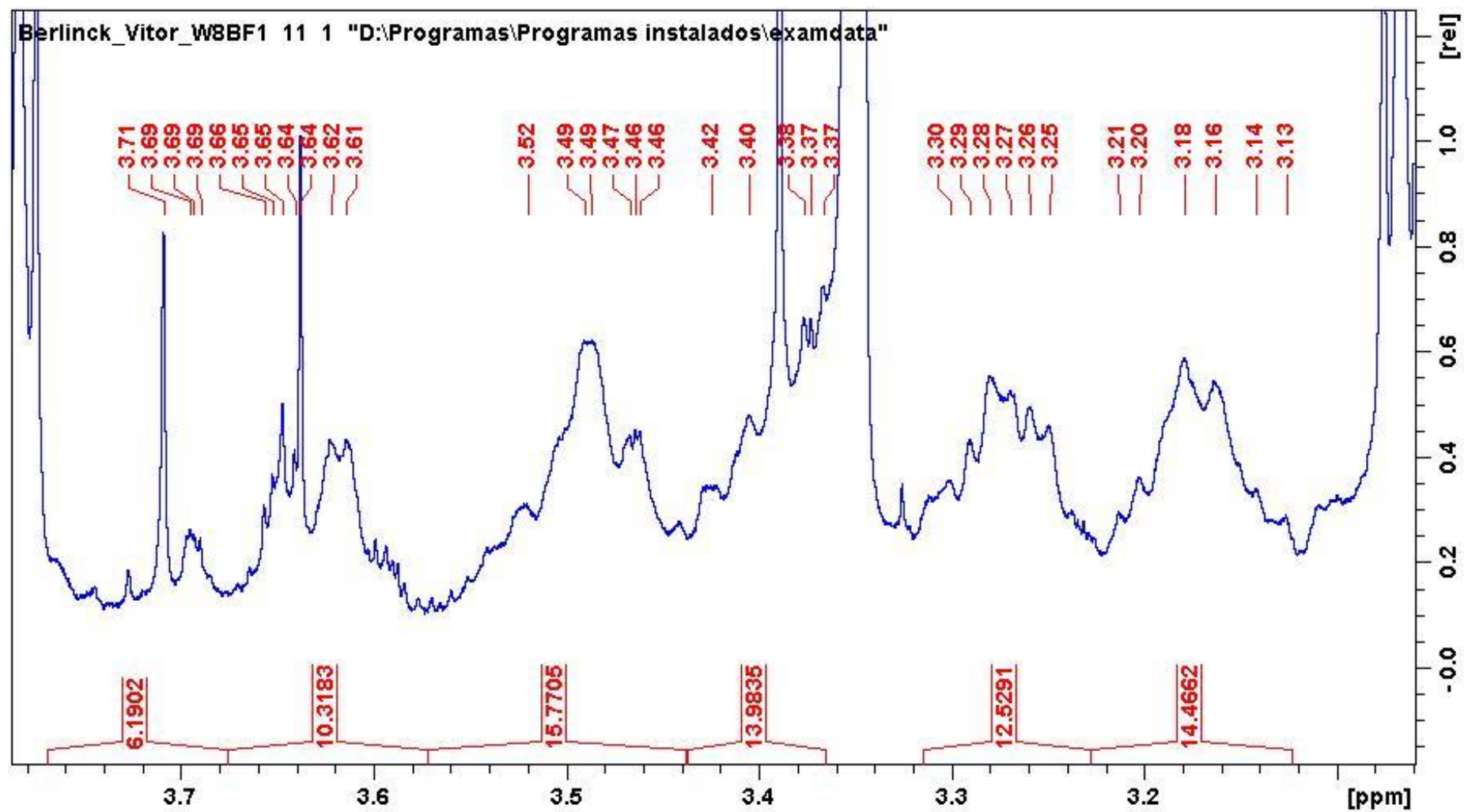
Figura A 26. Expansão do espectro de RMN de ^1H da oceanapiamida A em $\text{MeOH-}d_4$ (^1H : 600 MHz).

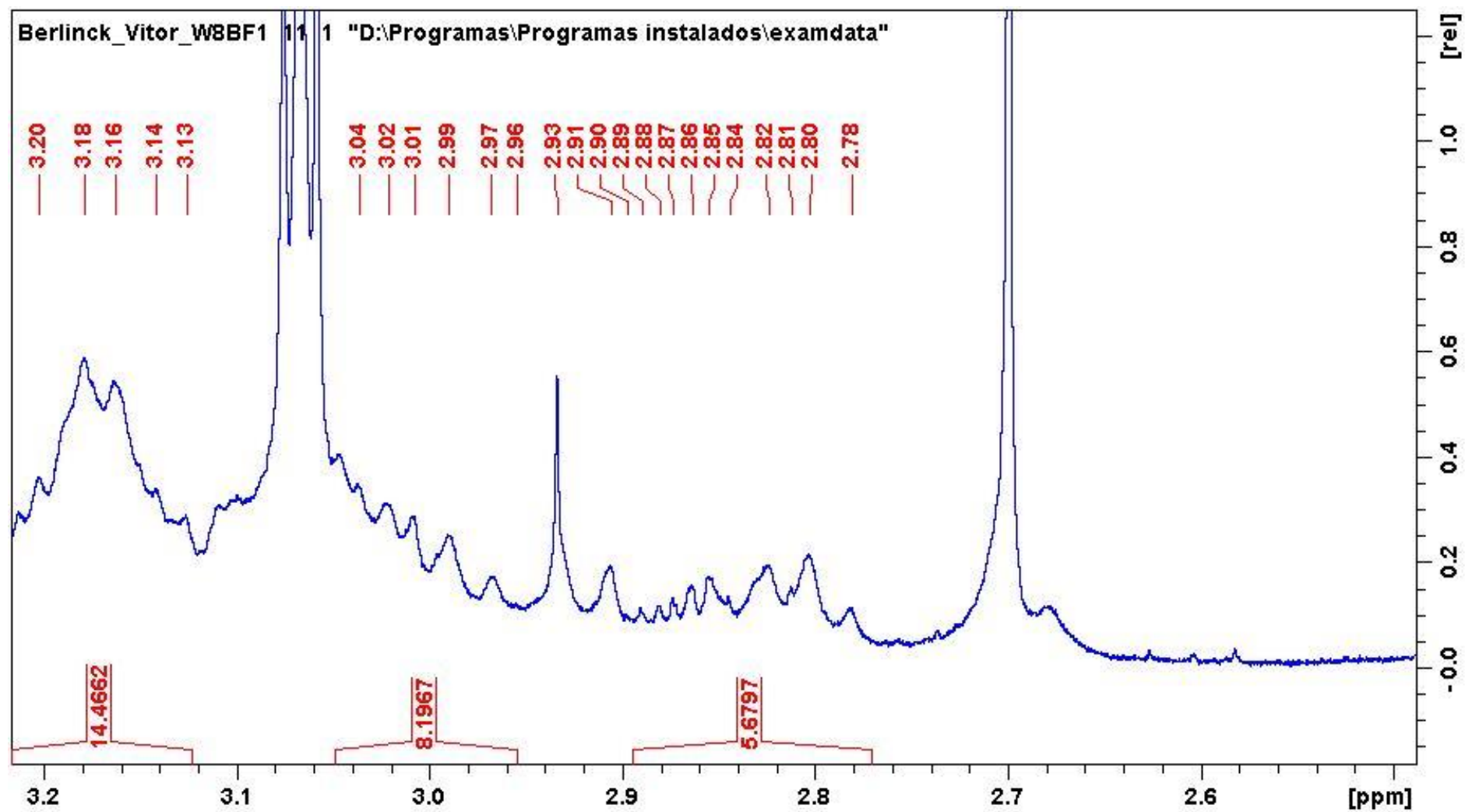
Figura A 27. Expansão do espectro de RMN de ^1H da oceanapiamida A em $\text{MeOH-}d_4$ (^1H : 600 MHz).

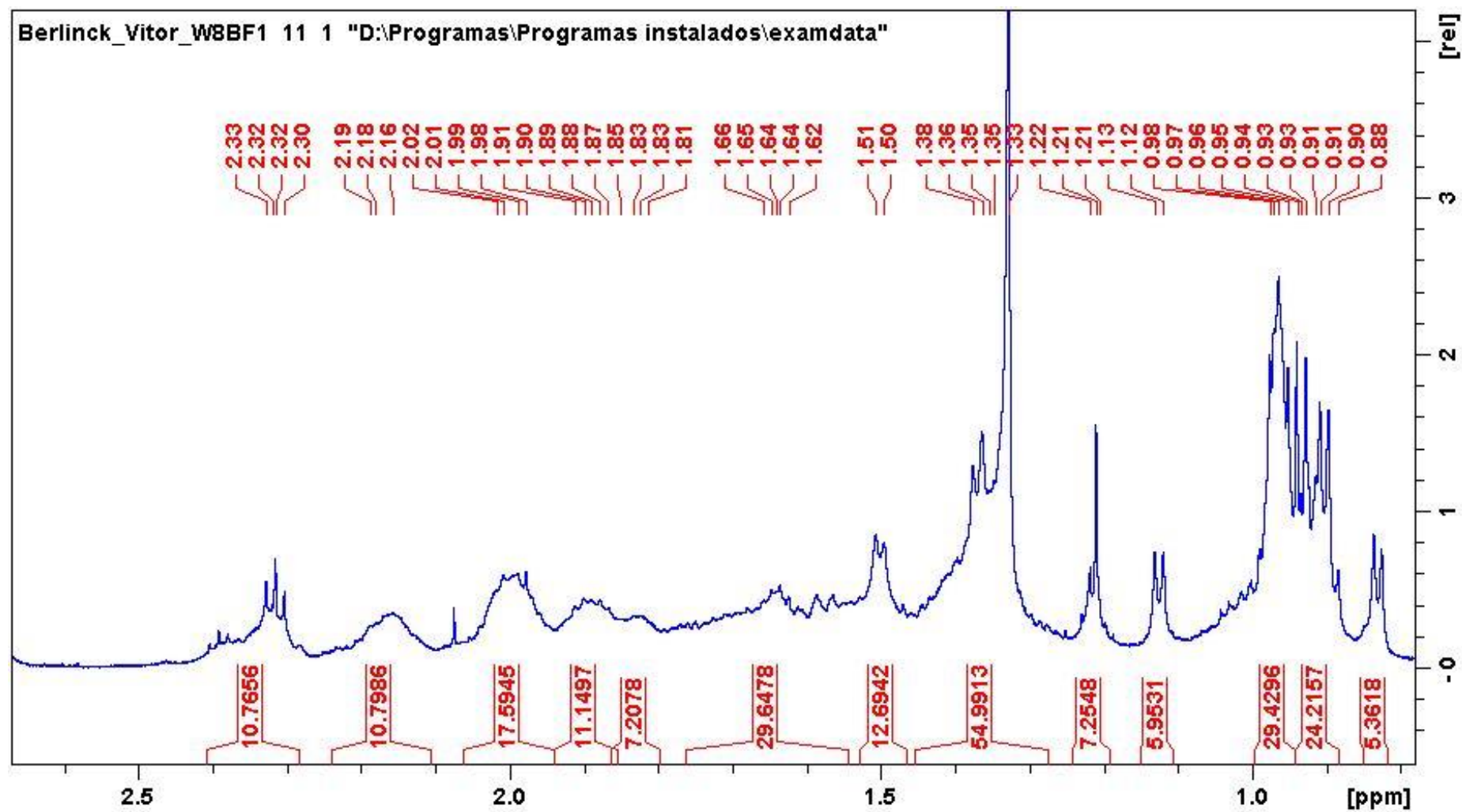
Figura A 28. Expansão do espectro de RMN de ^1H da oceanapiamida A em $\text{MeOH-}d_4$ (^1H : 600 MHz).

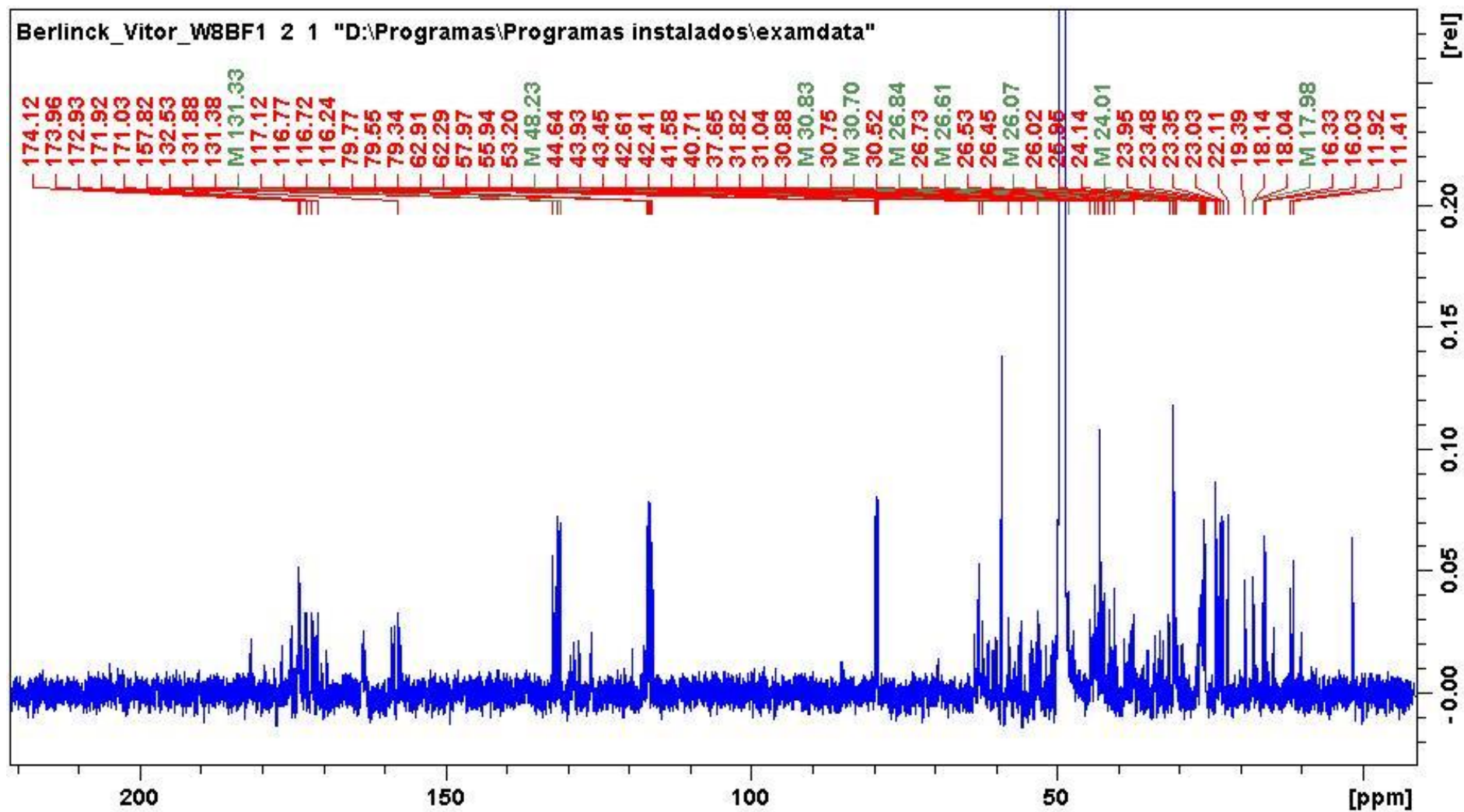
Figura A 29. Espectro de RMN de ^{13}C da oceanapiamida A em $\text{MeOH-}d_4$ (^1H : 150 MHz).

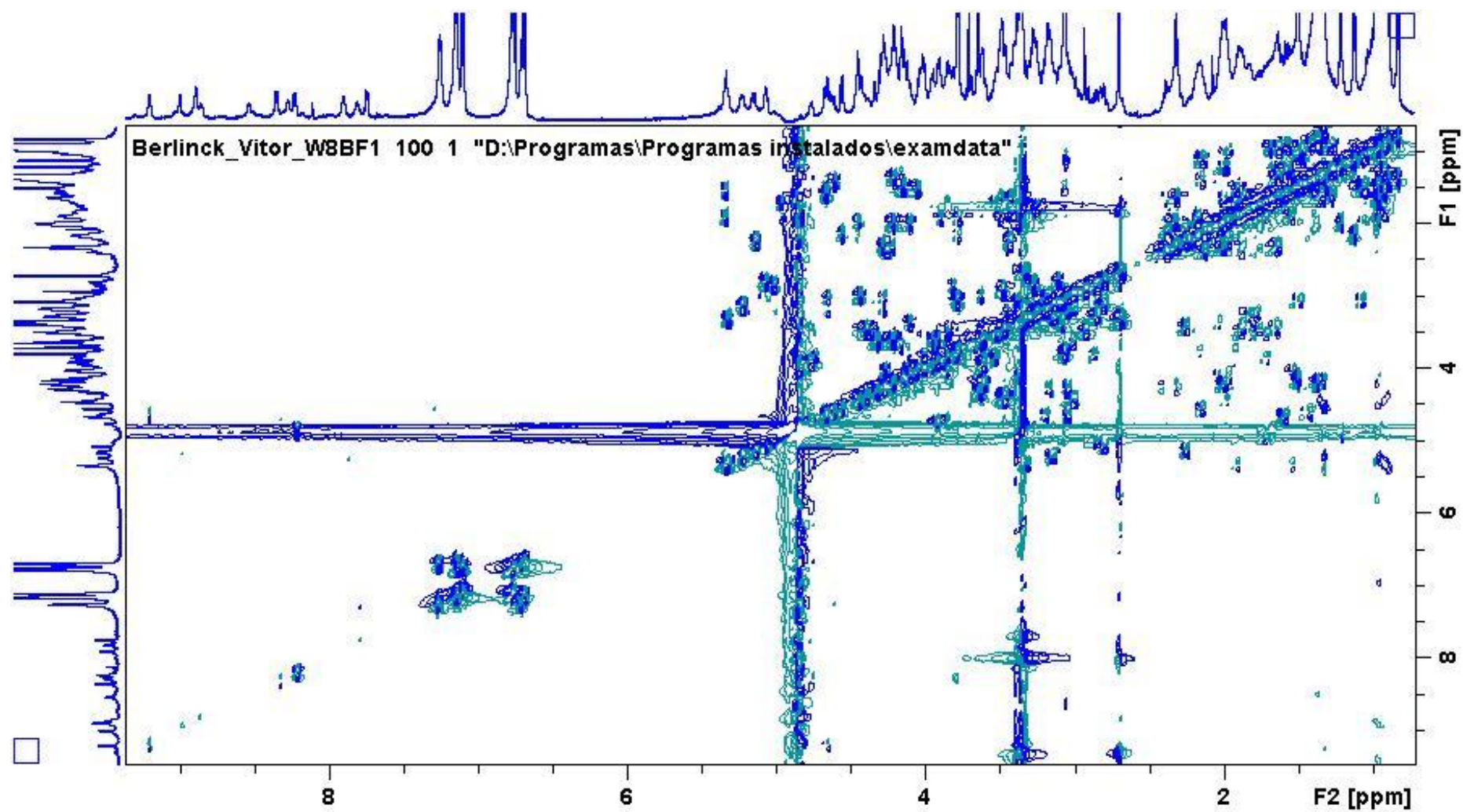
Figura A 30. Espectro COSY da oceanapiamida A em MeOH- d_4 .

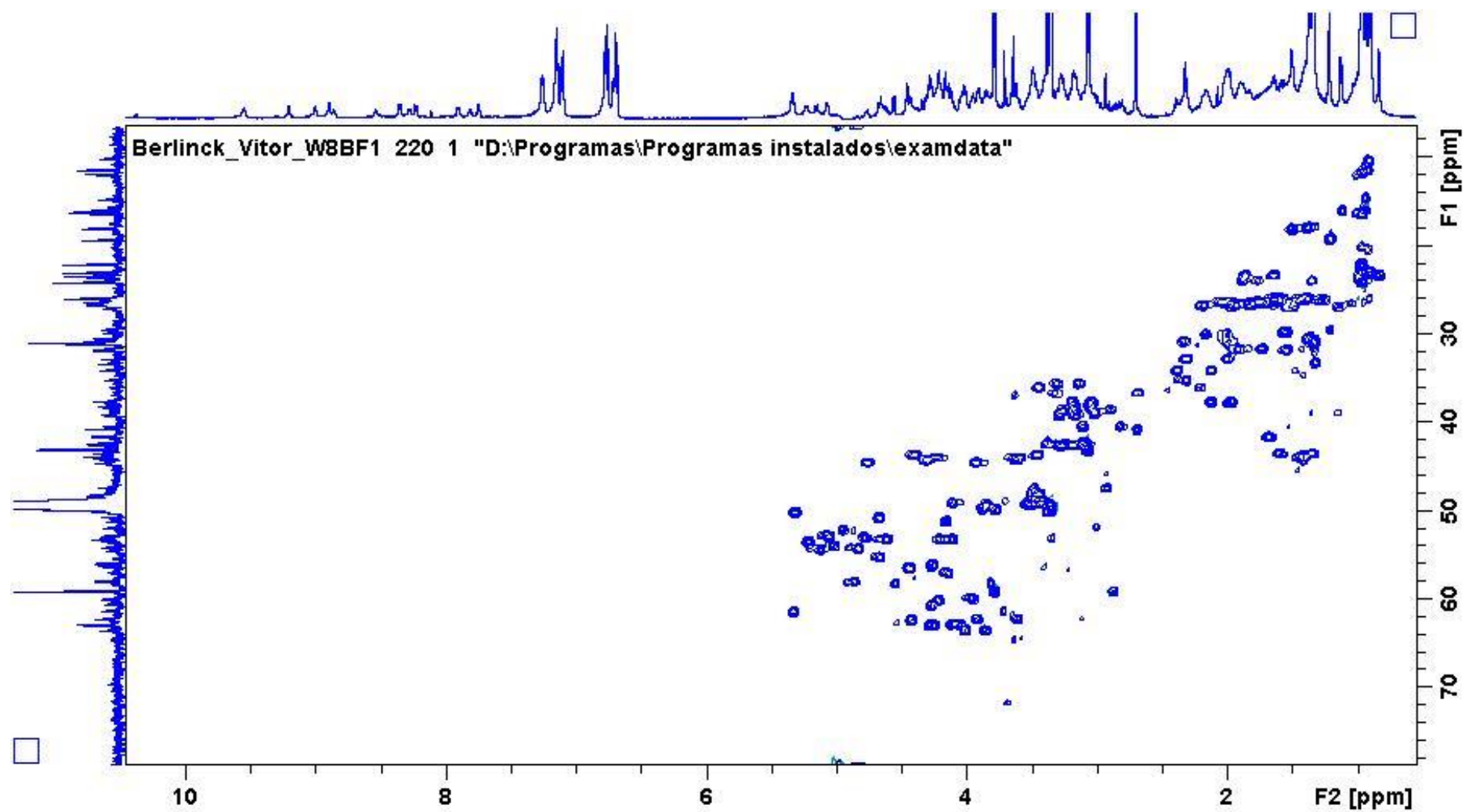
Figura A 31. Espectro *Selective* HSQC da oceanapiamida A em MeOH- d_4 .

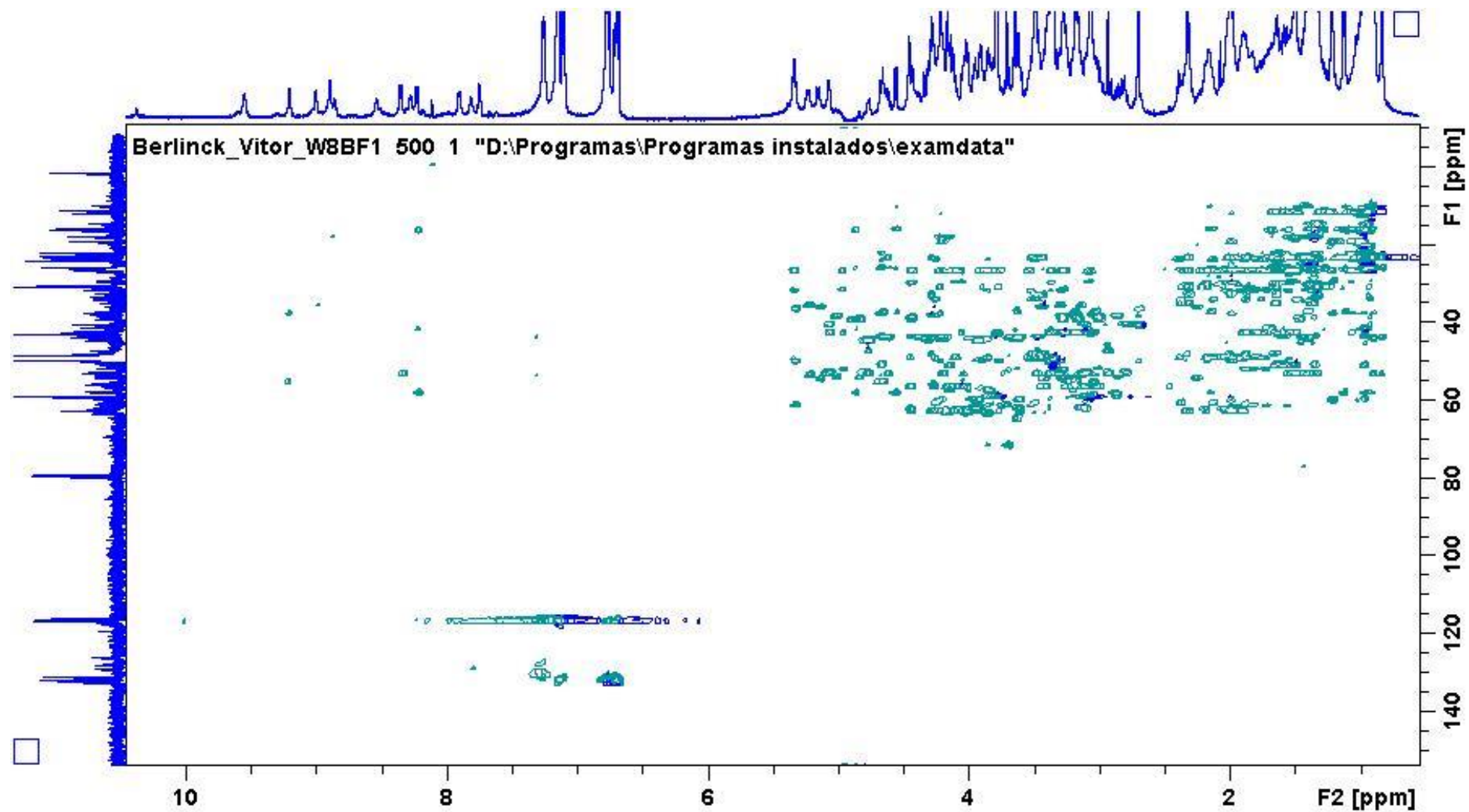
Figura A 32. Espectro HSQC-TOCSY da oceanapiamida A em MeOH- d_4 .

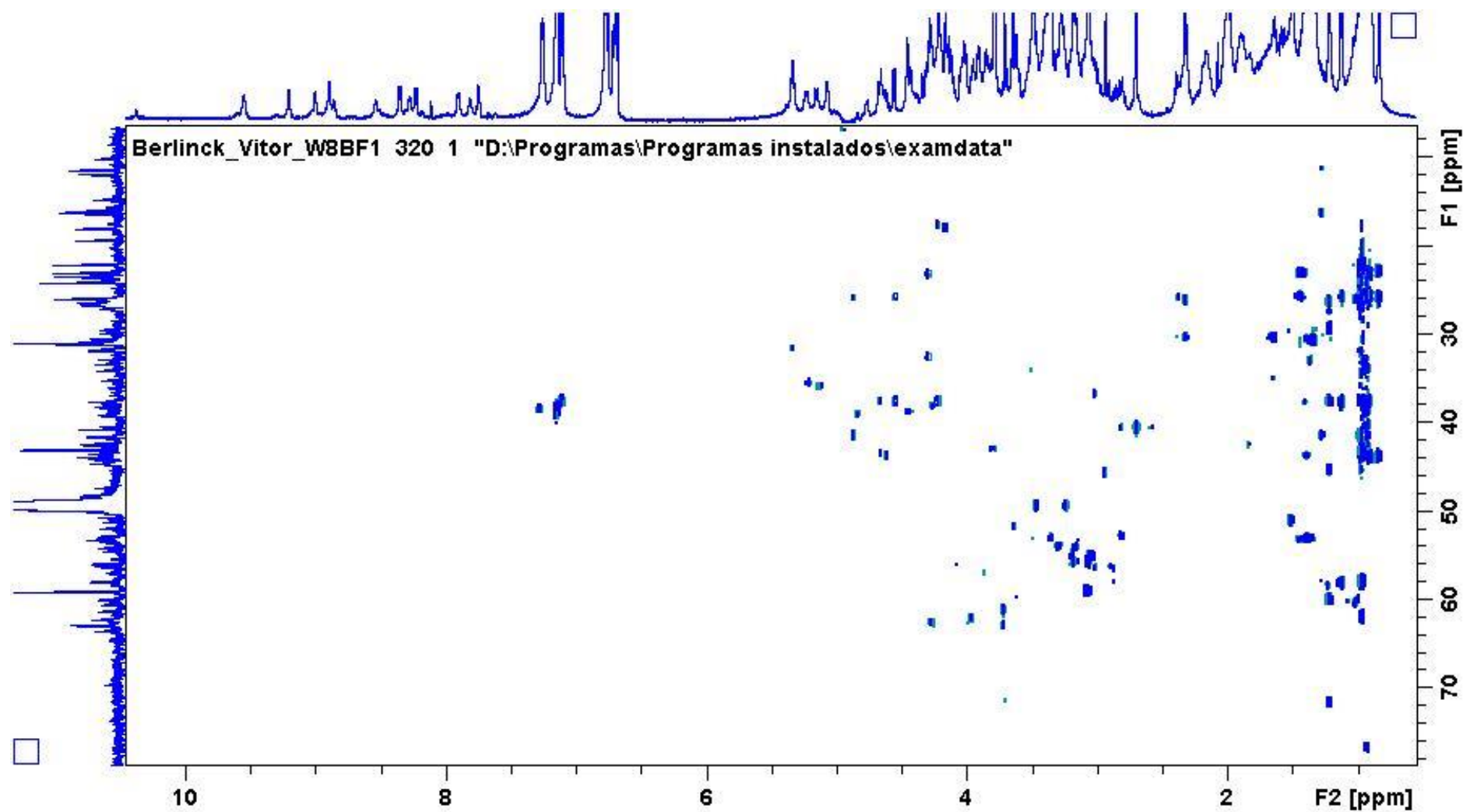
Figura A 33. Espectro de RMN de *Selective* HMBC da oceanapiamida A em MeOH- d_4 .

Tabela A 1. Dados de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C (δ , ppm) para os resíduos de aminoácidos identificados para a oceanapiamida A em MeOH- d_4 (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz)

Unidade	Posição	δ_{C} , tipo	δ_{H}
Ile ₁	α	58,0, CH	4,56
	β	37,7 CH	2,17
	γ	25,9, CH ₂	1,35
	γ'	16,0, CH ₃	1,13
	δ	10,2, CH ₃	0,93
Ile ₂	α	58,0, CH	4,56
	β	37,7 CH	2,17
	γ	25,9, CH ₂	1,35
	γ'	16,0, CH ₃	1,13
	δ	16,0, CH ₃	0,97
Leu ₁	α	53,2, CH	4,64
	β	43,9 CH ₂	1,35
	γ	26,1, CH	1,54
	δ	10,2, CH ₃	0,93
	δ'	11,4, CH ₃	0,89
Leu ₂	α	50,7, CH	4,64
	β	43,9 CH ₂	1,35
	γ	26,0, CH	1,35
	δ	24,0, CH ₃	0,93
	δ'	24,2, CH ₃	0,97
Leu ₃	α	53,2, CH	4,64
	β	43,9 CH ₂	1,35
	γ	26,0, CH	1,35
	δ	23,4, CH ₃	0,83
	δ'	23,4, CH ₃	0,83
Leu ₄	α	53,2, CH	4,64
	β	43,9 CH ₂	1,35
	γ	23,4, CH	1,35
	δ	23,0, CH ₃	0,89
	δ'	23,0, CH ₃	0,89
Leu ₅	α	50,7, CH	4,64
	β	43,5 CH ₂	1,64
	γ	26,0, CH	1,35
	δ	22,1, CH ₃	0,95
	δ'	22,1, CH ₃	0,95

Leu ₆	α	58,0, CH	4,87
	β	41,6 CH ₂	1,64
	γ	26,0, CH	1,35
	δ	16,3, CH ₃	0,95
	δ'	16,3, CH ₃	0,95
Val ₁	α	53,2, CH	4,20
	β	26,0, CH	1,35
	γ	14,7, CH ₃	0,93
	γ'	18,0, CH ₃	1,35
Val ₂	α	60,0, CH	4,21
	β	37,7, CH	1,99
	γ	19,4, CH ₃	1,21
	γ'	11,9, CH ₃	0,95
Val ₃	α	53,2, CH	4,20
	β	26,0, CH	1,35
	γ	14,7, CH ₃	0,93
	γ'	18,0, CH ₃	1,35
Ala	α	51,2, CH	4,15
	β	18,1, CH ₃	1,50
Tyr ₁	α	56,1, CH	4,25
	β	37,7, CH ₂	3,04; 3,16
	aromático	1: 129,7, C	
		2: 131,4, CH	7,10
		3: 116,7, CH	6,71
		4: 157,2, C	
		5: 116,7, CH	6,71
	6: 131,4, CH	7,10	
Tyr ₂	α	55,9, CH	4,27
	β	38,4, CH ₂	3,04; 3,16
	aromático	1: 129,1, C	
		2: 131,3, CH	7,26
		3: 116,8, CH	6,75
		4: 157,7, C	
		5: 116,8, CH	6,75
	6: 131,3, CH	7,26	
Tyr ₃	α	56,2, CH	4,27
	β	38,2, CH ₂	3,04; 3,16
	aromático	1: 126,2, C	
	2: 131,9, CH	7,14	

		3: 117,1, CH	6,77
		4: 158,5, C	
		5: 117,1, CH	6,77
		6: 131,9, CH	7,14
Tyr ₄	α	54,3, CH	4,84
	β	39,2, CH ₂	3,27; 3,16
	aromático	1: 128,3, C	
		2: 132,5, CH	7,15
		3: 116,2, CH	6,69
		4: 157,8, C	
		5: 116,2, CH	6,69
		6: 132,5, CH	7,15
Met	α	62,9, CH	4,30
	β	32,8, CH ₂	2,31
	γ	32,8, CH ₂	1,99
	δ	16,4, CH ₃	0,95
Cys ₁	α	54,5, CH	5,14
	β	36,0, CH ₂	2,26; 3,42
Cys ₂	α	54,0, CH	5,02
	β	38,4, CH ₂	2,86; 3,27
Cys ₃	α	53,5, CH	5,23
	β	35,7, CH ₂	2,86; 3,16
Cys ₄	α	55,9, CH	4,30
	β	38,2, CH ₂	3,04; 3,16
Pro ₁	α	61,3, CH	5,34
	β	26,6, CH ₂	1,55
	γ	31,8, CH ₂	1,92
	δ	49,5, CH ₂	3,52
Pro ₂	α	62,3, CH	4,45
	β	26,6, CH ₂	1,99
	γ	29,8, CH ₂	2,17
	δ	49,0, CH ₂	3,49
Ser	α	63,5, CH	4,00
	β	63,5, CH ₂	3,85
Arg	α	53,5, CH	4,02
	β	29,5, CH ₂	1,54
	γ	26,7, CH ₂	1,99
	δ	42,4, CH ₂	3,27
	guanidina	158,8, C	

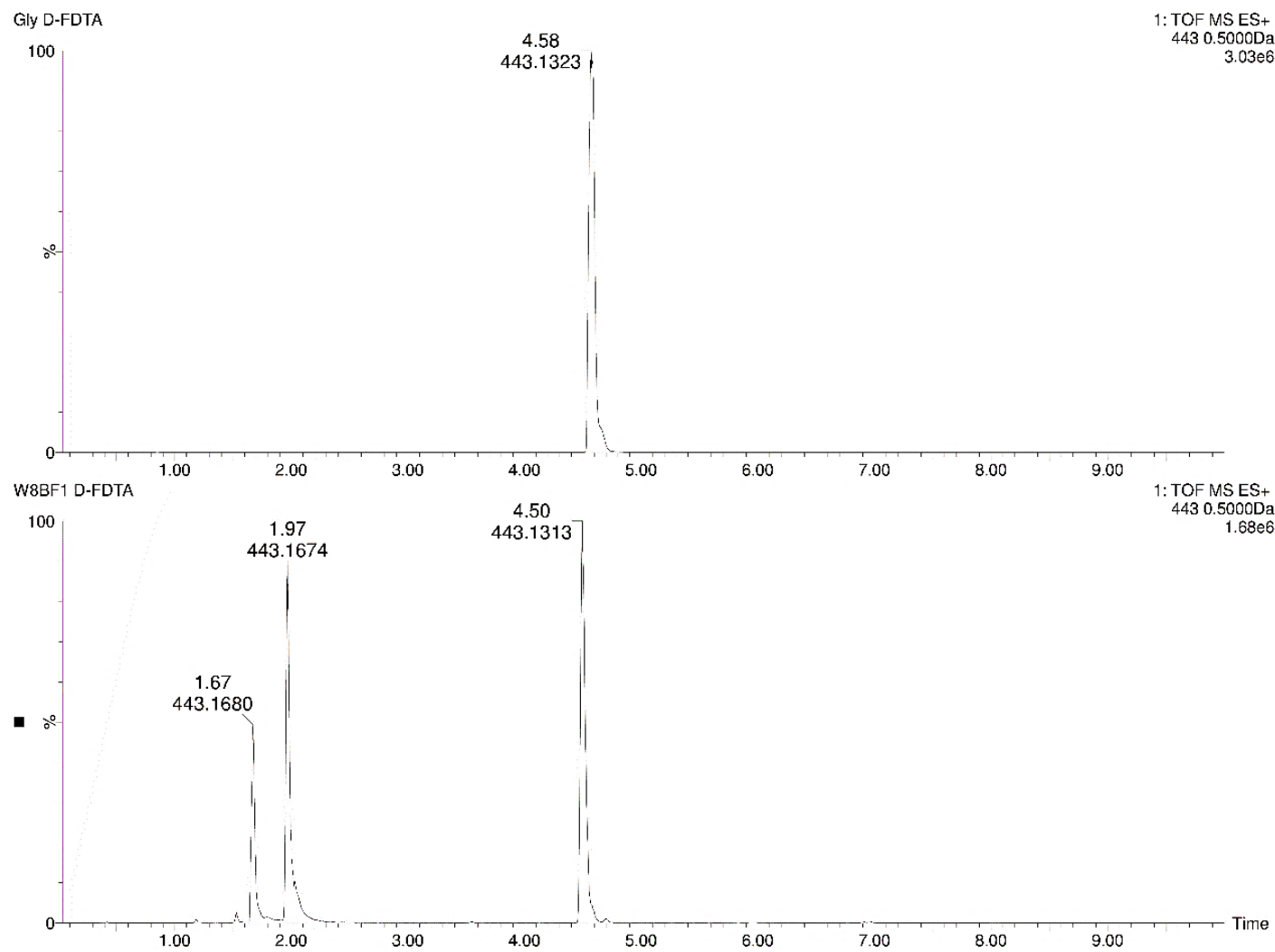
Figura A 34. XIC m/z 443 da análise do padrão glicina derivatizado com D-FDTA e da oceanapiamida A derivatizada com D-FDTA.

Figura A 35. XIC m/z 457 da análise do padrão L-alanina derivatizado com L e D-FDTA e da oceanapiamida A derivatizada com D-FDTA.

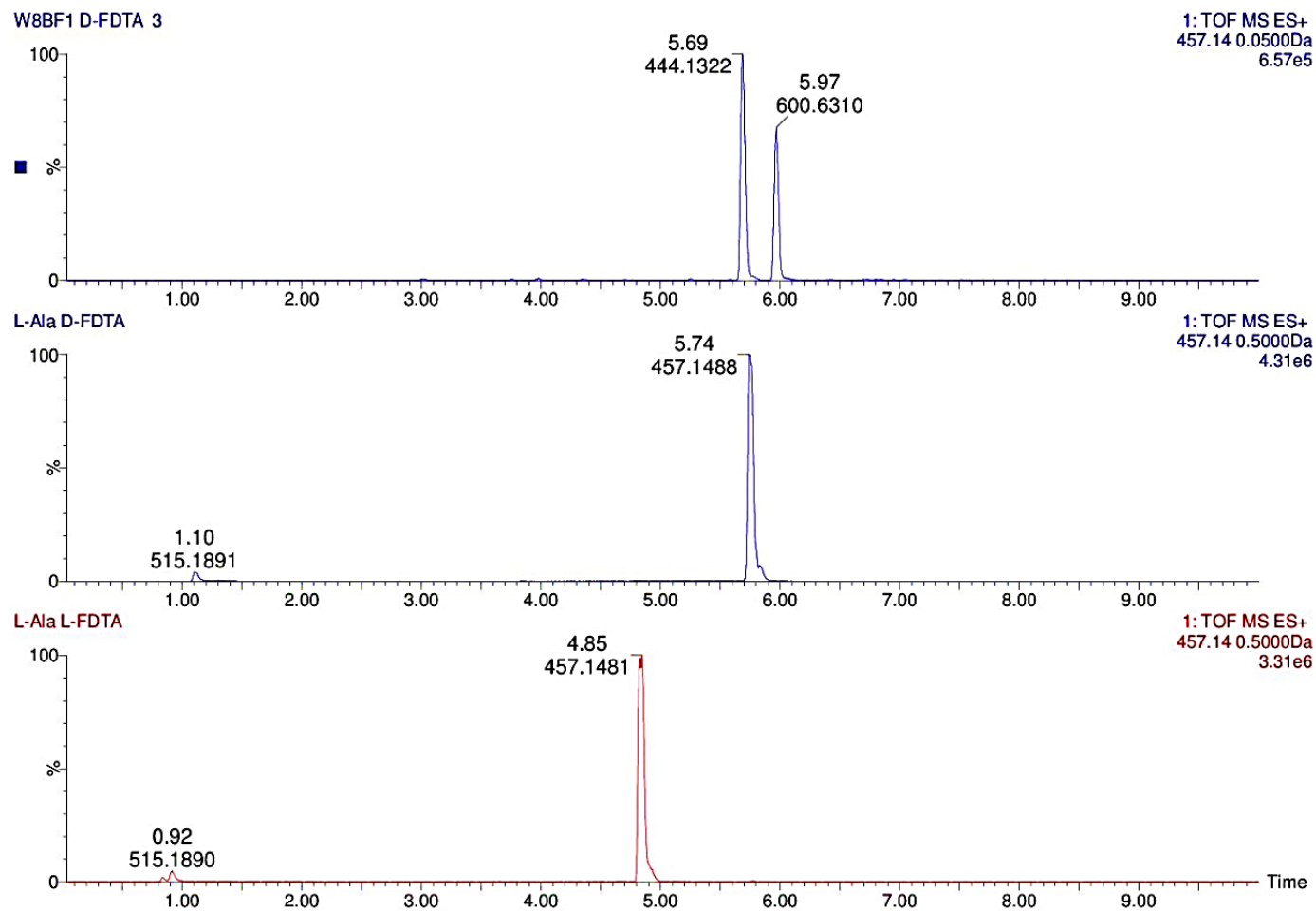


Figura A 36. XIC m/z 499 da análise dos padrões L-Leu, L-Ile e L-*allo*-Ile derivatizado com L e D-FDTA e da oceanapiamida A derivatizada com D-FDTA.

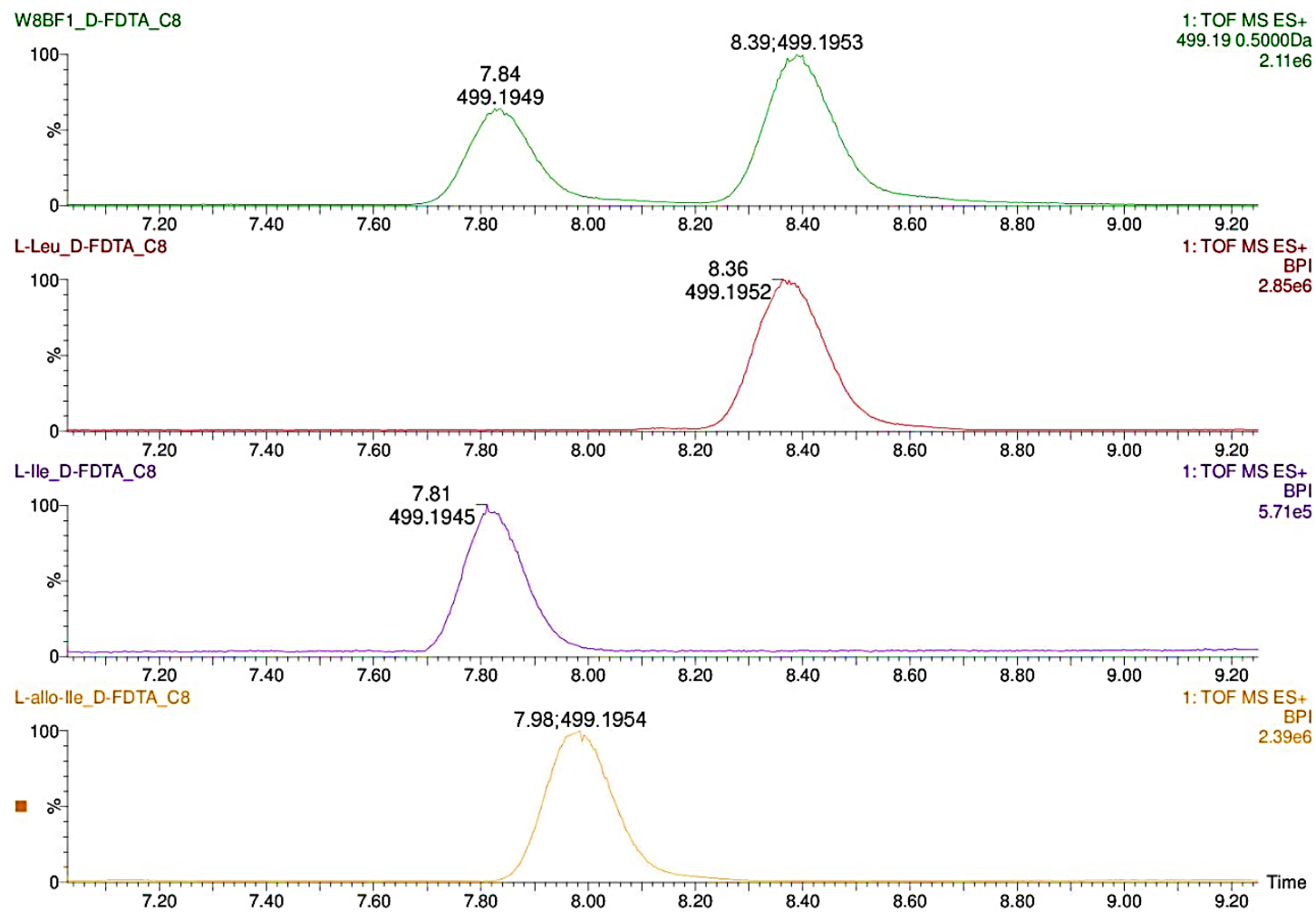


Figura A 37. XIC m/z 542 da análise do padrão L-arginina derivatizado com L e D-FDTA e da oceanapiamida A derivatizada com D-FDTA.

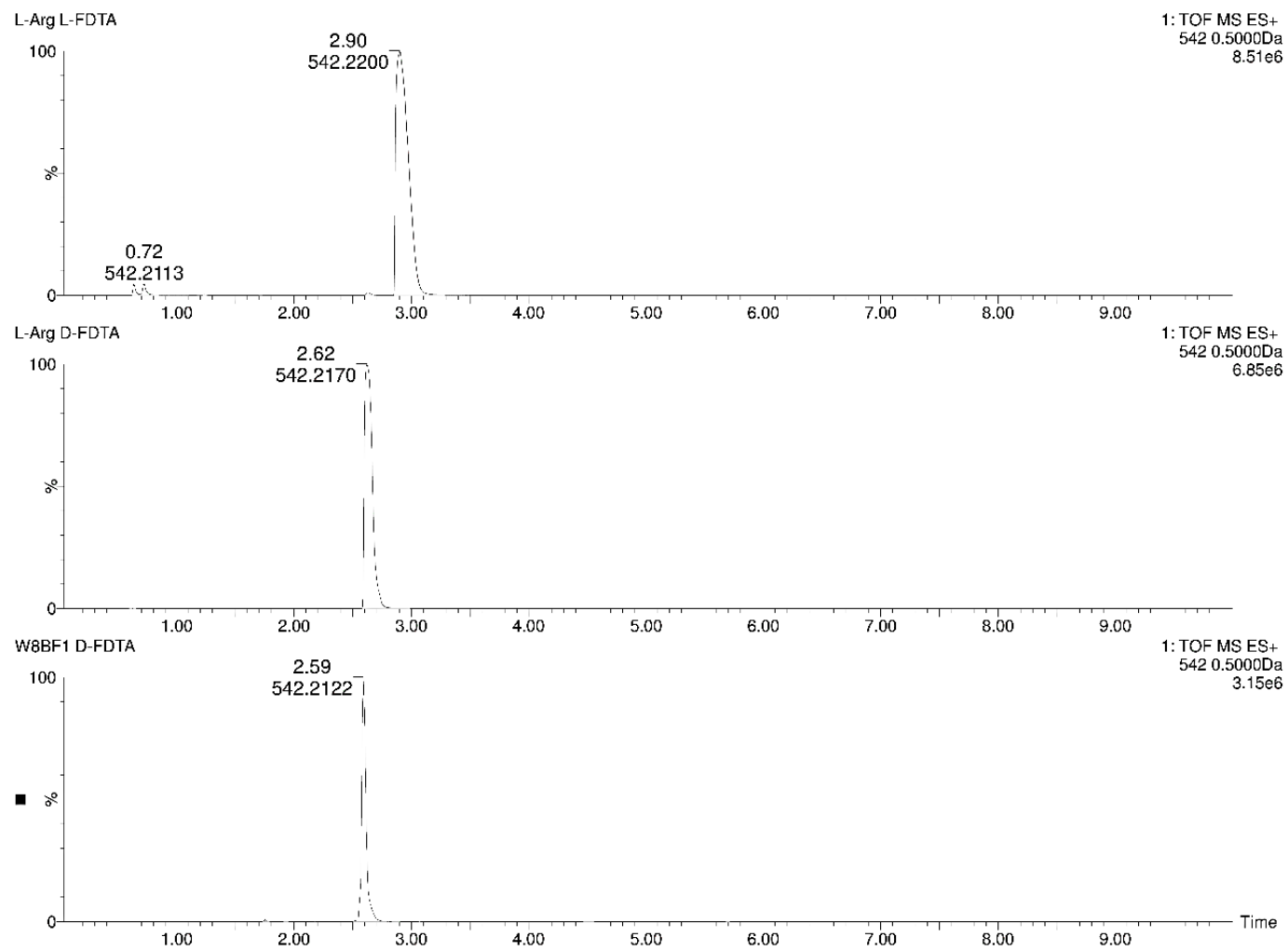


Figura A 38. XIC m/z 600 da análise do padrão L-cistina derivatizado com L e D-FDTA e da oceanapiamida A derivatizada com D-FDTA.

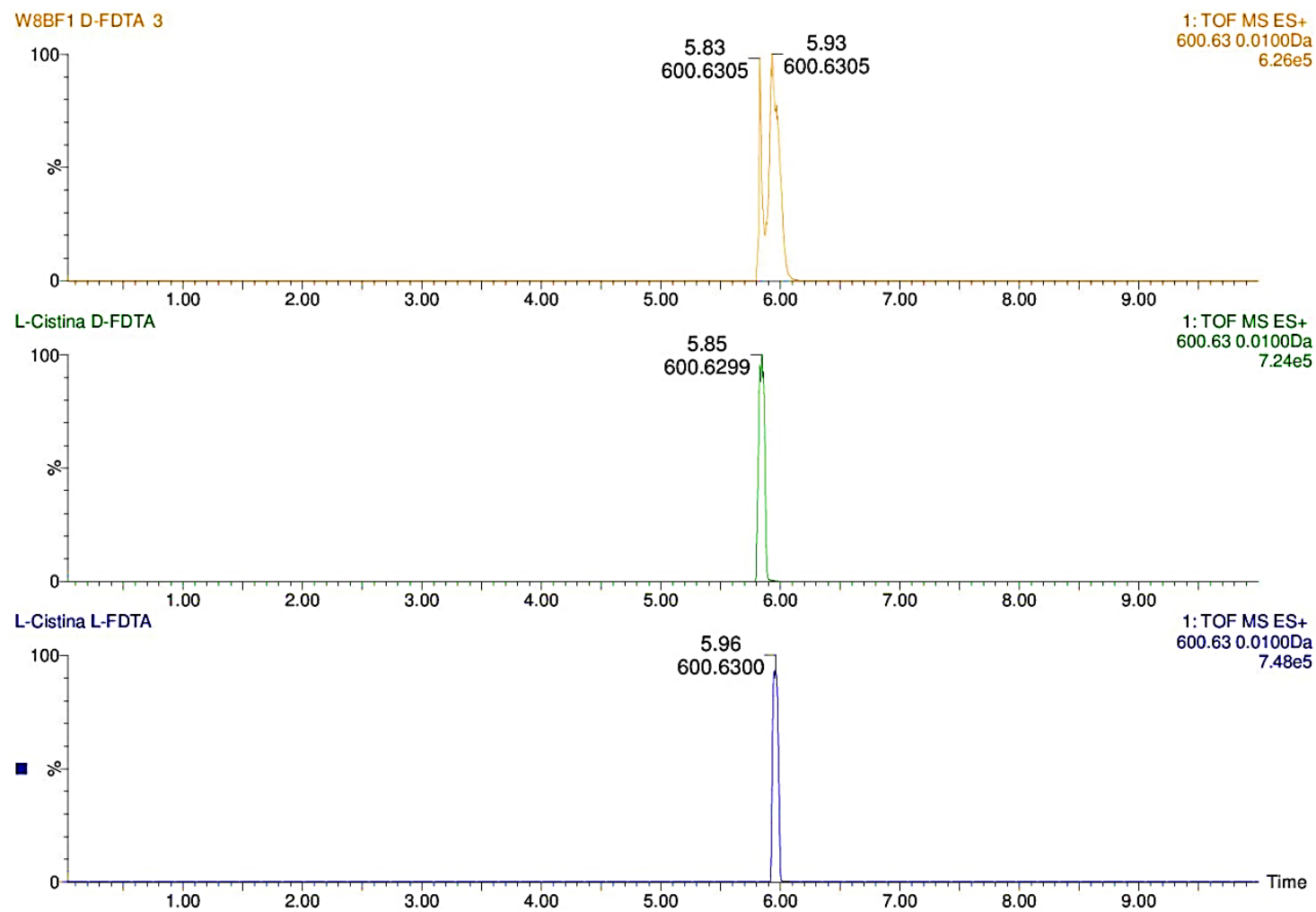


Figura A 39. XIC m/z 549 da análise do padrão L-tirosina derivatizado com L e D-FDTA e da oceanapiamida A derivatizada com D-FDTA.

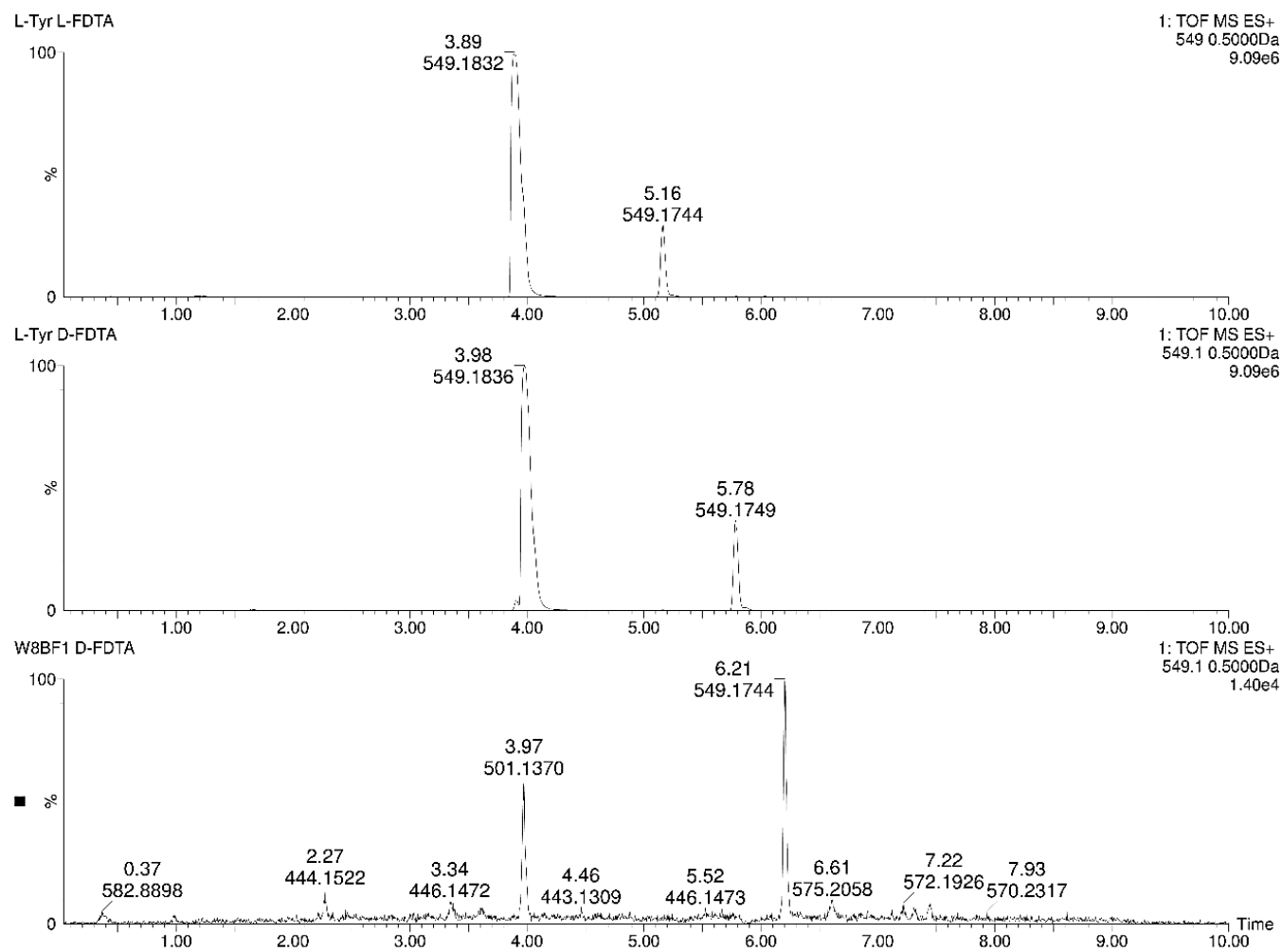


Figura A 40. XIC m/z 485 da análise do padrão L-valina derivatizado com L e D-FDTA e da oceanapiamida A derivatizada com D-FDTA.

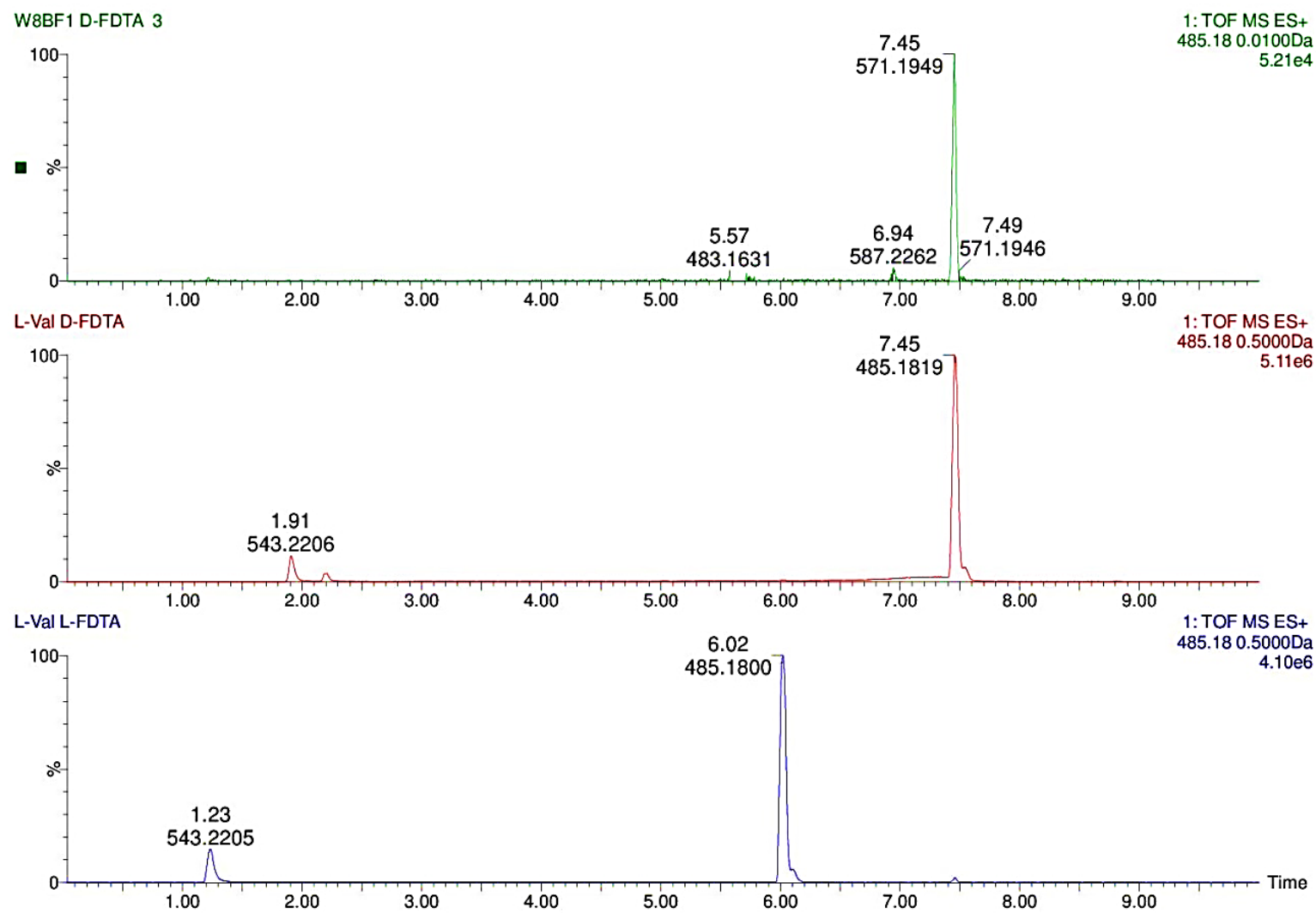


Figura A 41. XIC m/z 473 da análise do padrão L-serina derivatizado com L e D-FDTA e da oceanapiamida A derivatizada com D-FDTA.

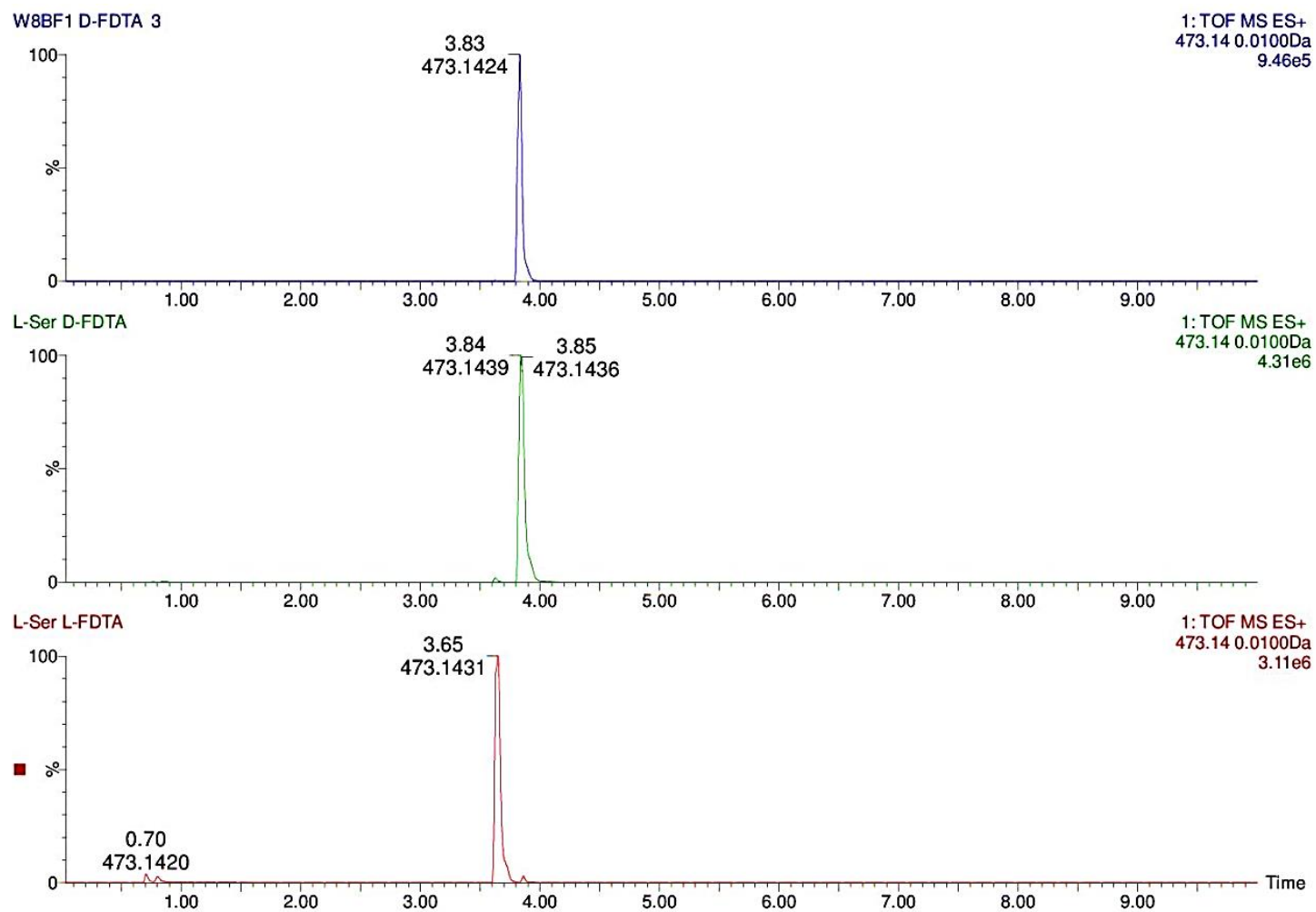


Figura A 42. XIC m/z 483 da análise do padrão L-prolina derivatizado com L e D-FDTA e da oceanapiamida A derivatizada com D-FDTA.

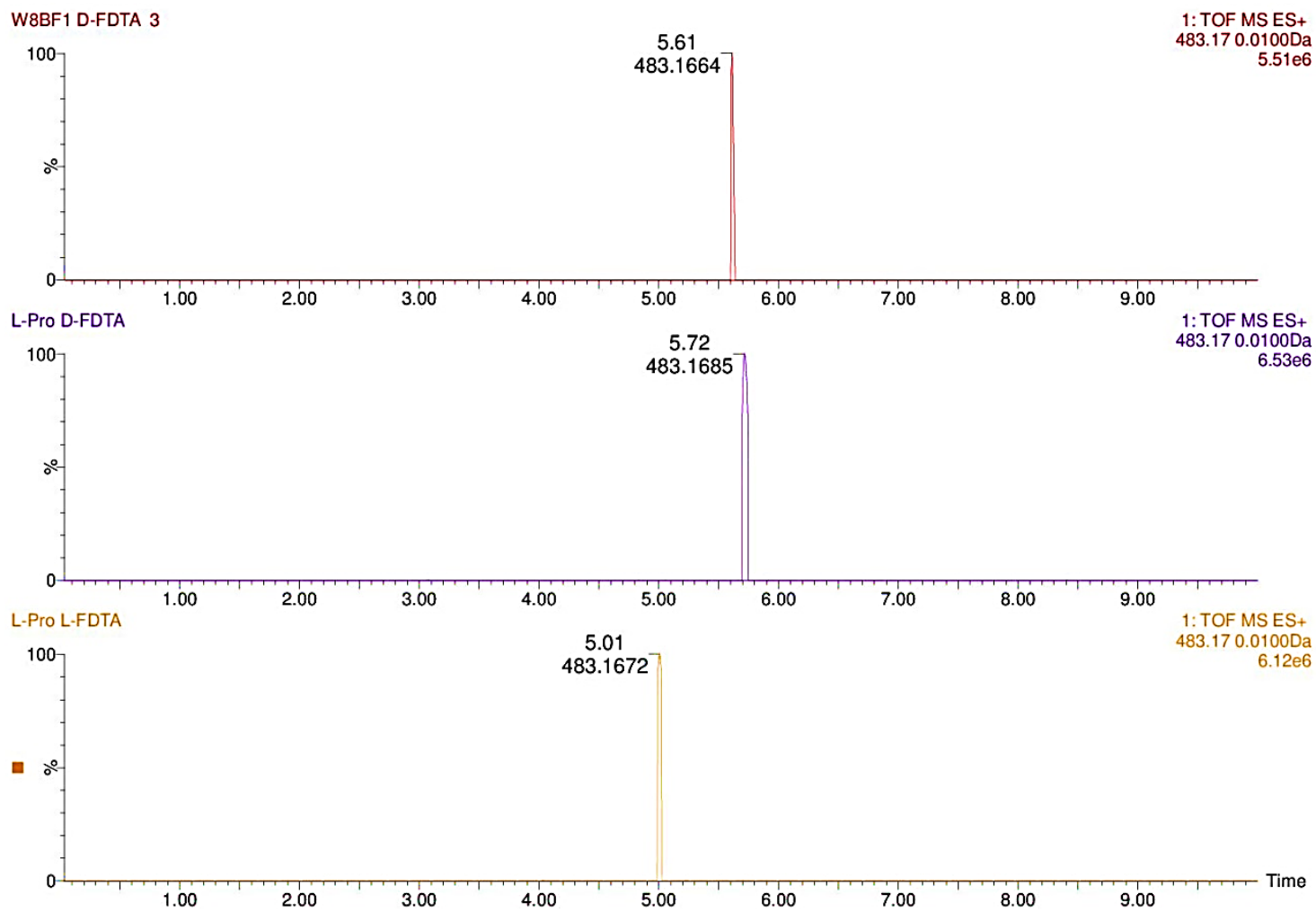


Figura A 43. XIC m/z 499 da análise dos padrões L-leucina e L-isoleucina derivatizados com L e D-FDTA e da oceanapiamida A derivatizada com D-FDTA.

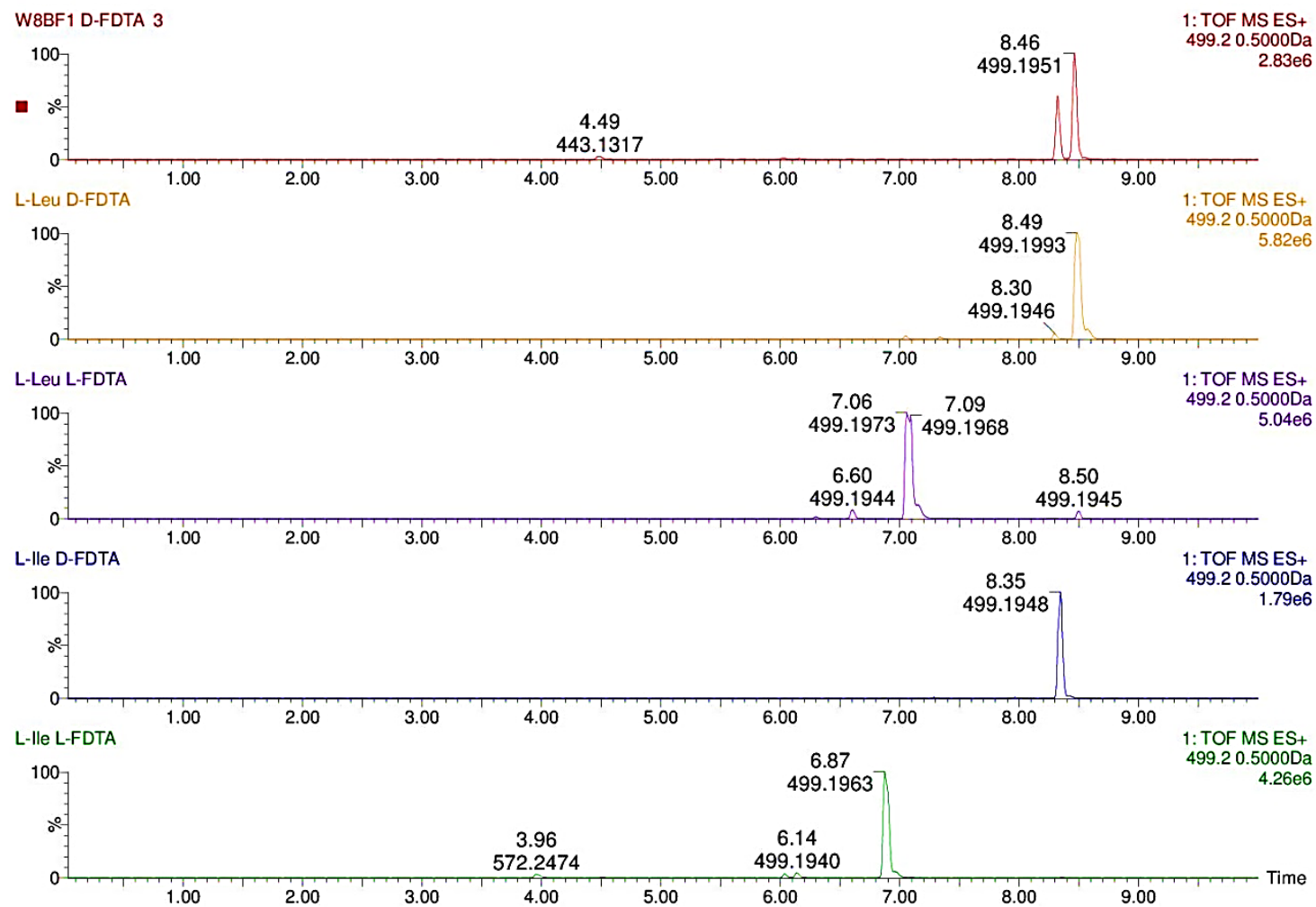


Figura A 44. Comparação entre os espectro MS/MS da oceanapiamida A e do produto de reação oceanapiamida A + DTT.

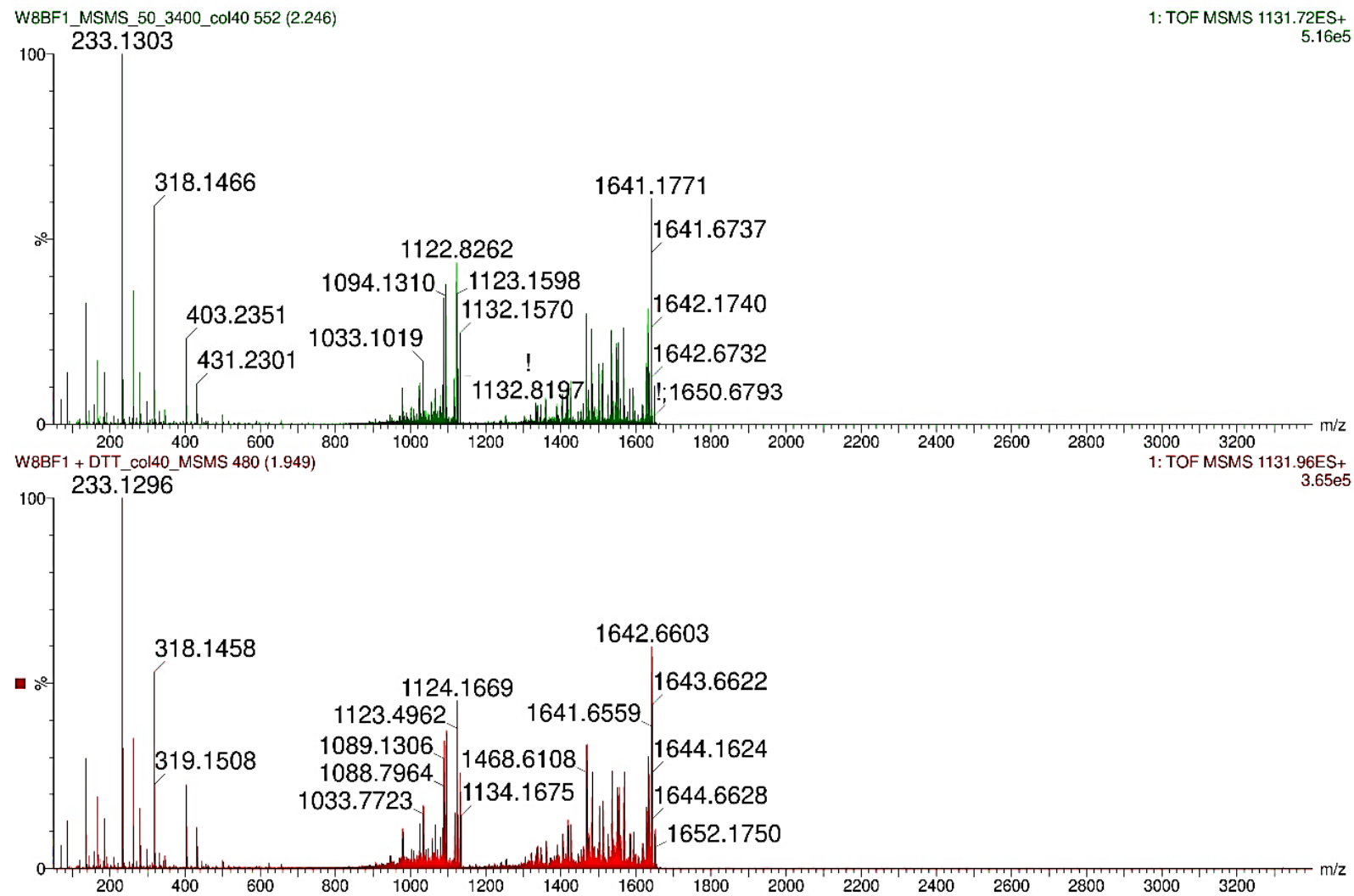


Figura A 45. Comparação entre os cromatogramas do produto de reação oceanapiamida A + DTT e da oceanapiamida A.

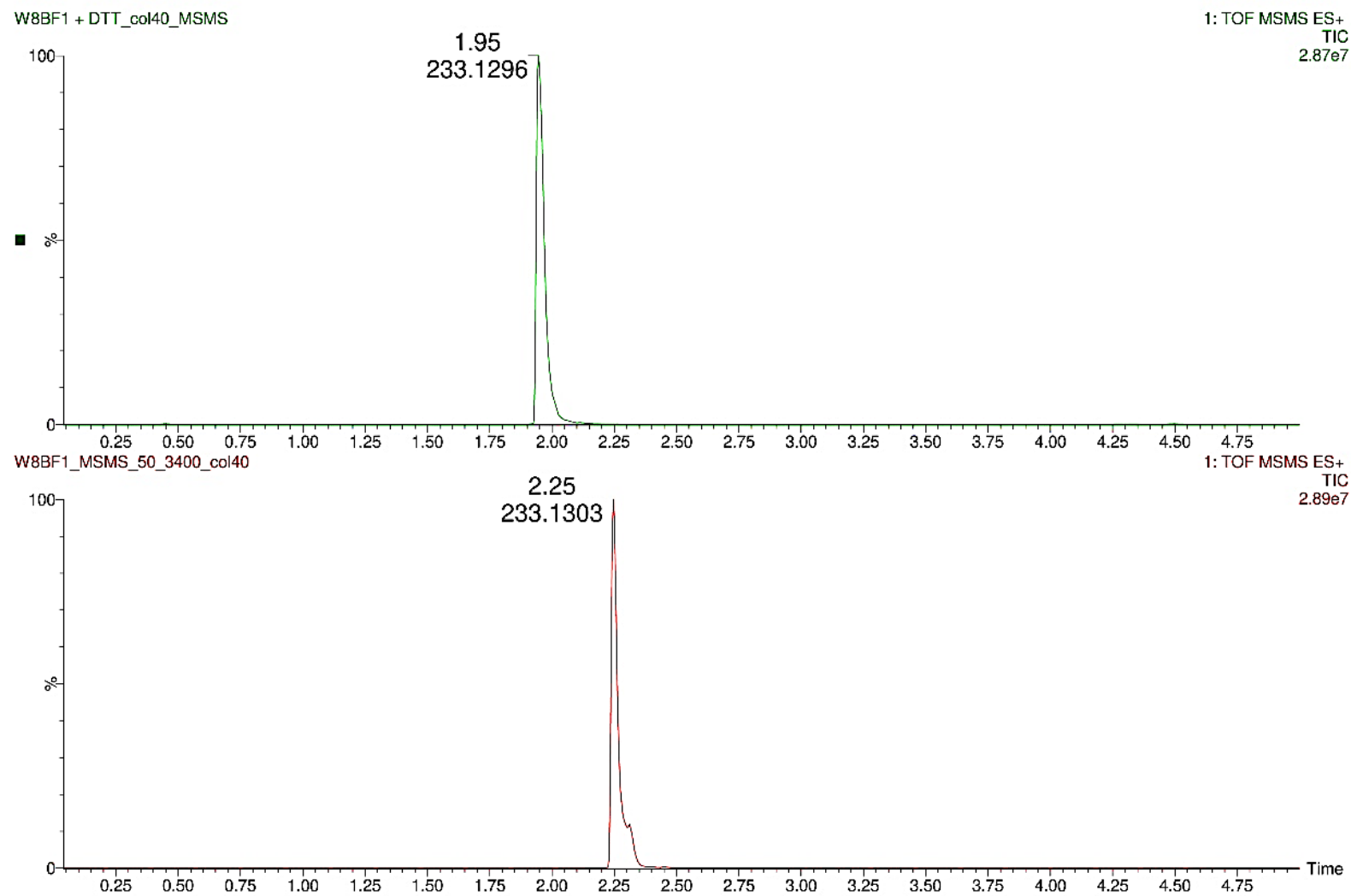


Figura A 46. Comparação entre os espectros MS do produto de reação oceanapiamida A + DTT e da oceanapiamida A.

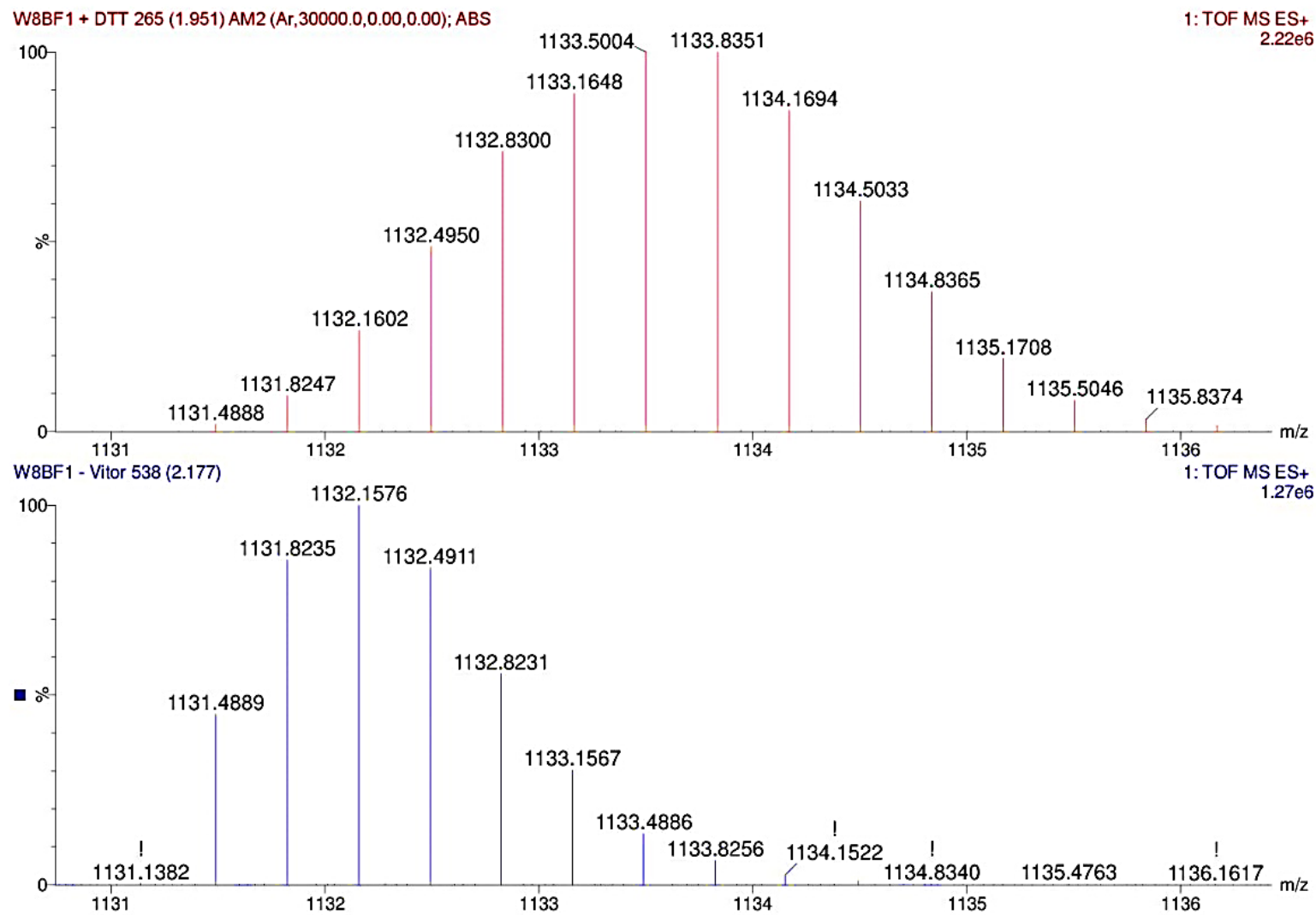


Figura A 47. Espectro MS/MS do composto 4-desbromo-oroidina (3).

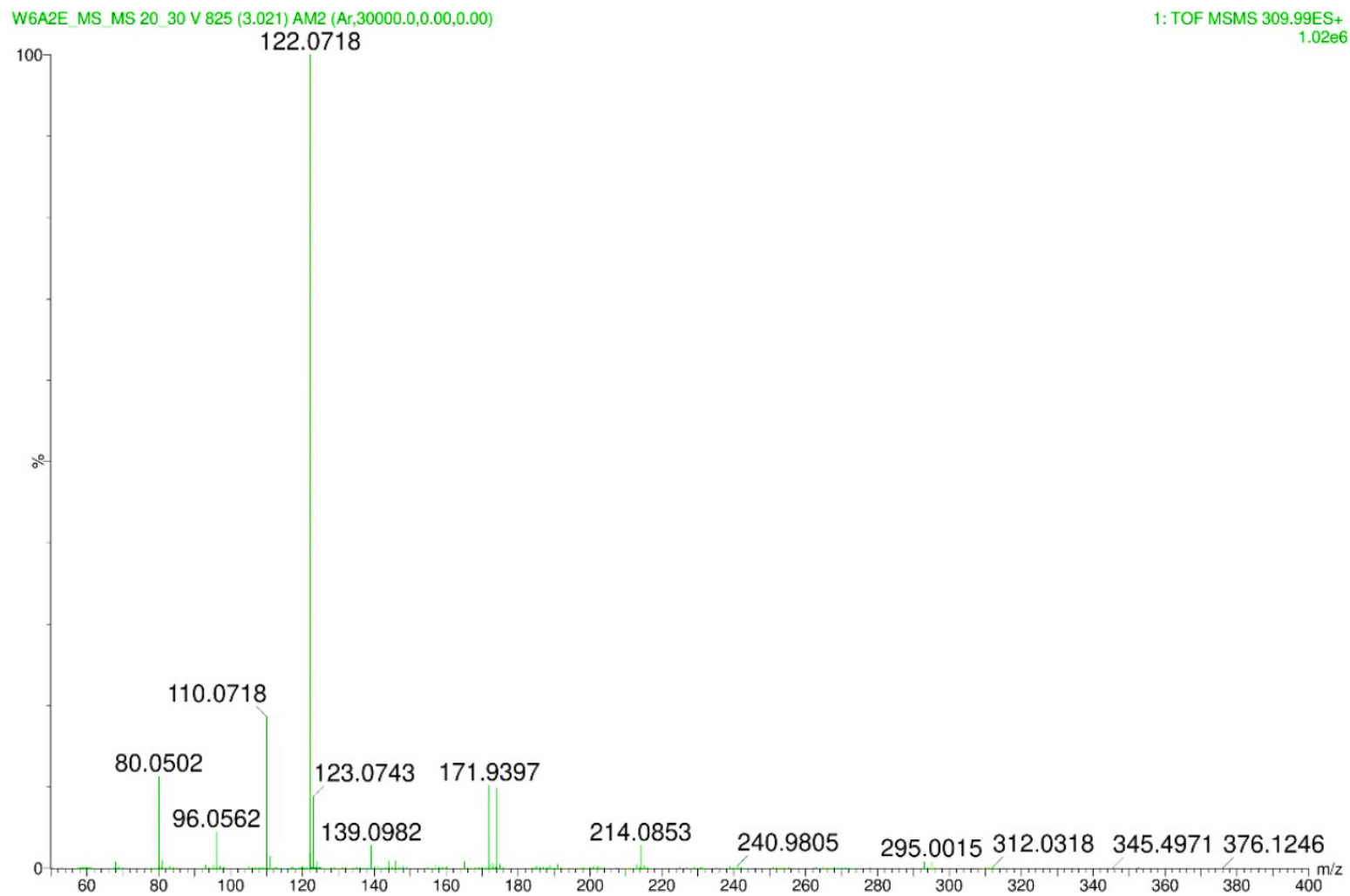


Figura A 48 - Espectro MS/MS do composto himenidina (4).

