



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Instituto de Química de São Carlos

ANDERSON LOMBARDO NORONHA

**Estudos estruturais e biológicos de alcaloides guanidínicos da
esponja *Monanchora* sp. do litoral do Espírito Santo**

São Carlos
2023

ANDERSON LOMBARDO NORONHA

**Estudos estruturais e biológicos de alcaloides guanidínicos da
esponja *Monanchora* sp. do litoral do Espírito Santo**

Exemplar revisado

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

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

Area de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck

“O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq”

São Carlos

2023

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: *Anderson Lombardo Noronha*
Data: 11/12/2023

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

Noronha, Anderson Lombardo
Estudos estruturais e biológicos de alcaloides guanidínicos da esponja
Monanchora sp. do litoral do Espírito Santo / Anderson Lombardo Noronha. —
São Carlos, 2023.
233 f.

Dissertação (Mestrado em Química Orgânica e Biológica) — Instituto de
Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2023.
Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck

1. Alcalóides guanidínicos. 2. Batzelladinas. 3. Monanchora. 4. Malária. 5. in vivo. I. Título.

Wilnelde do C. M. Matorano - CRB: 3978/8



AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho a meus professores e orientadores, presentes e anteriores, por me ensinarem a pensar de forma analítica e científica, e por me colocarem diante de desafios aos quais sou obrigado a ultrapassar meus limites internos e crescer.

A minha mãe por proporcionar condições financeiras e estruturais mínimas para meus estudos e por ser referência de força, resiliência, superação, esforço e também o pilar de minha família.

A meus guias e guardiões por estarem ao meu lado mesmo quando estou só.

A Nathalia Bonani por aceitar minhas cicatrizes e pela história que compartilhamos.

A Livia e ao Lucas pelo cuidado e afeto incondicional.

Ao Bruno Derisso, Caroline Aguiar, Caroline Oliveira, Eduardo Cabrera, João Monção, Marcelo Amorin, Michael Florentino, Paulo e Patrícia Olegário, Pedro Santucci, Patrícia Mendes e Rafael Ferreira, por viverem neste tempo e neste mundo comigo.

A minha psicanalista por ajudar a investigar “a mim e aos comigos em mim”.

A meus filhotes: Jujuba, Bolacha e Lolita, todo o meu amor.

Aos grupos de pesquisa e aos Pr. Dr. Rafael Guido (IFSC-USP), Pr. Dr. André Tempone (Instituto Butantan) e Pr. Dr. Danilo Miguel (Unicamp) pela colaboração e contribuição neste trabalho, fazendo-o assim possível e realizável.

A USP, lugar o qual sonhava estudar e hoje fecho um ciclo.

Ao CNPQ e a FAPESP por financiarem este projeto

Ao grupo Química Orgânica de Sistemas Biológicos e a meu orientador Pr. Dr. Roberto Berlinck pela parceria e por contribuir a todo momento de forma ativa na construção dos conhecimentos e técnicas necessárias para a conclusão deste trabalho.

EPÍGRAFE

MEFISTÓFELES

*Devo trazer-te, antes de tudo,
A roda alegre e livre como esta;
Da vida fácil, faze aqui o estudo;
Para este povo, todo dia é festa.
A graça é pouca, mas, havendo quem a aplauda,
Cada um revolve alegre em sua estreita roda,
Como gato, a brincar com a cauda.
Enquanto uma enxaqueca não os incomoda
E lhes dá crédito o patrão,
Ledos e sem cuidado estão.*

Fausto Uma tragédia, Johann Wolfgang von Goethe – Editora 34, 2004

RESUMO

Estudos sobre alcaloides guanidínicos de esponjas marinhas do Brasil ainda são limitados, com a maioria dos compostos isolados já conhecidos. Apenas recentemente foram isolados os primeiros alcaloides guanidínicos inéditos de uma esponja marinha do gênero *Monanchora*, coletada no litoral do Rio de Janeiro. Estes alcaloides apresentaram potente atividade antiparasitária contra *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi*. Todavia, a quantidade limitada das substâncias isoladas não permitiu avançar na investigação de atividade antiparasitária *in vivo*. Em coleta recente realizada no litoral do Espírito Santo, foi possível obter quantidade significativa da esponja *Monanchora* aff. *arbuscula*. O presente projeto tem por objetivos avançar no estudo químico e biológico destes alcaloides, tanto no que se refere ao isolamento de alcaloides inéditos quanto no aprofundamento da investigação das atividades biológicas dos alcaloides inéditos e conhecidos *in vitro* e *in vivo*. Os alcaloides guanidínicos batzelladina L e batzelladina F apresentaram em estudo anterior, potente atividade *in vitro* contra a cepa resistente a cloroquina causadora da malária, mostrando ser opções interessantes de estudos *in vivo*. No presente projeto de mestrado ambos os produtos naturais majoritários da esponja, batzelladina L e F, foram isolados em quantidade suficientes e avaliados *in vitro* contra a cepa causadora de malária sensível à cloroquina e contra as bactérias multirresistentes a fármacos ESKAPE e apresentaram atividades entre micro e nano molar, a citotoxicidade contra malária também foi avaliada *in vitro*. Testes *in vivo* em camundongos infectados foram desenvolvidos com a batzelladina L demonstrando reduzir a parasitemia e prolongar a sobrevivência dos animais frente ao grupo controle.

ABSTRACT

Studies related to the guanidine alkaloids obtained from marine sponges collected in Brazil are still narrow with the major compounds isolated known. Only recently were isolated new guanidine alkaloids from a marine sponge of genus *Monanchora*, collected from the Brazilian coast of Rio de Janeiro. Those alkaloids showed potent antiparasitic activity against *Leishmania infantum* and *Trypanosoma cruzi*. However, the limited amount of those isolated compounds was insufficient to evaluate their *in vivo* bioactivity. In a recent collect at Brazilian coast of Espírito Santo, significant amount of the *Monanchora* aff. *arbuscula* was obtained. This project has as main objectives to push forward the chemical and biological studies of the guanidine alkaloids, around the isolation of new compounds and to investigate its biological activity, both of the already known alkaloids and eventually of the new ones. The guanidine alkaloids batzelladine L and F had shown in previous studies potent *in vitro* bioactivity against the chloroquine-resistant malarial pathogen, being an interesting option to be evaluated *in vivo*. In the present project both majority alkaloids natural products, batzelladine L and F, were isolated from the sponge in sufficient amounts and have their activity *in vitro* evaluated against the chloroquine-sensitive malarial pathogen and multiresistant bacteria ESKAPE resulting in micro and nano molar activities, the cytotoxicity against malaria where also evaluated *in vitro*. *In vivo* experiments on infected mice were developed with batzelladine L, reducing the infection and extending the survival rate of the animals in comparison with the control group.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alcaloides guanidínicos de esponjas marinhas classificados por quimiotipo: bicíclicos, tricíclicos, policíclicos e batzelladínicos.	19
Figura 2. Alcaloides isolados a partir de <i>Monanchora arbuscula</i> (8)-hidroxiptilocaulina e batzellamida A.	20
Figura 3. Estruturas químicas de alcaloides da classe das batzelladinas, isolados de esponjas do gênero <i>Monanchora</i>	23
Figura 4. Fluxograma de extração para obtenção dos extratos aquoso e orgânico da esponja <i>Monanchora arbuscula</i>	32
Figura 5. Fluxograma do 1º fracionamento da fração AcMA17 por cromatografia de exclusão por tamanho (CET).....	33
Figura 6. Fluxograma do 2º e 3º fracionamento da fração AcMA17 por cromatografia de exclusão por tamanho (CET).....	34
Figura 7. Cromatograma da amostra MA17s2_71 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm. Condições cromatográficas: vide item 3.1.1.	37
Figura 8. Cromatograma da amostra MA17s2_71 por HPLC-ELSD. Condições cromatográficas: vide item 3.1.1.....	37
Figura 9. Cromatograma de íons totais da amostra MA17s2_71 por HPLC-MS. Condições cromatográficas: vide item 3.1.1.	38
Figura 10. Espectro de ESI-MS em modo positivo da amostra MA17s2_71, TR = 17,2'.	38
Figura 11. Cromatograma da amostra AcMA17_43 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm. Condições cromatográficas: vide item 3.1.1.	38
Figura 12. Cromatograma da amostra AcMA17_43 por HPLC-ELSD. Condições cromatográficas: vide item 3.1.1.....	38
Figura 13. Cromatograma de íons totais da amostra AcMA17_43 por HPLC-MS. Condições cromatográficas: vide item 3.1.1.	39
Figura 14. Espectro de ESI-MS em modo positivo da amostra AcMA17_43, TR = 15,5'.	39
Figura 15. Cromatograma da amostra DiOH2_Tubo_3 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm. Para condições cromatográficas, ver parte experimental, item 3.1.1.....	39
Figura 16. Cromatograma de íons totais da amostra DiOH2_Tubo_3 por HPLC-MS. Para condições cromatográficas, ver parte experimental, item 3.1.1.....	40
Figura 17. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra DiOH2_Tubo_3, TR = 17,4'.	40
Figura 18. Cromatograma da amostra DiOH2_Tubo_5 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm. Para condições cromatográficas, ver parte experimental, item 3.1.1.....	40
Figura 19. Cromatograma de íons totais da amostra DiOH2_Tubo_5 por HPLC-MS. Para condições cromatográficas, ver parte experimental, item 3.1.1.....	40
Figura 20. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra DiOH2_Tubo_5, TR = 16,9'.	41
Figura 21. Cromatograma da amostra DiOH2_Tubo_10 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm. Para condições cromatográficas, ver parte experimental, item 3.1.1.....	41
Figura 22. Cromatograma de íons totais da amostra DiOH2_Tubo_10 por HPLC-MS. Para condições cromatográficas, ver parte experimental, item 3.1.1.....	41
Figura 23. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra DiOH2_Tubo_10, TR = 16,1'.	41
Figura 24. Cromatograma da amostra DiOH2_Tubo_15 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm. Para condições cromatográficas, ver parte experimental, item 3.1.1.....	42
Figura 25. Cromatograma de íons totais da amostra DiOH2_Tubo_15 por HPLC-MS. Para condições cromatográficas, ver parte experimental, item 3.1.1.....	42
Figura 26. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra DiOH2_Tubo_15, TR = 20,8'.	42
Figura 27. Fluxograma do fracionamento da fração Ma17s2_71 e Ma17s2_71A por HPLC-UV.....	44
Figura 28. Cromatograma de separação da fração Ma17s2_71A (Recuperação). Condições: Gradiente 40:70 (MeOH/MeCN 1:1):H ₂ O acidificado com 0,1% ácido fórmico, coluna Waters X-terra C18 (7,8 × 150 mm, 5 µm); vazão de 2,5 mL/min; detecção: UV 208 nm; tempo de corrida cromatográfica: 20 minutos. Ampliação na Figura 33.	45
Figura 29. Cromatograma de separação da fração Ma17s2_71A (Recuperação). Condições: Gradiente 40:70 (MeOH/MeCN 1:1):H ₂ O acidificado com 0,1% ácido fórmico, coluna Waters X-terra C18 (7,8 × 150 mm, 5 µm); vazão de 2,5 mL/min; detecção: ELSD; tempo de corrida cromatográfica: 20 minutos.....	46