W6A2E3_MS_MS 20_30V 897 (3.285) AM2 (Ar,30000.0,0.00,0.00)

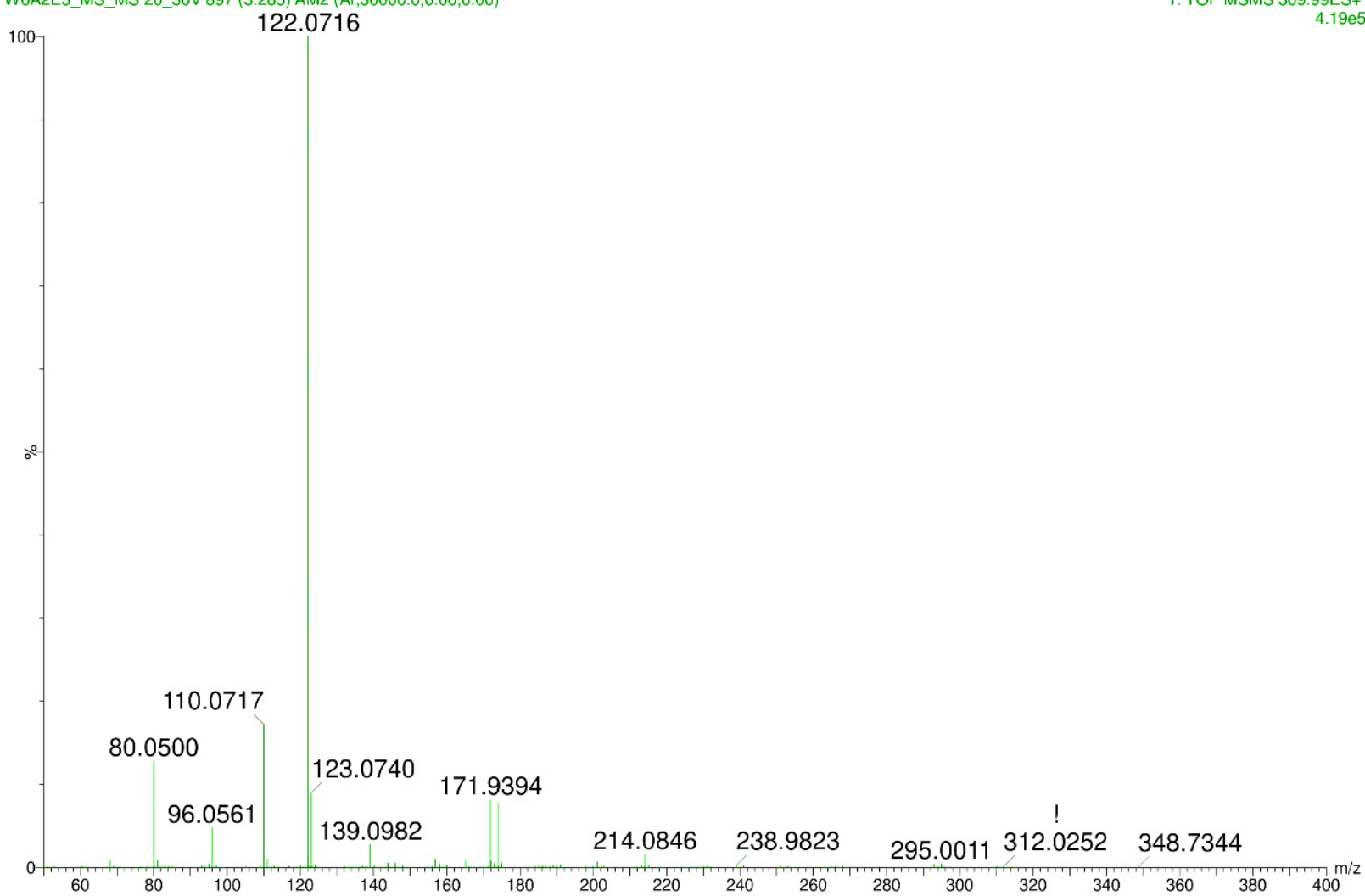
1: TOF MSMS 309.99ES+
4.19e5

Figura A 49 - Espectro MS/MS do composto 4-desbromougibohlina (5).

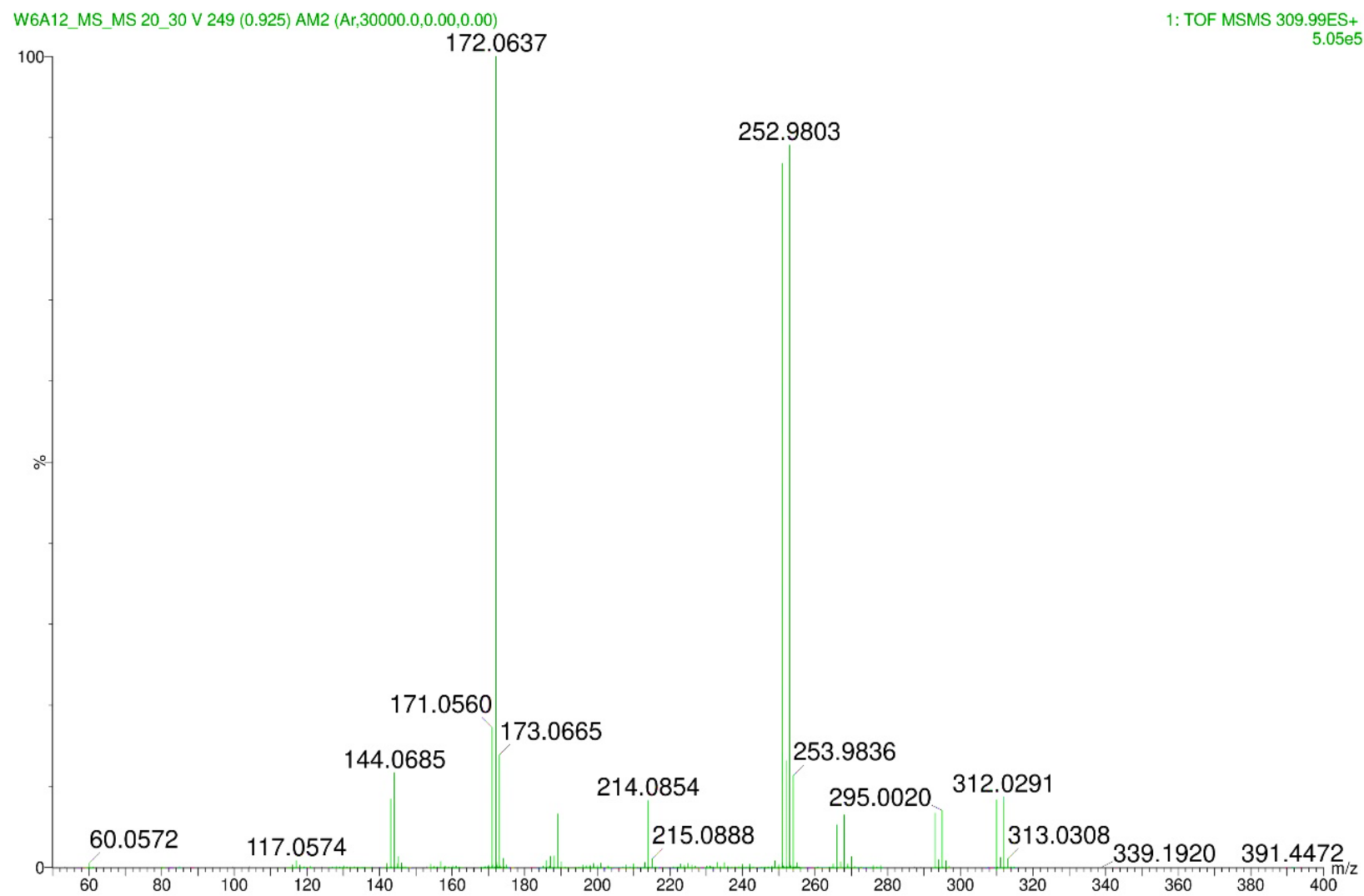


Figura A 50 - Espectro MS/MS do composto 5-desbromougibohlina (6).

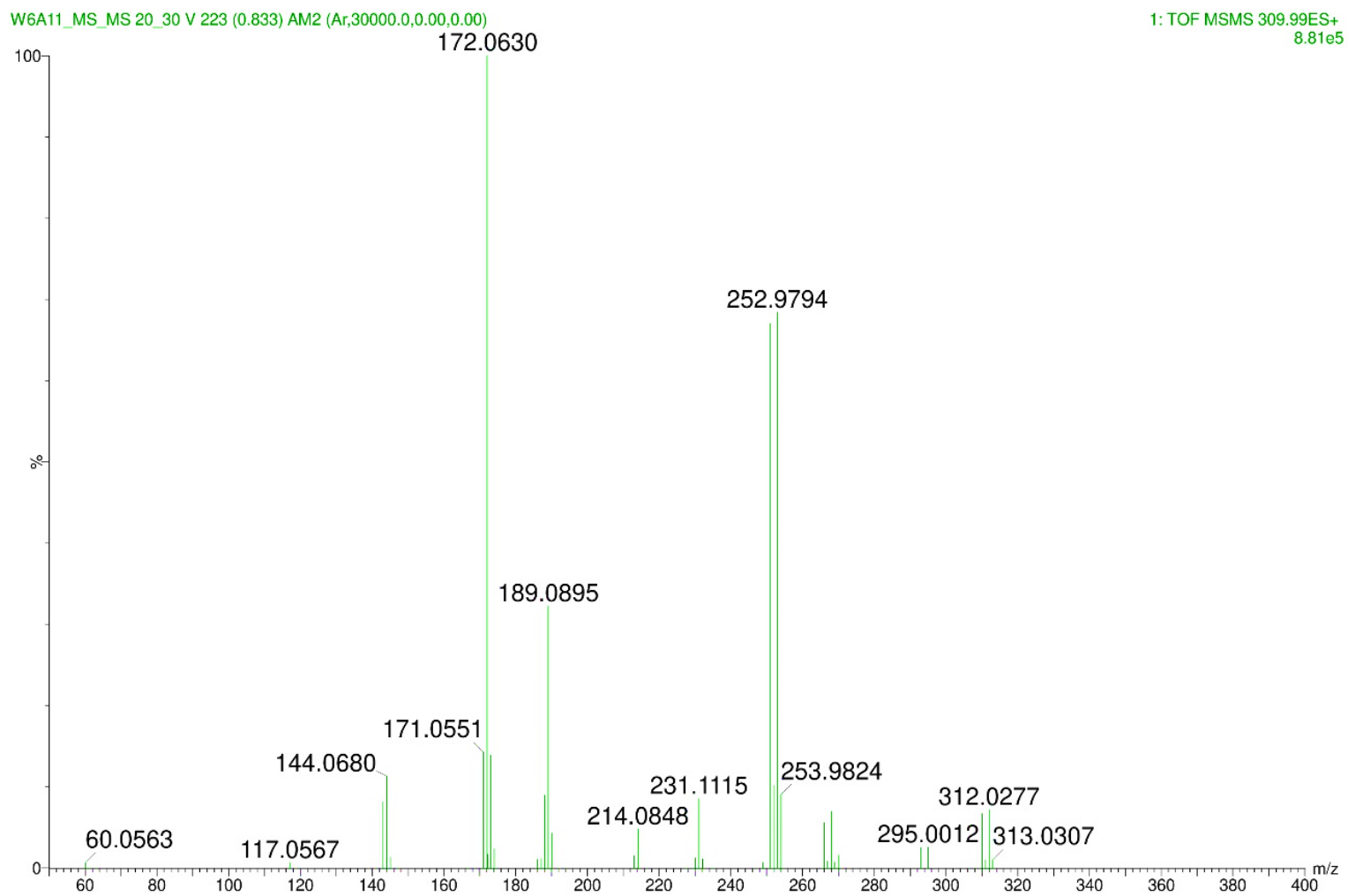


Figura A 51. Expansão do espectro MS/MS do composto 5-desbromougibohlina (6).

W6A11_MS_MS 20_30 V 223 (0.833) AM2 (Ar,30000.0,0.00,0.00)

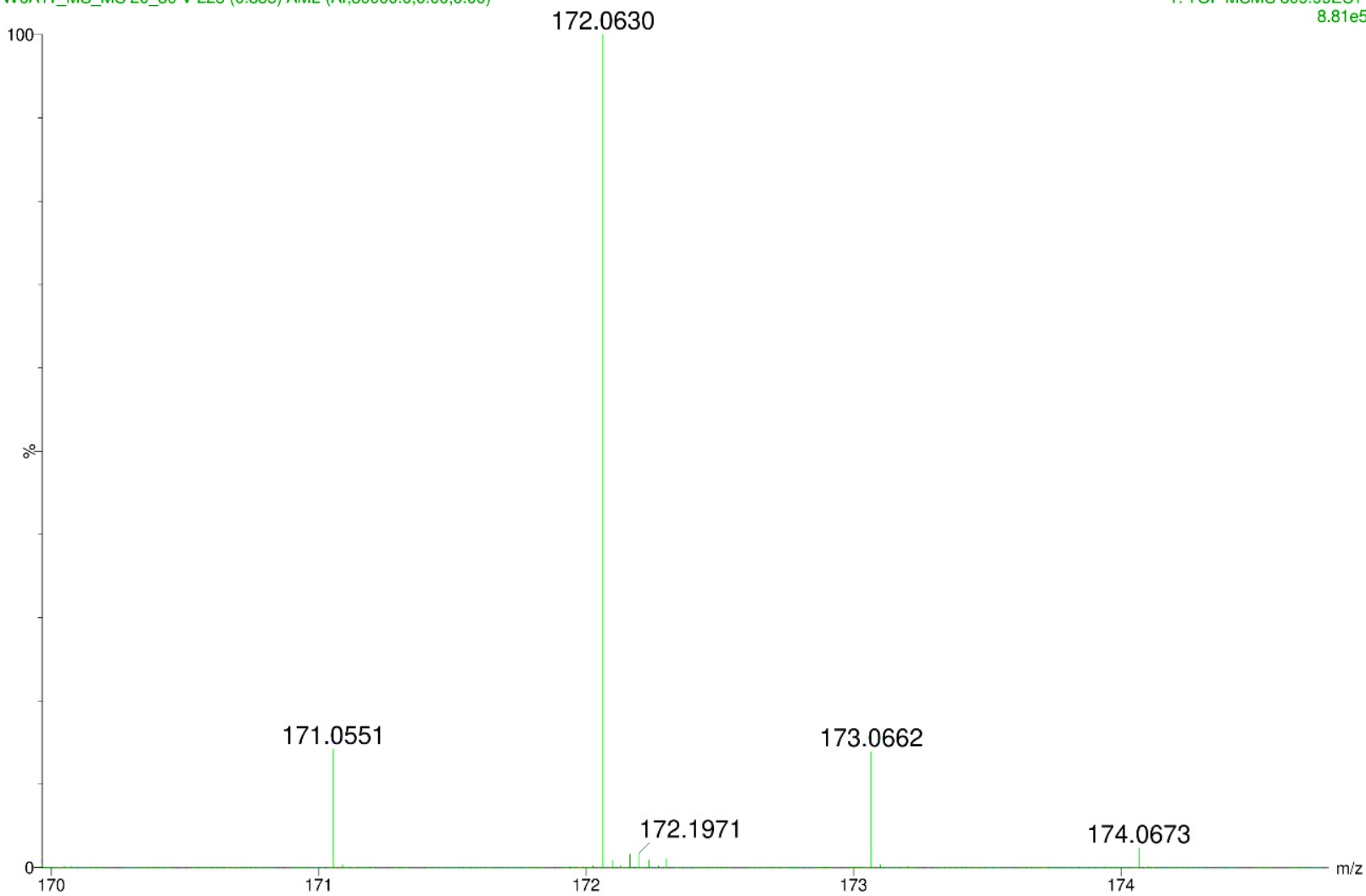
1: TOF MSMS 309.99ES+
8.81e5

Figura A 52 - Espectro MS/MS do composto monobromoisofakelina (7).

W6A1433_MS_MS 20_30 V 310 468 (1.727) AM2 (Ar,30000.0,0.00,0.00)

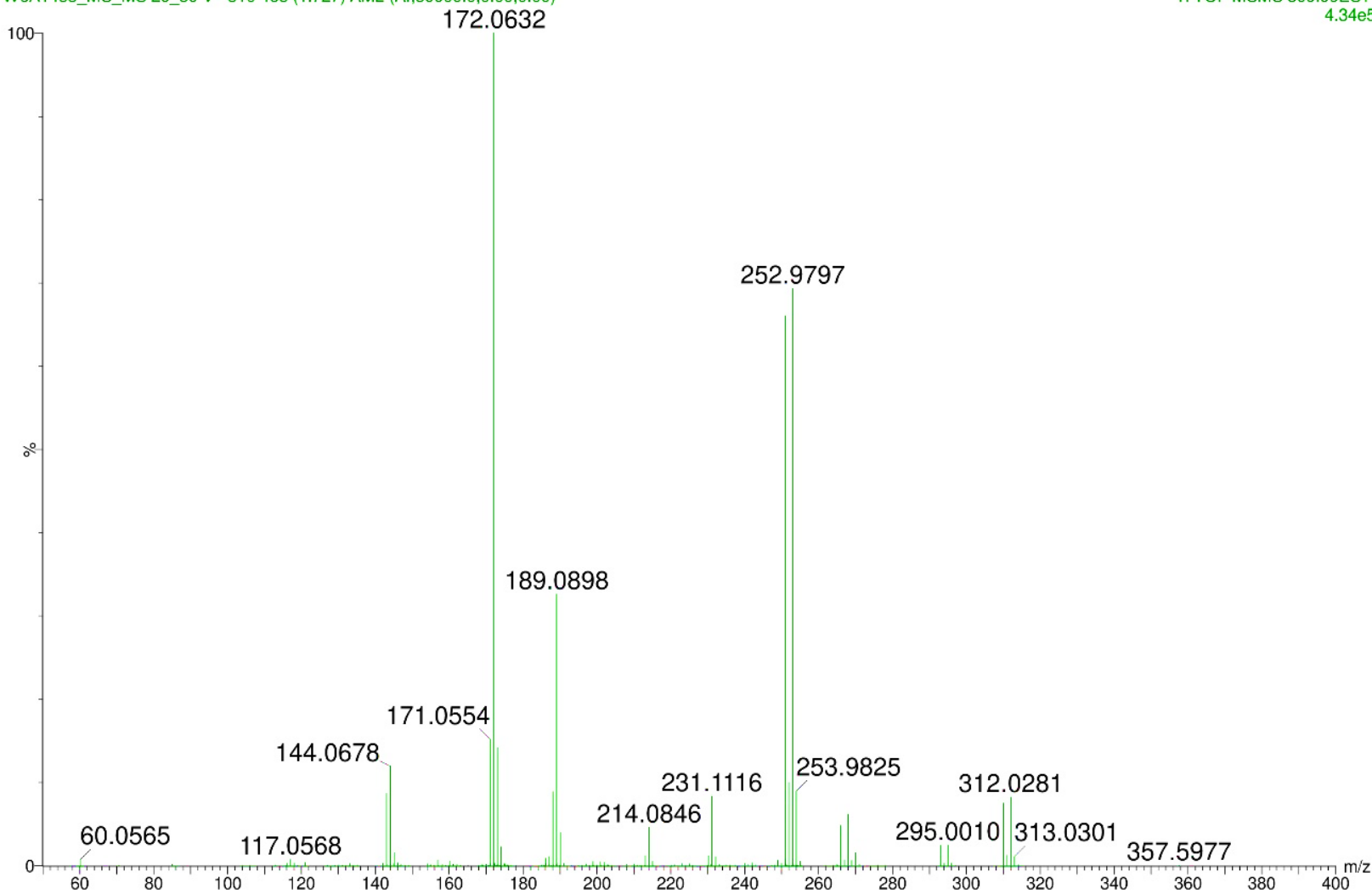
1: TOF MSMS 309.99ES+
4.34e5

Figura A 53. Espectros MS e MS/MS da himenidina (4).

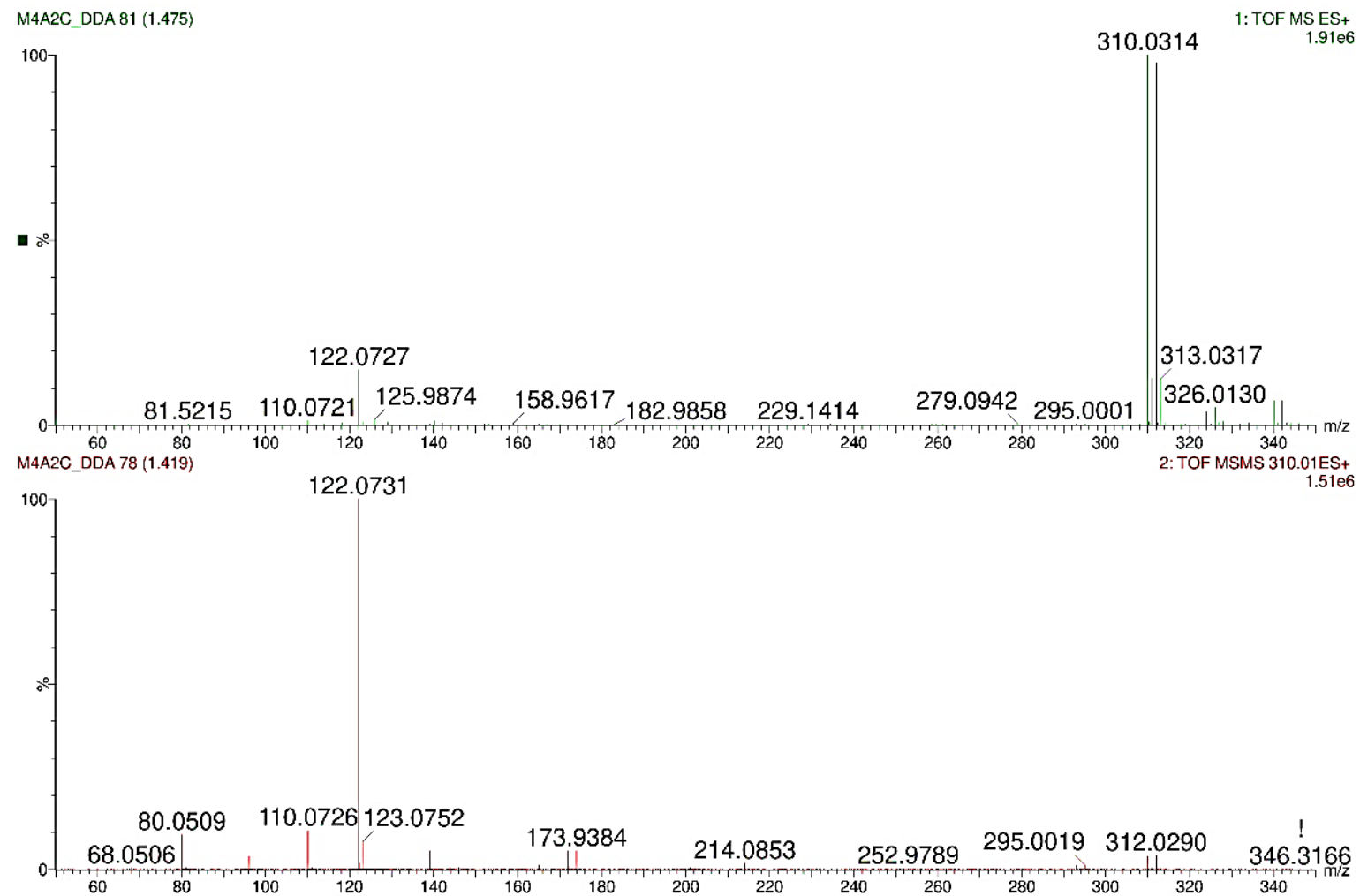


Figura A 54. Espectro MS da oroidina.

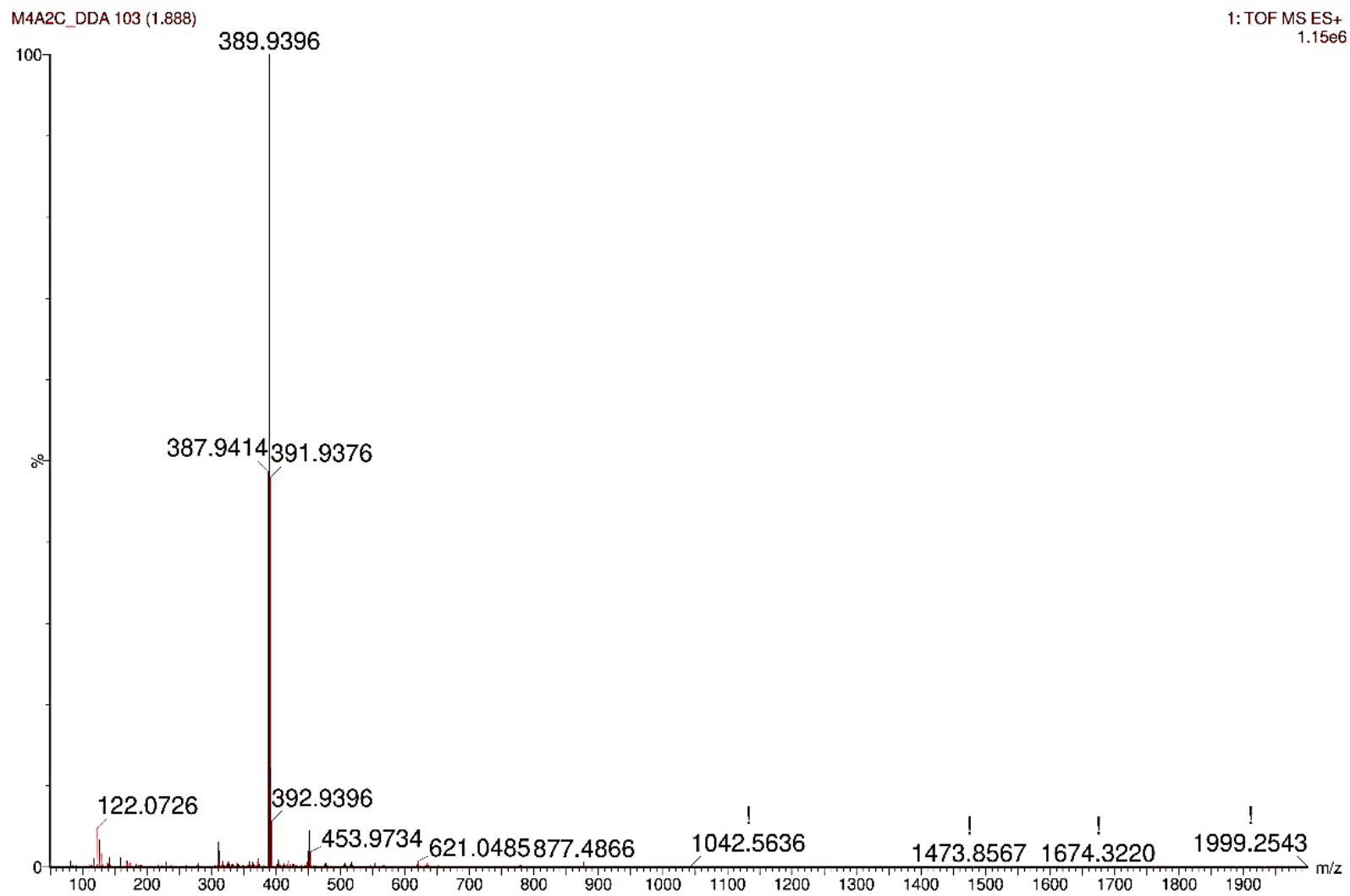


Figura A 55 Expansão do espectro MS da oroidina

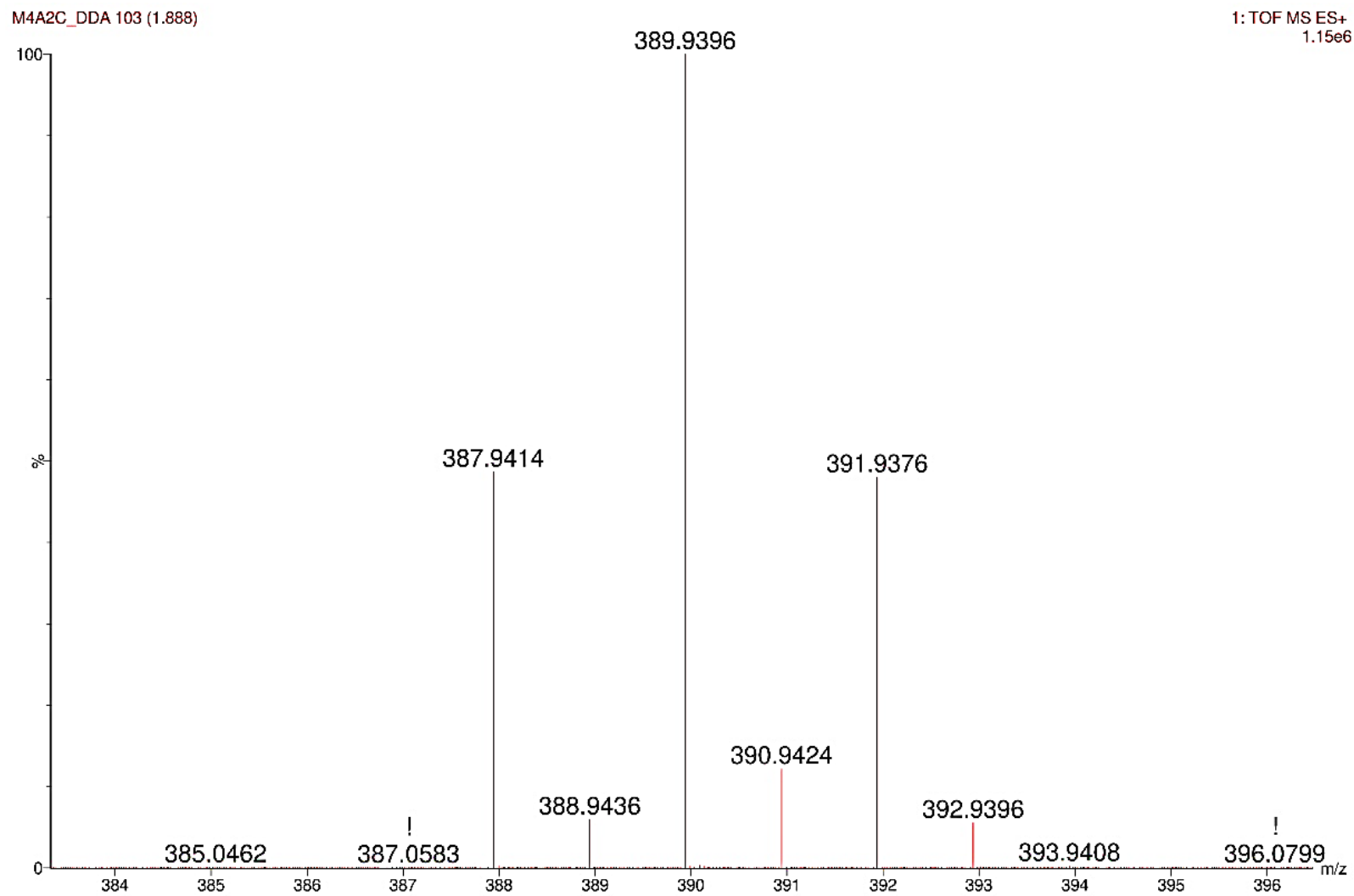


Figura A 56. Espectros MS/MS da himenidina (4) e da oroidina.

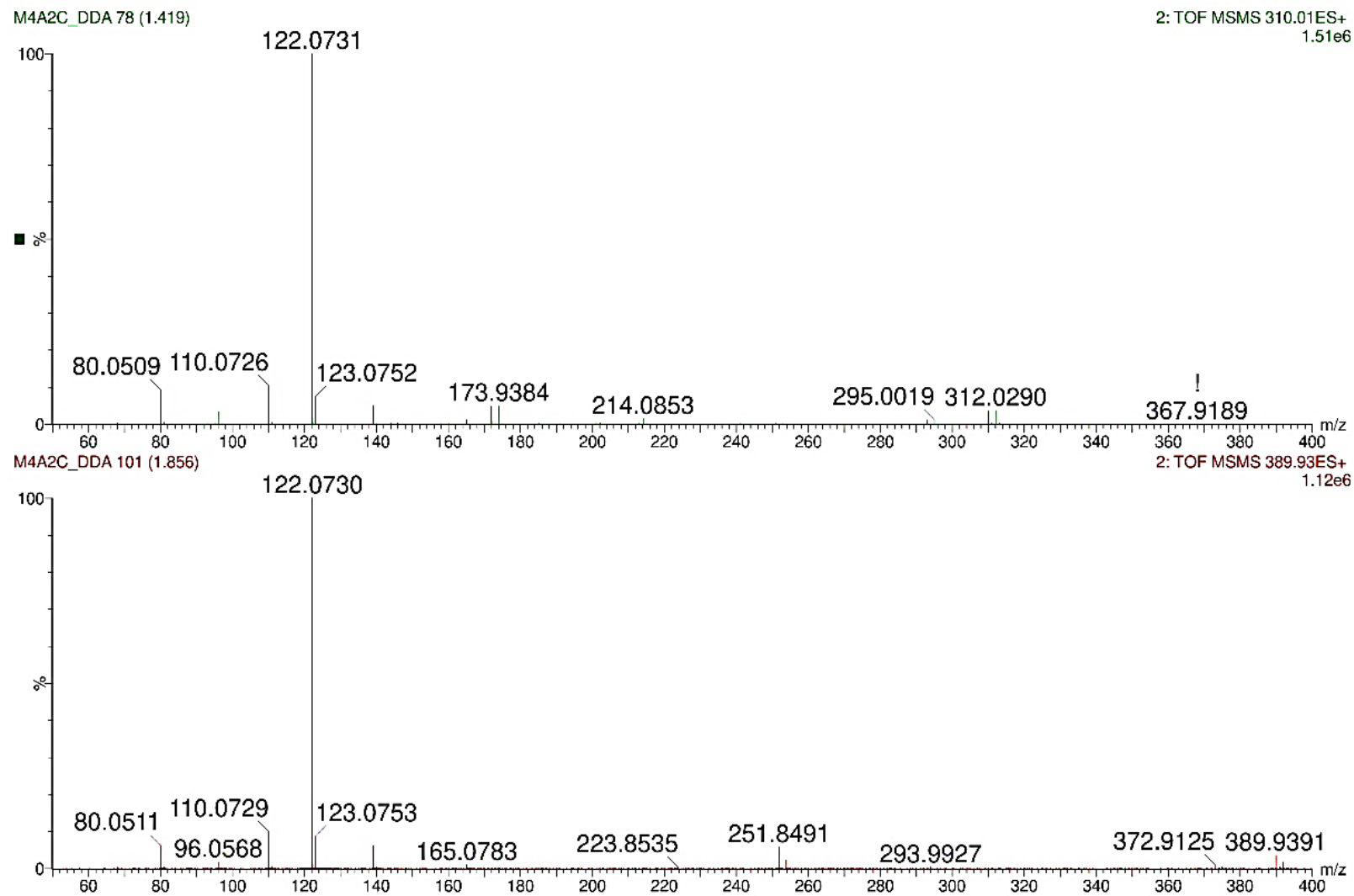


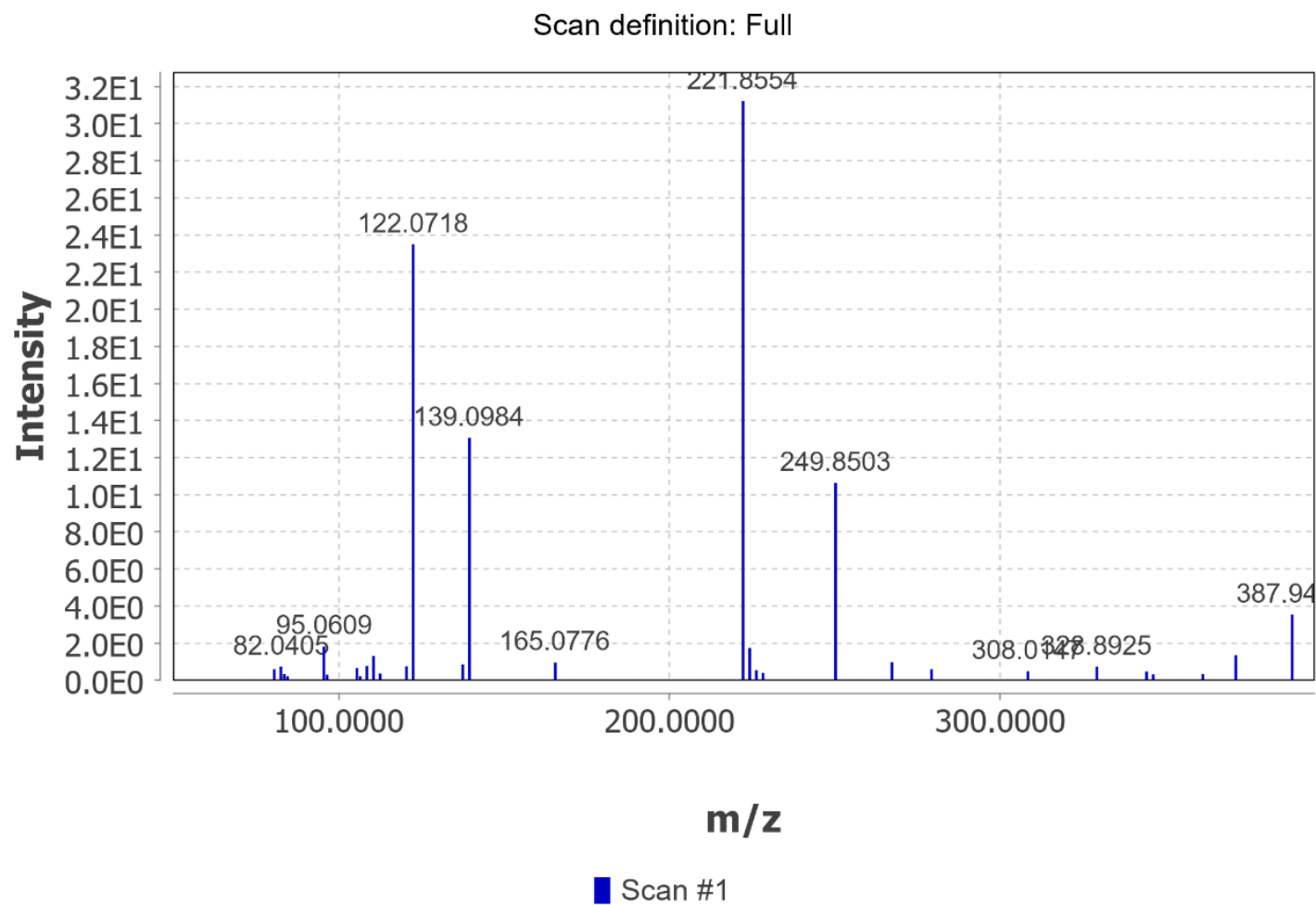
Figura A 57. Espectro de fragmentação MS/MS *in-silico* da oroidina.**Oroidine CFM-ID.mzXML#1 @0.00 MS2 (387.9403) c +, base peak: 221.8554 m/z (3.1E1)**

Figura A 58. Espectro MS da undecaetilenoglicol.

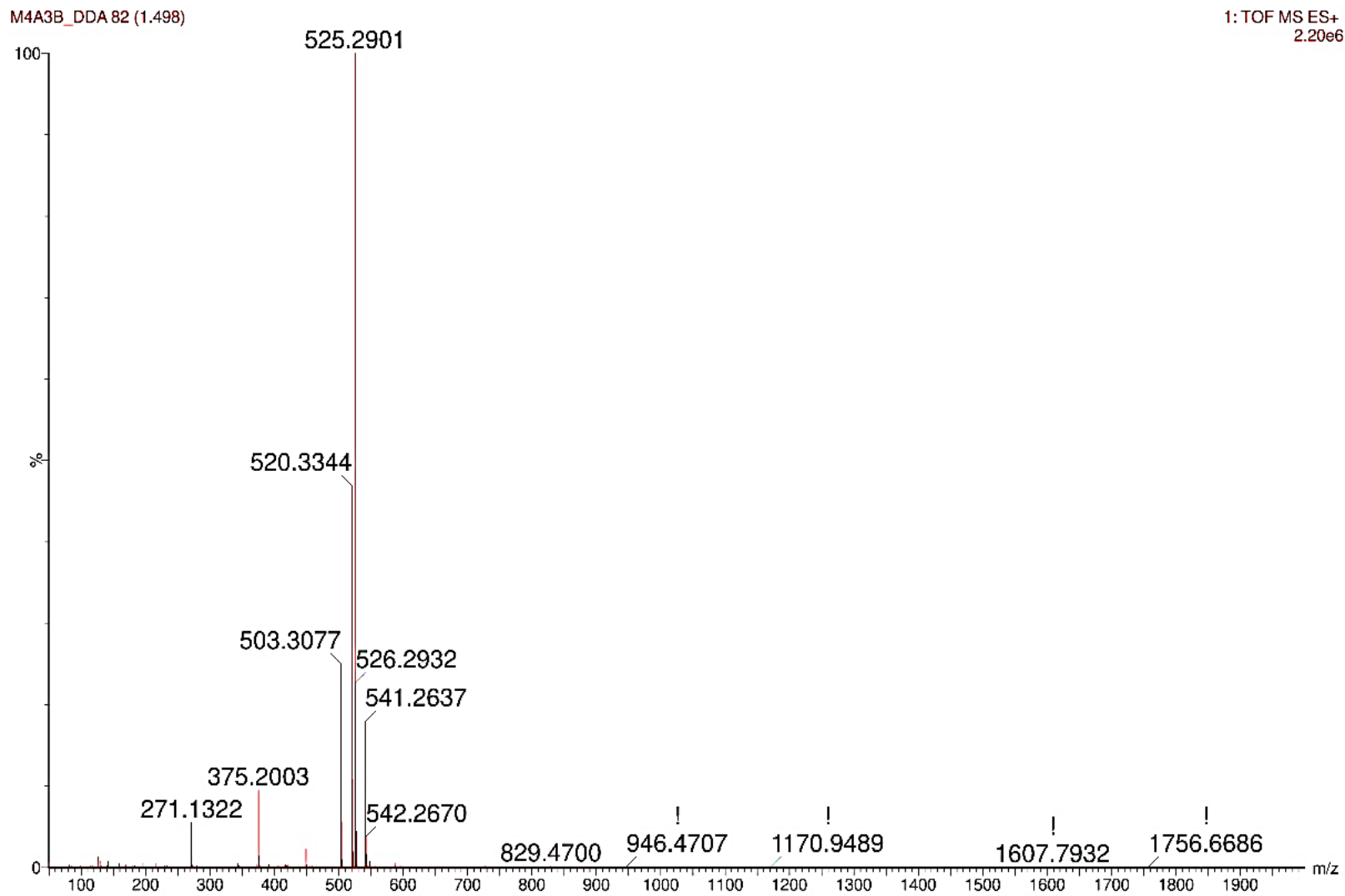


Figura A 59. Espectro MS/MS do undecaetilenoglicol.

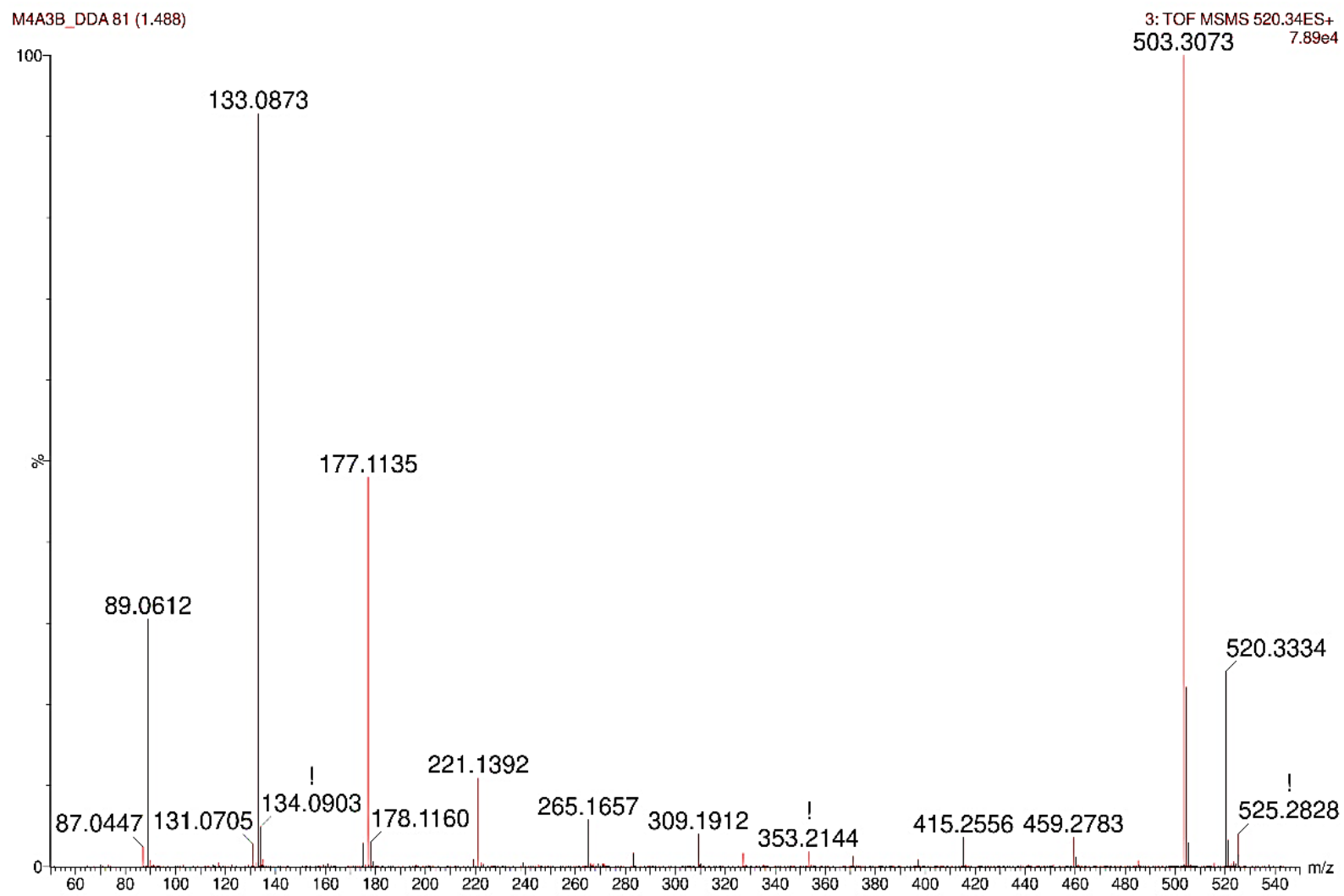


Figura A 60. Espectro de fragmentações *in-silico* do compostos undecaetilenoglicol.

**Undecaetilenoglicol CFM-ID.mzXML#1 @0.00 MS2 (503.3077) c +, base peak: 459.2800
m/z (9.6E0)**

Scan definition: Full

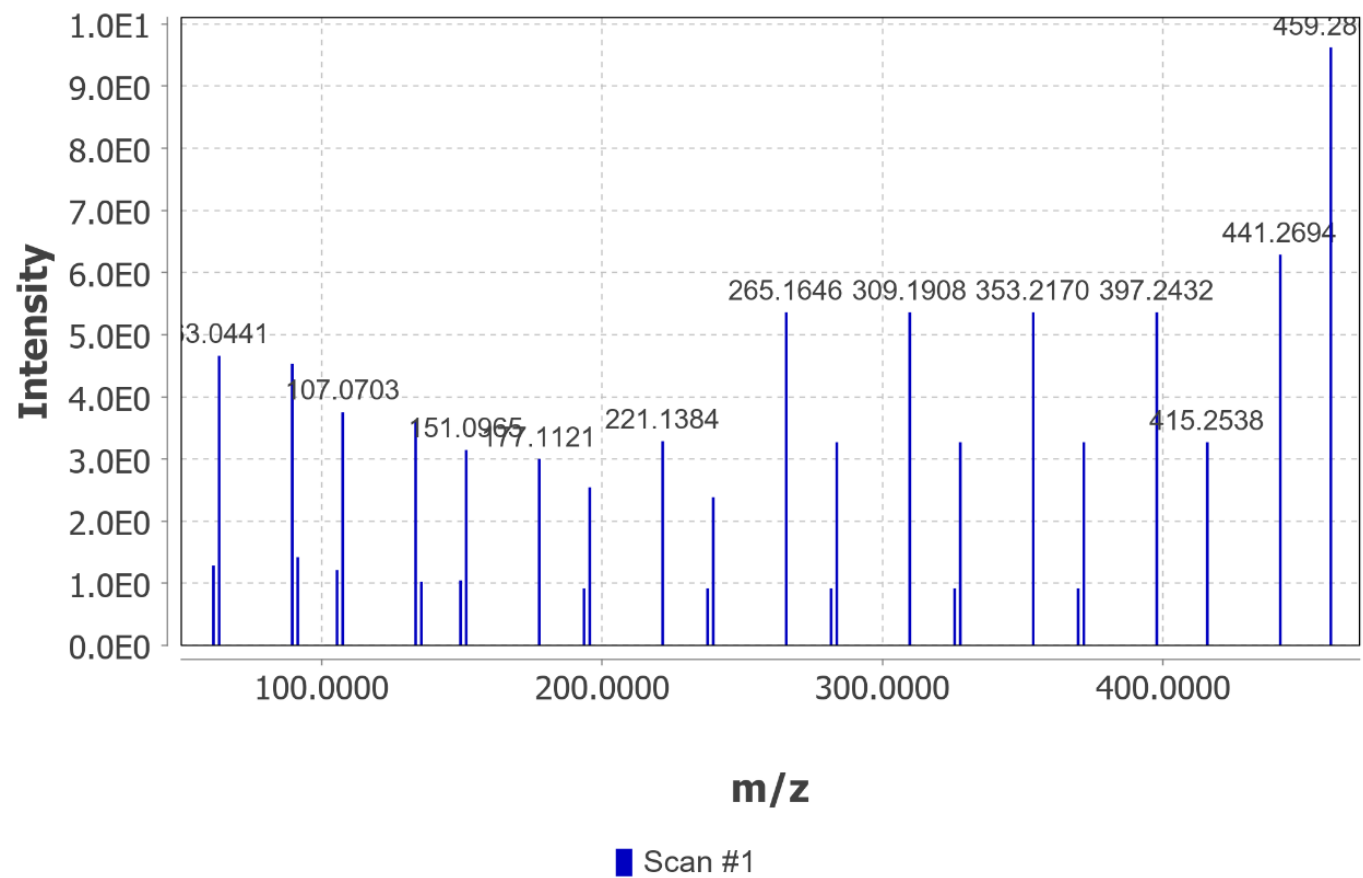


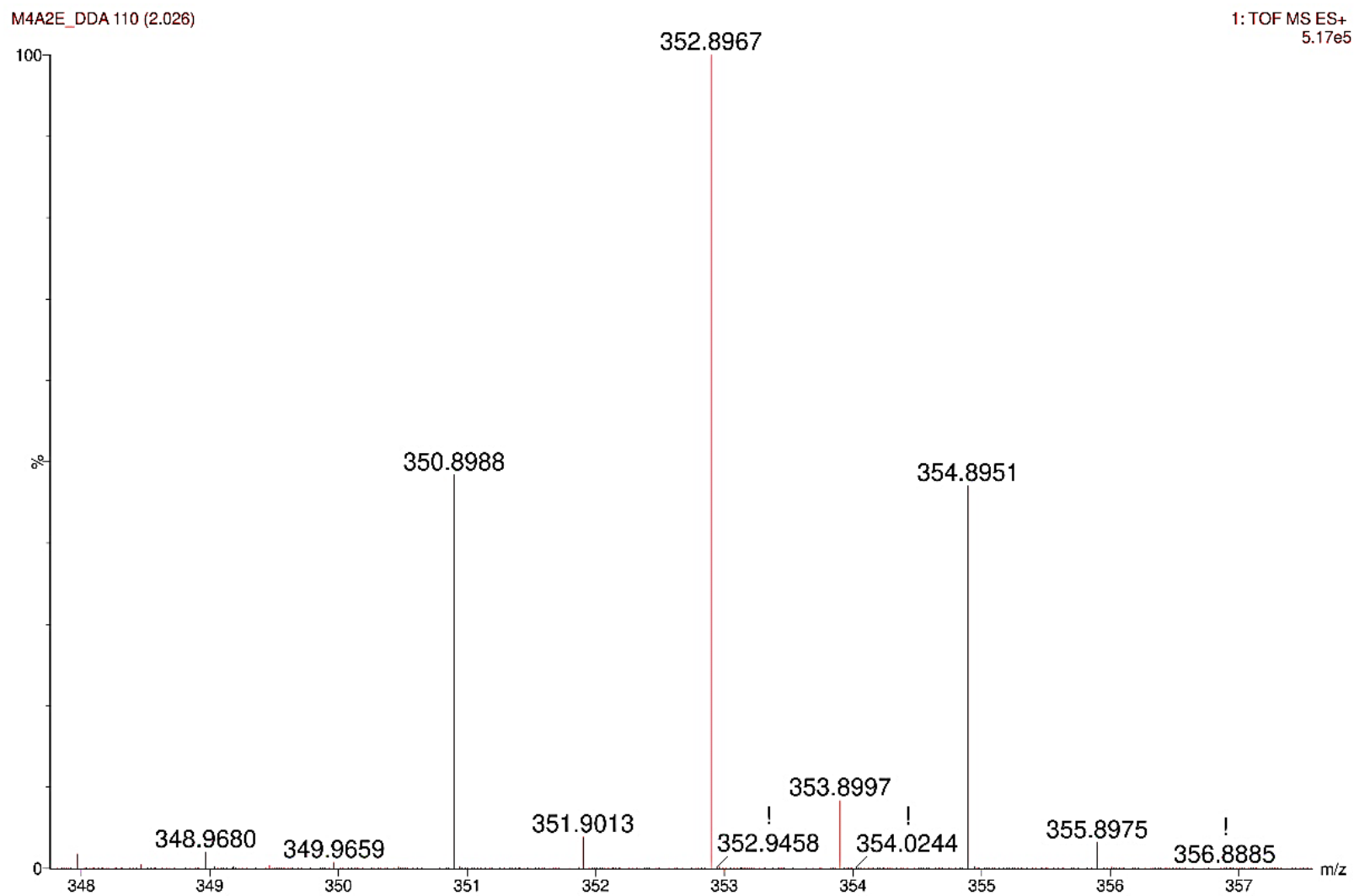
Figura A 61. Expansão do espectro MS referente ao nodo de m/z 352,89.

Figura A 62. Estrutura do composto himenamida B.

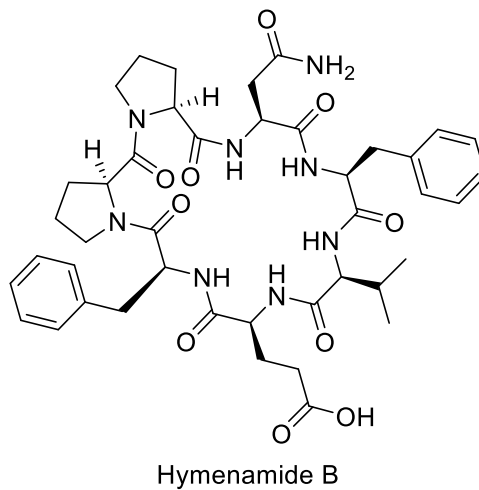


Figura A 63. Estrutura dos compostos monobromodispacamida e dihidrohimenialdesina.

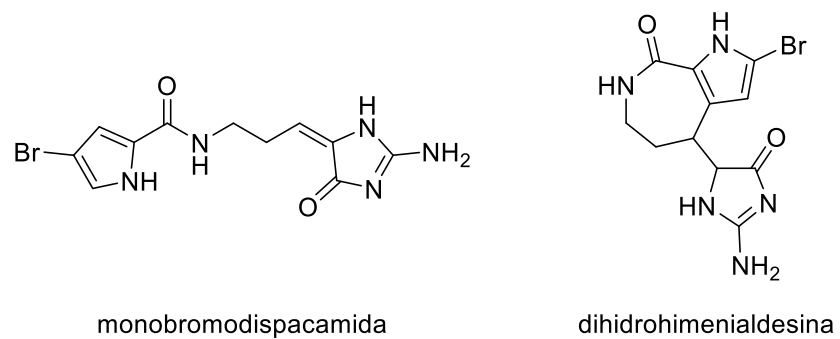


Figura A 64. Espectro MS da monobromodispacamida

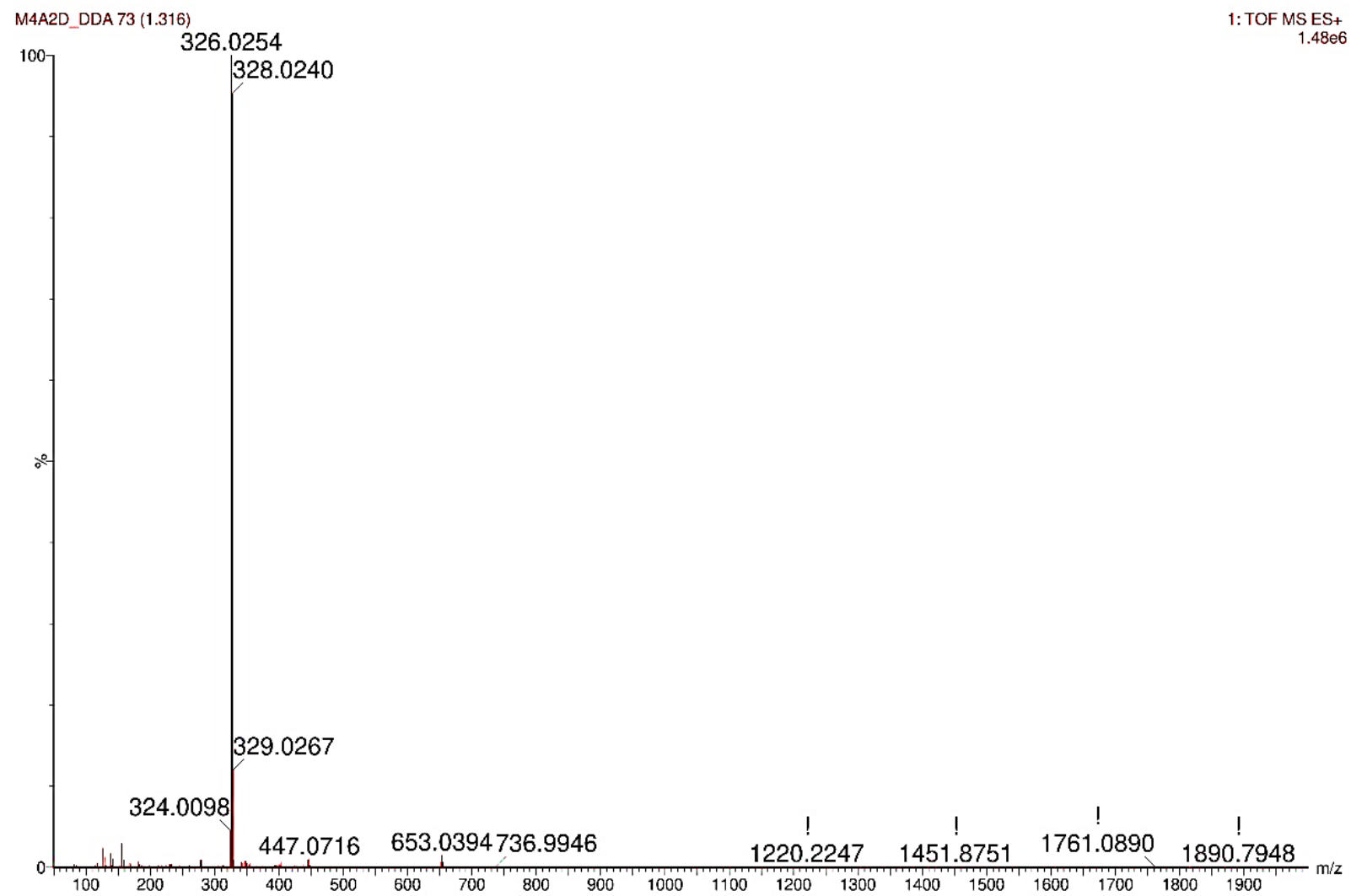


Figura A 65. Expansão do espectro MS da monobromodispacamida.

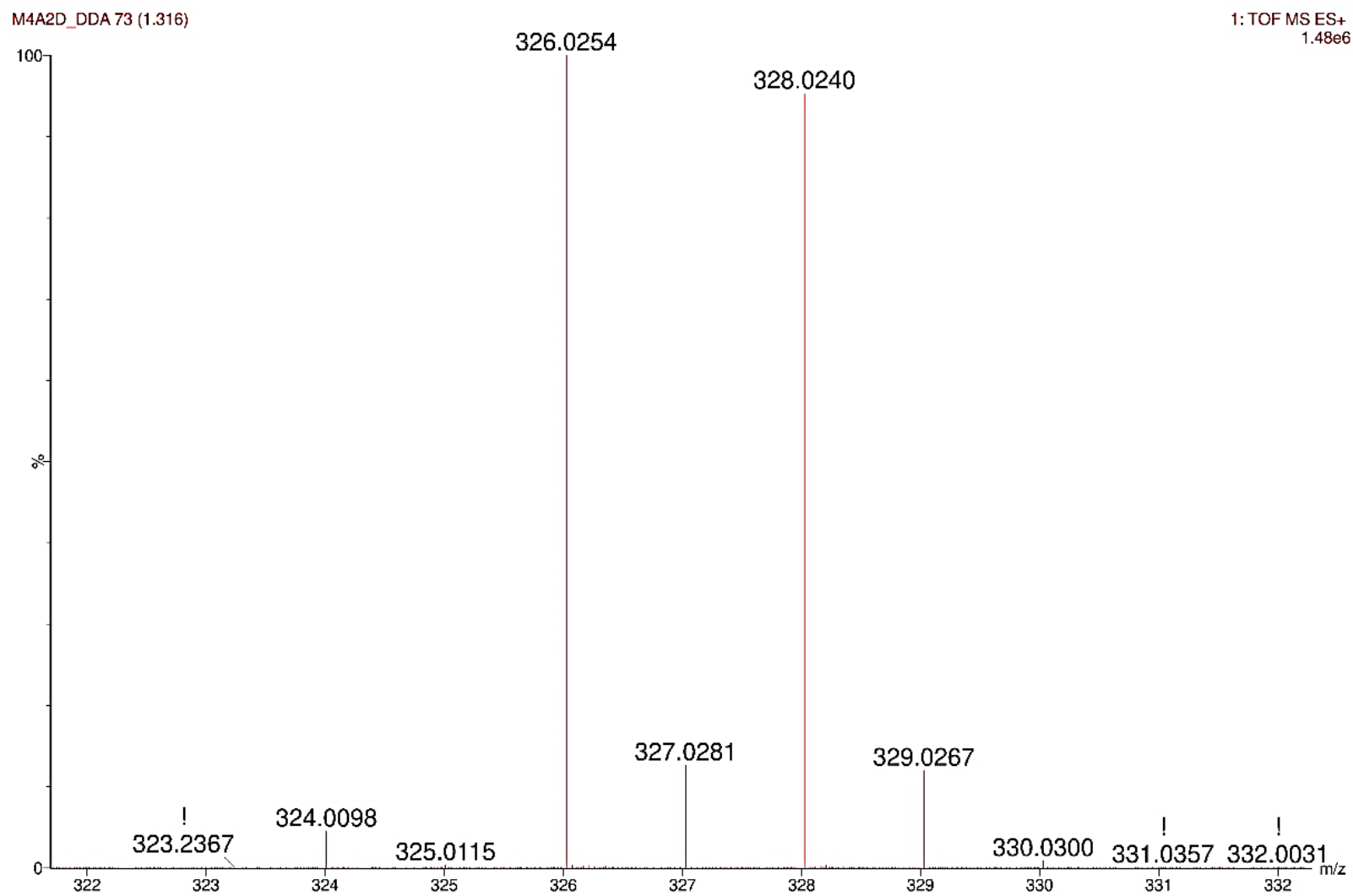


Figura A 66. Espectros MS/MS dos compostos himenidina (4) e monobromodispacamida.

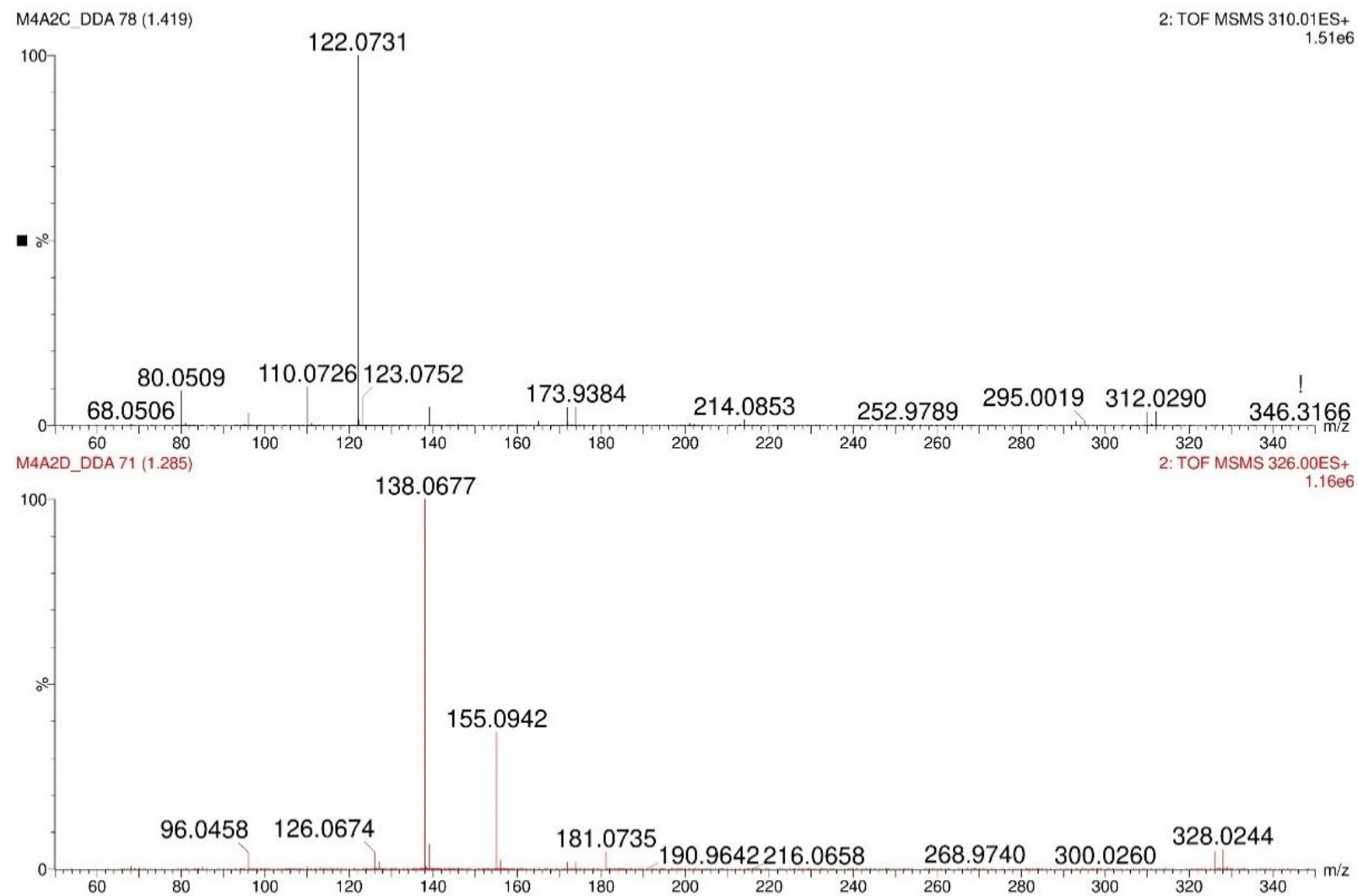


Figura A 67. Espectro de fragmentação *in-silico* para o composto monobromodispacamida.

**Monobromodispacamide CFM-ID.mzXML#1 @0.00 MS2 (326.0250) c +, base peak:
138.0662 m/z (2.5E1)**

Scan definition: Full

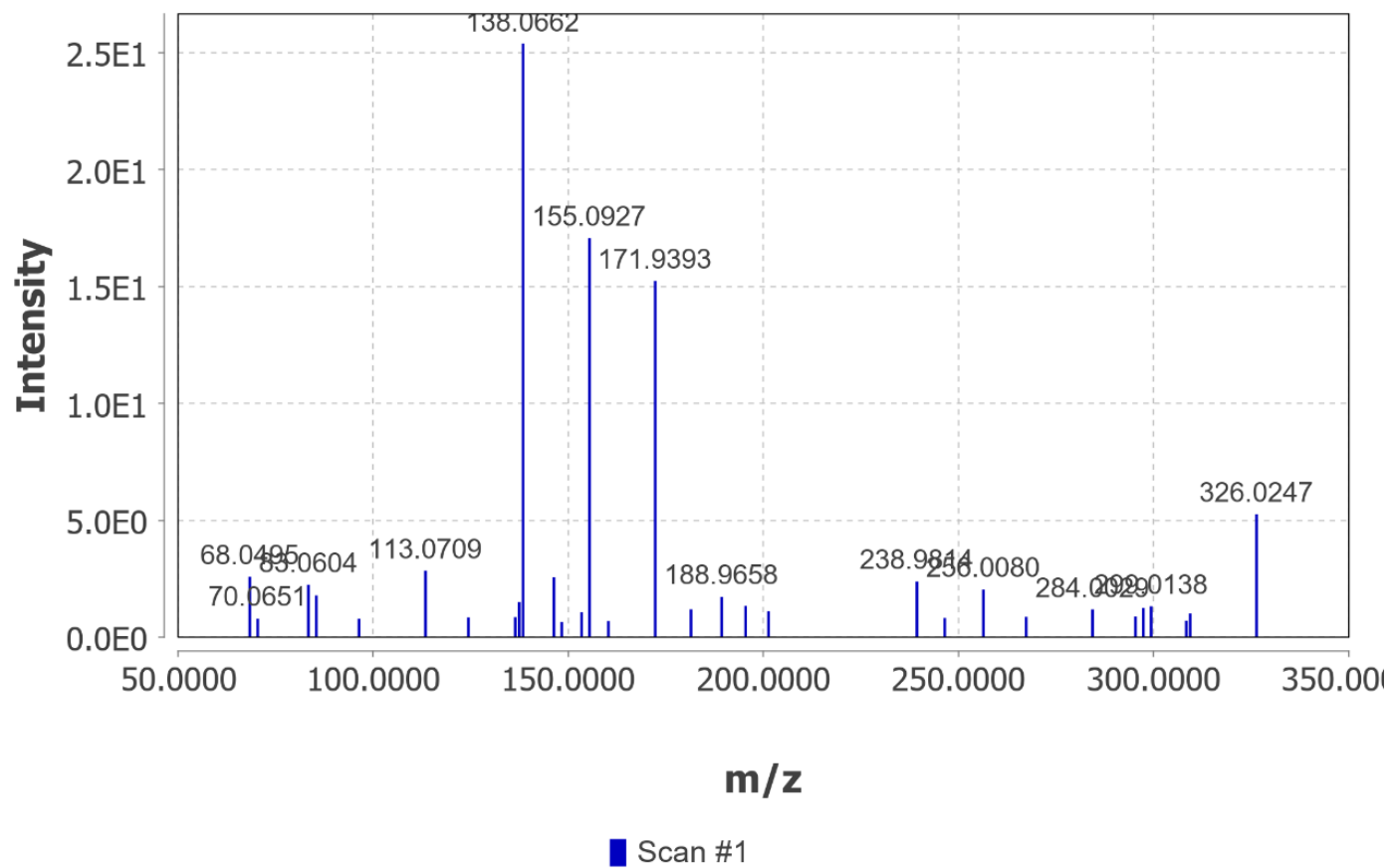


Figura A 68. Espectro de fragmentação *in-silico* para o composto dihidrohimenialdesina.

**dihydrohymenialdisine CFM-ID.mzXML#1 @0.00 MS2 (326.0247) c +, base peak: 326.0247
m/z (2.8E1)**

Scan definition: Full

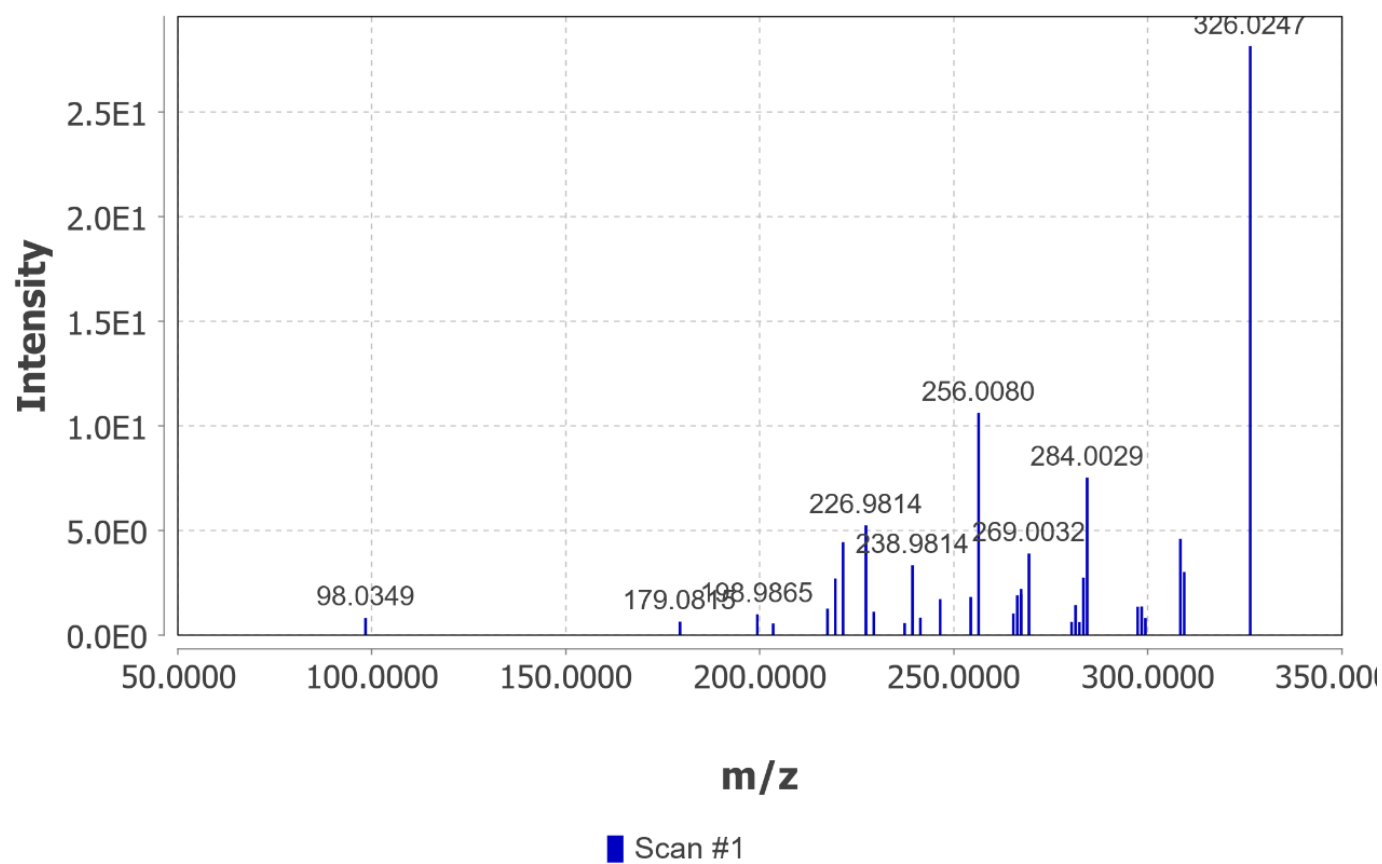


Figura A 69. Espectro MS da dispacamida.

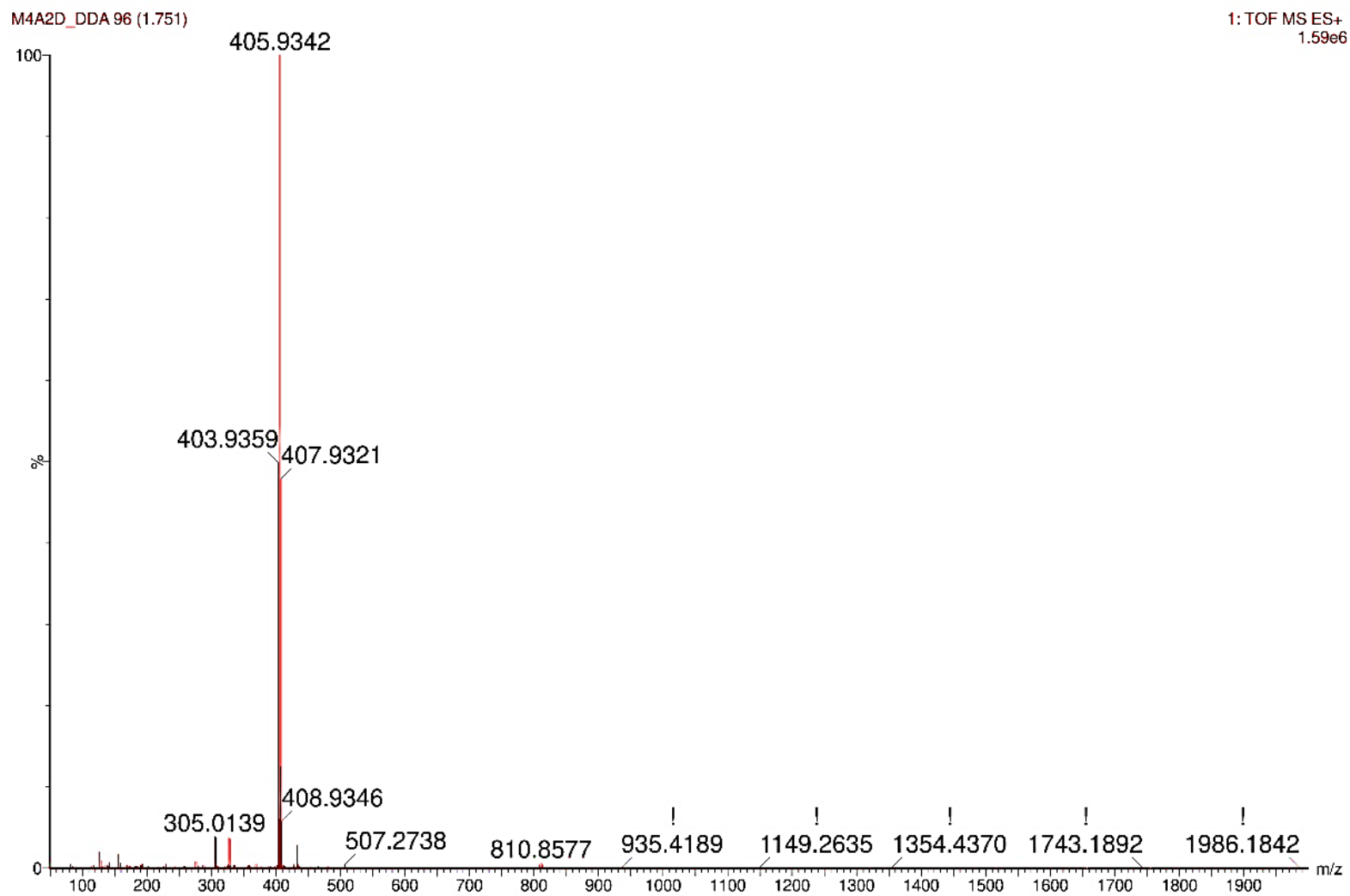


Figura A 70. Expansão do espectro MS da dispacamida.

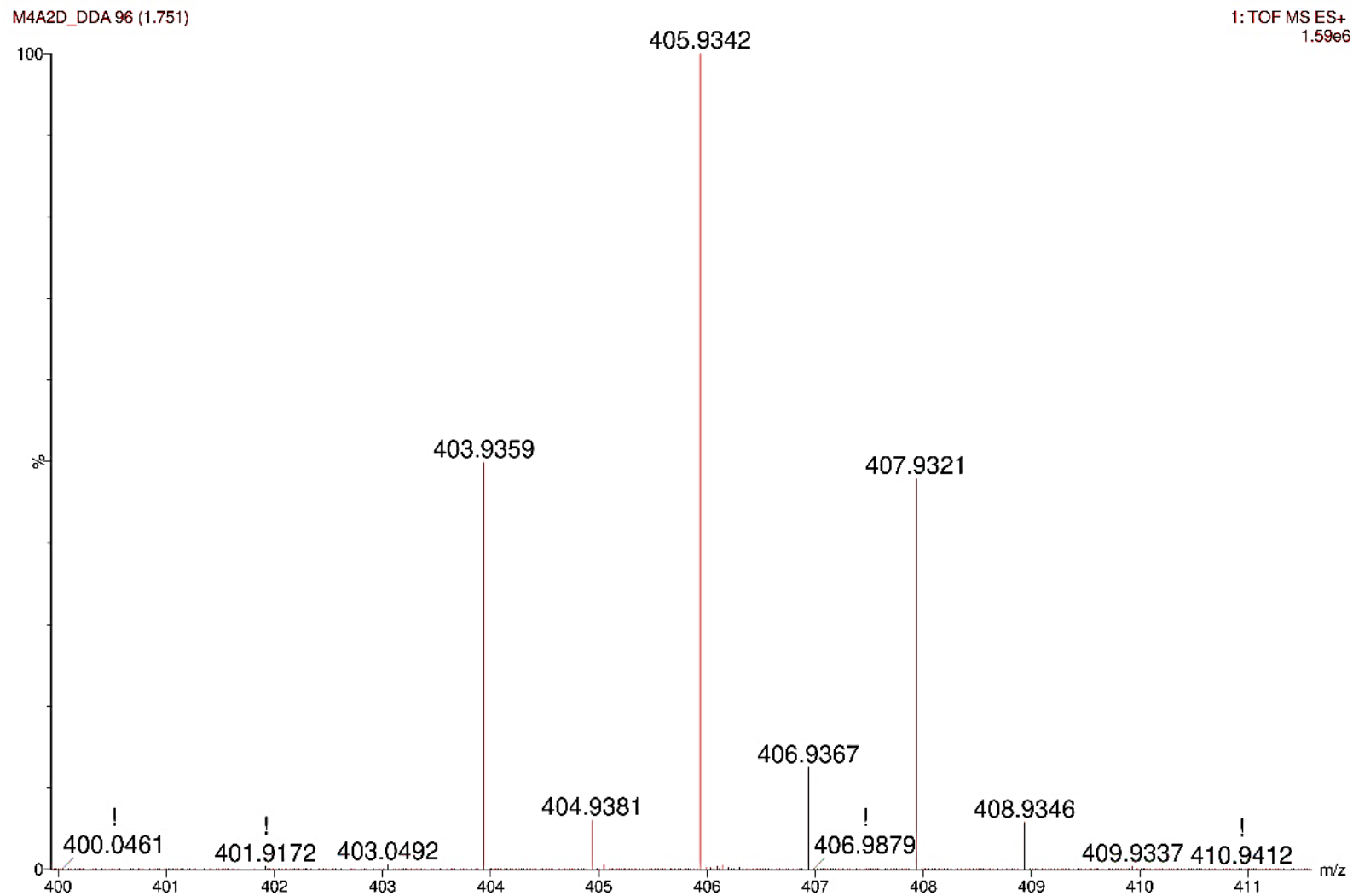


Figura A 71. Espectros MS/MS da monobromodispacamida, dispacamida e oroidina.

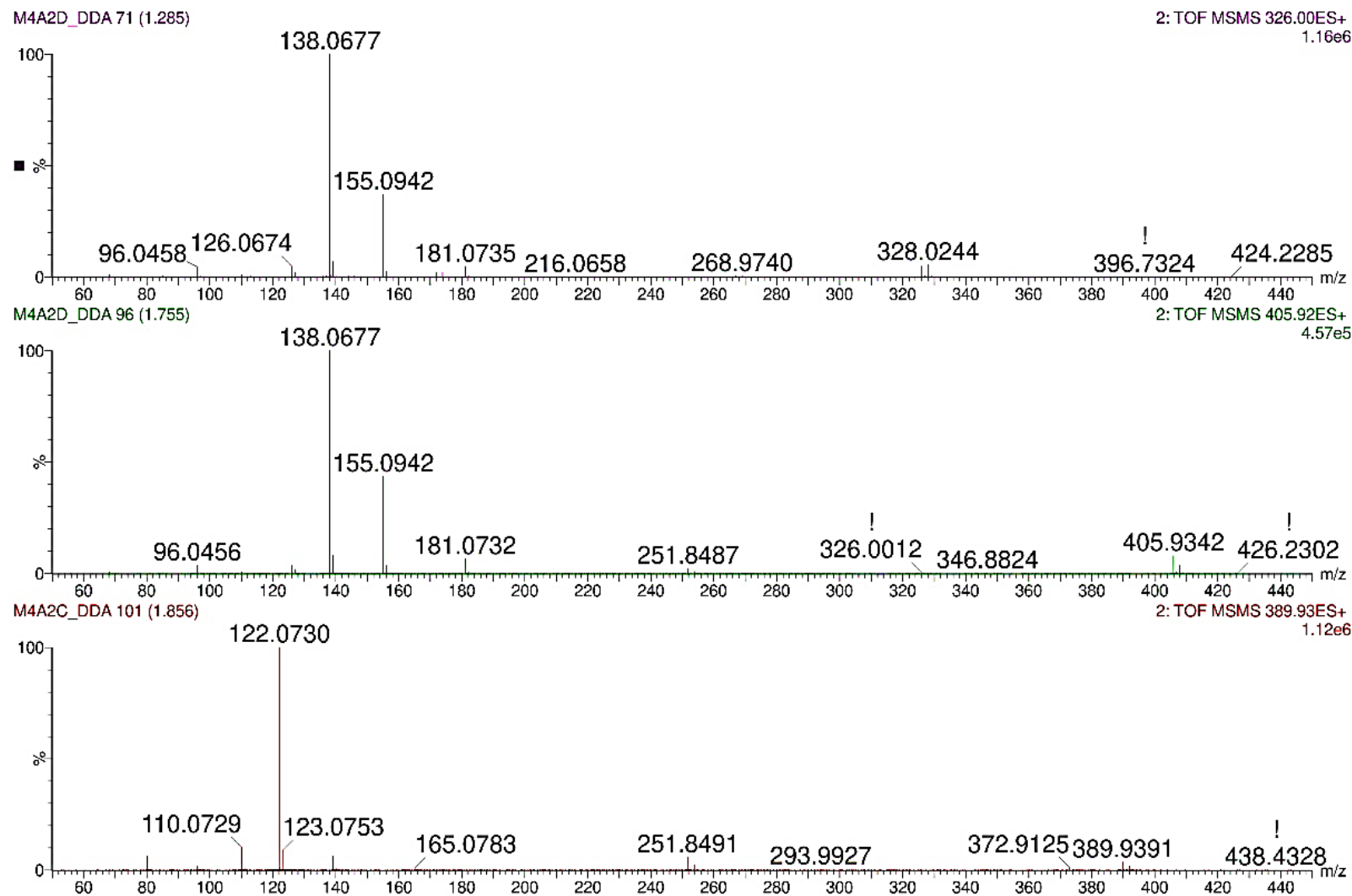


Figura A 72. Espectro de fragmentação *in-silico* da dispacamida.

Dispacamide CFM-ID.mzXML#1 @0.00 MS2 (403.9352) c +, base peak: 138.0662 m/z (4.9 E1)

Scan definition: Full

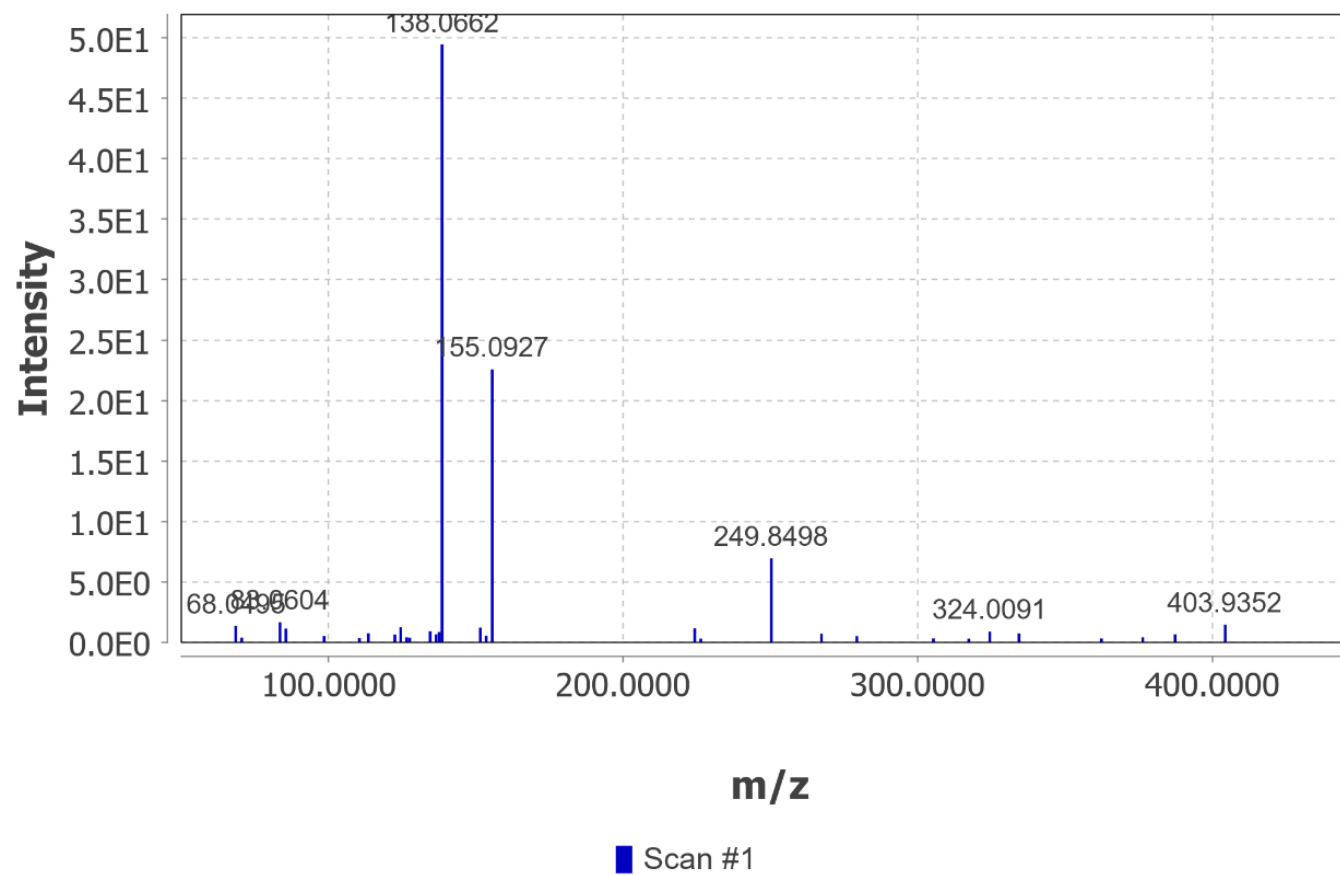


Figura A 73. Espectro MS da keramadina.

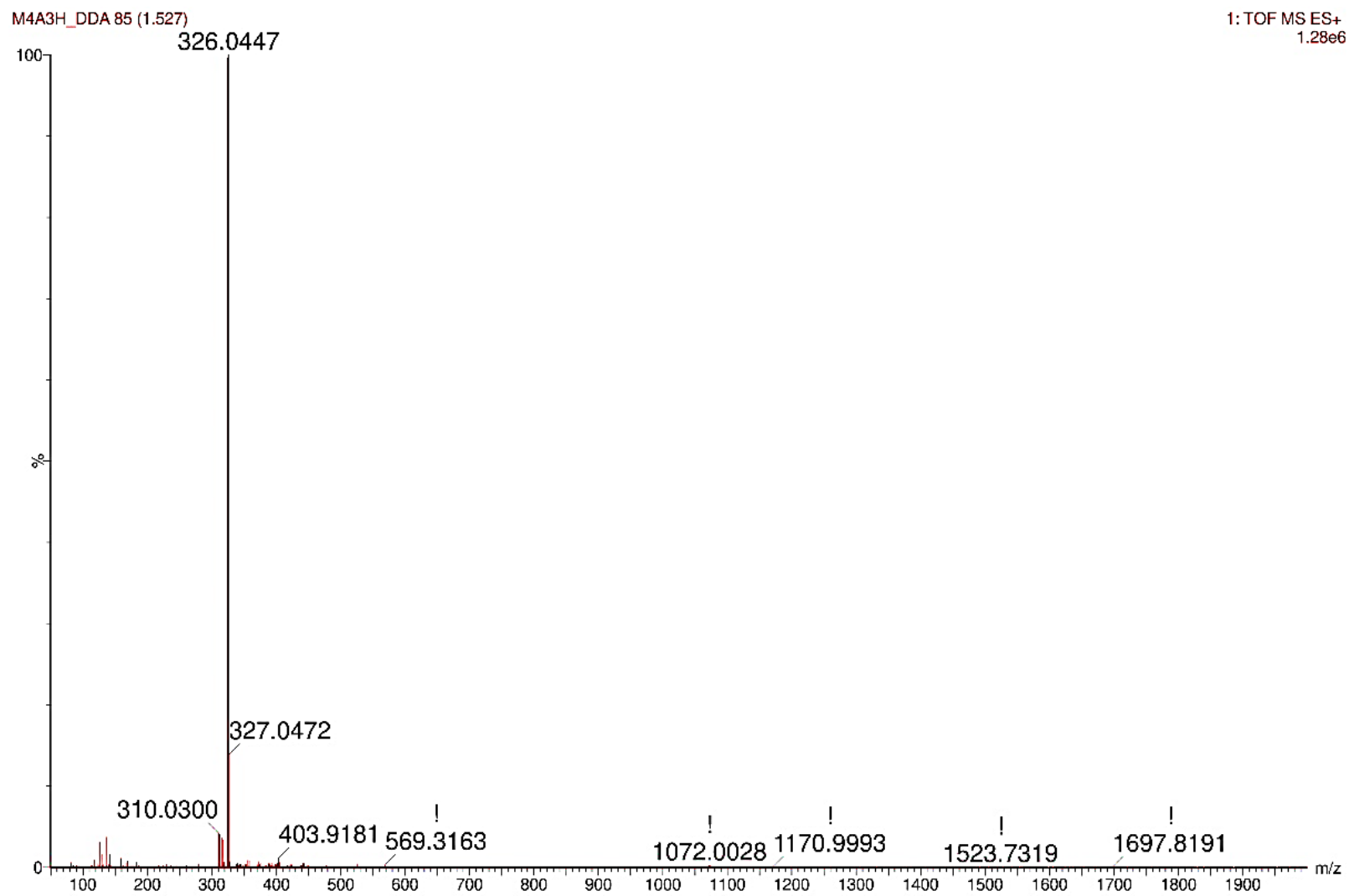


Figura A 74. Expansão do espectro MS da keramadina.

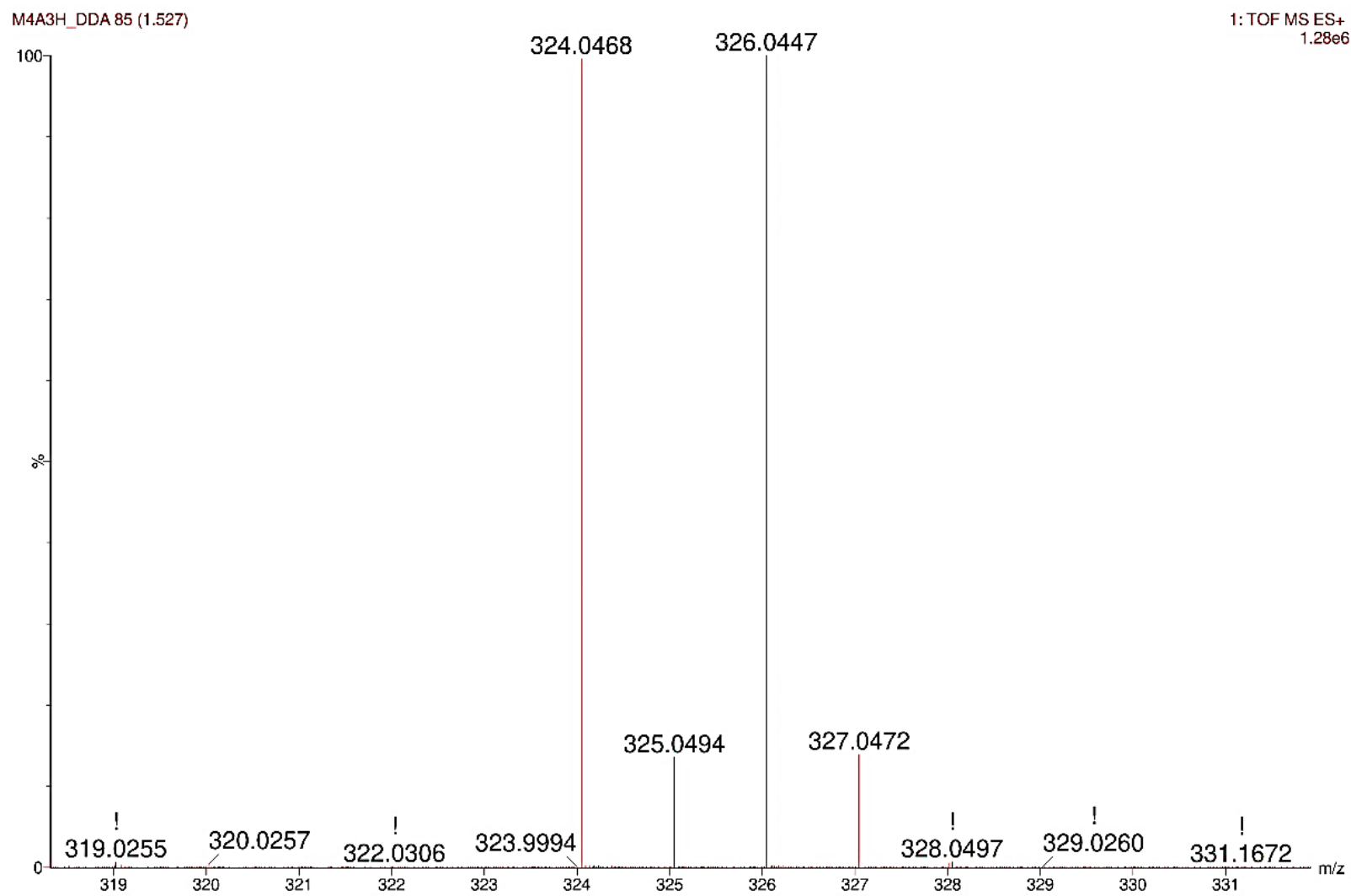


Figura A 75. Espectros MS/MS da himenidina (4) e da keramadina.

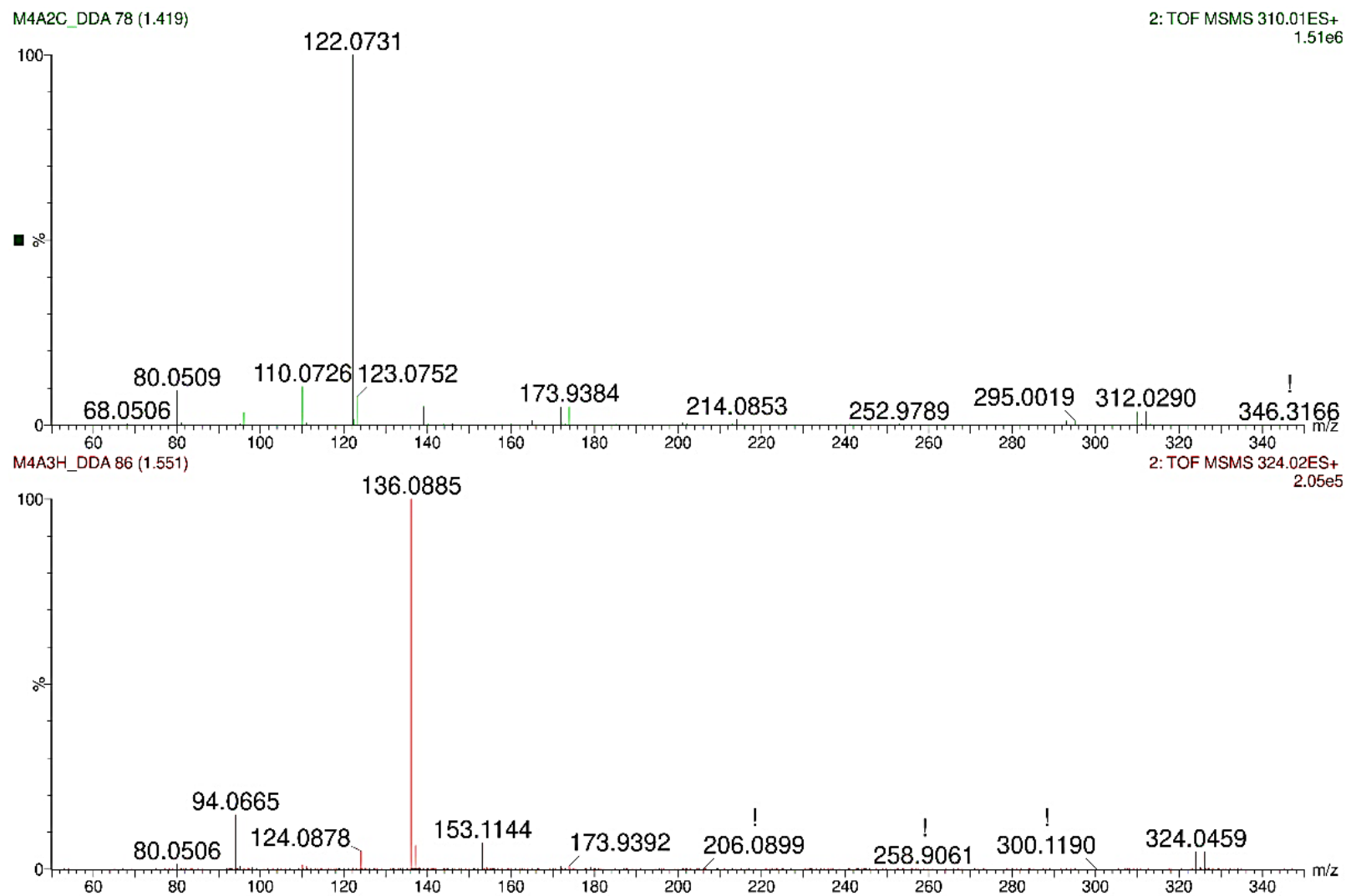


Figura A 76. Espectro de fragmentação *in-silico* para o composto keramadina

Keramadina CFM-ID.mzXML#1 @0.00 MS2 (324.0454) c +, base peak: 136.0869 m/z (2.7E1)

Scan definition: Full

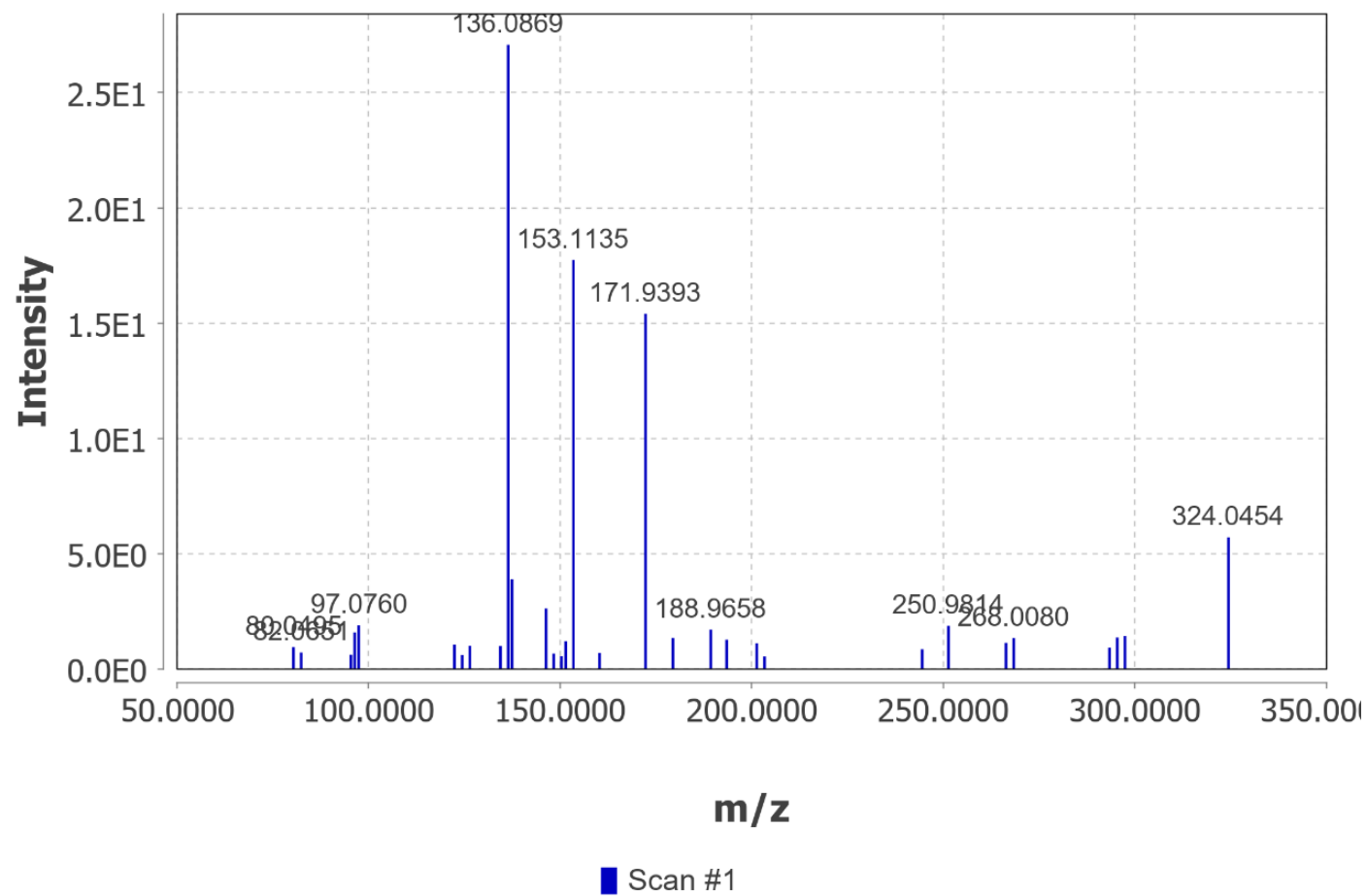


Figura A 77. Espectro MS da longamida B.

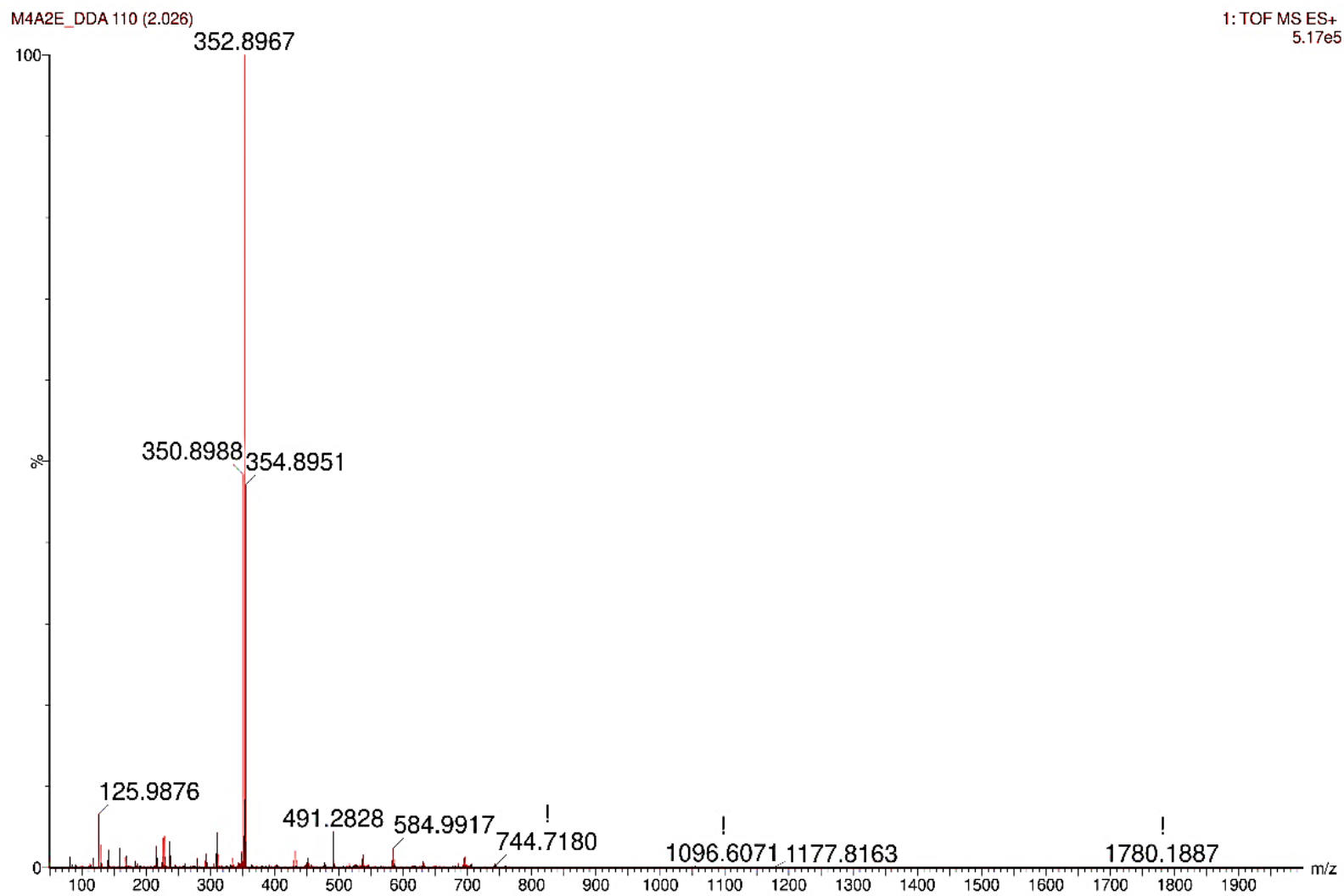


Figura A 78. Expansão do espectro MS da longamida B.

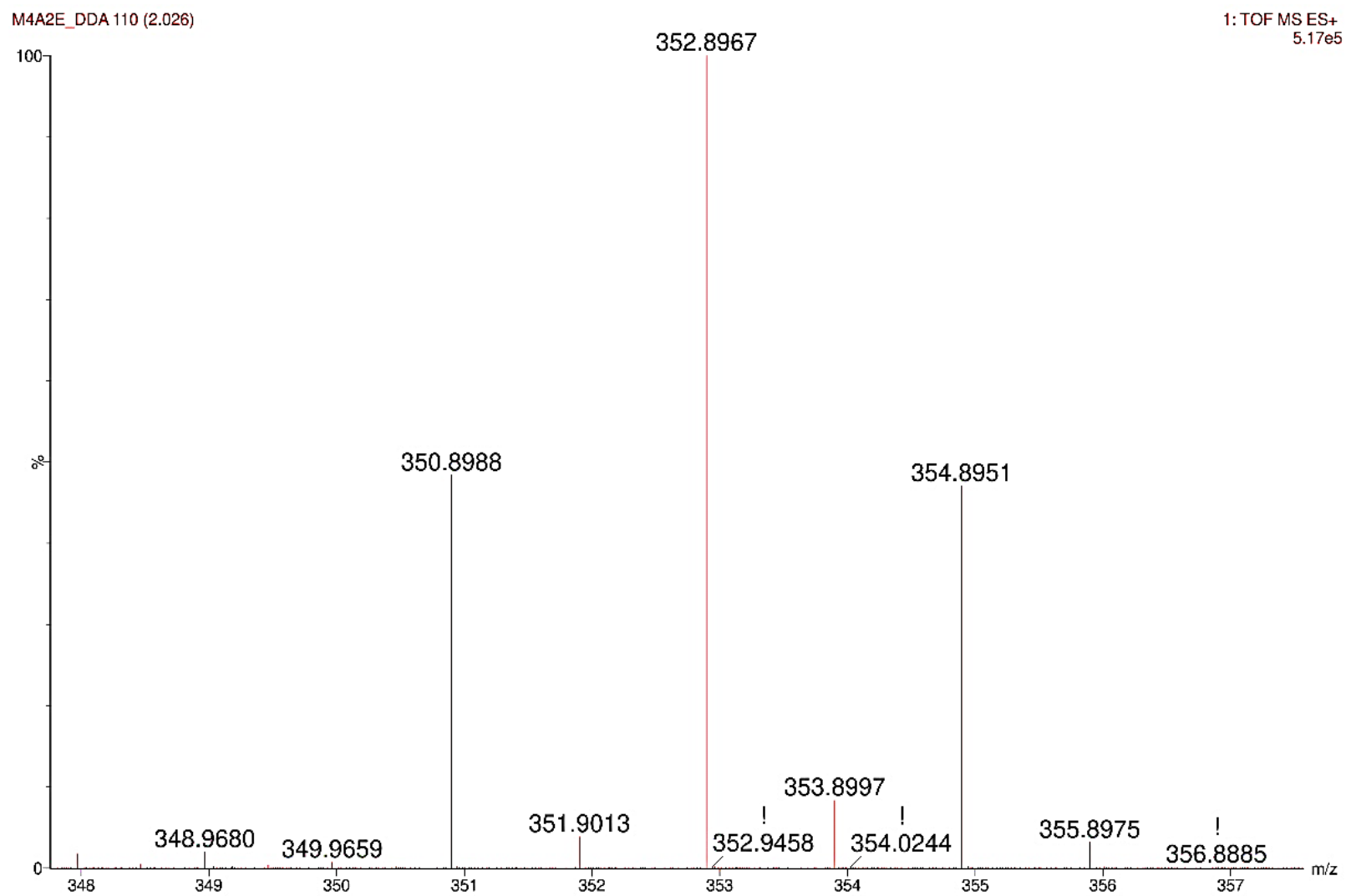


Figura A 79. Espectro MS/MS da longamida B.

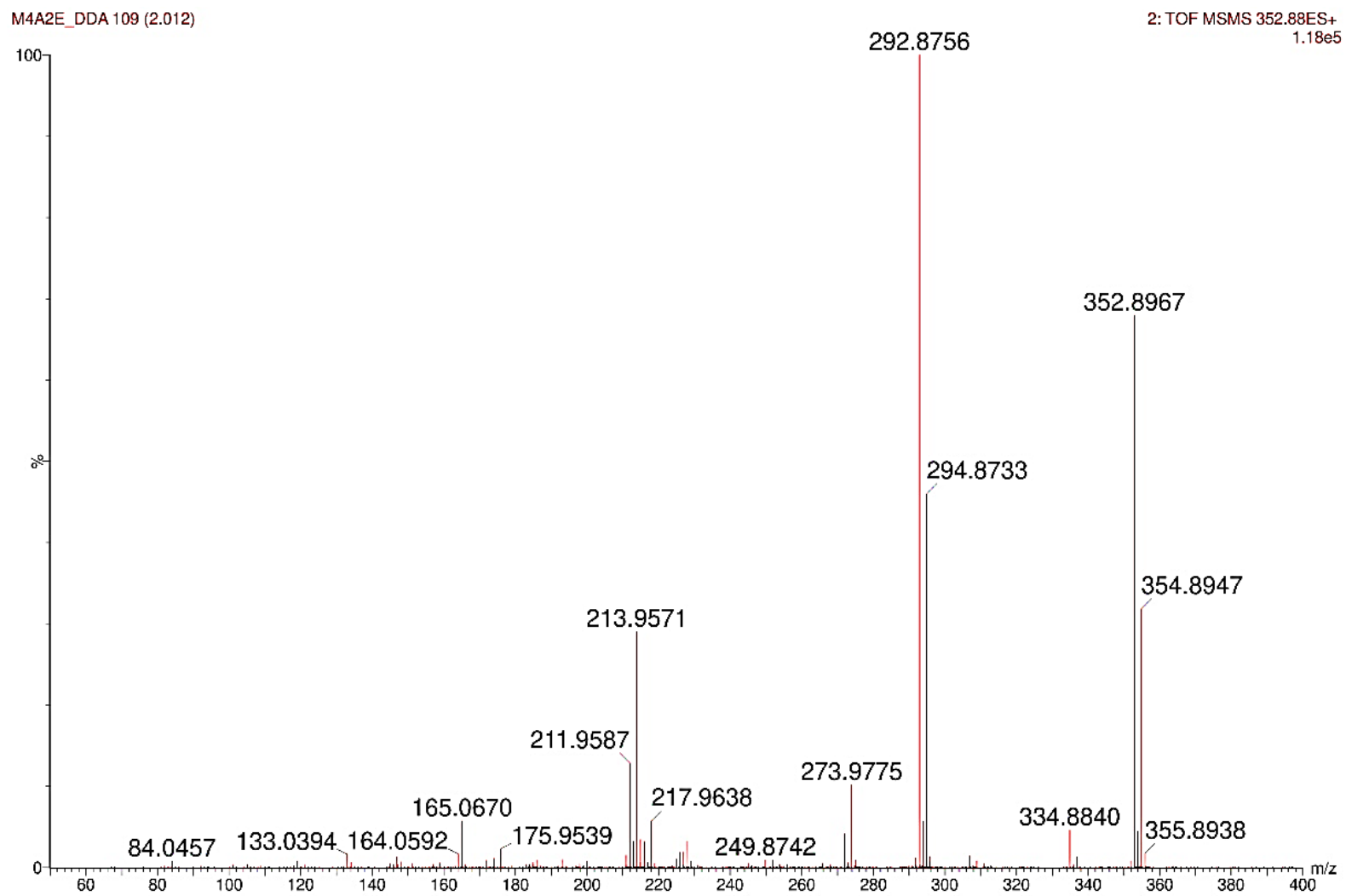


Figura A 80. Espectro de fragmentação *in-silico* para o composto longamida B.

Longamide B CFM-ID.mzXML#1 @0.00 MS2 (350.8975) c +, base peak: 332.8869 m/z (2.3 E1)

Scan definition: Full

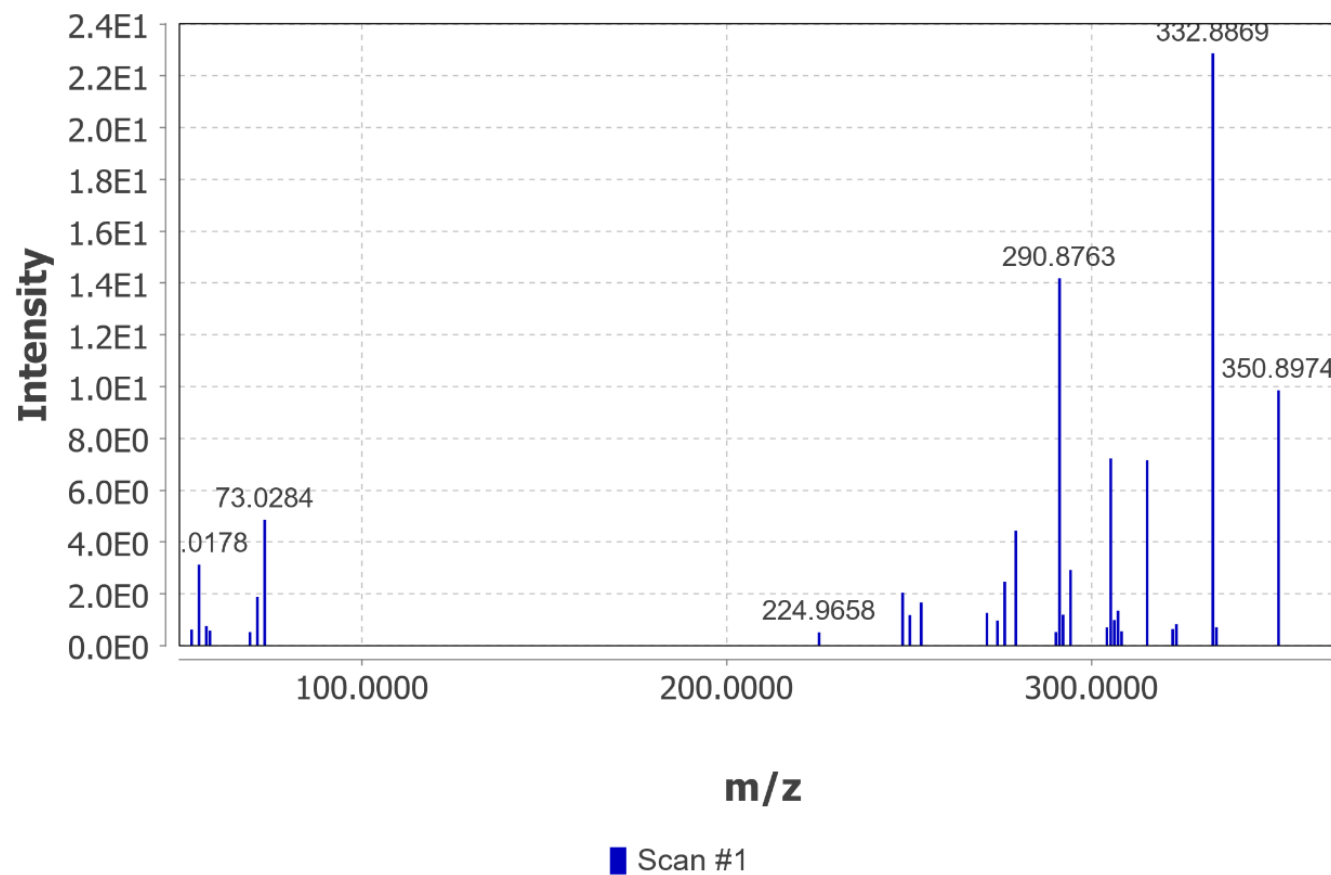


Figura A 81. Espectro MS do éster metílico da longamida B.

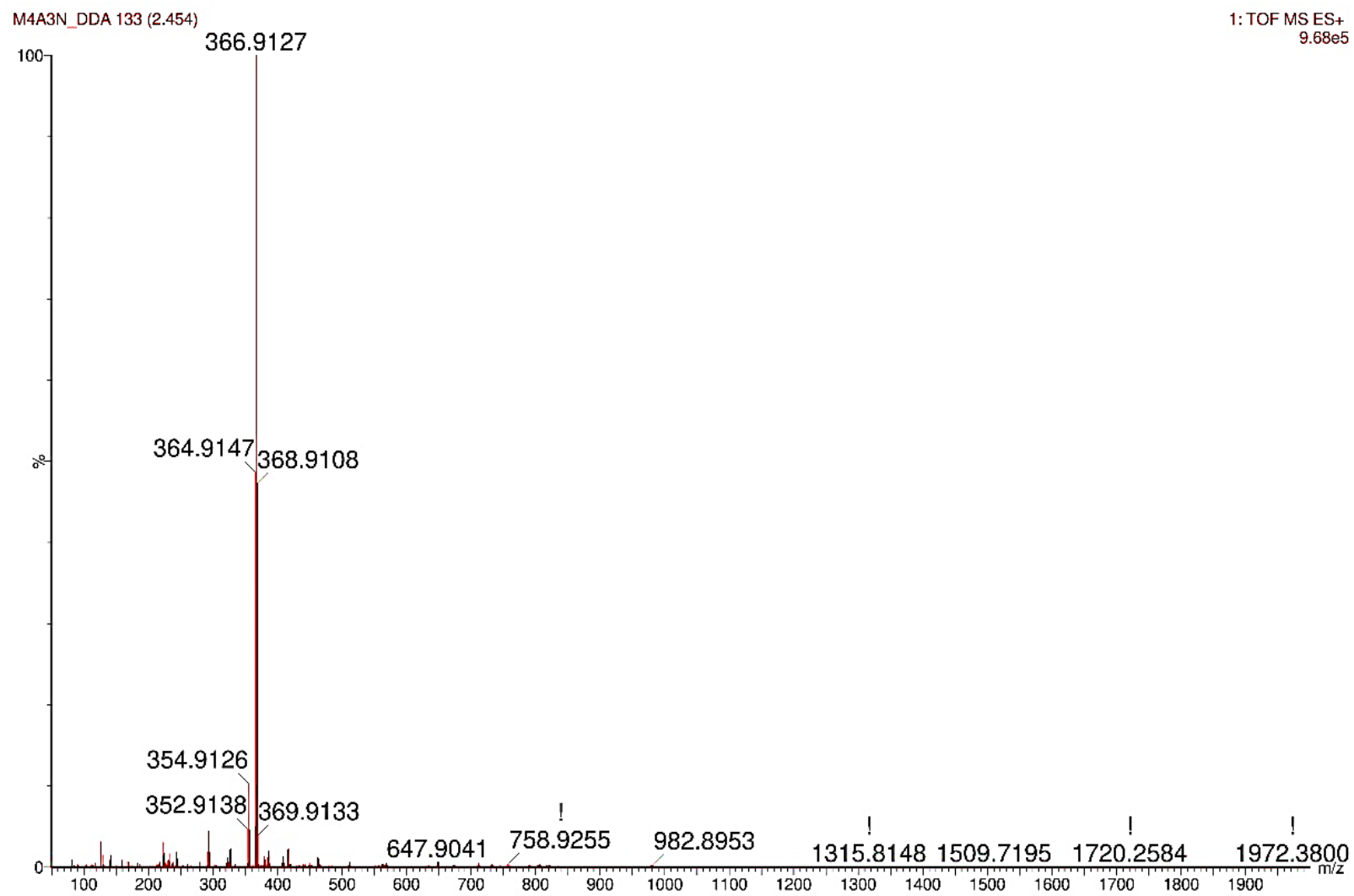


Figura A 82. Expansão do espectro MS do éster metílico da longamida B.

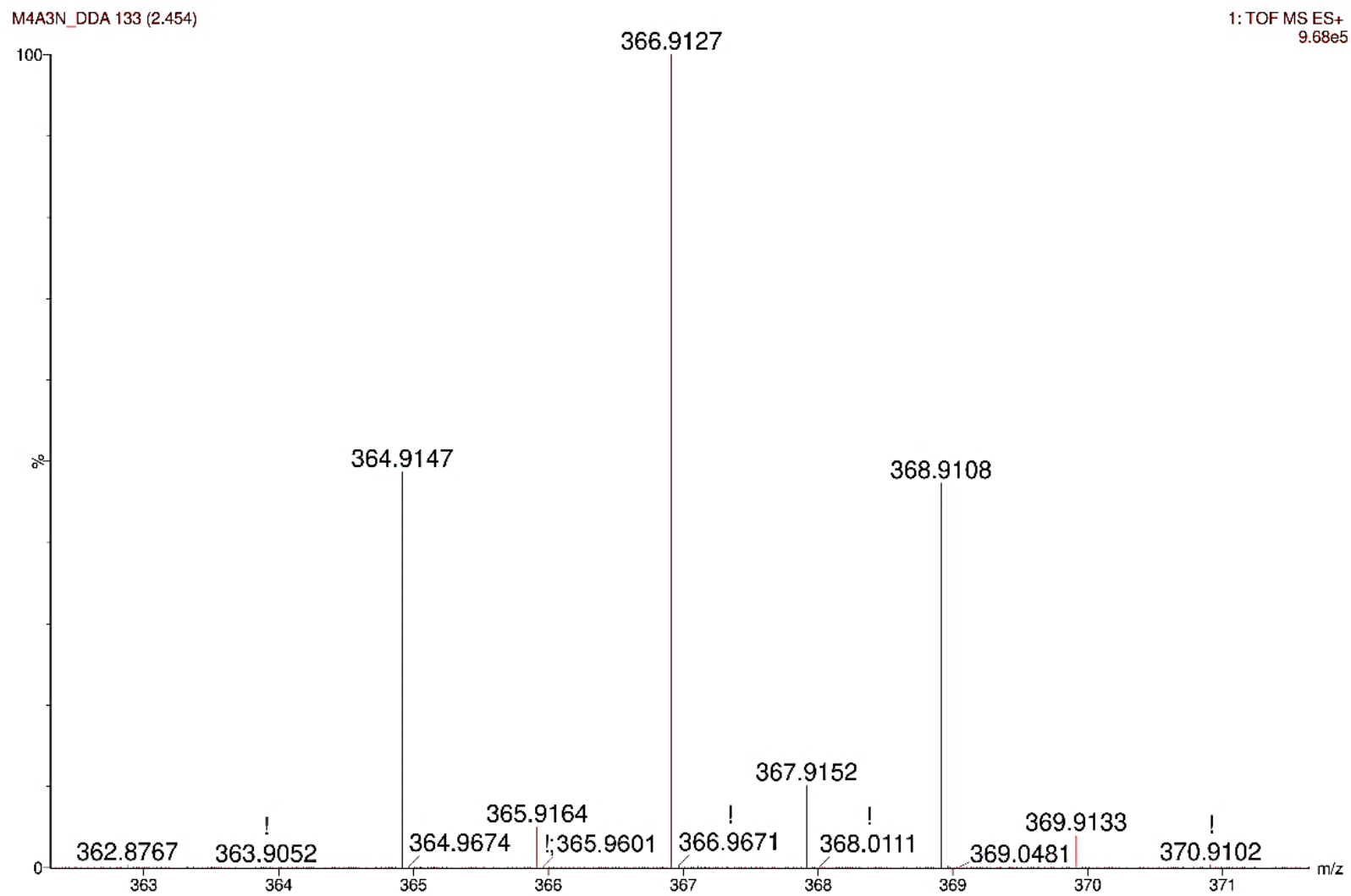


Figura A 83. Espectro MS/MS do éster metílico da longamida B.

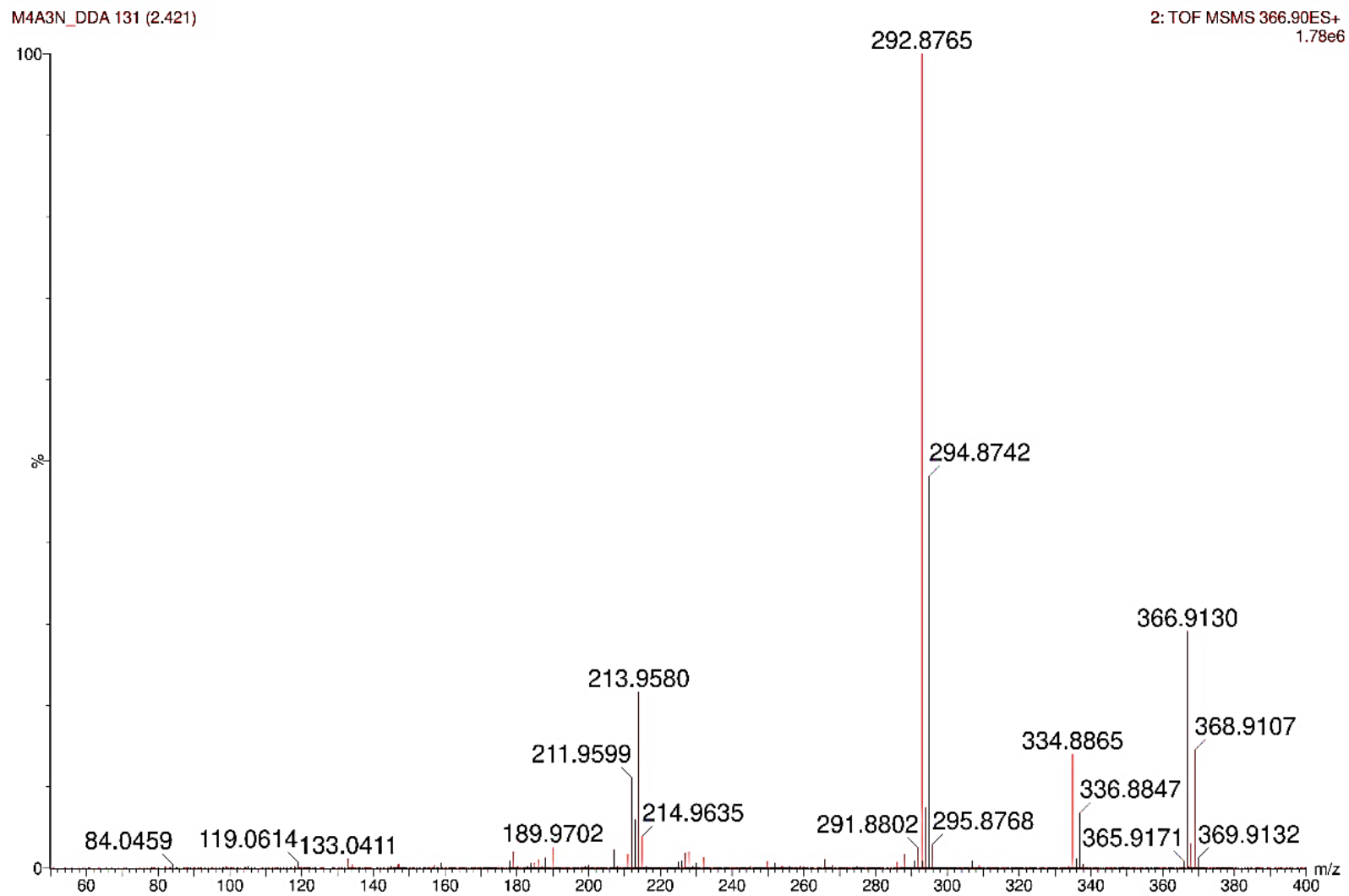


Figura A 84. Espectro de fragmentação *in-silico* para o composto éster metílico da longamida B.

**Éster-metílico da longamida B CFM-ID.mzXML#1 @0.00 MS2 (364.9131) c +, base peak:
290.8763 m/z (1.7E1)**

Scan definition: Full

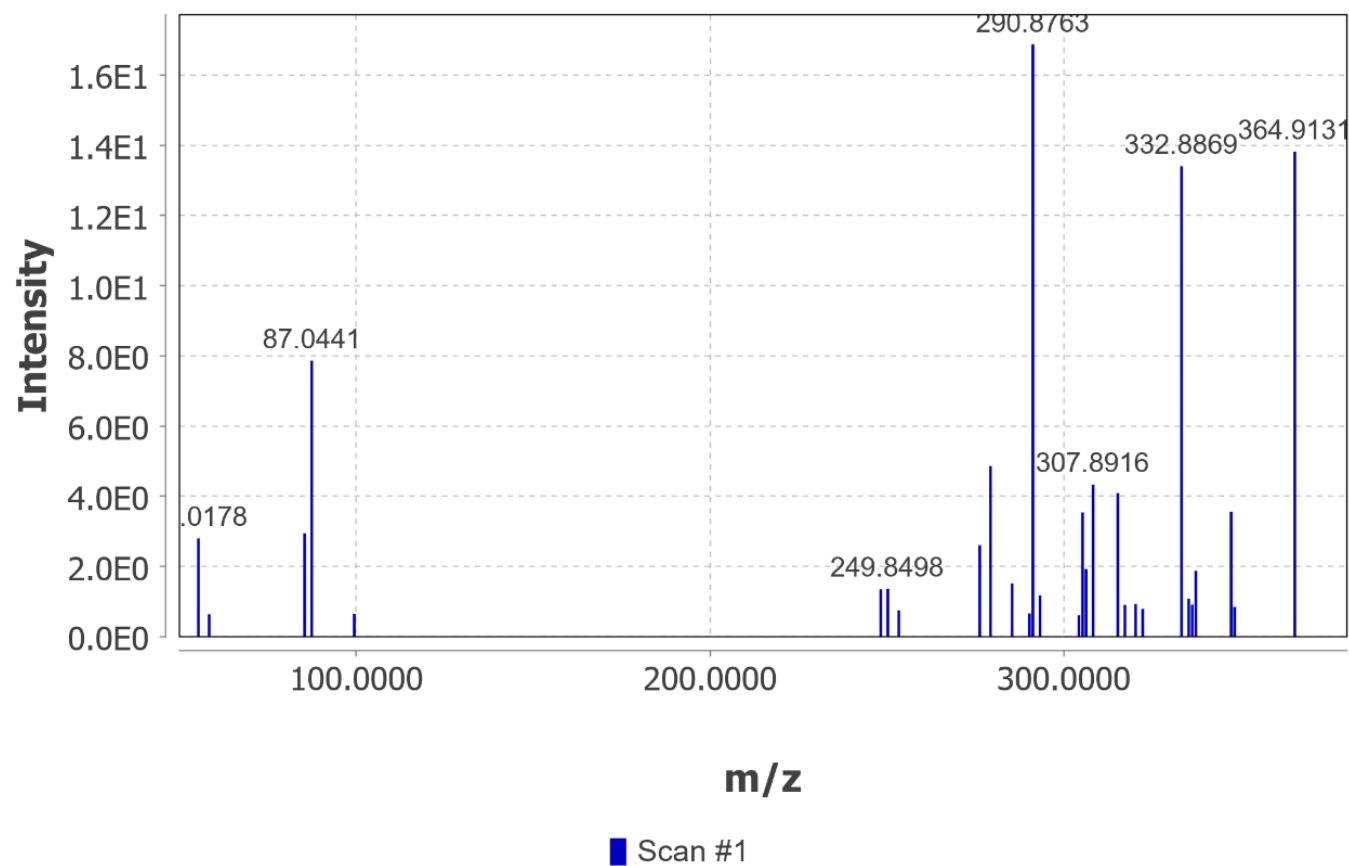


Figura A 85. Espectro MS do hanishin.

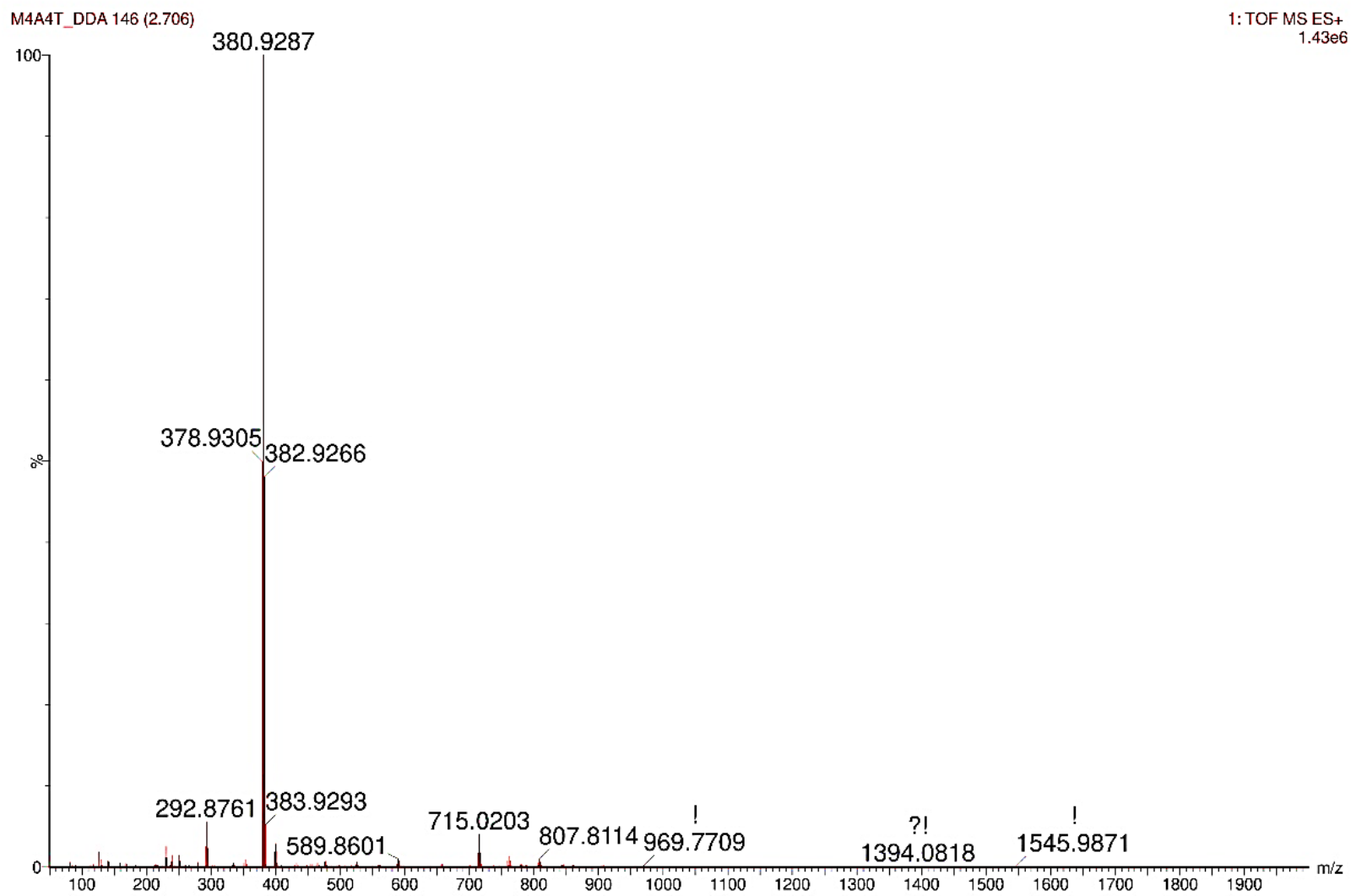


Figura A 86. Expansão do espectro MS do hanishin.

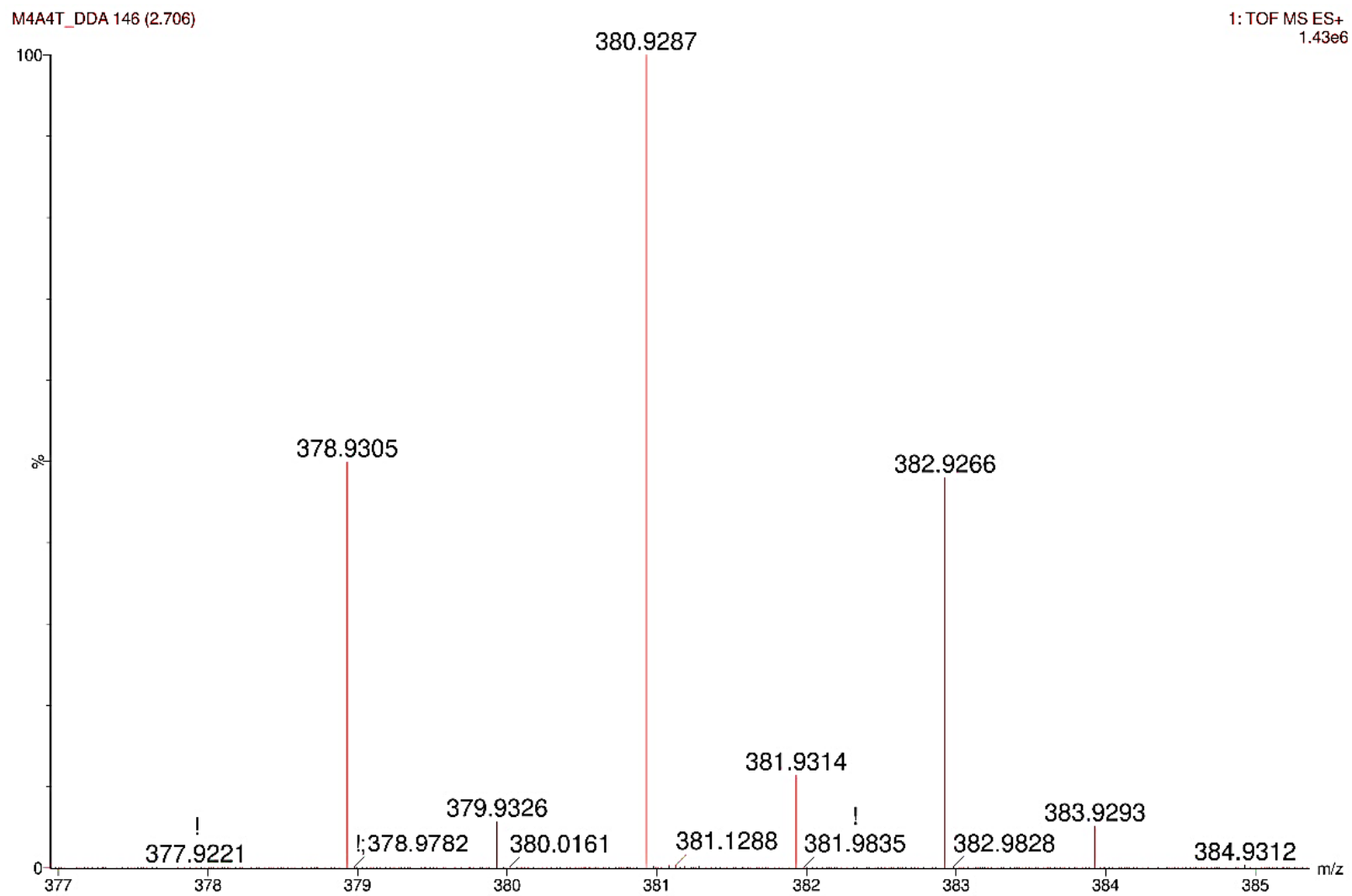


Figura A 87. Espectro MS/MS do hanishin.

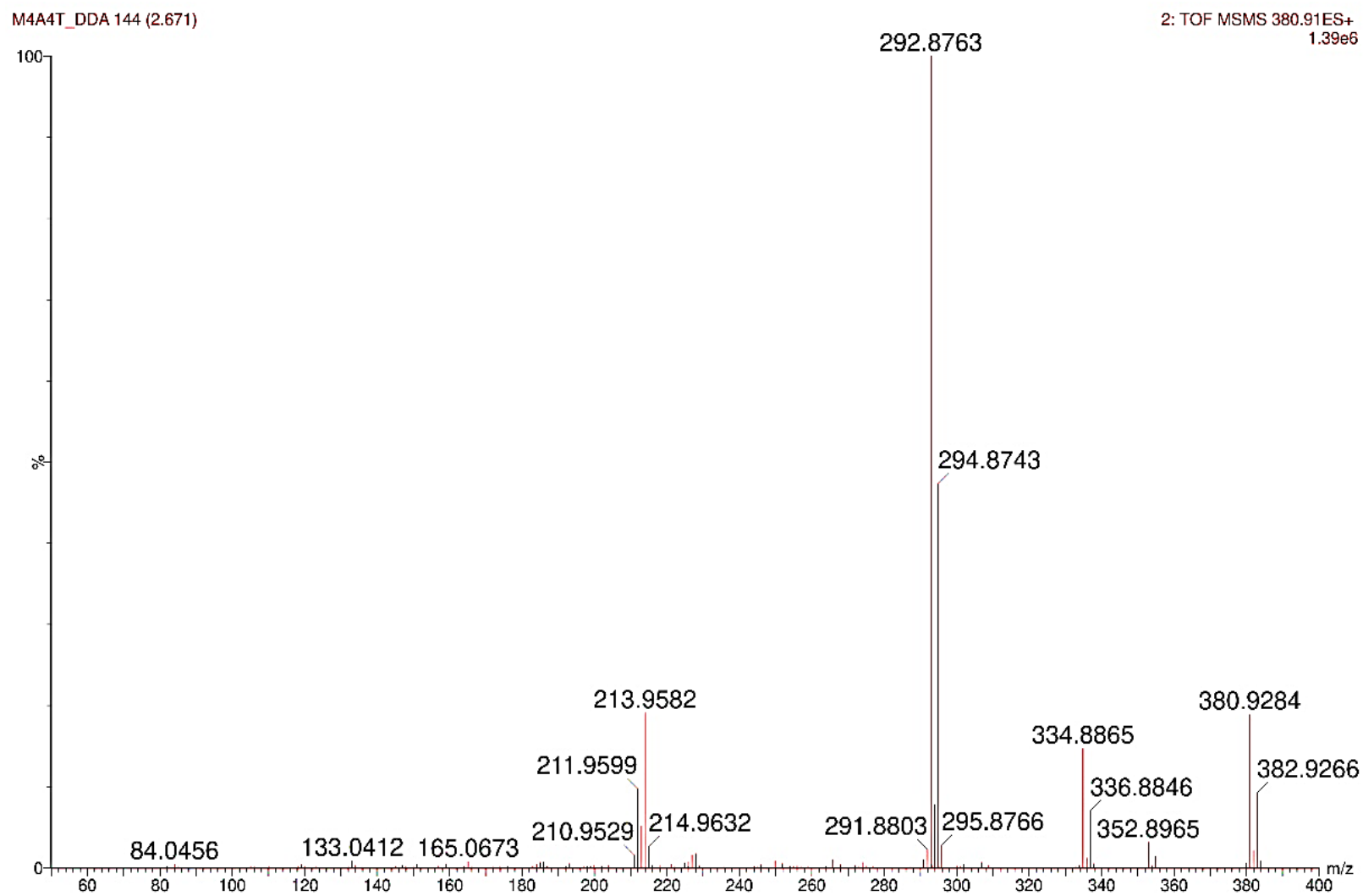


Figura A 88. Espectro de fragmentação *in-silico* para o composto hanishin.**Hanishin CFM-ID.mzXML#1 @0.00 MS2 (378.9288) c +, base peak: 332.8869 m/z (1.8E1)**

Scan definition: Full

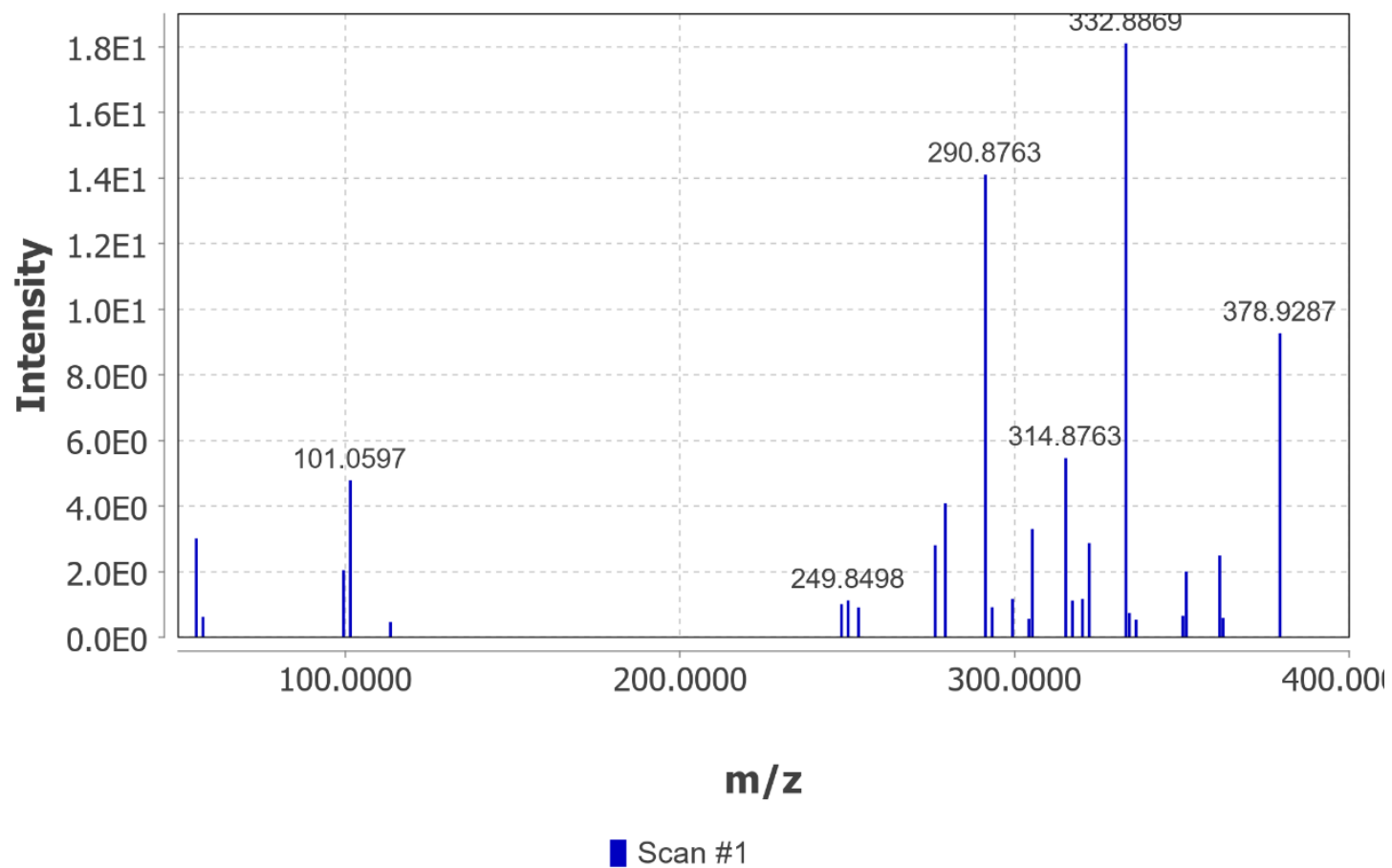


Figura A 89. Espectro MS do éster metílico da 3-debromolongamida B.

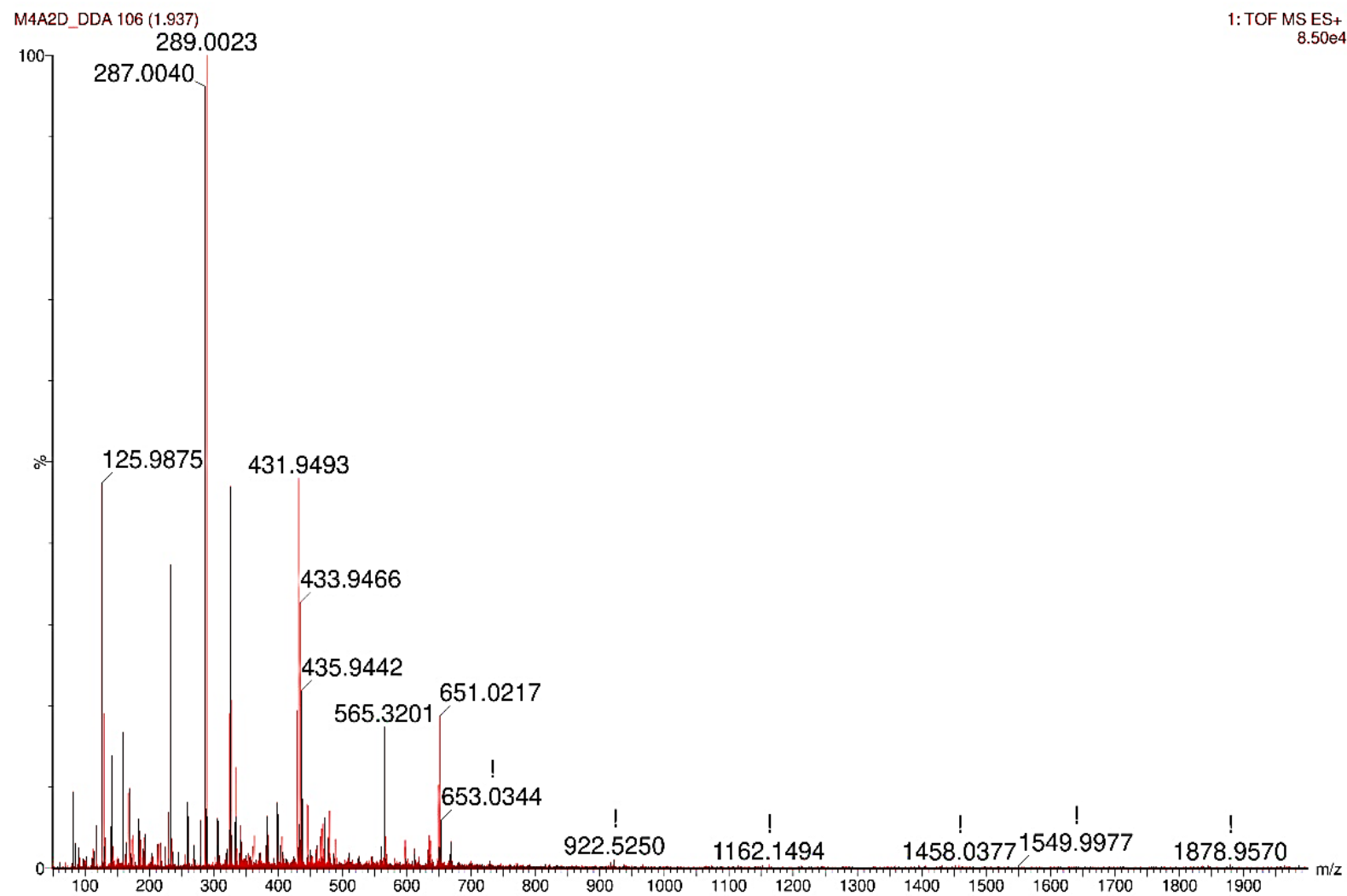


Figura A 90. Expansão do espectro MS do éster metílico da 3-debromolongamida B.

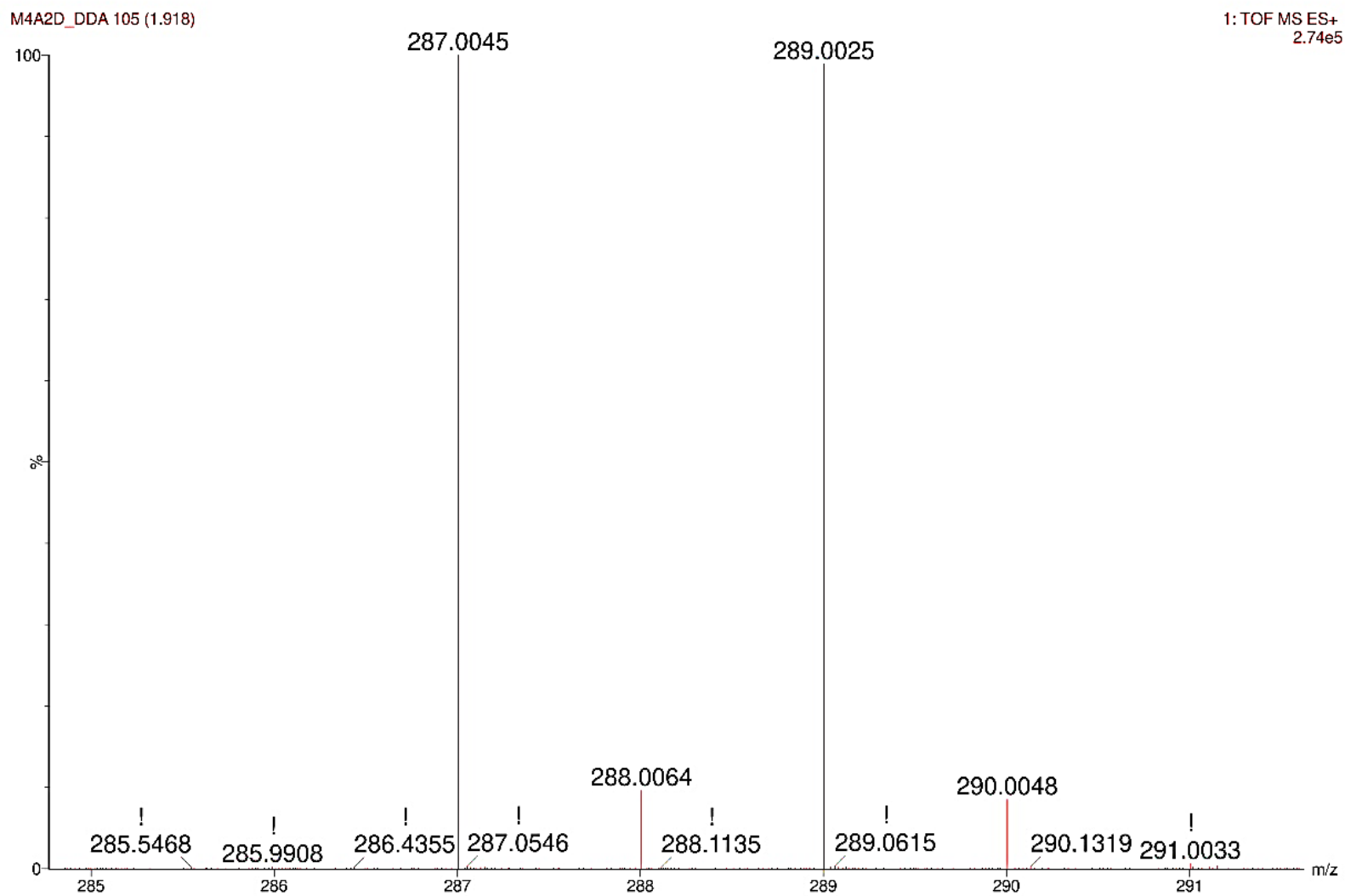


Figura A 91. Espectro MS/MS do éster metílico da 3-debromolongamida B

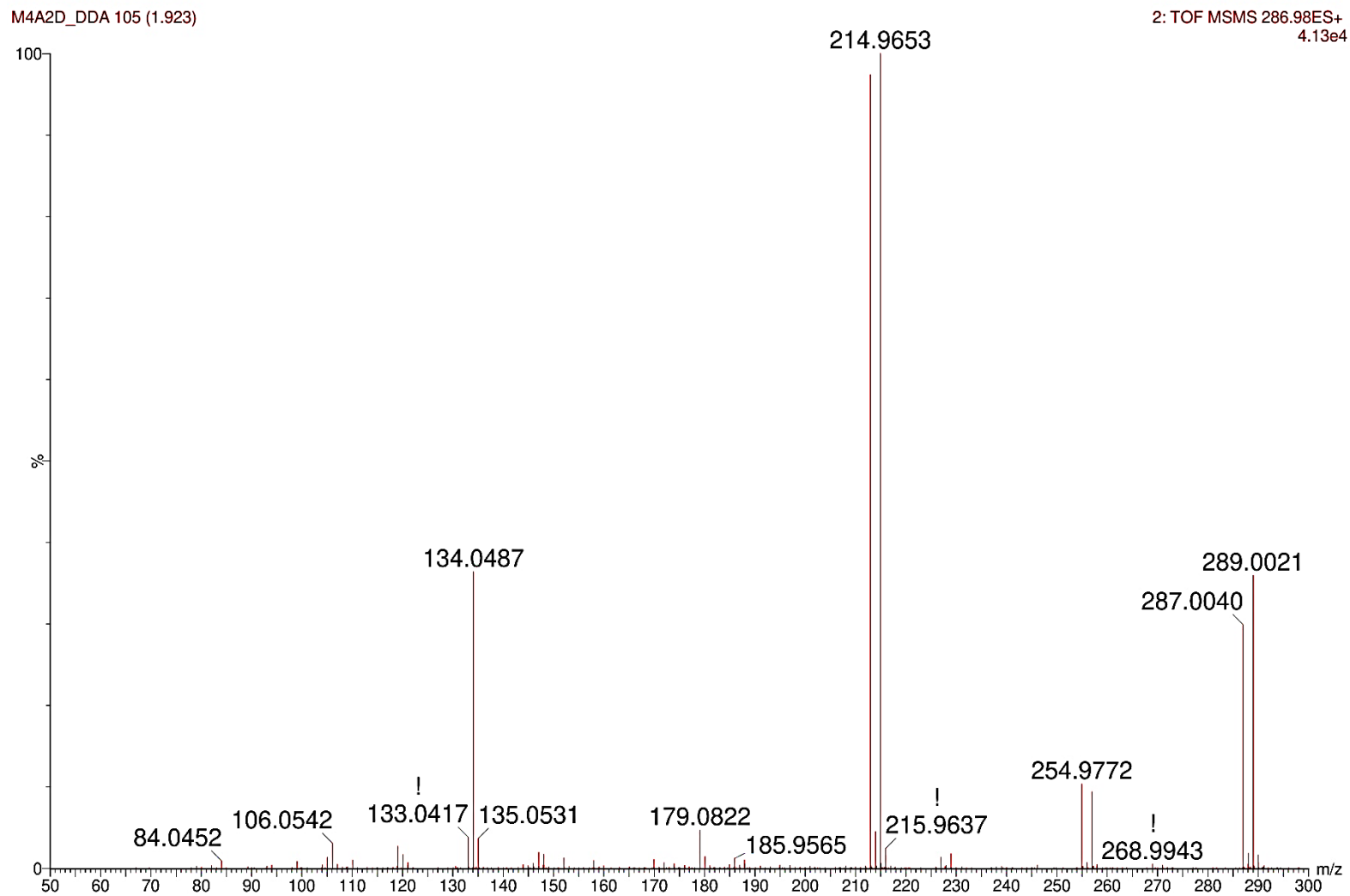


Figura A 92. Espectro de fragmentação *in-silico* do éster metílico da 3-debromolongamida B.

**Éster metílico da 3-debromolongamida B CFM-ID.mzXML#1 @0.00 MS2 (287.0026) c +,
base peak: 212.9658 m/z (1.7E1)**

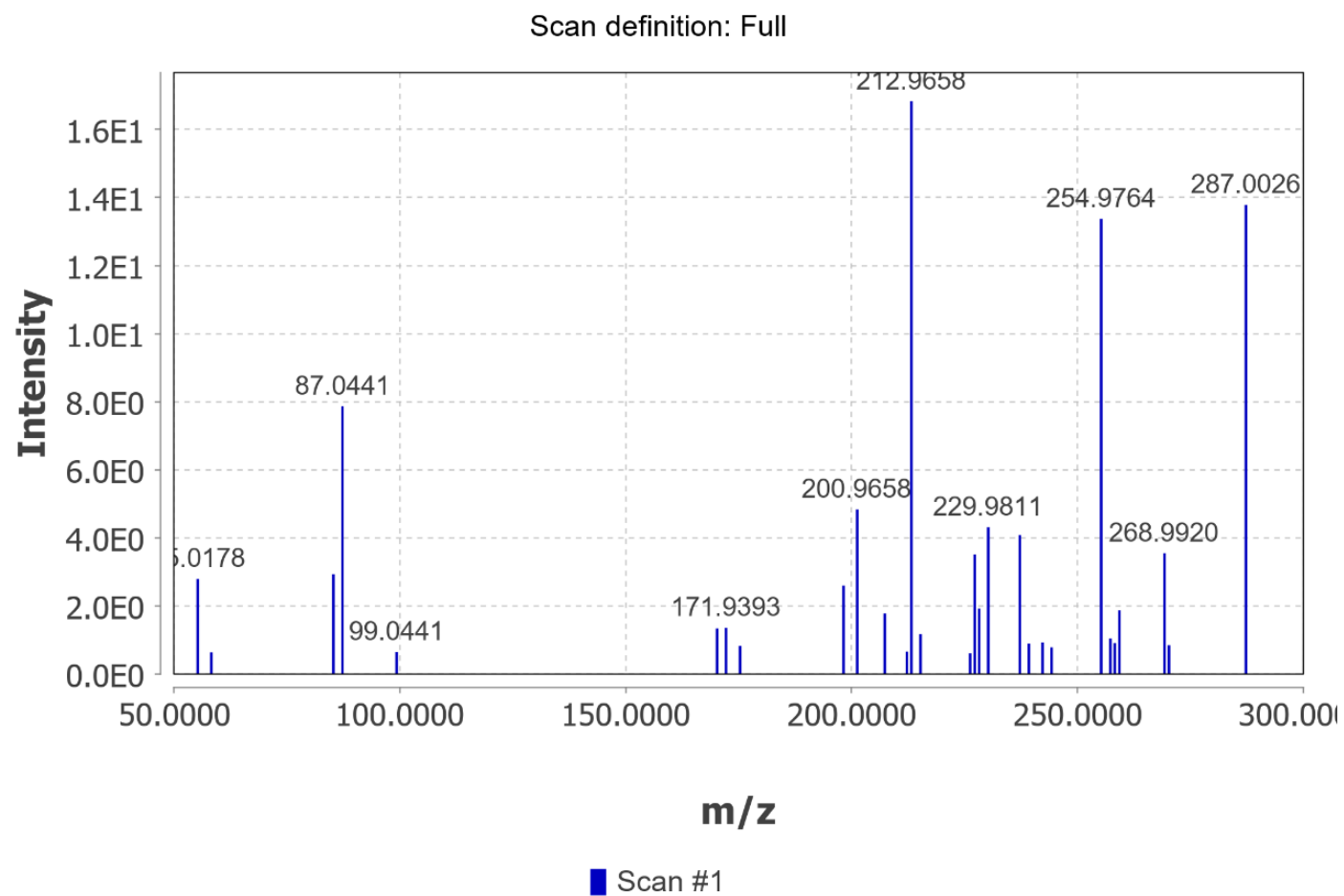


Figura A 93. Espectro MS da 3-debromohanishin.

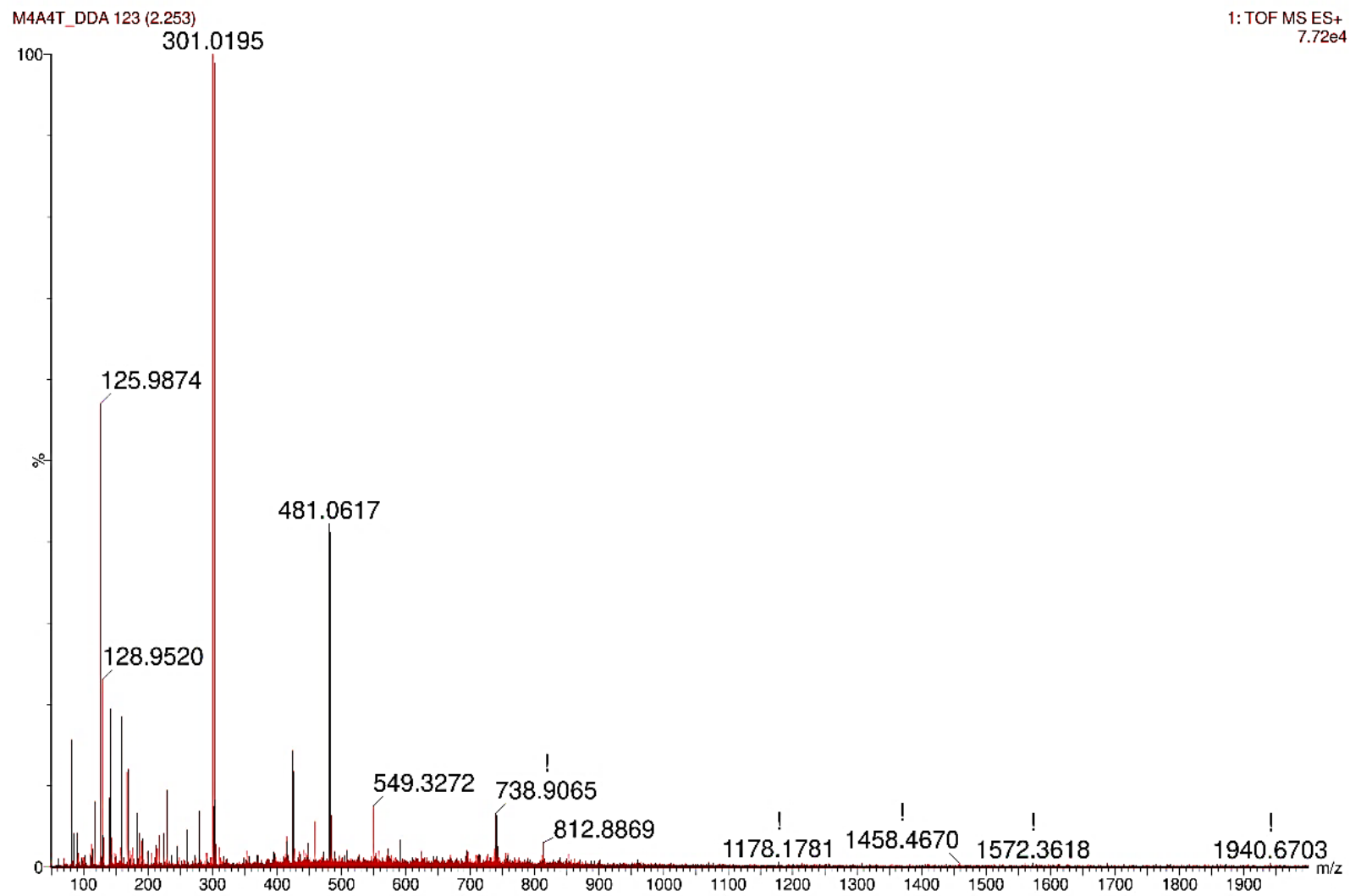


Figura A 94. Expansão do espectro MS da 3-debromohanishin.

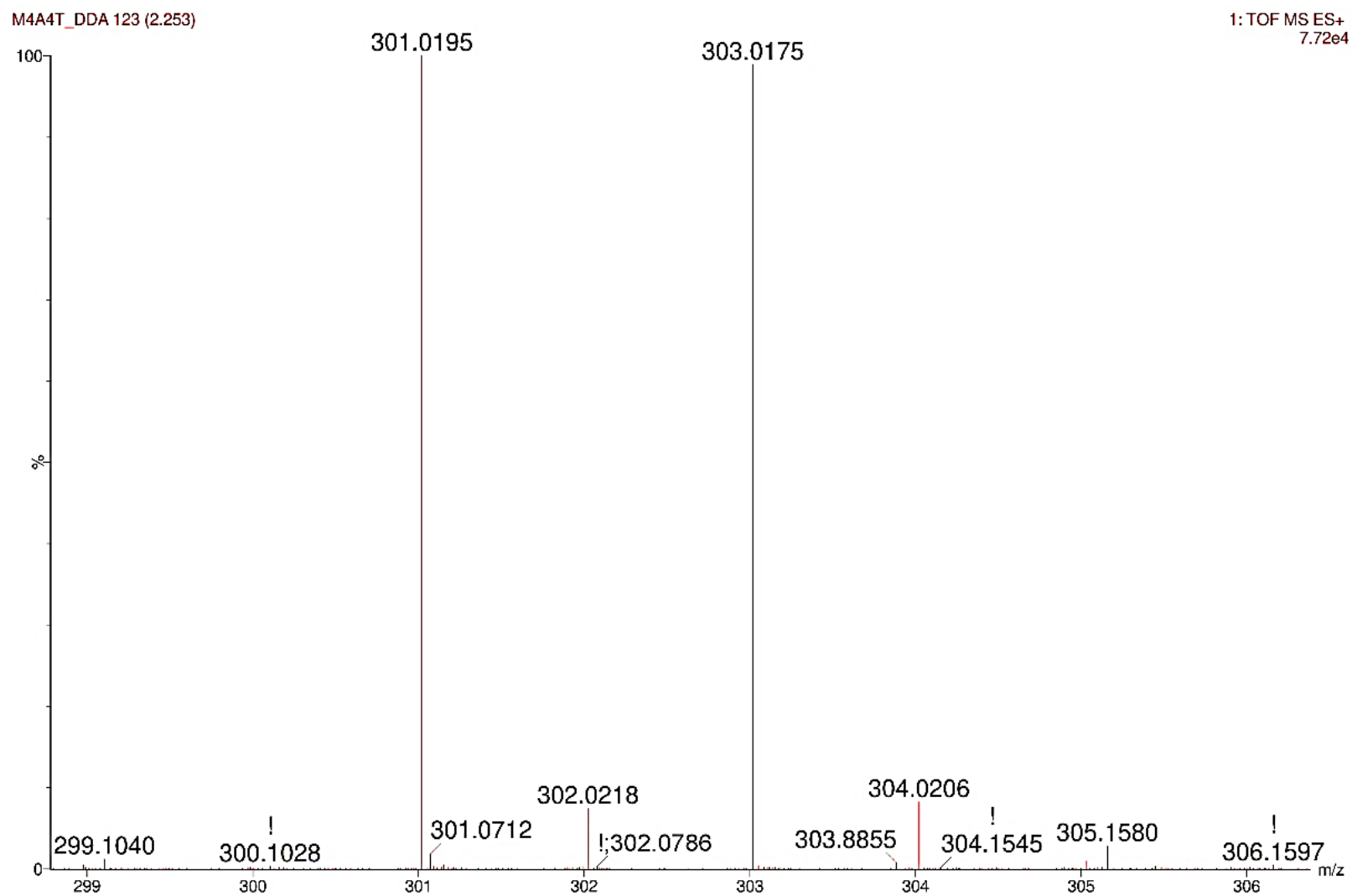


Figura A 95. Espectro MS/MS da 3-debromohanishin.

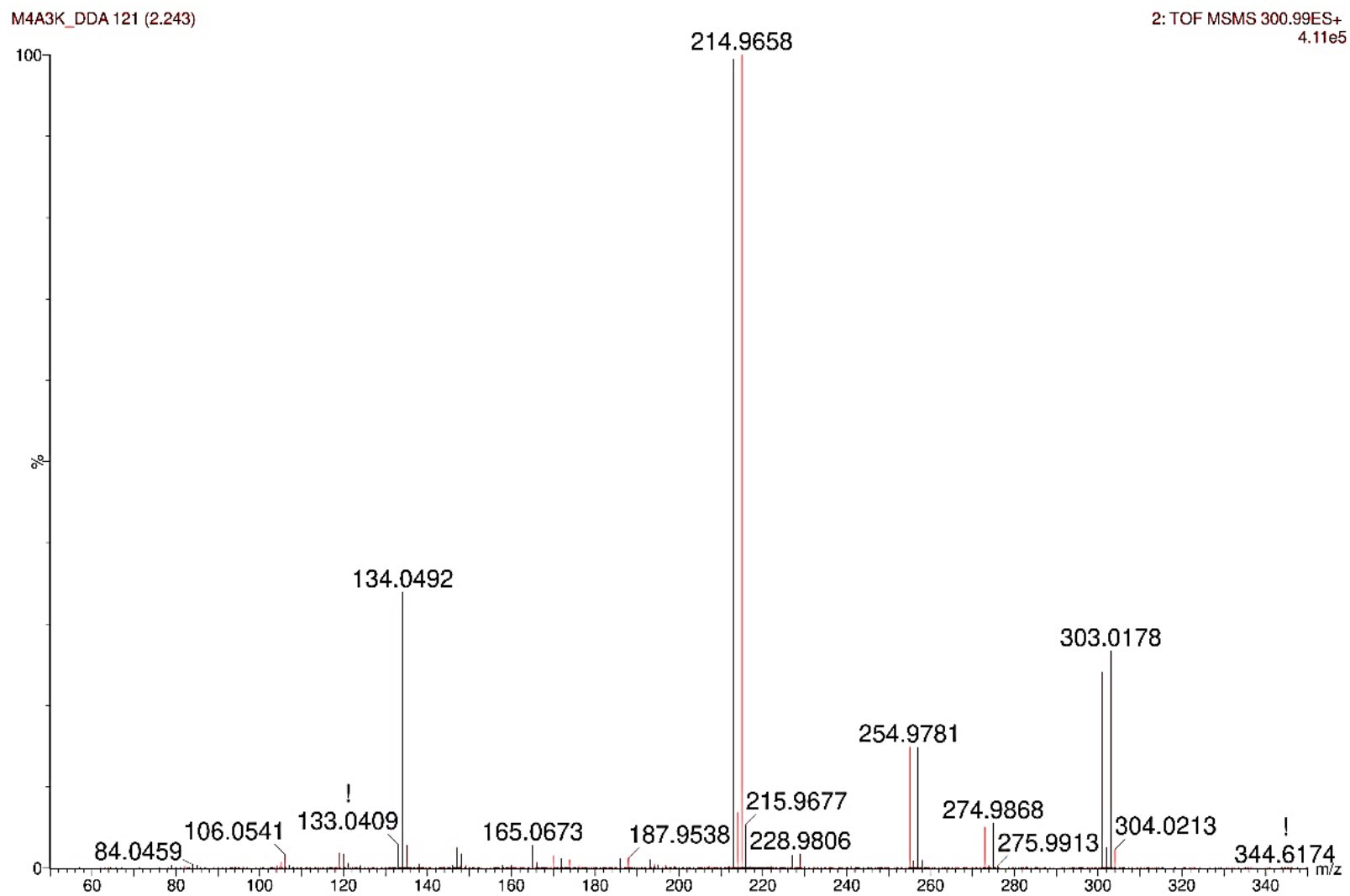


Figura A 96. Espectro de fragmentação *in-silico* para o 3-debromohanishin.