Figura 30. Cromatograma de separação da fração Ma17s2_71A (Recuperação). Condições: Gradiente 40:60 (MeOH/MeCN 1:1):H ₂ O acidificado com 0,1% ácido fórmico, coluna Waters X-terra C18 (7,8 × 150 mm, 5 µm); vazão de 1,0 mL/min; detecção: UV 208 nm; tempo de corrida cromatográfica: 40 minutos.	46
Figura 31. Cromatograma de separação da fração Ma17s2_71 (Inicial). Condições: Gradiente 40:60 (MeOH/MeCN 1:1):H ₂ O acidificado com 0,1% ácido fórmico, coluna Waters X-terra C18 (7,8 × 150 mm, 5 µm); vazão de 1,0 mL/min; detecção: UV 208 nm; tempo de corrida cromatográfica: 40 minutos.	47
Figura 32. Cromatograma de separação da fração Ma17s2_71 (Inicial). Condições: Gradiente 40:60 (MeOH/MeCN 1:1):H ₂ O acidificado com 0,1% ácido fórmico, coluna Waters X-terra C18 (7,8 × 150 mm, 5 µm); vazão de 1,0 mL/min; detecção: UV 300 nm; tempo de corrida cromatográfica: 40 minutos.	47
Figura 33. Cromatograma ampliado de Ma17s2_71A, Gradiente 40:70 solvente orgânico (MeOH:MeCN 1:1), fase estacionária C18, coluna X-terra (Waters – C18, 7,8 × 150 mm, 5 µm), com vazão de 2,5 mL/min, UV 208 nm, duração 20 minutos. Zoom na região de eluição dos compostos Ma71Dd e Ma71E. Ampliação da Figura 28.	48
Figura 34. Cromatograma de separação da fração Ma17s2_71A. Condições: Gradiente 25:70 (MeOH/MeCN 1:1) acidificada com 0,1% de ácido fórmico, fase estacionária C8 coluna InertSustain (GL Sciences Inc – C8, 4,6 × 250 mm, 5 µm); com vazão de 1,0 mL/min; detecção: UV 300 nm; tempo de corrida cromatográfica: 40 minutos.	49
Figura 35. Cromatograma de separação da fração Ma17s2_71A. Condições: Gradiente 15:50 de MeCN acidificada com 0,1% de ácido fórmico, fase estacionária C8 coluna InertSustain (GL Sciences Inc – C8, 4,6 × 250 mm, 5 µm); com vazão de 1,0 mL/min; detecção: UV 265 nm; tempo de corrida cromatográfica: 40 minutos.	50
Figura 36. Cromatograma de separação da fração Ma17s2_71A. Condições: Gradiente 15:50 de MeCN acidificada com 0,1% de ácido tricloroacético, fase estacionária C8 coluna InertSustain (GL Sciences Inc – C8, 4,6 × 250 mm, 5 µm); com vazão de 1,0 mL/min; detecção: UV 300 nm; tempo de corrida cromatográfica: 40 minutos.	50
Figura 37. Condição cromatográfica melhorada para a separação dos alcaloides presentes na fração Ma17s2_71A. Condições: coluna Ph Inertsustain (GL – Sciences Inc 4,6 × 250 mm, 5 µm); composição do eluente: MeCN/H ₂ O 25:75 até 3 min.; MeCN/H ₂ O 30:70 de 4 a 7 min; MeCN/H ₂ O 35:65 de 8 a 11 min; MeCN/H ₂ O 40:60 de 12 a 20 min; MeCN/H ₂ O 60:40 de 21 a 30 min; retorno à condição cromatográfica inicial e condicionamento em MeCN/H ₂ O 25:75 entre 31 e 40 min.	52
Figura 38. Cromatograma da fração Ma17s2_71A. Condições: coluna Ph InertSustain (GL Sciences Inc – Ph, 4,6 × 250 mm, 5 µm); eluente: composição do eluente: MeCN/H ₂ O 25:75 até 3 min.; MeCN/H ₂ O 30:70 de 4 a 7 min; MeCN/H ₂ O 35:65 de 8 a 11 min; MeCN/H ₂ O 40:60 de 12 a 20 min; MeCN/H ₂ O 60:40 de 21 a 30 min; retorno à condição cromatográfica inicial e condicionamento em MeCN/H ₂ O 25:75 entre 31 e 40 min. Vazão: 1 mL/min; Tempo de corrida cromatográfica: 40 minutos.	53
Figura 39. Fluxograma do fracionamento da fração AcMa17_43 por HPLC-UV. 43T	59
Figura 40. Cromatograma HPLS-ESI-MS em modo TIC MS+ do composto Ma71E.	60
Figura 41. Espectro de massas ESI-quadrupolo MS+ do composto Ma71E, TR = 15,2'.	61
Figura 42. Cromatograma HPLS-ESI-MS em modo TIC MS+ do composto Ma71E.	62
Figura 43. Cromatograma HPLS-ESI-MS em modo TIC MS+ do composto AcMa17_43Q.	62
Figura 44. Cromatograma HPLS-ESI-MS em modo TIC MS+ do composto AcMa17_43Q, eluição em gradiente exploratório 20-100% orgânico.	62
Figura 45. Espectro de massas ESI-quadrupolo MS+ do composto AcMa17_43Q, TR = 15,9'.	62
Figura 46. LC-UV preparativo amostra AcMa17_43Q. Gradiente	63
Figura 47. Cromatograma da amostra 43M por HPLC-DAD monitorado em 260 nm. Condições cromatográficas: gradiente exploratório.	65
Figura 48. Cromatograma da amostra 43M, identificação da batzelladina F por HPLC-DAD monitorado em 305 nm. Condições cromatográficas: gradiente exploratório.	65
Figura 49. Cromatograma HPLS-ESI-MS em modo TIC MS+ da amostra 43M. Condições cromatográficas: gradiente exploratório.	65
Figura 50. Espectro de massas ESI-quadrupolo MS+ da amostra 43M. Batzelladina F, [M+2H] ⁺ 313,4, TR = 9,8'.	65
Figura 51. Cromatograma da amostra 43M, identificação da batzelladina F por HPLC-DAD monitorado em 208 nm. Condições cromatográficas: gradiente A.	67
Figura 52. Cromatograma da amostra 43M, identificação da batzelladina F por HPLC-DAD monitorado em 260 nm. Condições cromatográficas: gradiente A.	67
Figura 53. Cromatograma da amostra 43M_A por HPLC-DAD monitorado em 305 nm. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna C18, X-Terra, Waters – C18, (4,6 mm × 250 mm, 5 µm).	68
Figura 54. Cromatograma da amostra 43M_A por HPLC-DAD monitorado em 265 nm. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna C18, X-Terra, Waters – C18, (4,6 mm × 250 mm, 5 µm).	69
Figura 55. Cromatograma HPLS-ESI-MS em modo TIC MS+ da amostra 43M_A. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna C18, X-Terra, Waters – C18, (4,6 mm × 250 mm, 5 µm).	69