**3-debromohanishin CFM-ID.mzXML#1 @0.00 MS2 (301.0283) c +, base peak: 254.9764
m/z (1.8E1)**

Scan definition: Full

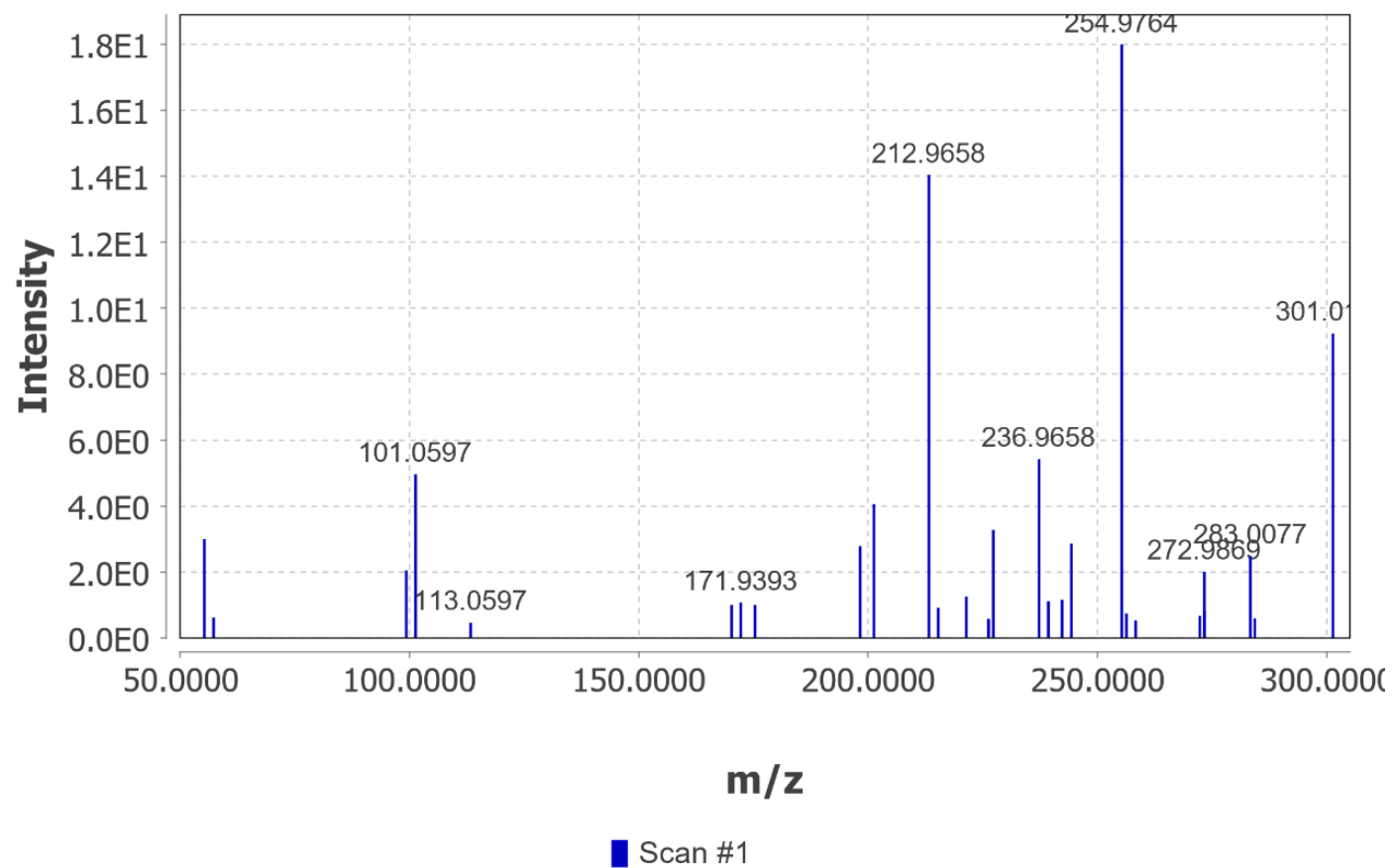


Figura A 97. Espectros MS dos compostos dibromoageliferina (8), bromoageliferina (9) e ageliferina (10).

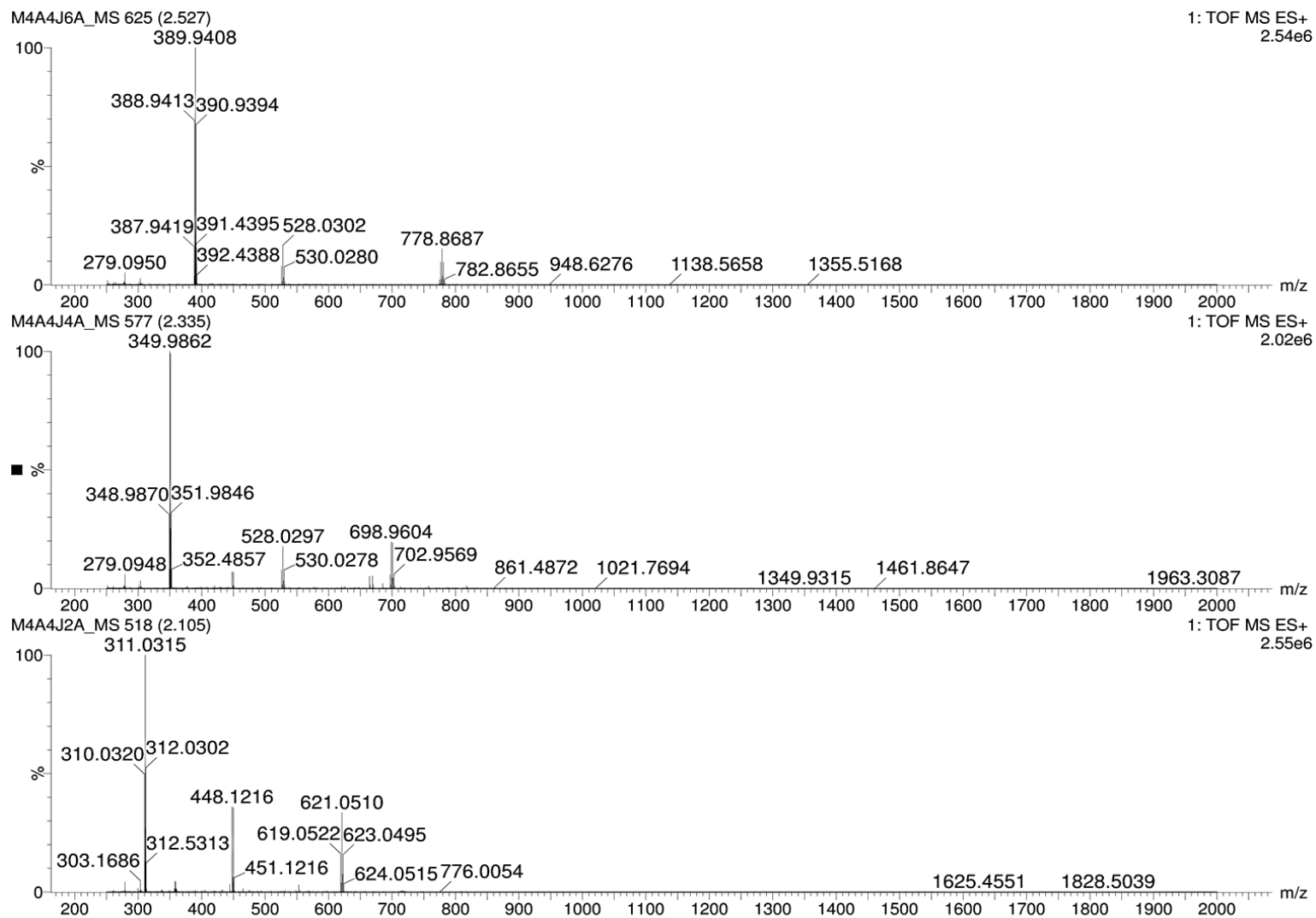


Figura A 98. Expansão dos espectros MS dos compostos dibromoageliferina (8), bromoageliferina (9) e ageliferina (10).

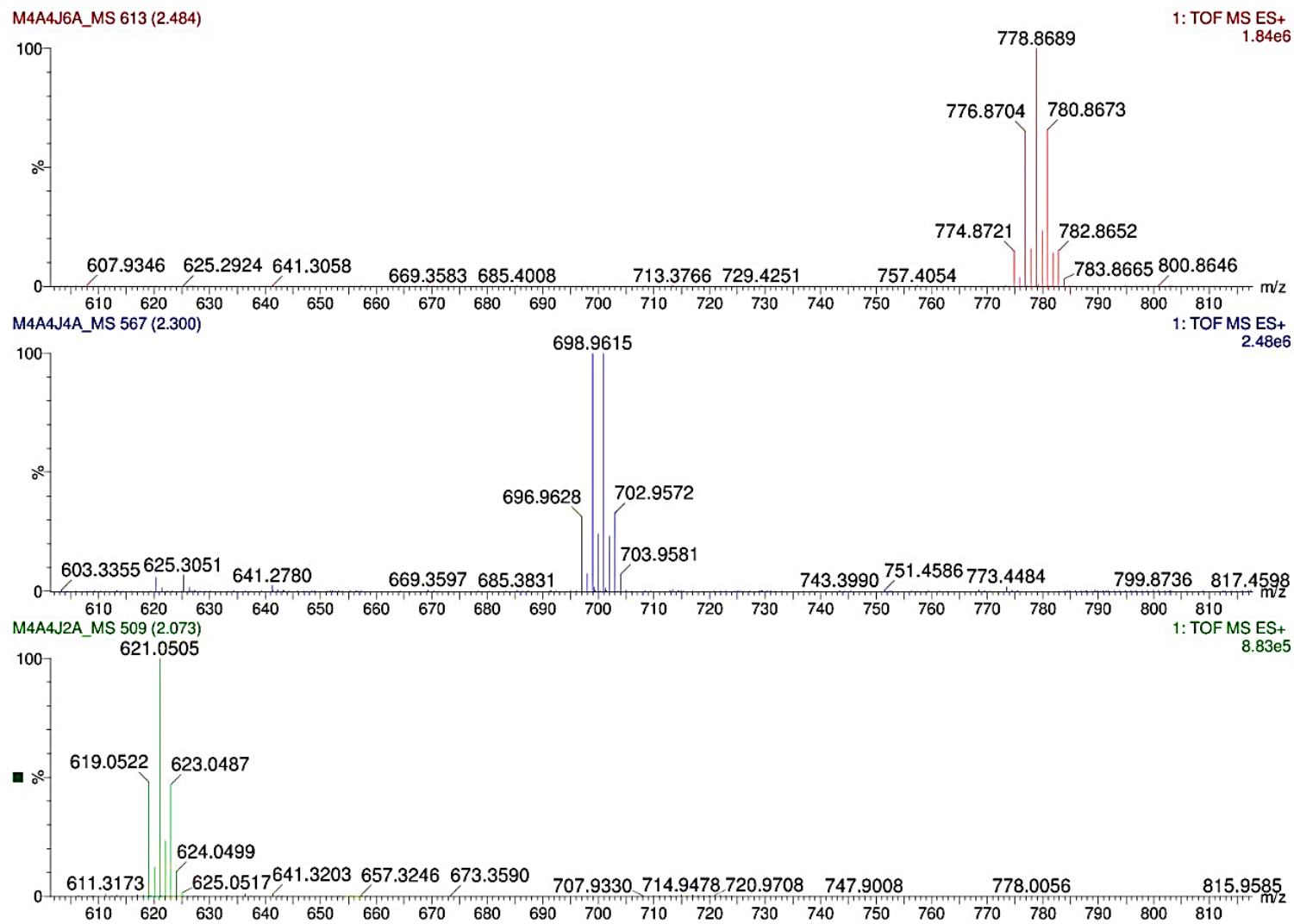


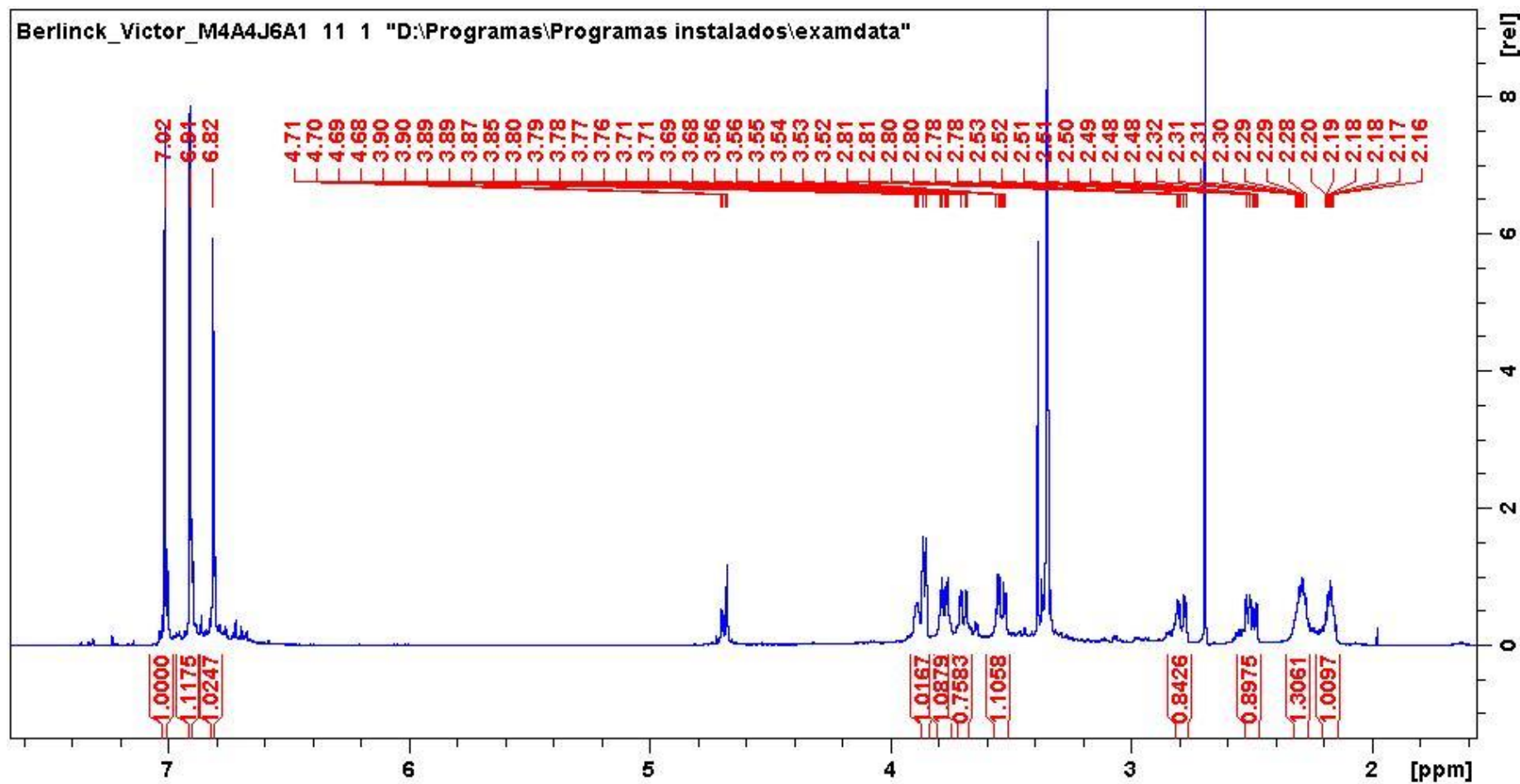
Figura A 99. Espectro de RMN de ^1H da dibromoagelifenia (**8**) (600 MHz, em $\text{MeOH-}d_4$).

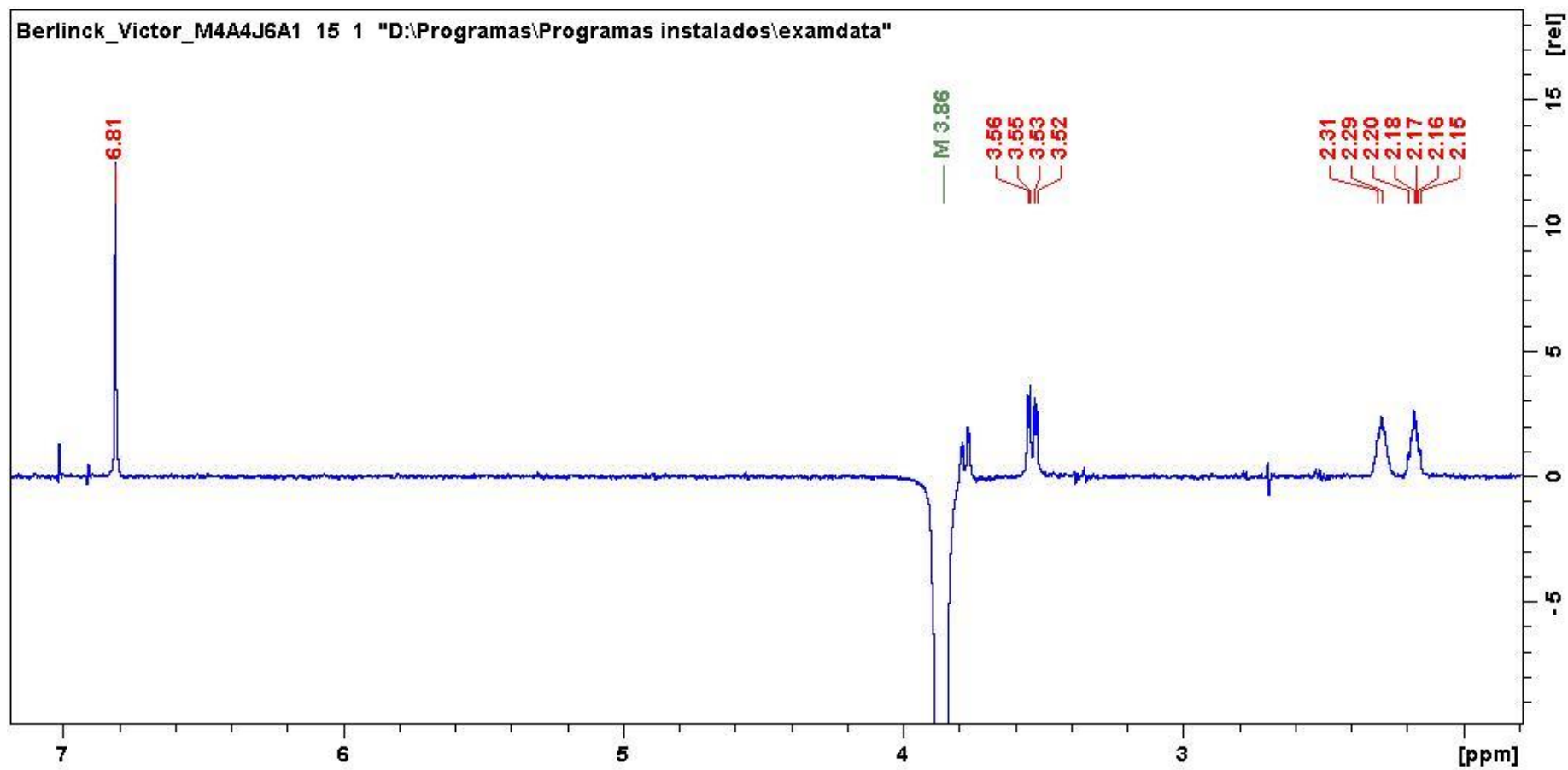
Figura A 100. Espectro de NOESY 1D da dibromoageliferina (**8**) irradiado em H-10 (600 MHz, em MeOH-*d*₄).

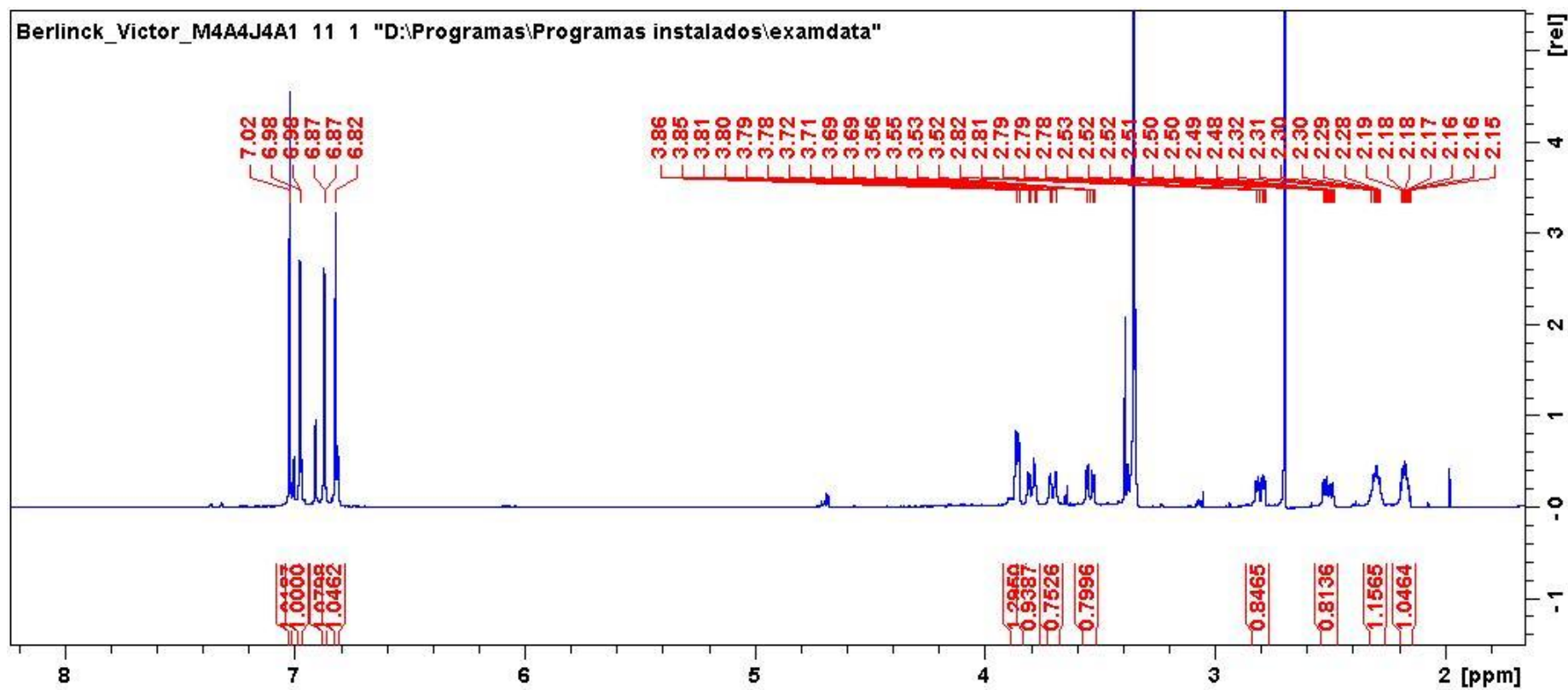
Figura A 101. Espectro de RMN de ^1H da monobromoagelifenia (**9**) (600 MHz, em $\text{MeOH-}d_4$).

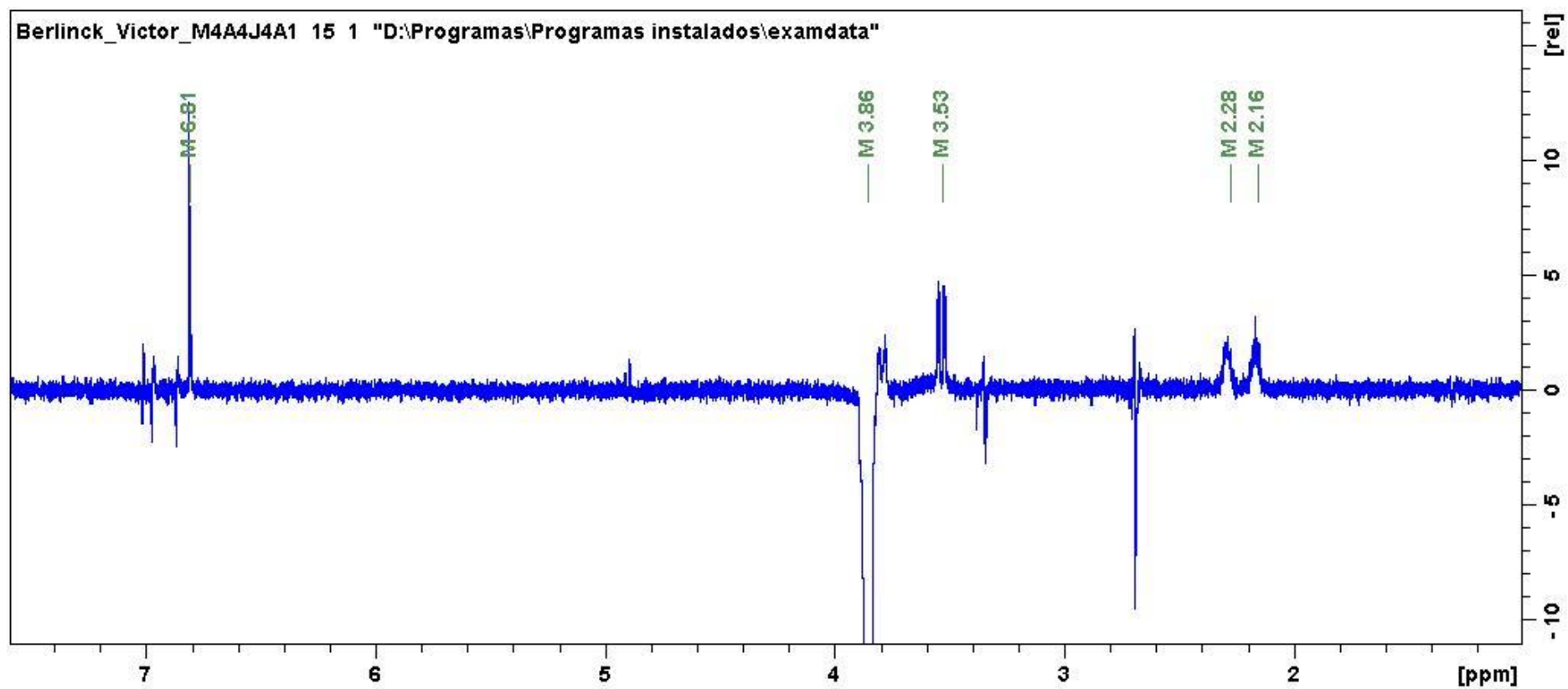
Figura A 102. Espectro de NOESY 1D da bromoageliferina (9) irradiado em H-10 (600 MHz, em MeOH-*d*₄).

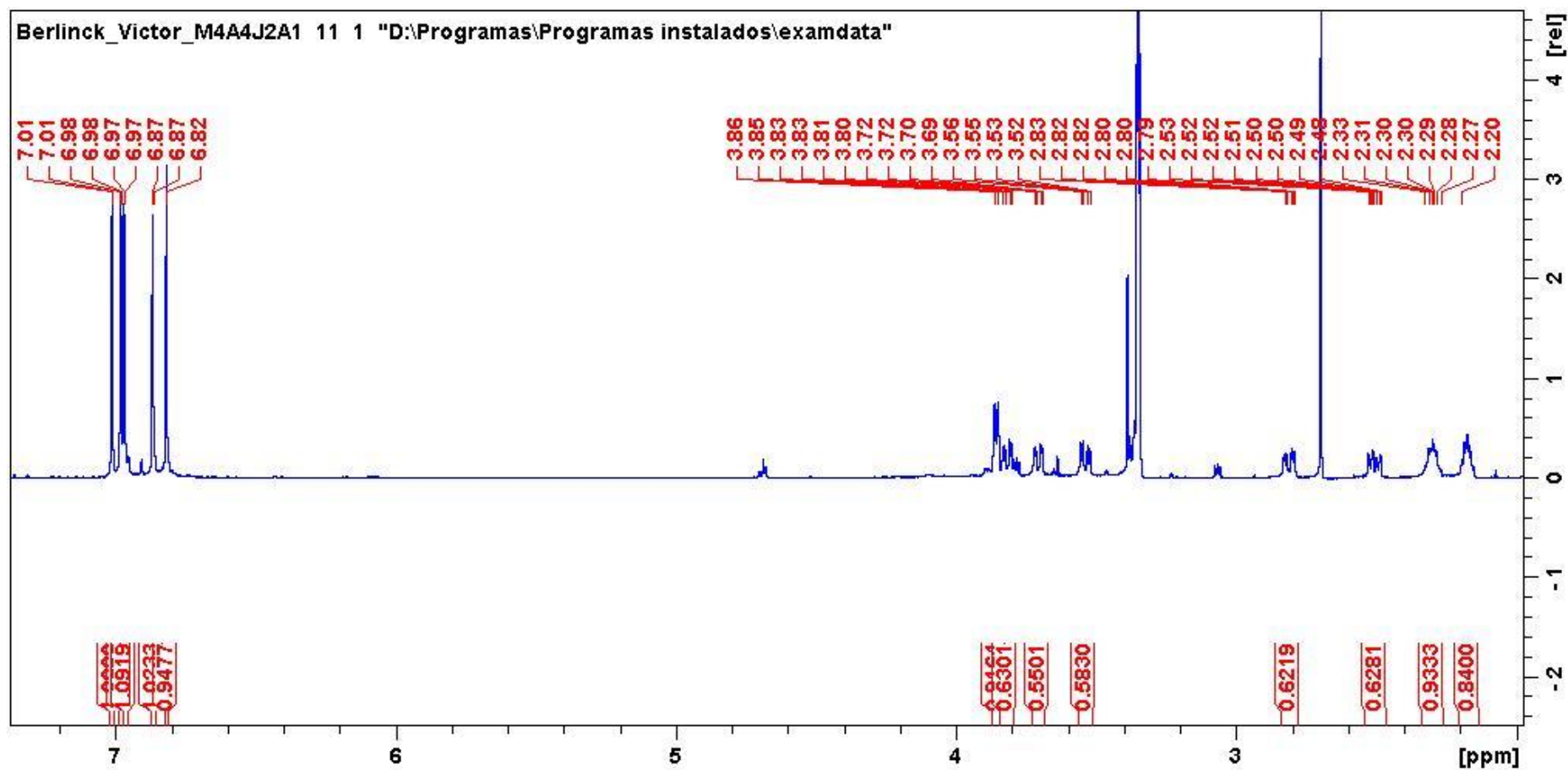
Figura A 103. Espectro de RMN de ^1H da ageliferina (**10**) (600 MHz, em $\text{MeOH-}d_4$).

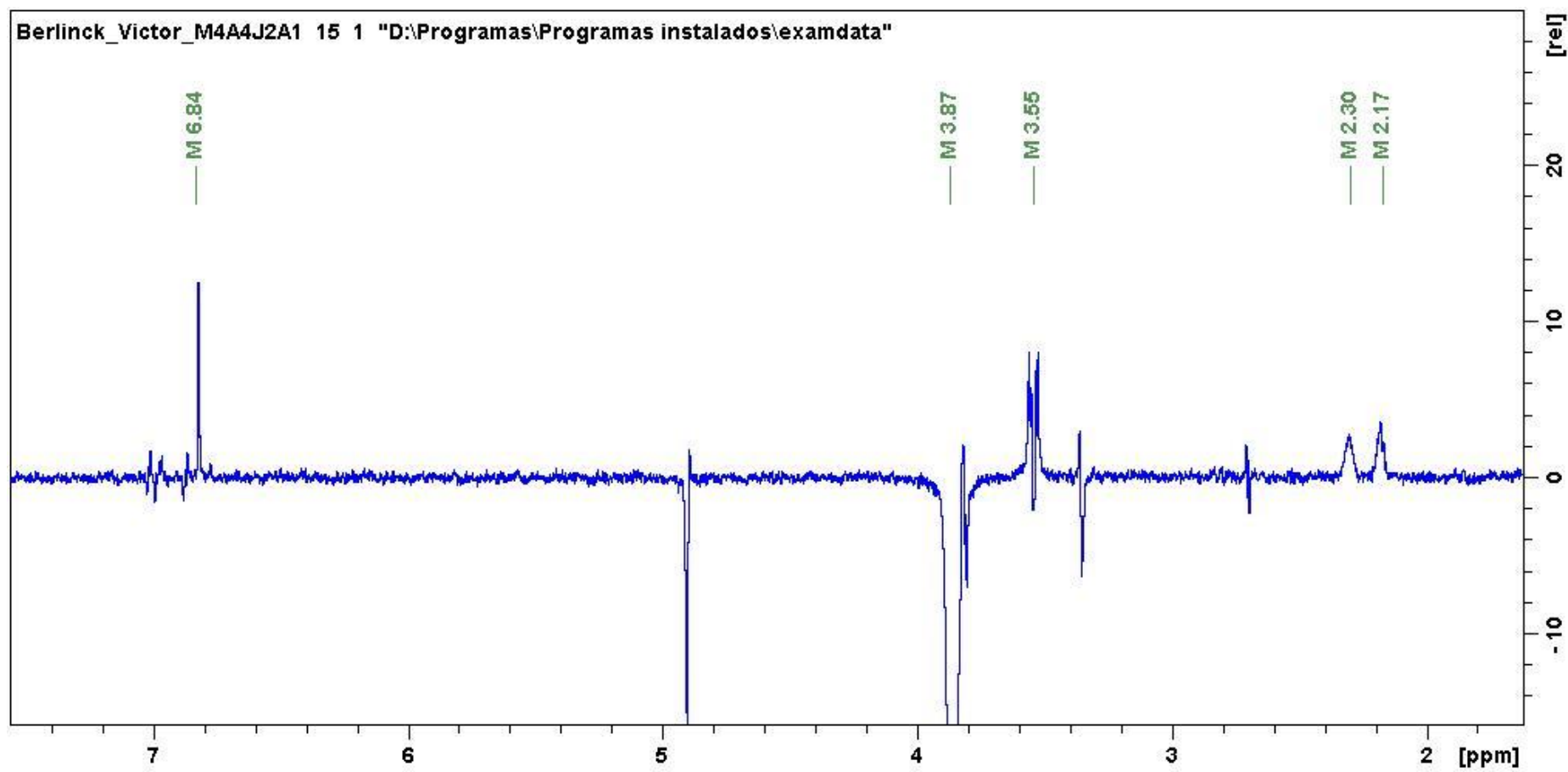
Figura A 104. Espectro de NOESY 1D da ageliferina (10) irradiado em H-10 (600 MHz, em MeOH-*d*₄).

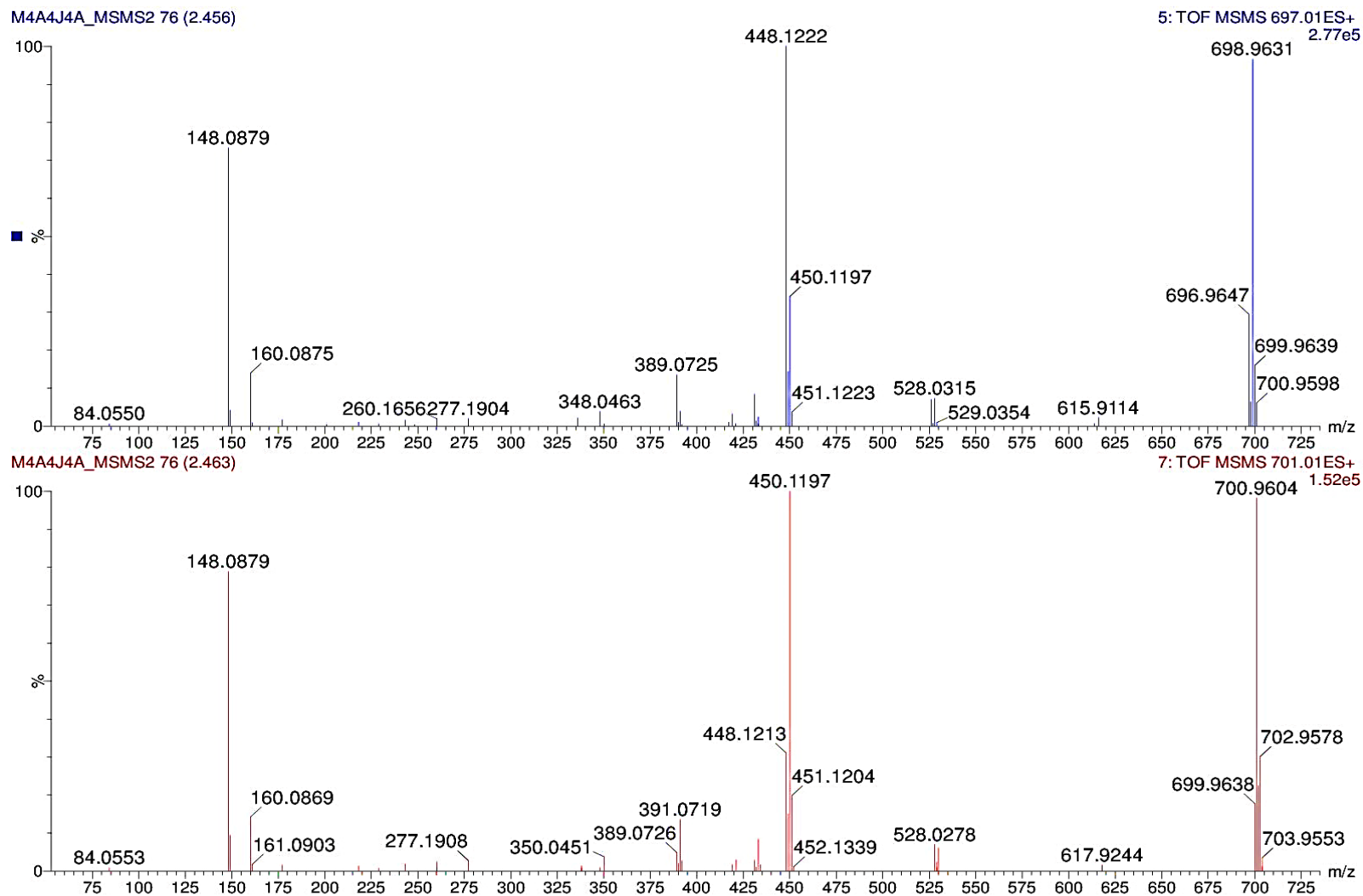
Figura A 105. Espectros MS/MS do composto bromoageliferina (9) a partir dos íons precursoros de m/z 696,95 e m/z 700,96.

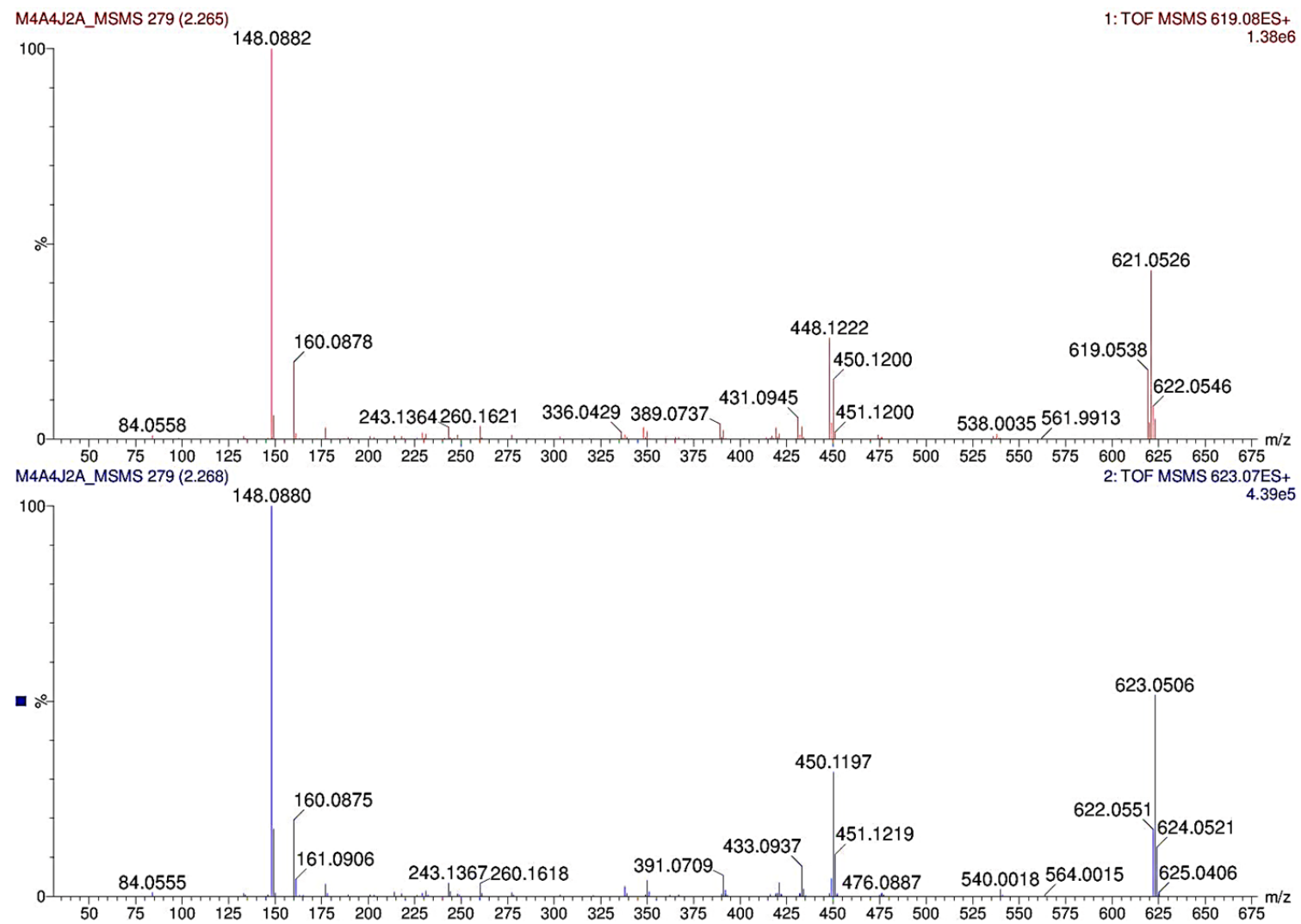
Figura A 106. Espectros MS/MS do composto ageliferina (**10**), a partir dos íons precursoros m/z 619,05 e m/z 623,05.

Tabela A 2. Íons observados nos espectros MS/MS do composto bromoageliferina (**9**) a partir dos íons precursores de m/z 696,95 e m/z 700,96

Íon fragmento	Fórmula	m/z 696,95			m/z 700,96		
		Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)	Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)
[M + H] ⁺	C ₂₂ H ₂₄ Br ₃ N ₁₀ O ₂ ⁺	696,9579	-1,43	23,83	700,9604	2,28	98,13
		698,9604	-0,57	90,22	702,9578	1,56	30,09
A ₁	C ₁₇ H ₂₂ Br ₂ N ₉ O ⁺	526,0278	-5,89	5,95	528,0278	-2,08	6,95
		528,0284	-0,95	7,71	530,0278	1,89	6,07
A ₂	C ₁₇ H ₂₃ BrN ₉ O ⁺	448,1210	1,56	100,00	448,1213	2,23	30,93
		450,1190	1,56	39,94	450,1197	3,11	100,00
B ₁	C ₁₇ H ₁₉ Br ₂ N ₈ O ⁺	509,0006	-7,47	0,32	-	-	-
		511,0020	-0,59	0,33	-	-	-
B ₂	C ₁₇ H ₂₀ BrN ₈ O ⁺	431,0939	0,23	8,53	431,0931	-1,62	2,76
		433,0899	-4,39	3,20	433,0906	-2,77	8,22
C ₁	C ₁₄ H ₁₄ Br ₂ N ₅ O ⁺	425,9506	-12,68	0,47	-	-	-
		427,9538	-0,47	0,68	-	-	-
C ₂	C ₁₄ H ₁₅ BrN ₅ O ⁺	348,0451	-1,15	3,31	348,0498	12,35	0,82
		350,0422	-3,71	1,32	350,0451	4,57	3,70
D	C ₁₂ H ₂₁ N ₈ ⁺	277,1862	-7,94	2,28	277,1908	8,66	2,62

E	$C_{12}H_{18}N_7^+$	260,1626	2,69	3,24	260,1620	0,38	2,32
F	$C_9H_{10}N_3^+$	160,0881	6,87	15,78	160,0869	-0,62	14,14
G	$C_8H_{10}N_3^+$	148,0883	8,78	83,49	148,0879	6,08	78,85

Tabela A 3. Íons observados nos espectros MS/MS do composto agelifarina (**10**) a partir dos íons precursores de m/z 619,05 e m/z 623,05.

Íon fragmento	Fórmula	m/z 619,05			m/z 623,05		
		Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)	Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)
[M + H] ⁺	C ₂₂ H ₂₅ Br ₂ N ₁₀ O ₂ ⁺	619,0538	2,26	17,65	623,0506	3,69	51,59
		621,0526	3,70	43,15			
A ₁ /A ₂	C ₁₇ H ₂₃ BrN ₉ O ⁺	448,1222	4,23	25,76	450,1197	3,11	31,72
		450,1200	3,78	15,21			
B ₁ /B ₂	C ₁₇ H ₂₀ BrN ₈ O ⁺	431,0945	1,62	5,33	433,0937	4,38	7,66
		433,0924	1,38	3,10			
C ₁ /C ₂	C ₁₄ H ₁₅ BrN ₅ O ⁺	348,0463	2,30	2,90	350,0432	-0,85	3,99
		350,0434	-0,28	1,87			
D	C ₁₂ H ₂₁ N ₈ ⁺	277,1883	-0,36	0,92	277,1900	5,77	0,88
E	C ₁₂ H ₁₈ N ₇ ⁺	260,1621	0,77	3,24	260,1618	-0,38	3,23
F	C ₉ H ₁₀ N ₃ ⁺	160,0878	4,99	19,63	160,0878	3,12	19,51
G	C ₈ H ₁₀ N ₃ ⁺	148,0882	8,10	100,00	148,0880	6,75	100,00

Figura A 107. Espectro MS do composto nagelamida H (11).

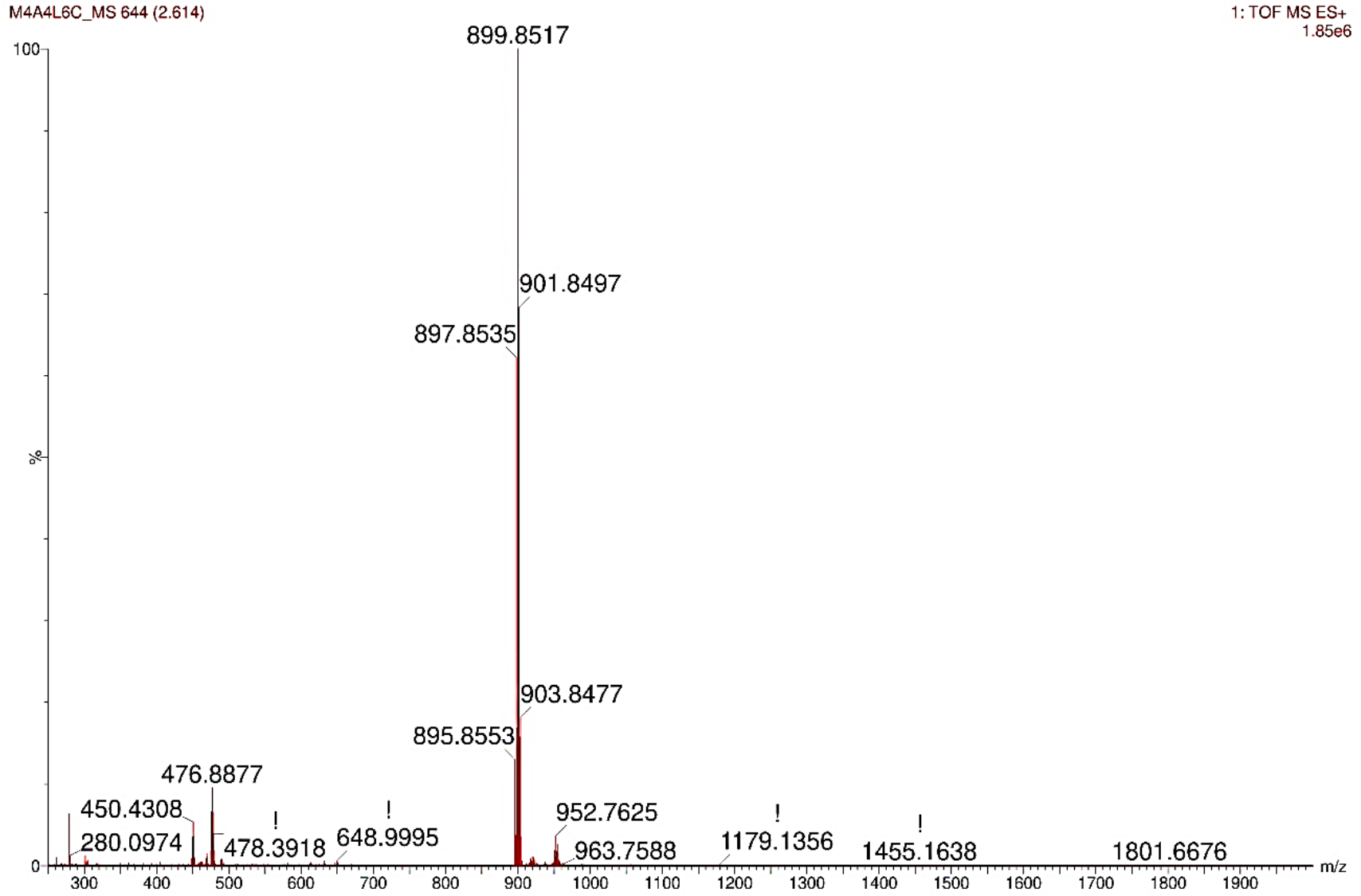


Figura A 108. Expansão do espectro MS do composto nagelamida H (11).

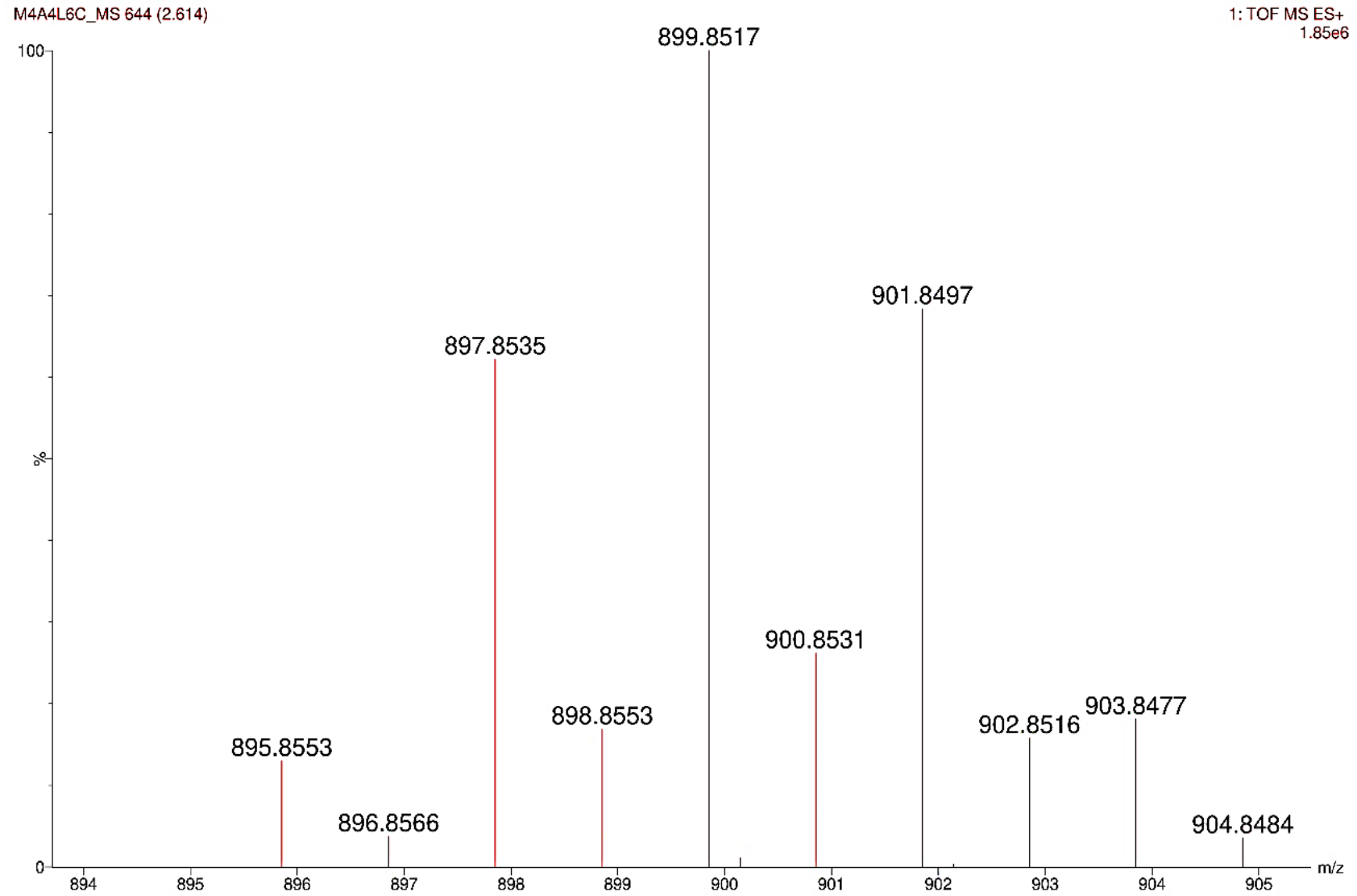


Figura A 109. Espectro de RMN de ^1H da nagelamida H (**11**) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

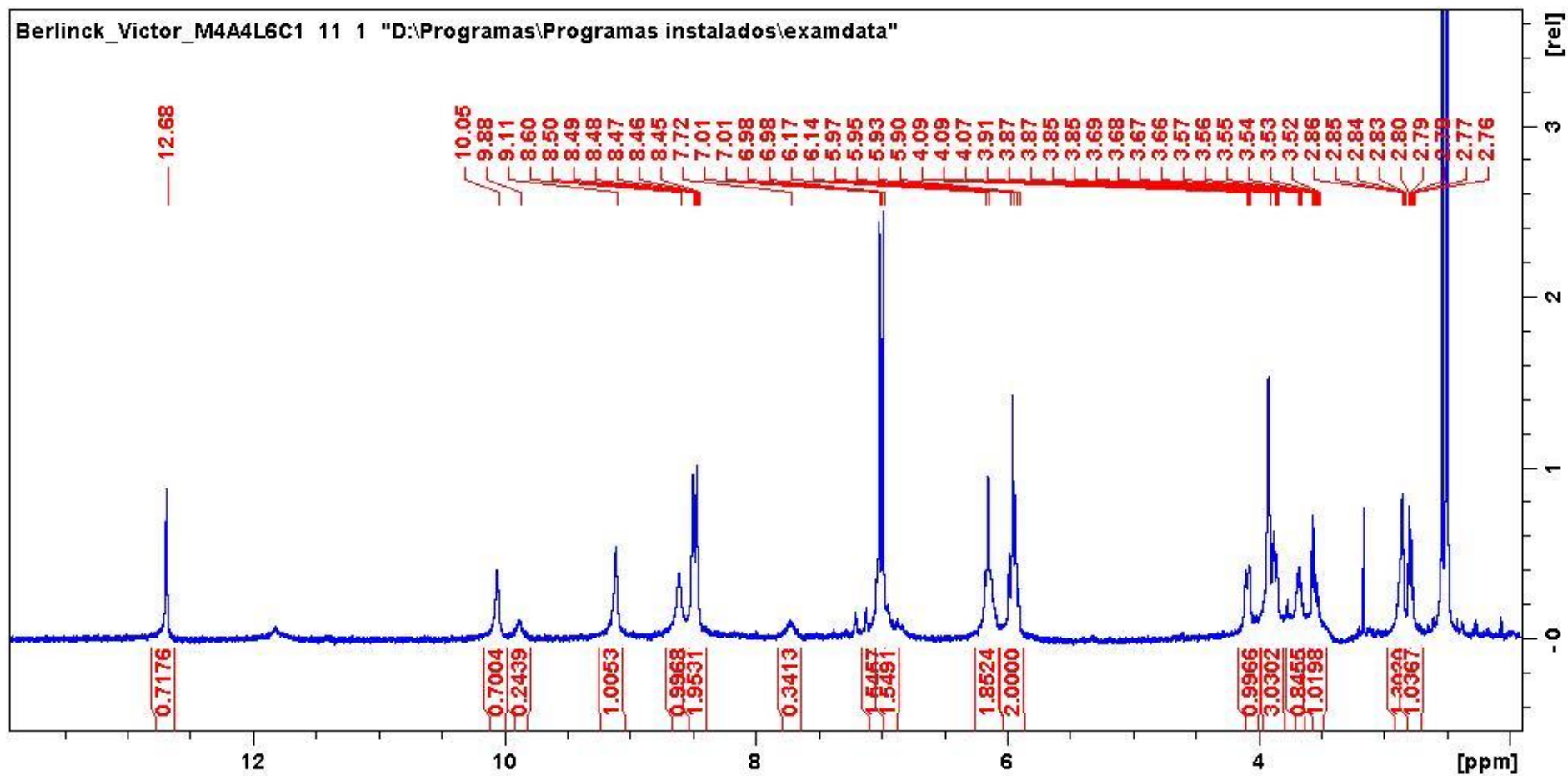


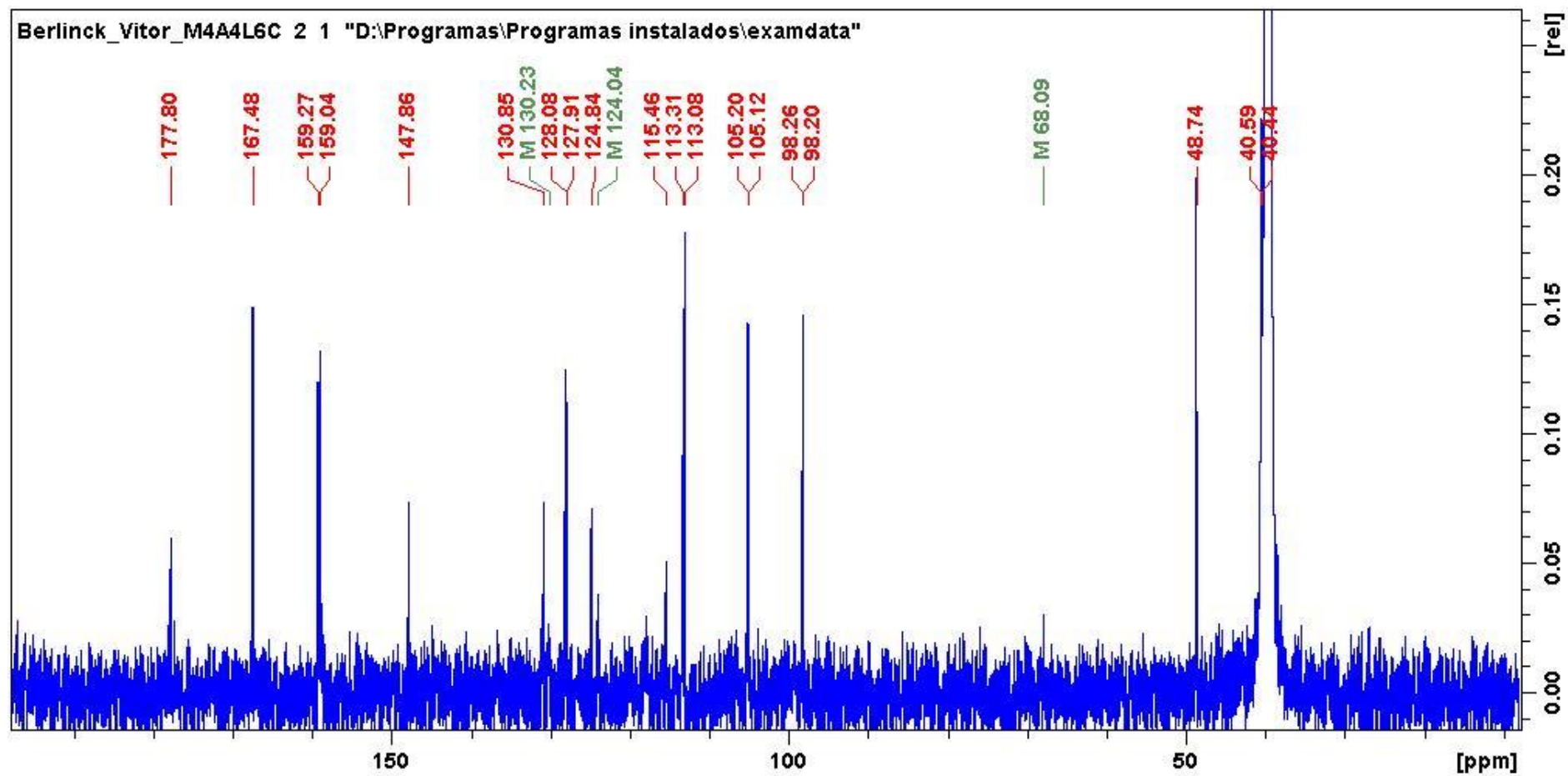
Figura A 110. Espectro de RMN de ^{13}C da nagelamida H (11) (150 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

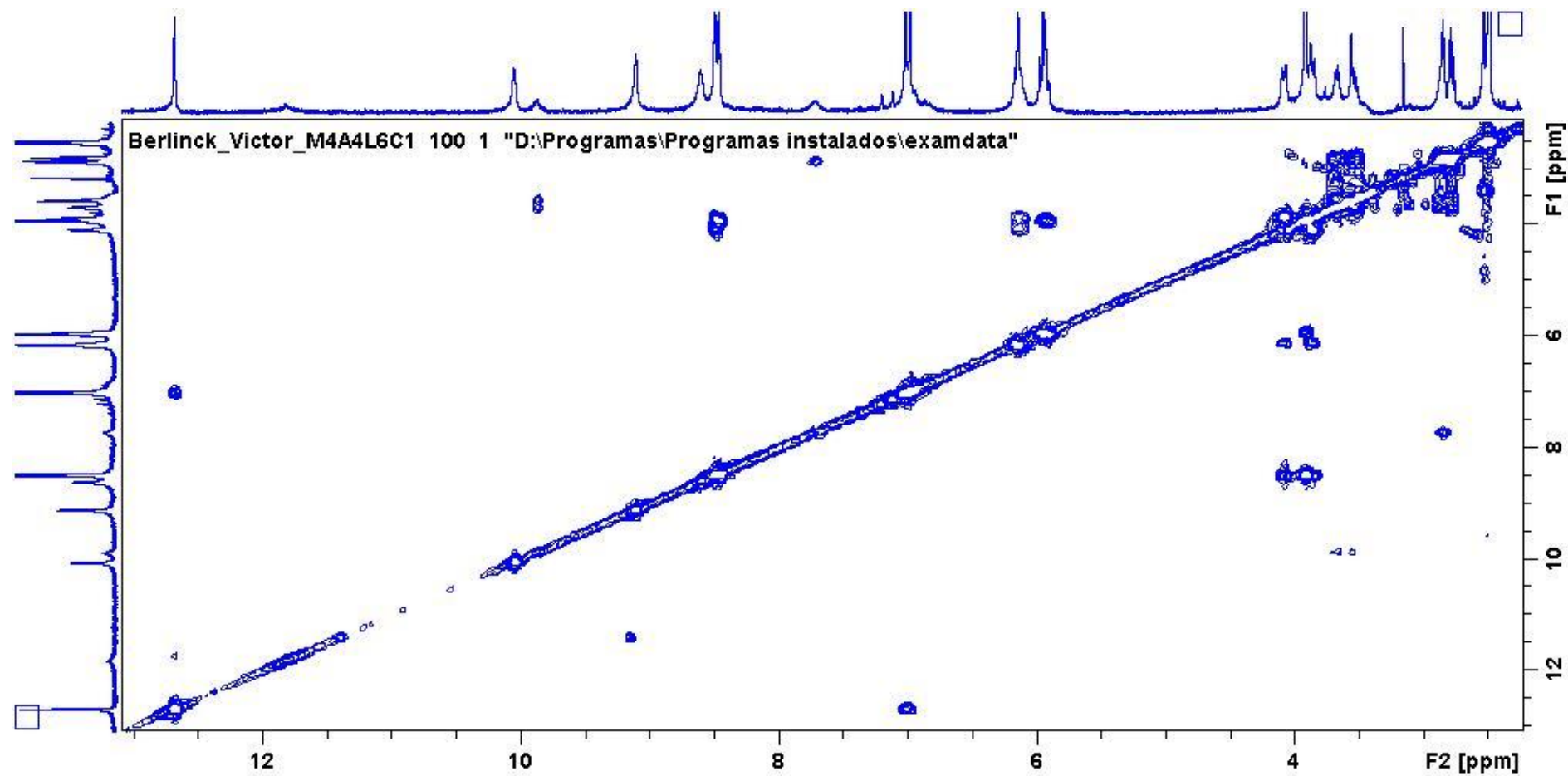
Figura A 111. Espectro COSY da nagelamida H (11) (600 MHz, em DMSO- d_6).

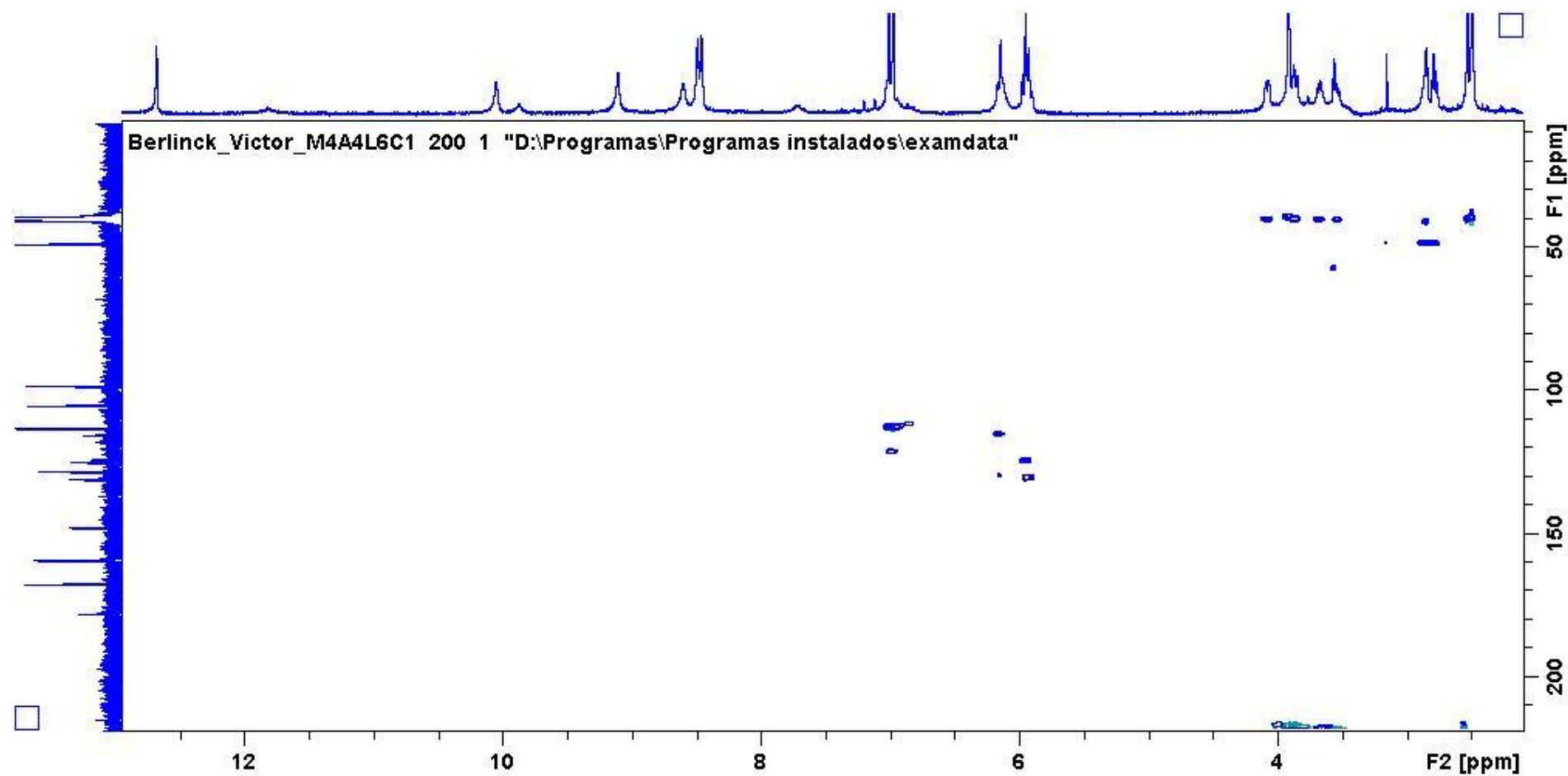
Figura A 112. Espectro HSQC da nagelamida H (11) (600 MHz, em DMSO- d_6).

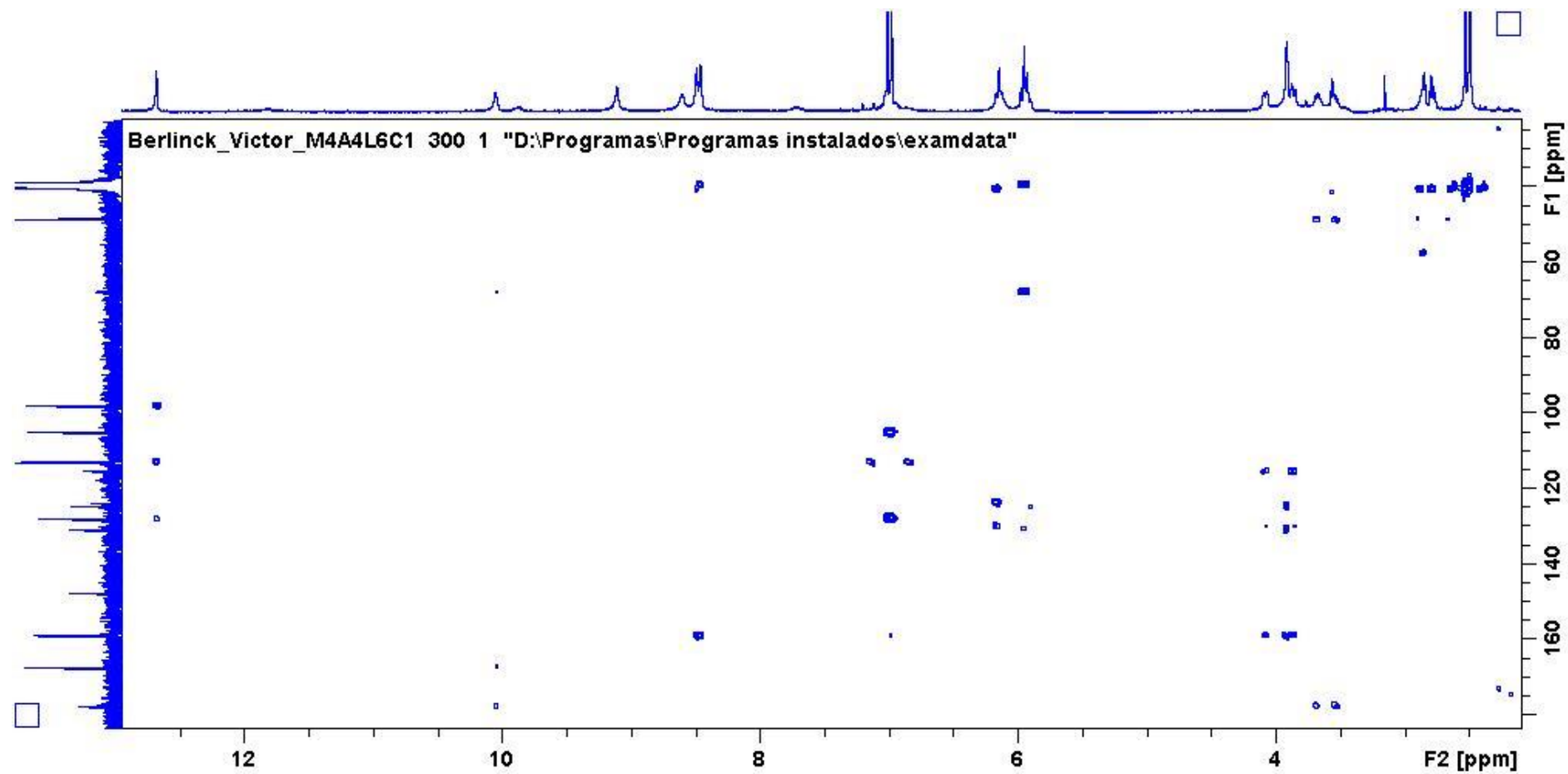
Figura A 113. Espectro HMBC da nagelamida H (11) (600 MHz, em DMSO- d_6).

Figura A 114. Espectros MS/MS do composto nagelamida H (**11**) a partir dos íons precursores de m/z 895,85, m/z 899,85 e m/z 903,85.

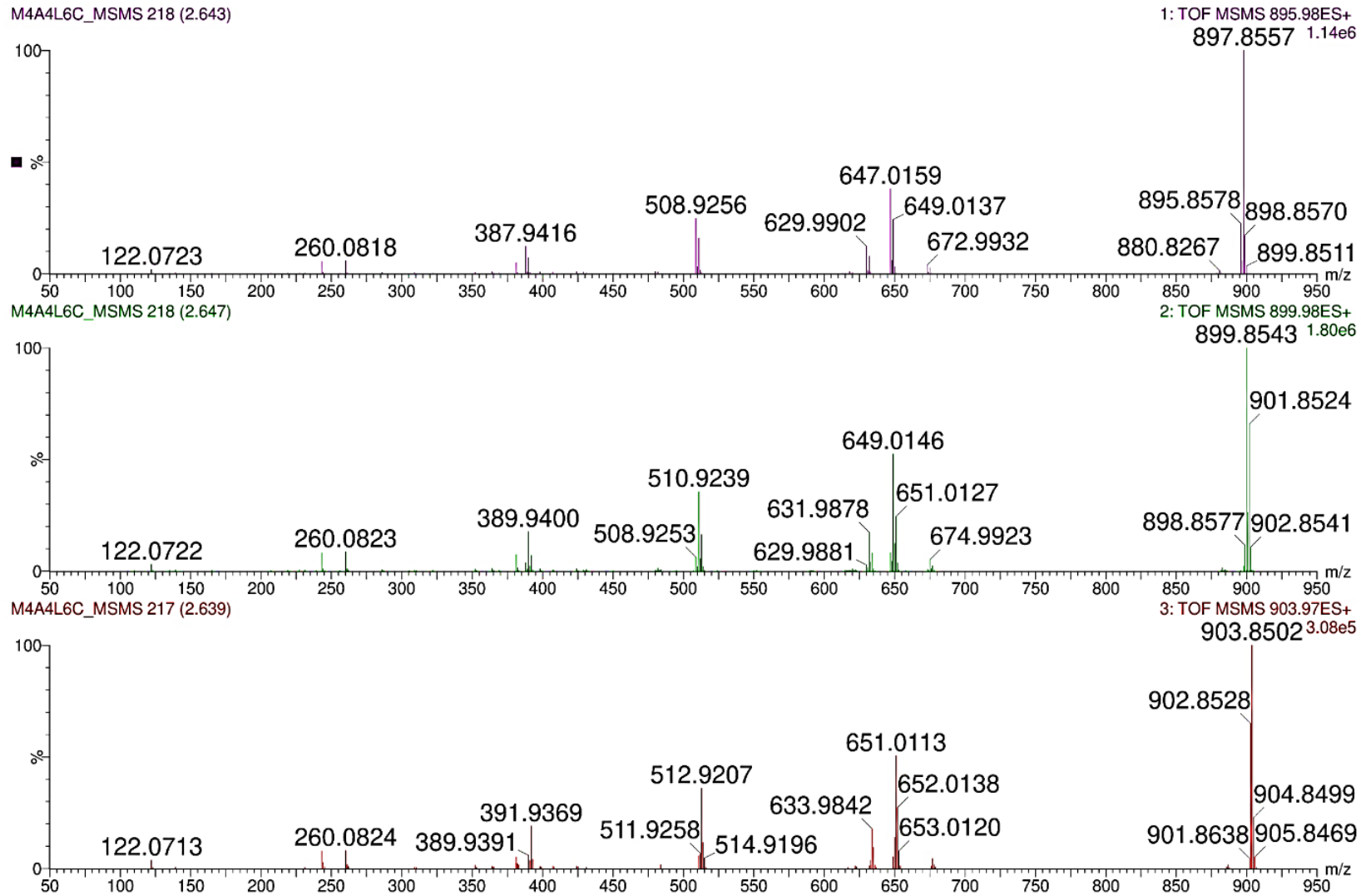


Tabela A 4. Íons observados nos espectros MS/MS do composto nagelamida H (11) a partir dos íons precursores de m/z 895,85, m/z 899,85 e m/z 903,85.

Íon fragmento	Fórmula	m/z 895,85			m/z 899,85			m/z 903,85		
		Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)	Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)	Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)
[M + H] ⁺	C ₂₄ H ₂₆ Br ₄ N ₁₁ O ₅ S ⁺	895,8578	1,23	22,38	899,8543	1,89	100,00	903,8502	1,77	100,00
		897,8557	1,11	100,00	901,8524	1,99	65,67			
A ₁ /A ₂	C ₂₀ H ₂₃ Br ₂ N ₁₀ O ₅ S ⁺	672,9932	-0,45	3,69	672,9910	-3,71	0,71	676,9881	-1,92	4,36
		674,9910	-0,59	2,48	674,9923	1,33	4,96			
					676,9891	-0,44	2,31			
B ₁ /B ₂	C ₁₉ H ₂₅ Br ₂ N ₁₀ O ₄ S ⁺	647,0159	2,63	37,95	647,0157	2,32	8,22	651,0113	1,69	50,42
		649,0137	2,31	24,19	649,0146	3,69	52,39			
					651,0127	3,84	24,41			
C ₁ /C ₂	C ₁₉ H ₂₂ Br ₂ N ₉ O ₄ S ⁺	629,9902	3,97	12,14	629,9881	0,63	2,59	633,9842	0,95	17,63
		631,9882	4,11	7,72	631,9878	3,48	17,13			
					633,9855	2,99	8,09			
D	C ₁₃ H ₁₅ Br ₂ N ₆ O ₄ S ⁺	508,9256	3,73	24,74	508,9253	3,14	6,01	512,9207	2,14	35,86
		510,9234	3,52	15,87	510,9239	4,50	35,49			
					512,9222	5,07	16,25			
E	C ₁₁ H ₁₂ Br ₂ N ₅ O ⁺	387,9416	3,35	12,19	387,9411	2,06	3,67	391,9369	1,53	18,86
		389,9390	1,79	7,04	389,9400	4,35	17,59			
					391,9376	3,31	6,95			

F ₁ /F ₂	C ₁₄ H ₂₁ N ₈ O ₃ S ⁺	381,1465	3,41	4,86	381,1459	1,83	7,23	381,1414	-9,97	5,03
G	C ₈ H ₁₄ N ₅ O ₃ S ⁺	260,0818	2,30	5,69	260,0823	4,23	8,52	260,0824	4,61	7,91
H	C ₈ H ₁₁ N ₄ O ₃ S ⁺	243,0551	2,06	5,45	243,0560	5,76	8,12	243,0554	3,29	7,69
I	C ₆ H ₈ N ₃ ⁺	122,0723	8,19	1,77	122,0722	7,37	2,97	122,0713	0,00	3,66

Figura A 115. Espectro MS dos compostos nagelamida H2/H3 (12/13).

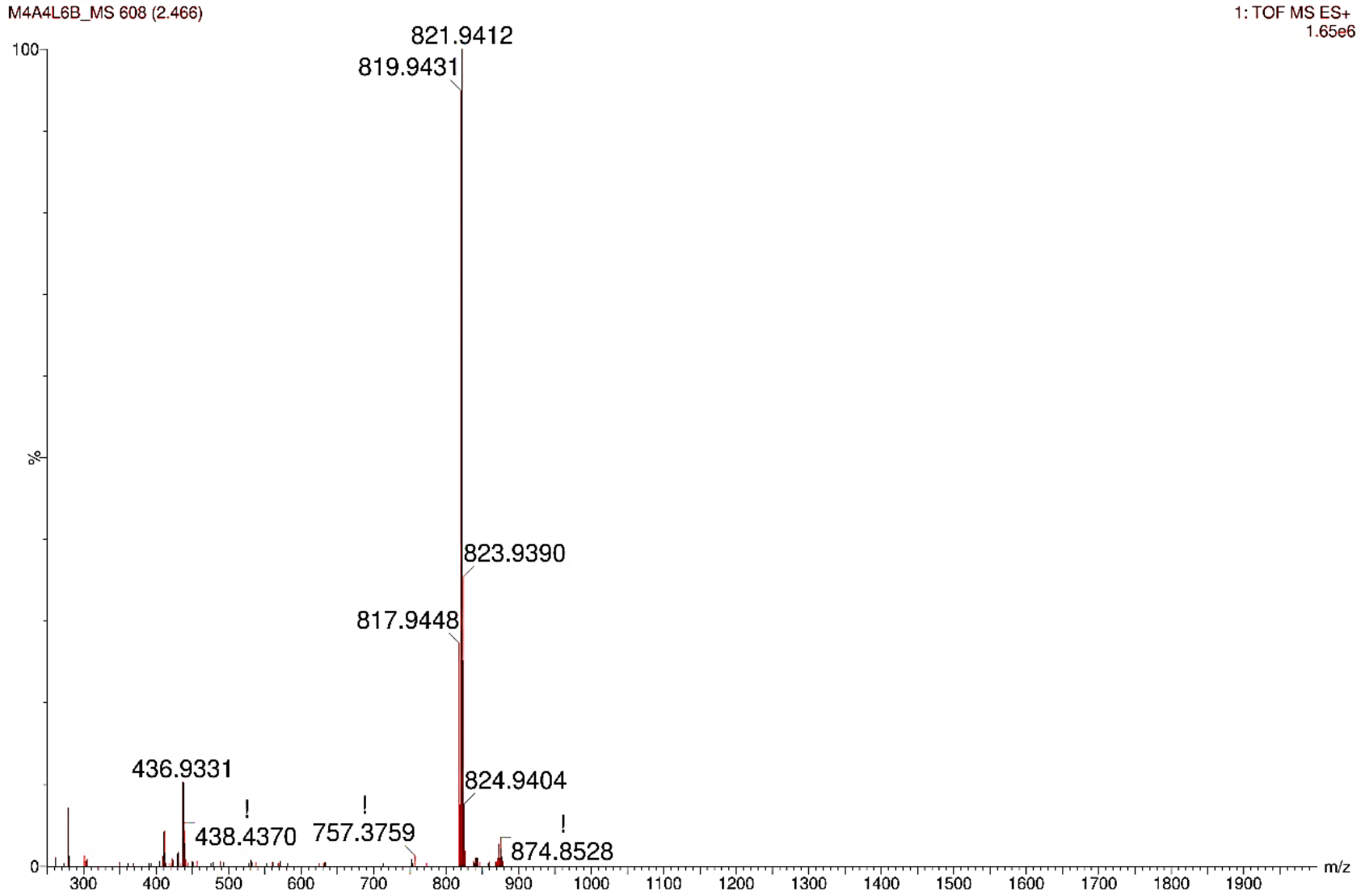


Figura A 116. Expansão do espectro MS dos compostos nagelamida H2/H3 (12/13).

M4A4L6B_MS 608 (2.466)

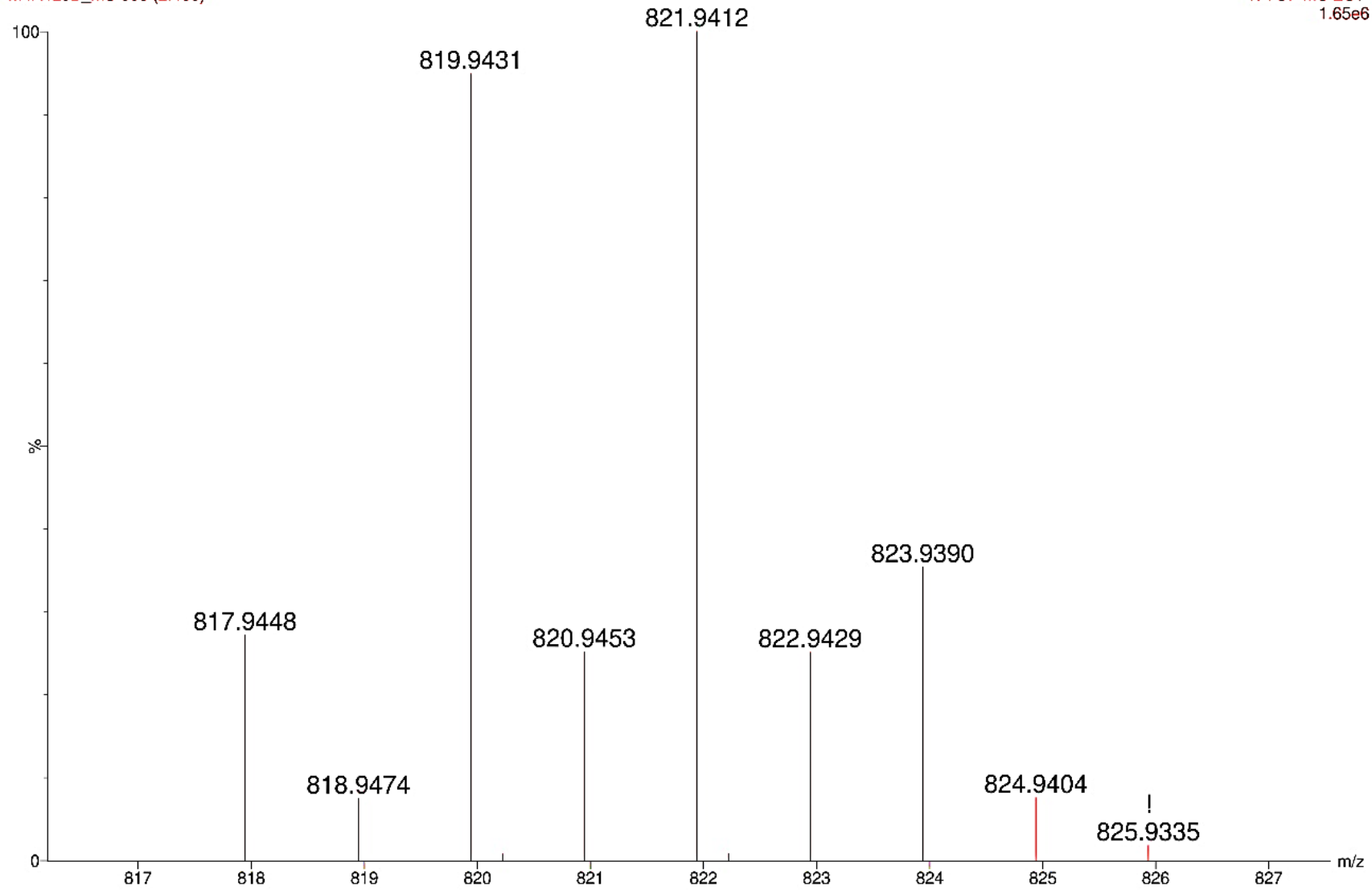
1: TOF MS ES+
1.65e6

Figura A 117. Espectro de RMN de ^1H da nagelamida H2/H3 (**12/13**) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

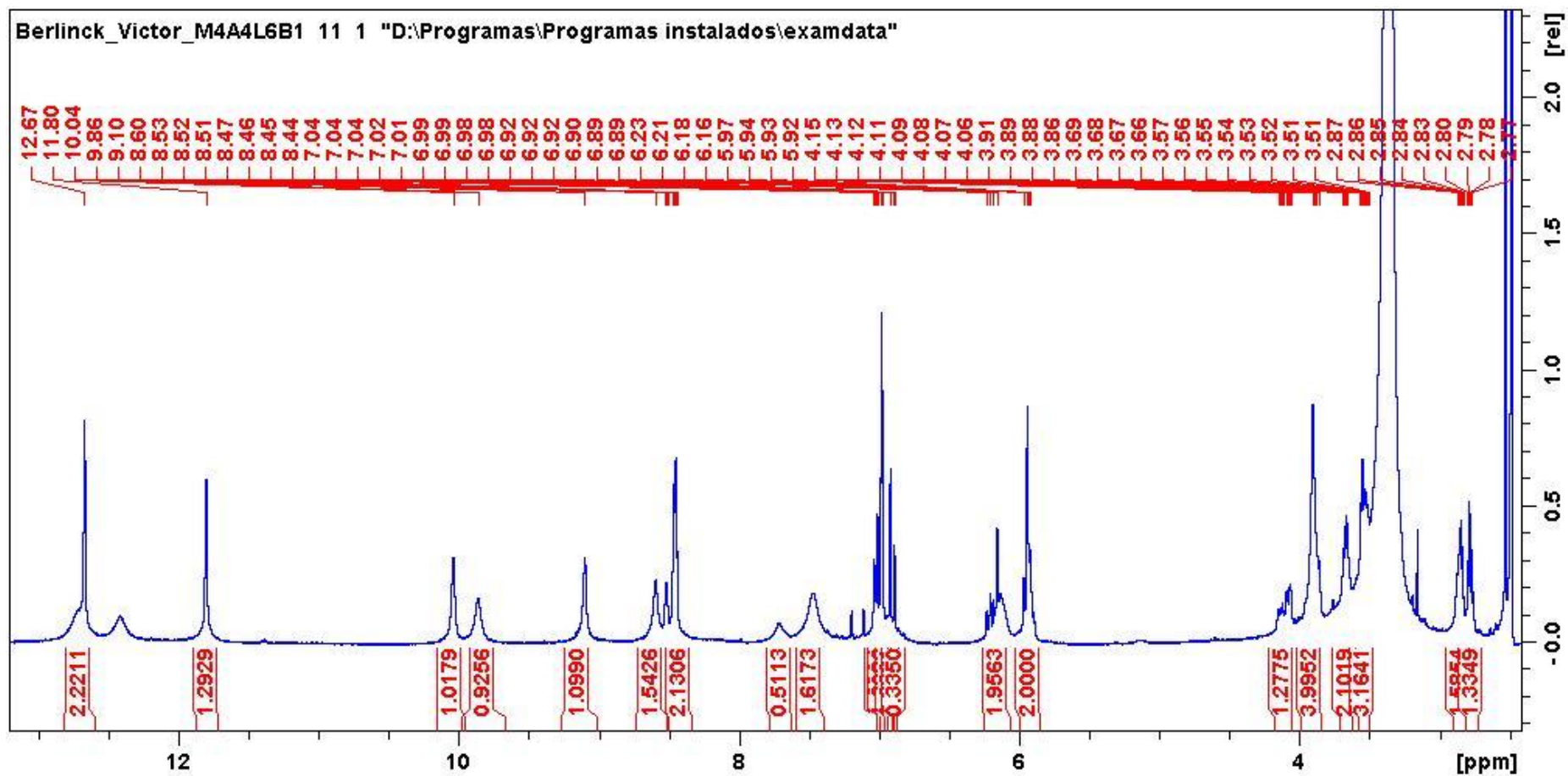


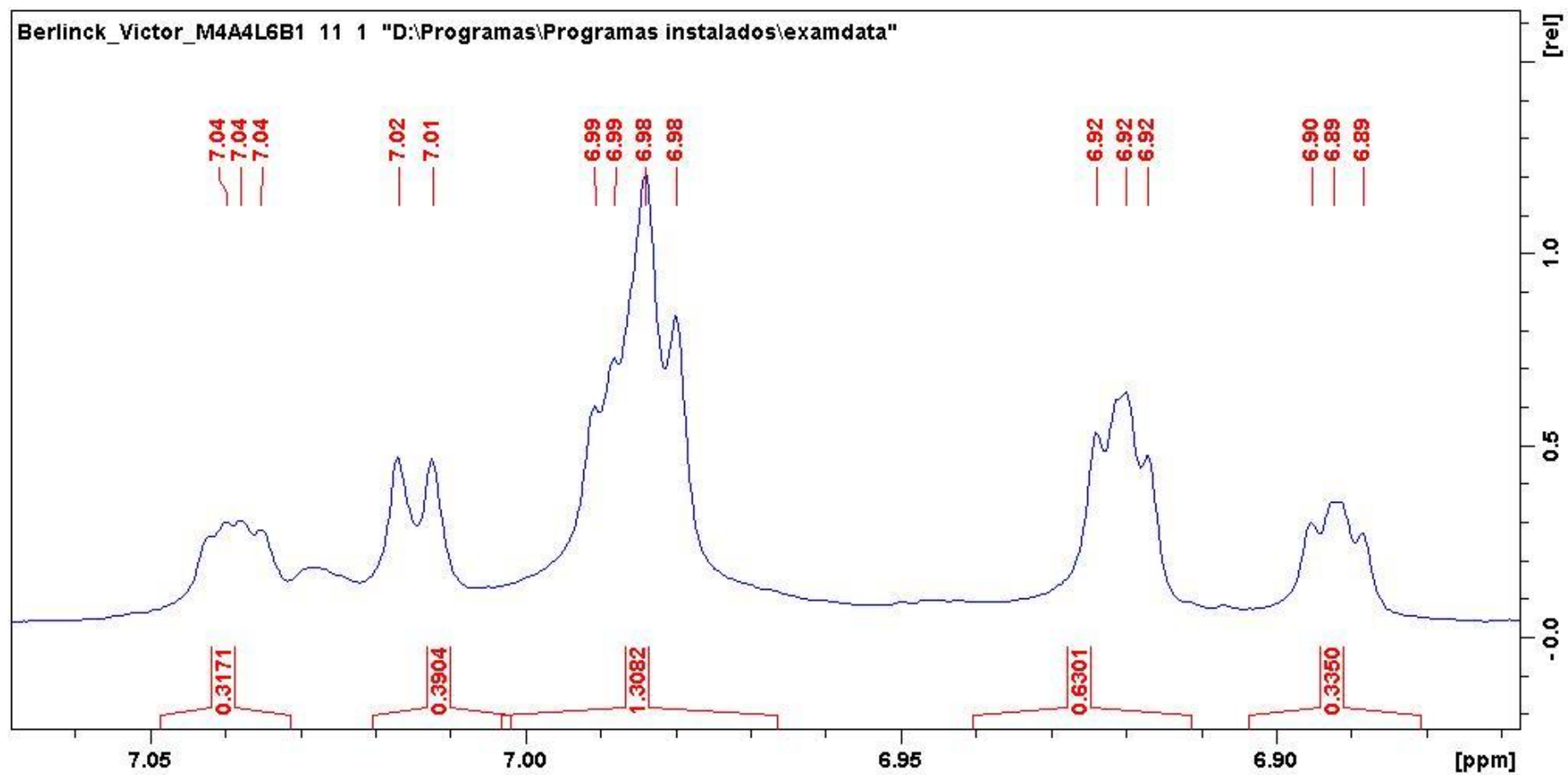
Figura A 118. Expansão do espectro de RMN de ^1H da nagelamida H2/H3 (12/13) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

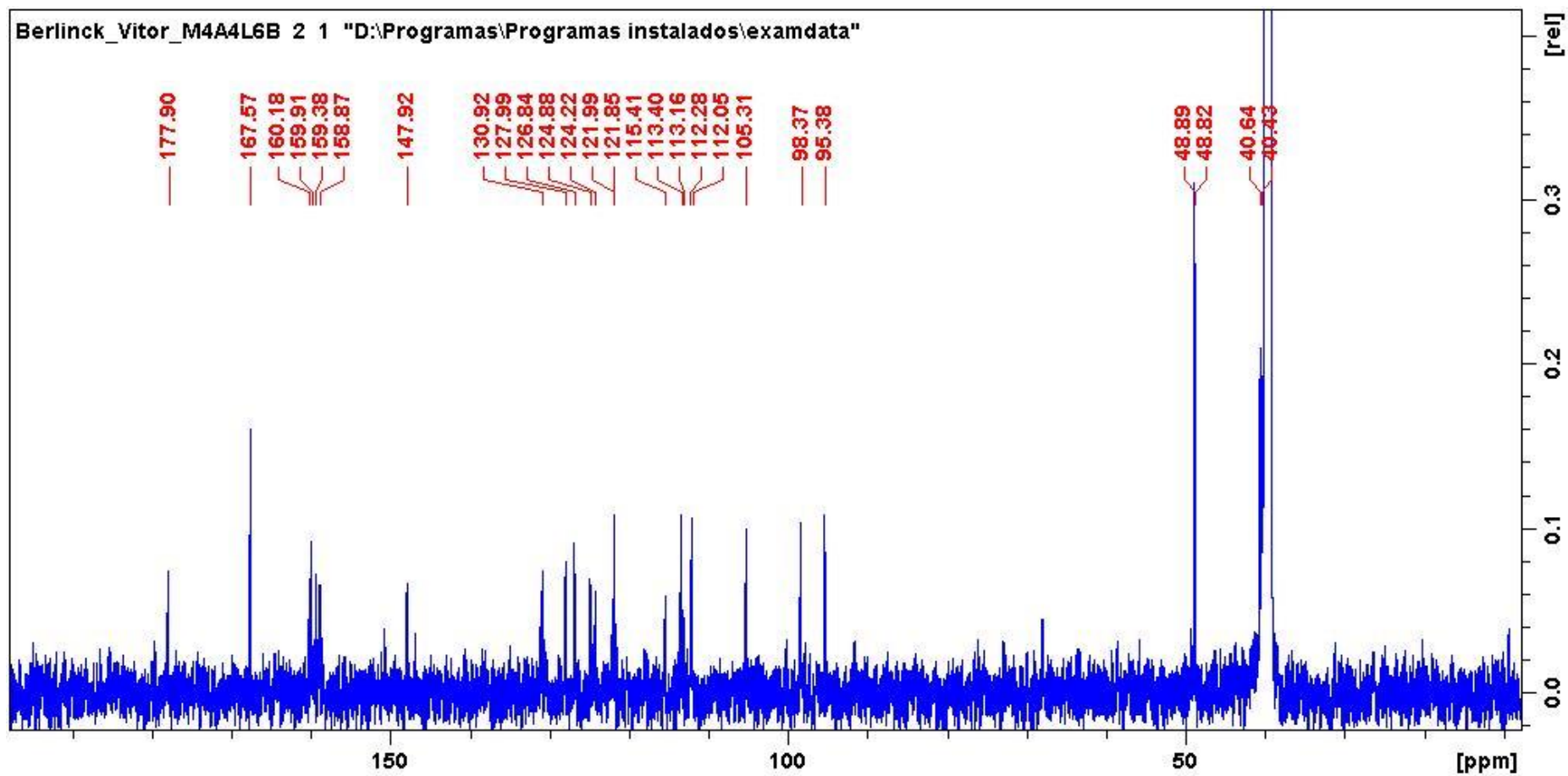
Figura A 119. Espectro de RMN de ^{13}C da nagelamida H2/H3 (12/13) (150 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

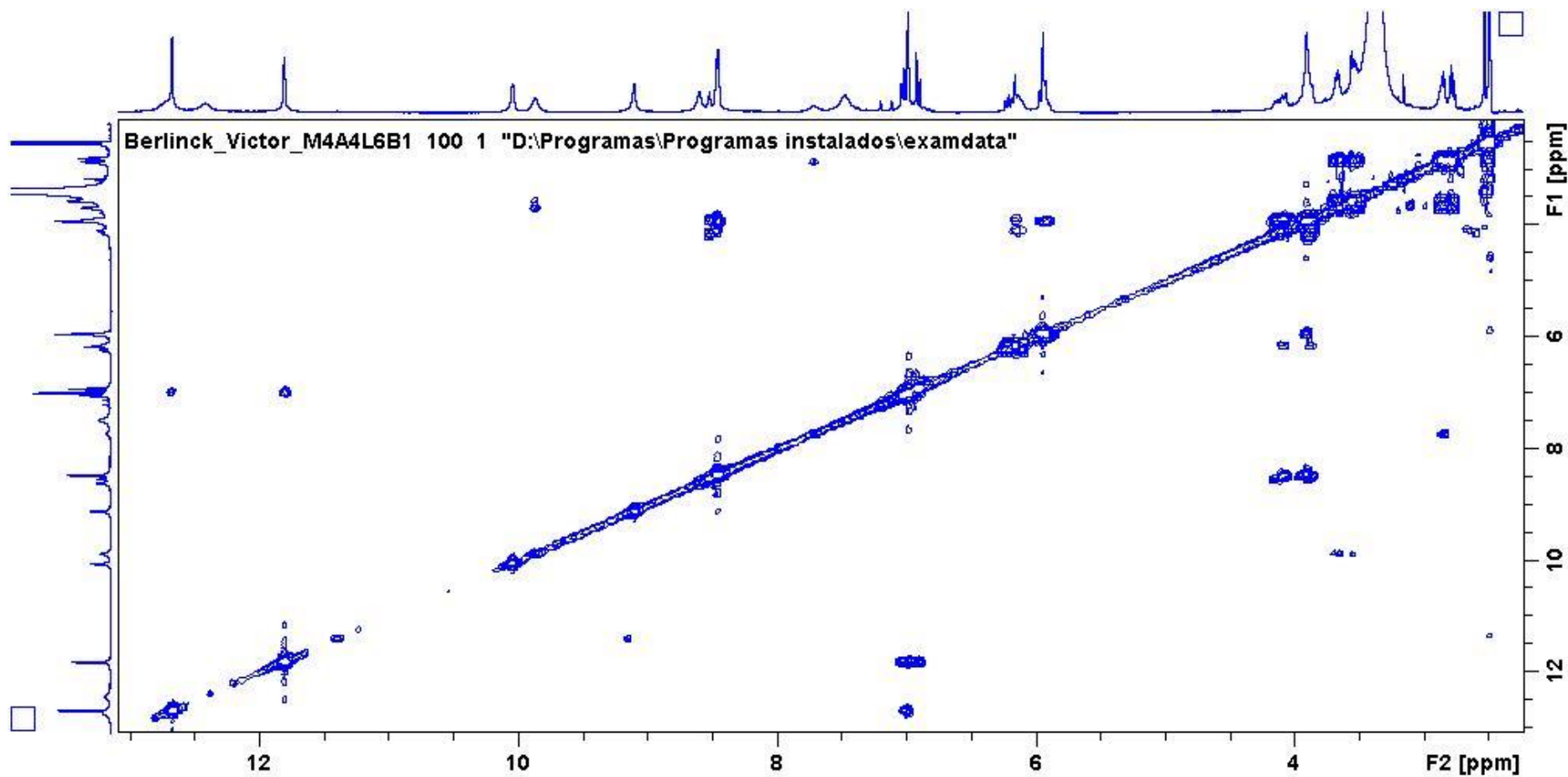
Figura A 120. Espectro COSY da nagelamida H2/H3 (12/13) (600 MHz, em DMSO- d_6).

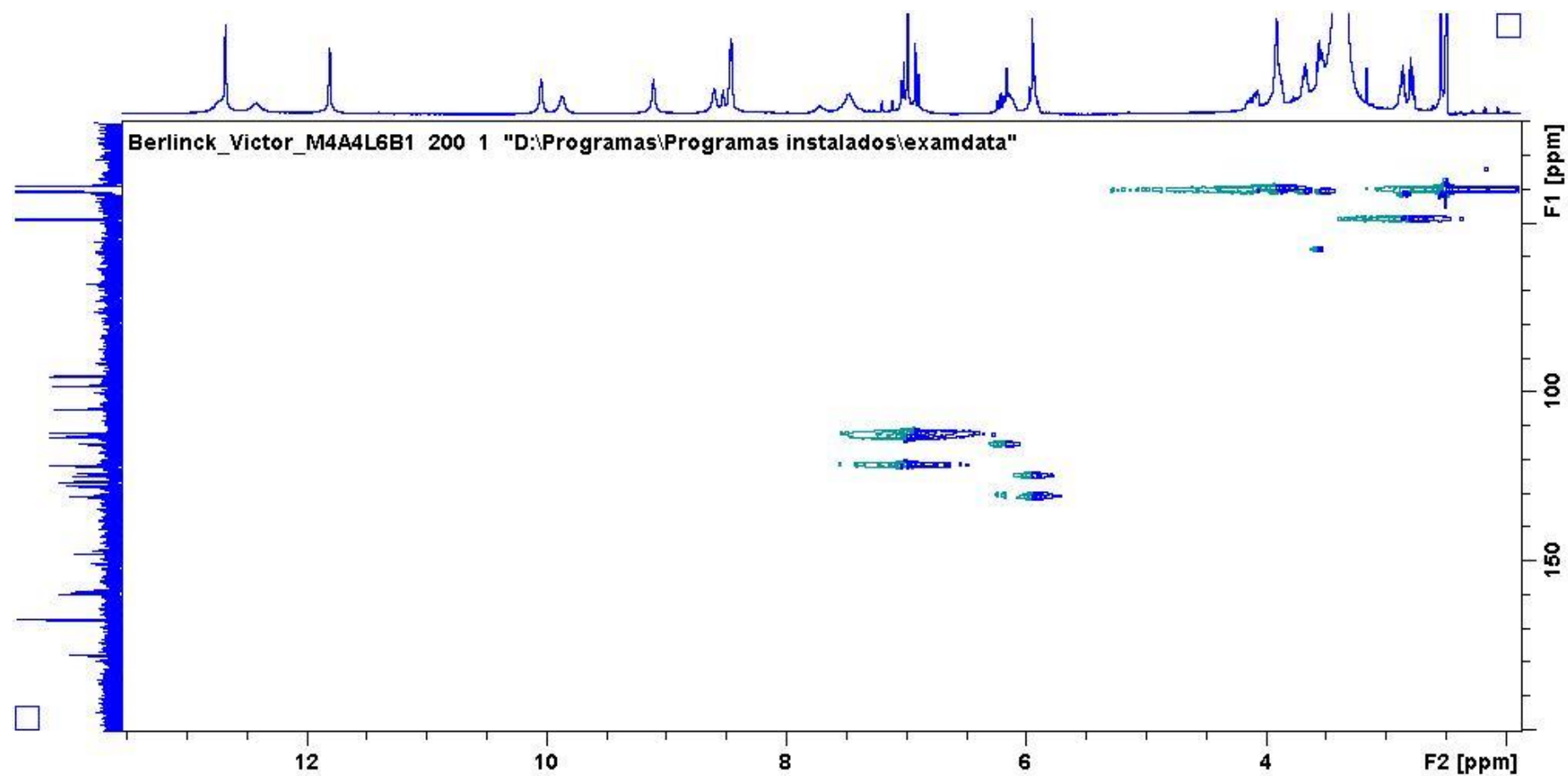
Figura A 121. Espectro HSQC da nagelamida H2/H3 (12/13) (600 MHz, em DMSO- d_6).

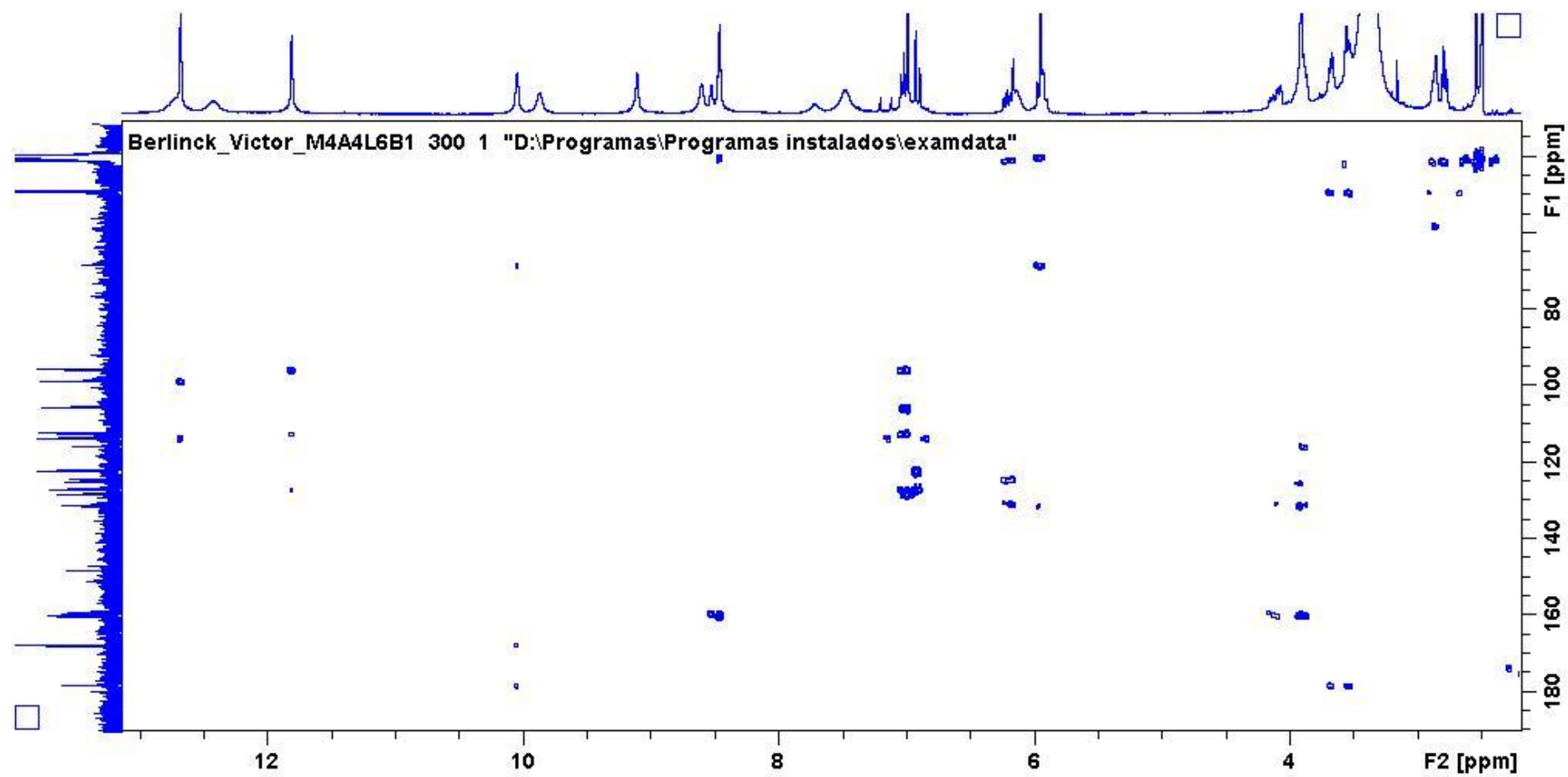
Figura A 122. Espectro HMBC da nagelamida H2/H3 (12/13) (600 MHz, em DMSO- d_6).

Figura A 123. Espectros MS/MS dos compostos nagelamidas H2 e H3 (**12/13**), a partir dos íons precursoros m/z 817,94 e m/z 821,94.

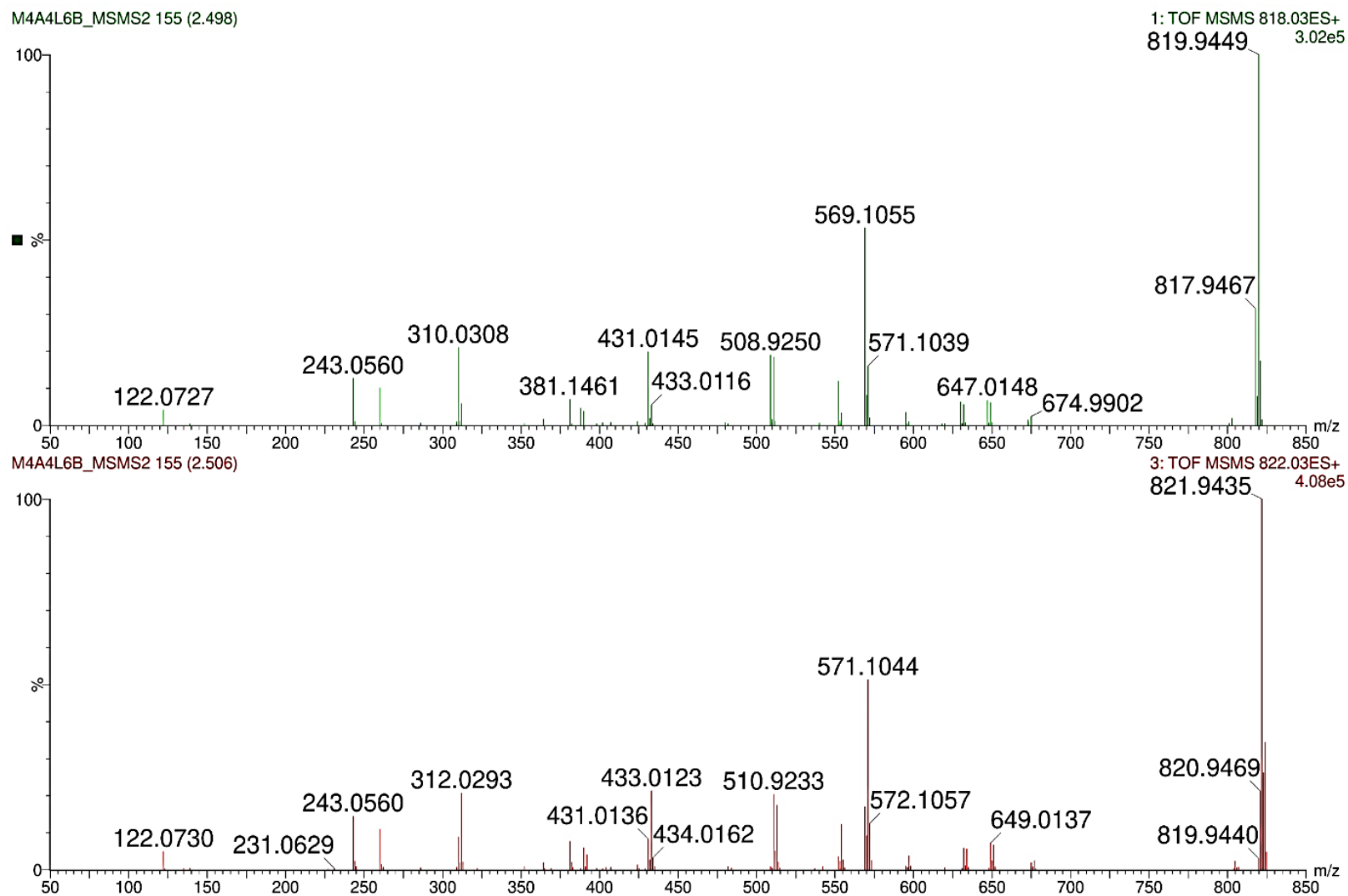


Tabela A 5. Íons observados nos espectros MS/MS do composto nagelamide H2 (**12**) a partir dos íons precursores de m/z 817,94 e m/z 821,94.

Íon fragmento	Fórmula	m/z 817,94			m/z 821,94		
		Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)	Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)
[M + H] ⁺	C ₂₄ H ₂₇ Br ₃ N ₁₁ O ₅ S ⁺	817,9467	0,61	31,35	821,9435	1,58	100,00
		819,9449	0,85	100,00	823,9416	1,82	34,38
A ₁	C ₂₀ H ₂₃ Br ₂ N ₁₀ O ₅ S ⁺	672,9795	-20,80	1,40	674,9964	7,26	1,90
		674,9902	-1,92	2,31	676,9886	-1,18	2,42
A ₂	C ₂₀ H ₂₄ BrN ₁₀ O ₅ S ⁺	595,0803	-4,54	3,45	595,0849	3,12	0,96
		597,0863	8,88	0,95	597,0836	4,35	3,65
B ₁	C ₁₉ H ₂₅ Br ₂ N ₁₀ O ₄ S ⁺	647,0148	0,77	6,69	649,0137	2,31	7,10
		649,0121	-0,15	6,06	651,0100	-0,31	6,66
B ₂	C ₁₉ H ₂₆ BrN ₁₀ O ₄ S ⁺	569,1055	2,99	53,21	569,1051	2,28	16,94
		571,1039	3,85	15,94	571,1044	4,72	51,24
C ₁	C ₁₉ H ₂₂ Br ₂ N ₉ O ₄ S ⁺	629,9861	-2,54	6,27	631,9863	0,95	5,79
		631,9869	1,90	5,56	633,9836	0,00	5,54
C ₂	C ₁₉ H ₂₃ BrN ₉ O ₄ S ⁺	552,0787	2,72	11,86	552,0795	4,17	3,55
		554,0745	-1,26	3,27	554,0762	1,80	12,16
D	C ₁₃ H ₁₅ Br ₂ N ₆ O ₄ S ⁺	508,9250	2,55	18,90	510,9233	3,32	20,28
		510,9230	2,74	18,33	512,9215	3,70	17,38
E	C ₁₁ H ₁₃ BrN ₅ O ⁺	310,0308	3,22	20,99	310,0311	4,19	8,78
		312,0280	0,64	5,86	312,0293	4,81	20,68

F ₁ /F ₂	C ₁₄ H ₂₁ N ₈ O ₃ S ⁺	381,1431	2,36	6,96	381,1461	2,36	7,56
G	C ₈ H ₁₄ N ₅ O ₃ S ⁺	260,0824	4,61	10,03	260,0828	6,15	10,91
H	C ₈ H ₁₁ N ₄ O ₃ S ⁺	243,0560	5,76	12,61	243,0560	5,76	14,40
I	C ₆ H ₈ N ₃ ⁺	122,0727	11,47	4,03	122,0730	13,93	4,89

Tabela A 6. Íons observados nos espectros MS/MS do composto nagelamide H3 (**13**) a partir dos íons precursores de m/z 817,94 e m/z 821,94.

Íon fragmento	Fórmula	m/z 817,94			m/z 821,94		
		Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)	Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)
[M + H] ⁺	C ₂₄ H ₂₇ Br ₃ N ₁₁ O ₅ S ⁺	817,9467	0,61	31,35	821,9435	1,58	100,00
		819,9449	0,85	100,00	823,9416	1,82	34,38
A ₁	C ₂₀ H ₂₄ BrN ₁₀ O ₅ S ⁺	595,0803	-4,54	3,45	595,0849	3,12	0,96
		597,0863	8,88	0,95	597,0836	4,35	3,65
A ₂	C ₂₀ H ₂₃ Br ₂ N ₁₀ O ₅ S ⁺	672,9795	-20,80	1,40	674,9964	7,26	1,90
		674,9902	-1,92	2,31	676,9886	-1,18	2,42
B ₁	C ₁₉ H ₂₆ BrN ₁₀ O ₄ S ⁺	569,1055	2,99	53,21	569,1051	2,28	16,94
		571,1039	3,85	15,94	571,1044	4,72	51,24
B ₂	C ₁₉ H ₂₅ Br ₂ N ₁₀ O ₄ S ⁺	647,0148	0,77	6,69	649,0137	2,31	7,10
		649,0121	-0,15	6,06	651,0100	-0,31	6,66
C ₁	C ₁₉ H ₂₃ BrN ₉ O ₄ S ⁺	552,0787	2,72	11,86	552,0795	4,17	3,55
		554,0745	-1,26	3,27	554,0762	1,80	12,16
C ₂	C ₁₉ H ₂₂ Br ₂ N ₉ O ₄ S ⁺	629,9861	-2,54	6,27	631,9863	0,95	5,79
		631,9869	1,90	5,56	633,9836	0,00	5,54
D	C ₁₃ H ₁₆ BrN ₆ O ₄ S ⁺	431,0145	3,02	19,81	431,0136	0,93	8,24
		433,0116	0,92	5,43	433,0123	2,54	21,27
E	C ₁₁ H ₁₂ Br ₂ N ₅ O ⁺	387,9406	0,51	4,58	389,9390	1,79	5,89
		389,9382	-0,26	3,75	391,9377	3,57	4,01

F ₁ /F ₂	C ₁₄ H ₂₁ N ₈ O ₃ S ⁺	381,1431	2,36	6,96	381,1461	2,36	7,56
G	C ₈ H ₁₄ N ₅ O ₃ S ⁺	260,0824	4,61	10,03	260,0828	6,15	10,91
H	C ₈ H ₁₁ N ₄ O ₃ S ⁺	243,0560	5,76	12,61	243,0560	5,76	14,40
I	C ₆ H ₈ N ₃ ⁺	122,0727	11,47	4,03	122,0730	13,93	4,89

Figura A 124. Espectro de IV de nagelamida H2/H3 (12/13) em filme em pastilha de Si.

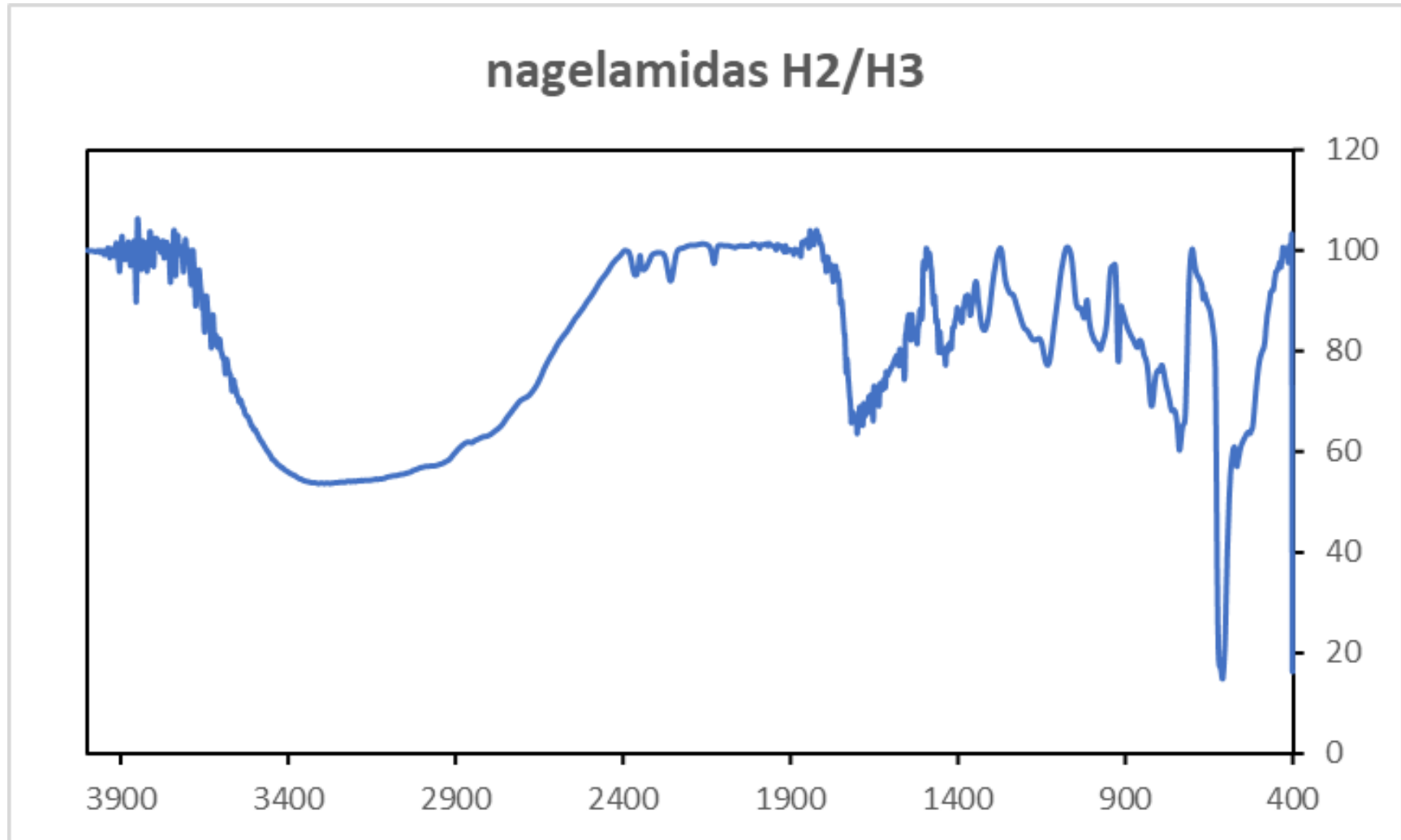


Figura A 125. Espectro MS do composto citrinamina B (14).

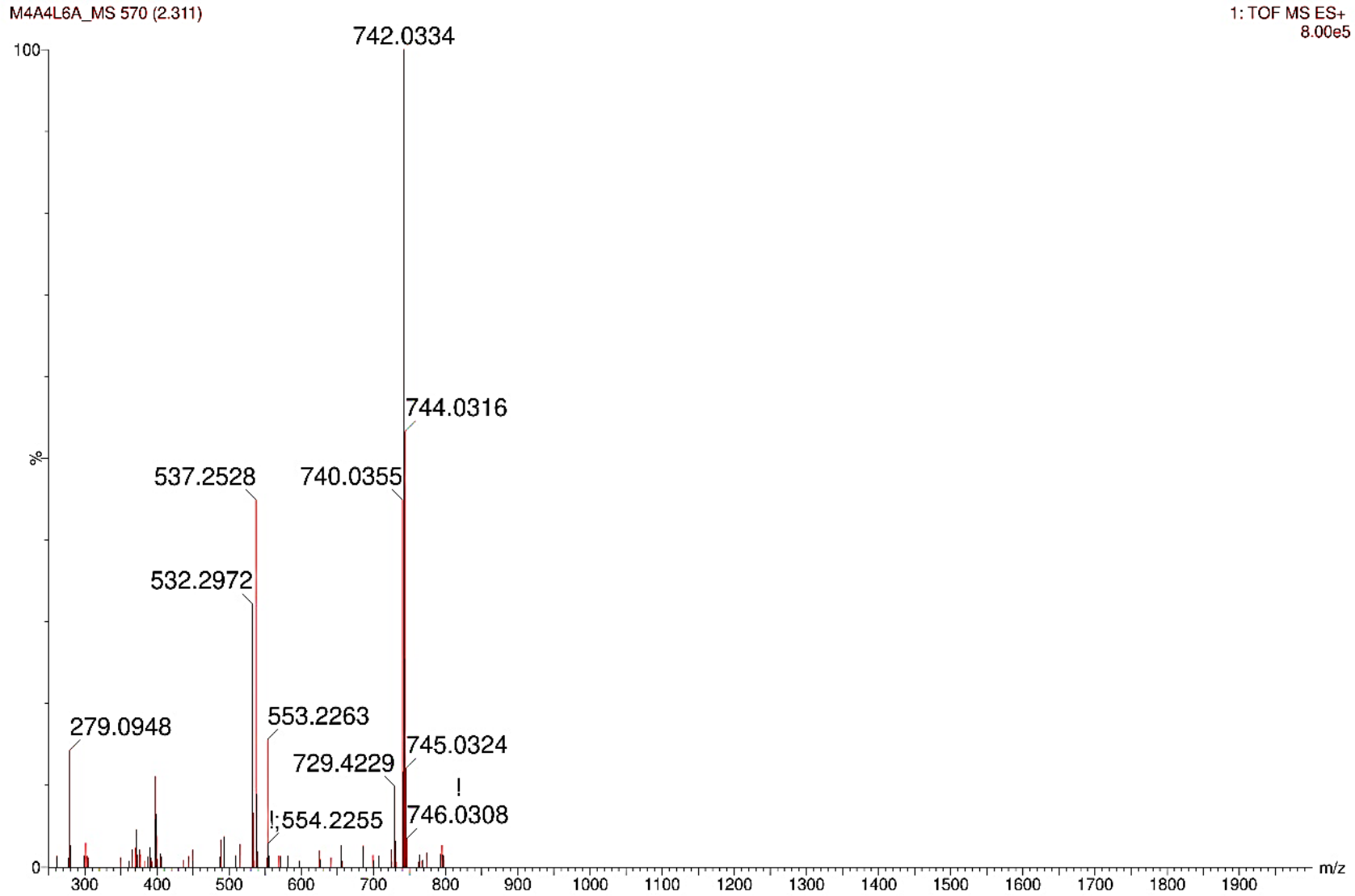


Figura A 126. Expansão do espectro MS do composto citrinamina B (14).

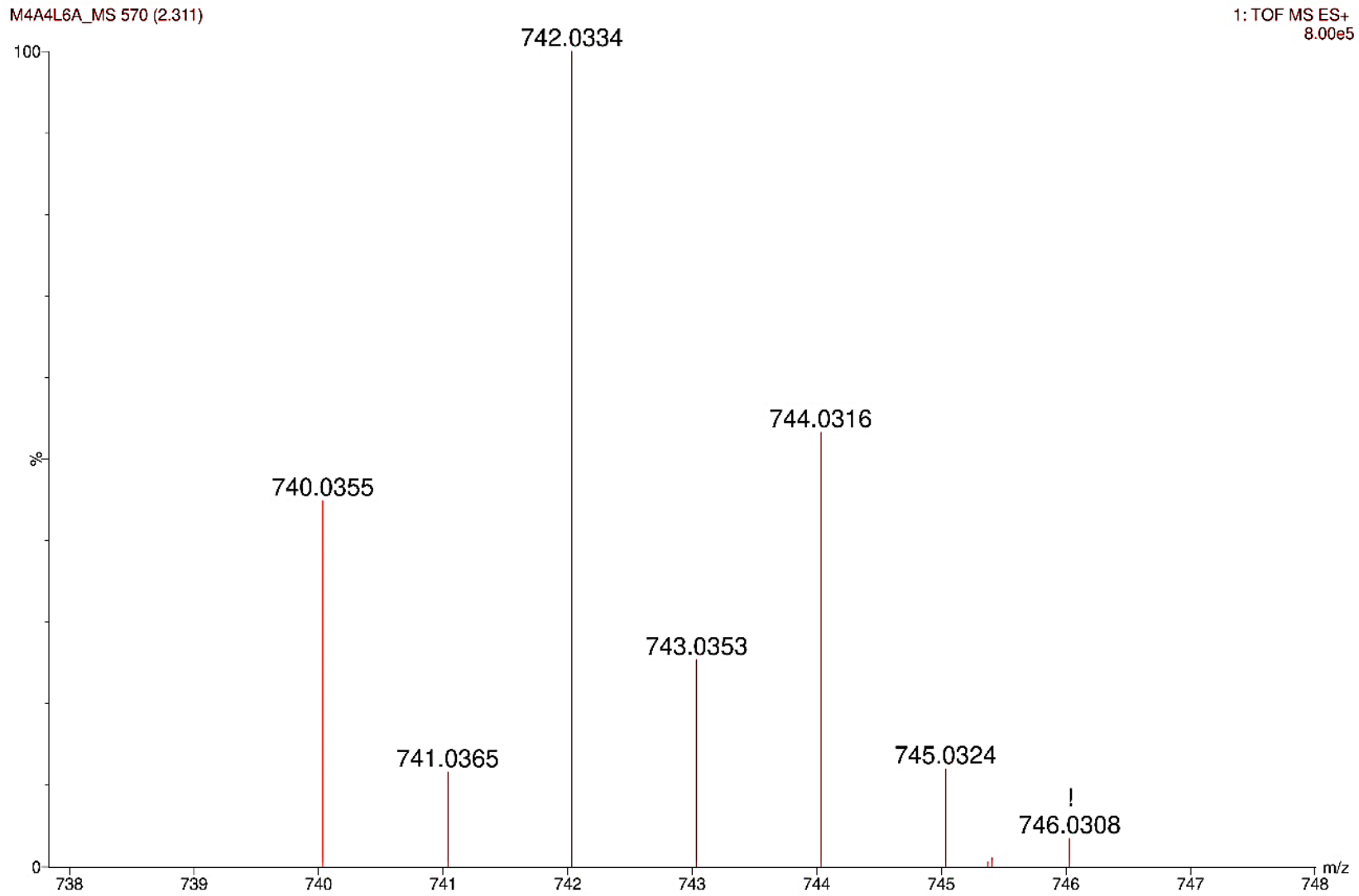


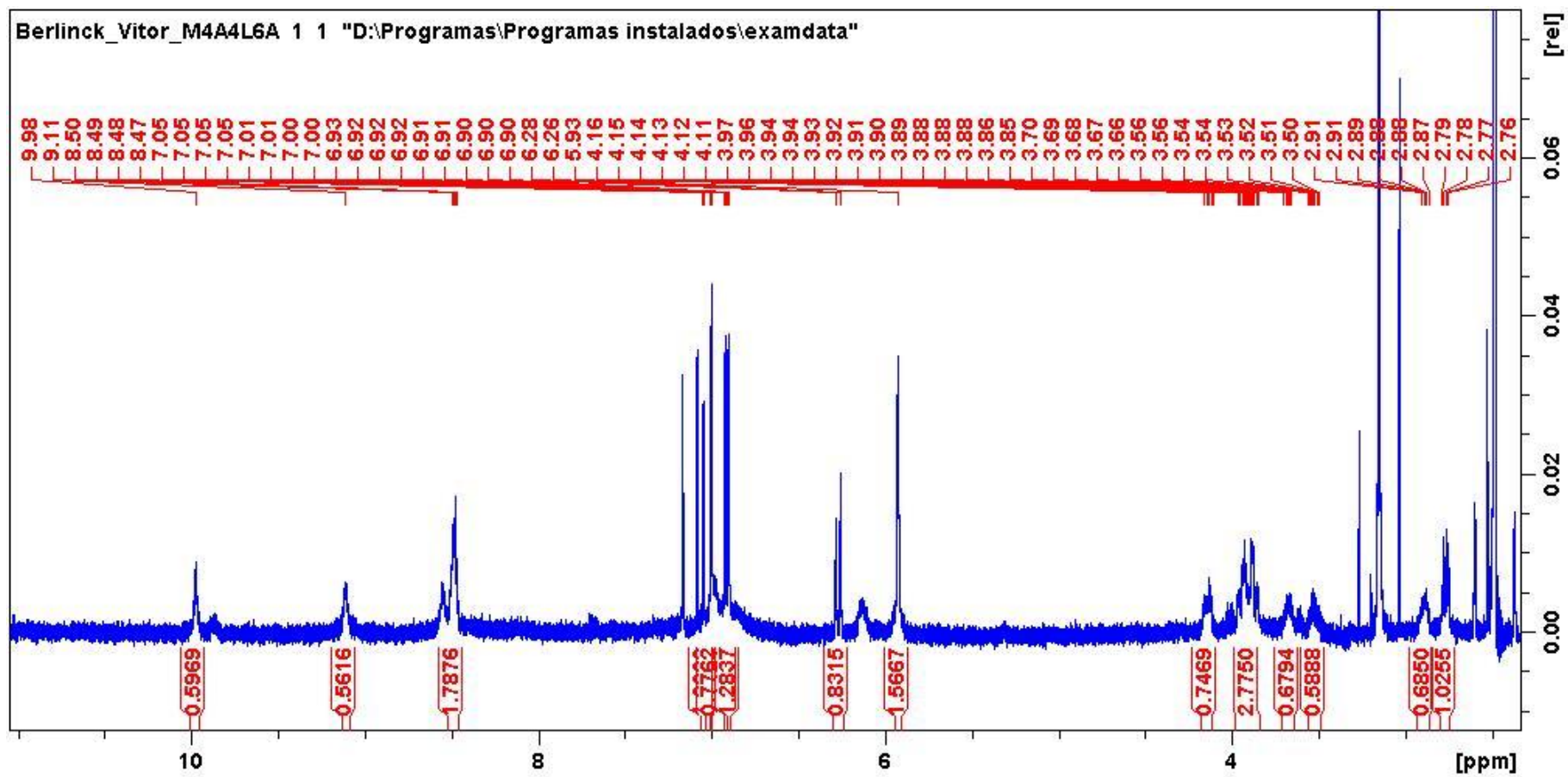
Figura A 127. Espectro de RMN de ^1H da citrinamina B (**14**) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

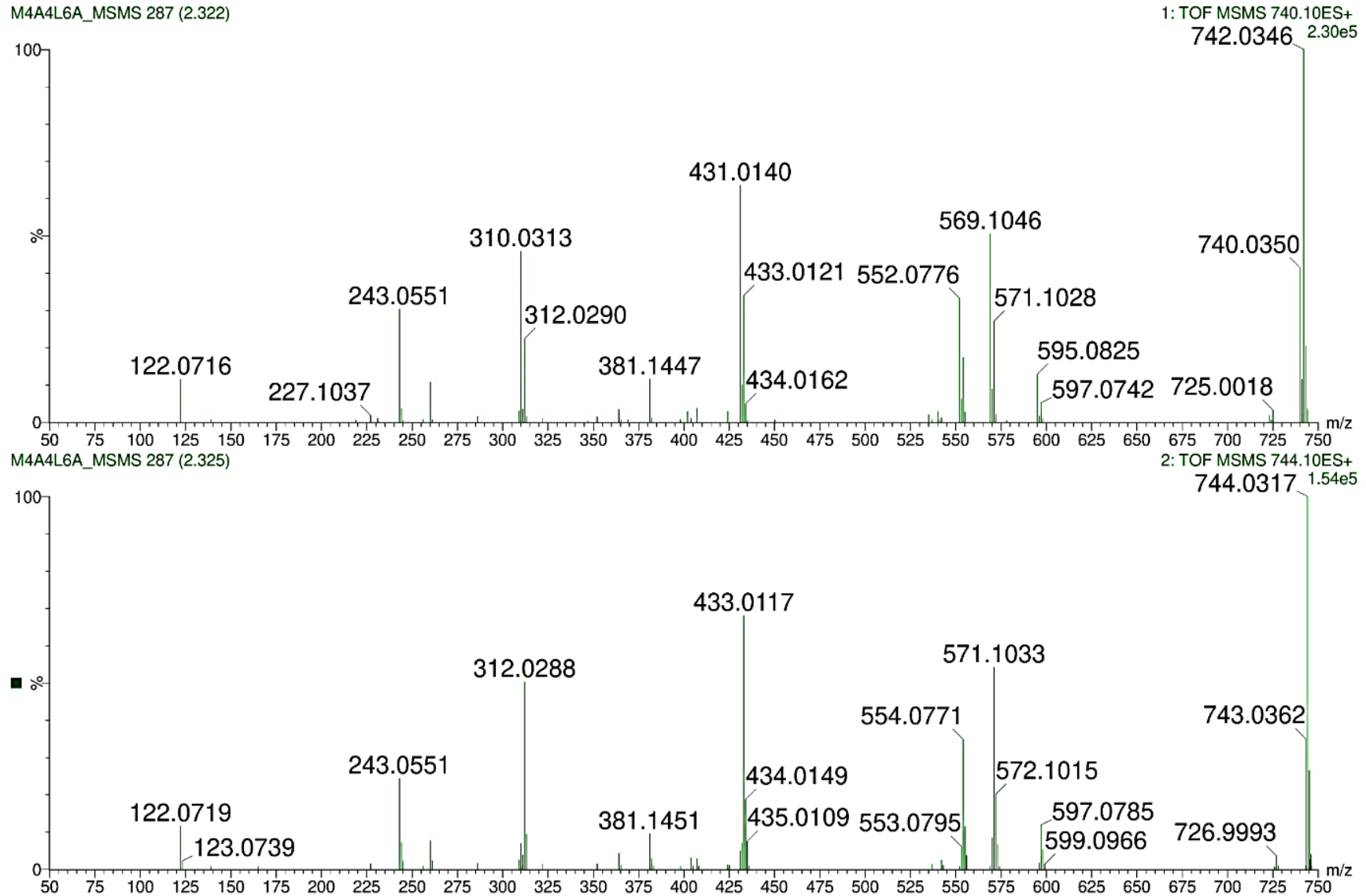
Figura A 128. Espectro MS/MS do composto citrinamina B (14), a partir dos íons precursoros m/z 740,03 e m/z 744,03.

Tabela A 7. Íons observados nos espectros MS/MS do composto citrinamina B (**14**) a partir dos íons precursores de m/z 740,03 e m/z 744,03.

Íon fragmento	Fórmula	m/z 740,03			m/z 744,03		
		Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)	Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)
[M + H] ⁺	C ₂₄ H ₂₈ Br ₂ N ₁₁ O ₅ S ⁺	740,0355	-0,27	41,58	744,0317	0,13	100,00
		742,0352	2,02	100,00			
A ₁ /A ₂	C ₂₀ H ₂₄ BrN ₁₀ O ₅ S ⁺	595,0831	0,17	12,92	597,0785	-4,19	11,87
		597,0819	1,51	6,96			
B ₁ /B ₂	C ₁₉ H ₂₆ BrN ₁₀ O ₄ S ⁺	569,1058	3,51	49,11	571,1033	2,80	54,16
		571,1025	1,40	26,74			
C ₁ /C ₂	C ₁₉ H ₂₃ BrN ₉ O ₄ S ⁺	552,0780	1,45	30,26	554,0771	3,43	34,76
		554,0778	4,69	17,43			
D	C ₁₃ H ₁₆ BrN ₆ O ₄ S ⁺	431,0143	2,55	60,91	433,0117	1,15	68,00
		433,0119	1,62	31,54			
E	C ₁₁ H ₁₃ BrN ₅ O ⁺	310,0311	4,19	42,84	312,0288	3,20	50,23
		312,0287	2,88	20,65			
F ₁ /F ₂	C ₁₄ H ₂₁ N ₈ O ₃ S ⁺	381,1452	0,00	11,91	381,1451	-0,26	9,43
G	C ₈ H ₁₄ N ₅ O ₃ S ⁺	260,0817	1,92	10,18	260,0811	-0,38	7,55
H	C ₈ H ₁₁ N ₄ O ₃ S ⁺	243,0554	3,29	29,51	243,0551	2,06	24,28
I	C ₆ H ₈ N ₃ ⁺	122,0720	5,73	10,20	122,0719	4,91	11,56

Figura A 129. Espectro MS da dispirina B (15).

M4A3GEA3_MS 591 (2.405)

1: TOF MS ES+
3.02e6

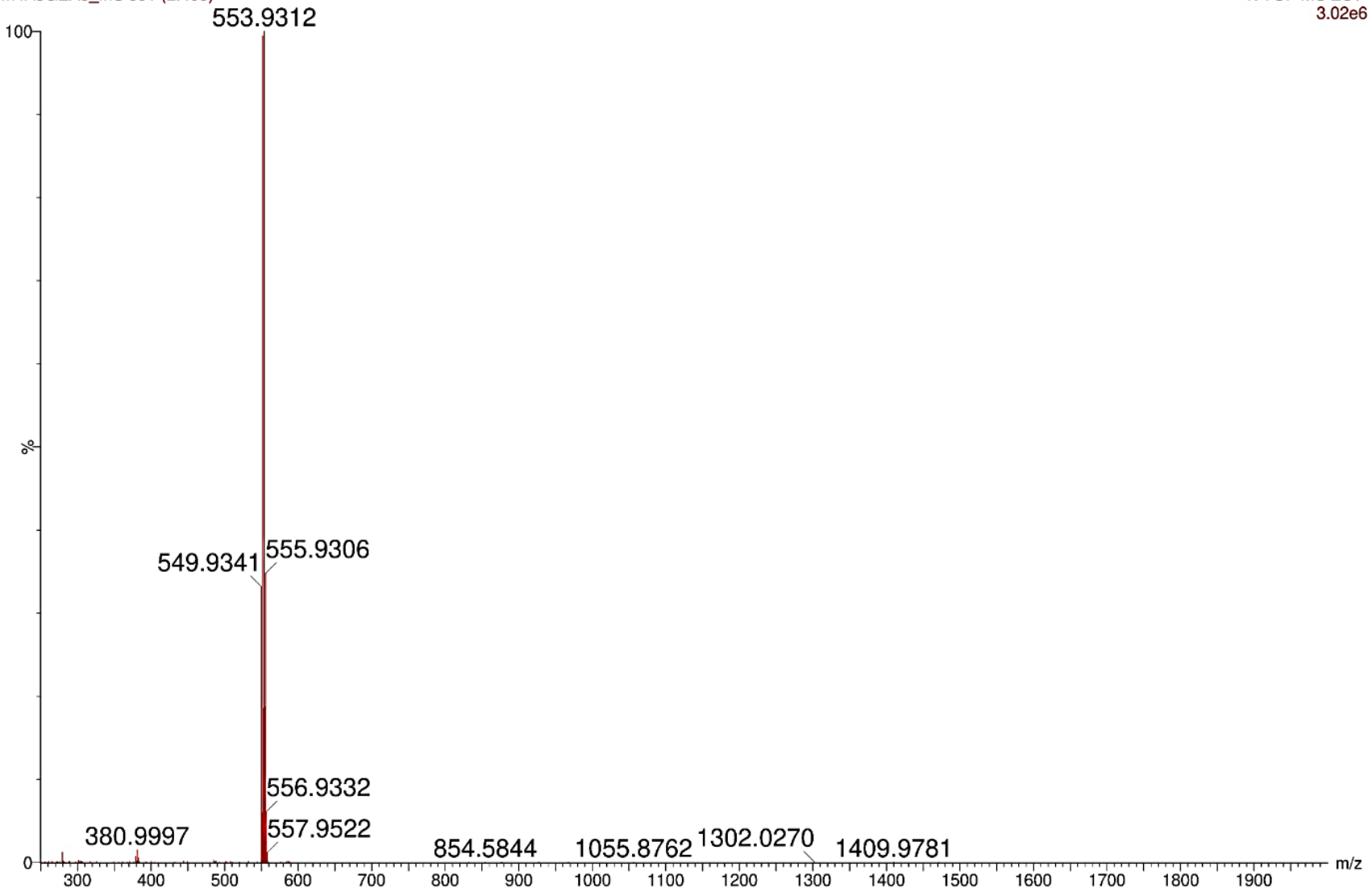


Figura A 130. Expansão do espectro MS da dispirina B (15).

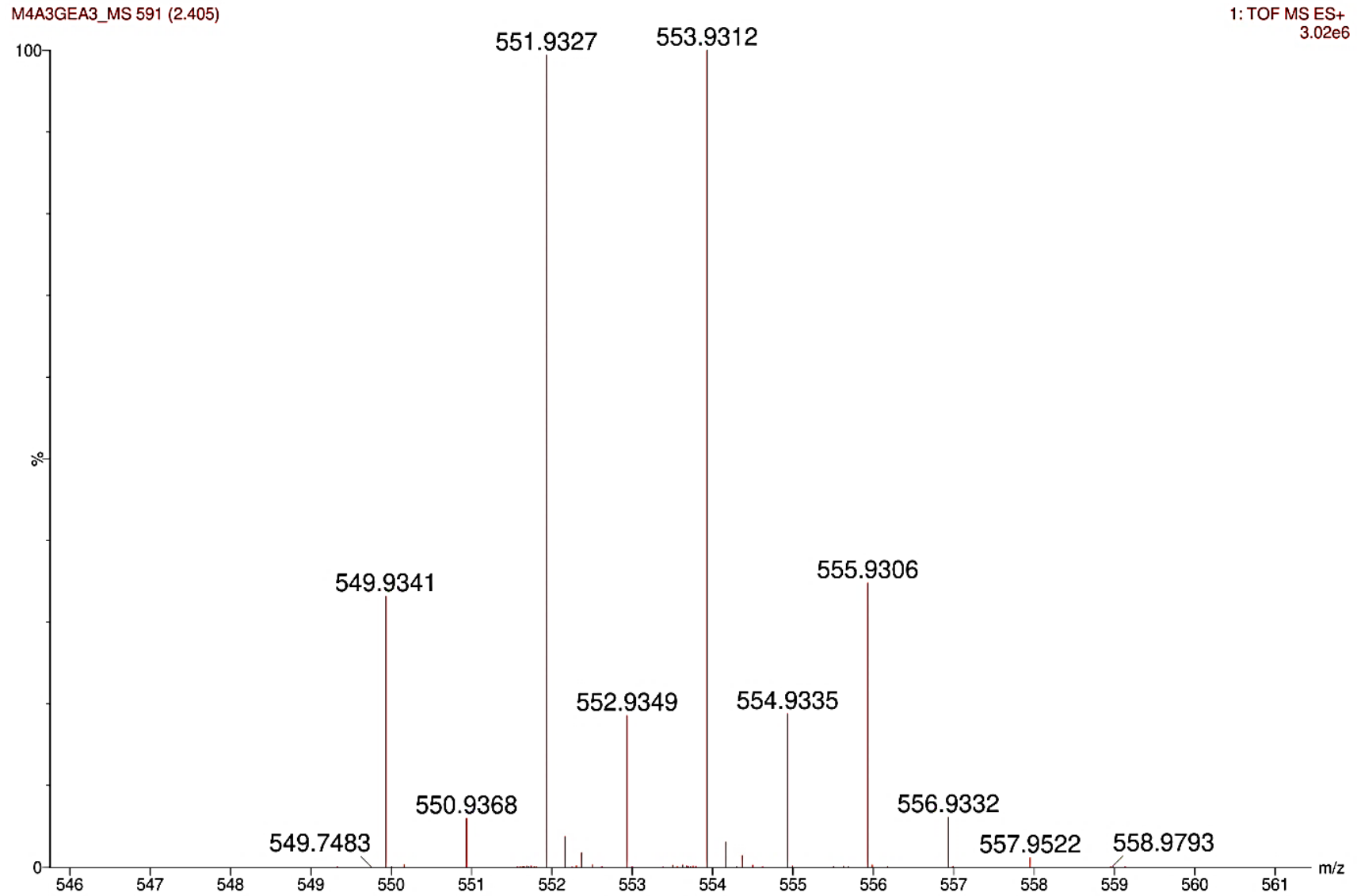


Figura A 131. Espectros MS/MS da dispirina B (15).

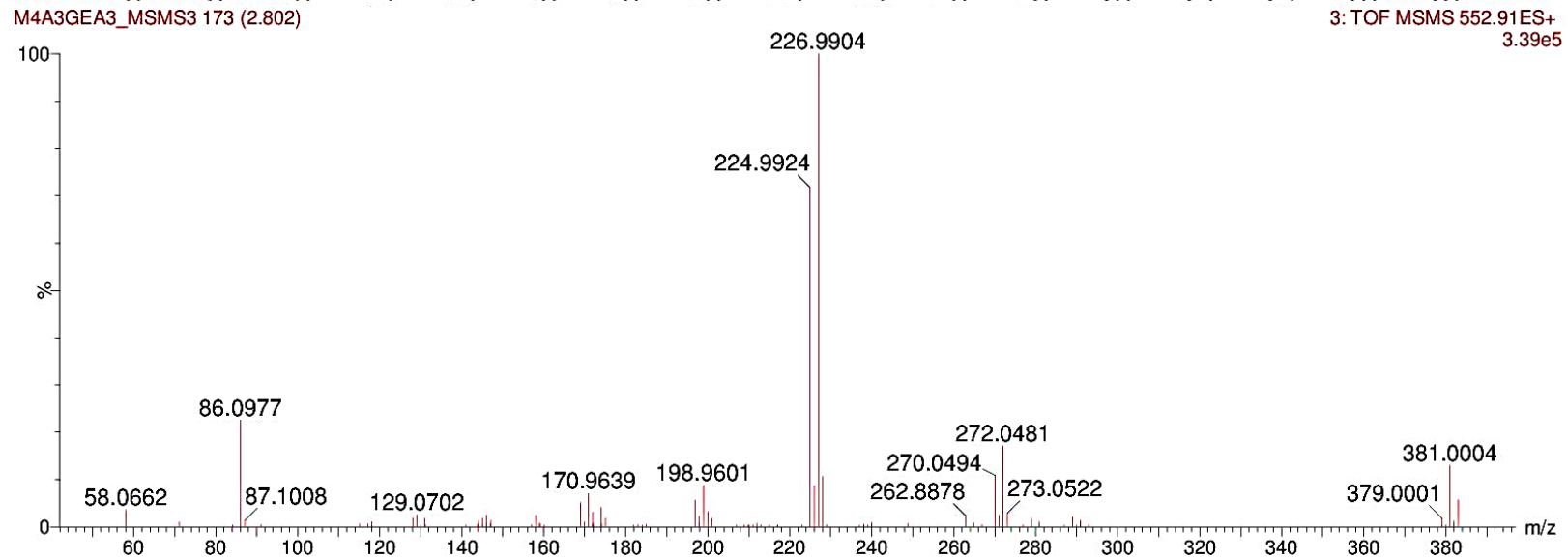
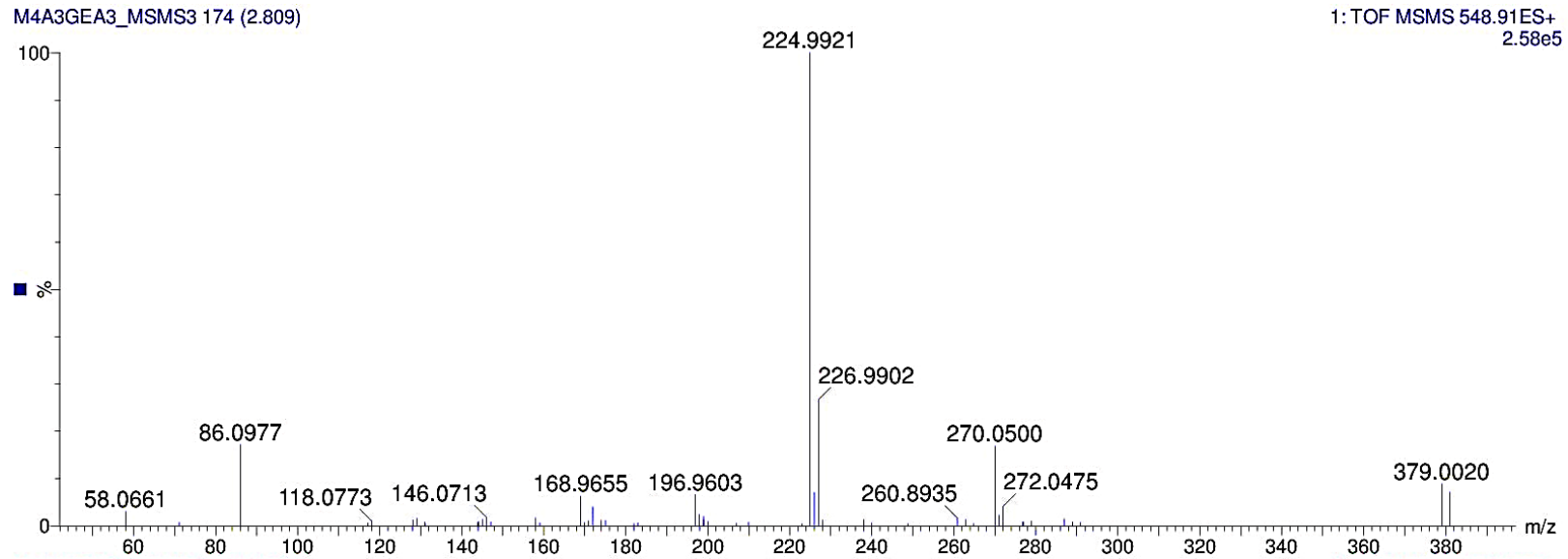


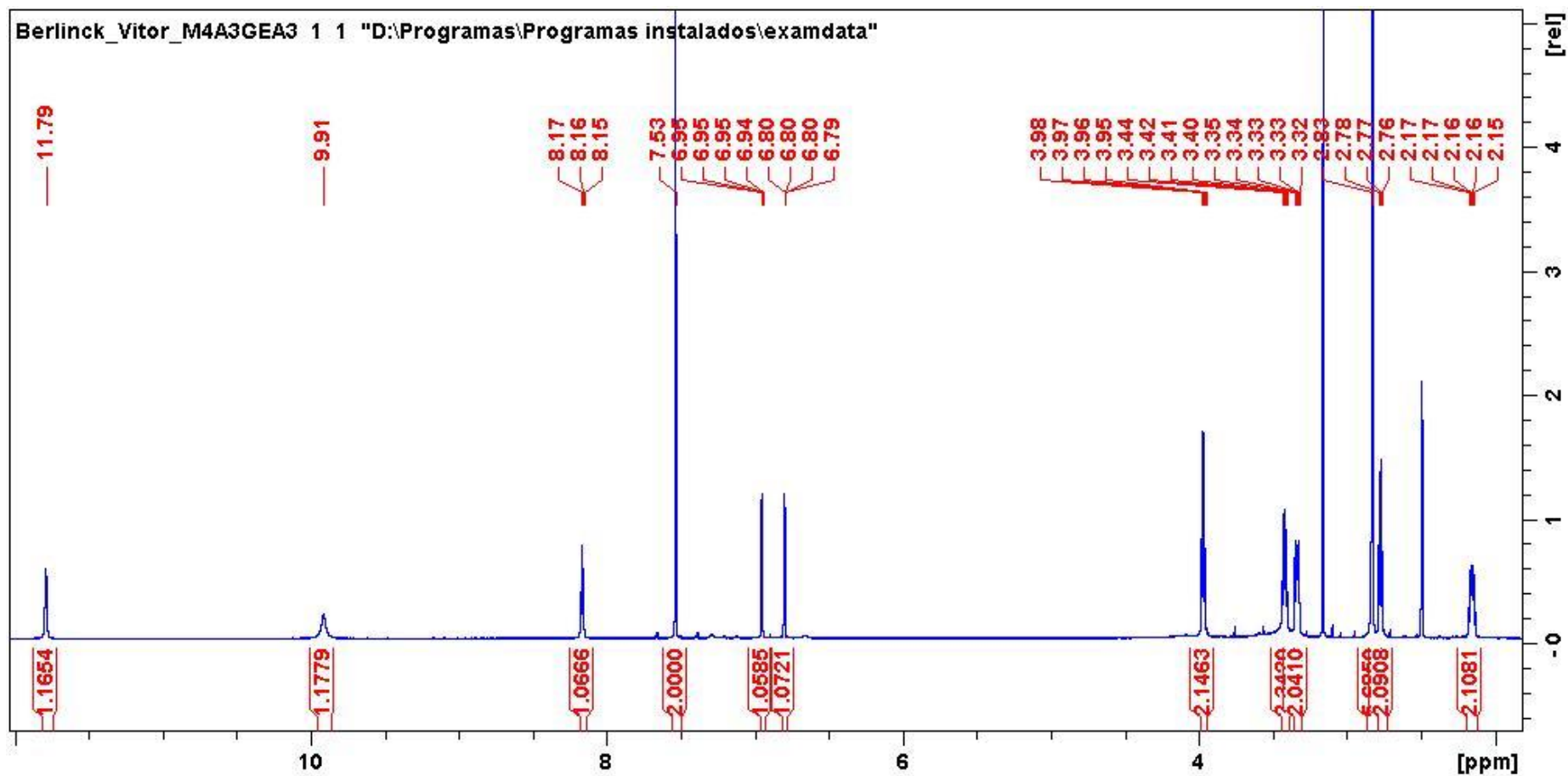
Figura A 132. Espectro de RMN de ^1H da dispirina B (15) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

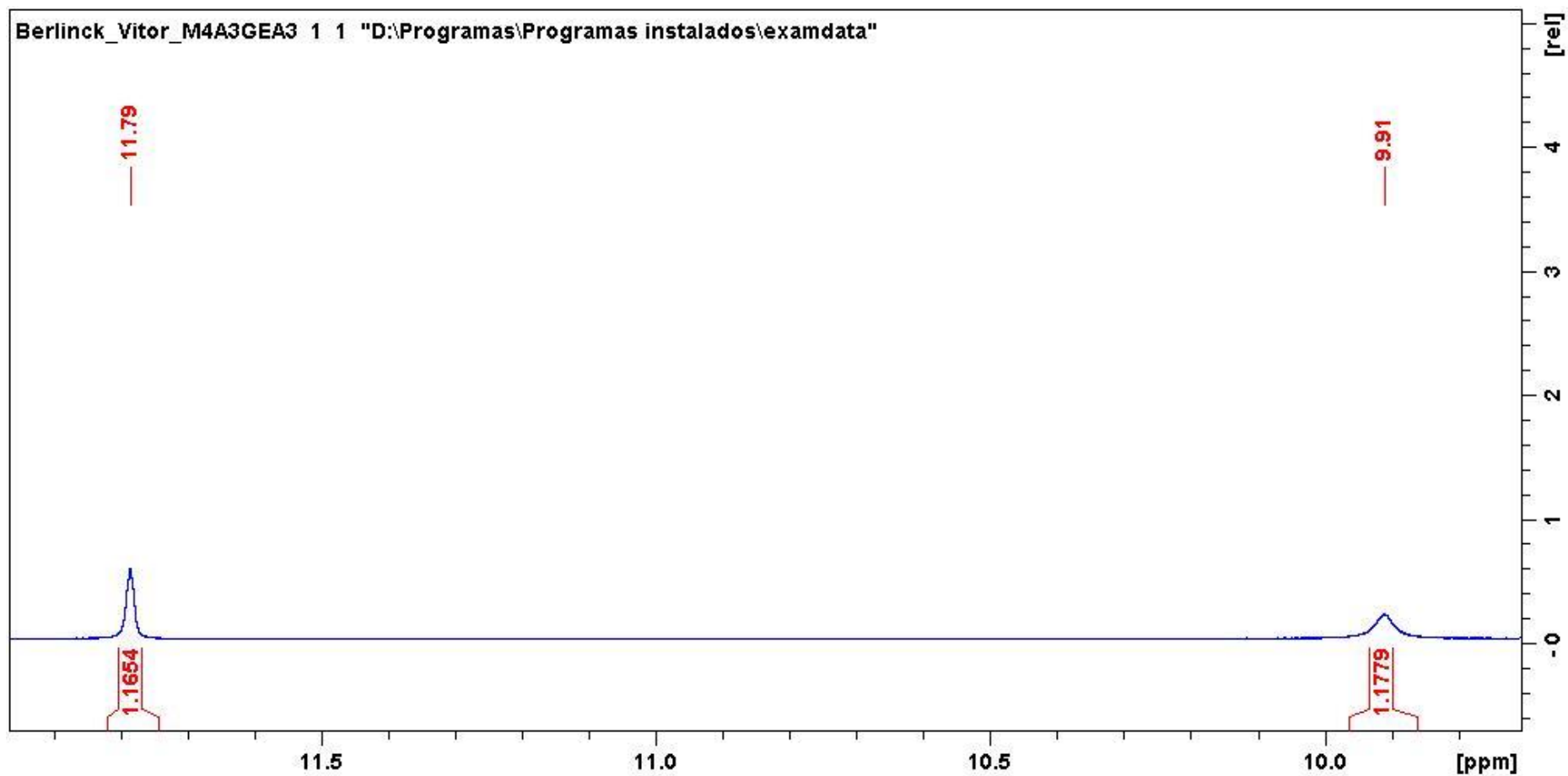
Figura A 133. Expansão do espectro de RMN de ^1H da dispirina B (**15**) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

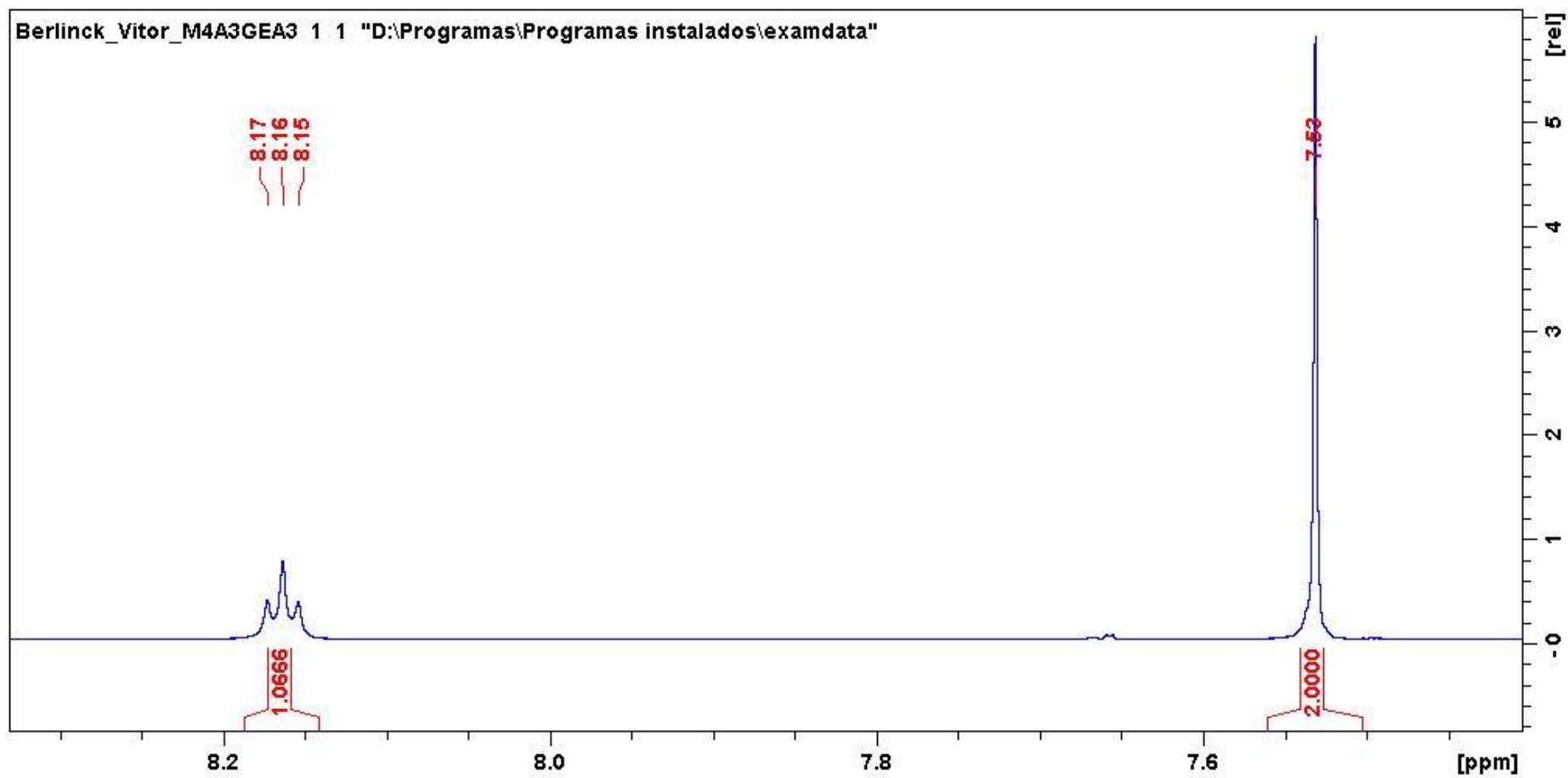
Figura A 134. Expansão do espectro de RMN de ^1H da dispirina B (**15**) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

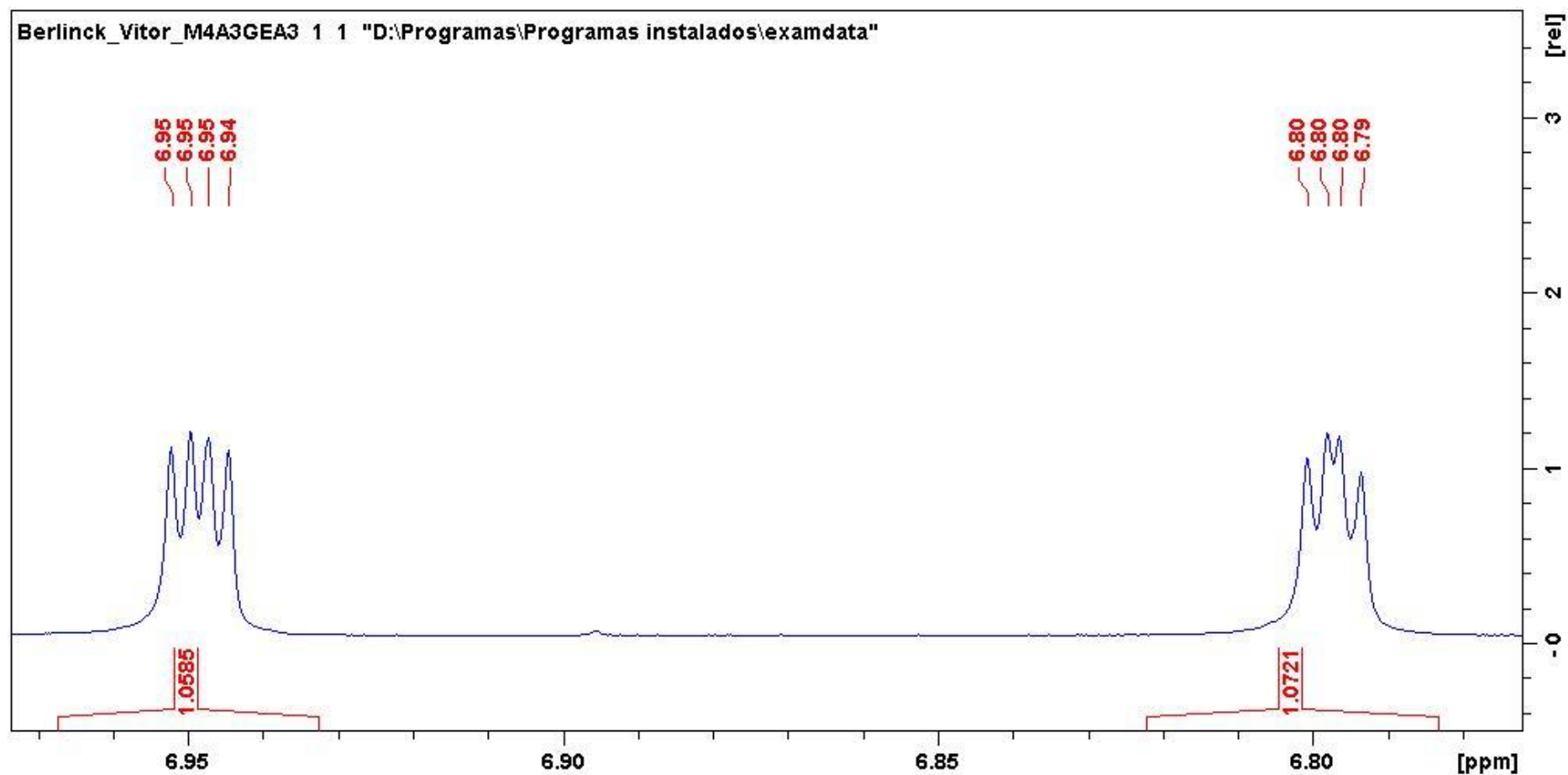
Figura A 135. Expansão do espectro de RMN de ^1H da dispirina B (**15**) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

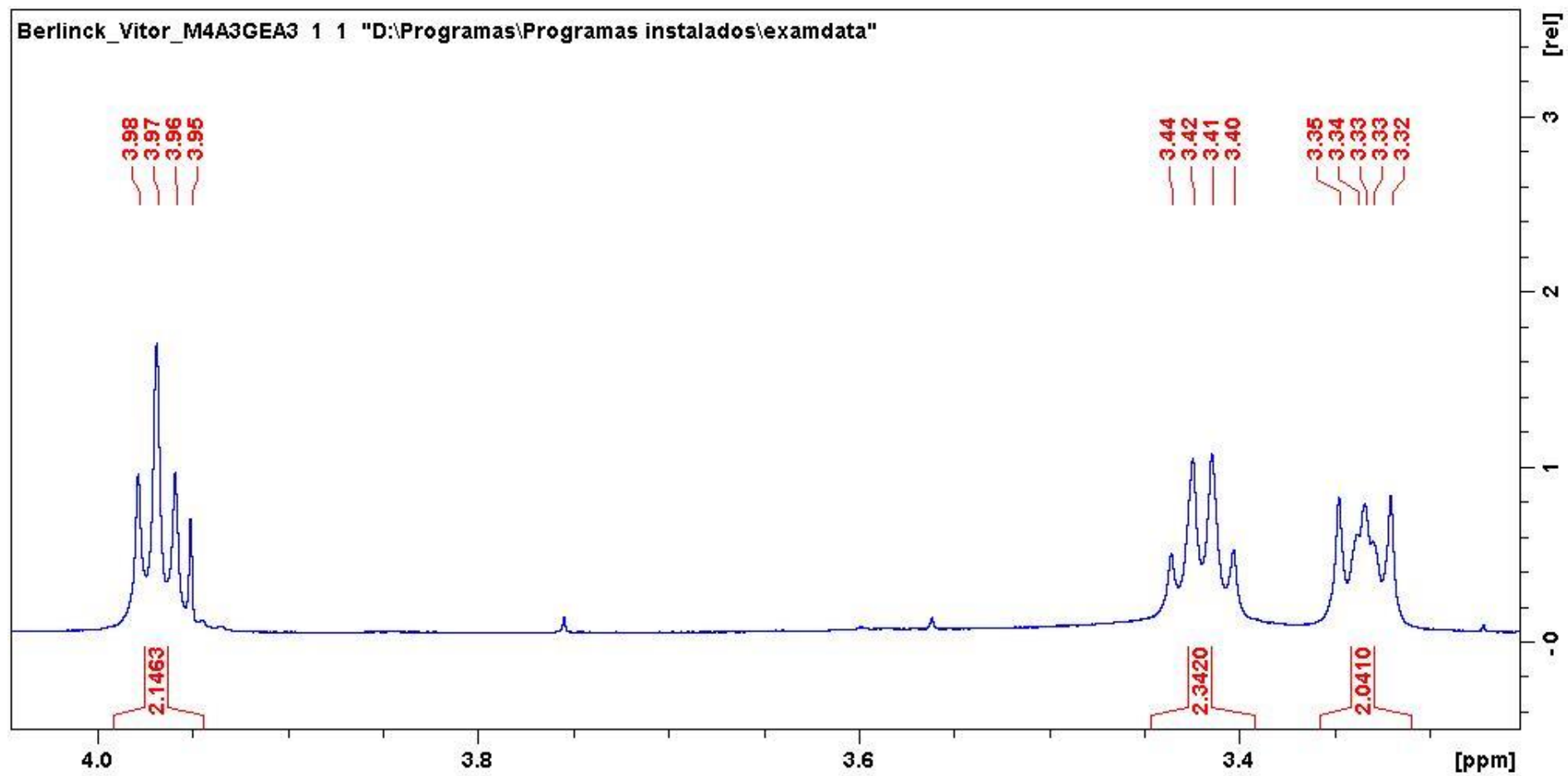
Figura A 136. Expansão do espectro de RMN de ^1H da dispirina B (**15**) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

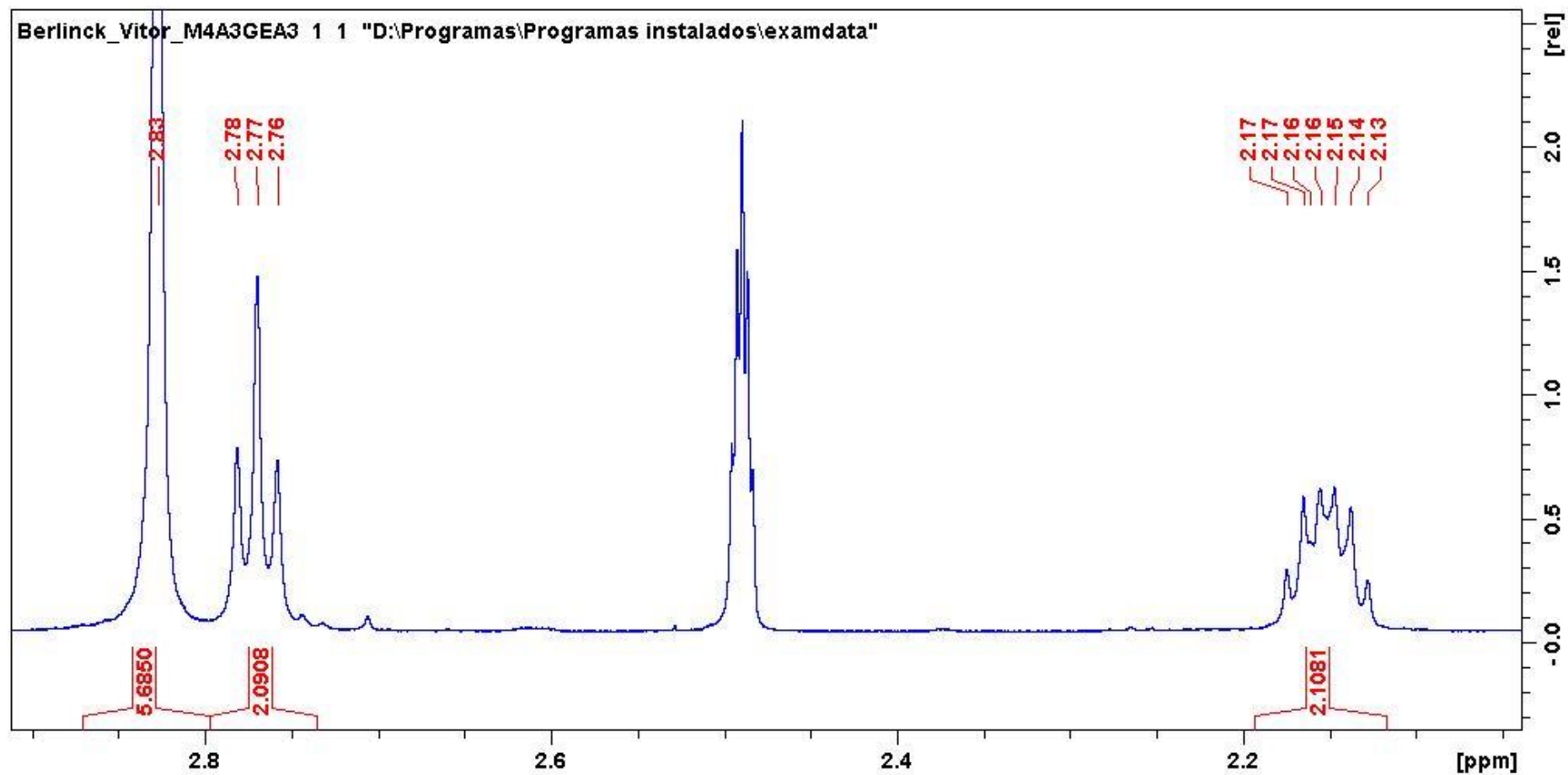
Figura A 137. Expansão do espectro de RMN de ^1H da dispirina B (**15**) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

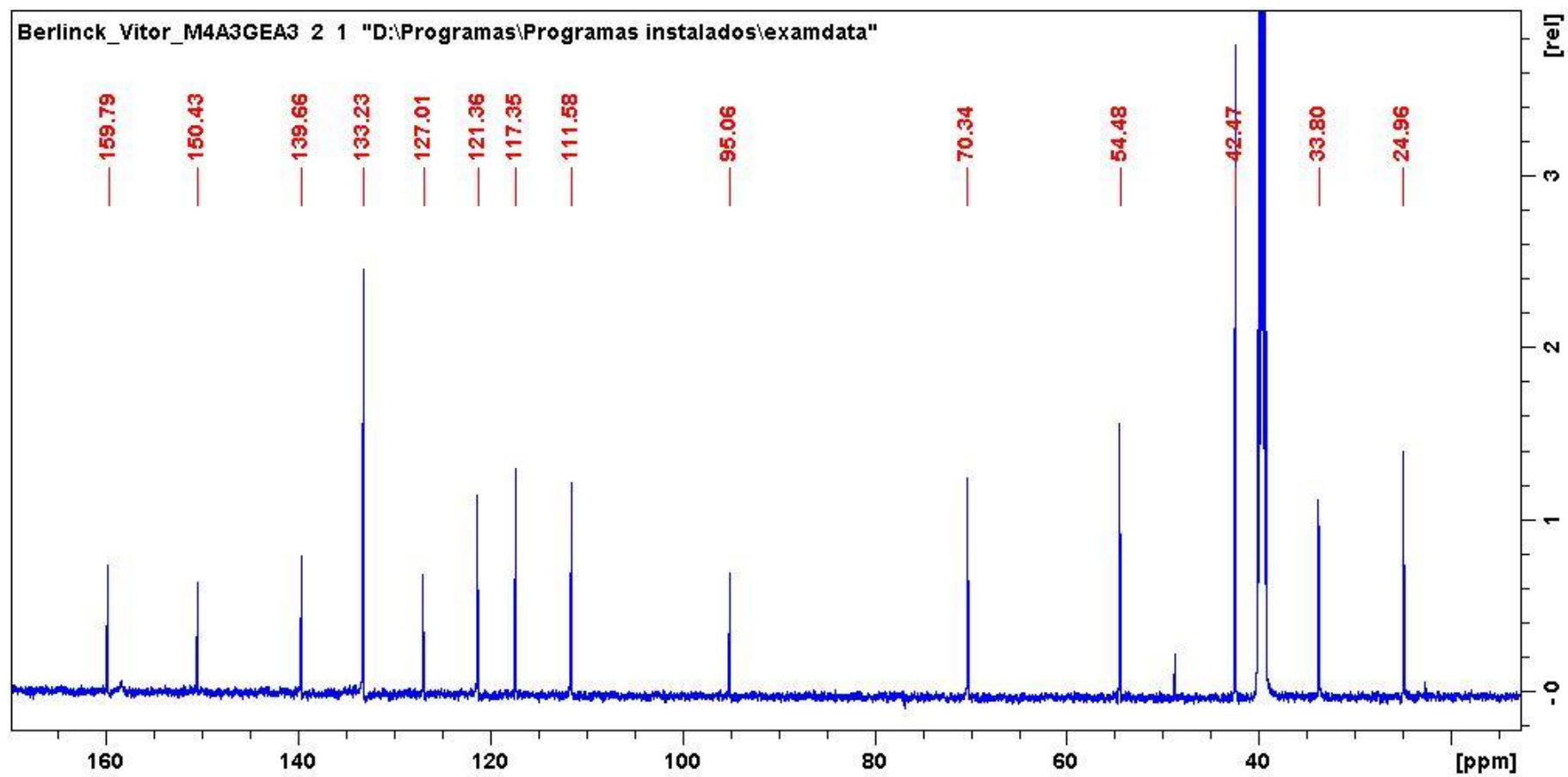
Figura A 138. Espectro de RMN de ^{13}C da dispirina B (15) (150 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

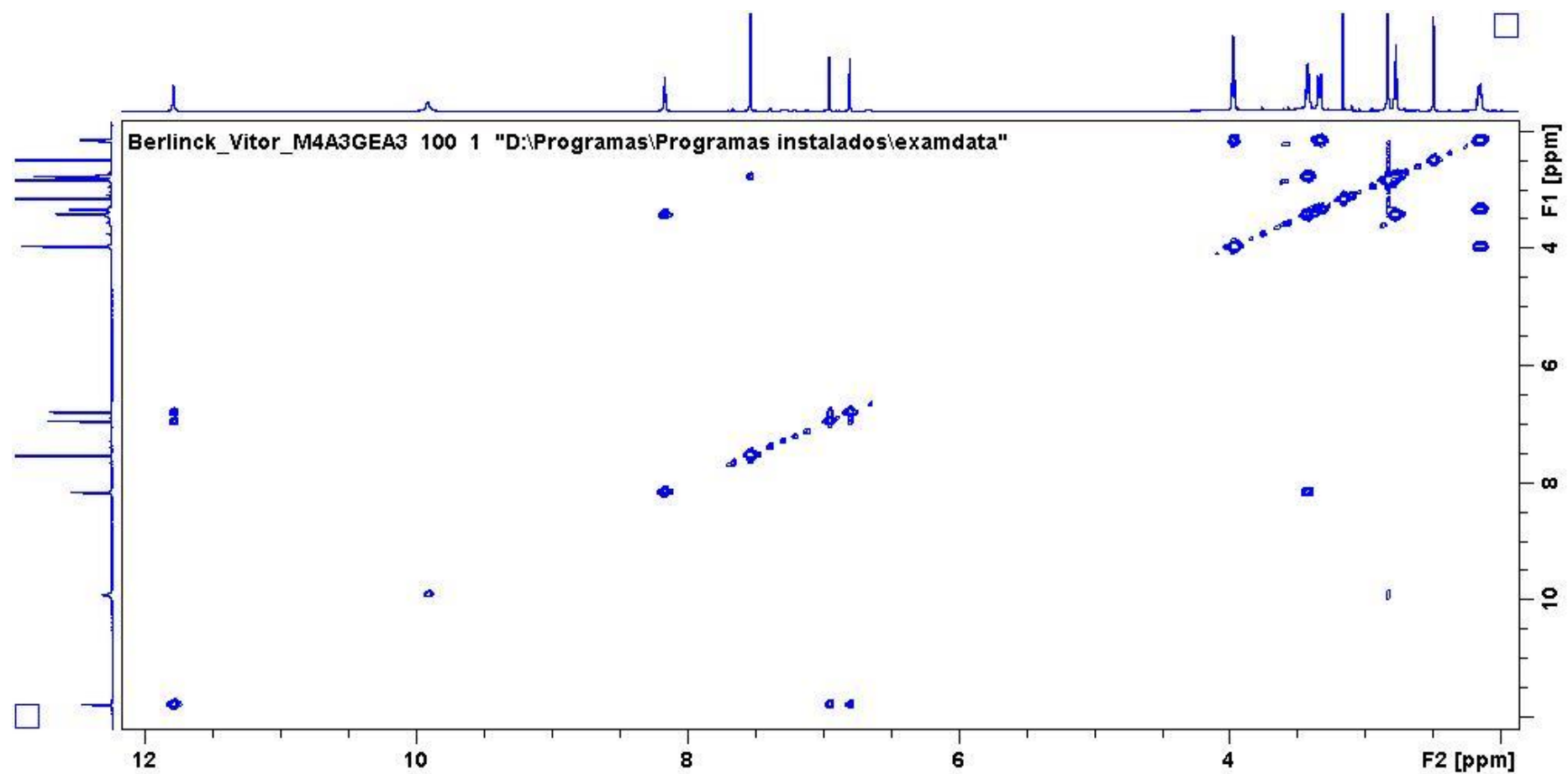
Figura A 139. Espectro de COSY da dispirina B (15) (600 MHz, em DMSO- d_6).