Figura 56. Espectro de massas ESI-quadrupolo MS+ da amostra 43M_A, TR = 22,2'	69
Figura 57. Cromatograma HPLS-ESI-MS extraído m/z+ 313, MS+ da amostra 43M_A. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna C18, X-Terra, Waters – C18, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).....	70
Figura 58. Espectro de massas ESI-quadrupolo MS+ da amostra 43M_A, TR = 23,1'. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna C18, X-Terra, Waters – C18.....	70
Figura 59. Cromatograma da amostra 43M_A por HPLC-DAD monitorado em 305 nm. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna InestSustain - Ph (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).	70
Figura 60. Cromatograma da amostra 43M_A por HPLC-DAD monitorado em 265 nm. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna InestSustain - Ph (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).	71
Figura 61. Cromatograma HPLS-ESI-MS em modo TIC MS+ da amostra 43M_A. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna InestSustain - Ph (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).	71
Figura 62. Espectro de massas ESI-quadrupolo MS+ da amostra 43M_A, TR = 22,3'. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna InestSustain – Ph.	71
Figura 63. Cromatograma HPLS-ESI-MS extraído m/z+ 313, MS+ da amostra 43M_A. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna InestSustain - Ph (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).	72
Figura 64. Espectro de massas ESI-quadrupolo MS+ da amostra 43M_A, TR = 20,2'. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna InestSustain – Ph.	72
Figura 65. Cromatograma da amostra 43M_A por HPLC-DAD monitorado em 305 nm. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna InestSustain – C8 (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).	72
Figura 66. Cromatograma da amostra 43M_A por HPLC-DAD monitorado em 265 nm. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna InestSustain – C8 (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).	73
Figura 67. Cromatograma HPLS-ESI-MS em modo TIC MS+ da amostra 43M_A. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna InestSustain – C8 (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).	73
Figura 68. Espectro de massas ESI-quadrupolo MS+ da amostra 43M_A, TR = 20,5'. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna InestSustain – C8	73
Figura 69. Cromatograma HPLS-ESI-MS extraído m/z+ 313, MS+ da amostra 43M_A. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna InestSustain – C8 (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).	74
Figura 70. Espectro de massas ESI-quadrupolo MS+ da amostra 43M_A, TR = 20,8'. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna InestSustain – C8	74
Figura 71. Cromatograma da amostra 43M_A por HPLC-DAD monitorado em 305 nm. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna C18, X-Terra, Waters – C18, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).....	74
Figura 72. Cromatograma da amostra 43M_A por HPLC-DAD monitorado em 265 nm. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna C18, X-Terra, Waters – C18, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).....	75
Figura 73. Cromatograma HPLS-ESI-MS em modo TIC MS+ da amostra 43M_A. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna C18, X-Terra, Waters – C18, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).....	75
Figura 74. Espectro de massas ESI-quadrupolo MS+ da amostra 43M_A, TR = 23,1'; 26,3'; 28,0' e 30,5'.	76
Figura 75. Cromatograma HPLS-ESI-MS em modo TIC MS+ da amostra 43M_A. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna C18, X-Terra, Waters – C18, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).....	76
Figura 76. Espectro de massas ESI-quadrupolo MS+ da amostra 43M_A, TR = 15,0'; 15,7'; 16,6' e 19,1'.	77
Figura 77. Cromatograma da amostra 43M_A por HPLC-DAD monitorado em 300 nm. Condições cromatográficas: Gradiente exploratório. Coluna C18, X-Terra, Waters – C18, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).	77
Figura 78. Cromatograma HPLS-ESI-MS em modo TIC MS+ da amostra 43M_A. Condições cromatográficas: Gradiente exploratório. Coluna C18, X-Terra, Waters – C18, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).	78
Figura 79. Espectro de massas ESI-quadrupolo MS+ da amostra 43M_A, TR = 13,6'	78
Figura 80. Cromatograma HPLS-ESI-MS em modo TIC MS+ da amostra 43P. Condições cromatográficas: Gradiente exploratório. Coluna C18, X-Terra, Waters – C18, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm). Batzelladina L.	78
Figura 81. Espectro de massas ESI-quadrupolo MS+ da amostra 43MP, TR = 15,5'. Condições cromatográficas: Gradiente exploratório. Coluna C18, X-Terra, Waters – C18, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm). Batzelladina L.	79
Figura 82. Fluxograma do fracionamento da fração AcMa17_43 por HPLC-UV.....	80
Figura 83. Fluxograma das purificações sucessivas do catálogo de minoritários, por HPLC-UV.....	83
Figura 84. Cromatograma da amostra 312_Fonte por HPLC-DAD monitorado em 300 nm. Condições cromatográficas: Gradiente exploratório. Coluna C18, X-Terra, Waters – C18, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).	83
Figura 85. Cromatograma HPLS-ESI-MS em modo TIC MS+ da amostra 312_Fonte. Condições cromatográficas: Gradiente exploratório. Coluna C18, X-Terra, Waters – C18, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).	83