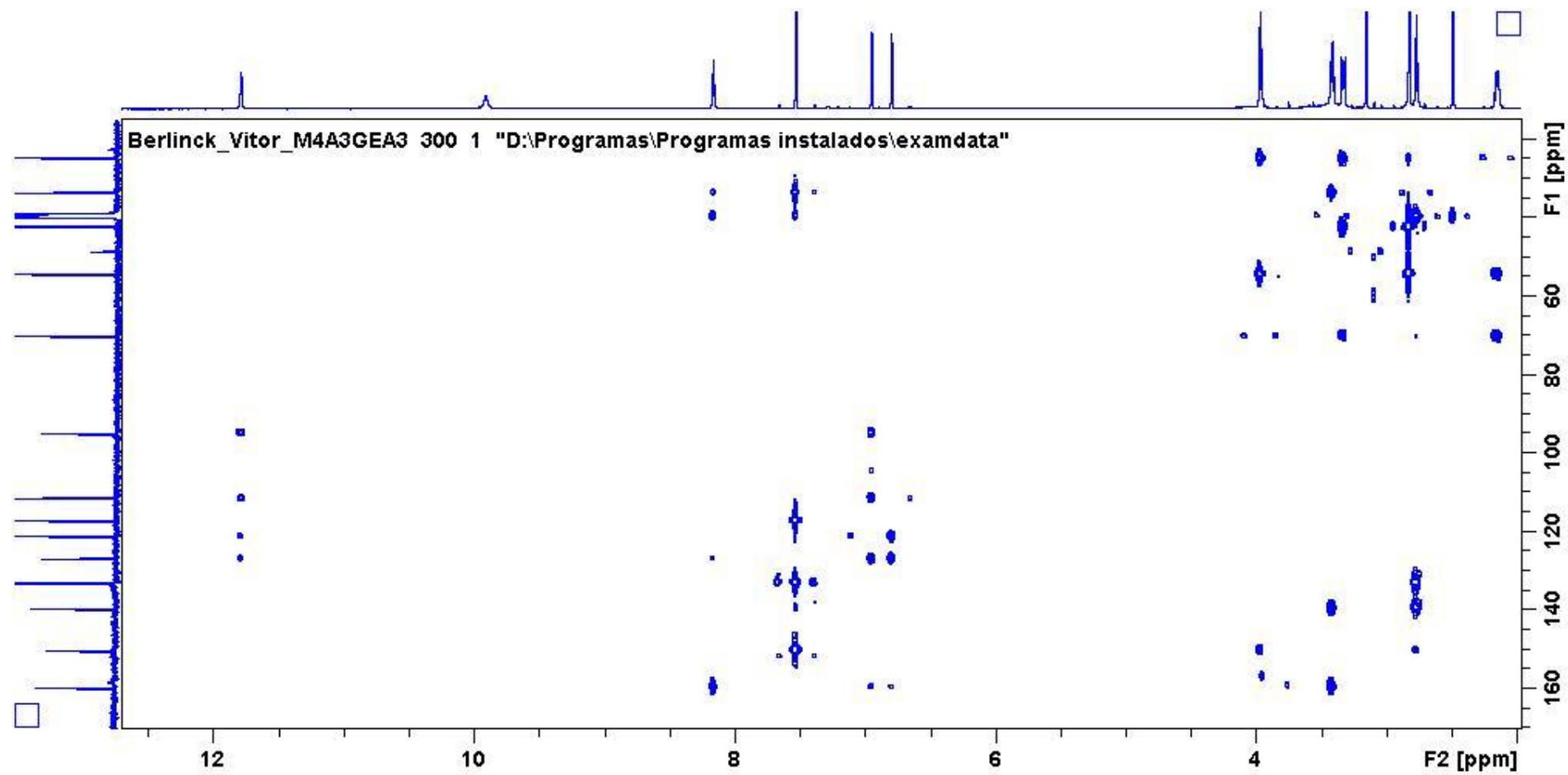
Figura A 140. Espectro de HMBC da dispirina B (15) (600 MHz, em DMSO- d_6).

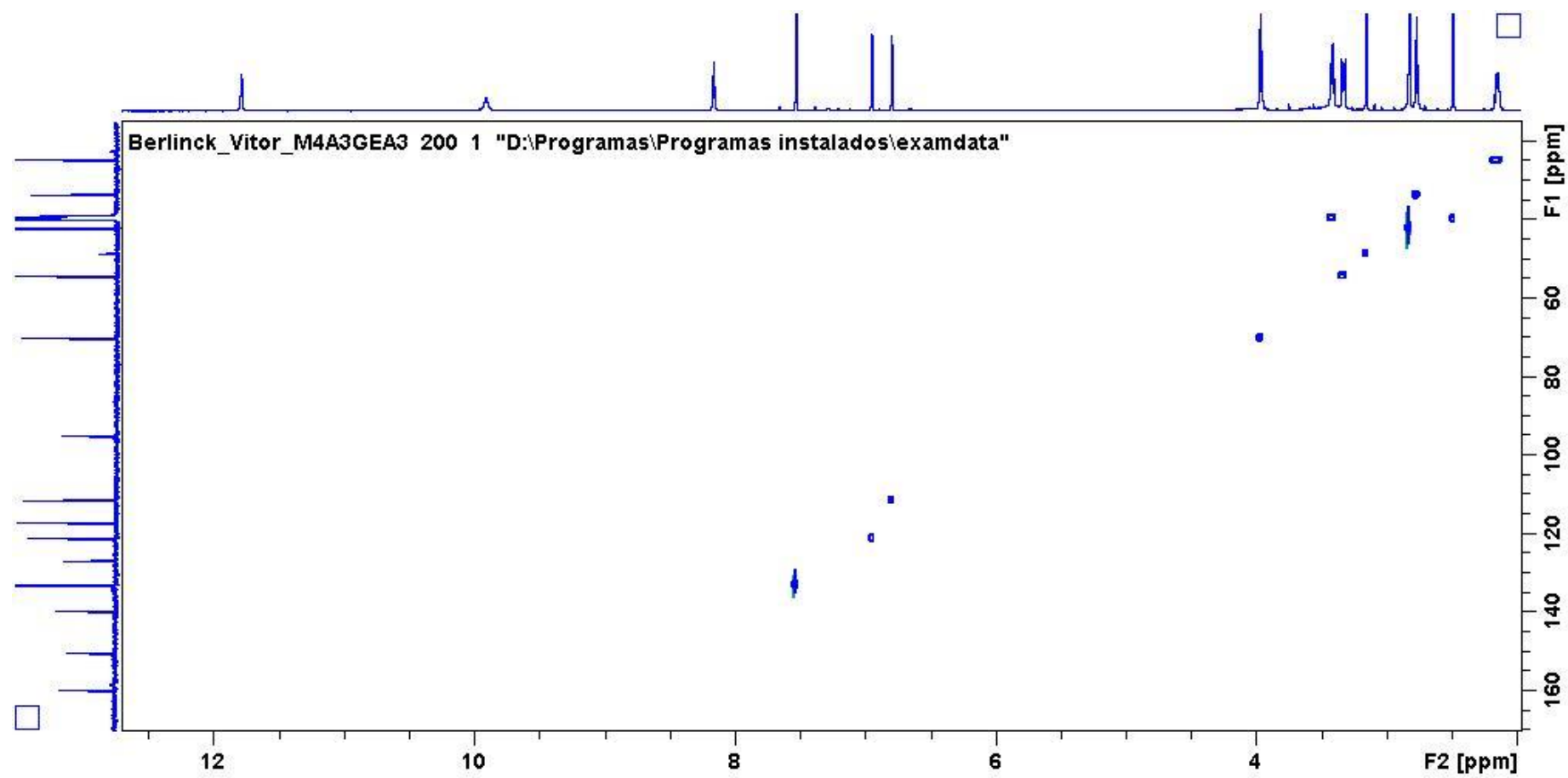
Figura A 141. Espectro de HSQC da dispirina B (**15**) (600 MHz, em DMSO- d_6).

Figura A 142. Espectro de IV da dispirina B (15) em filme em pastilha de Si.

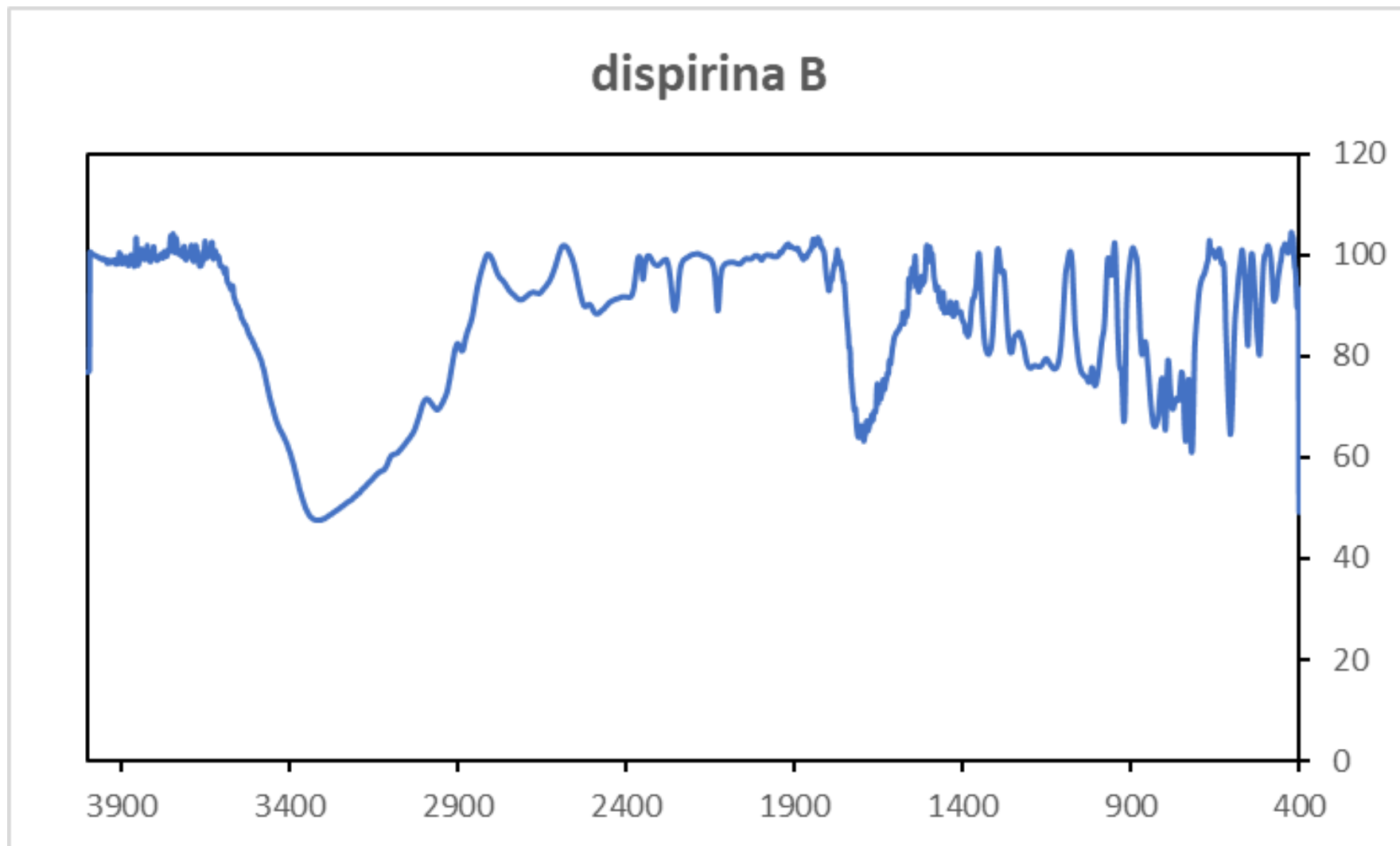


Figura A 143. Espectro MS da dispirina C (16).

M4A3GEA5_MS 594 (2.416)

1: TOF MS ES+
2.07e6

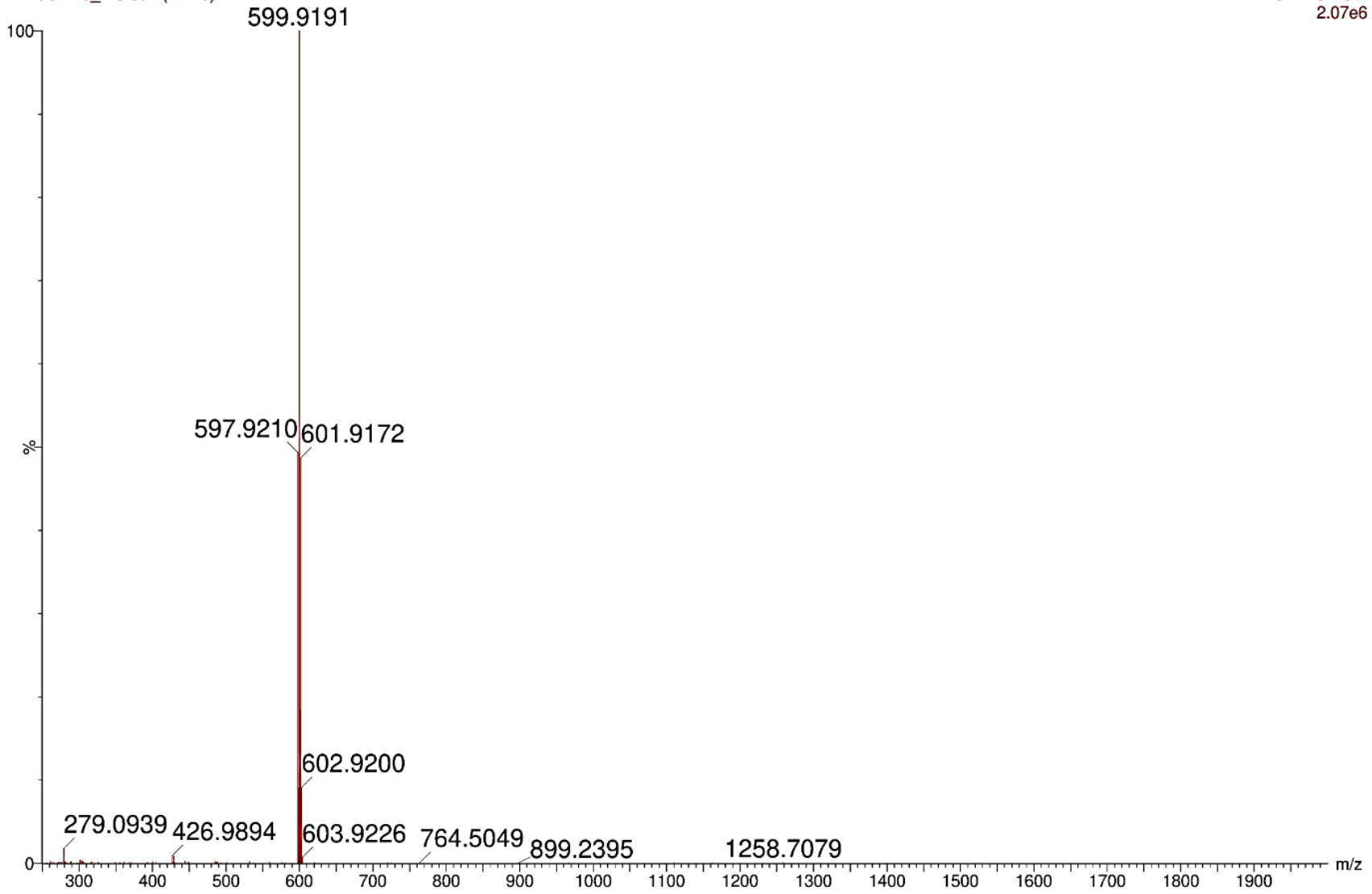


Figura A 144. Expansão do espectro MS da dispirina C (16).

M4A3GEA5_MS 594 (2.416)

1: TOF MS ES+
2.07e6

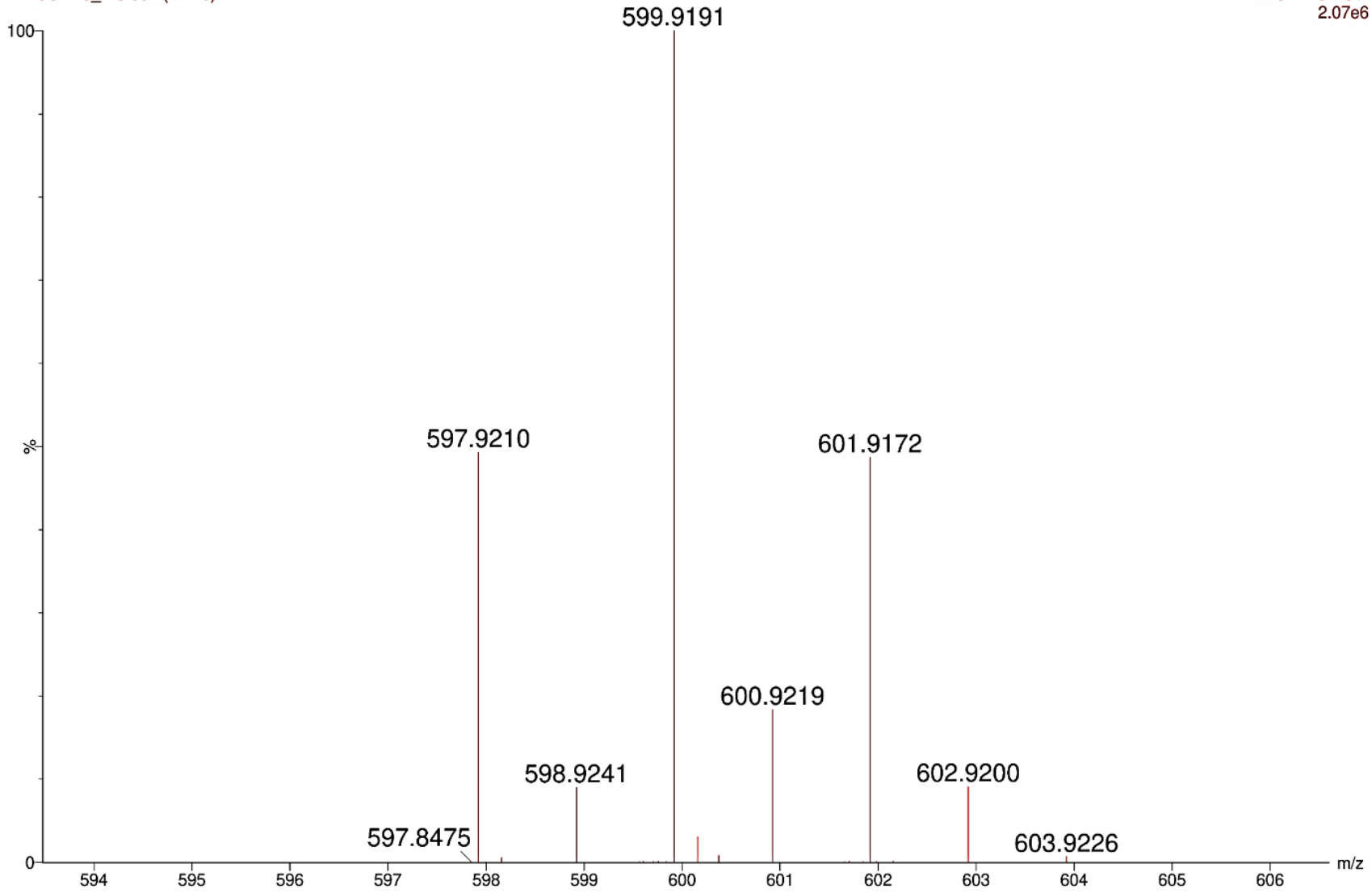


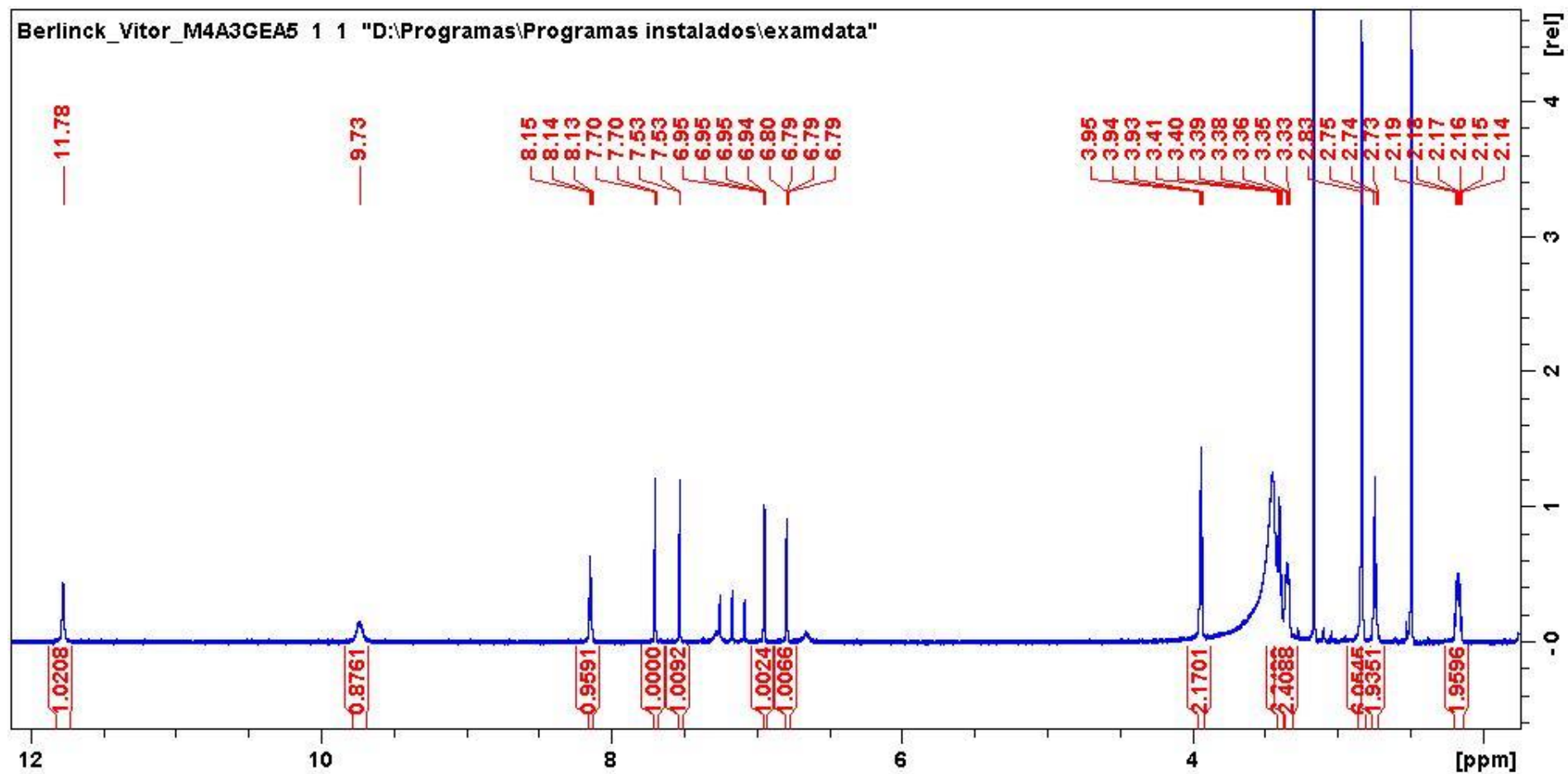
Figura A 145. Espectro de RMN de ^1H da dispirina C (**16**) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

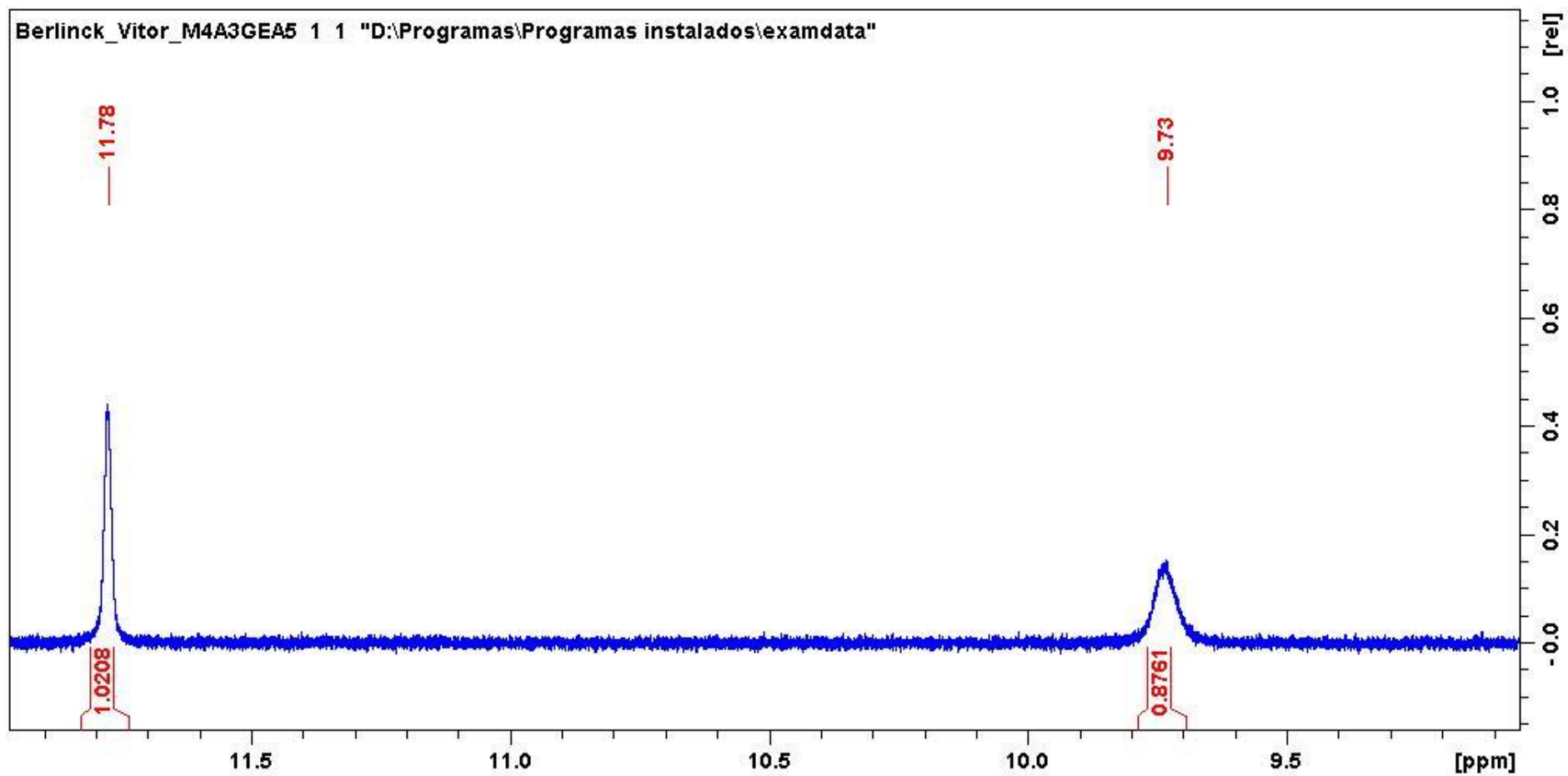
Figura A 146. Expansão do espectro de RMN de ^1H da dispirina C (**16**) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

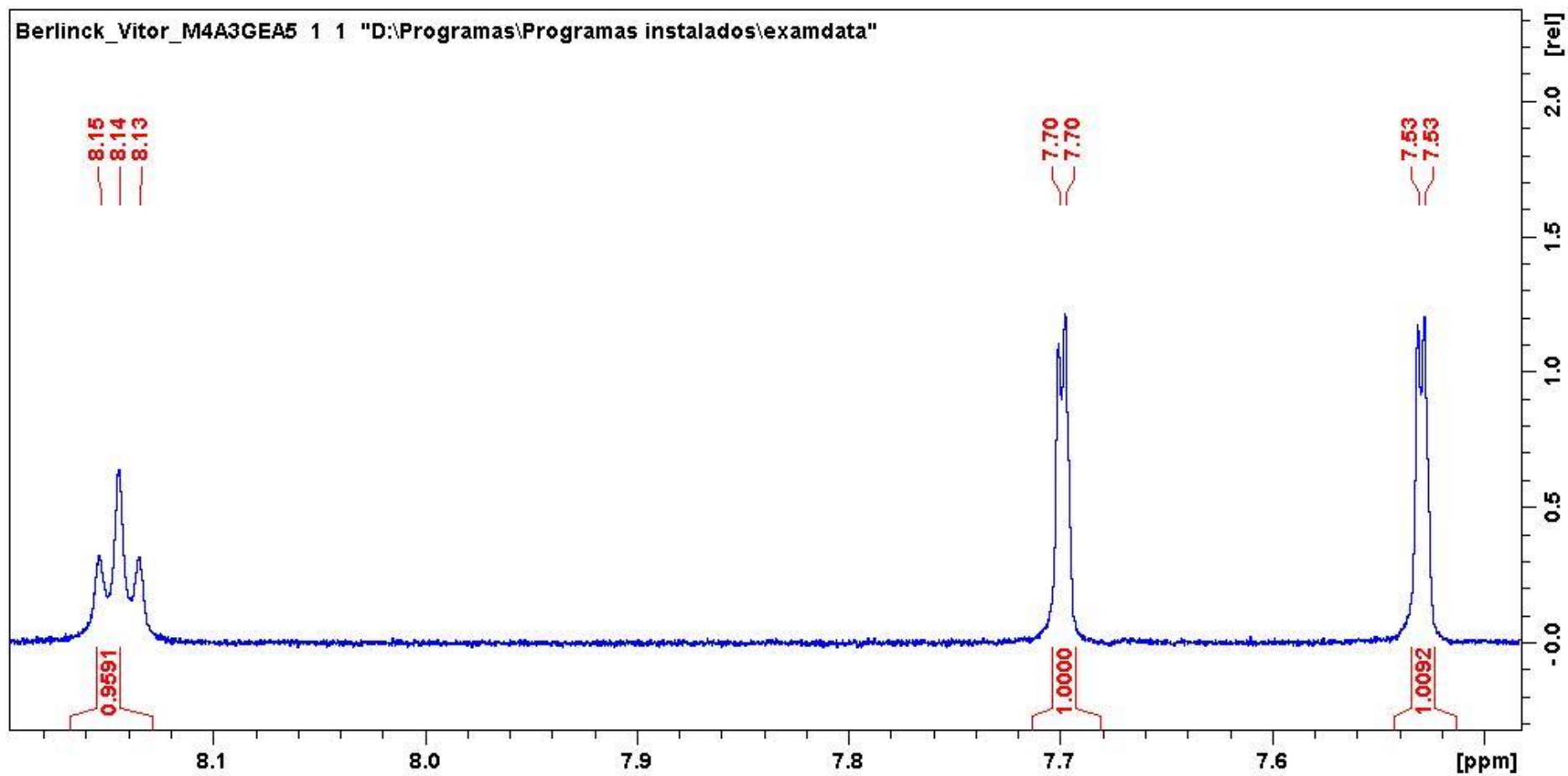
Figura A 147. Expansão do espectro de RMN de ^1H da dispirina C (**16**) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

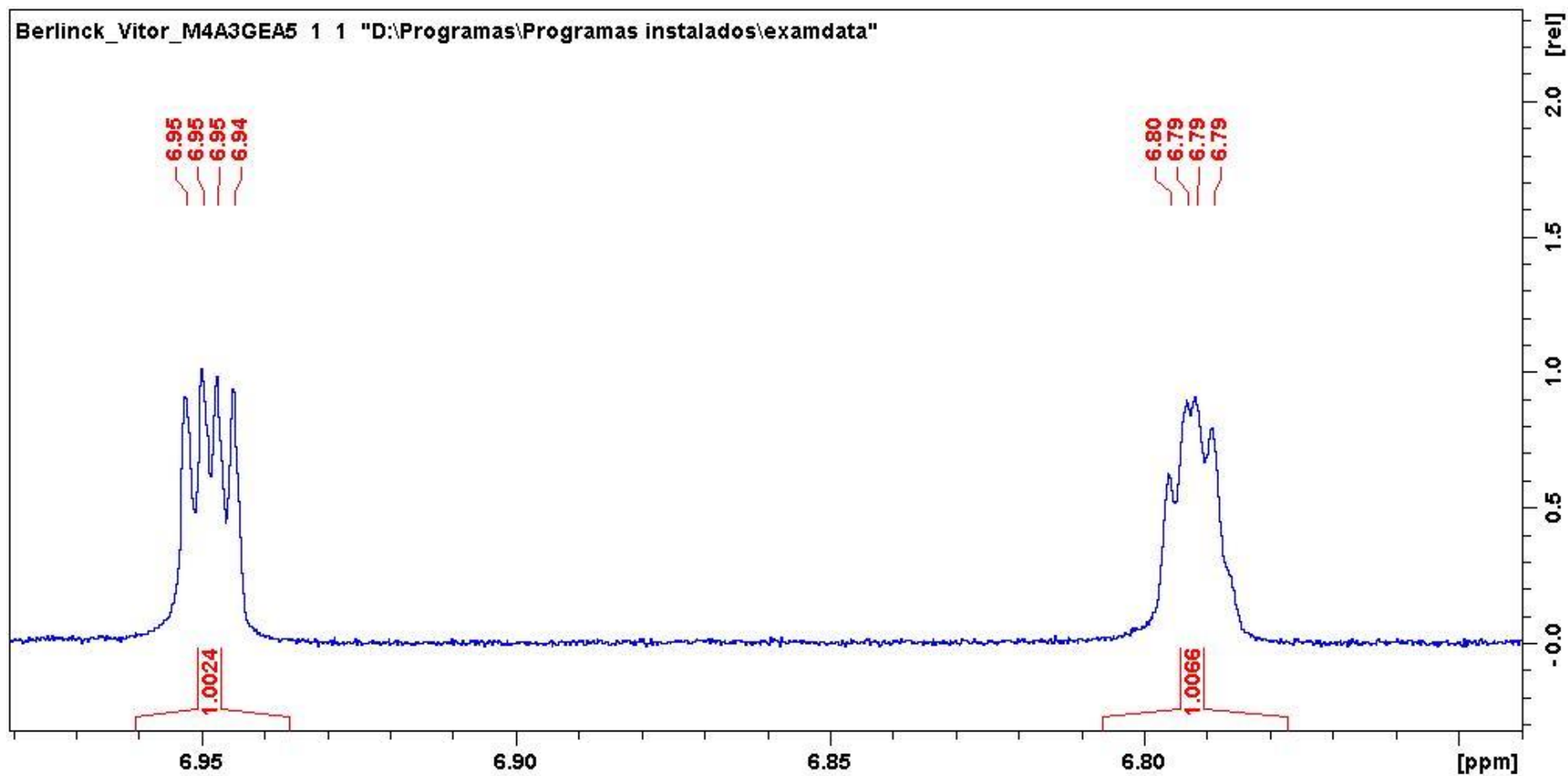
Figura A 148. Expansão do espectro de RMN de ^1H da dispirina C (**16**) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

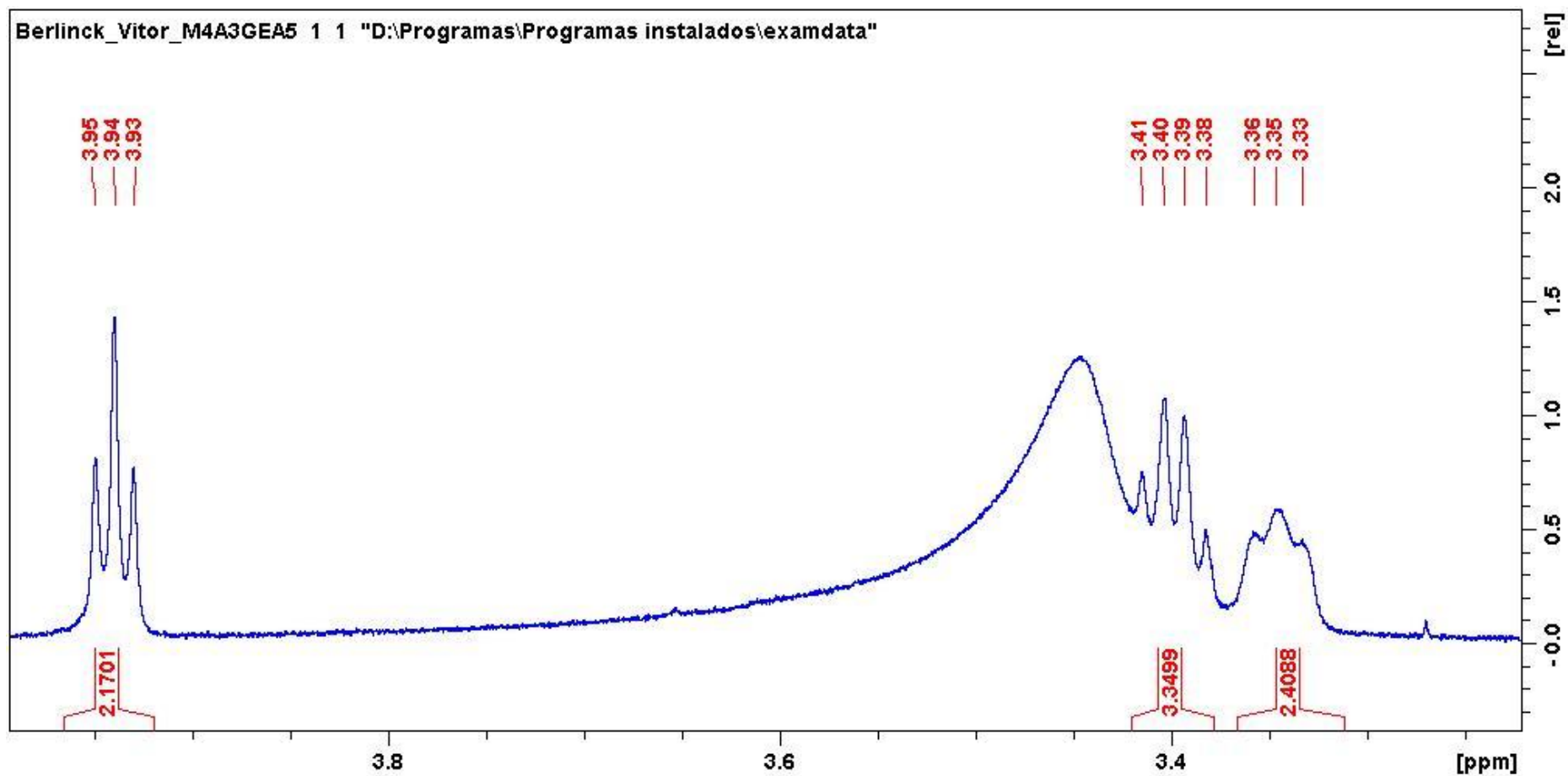
Figura A 149. Expansão do espectro de RMN de ^1H da dispirina C (**16**) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

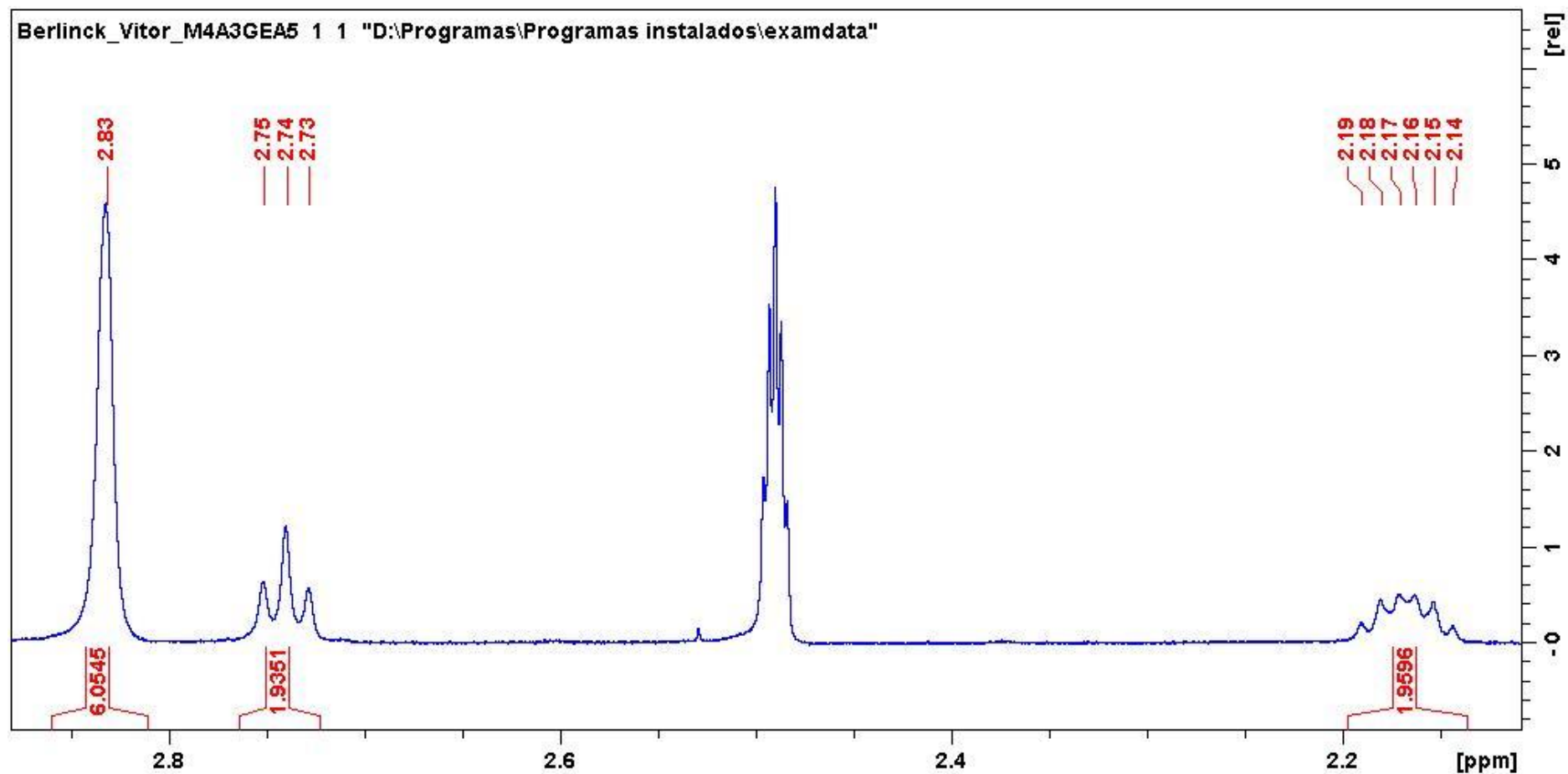
Figura A 150. Expansão do espectro de RMN de ^1H da dispirina C (**16**) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

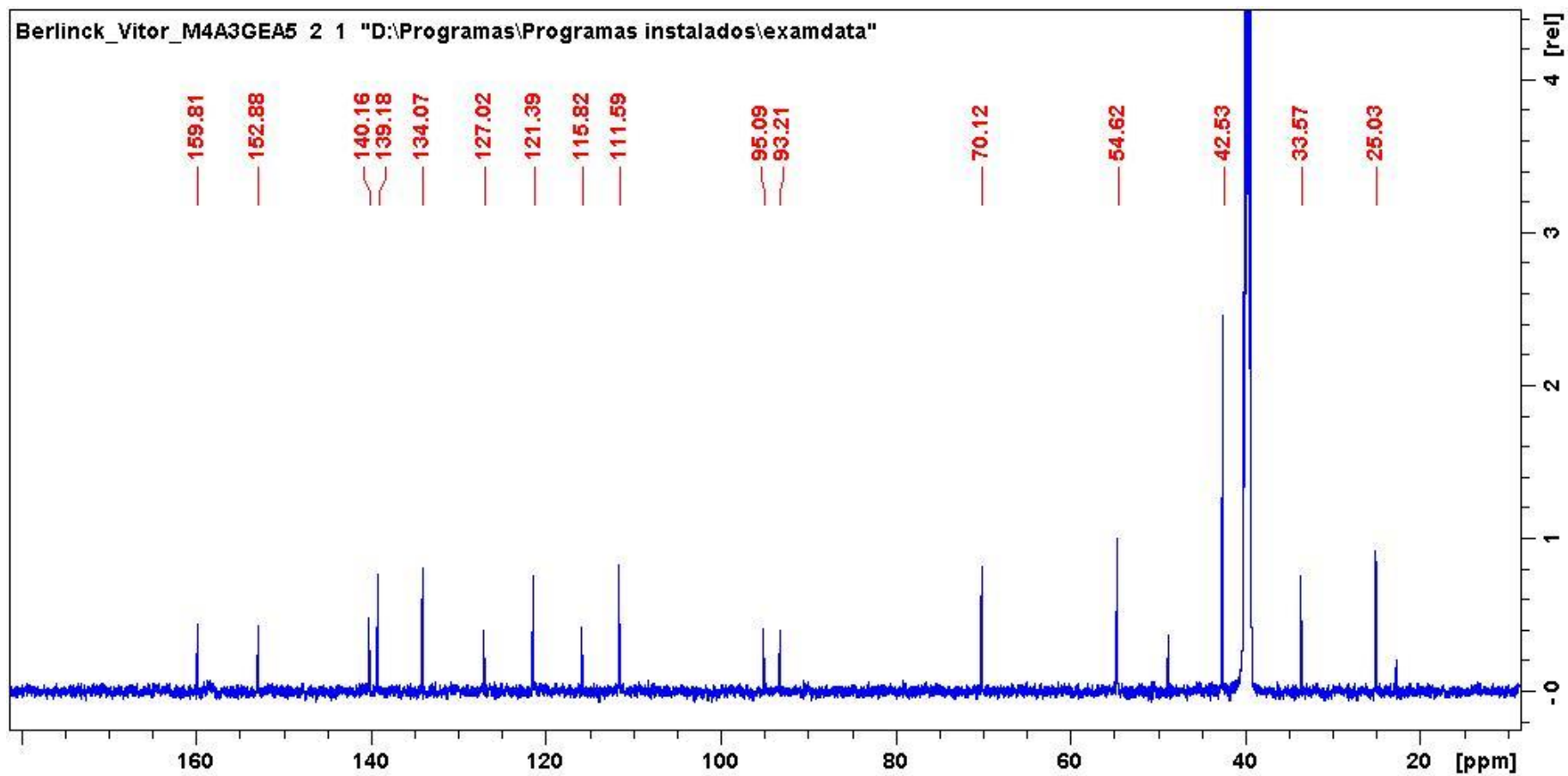
Figura A 151. Espectro de RMN de ^{13}C da dispirina C (16) (150 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

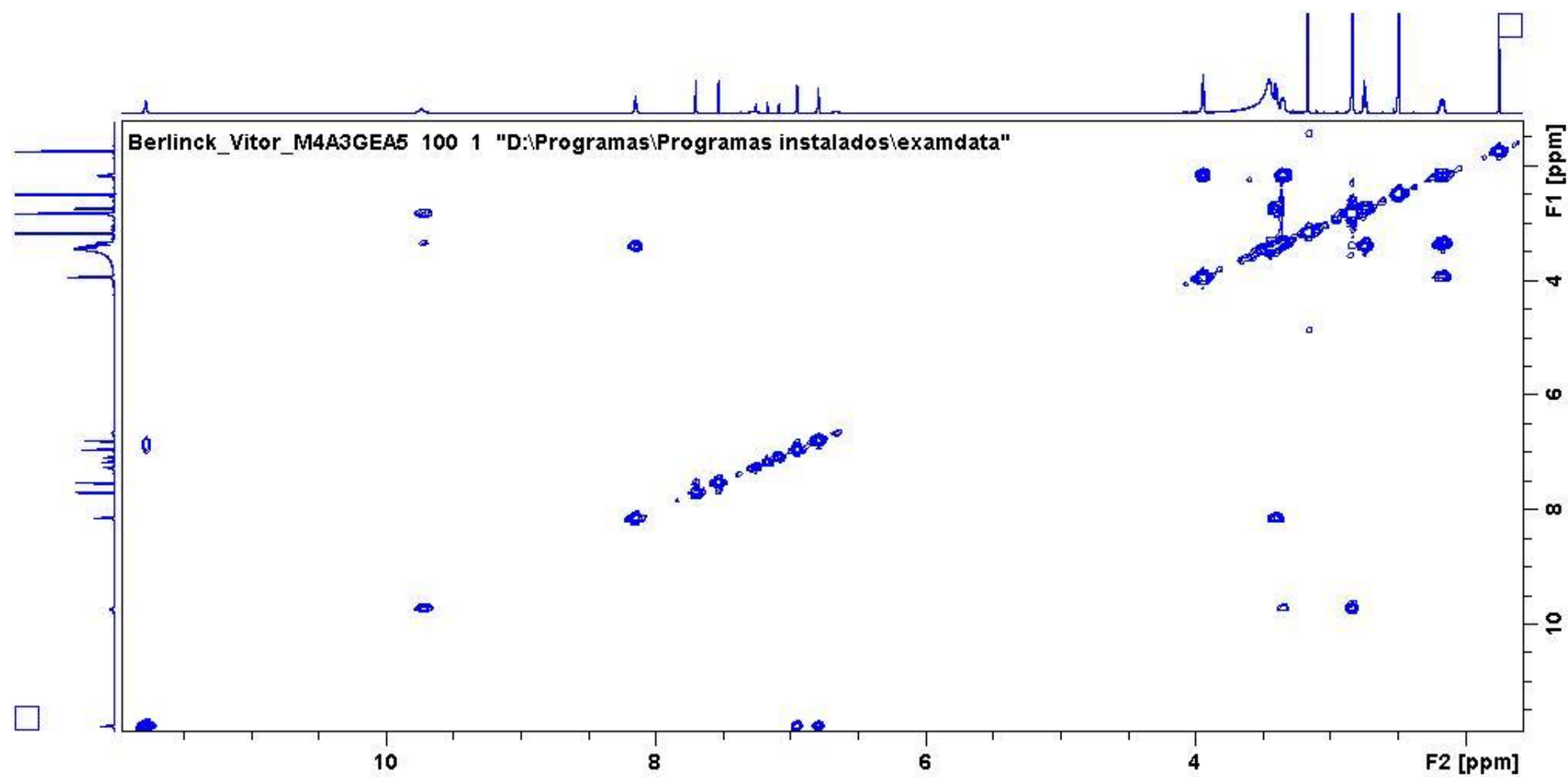
Figura A 152. Espectro COSY da dispirina C (**16**) (600 MHz, em DMSO- d_6).

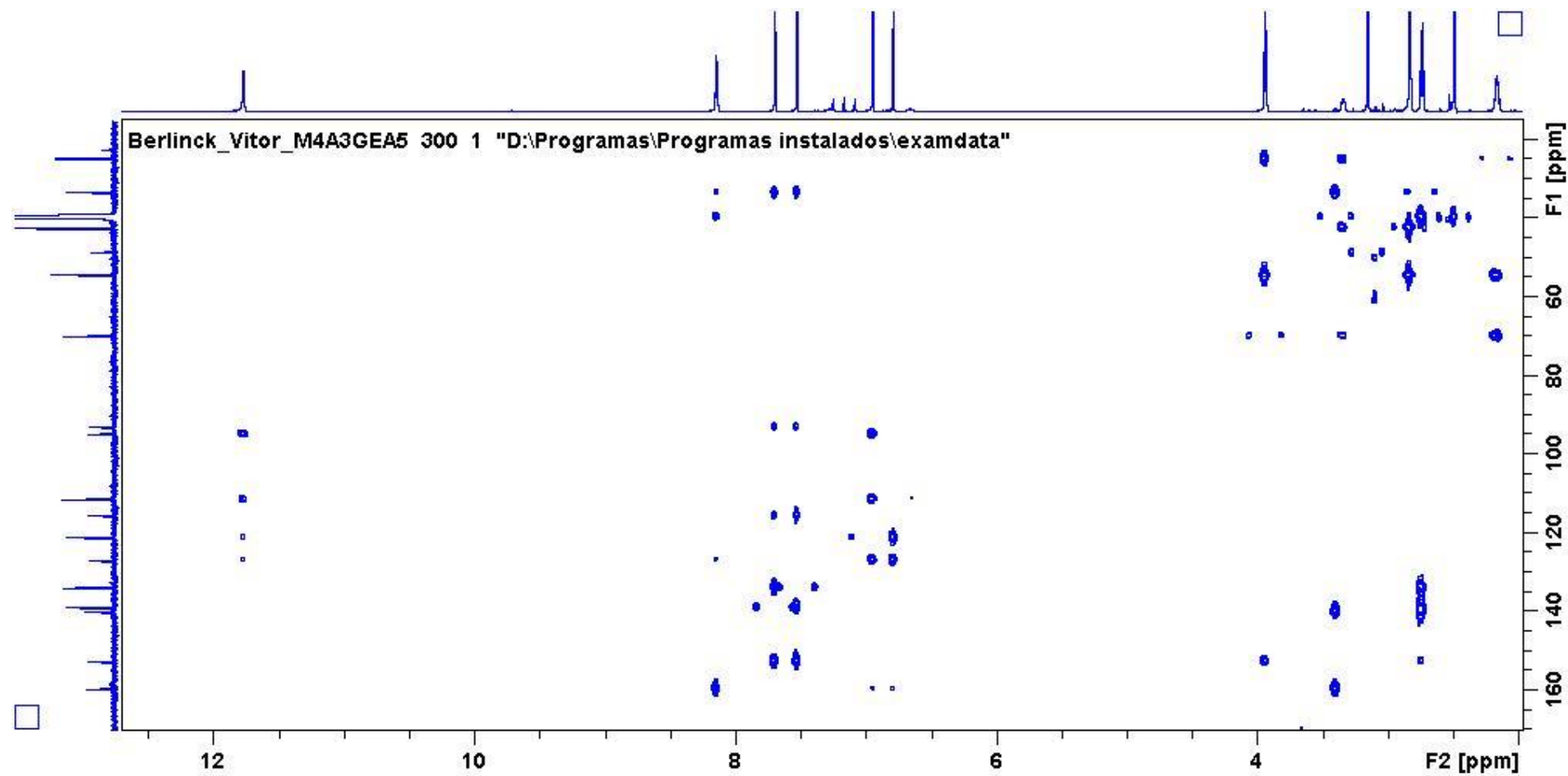
Figura A 153. Espectro COSY da dispirina C (**16**) (600 MHz, em DMSO- d_6).

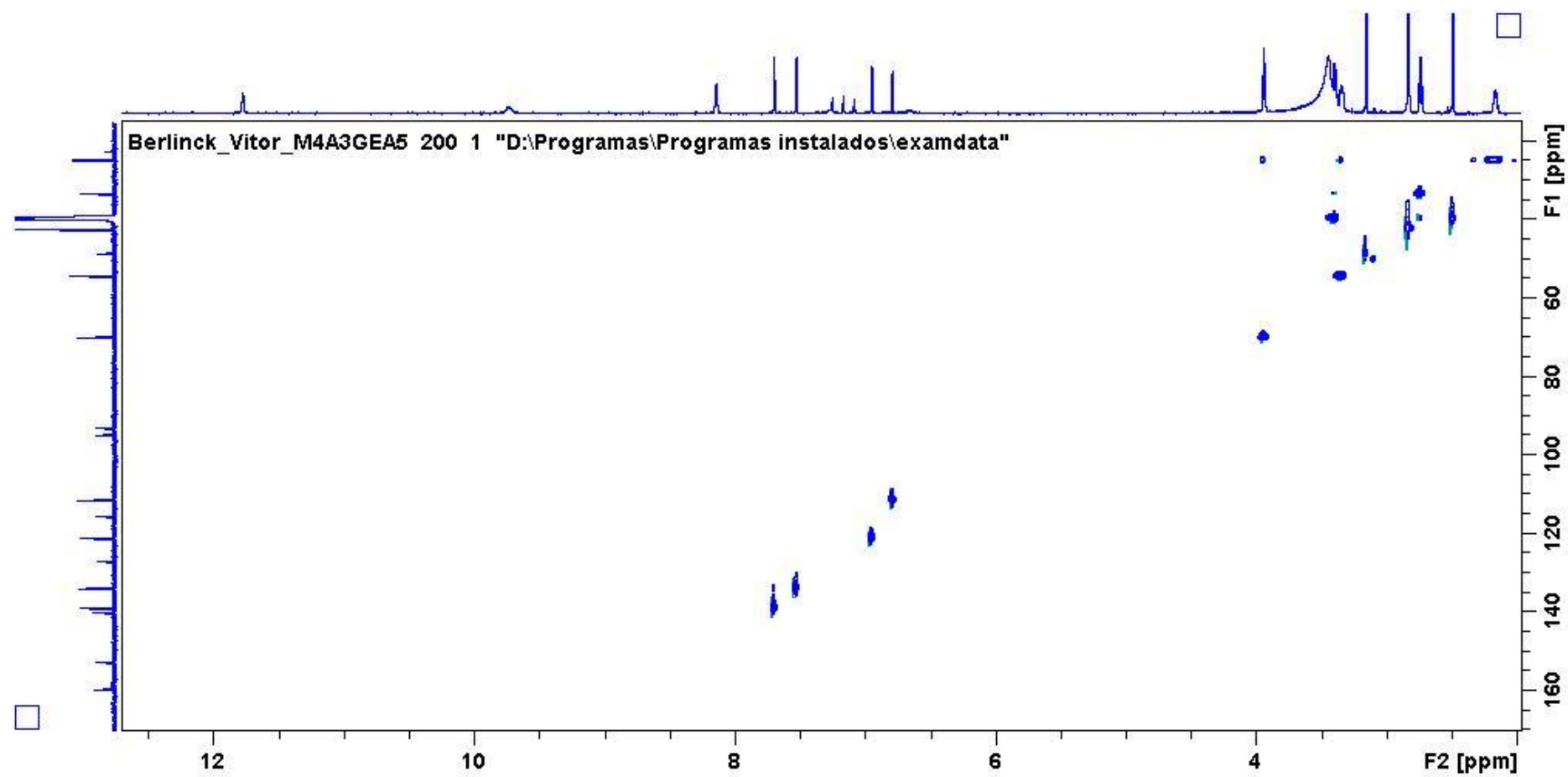
Figura A 154. Espectro HSQC da dispirina C (16) (600 MHz, em DMSO- d_6).

Figura A 155. Espectros MS/MS da dipirina C (16).

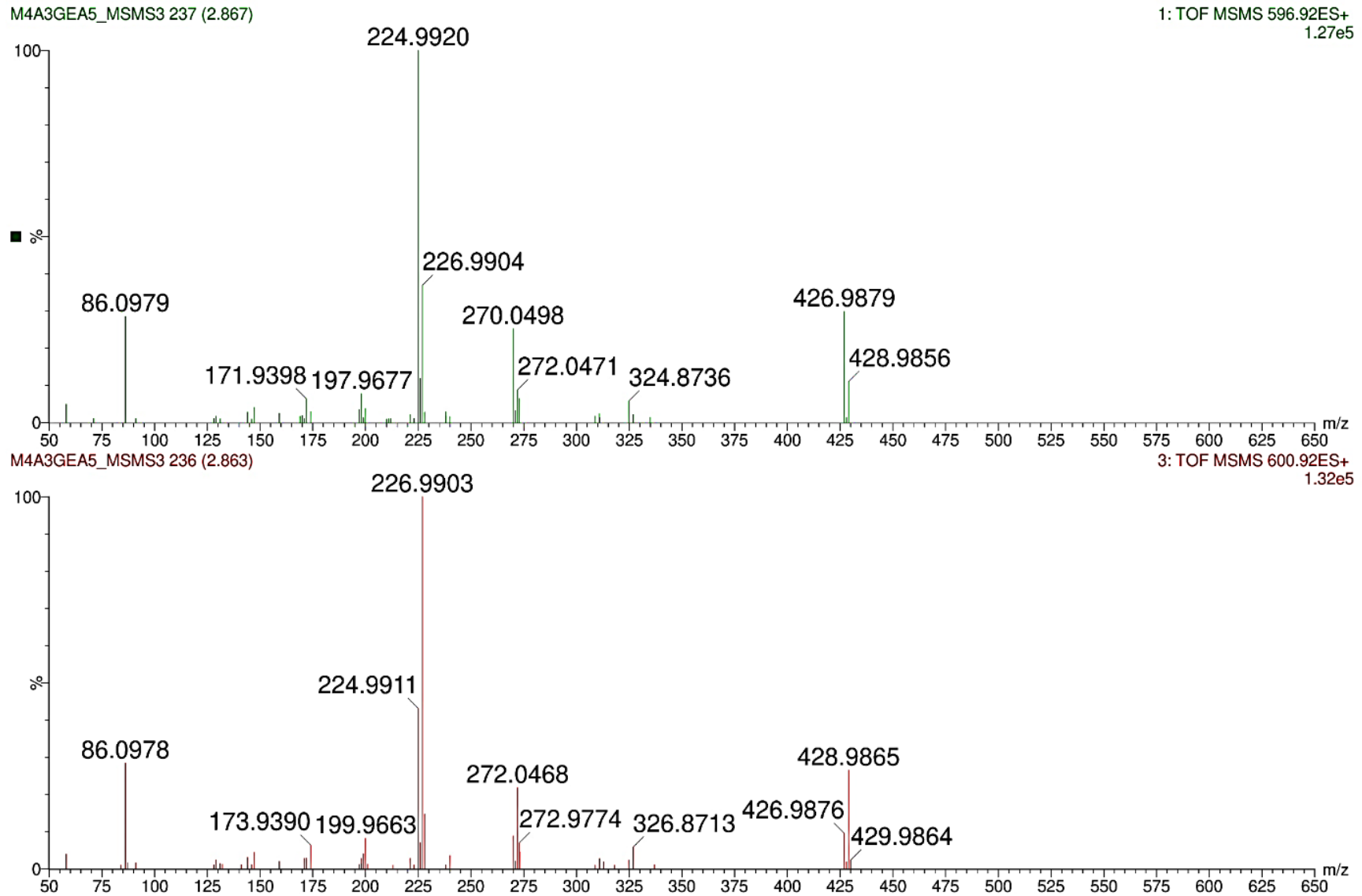


Tabela A 8. Íons observados nos espectros MS/MS do composto dispirina C (**16**) a partir dos íons precursores de m/z 597,92 e m/z 601,91.

Íon fragmento	Fórmula	m/z 597,92			m/z 601,91		
		Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)	Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)
A	$C_{13}H_{21}BrIN_2O^+$	426,9888	2,58	29,64	428,9871	3,49	28,64
		428,9870	3,26	12,11			
B1	$C_{12}H_{17}INO^+$	318,0361	3,77	1,38	318,0358	2,83	1,21
B2	$C_{12}H_{17}BrNO^+$	270,0499	3,70	24,08	272,0480	4,41	23,45
		272,0478	3,67	10,36			
C1	$C_{10}H_{10}IO^+$	272,9783	4,39	8,92	272,9779	2,93	9,05
C2	$C_{10}H_{10}BrO^+$	224,9920	4,44	100,00	226,9902	5,29	100,00
		226,9903	5,72	41,10			
D	$C_5H_3BrNO^+$	171,9399	3,49	7,25	173,9378	2,87	7,39
		173,9777	2,29	2,96			

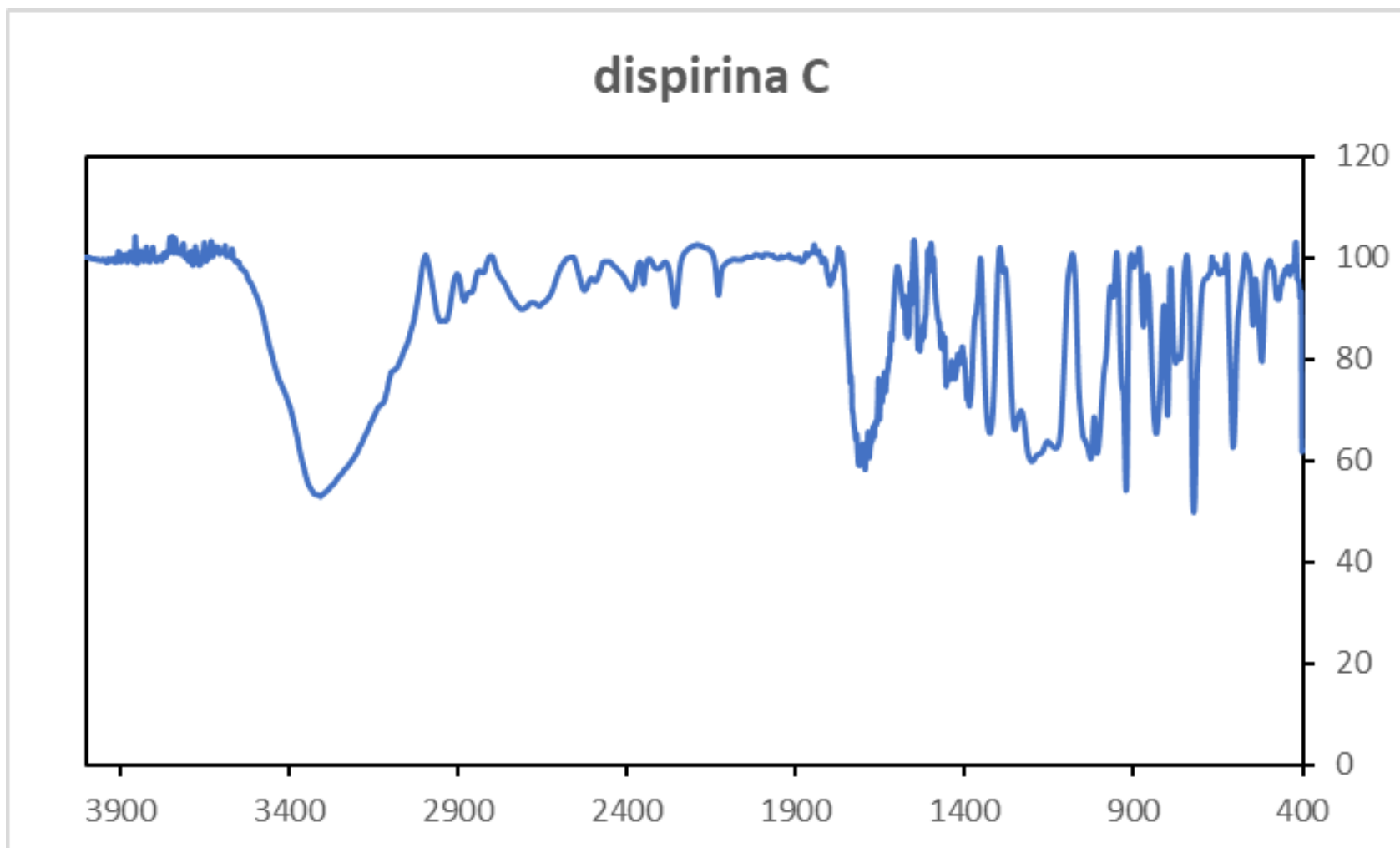
Figura A 156. Espectro IV da dispirina C (**16**) em filme em pastilha de Si.

Figura A 157. Espectro MS da dispirina D (17).

M4A3GEA7_MS 612 (2.481)

1: TOF MS ES+
2.12e6

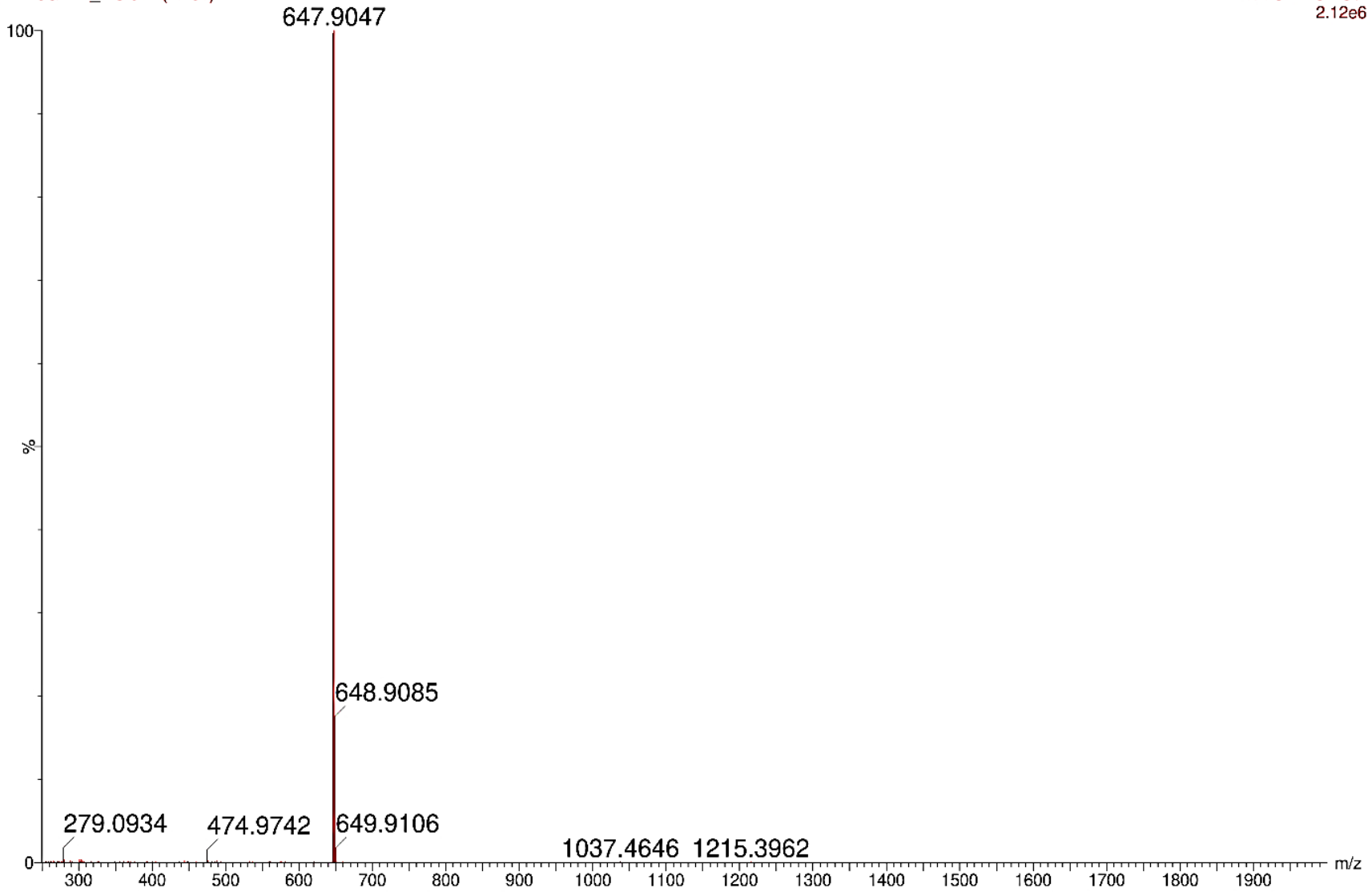


Figura A 158. Expansão do espectro MS da dispirina D (17)..

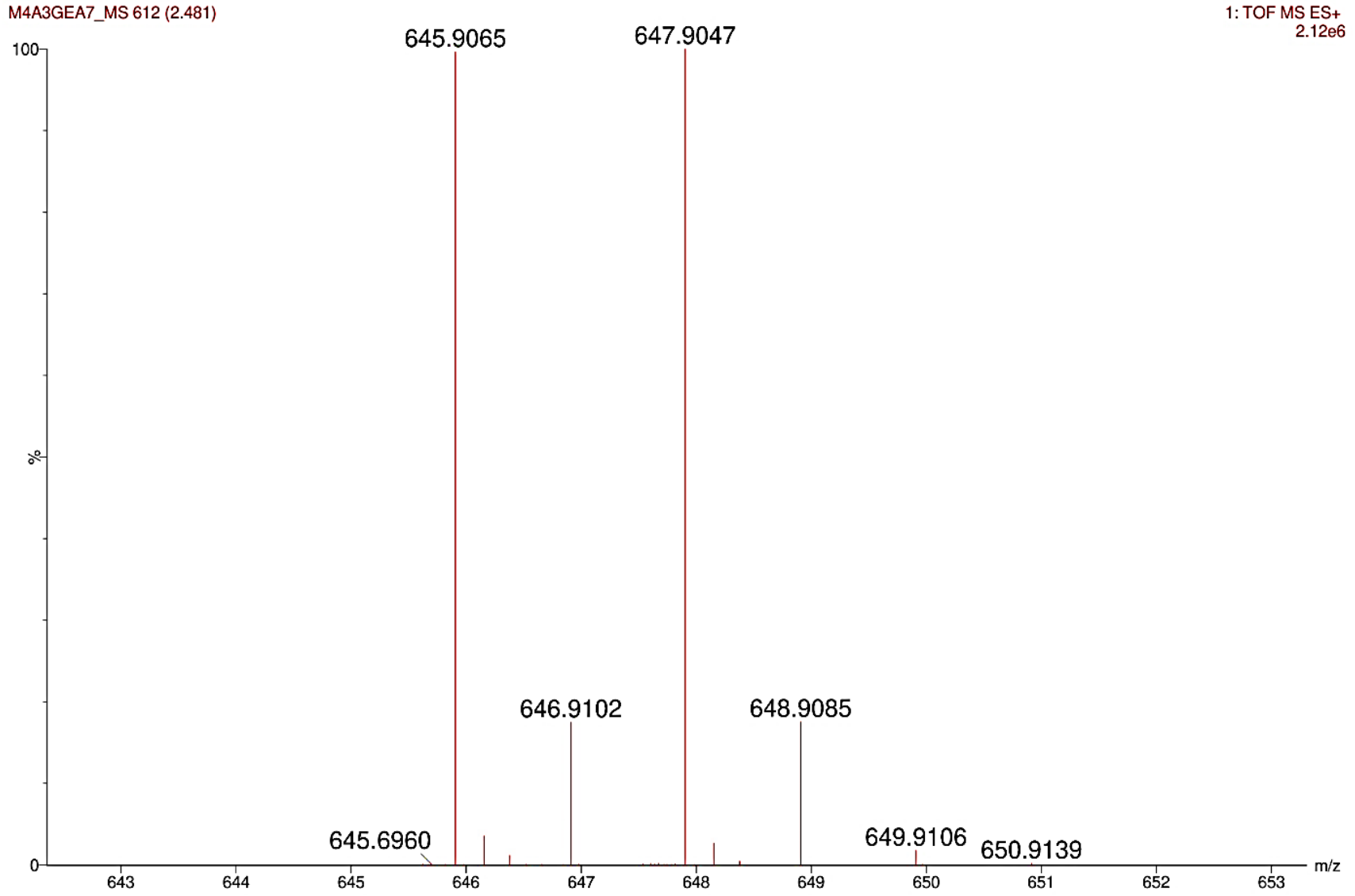


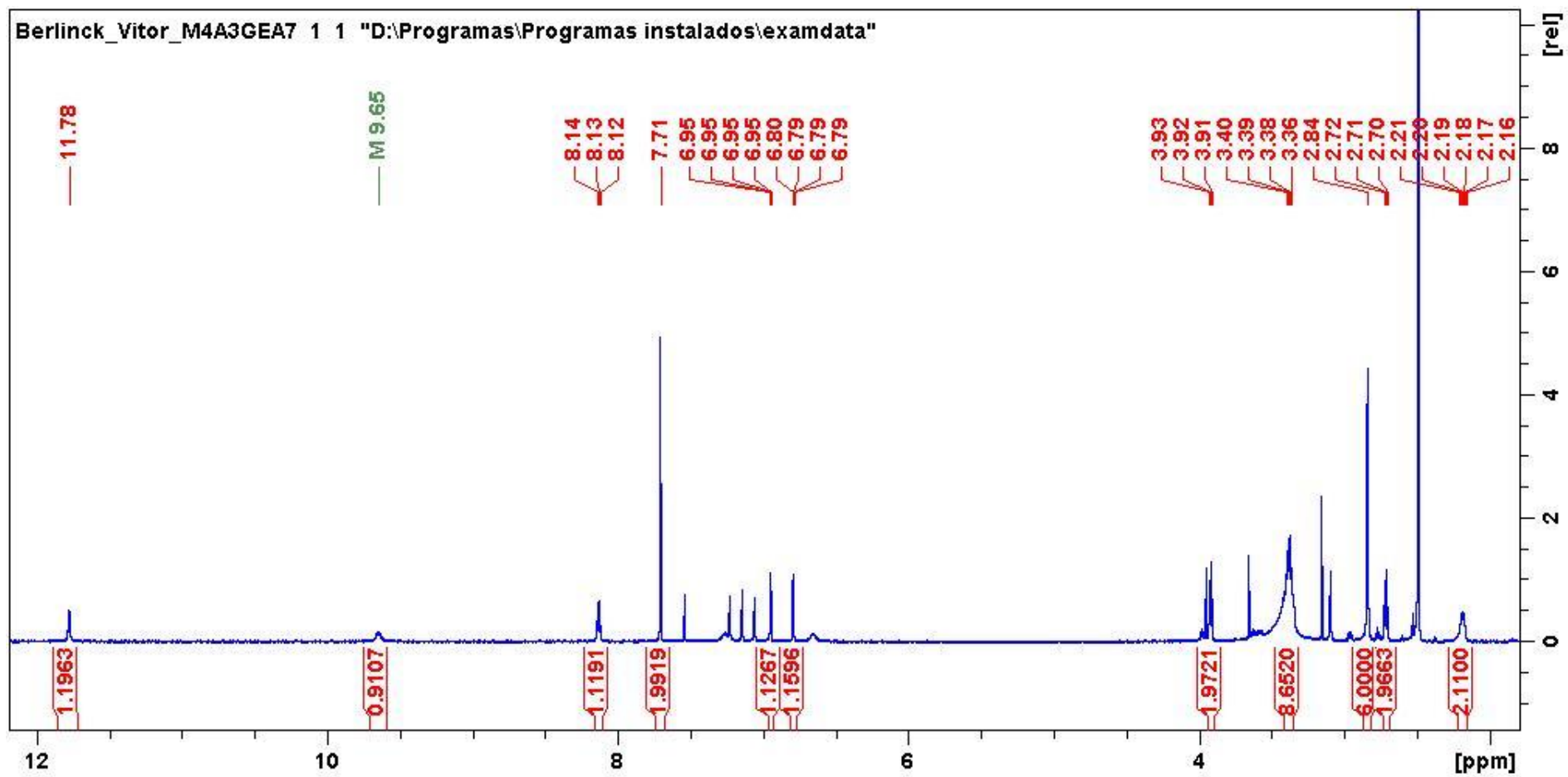
Figura A 159. Espectro de RMN de ^1H da dispirina D (**17**) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

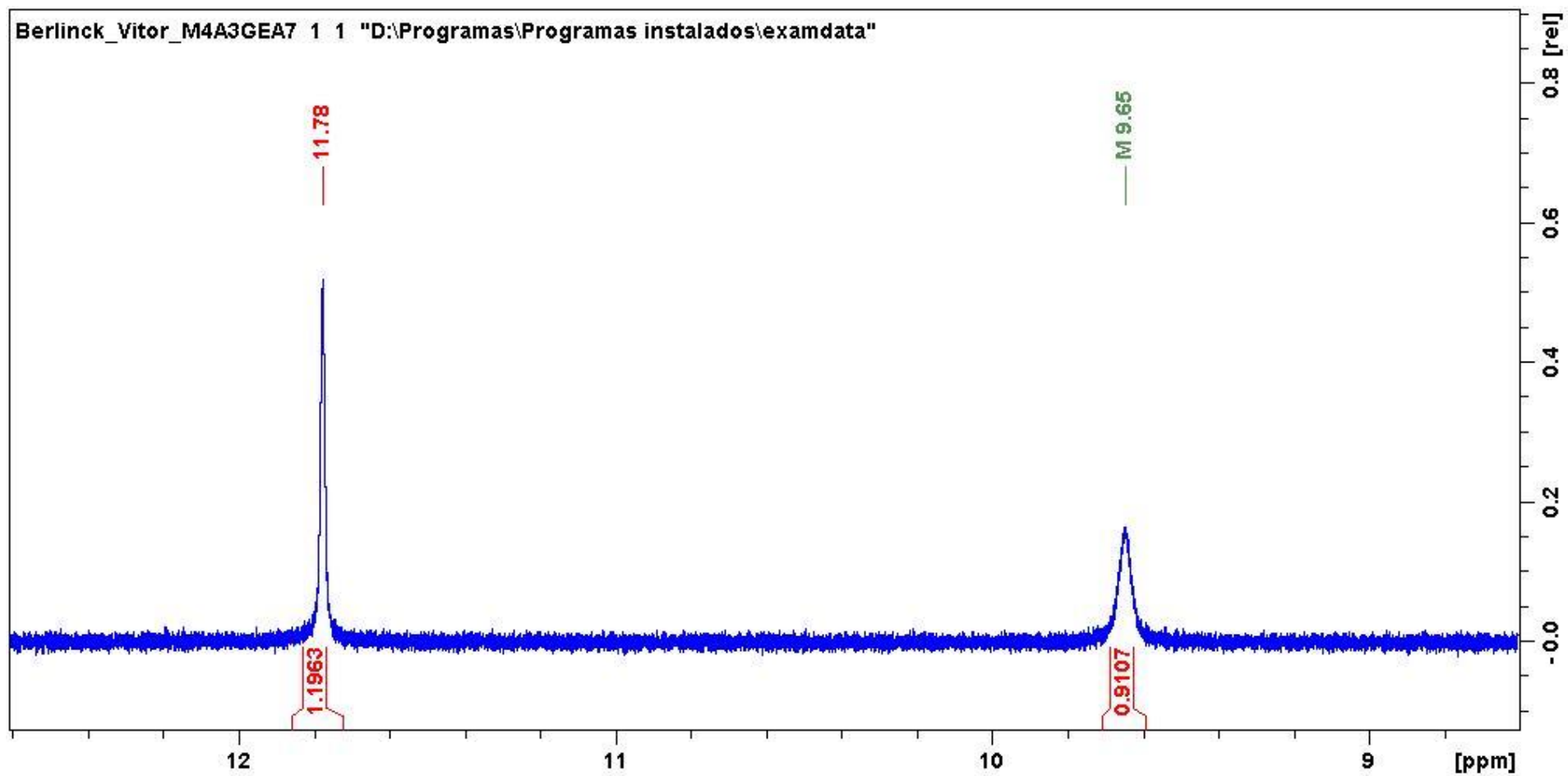
Figura A 160. Expansão do espectro de RMN de ^1H da dispirina D (17) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

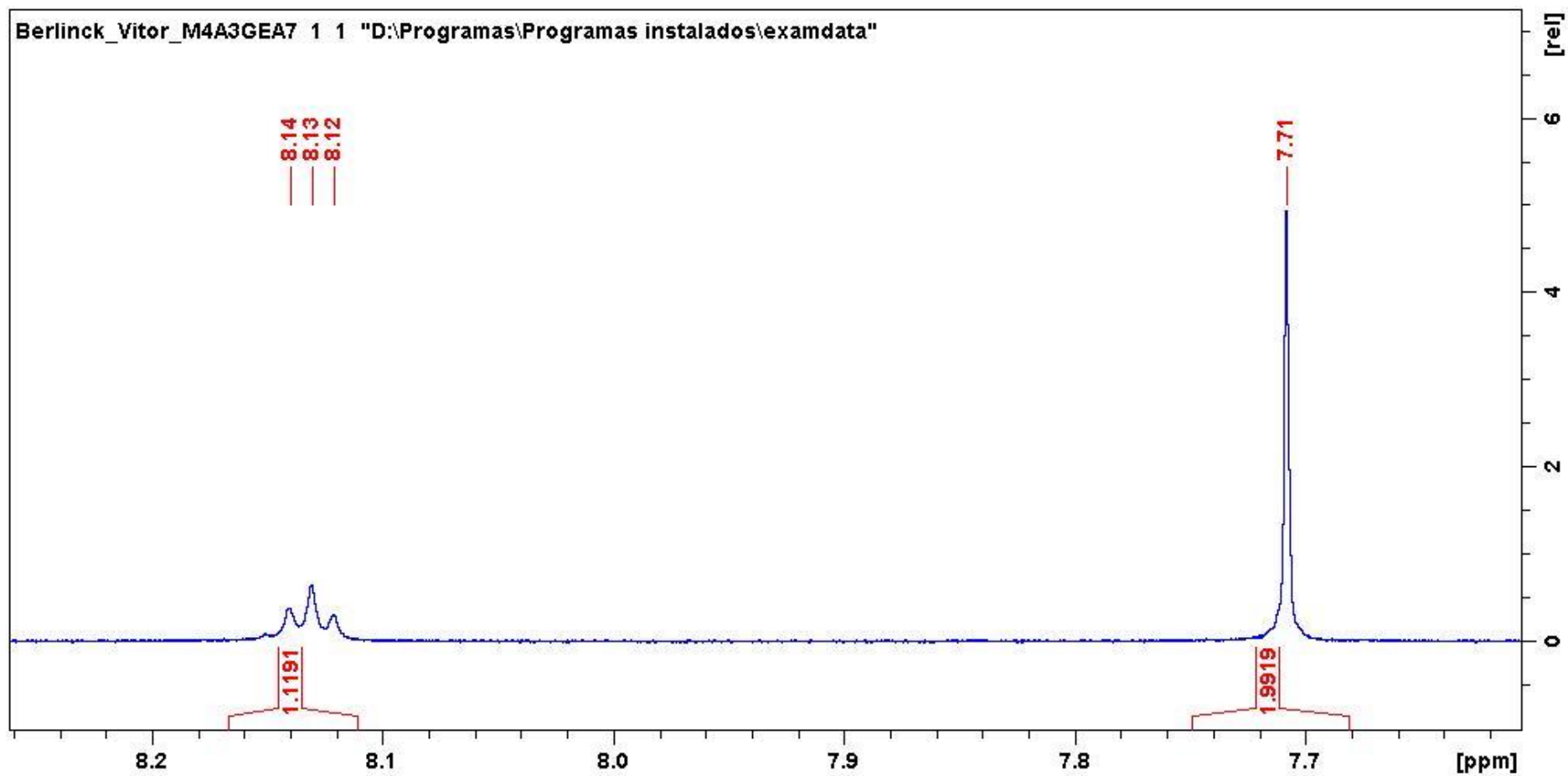
Figura A 161. Expansão do espectro de RMN de ^1H da dispirina D (**17**) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

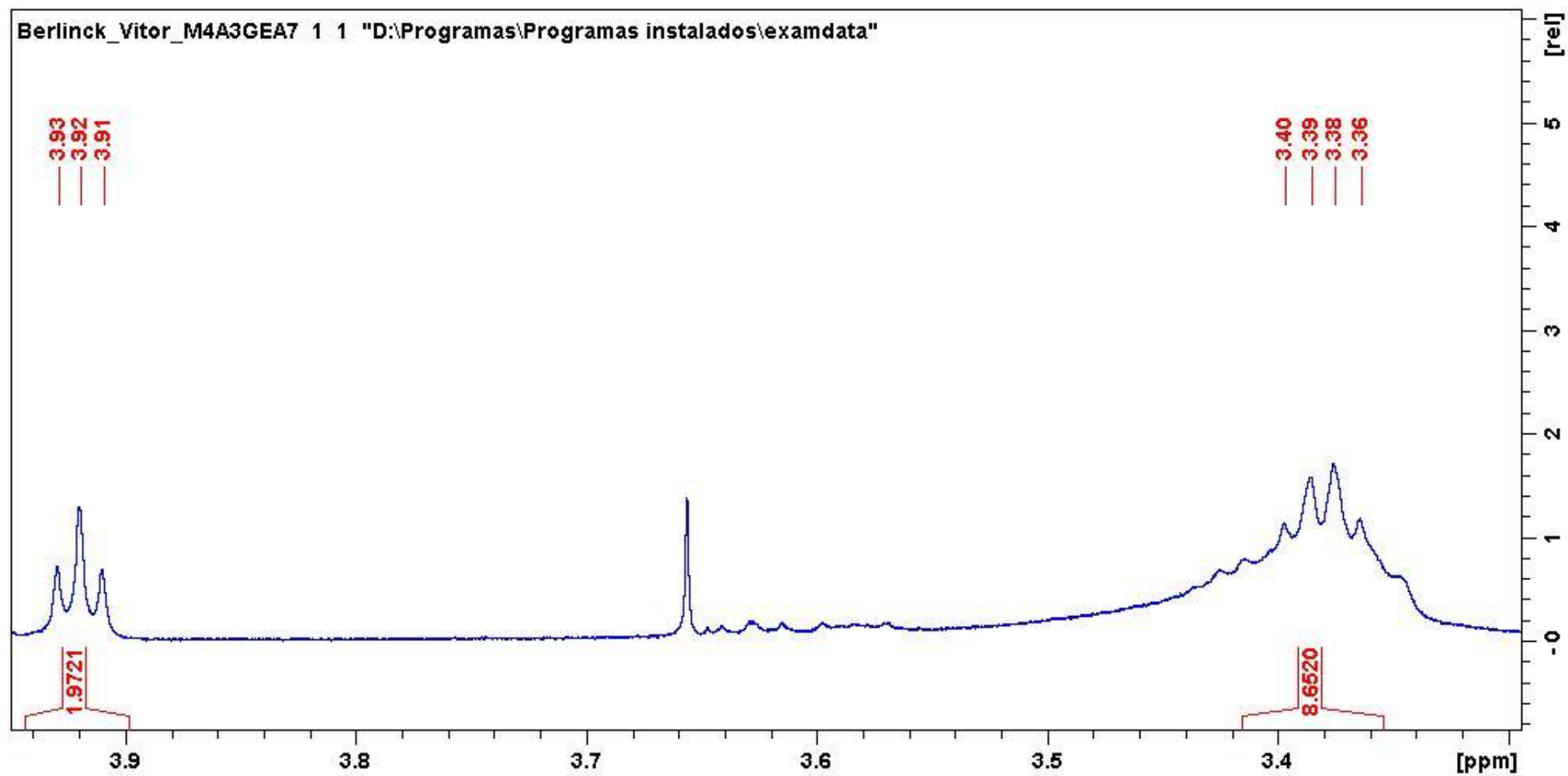
Figura A 162. Expansão do espectro de RMN de ^1H da dispirina C (17) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

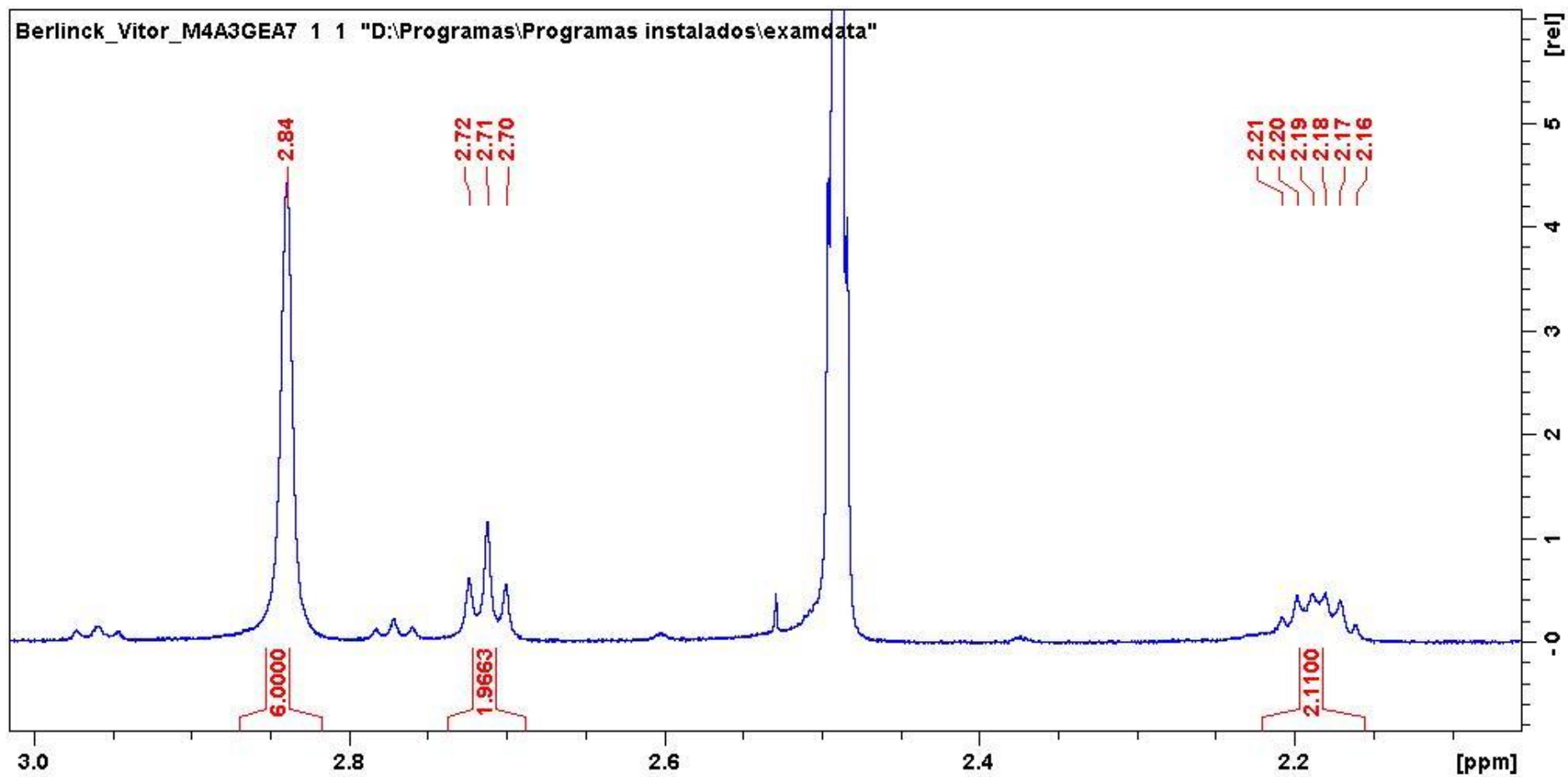
Figura A 163. Expansão do espectro de RMN de ^1H da dispirina C (17) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

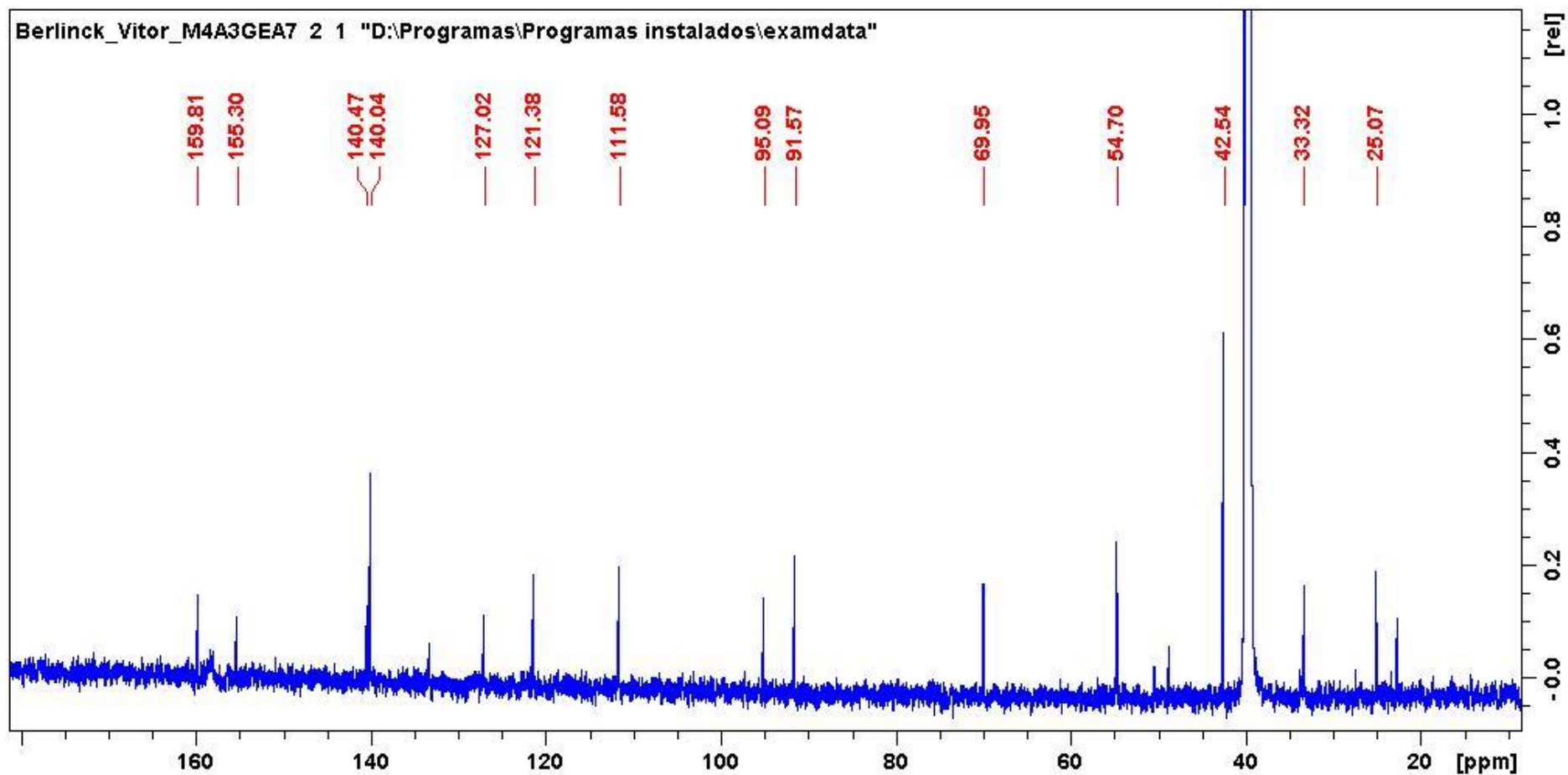
Figura A 164. Espectro de RMN de ^{13}C da dispirina D (17) (150 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

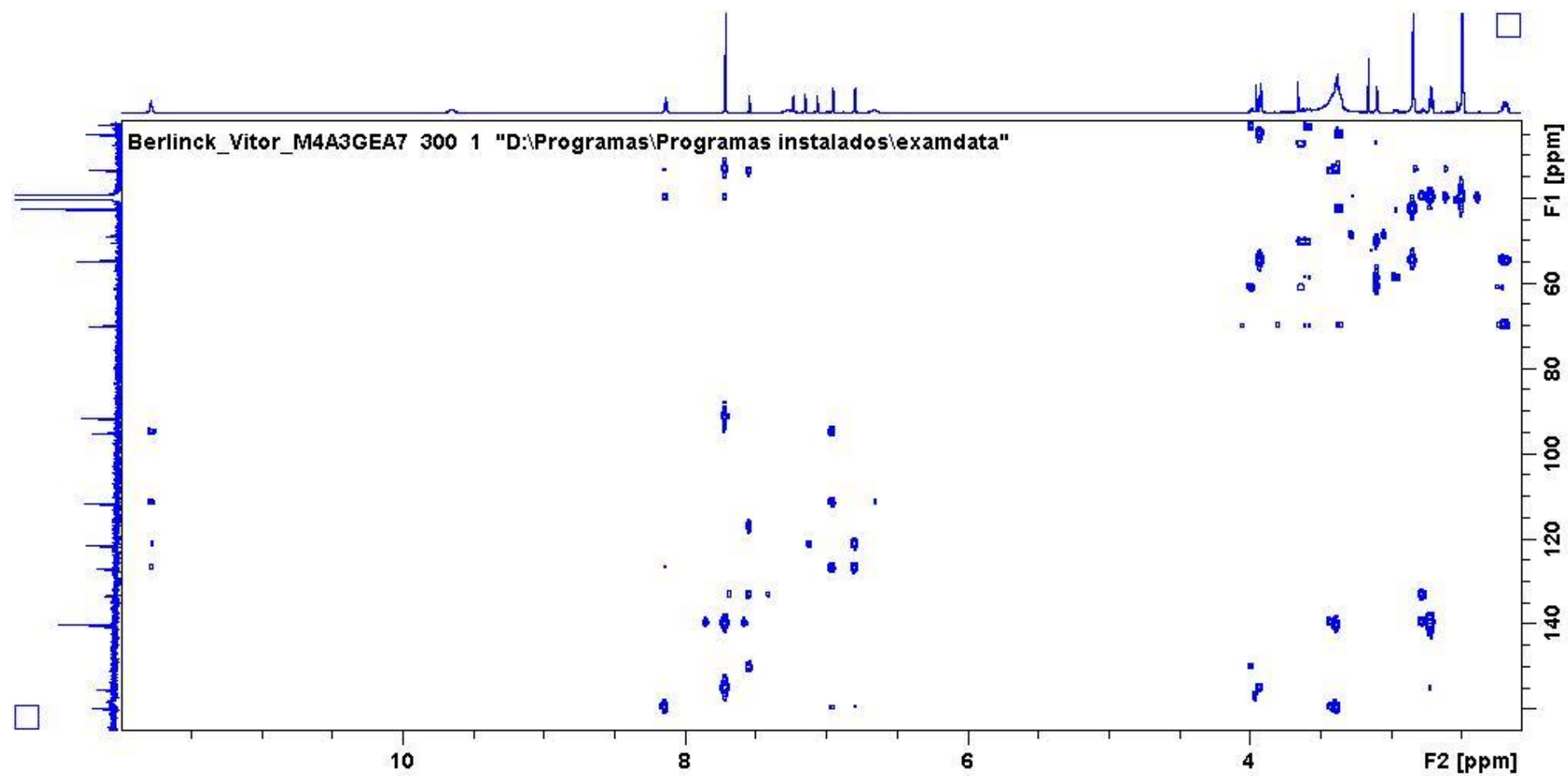
Figura A 166. Espectro HMBC da dispirina D (17) (600 MHz, em DMSO- d_6).

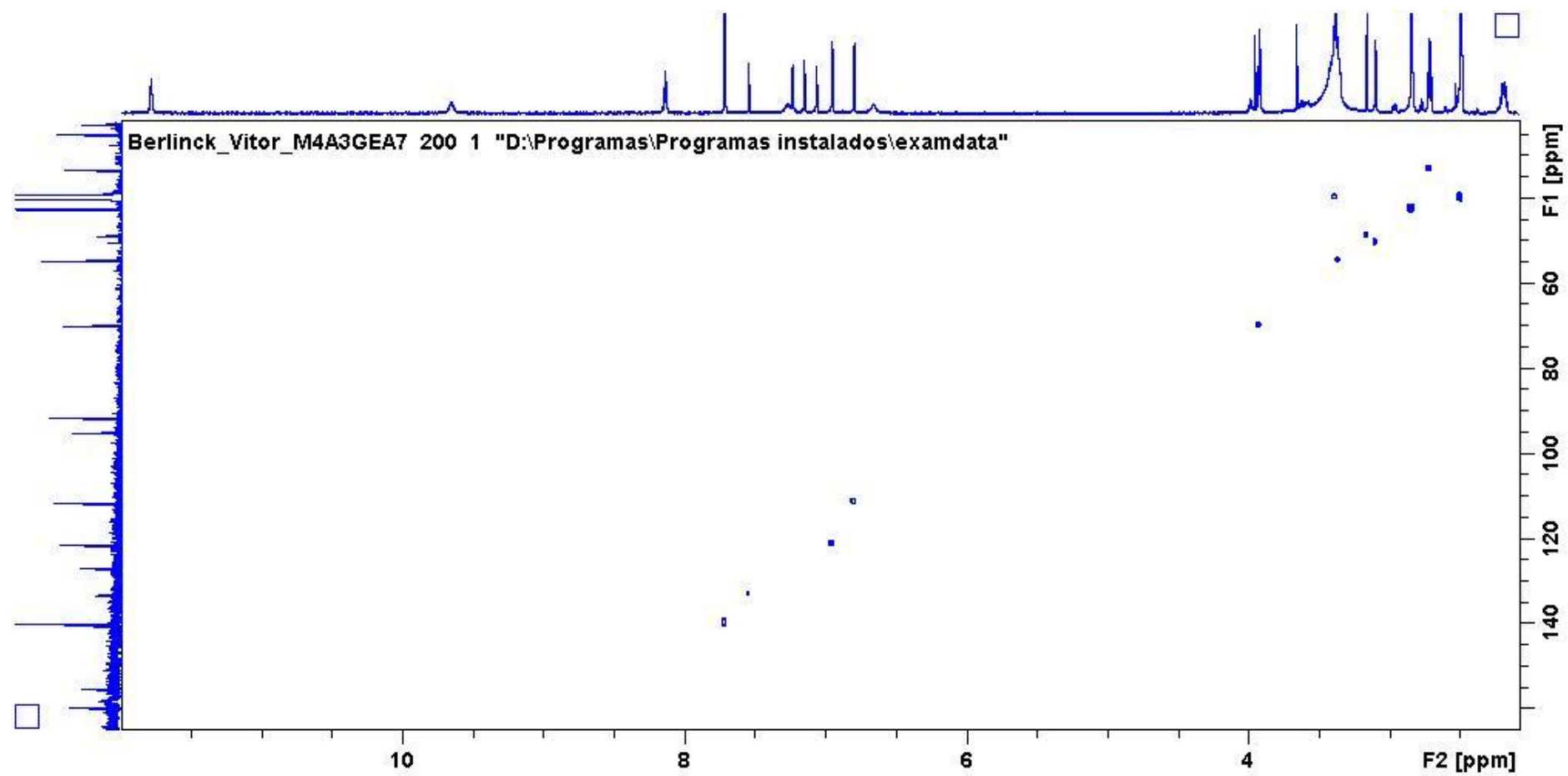
Figura A 167. Espectro HMBC da dispirina D (17) (600 MHz, em DMSO- d_6).

Figura A 168. Espectros MS/MS da dispirina D (17).

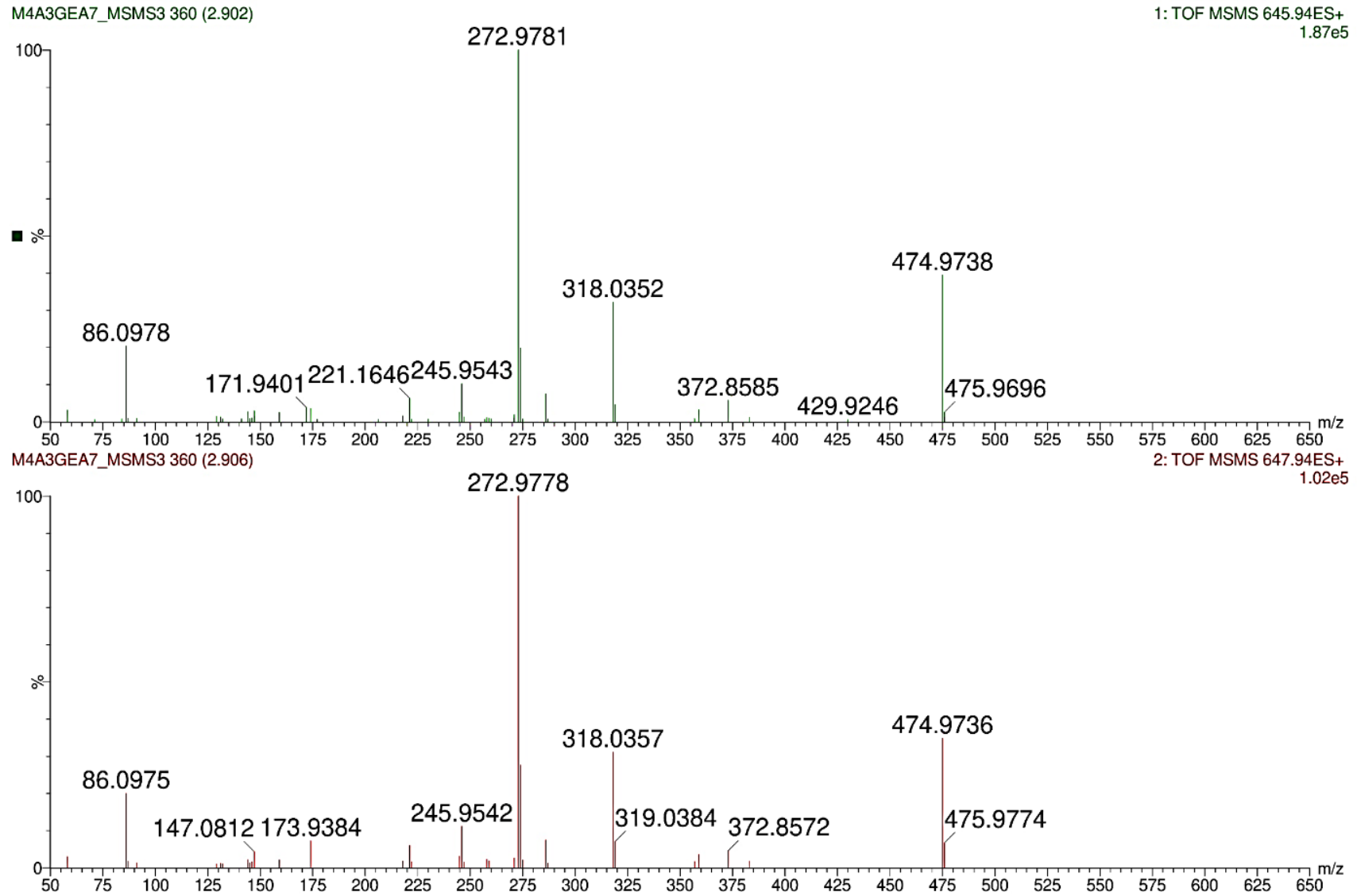


Tabela A 9. Íons observados nos espectros MS/MS do composto dispirina D (**17**) a partir do íon precursor de m/z 645,91.

Íon fragmento	Fórmula	m/z 645,91		
		Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)
A	$C_{13}H_{21}Br_2N_2O^+$	474,9758	4,21	39,31
B1/B2	$C_{12}H_{17}BrNO^+$	318,0364	4,72	31,81
C1/C2	$C_{10}H_{10}BrO^+$	272,9785	5,13	100,00
D	$C_5H_3BrNO^+$	171,9397	2,33	4,30
		173,9378	2,87	3,71

Figura A 169. Espectro de IV da dispirina D (17) em filme em pastilha de Si.

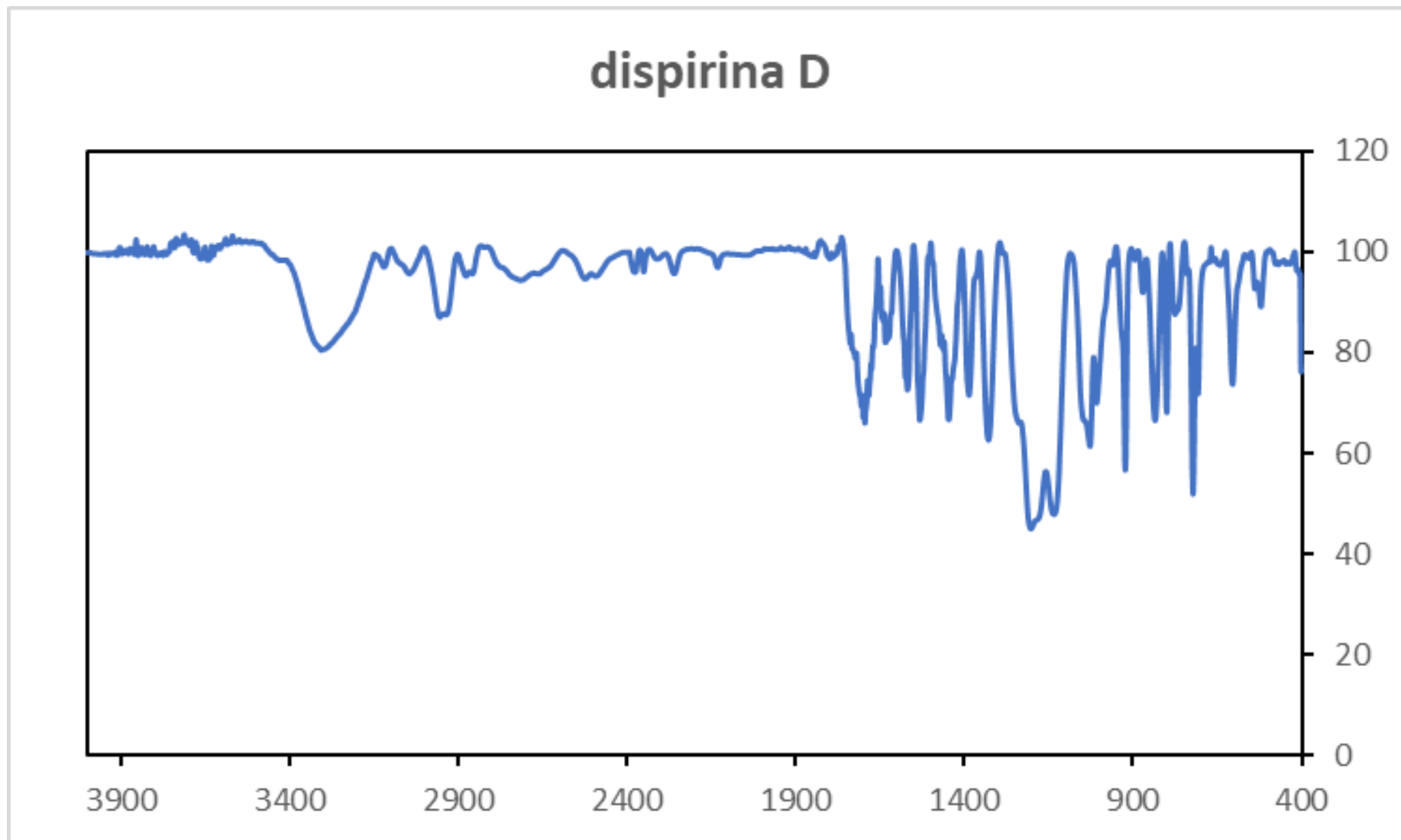


Figura A 170. Espectro MS da dispirina E (18).

M4A3G_DDA 137 (2.575)

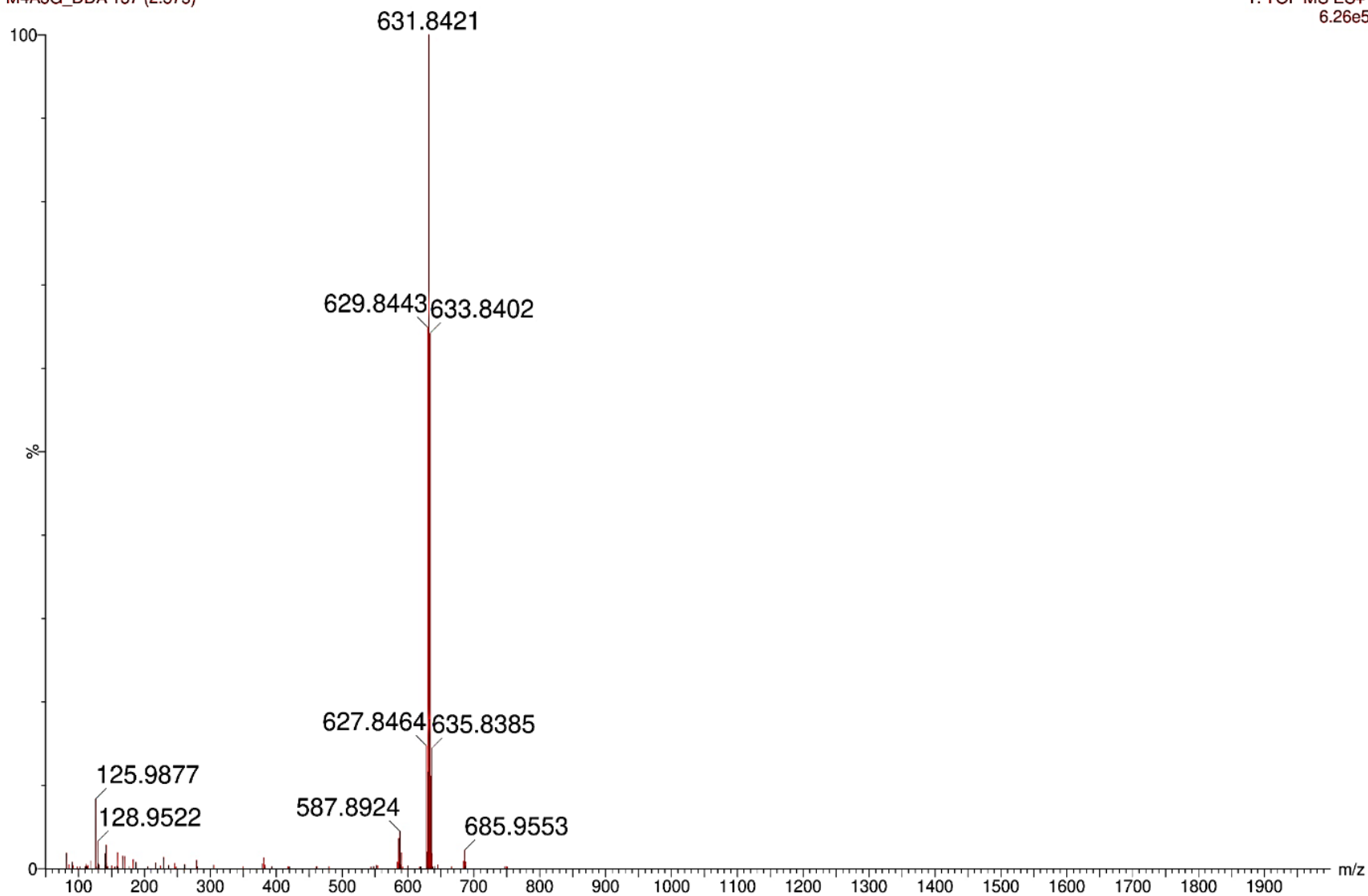
1: TOF MS ES+
6.26e5

Figura A 171. Expansão do espectro MS da dispirina E (18).

M4A3G_DDA 137 (2.575)

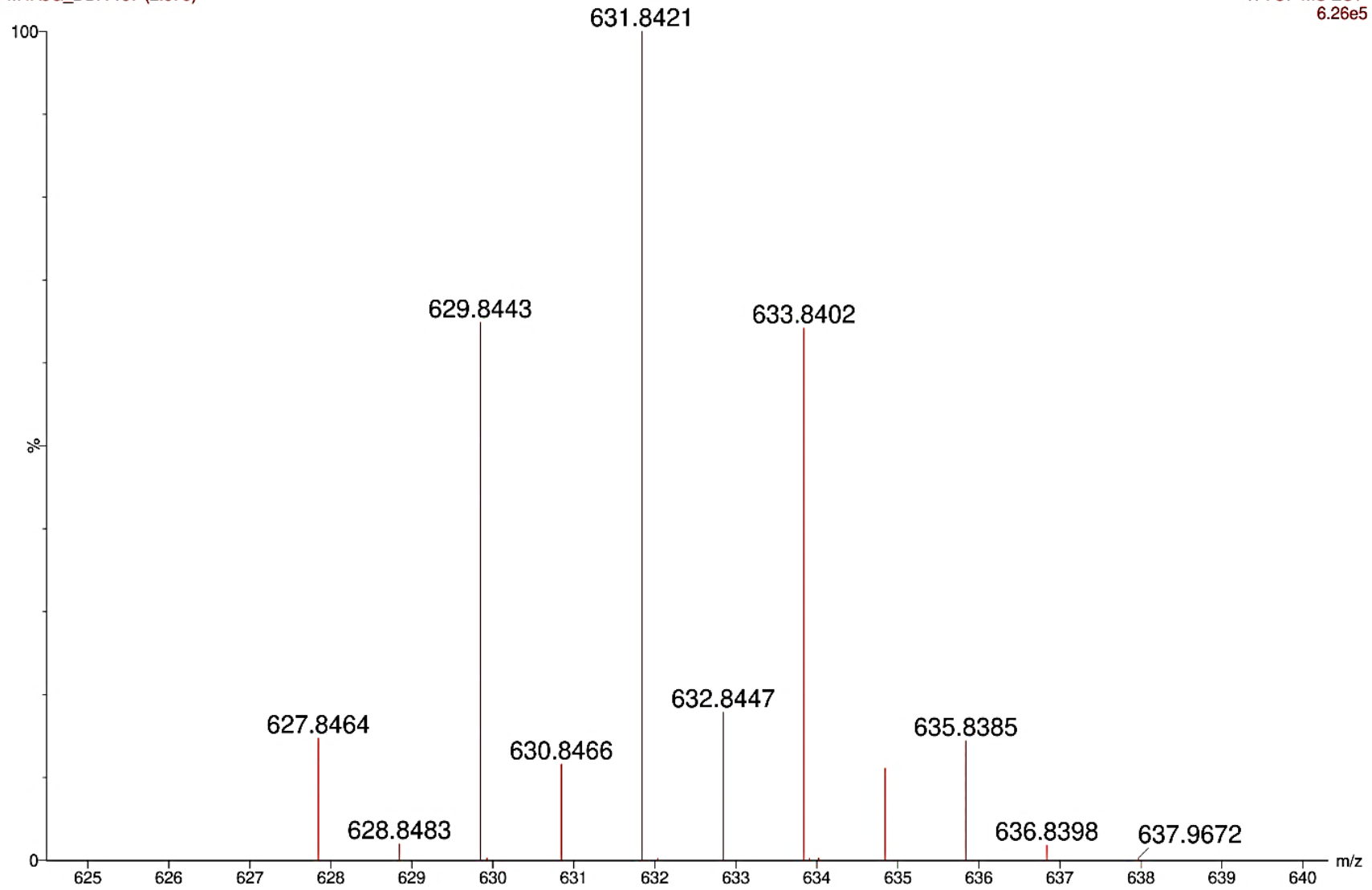
1: TOF MS ES+
6.26e5

Figura A 172. Espectros MS/MS da dispirina D (18).

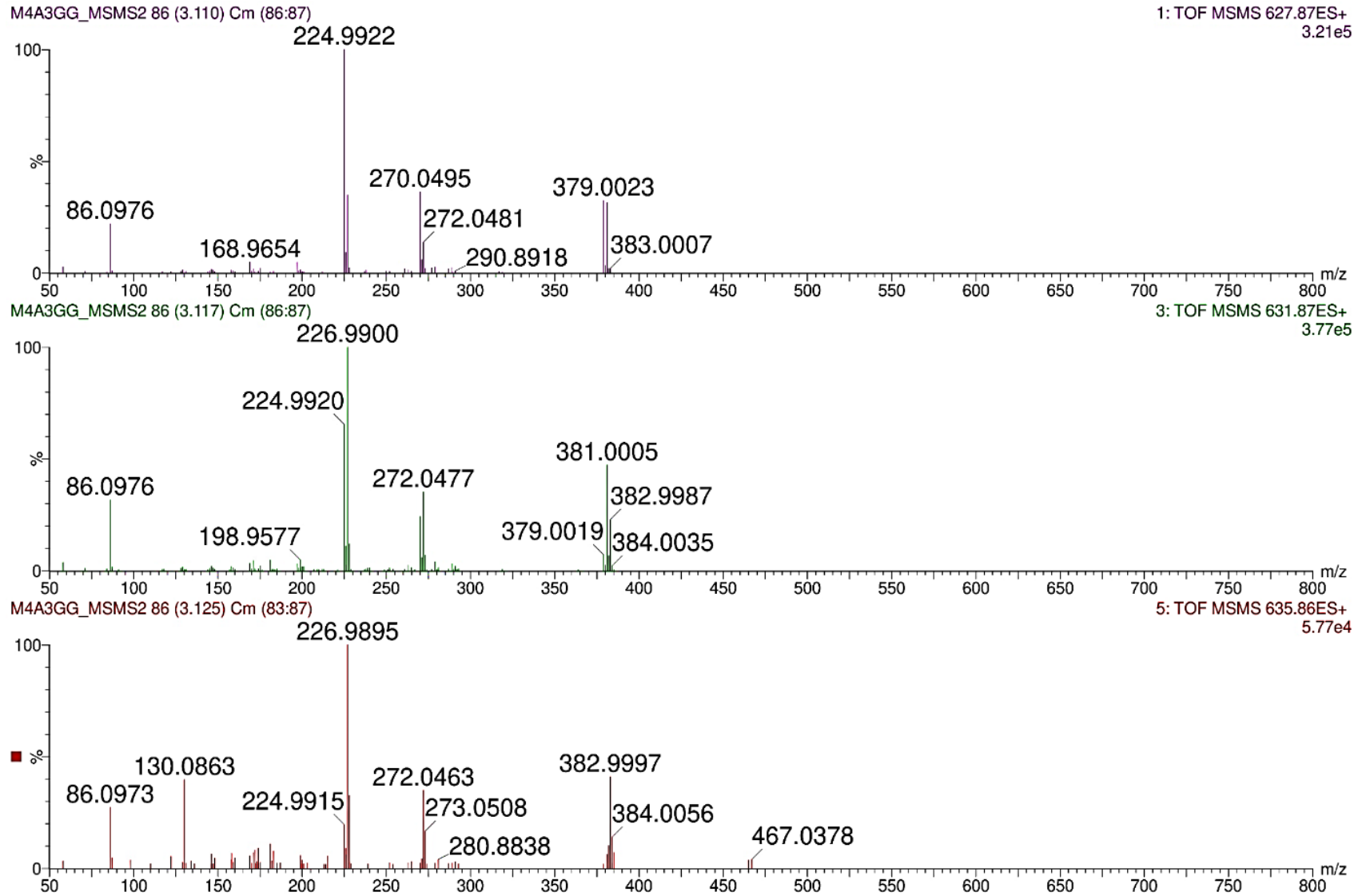


Tabela A 10. Íons observados nos espectros MS/MS do composto dispirina E (**18**) a partir dos íons precursores de m/z 627,84, m/z 631,84 e m/z 635,84.

Íon fragmento	Fórmula	m/z 627,84			m/z 631,84			m/z 635,84		
		Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)	Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)	Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)
A	$C_{13}H_{21}Br_2N_2O^+$	379,0024	2,11	32,48	381,0004	2,36	47,27	382,9997	5,74	41,92
		381,0008	3,41	31,46	382,9988	3,39	22,76			
B1/B2	$C_{12}H_{17}BrNO^+$	270,0496	2,59	36,22	270,0493	1,48	24,15	272,0463	-1,84	35,84
		272,0482	5,15	13,71	272,0477	3,30	35,11			
C1/C2	$C_{10}H_{10}BrO^+$	224,9921	4,89	100,00	224,9919	4,00	65,31	226,9895	2,20	100,00
		226,9899	3,96	34,81	226,9900	4,40	100,00			
D	$C_5H_2Br_2NO^+$	249,8493	-2,00	0,73	251,8484	2,38	1,26	-	-	-
		251,8480	0,79	0,60	253,8453	-1,57	0,42			

Figura A 173. Espectro MS da dispirina F (19).

M4A3G_DDA 140 (2.631)

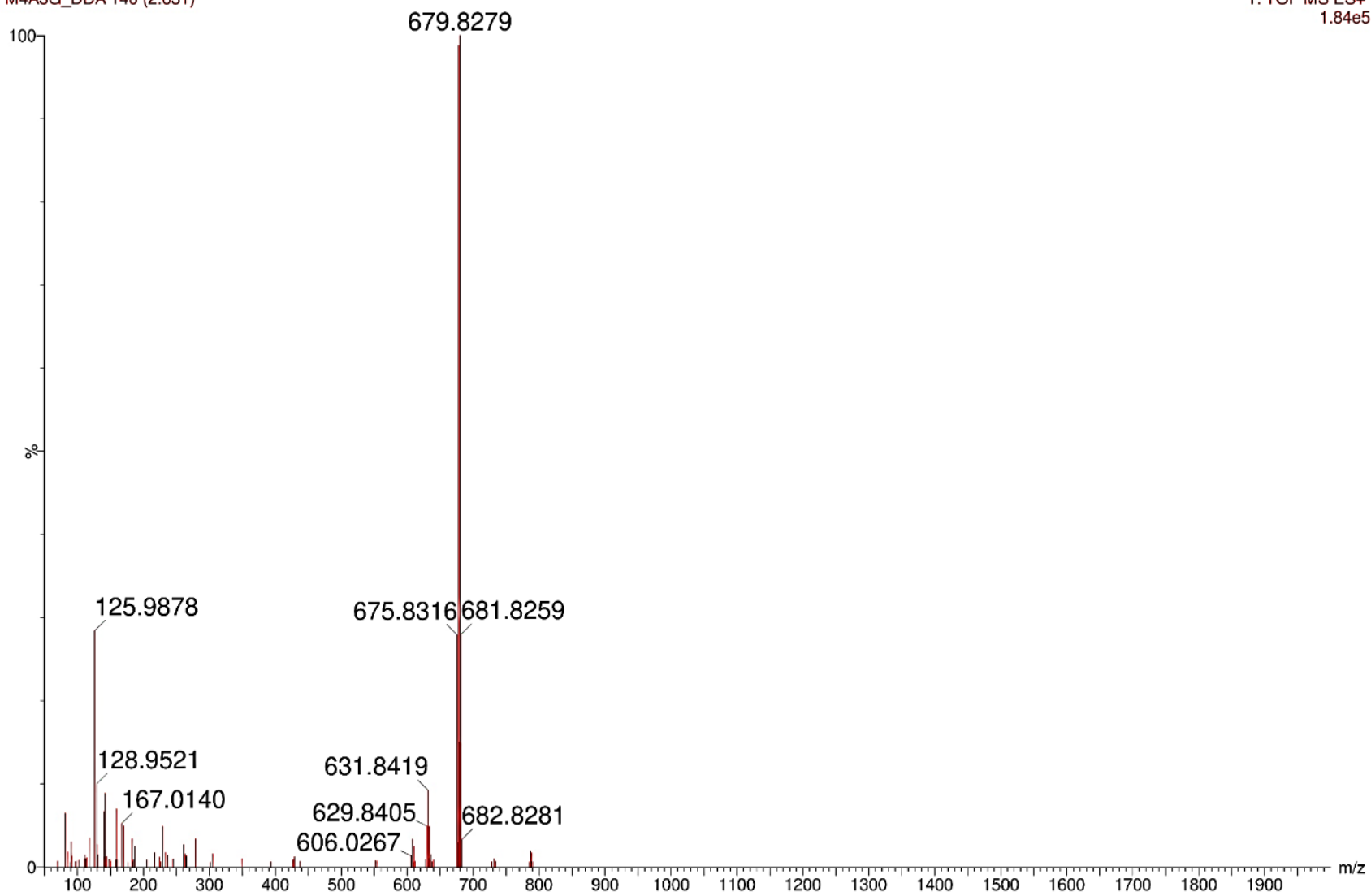
1: TOF MS ES+
1.84e5

Figura A 174. Expansão do espectro MS da dispirina F (19).

M4A3G_DDA 140 (2.631)

1: TOF MS ES+
1.84e5

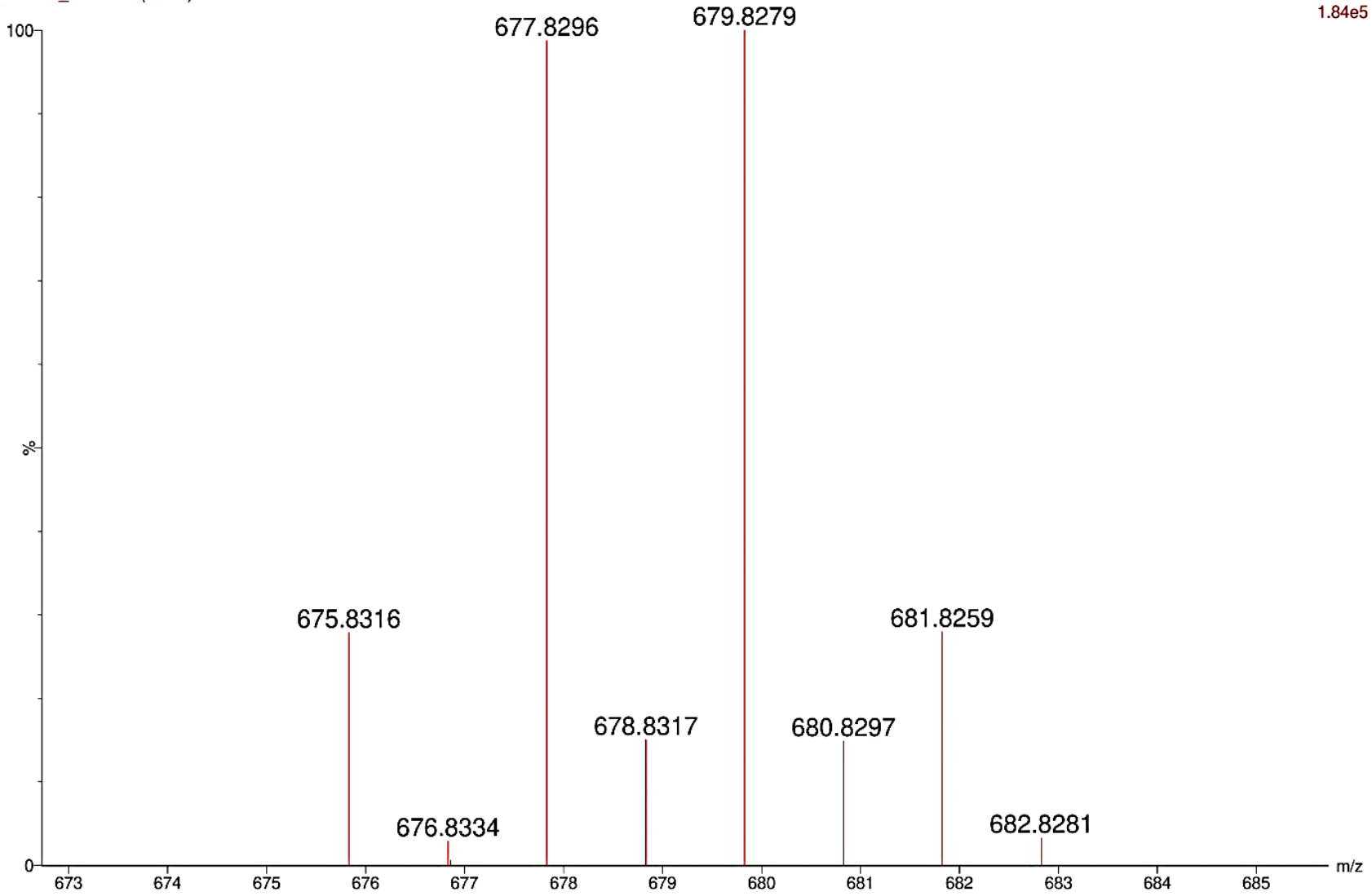
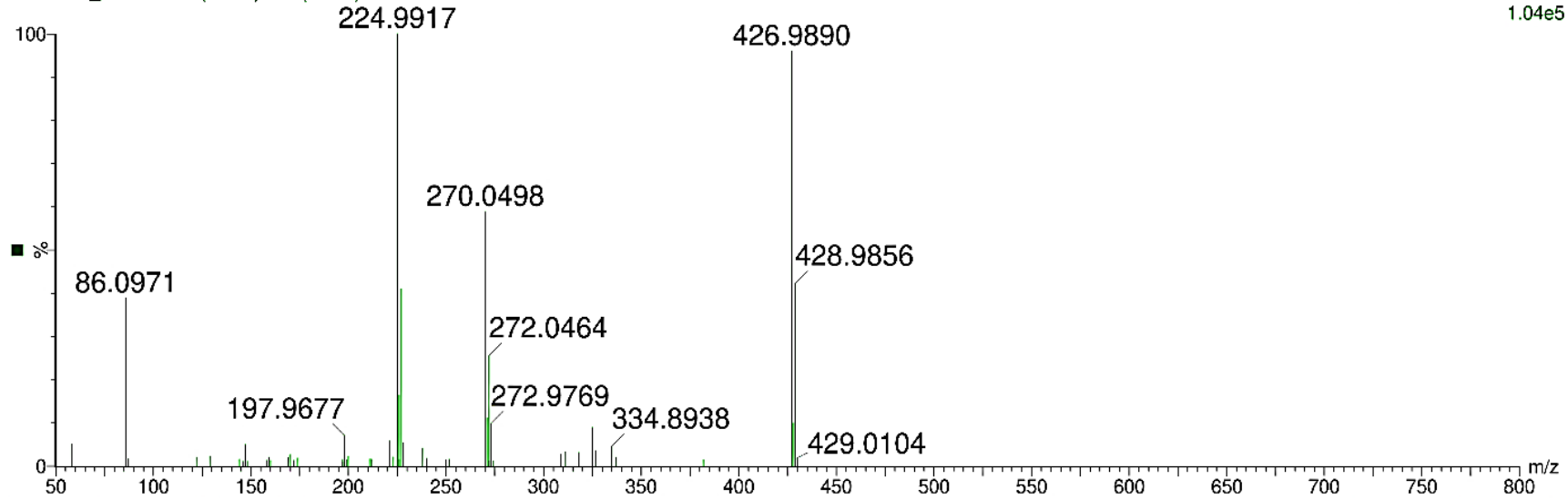


Figura A 175. Espectros MS/MS da dispirina F (19).

M4A3GG_MSMS2 86 (3.128) Cm (86:88)

6: TOF MSMS 675.87ES+
1.04e5

M4A3GG_MSMS2 86 (3.135) Cm (85:89)

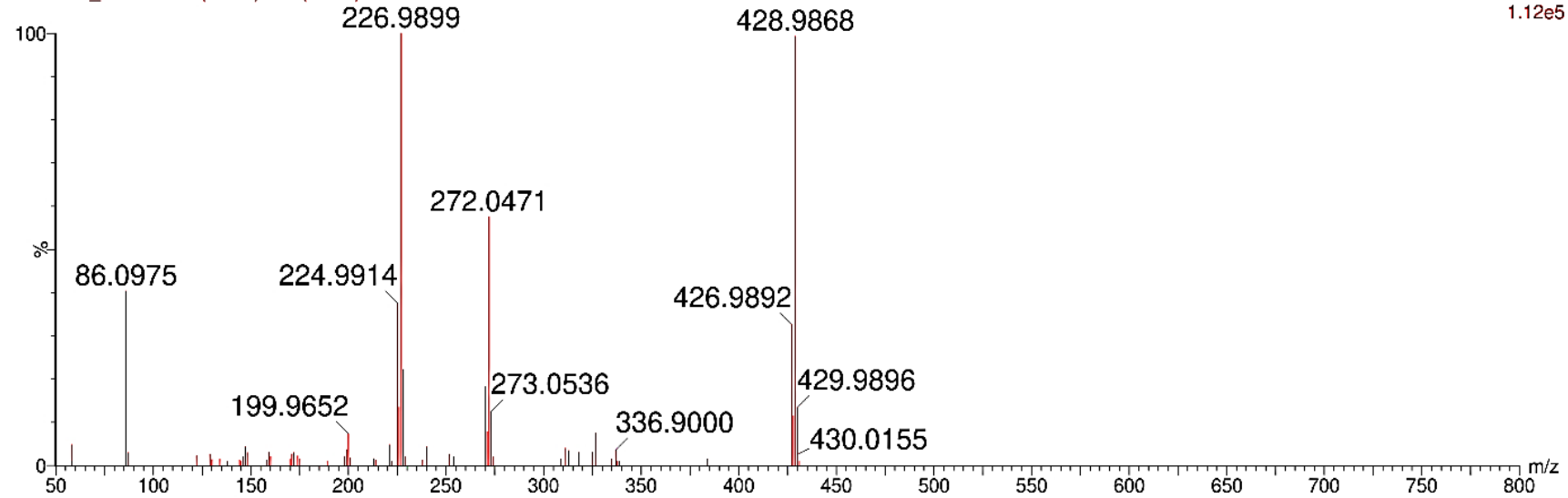
8: TOF MSMS 679.87ES+
1.12e5

Tabela A 11. Íons observados nos espectros MS/MS do composto dispirina F (**19**) a partir dos íons precursores de m/z 675,83 e m/z 679,82.

Íon fragmento	Fórmula	m/z 675,83			m/z 679,82		
		Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)	Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)
A	$C_{13}H_{21}BrIN_2O^+$	426,9890	3,04	96,00	426,9892	3,51	31,38
		428,9856	0,00	42,29	428,9868	2,80	99,22
B1	$C_{12}H_{17}INO^+$	318,0364	4,72	3,11	318,0334	-4,72	1,00
B2	$C_{12}H_{17}BrNO^+$	270,0498	3,33	58,83	270,0493	1,48	17,90
		272,0464	-1,47	25,57	272,0471	4,03	57,16
C1	$C_{10}H_{10}IO^+$	272,9769	-0,73	9,85	272,9782	4,03	9,46
C2	$C_{10}H_{10}BrO^+$	224,9917	3,11	100,00	224,9914	1,78	37,51
		226,9895	2,20	40,92	226,9899	3,96	100,00
D	$C_5H_3BrNO^+$	249,8537	15,61	1,47	251,8427	-20,25	2,09
		251,8502	9,53	1,58	253,8462	1,97	1,76

Figura A 176. Espectro MS da disparamida A (**20**).

M4A4KB5_MS 564 (2.289)

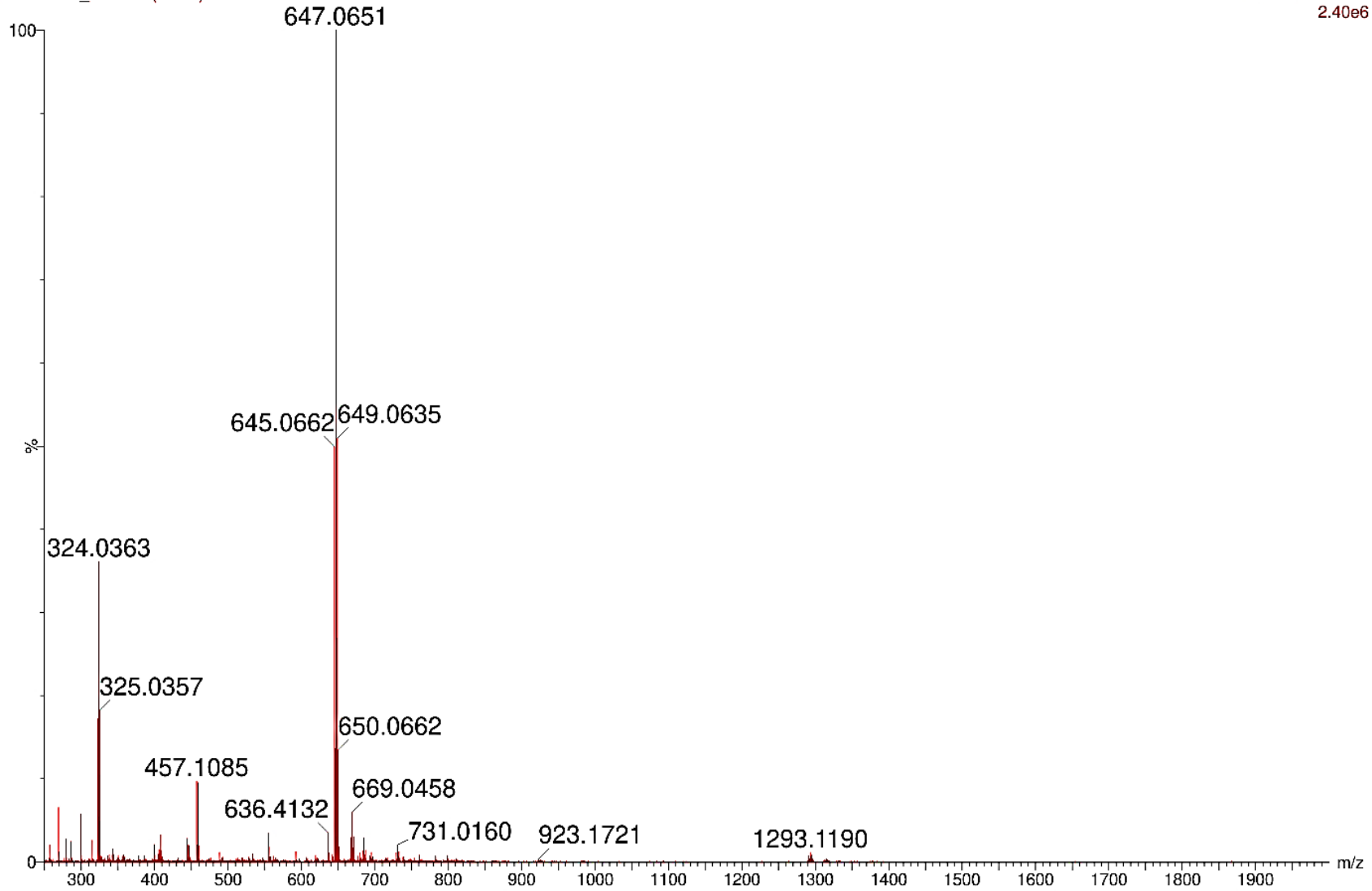
1: TOF MS ES+
2.40e6

Figura A 177. Expansão do espectro MS da disparamida A (20).

M4A4KB5_MS 564 (2.289)

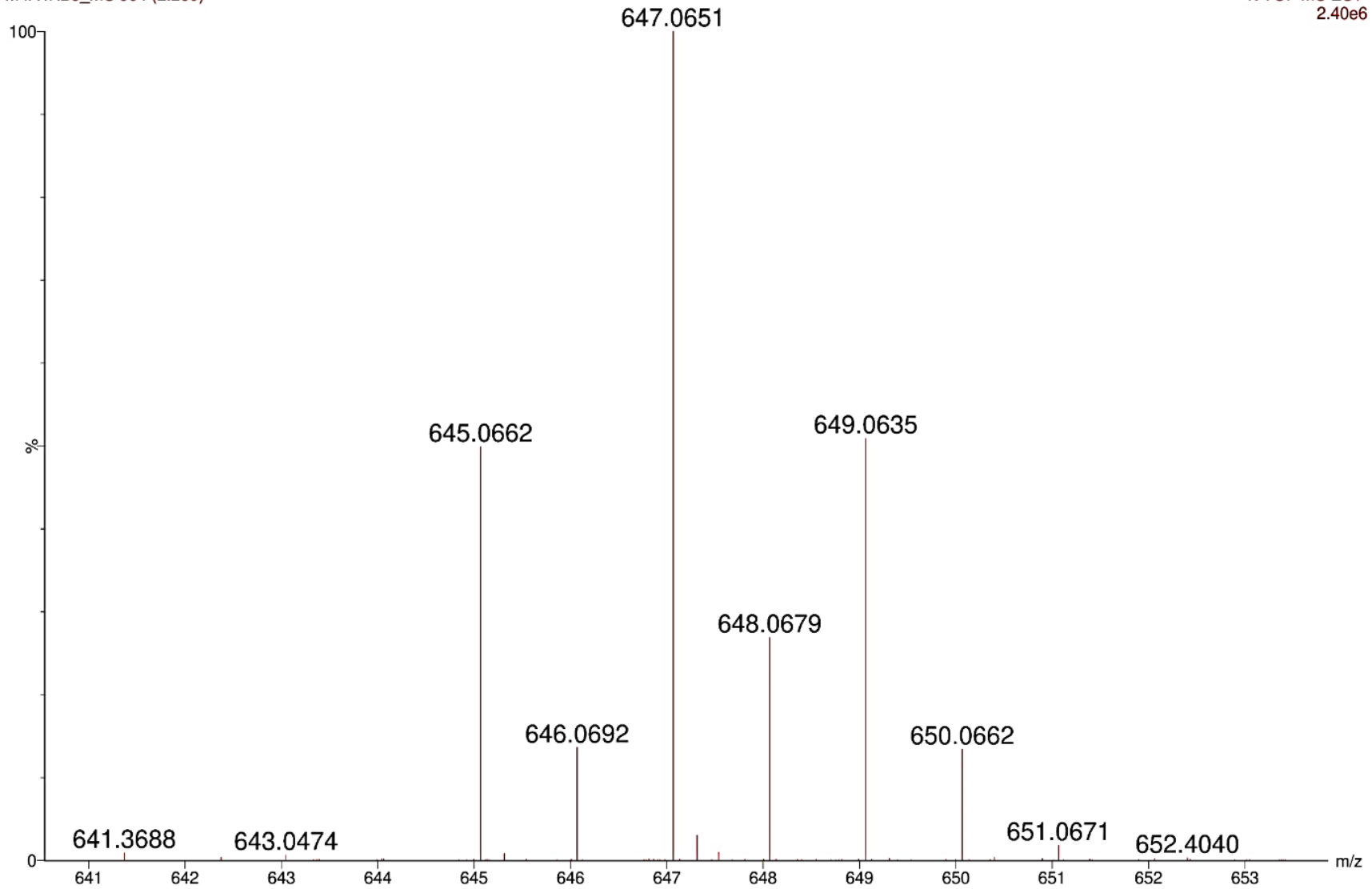
1: TOF MS ES+
2.40e6

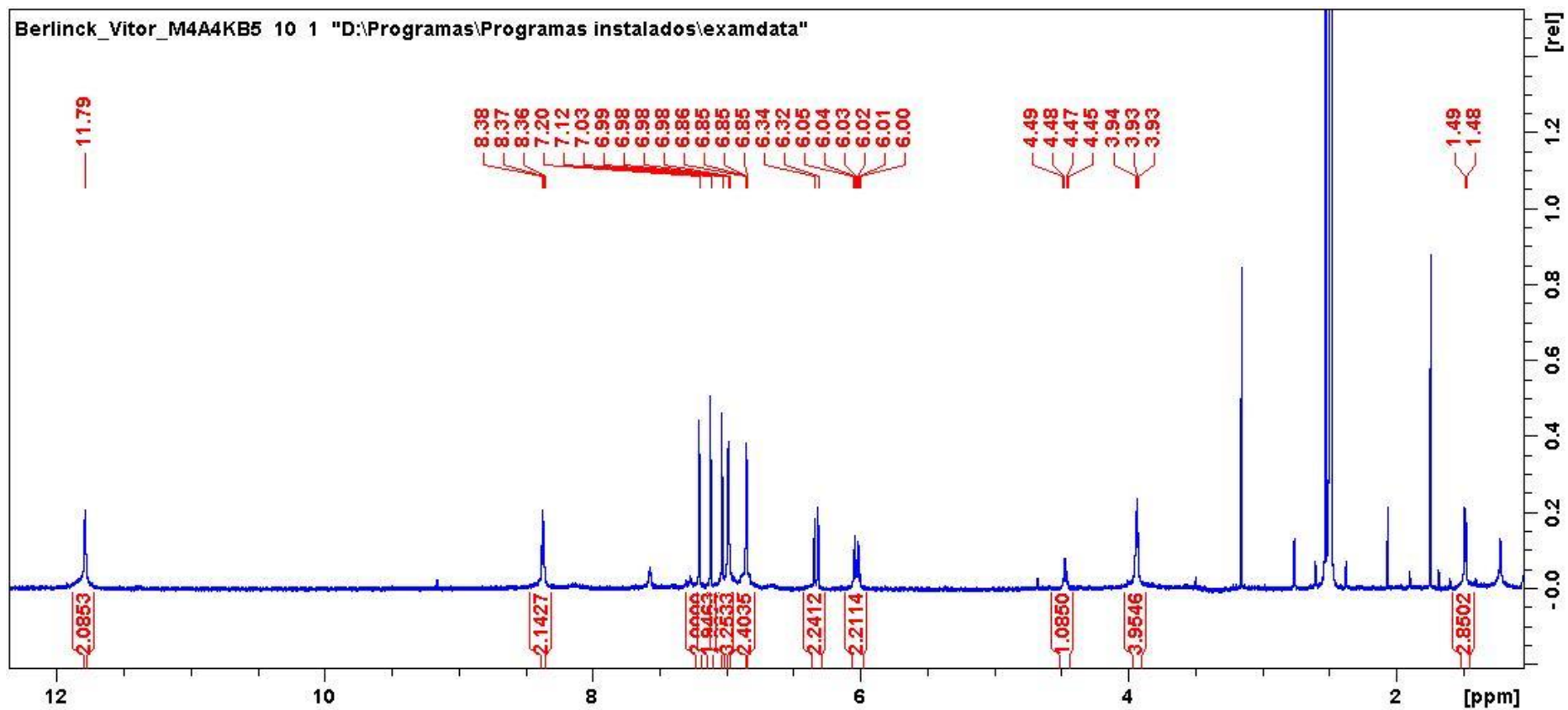
Figura A 178. Espectro de RMN de ^1H da disparamida A (**20**) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

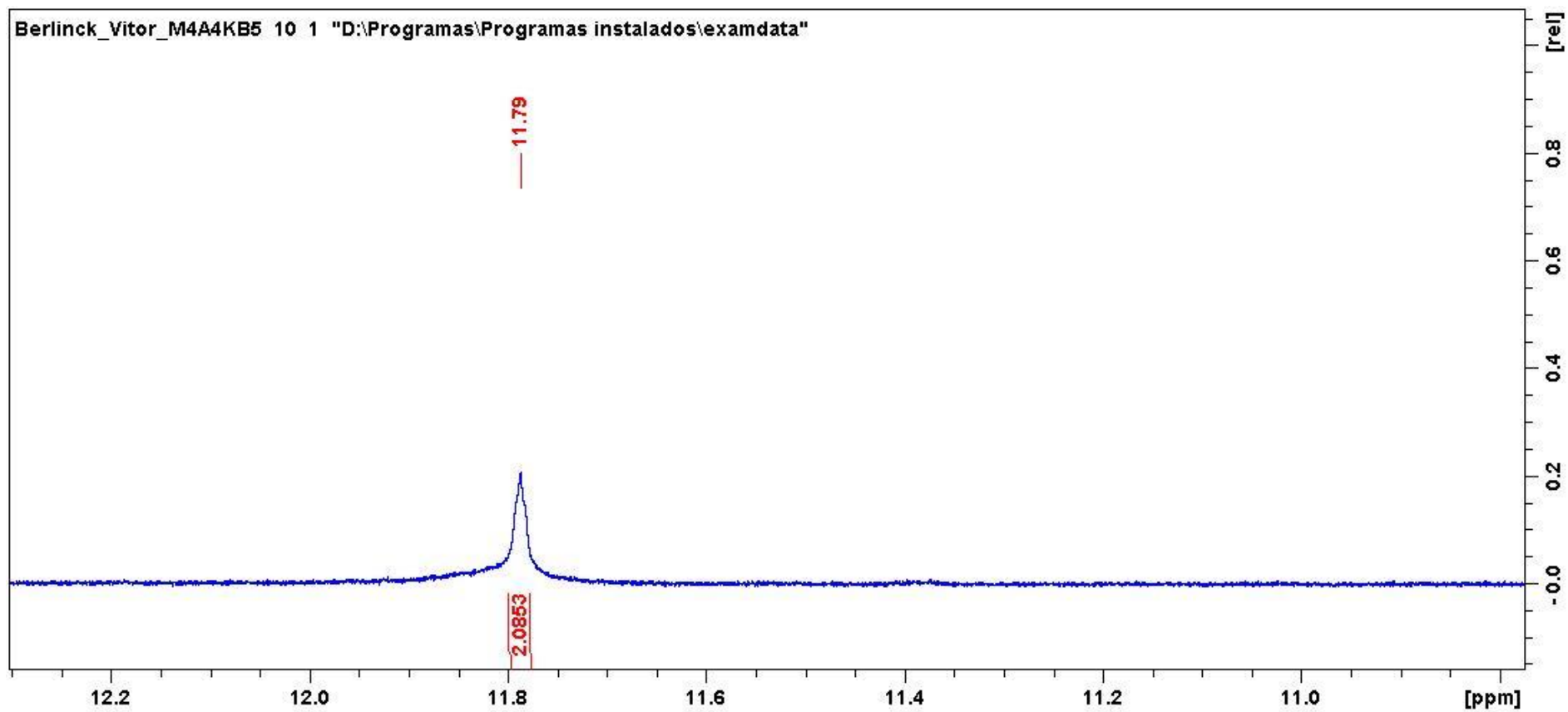
Figura A 179. Expansão do espectro de RMN de ^1H da disparamida A (**20**) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

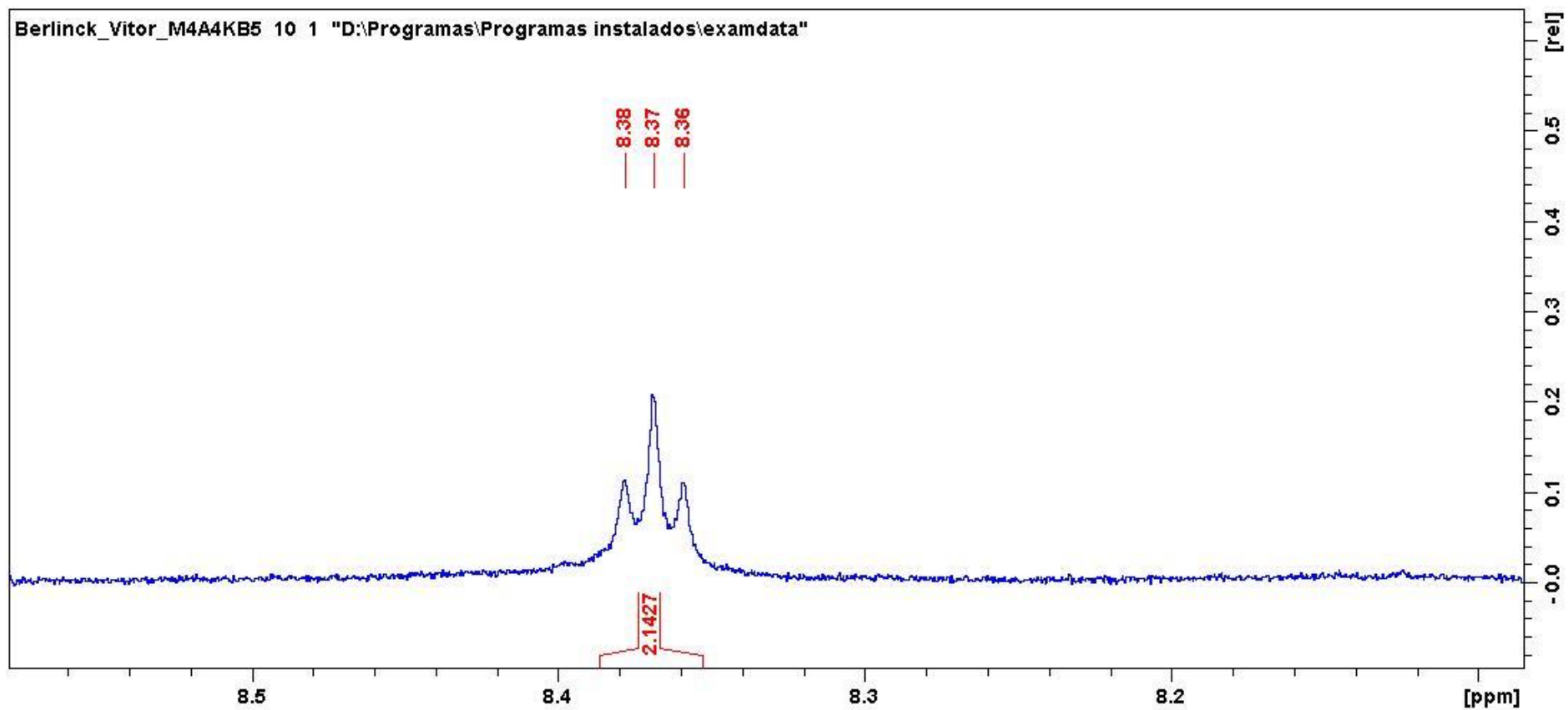
Figura A 180. Expansão do espectro de RMN de ^1H da disparamida A (**20**) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

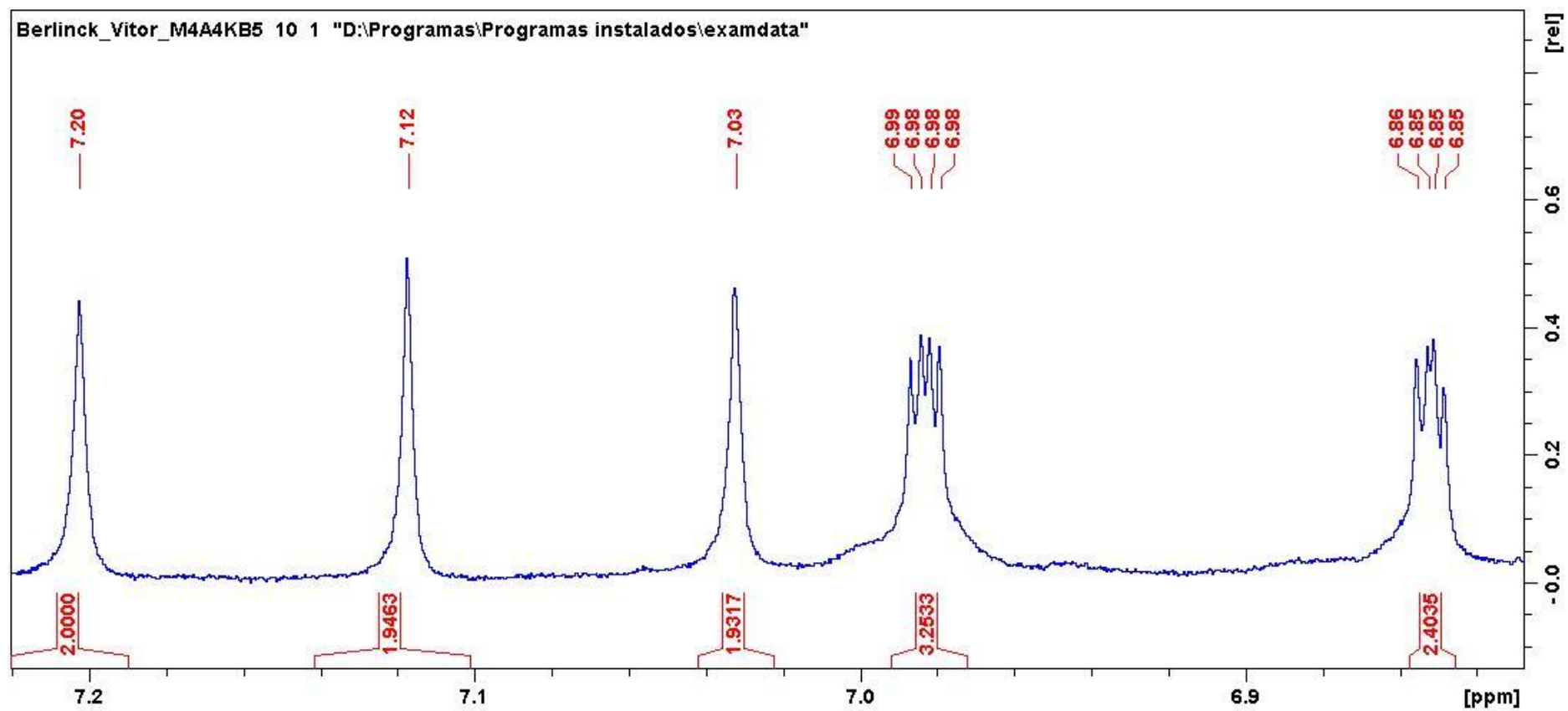
Figura A 181. Expansão do espectro de RMN de ^1H da disparamida A (**20**) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

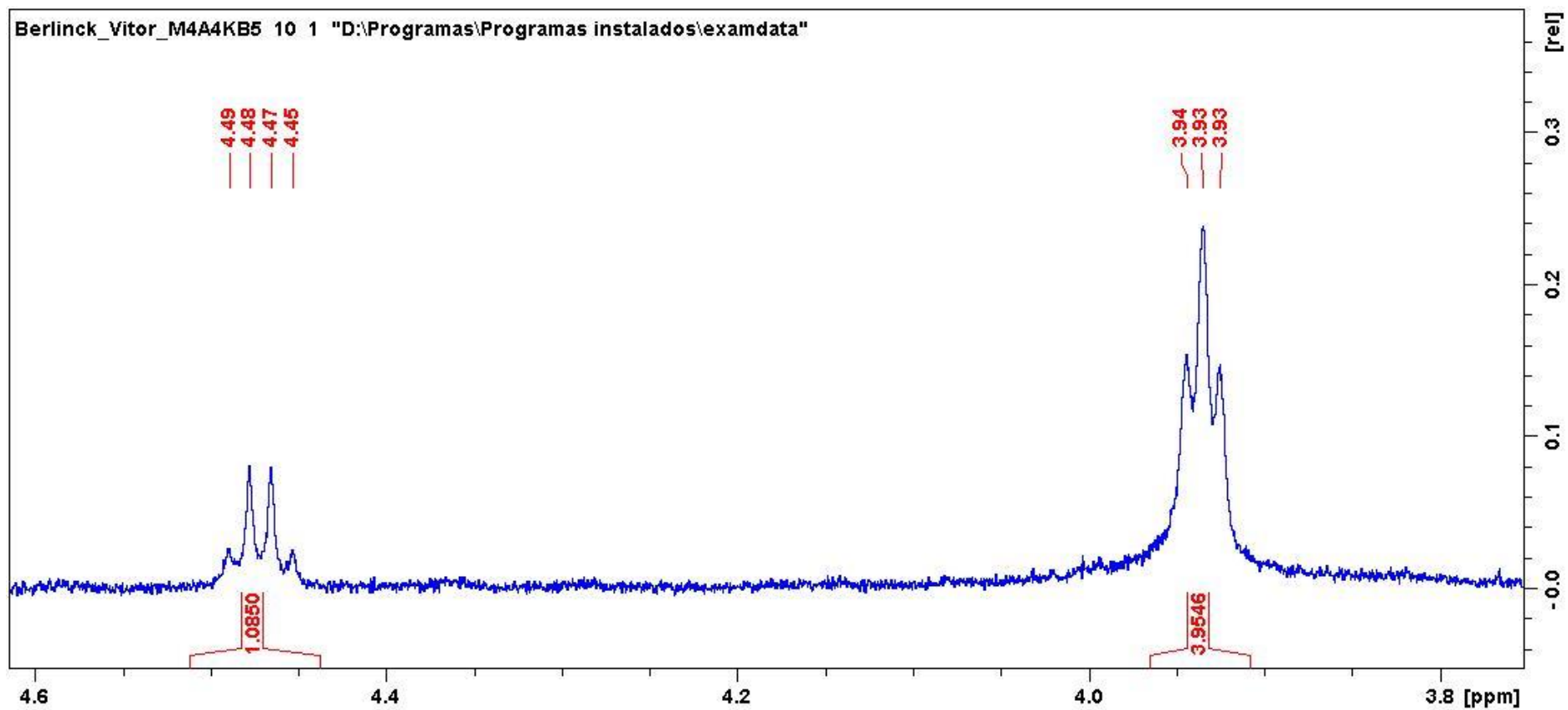
Figura A 182. Expansão do espectro de RMN de ^1H da disparamida A (**20**) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

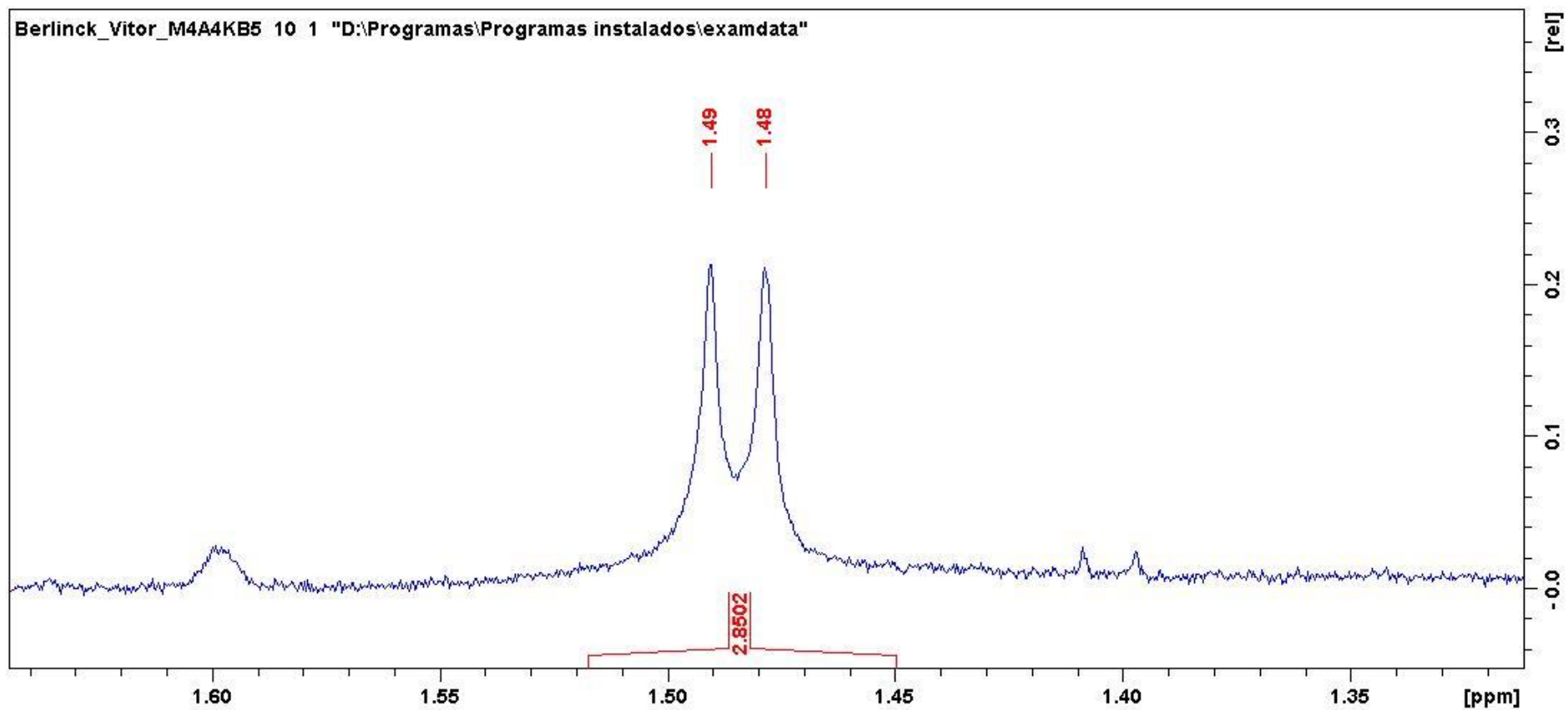
Figura A 183. Expansão do espectro de RMN de ^1H da disparamida A (**20**) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

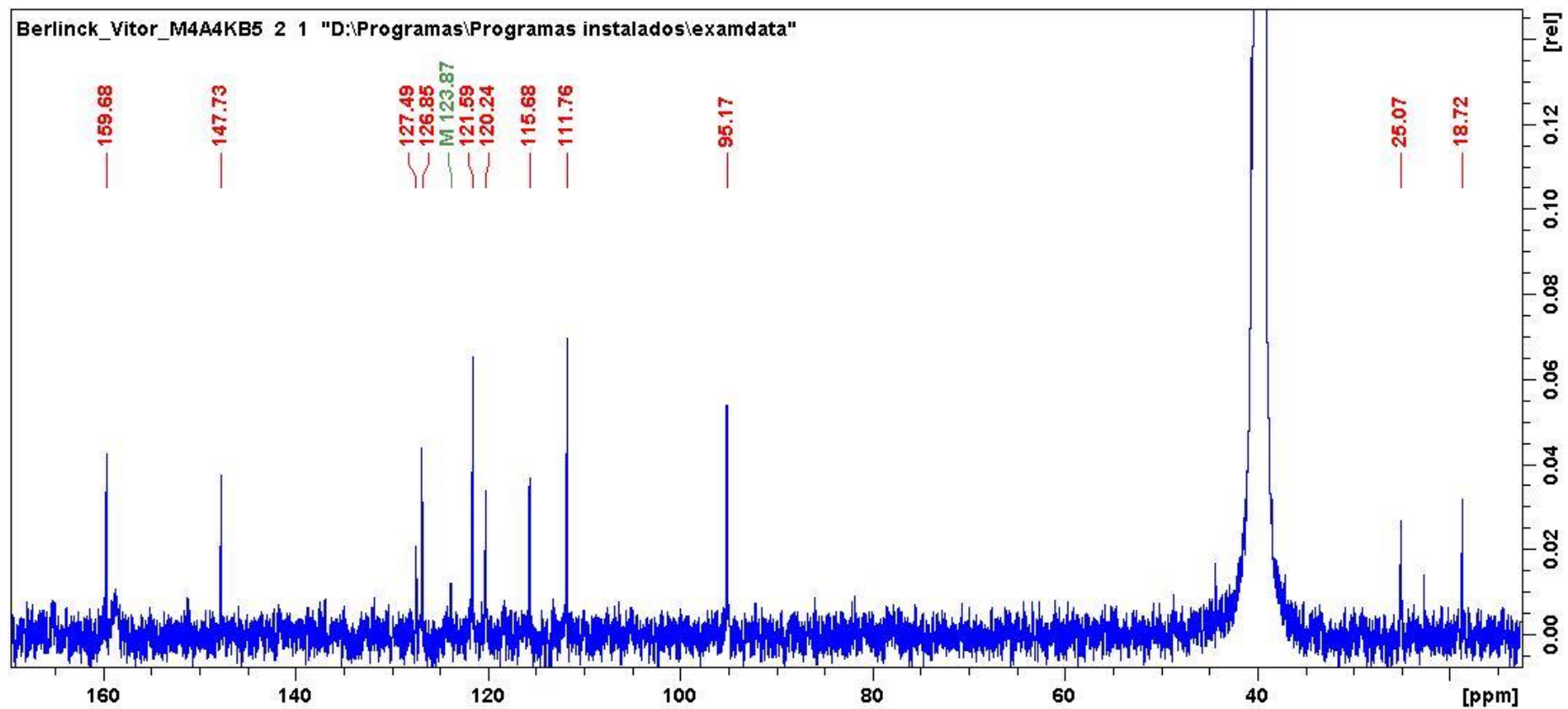
Figura A 184. Espectro de RMN de ^{13}C da disparamida A (**20**) (150 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

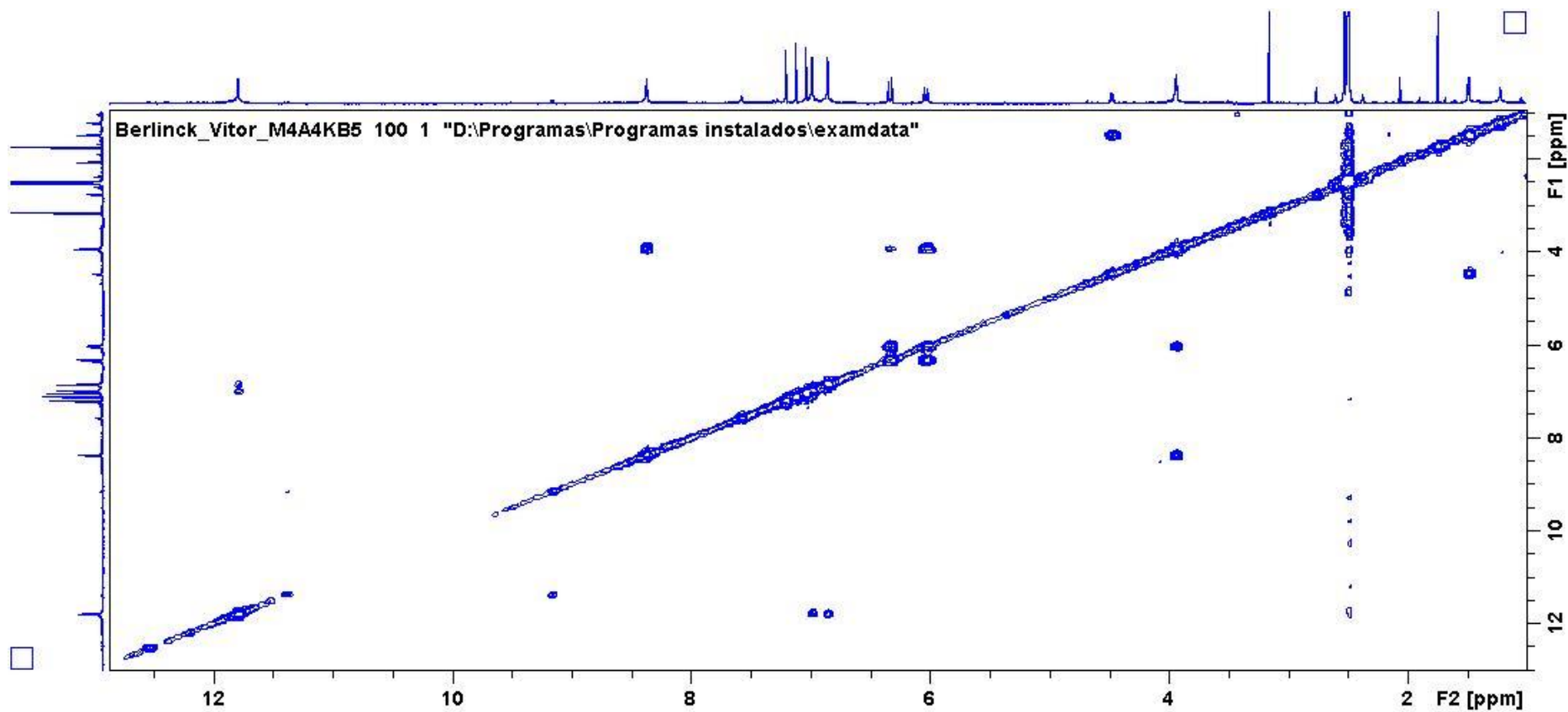
Figura A 185. Espectro COSY da disparamida A (**20**) (600 MHz, em DMSO- d_6).