Figura 86. Espectro de massas ESI-quadrupolo MS+ da amostra 312_Fonte, TR = 6,3'.....	84
Figura 87. Cromatograma da amostra 312_PuroC por HPLC-DAD monitorado em 300 nm. Condições cromatográficas: Gradiente exploratório. Coluna C18, X-Terra, Waters – C18, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).	84
Figura 88. Cromatograma HPLS-ESI-MS em modo TIC MS+ da amostra 312_PuroC. Condições cromatográficas: Gradiente exploratório. Coluna C18, X-Terra, Waters – C18, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).	84
Figura 89. Espectro de massas ESI-quadrupolo MS+ da amostra 312_PuroA, TR = 6,3'.....	85
Figura 90. Fluxograma para isolamento de compostos batzelladínicos de extratos de esponjas <i>monanchora arbuscula</i> utilizados neste trabalho.....	86
Figura 91. Estrutura do composto MA71Dd.....	88
Figura 92. Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) do composto MA71Dd.....	88
Figura 93. Espectro de RMN de ¹³ C (150 MHz, CD ₃ OD) do composto MA71Dd.....	90
Figura 94. Espectro de massas ESI-quadrupolo MS+ do composto MA71Dd.....	90
Figura 95. Cromatograma HPLS-ESI-MS em modo TIC MS+ do composto MA71Dd, eluição em gradiente exploratório 20-100% orgânico.	91
Figura 96. Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) comparativo entre o composto MA71Dd obtido da Ma17s2_71A e da subfração AcMa17_43P, de acordo com seus espectros de RMN - ¹ H, (Figura 92). ...	91
Figura 97. Espectro de HMBC (600 MHz, CD ₃ OD) do composto MA71E.....	93
Figura 98. Ampliação do espectro de RMN HMBC (600 MHz, CD ₃ OD) do composto MA71E.	94
Figura 99. Ampliação do espectro de RMN HMBC (600 MHz, CD ₃ OD) do composto MA71E.	94
Figura 100. Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) do composto MA71E.	95
Figura 101. Espectro de RMN de ¹³ C (150 MHz, CD ₃ OD) do composto MA71E.....	95
Figura 102. Estrutura do composto MA71E.....	96
Figura 103. Proposta de fragmentação para o composto MA71E.....	97
Figura 104. Espectro de MSMS do íon <i>m/z</i> 651,5335 [M+H] ⁺ do composto MA71E, TR = 5,1'.....	98
Figura 105. Espectro de HRMS do composto MA71E, TR = 5,1'.....	98
Figura 106. Cromatograma HPLS-ESI-MS em modo TIC MS+ composto 43Q326, eluição em gradiente exploratório 20-100% orgânico.	99
Figura 107. Espectro de massas ESI-quadrupolo MS+ do composto 43Q326, TR = 15,4'.....	99
Figura 108. Cromatograma HPLS-UV detecção em 300 nm do composto 43Q326, eluição em gradiente exploratório 20-100% orgânico.	99
Figura 109. Absorção UV do composto 43Q326.	100
Figura 110. Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) do composto 43Q326. (Comparativo com o Ma71E obtido anteriormente).	100
Figura 111. Espectro de RMN de ¹³ C (150 MHz, CD ₃ OD) do composto 43Q326.....	101
Figura 112. Espectro de RMN de ¹ H-Noesy (600 MHz, CD ₃ OD) do composto 43Q326, acoplamento entre os prótons dos carbonos C-3 e C-5 (Tabela 13).	101
Figura 113. Espectro de RMN de ¹ H-Noesy (600 MHz, CD ₃ OD) do composto 43Q326, acoplamento entre os prótons dos carbonos C-7 e C-9 (Tabela 13).	102
Figura 114. Espectro de RMN de ¹ H-Noesy (600 MHz, CD ₃ OD) do composto 43Q326, acoplamento entre os prótons dos carbonos C-25 e C-27 (Tabela 13).	102
Figura 115. Espectro de UV do composto 43Q326.	103
Figura 116. Espectro de dicroísmo do composto 43Q326.....	103
Figura 117. Estrutura do composto 71BC313 (HUA, H. <i>et al</i>).	104
Figura 118. Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) do composto 71BC313.....	105
Figura 119. Espectro de RMN de ¹³ C (150 MHz, CD ₃ OD) do composto 71BC313.....	107
Figura 120. Espectro de massas ESI-quadrupolo MS+ do composto 71BC313.....	108
Figura 121. Cromatograma HPLS-ESI-MS em modo TIC MS+ do composto 71BC313, eluição em gradiente exploratório 20-100% orgânico.	108
Figura 122. Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) do composto 71BC313.....	108
Figura 123. Curva concentração-resposta contra cepa 3D7 de <i>P. falciparum</i>	111
Figura 124. Curva concentração-resposta contra células HepG2.	112
Figura 125. Porcentagem de redução da parasitemia da batzelladina L em relação ao controle.....	113
Figura 126. Evolução da parasitemia dos animais tratados e dos controles: Parasitemia média em camundongos infectados pelo <i>P. berguei</i> (cepa NK65) tratados com batzelladina L e com cloroquina, avaliada em diferentes dias após a infecção.	113
Figura 127. Taxa de sobrevivência dos animais infectados pelo <i>P. berguei</i> (cepa NK65), tratados com batzelladina L, com cloroquina e do controle, durante a duração do experimento (30 dias).	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fases móveis preparadas a partir das soluções A (Hexano:CH ₂ Cl ₂ , 9:1) e B (AcOEt:MeOH, 9:1).	35
Tabela 2. Frações agrupadas a partir de seus respectivos perfis cromatográficos.	35
Tabela 3. Balanço de massa das frações obtidas, após agrupamento por semelhança.	36
Tabela 4. Distribuição das massas das frações após a 1 ^a separação por CET do extrato AcMA17.	36
Tabela 5. Distribuição das massas das frações após as 2 ^a e 3 ^a separação da fração AcMA17 por CET.	36
Tabela 6. Comportamento cromatográfico das frações AcMa17_43A até AcMa17_43J.	55
Tabela 7. Balanço de massa do subfracionamento das frações AcMa17_43A até AcMa17_43J.	58
Tabela 8. Balanço de massa do subfracionamento das frações AcMa17_43K até AcMa17_43T.	58
Tabela 9. Área, %Área e Altura do composto de interesse (Ma71E) e interferentes vizinhos.	60
Tabela 10. Condição cromatográfica: Gradiente A: Coluna X-Terra, Waters – C18, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm), vazão 1 mL/min, gradiente orgânico (MeOH:MeCN 1:1):H ₂ O contendo 0,1% de ácido fórmico, descrito abaixo.	66
Tabela 11. Catalogo e balanço de massa final dos compostos obtidos das frações 43M e 43N.	81
Tabela 12. Comparação dos dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (14,1 T) para a substância MA71Dd com os dados reportado na literatura para a batzelladina L.	89
Tabela 13. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (14,1 T) de Ma71E.	97
Tabela 14. Comparação dos dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (14,1 T) para a substância 71BC313 com os dados reportado na literatura para a batzelladina F.	106
Tabela 15. Atividade antibacteriana dos alcalóides contra as cepas de bactérias gram-positivas e gram-negativas multirresistentes à fármacos.	109
Tabela 16. Avaliação da atividade antiplasmodial contra <i>P. falciparum</i> (IC ₅₀ ^{<i>P.falc</i>}), citotoxicidade em células de hepatocarcinoma humano (IC ₅₀ ^{HepG2}) e valor do índice de seletividade dos compostos.	110
Tabela 17. Cálculo do percentual de redução da parasitemia <i>in vivo</i> contra <i>P. berguei</i>	112