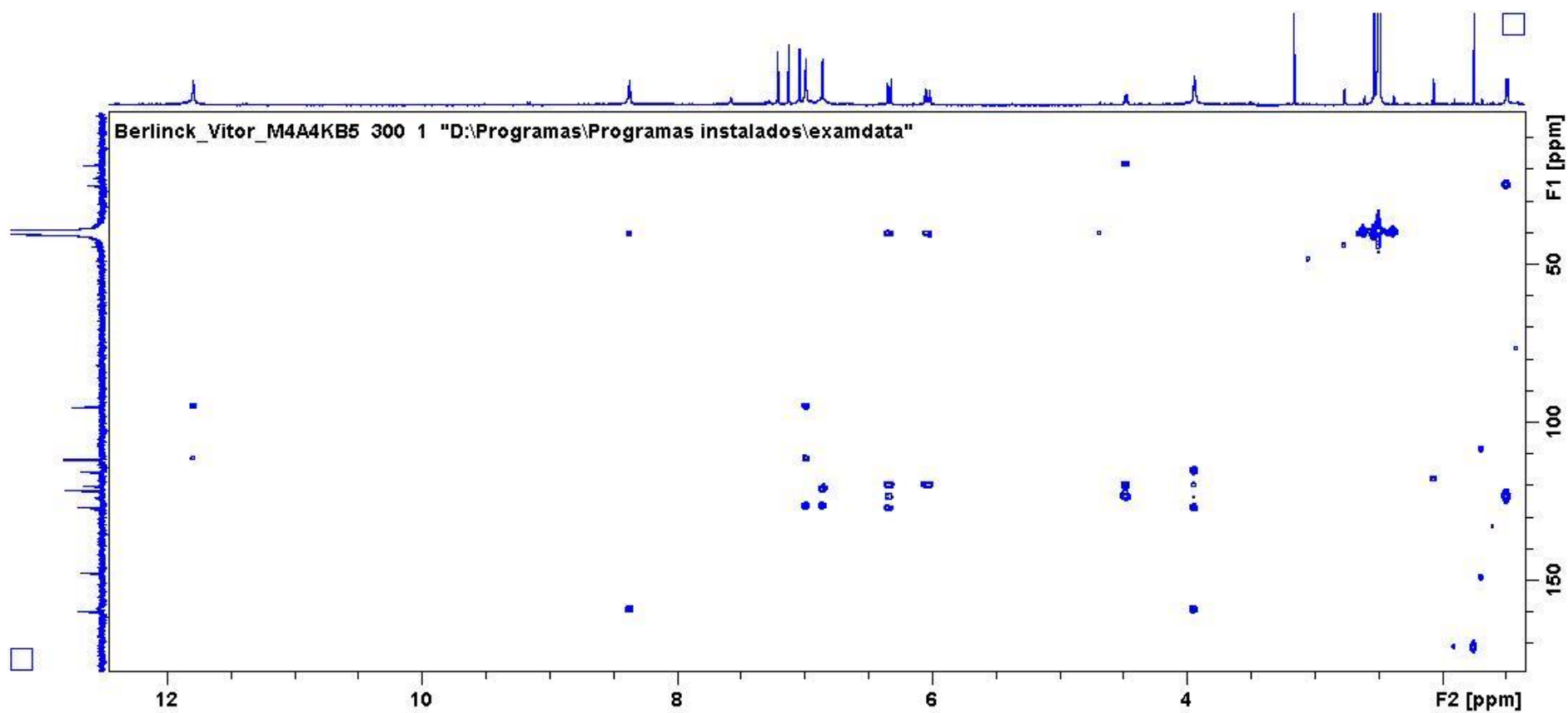
Figura A 186. Espectro HMBC da disparamida A (**20**) (600 MHz, em DMSO- d_6).

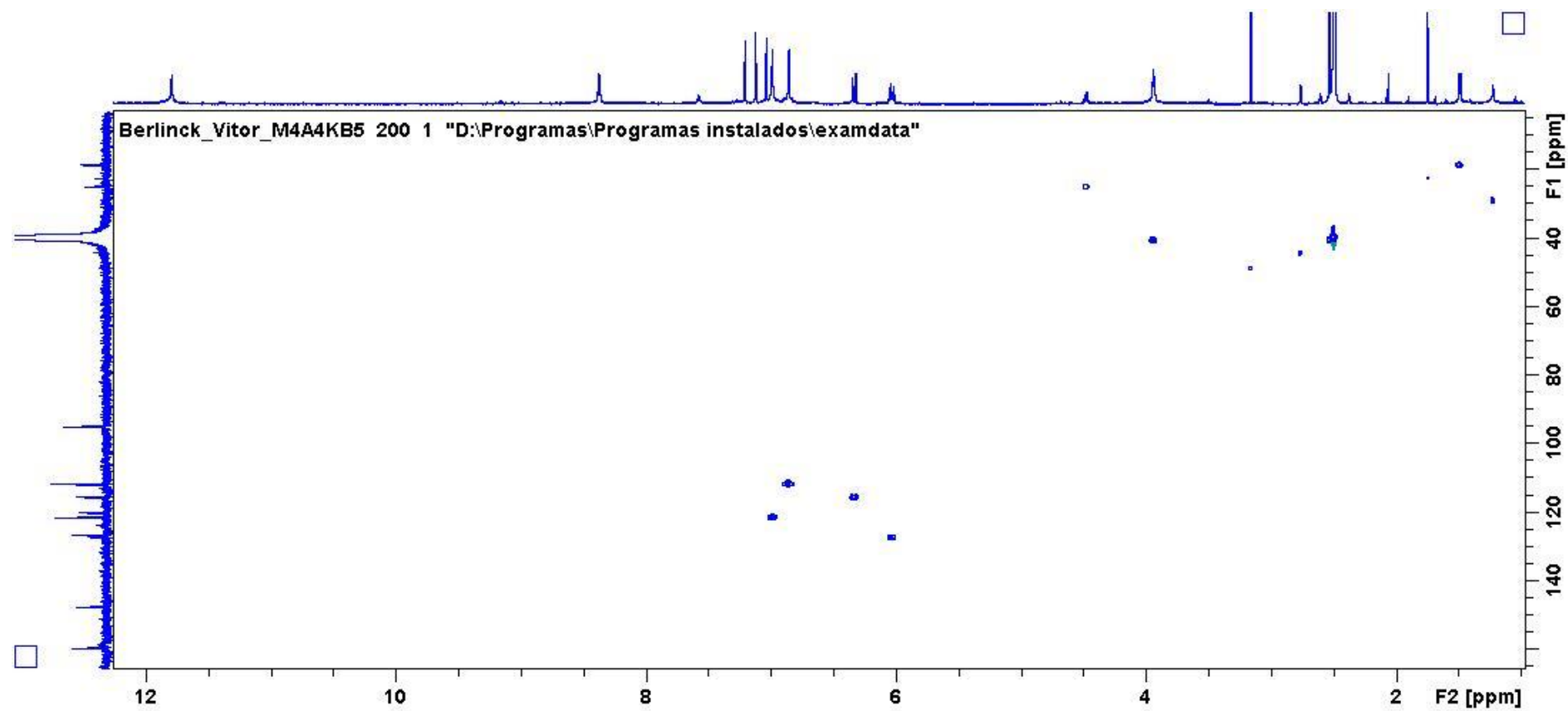
Figura A 187. Espectro HSQC da disparamida A (**20**) (600 MHz, em DMSO- d_6).

Figura A 188. Espectros MS/MS da disparamida A (20).

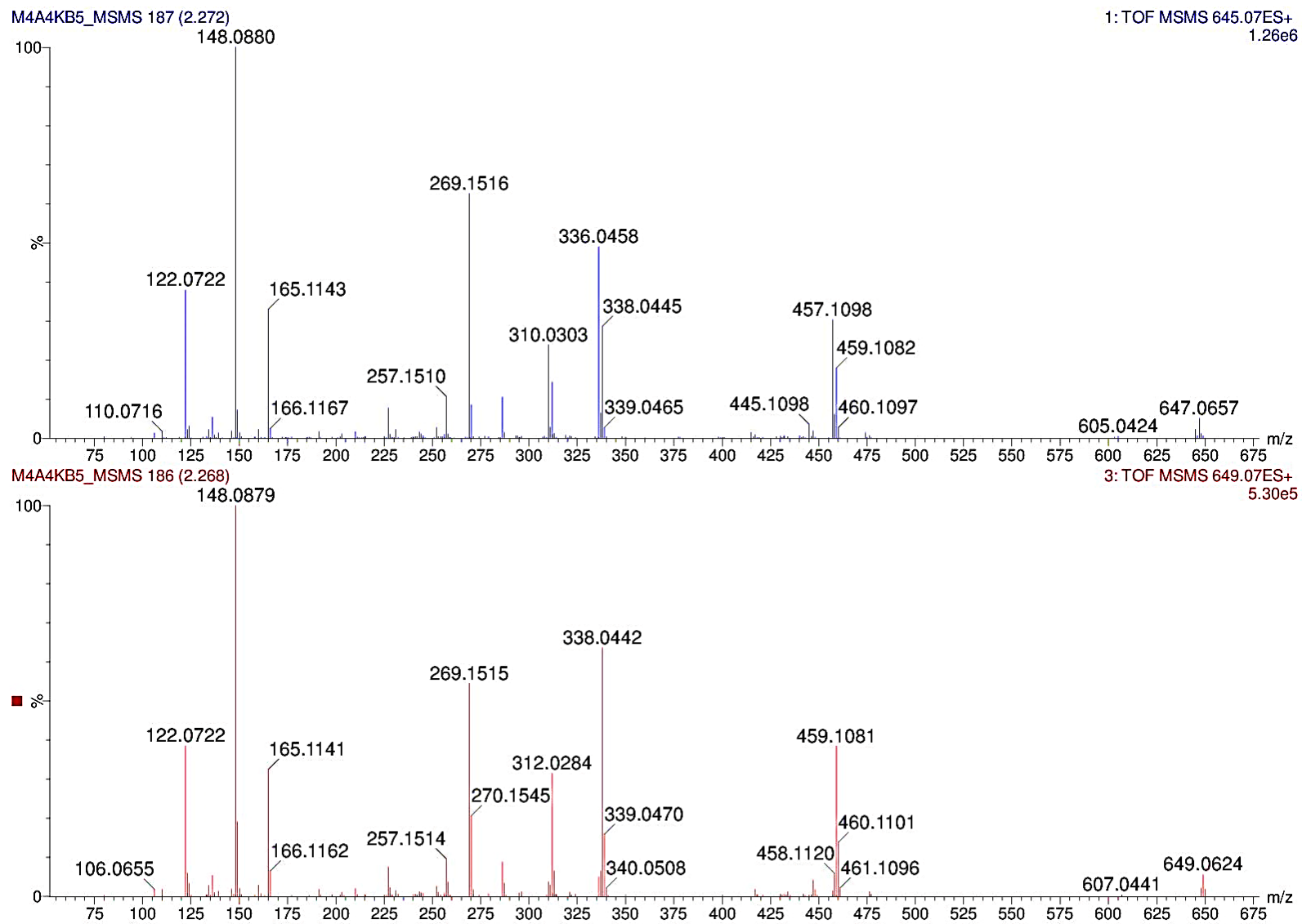


Figura A 189. Espectro de IV da disparamida A (**20**) em filme em pastilha de Si.

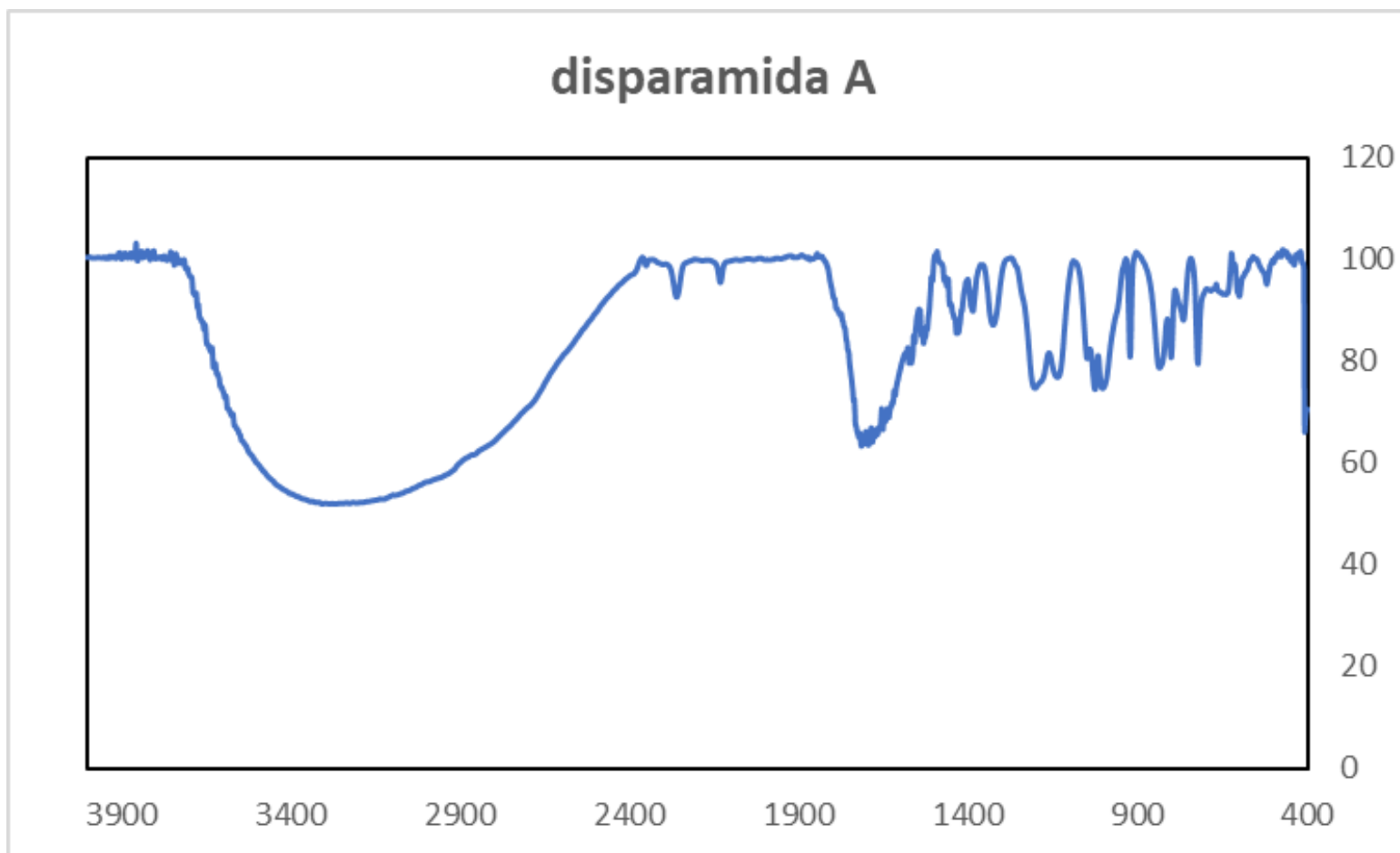


Figura A 190. Espectro MS da disparamida B (21).

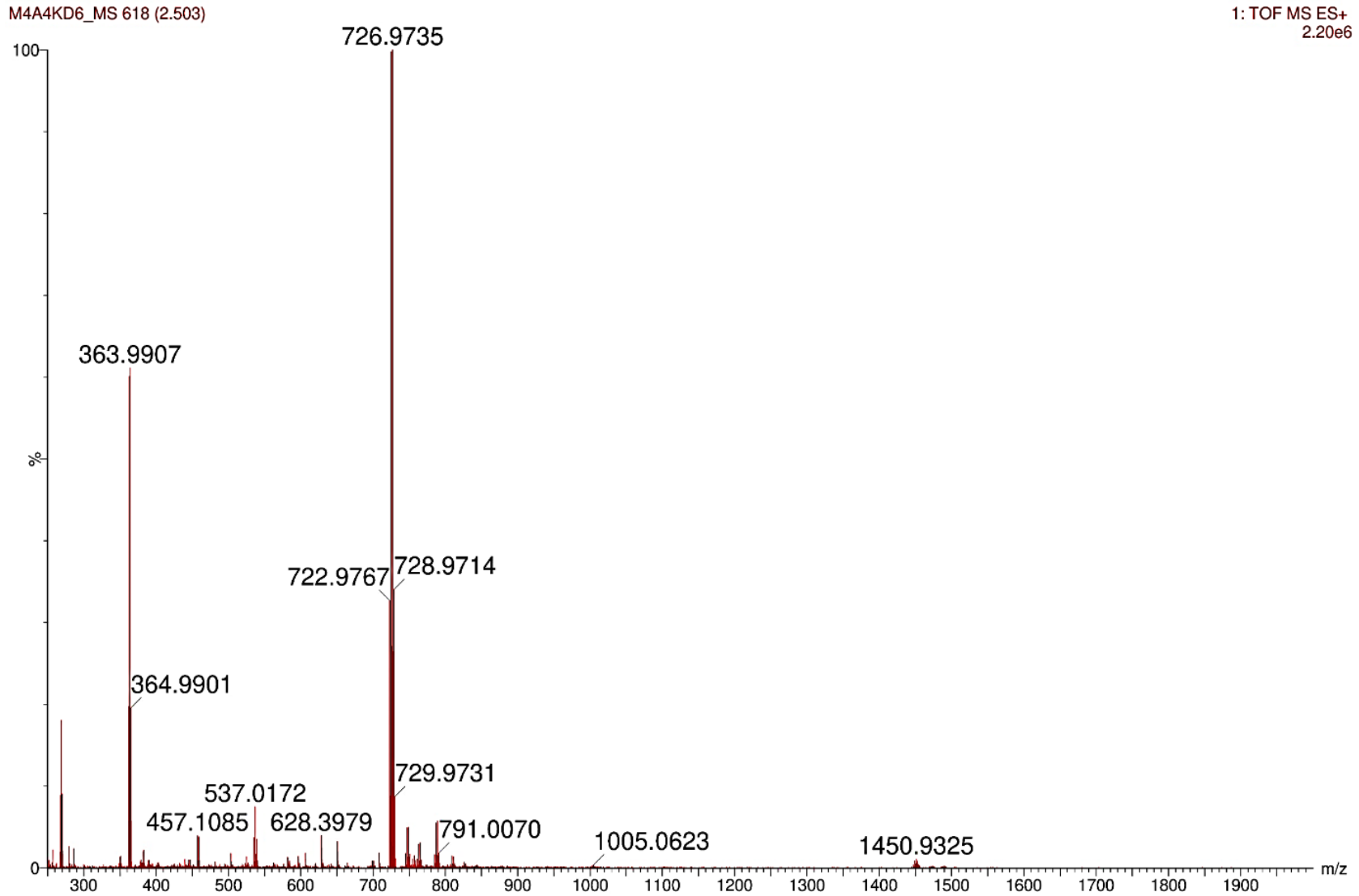


Figura A 191. Expansão dos espectro MS da disparamida B (21).

M4A4KD6_MS 618 (2.503)

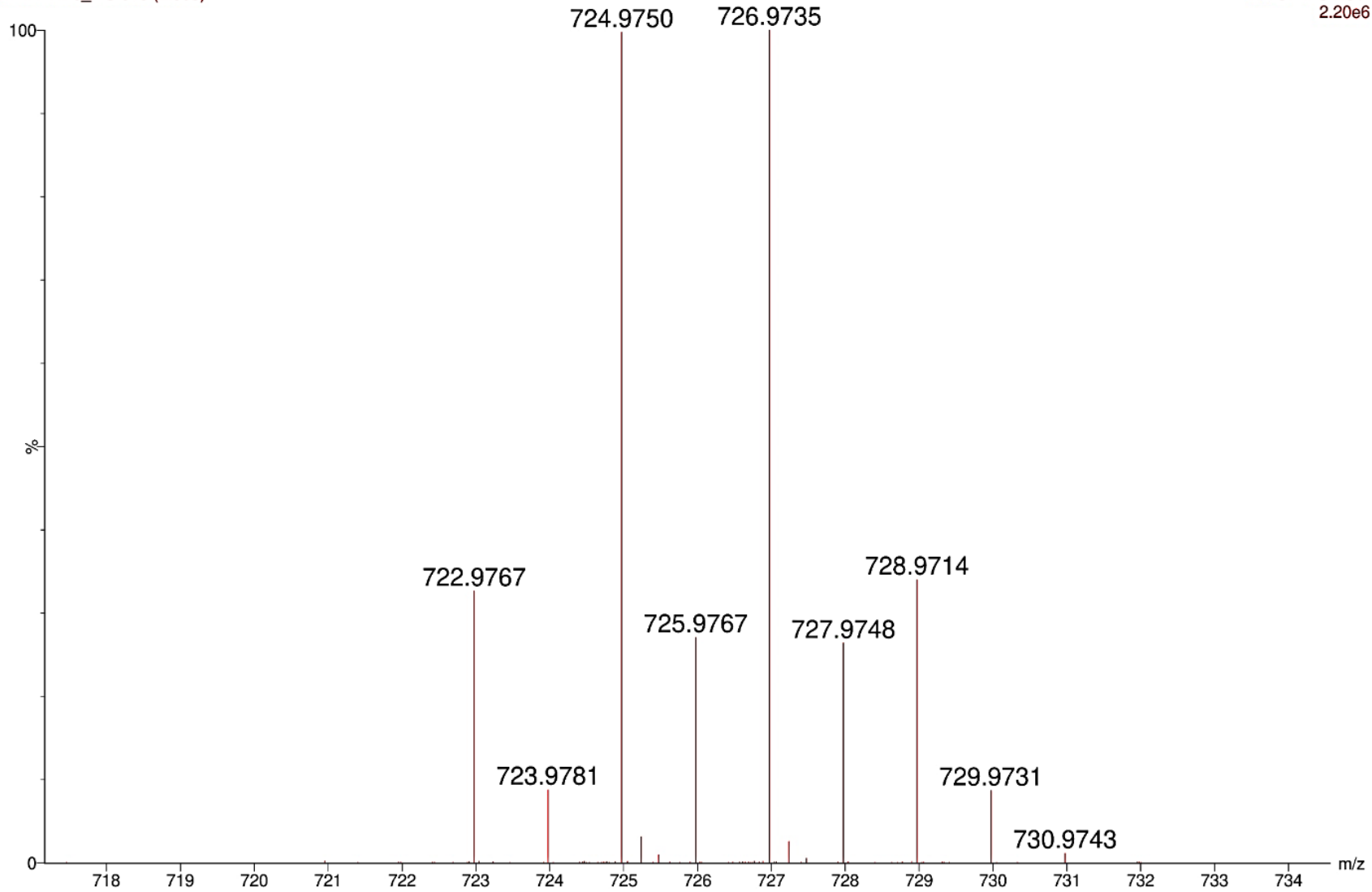
1: TOF MS ES+
2.20e6

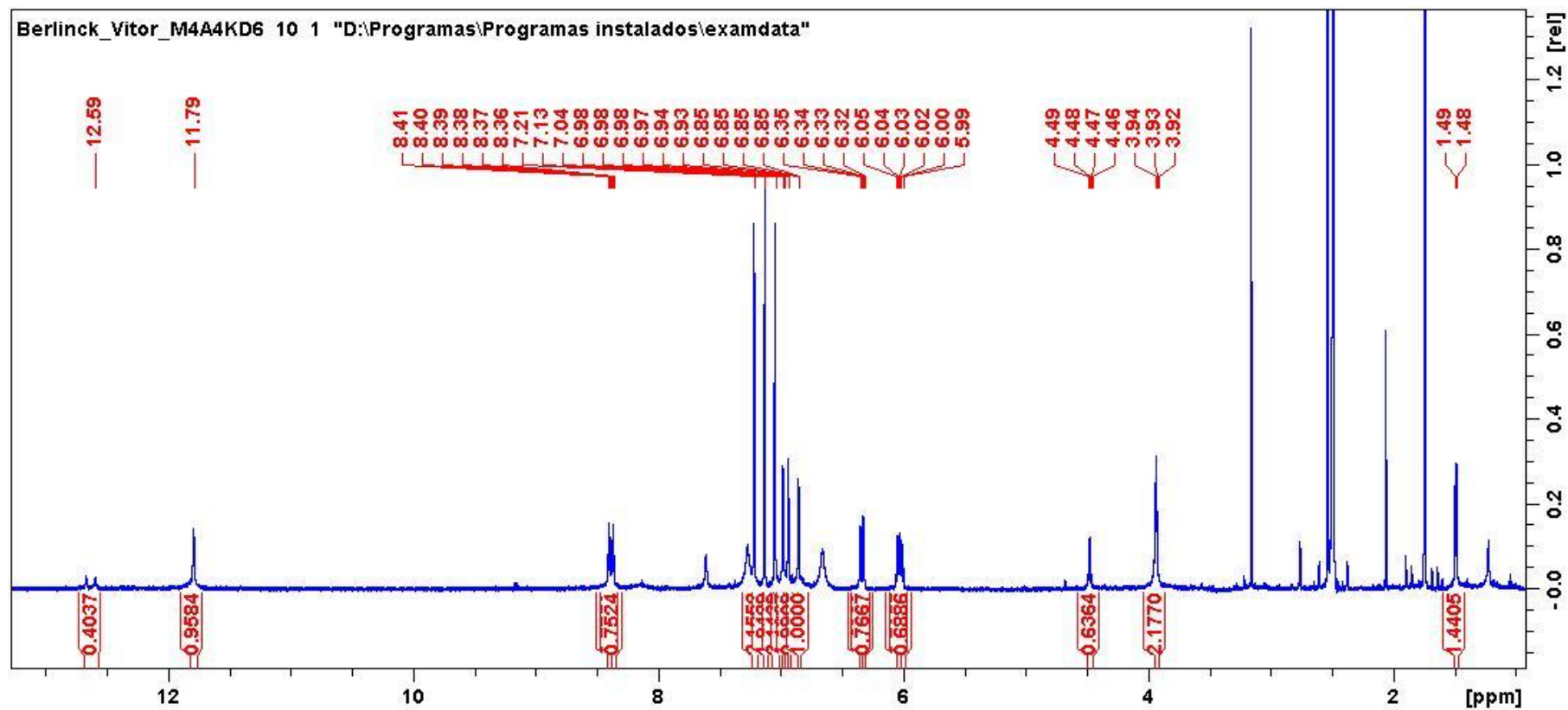
Figura A 192. Espectro de RMN de ^1H da disparamida B (21) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

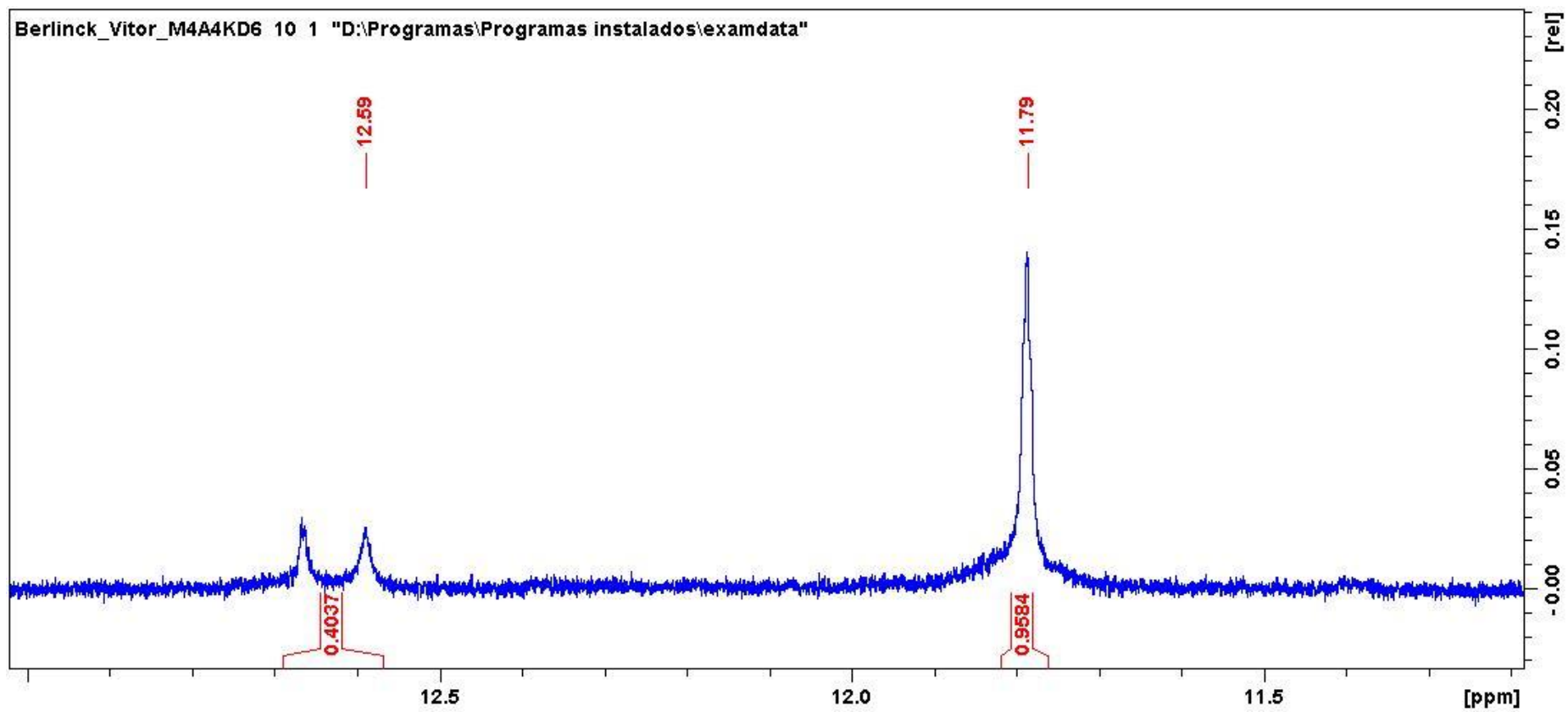
Figura A 193. Espectro de RMN de ^1H da disparamida B (21) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

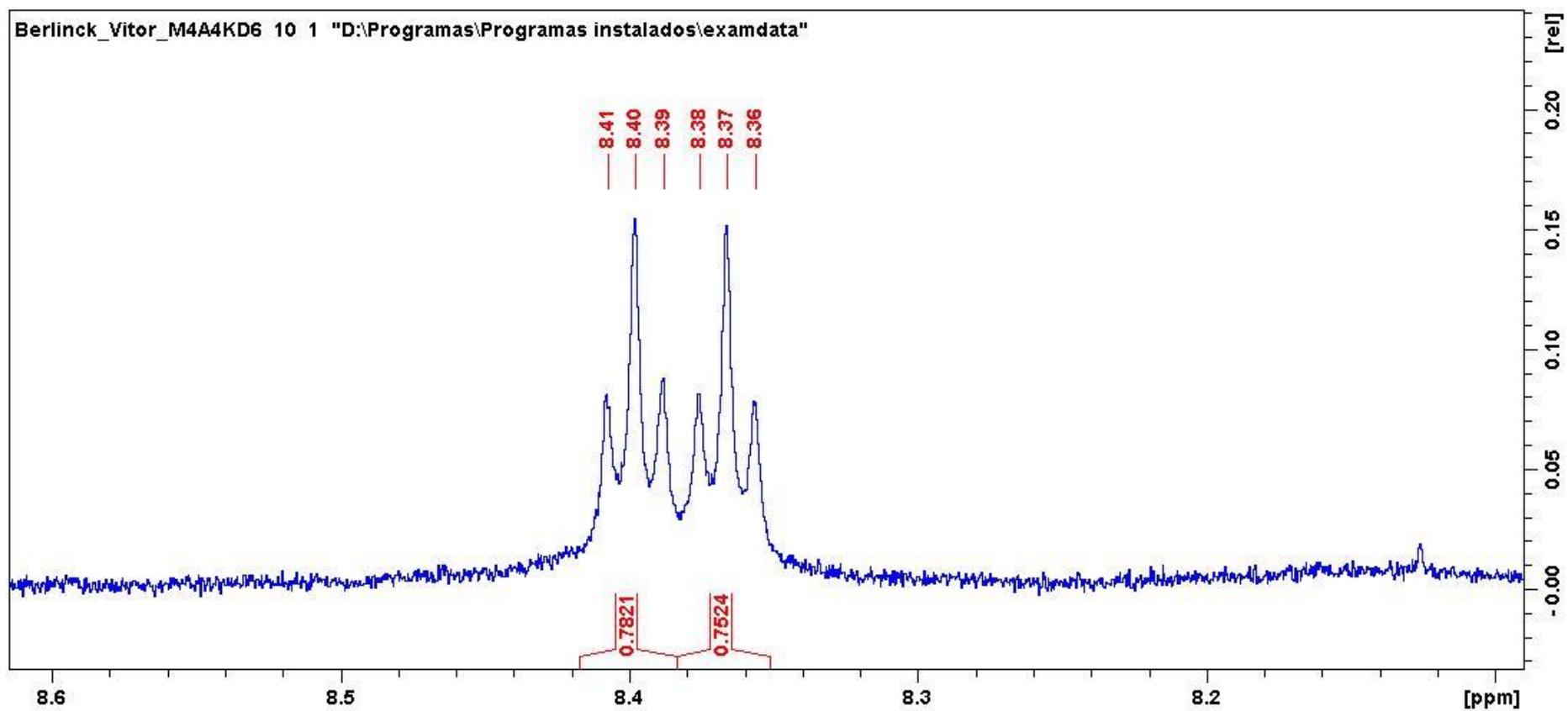
Figura A 194. Expansão do espectro de RMN de ^1H da disparamida B (**21**) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

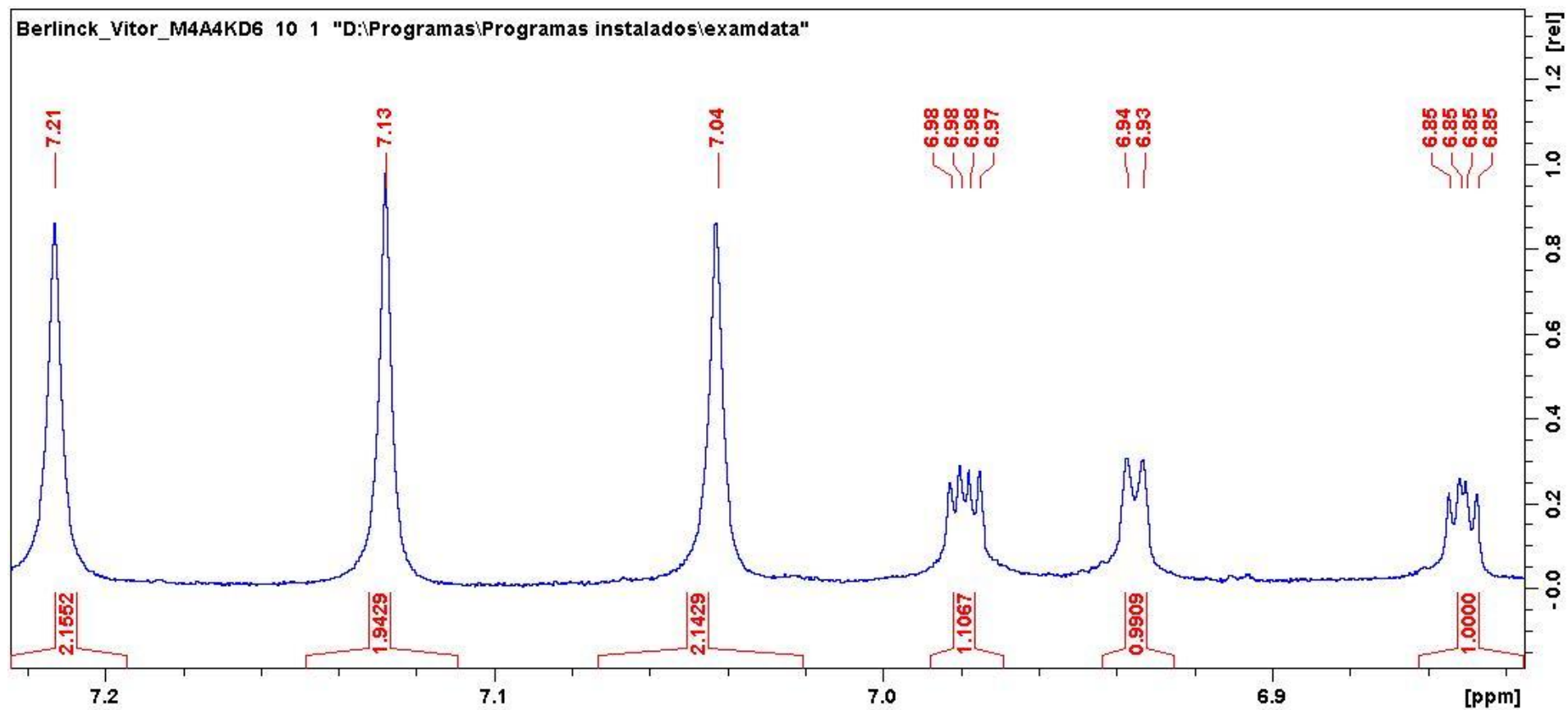
Figura A 195. Expansão do espectro de RMN de ^1H da disparamida B (**21**) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

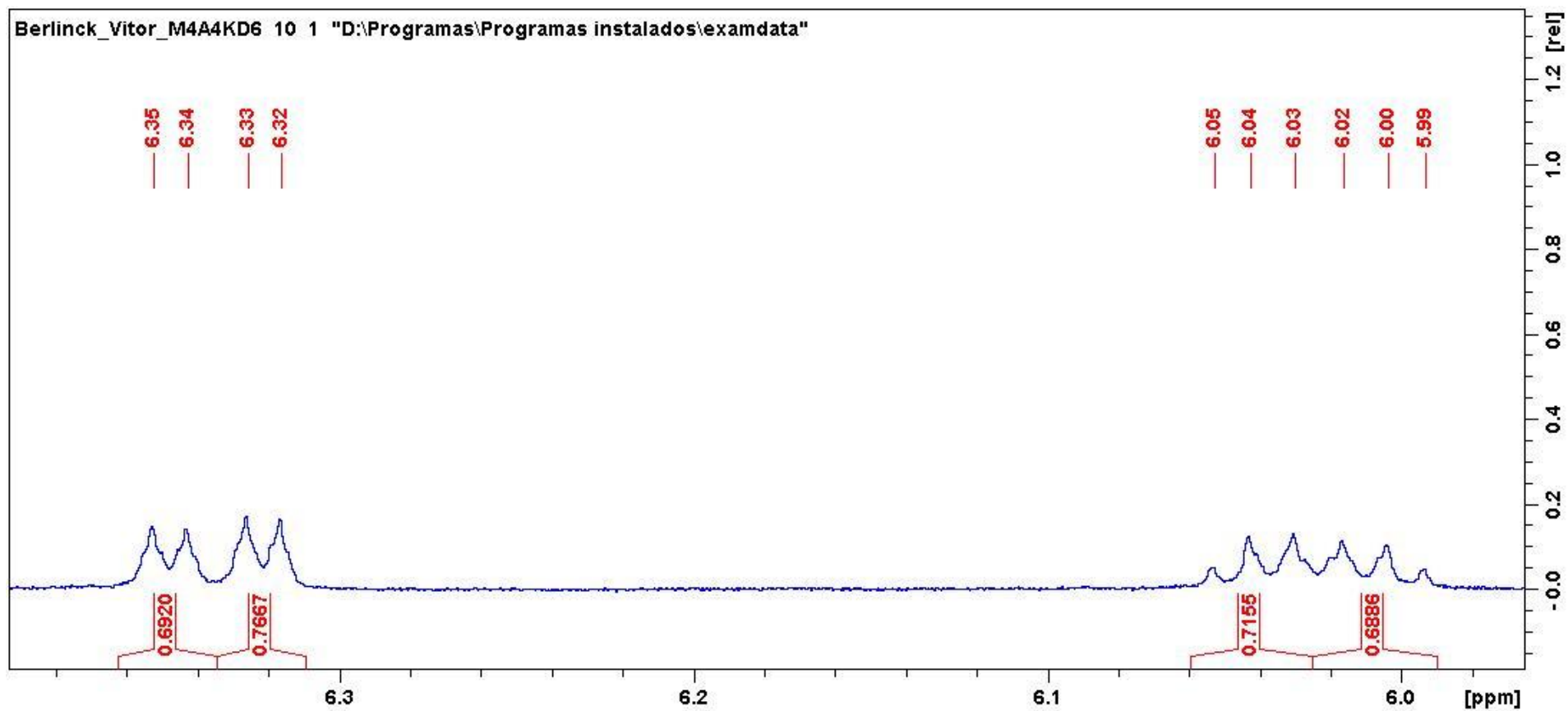
Figura A 196. Expansão do espectro de RMN de ^1H da disparamida B (**21**) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

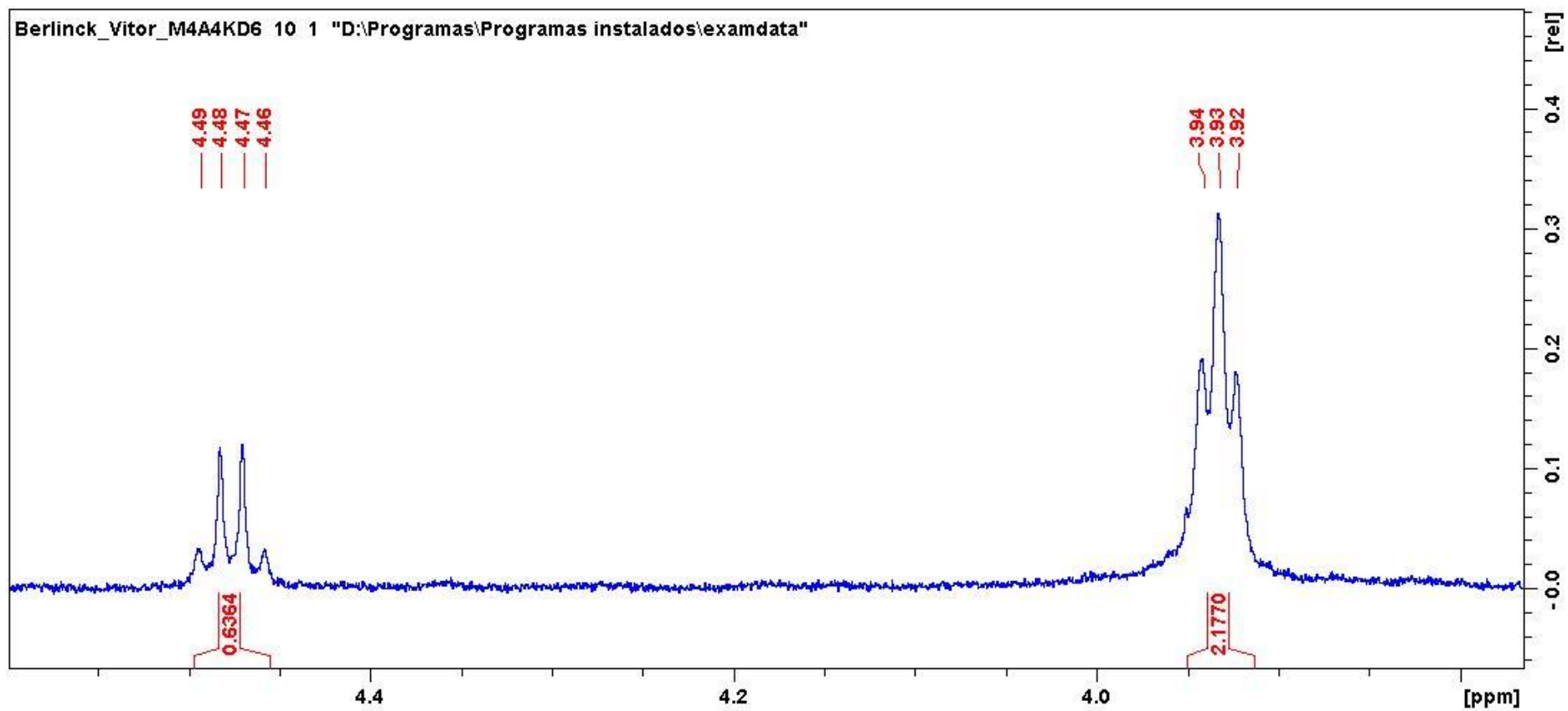
Figura A 197. Expansão do espectro de RMN de ^1H da disparamida B (**21**) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

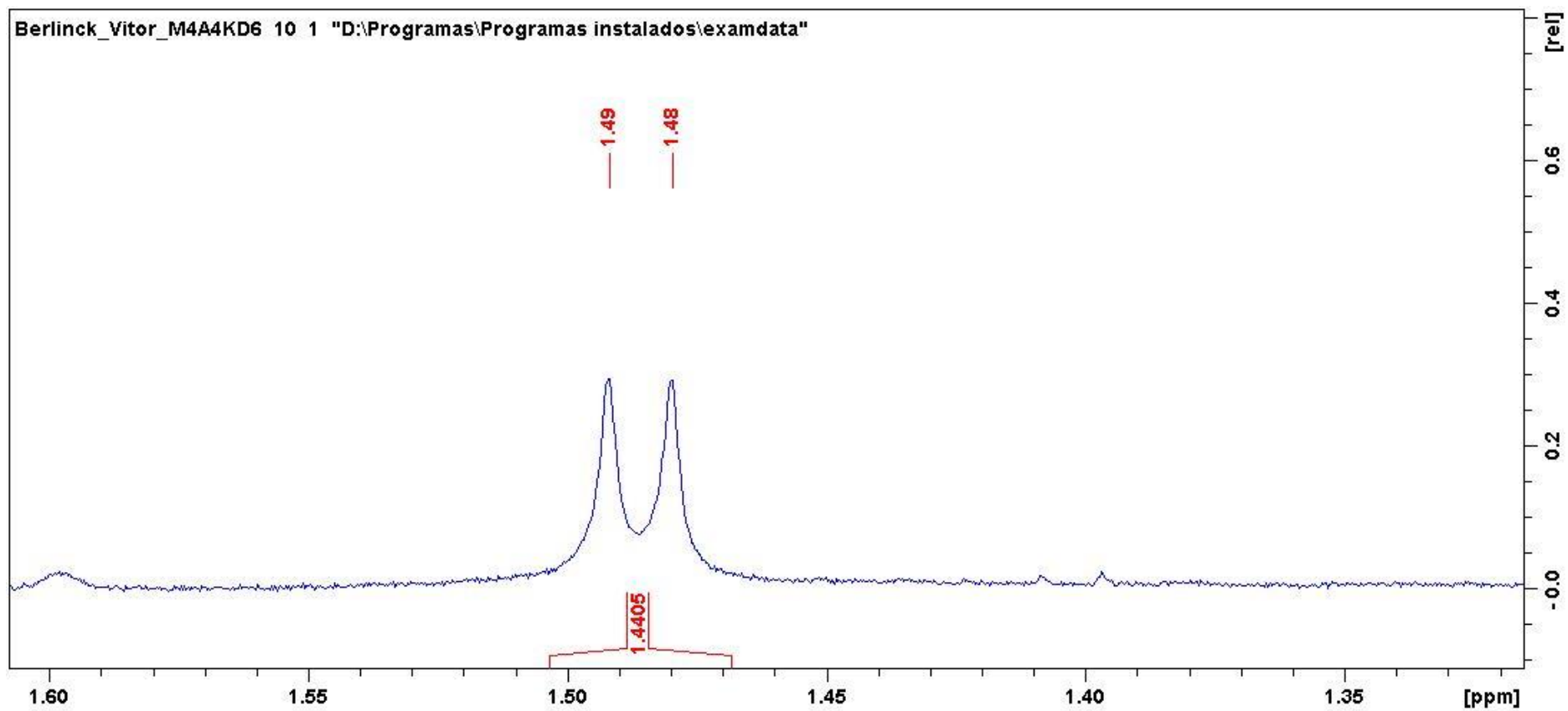
Figura A 198. Expansão do espectro de RMN de ^1H da disparamida B (**21**) (600 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

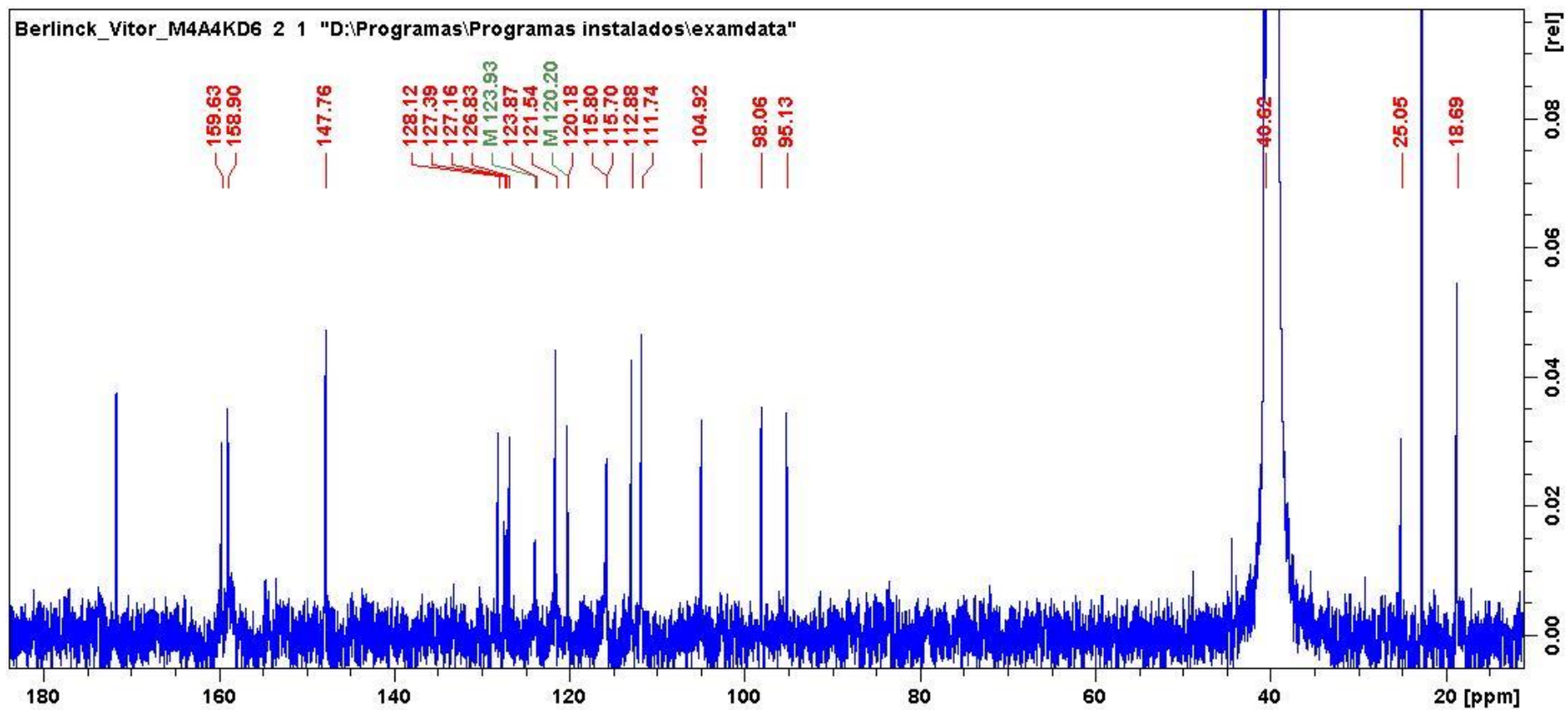
Figura A 199. Espectro de RMN de ^{13}C da disparamida B (**21**) (150 MHz, em $\text{DMSO-}d_6$).

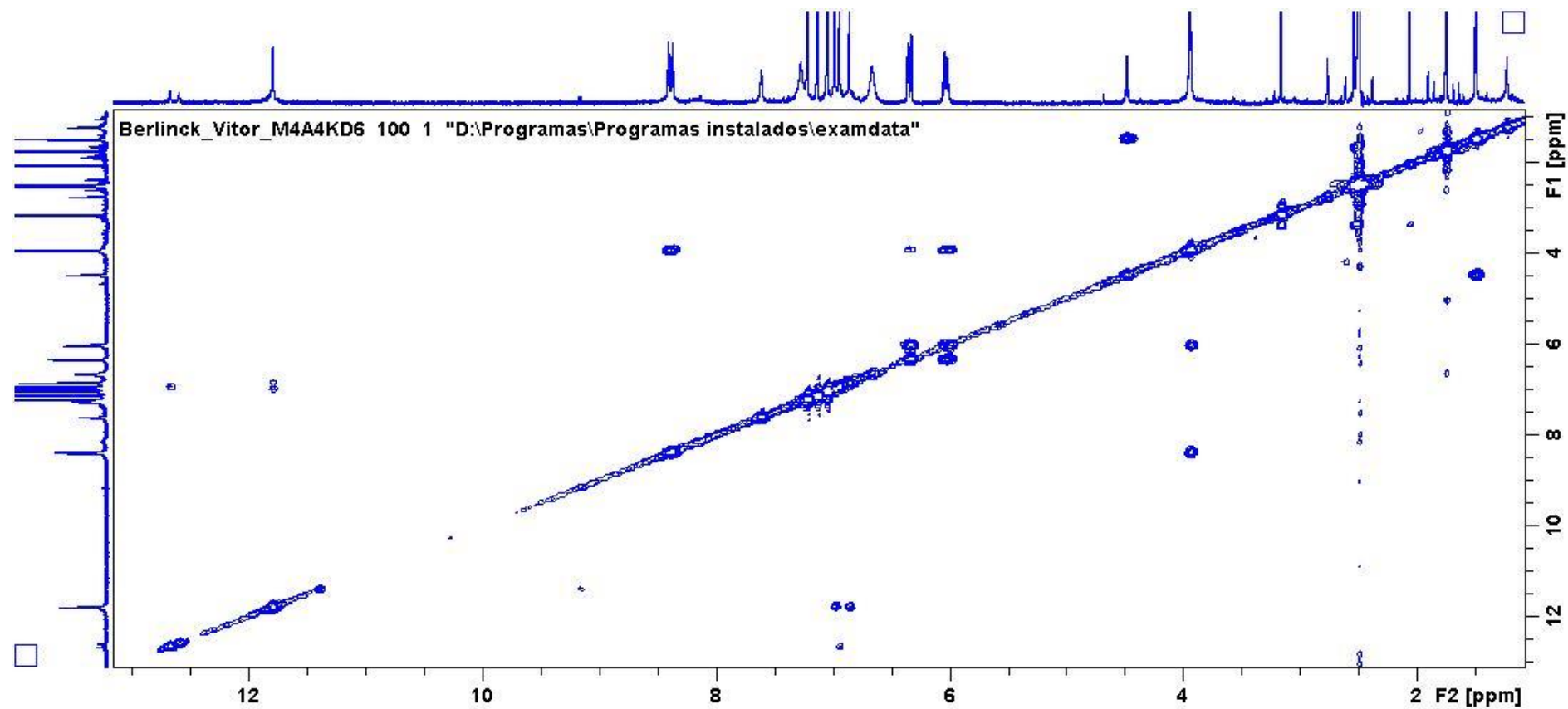
Figura A 200. Espectro COSY da disparamida B (**21**) (600 MHz, em DMSO- d_6).

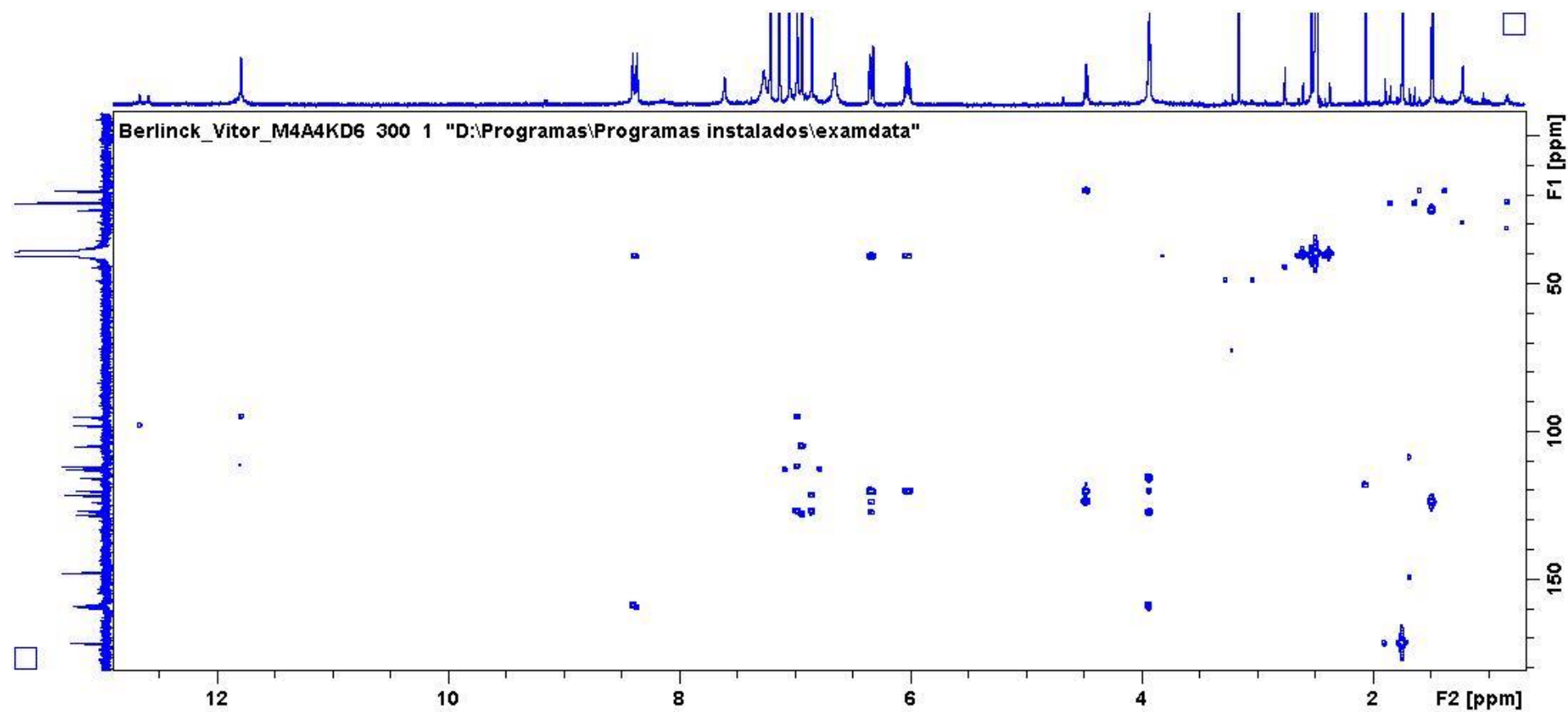
Figura A 201. Espectro HMBC da disparamida B (21) (600 MHz, em DMSO- d_6).

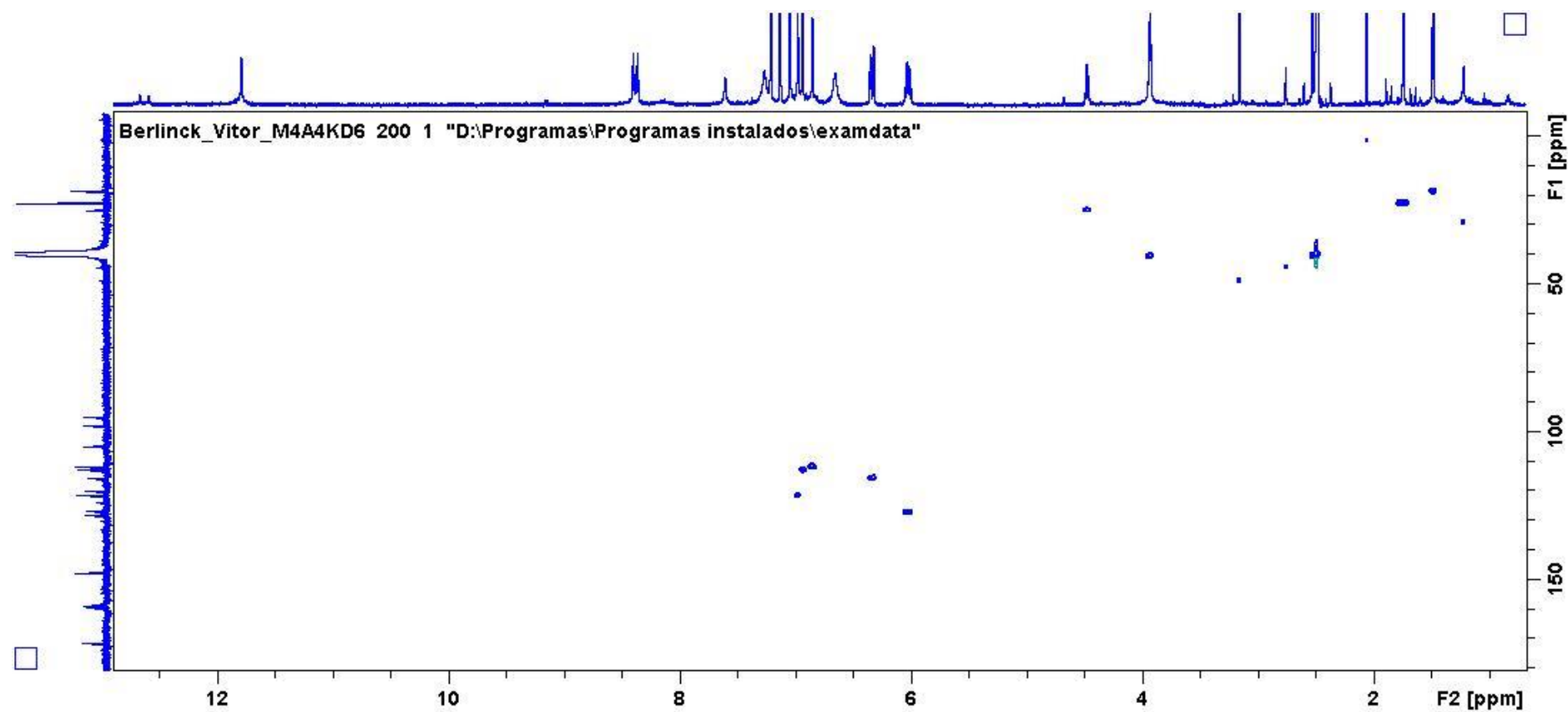
Figura A 202. Espectro HSQC da disparamida B (**21**) (600 MHz, em DMSO- d_6).

Figura A 203. Espectro MS/MS da disparamida B (21).

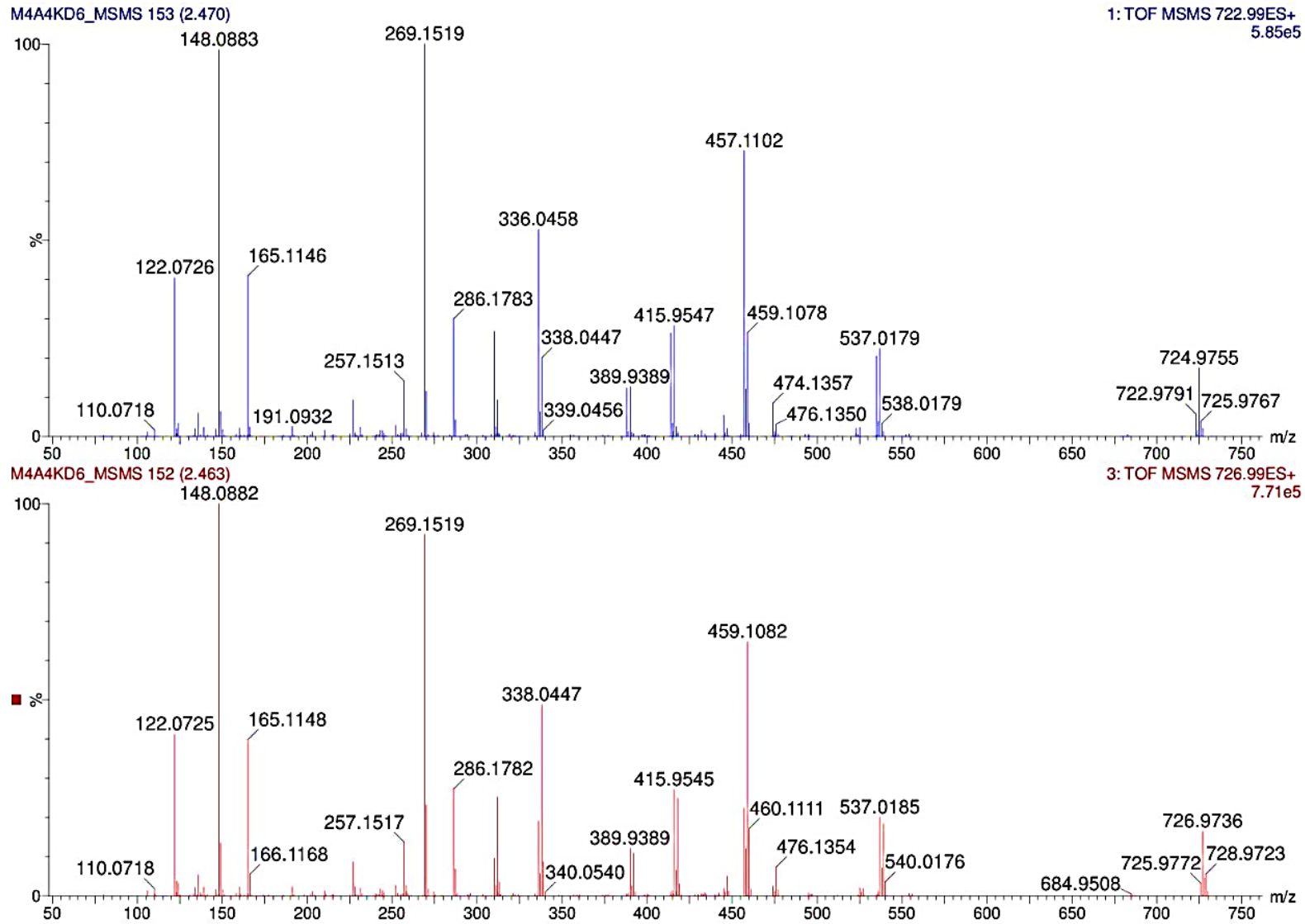


Tabela A 12. Íons observados nos espectros MS/MS do composto disparamida B (**21**) a partir dos íons precursores de m/z 722,97 e m/z 726,97.

Íon fragmento	Fórmula	m/z 722,97			m/z 726,97		
		Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)	Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)
[M + H] ⁺	C ₂₄ H ₂₅ Br ₄ N ₁₀ O ₂ ⁺	722,9791	0,83	5,55	726,9736	-1,10	16,45
		724,9755	-1,37	17,41	728,9723	-0,14	5,49
A ₁	C ₁₉ H ₂₂ BrN ₈ O ⁺	457,1102	1,53	72,89	457,1094	-0,22	22,41
		459,1078	0,87	26,31	459,1082	1,74	64,72
A ₂	C ₁₉ H ₂₁ Br ₂ N ₈ O ⁺	535,0198	-0,37	20,41	537,0185	0,93	20,06
		537,0179	-0,19	22,41	539,0168	1,67	18,32
B ₁	C ₁₈ H ₂₂ BrN ₈ O ⁺	445,1075	-4,49	5,27	445,1096	0,22	1,85
		447,1067	-1,56	1,95	447,1081	1,56	4,88
B ₂	C ₁₈ H ₂₁ Br ₂ N ₈ O ⁺	523,0178	-4,21	2,02	525,0170	-1,90	2,00
		525,0156	-4,57	2,18	527,0139	-3,79	1,80
C ₁	C ₁₃ H ₁₅ BrN ₅ O ⁺	336,0458	0,89	52,68	336,0457	0,59	19,08
		338,0447	3,55	19,91	338,0447	3,55	48,82
C ₂	C ₁₃ H ₁₄ Br ₂ N ₅ O ⁺	413,9566	1,45	26,31	415,9545	1,20	27,18
		415,9547	1,68	28,24	417,9532	3,11	24,96
D	C ₁₄ H ₁₇ N ₆ ⁺	269,1519	3,71	100,00	269,1519	3,71	92,19
E ₁ /E ₂	C ₁₃ H ₁₇ N ₆ ⁺	257,1513	1,55	13,89	257,1517	3,11	13,53
F	C ₈ H ₁₃ N ₄ ⁺	165,1146	6,66	40,84	165,1148	7,87	39,76

G	$\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_3^+$	148,0883	9,45	98,56	148,0882	8,78	100,00
H	$\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_3$	122,0726	10,65	40,41	122,0725	9,83	41,22

Figura A 204. Espectro IV da disparamida B (21) em filme em pastilha de Si.

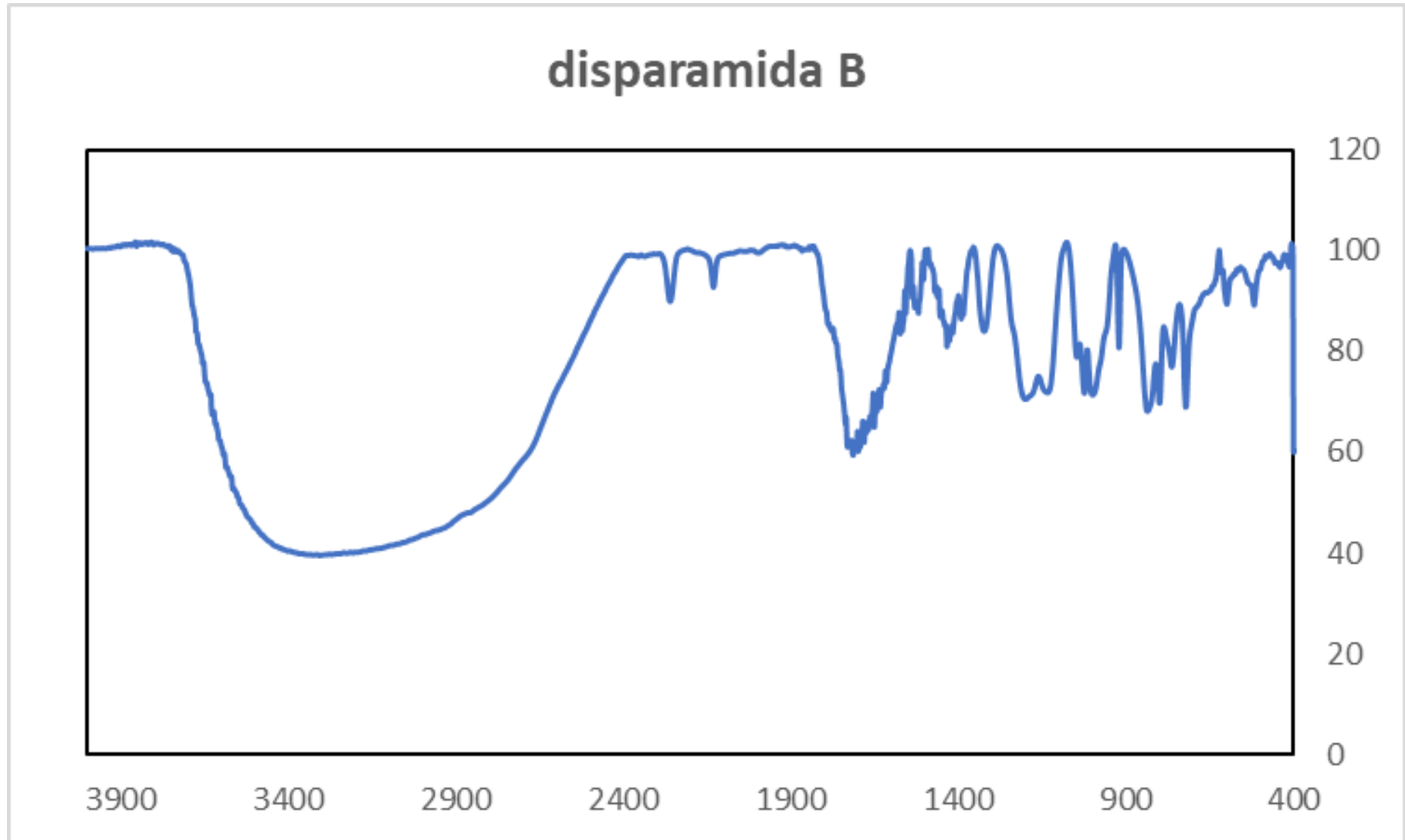


Figura A 205. Espectro MS da diparamida C (22).

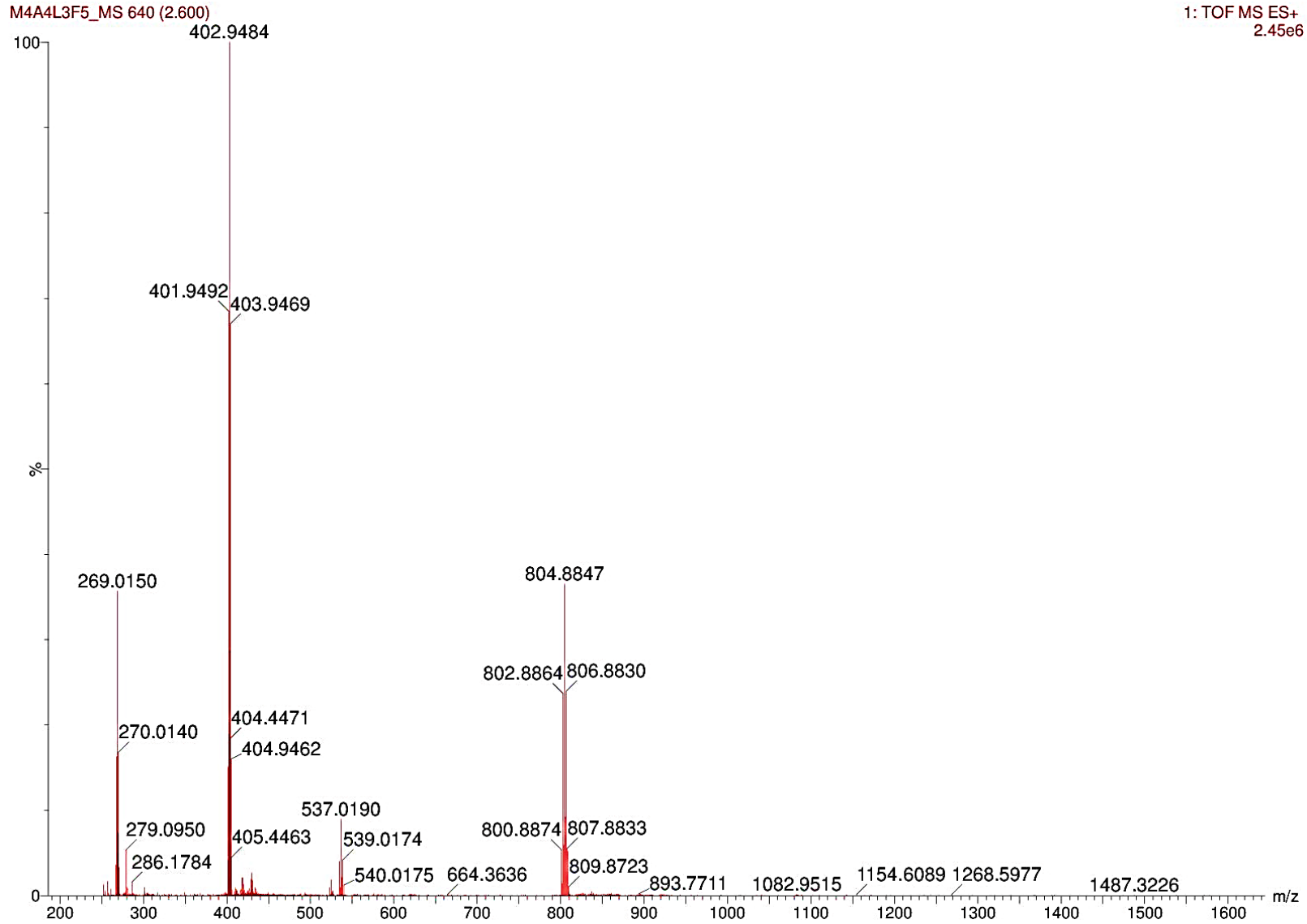


Figura A 206. Expansão do espectro MS da disparamida C (22).

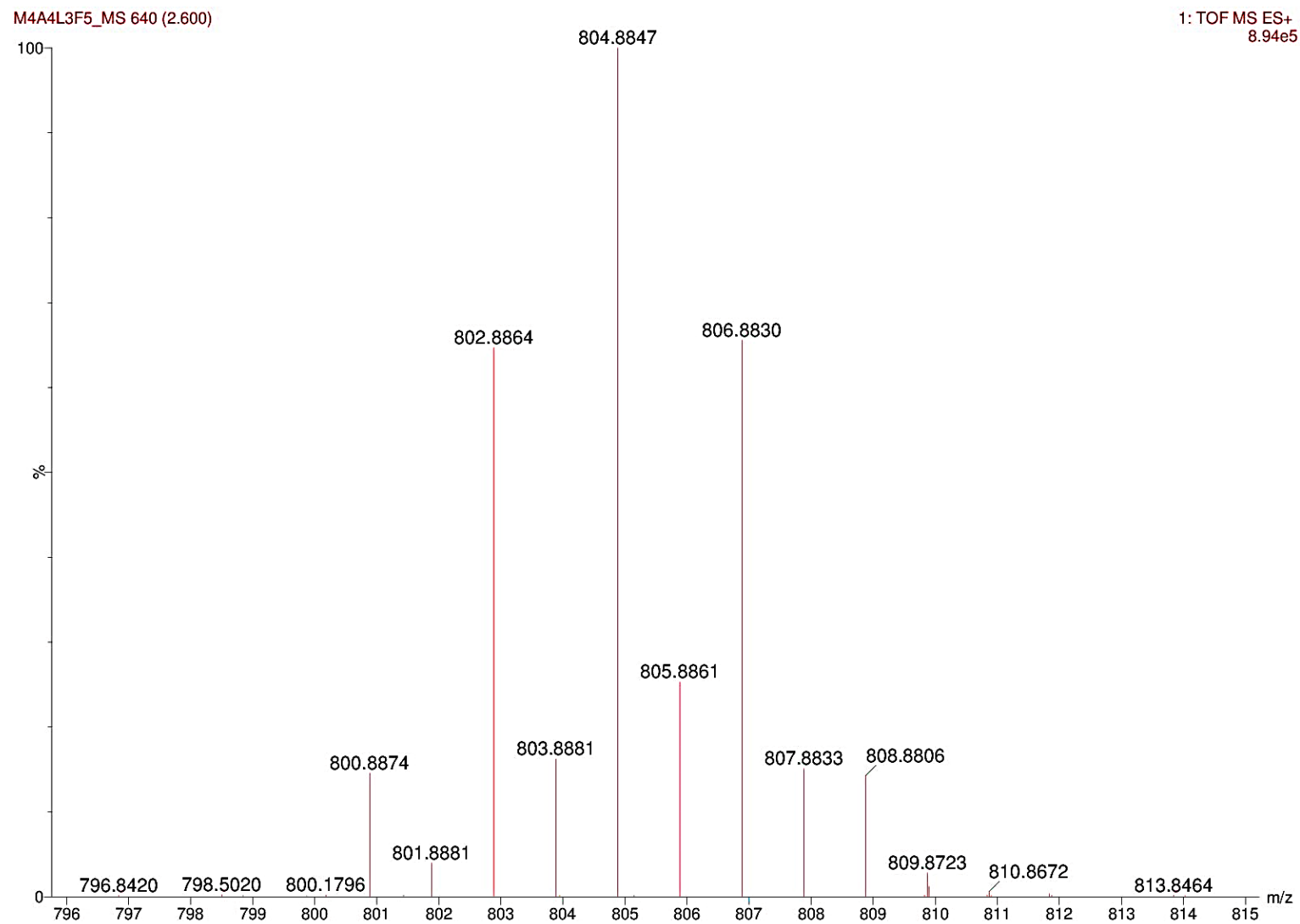


Figura A 207. Espectros MS/MS da disparamida C (22).

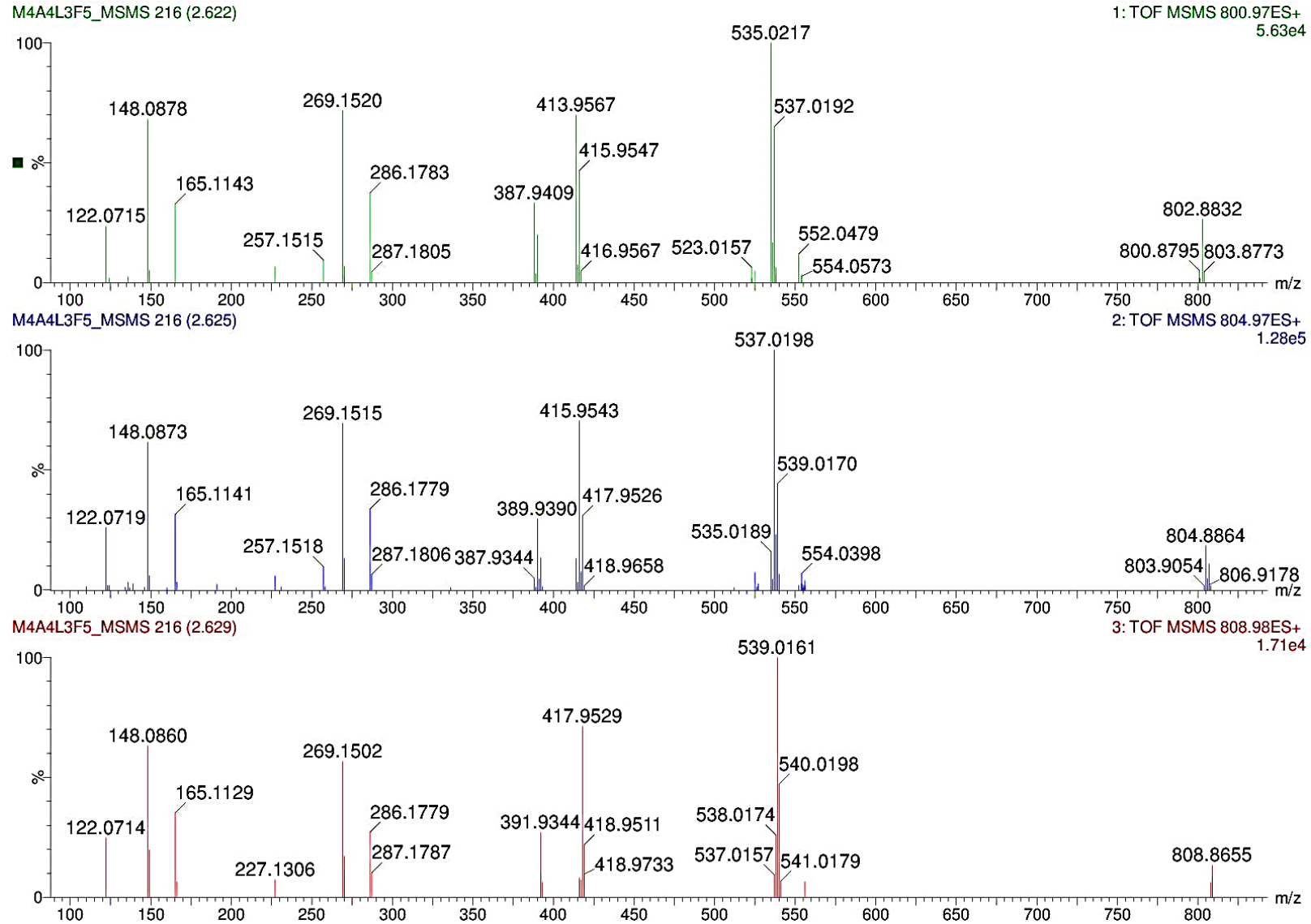


Tabela A 13. Íons observados nos espectros MS/MS do composto disparamida C (**22**) a partir dos íons precursores de m/z 800,88, m/z 804,88 e m/z 808,87

Íon fragmento	Fórmula	m/z 800,88			m/z 804,88			m/z 808,87		
		Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)	Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)	Massa acurada	Erro de massa (ppm)	Intensidade relativa (%)
[M + H] ⁺	C ₂₄ H ₂₅ Br ₄ N ₁₀ O ₂ ⁺	800,8795	-11,86	4,83	804,8864	1,74	18,37	808,8722	-10,76	13,24
		802,8832	-4,74	26,50	806,8794	-4,34	10,79			
A ₁ /A ₂	C ₁₉ H ₂₁ Br ₂ N ₈ O ⁺	535,0217	3,18	100,00	535,0189	-2,06	15,74	539,0161	0,37	100,00
		537,0192	2,23	64,89	537,0198	3,35	100,00			
					539,0170	2,04	44,19			
B ₁ /B ₂	C ₁₈ H ₂₁ Br ₂ N ₈ O ⁺	523,0157	-8,22	6,24	523,0051	-2,85	0,61	527,0161	0,38	4,62
		525,0190	1,90	4,89	525,0196	3,04	7,24			
					527,0178	3,60	2,58			
C ₁ /C ₂	C ₁₃ H ₁₄ Br ₂ N ₅ O ⁺	413,9567	1,69	69,93	413,9565	1,21	12,99	417,9529	2,39	71,23
		415,9547	1,68	46,55	415,9543	0,72	70,48			
					417,9526	1,67	30,70			
D	C ₁₄ H ₁₇ N ₆ ⁺	269,1520	4,09	71,74	269,1515	2,23	69,4	269,1502	-2,60	56,61
E ₁ /E ₂	C ₁₃ H ₁₇ N ₆ ⁺	257,1515	2,33	9,26	257,1518	3,49	9,51	257,1468	-14,95	5,31
F	C ₈ H ₁₃ N ₄ ⁺	165,1143	4,84	32,72	165,1141	3,63	31,35	165,1129	-3,63	34,94
G	C ₈ H ₁₀ N ₃ ⁺	148,0878	6,08	68,08	148,0873	2,70	61,55	148,0860	-6,08	63,09
H	C ₆ H ₈ N ₃ ⁺	122,0715	1,64	23,47	122,0719	4,91	25,98	122,0714	0,82	24,9