LISTA DE ABREVIACOES

AcOEt: Acetato de etila.
CC: Cromatografia em Coluna.
CET: Cromatografia de exclusão por tamanho.
CC₅₀: Concentrao citotóxica que causa a morte de 50% das células do hospedeiro.
COSY: *Correlated Spectroscopy*.
DAD: *Diode array detector*.
DMSO: Dimetilsulfóxido.
DNA: *Deoxyribonucleic acid*, material intracelular hereditário que carrega informaçoes genéticas de um organismo.
DIOL: Fase estacionária com grupo funcional de sílica modificada com grupo apresentando cadeia orgânica de carbonos com dois grupos -OH.
ESI: *Electrospray ionization*.
ELSD: *Evaporative light scattering detector*.
ESKAPE: Acrnimo de seis bactérias multi-resistentes a fármacos.
EC₅₀: Máxima concentrao inibitória de 50% dos patógenos.
HepG2: Linhagem celular humana de câncer de fígado.
Hz: Hertz.
HPLC: *High performance liquid chromatography*.
HMBC: *Heteronuclear multiple bond correlation*.
HSQC: *Heteronuclear single quantum coherence*.
HIV: Virus da imunodeficiência humana.
IS: ndice de seletividade.
IC₅₀: Concentrao inibitória média de 50% dos patógenos.
Ka: Constante de ionizao do cido.
MIC: Concentrao inibitória média.
m/z: Razão massa/carga.
MCL₅₀: Concentrao letal média.
MeOH: Metanol.
MS: *Mass spectroscopy*.
MeCN: Acetonitrila.
MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-dienil-2H-tetrazólio).
pKa: log negativo do Ka, indicador de acidez.
pH: Potencial hidrogeniônico. Escala logarítmica para representar acidez de uma soluço.
RMN: Ressonância magnética nuclear.
TR: Tempo de reteno.
TIC: *Total ion chromatogram*.
UV: Ultravioleta.
[α]^D: Rotao tica específica.
δ: Deslocamento químico.
λ: Comprimento de onda.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO:	16
1.1. <i>Monanchora arbuscula</i> e produtos naturais de organismos marinhos.....	16
1.2. Desreplicação e purificação das frações de alcaloides batzelladinas	23
2. OBJETIVOS:	25
3. PARTE EXPERIMENTAL	26
3.1. Materiais, equipamentos e técnicas utilizadas	26
3.1.1. Caracterização por HPLC-DAD-ELSD-MS.....	26
3.1.2. Fracionamento por cromatografia por exclusão por tamanho (CET)	27
3.1.3. Fracionamento por cromatografia por adsorção em coluna DIOL	28
3.1.4. Purificação por cromatografia preparativa HPLC-UV ou HPLC-UV-ELSD	28
3.1.5. Ressonância magnética nuclear (RMN)	28
3.1.6. Avaliação da atividade biológica <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> dos compostos majoritários.....	29
3.1.6.1. Atividade biológica <i>in vitro</i> contra cepas bacterianas ESKAPE	29
3.1.6.2. Atividade biológica <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> contra <i>P. falciparum</i> e <i>P. berguei</i>	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO:	31
4.1. Extração da esponja marinha da espécie <i>Monanchora arbuscula</i>	31
4.2. Fracionamento da fração acetato de etila do extrato MeOH de <i>M. arbuscula</i>	32
4.2.1. Fracionamento por cromatografia de exclusão por tamanho	32
4.2.2. Fracionamento por cromatografia em coluna DIOL.....	34
4.3. Caracterização das frações por HPLC-DAD-ELSD-MS.....	36
4.3.1. Frações obtidas utilizando CET por Sephadex LH-20	36
4.3.2. Frações obtidas utilizando cromatografia em coluna com fase estacionaria DIOL....	39
4.4. Purificação dos alcalóides batzelladínicos por HPLC-UV preparativo	43
4.4.1. Purificação do composto majoritário batzelladina L e composto minoritário	43
(<i>m/z</i> 651) a partir de Ma17s2_71	43
4.4.2. Desenvolvimento e otimização de método cromatográfico para obtenção de	44
batzelladina L em maior quantidade para ensaios <i>in vivo</i>	44
4.4.2.1. Comparativo entre detectores ELSD vs UV (208 nm), redução da vazão de.....	44
2.5 mL/min para 1.0 mL/min.	44
4.4.2.2. Comparativo entre fases estacionarias C18 e C8, sensibilidade no detector UV	49
em comprimentos de onda 265, 300 e 205, e uso de ácido fórmico ou ácido	49
trifluoroacético 0.1% para acidificação da fase móvel MeCN	49
4.4.2.3. Verificação da eficácia da condição cromatográfica melhorada	54
4.4.2.4. Purificação da fração 43Q contendo o alcaloide minoritário (<i>m/z</i> 651)	60
4.4.3. Obtenção do alcaloide majoritário batzelladina F a partir das frações 43M	64
e 43N e do catálogo de alcaloides minoritários	64
4.4.3.1. Desenvolvimento da condição cromatográfica para acumular o alcaloide majoritário	64
batzelladina F e acúmulo do composto 313_43MN	64
4.4.3.2. Fracionamento da fração 43M contendo alcaloide majoritário batzelladina F	80
4.4.3.3. Exemplo das purificações sucessivas do catálogo de minoritários	82
4.4.3.4. Fluxograma modelo para a purificação de compostos batzelladínicos a partir de	85
extratos de esponjas <i>monanchora arbuscula</i>	85

4.5.	Caracterização e análise dos compostos purificados por RMN e HPLC-MS-LSD-DAD...	87
4.5.1.	Identificação estrutural da batzelladina L	87
4.5.2.	Elucidação estrutural da substância minoritária (<i>m/z</i> 651).....	92
4.5.3.	Identificação estrutural da batzelladina F	104
4.6.	Avaliação das atividades biológicas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> dos compostos batzelladínicos da esponja <i>monanchora arbuscula</i>	109
4.6.1.	Atividade <i>in vitro</i> da batzelladina L, batzelladina F e do composto minoritário Ma71E . contra cepas de bactérias gram-positivas e gram-negativas multirresistentes à fármacos (ESKAPE)	109
4.6.2.	Atividade <i>in vitro</i> antiplasmodial contra <i>P. falciparum</i> da batzelladina L e da batzelladina F	110
4.6.3.	Atividade <i>in vivo</i> antiplasmodial contra <i>P. falciparum</i> da batzelladina L	112
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	116
6.	REFERÊNCIAS	118

1. INTRODUÇÃO:

FAUSTO

*Não penso em alegrias, já to disse.
Entrego-me ao delírio, ao mais cruciante gozo,
Ao fértil dissabor como ao ódio amoroso.
Meu peito, da ânsia do saber curado,
A dor nenhuma fugirá do mundo,
E o que a toda humanidade é doado,
Quero gozar no próprio Eu, a fundo,
Com a alma lhe colher o vil e o mais perfeito,
Juntar-lhe a dor e o bem-estar no peito,
E, destarte, ao seu Ser ampliar meu próprio Ser,
E, com ela, afinal, também eu perecer.*

Fausto Uma tragédia, Johann Wolfgang von Goethe – Editora 34, 2004

1.1. ***Monanchora arbuscula* e produtos naturais de organismos marinhos**

Os organismos marinhos são constantemente submetidos a uma ampla variação de condições ambientais, como temperatura, pressão e disponibilidade de nutrientes (GUPTA, 2021; TEMPONE, *et al.*, 2021; EL-DEMERDASH, *et al.*, 2018). Por estarem sujeitos a condições de stress, diversos organismos marinhos adquiriram características que favoreceram sua adaptação no ambiente em que se encontram, sendo uma das principais o acúmulo de metabólitos secundários bioativos. Atualmente se considera que os organismos marinhos são de grande importância para a descoberta e prospecção de novos produtos naturais, com excelente atividade biológica e grande diversidade molecular. A diversidade química e arquitetura molecular destes metabólitos os faz alvo ideal para serem objeto de síntese orgânica (GALLIMORE, KELLY e SCHEUER, 2005; HUA, *et al.*, 2007; EL-DEMERDASH, *et al.*, 2018).

Uma das classes mais importantes de metabólitos de organismos marinhos são derivados guanidínicos. As esponjas marinhas constituem a principal classe de organismos marinhos que apresentam derivados guanidínicos, principalmente alcaloides e derivados peptídicos (BERLINCK, *et al.*, 2021).

Apresentando basicidade elevada ($pK_a = 13.6$), os alcaloides guanidínicos são capazes de se ligarem a grupos fosfato, metais e carboxilatos, em aplicações como agentes anti-infecciosos, suas estruturas podem acarretar a formação de ligações de

hidrogênio, estando protonadas no pH fisiológico, tornando-as atrativas quando se pensa em interação com o alvo biológico (Kim, S.; Semenyá, D.; Castagnolo, D.; 2021).

Os alcaloides guanidínicos podem ser classificados em quatro quimiotipos: alcaloides monocíclicos e bicíclicos, alcaloides tricíclicos, alcaloides policíclicos e alcaloides batzelladínicos.

São exemplos dos alcaloides guanidínicos monocíclicos ou bicíclicos as crambescinas. O mais complexo alcaloide pertencente a esta classe é a urupocidina A (MAKARIEVA, *et al.*, 2014). No quimiotipo dos alcaloides guanidínicos tricíclicos estão presentes compostos como as ptilocaulinas, mirabilinas e netaminas. Nos alcaloides policíclicos a ptilomicalina A, as crambescidinas, as monoanchocidinas e a monoanchomicalinas, possuem estruturas com cadeias alquílicas polifuncionalizadas ligadas a um núcleo guanidínico pentacíclico. Enquanto que as batzelladinas, isoladas pela primeira vez da esponja Caribenha *Batzella* sp., possuem em suas estruturas dois ou três grupos guanidínicos em sub-estruturas tricíclicas, usualmente interconectadas por uma unidade éster alquílico. (SANTOS, M.; *et al.*; 2015).

O núcleo guanidínico tricíclico é frequentemente conservado entre os membros da classe dos compostos batzelladínicos. Modificações na cadeia lateral ligada ao grupo éster os conferem diferentes propriedades de atividade biológica, valores micromolares ou até submicromolares contra *P. falciparum* e *Tripanossoma cruzi* foram observados para estes compostos. (TEMPONE, *et al.*, 2021).

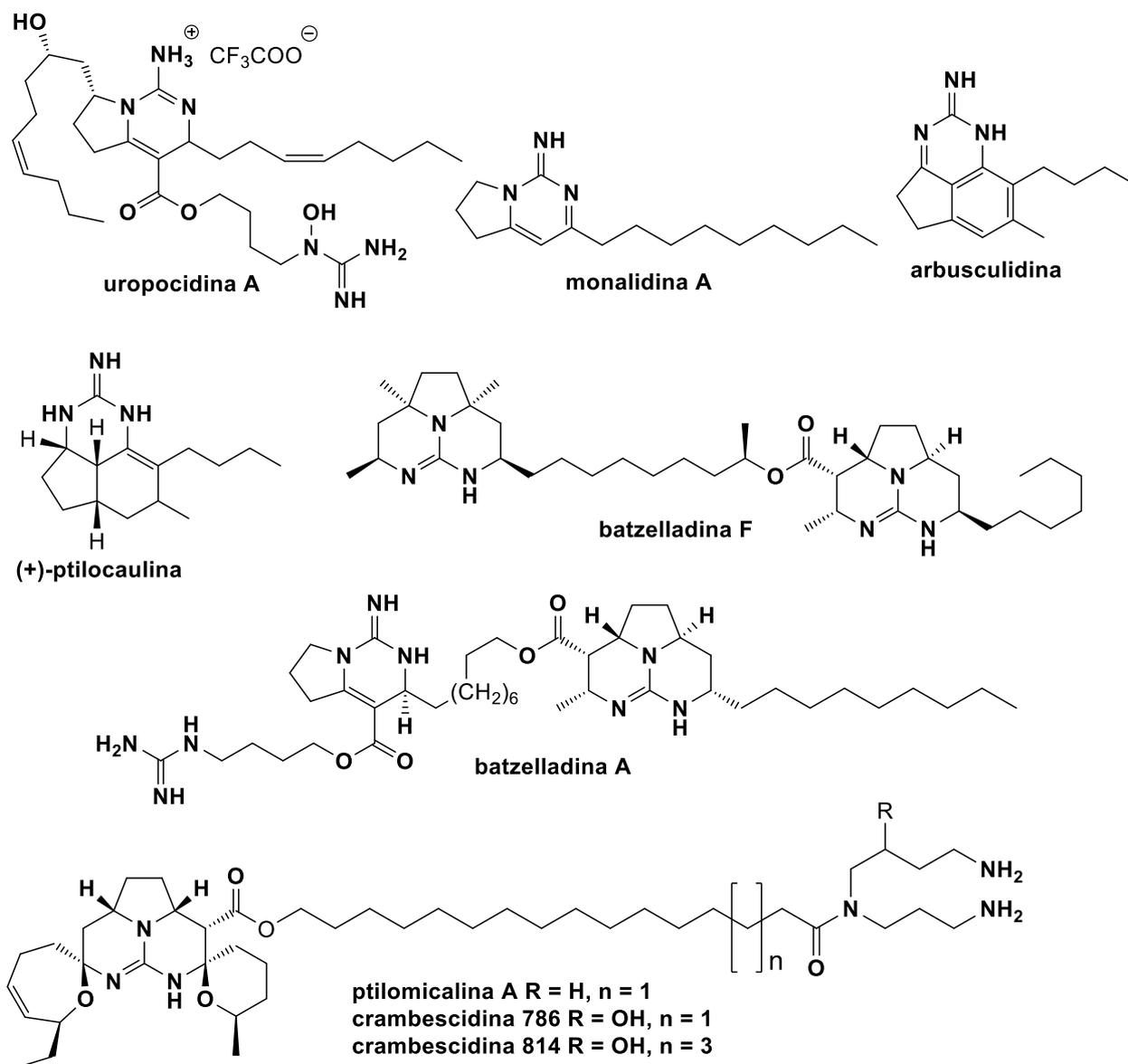
Sete alcaloides guanidínicos juntamente à batzelladinas A, F, H e L foram isolados e tiveram suas estruturas elucidadas e suas atividades contra a cepa resistente da malária e células humanas avaliadas (Laville, R.; *et al.*; 2009). Uma exploração mais ampla das suas atividades biológicas é viável, mas questões de toxicidade ainda foram pouco exploradas. Poucos destes alcaloides foram avaliados em testes de atividade anti-*Leishmania*, sendo que os medicamentos utilizados para o tratamento de Leishmaniose são muito antigos (mais de 60 anos) e com severos efeitos colaterais (SANTOS, M.; *et al.*; 2015; Tempone, A.; *et al.*; 2021).

Apesar dos resultados iniciais promissores reportados *in vitro*, com vários produtos naturais apresentando atividades contra mais de um tipo de parasitologia, ainda poucos alcaloides de origem marinha tiveram suas bioatividades avaliadas *in vivo*, situação em

que outras propriedades necessitam ser analisadas, como solubilidade, estabilidade, propriedades farmacocinéticas, potência e seletividade.

Quimioterápicos são a única forma de tratamento para as doenças negligenciadas do hemisfério sul como doença de Chagas, tripanossomíase humana africana (doença do sono), leishmanioses e malária, com o arsenal de fármacos atuais muito restritos, frequentemente apresentando efeitos colaterais adversos severos e uma variabilidade alta na eficácia ou resistência parasitológica, podendo também ter elevado custo de aquisição. Entre as doenças parasitológicas causadas por protozoários, malária ganha atenção extra devido a seu amplo espalhamento pelo planeta e impacto social. Malária é causada por cinco espécies de parasitas do gênero *Plasmodium*, sendo o mais letal o *P. falciparum*. O seu ciclo reprodutivo está associado ao mosquito *Anopheles* como vetor, o parasita multiplica-se rapidamente ocasionando 200 milhões de casos por ano e 400000 mortes. A malária recentemente ficou conhecida por outra terminologia: doença da pobreza; associado ao menor investimento que recebe tanto com relação aos enfermos quanto a investigação da doença, o que resulta em um perfil inferior da doença frente à saúde pública (SANTOS, M.; *et al.*; 2015; Tempone, A.; *et al.*; 2021).

Figura 1. Alcaloides guanidínicos de esponjas marinhas classificados por quimiotipo: bicíclicos, tricíclicos, policíclicos e batzelladínicos.



A batzelladina A (Figura 1) inibe de maneira competitiva a ligação da proteína do envelope HIV gp-120 ao receptor da célula humana CD4+ com afinidade micro molar. (SANTOS, M.; *et al.*; 2015; EL-DEMERDASH, *et al.*, 2018)

A ptilomicalina A (Figura 1) apresenta estrutura guanidínica pentacíclica e atividade antiviral e antifúngica, e despertou o interesse pela investigação de novos alcaloides guanidínicos de origem marinha (HUA, *et al.*, 2007).

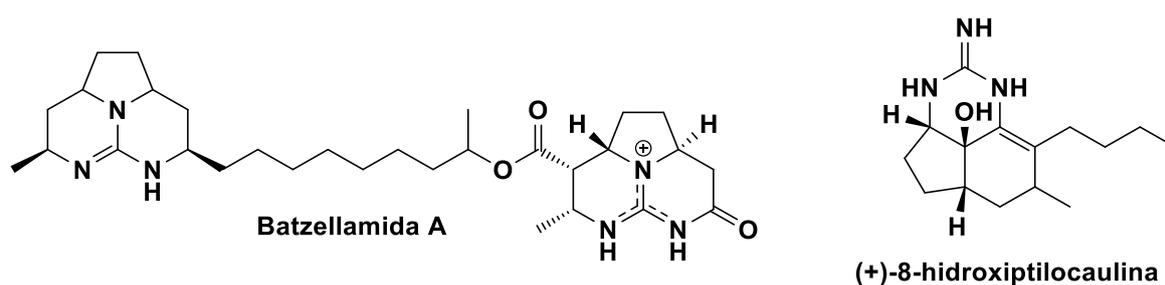
Esponjas da classe Poecilosclerida, em particular do gênero *Crambe* e *Monanchora*, são ricas no acúmulo de alcaloides guanidínicos, que apresentam diversas

atividades biológicas, como por exemplo citotóxica, antiviral, inibidores enzimáticos, receptor antagonista, bloqueadores de Ca^{2+} , antifúngico e antimicrobiana (SANTOS, M.; *et al.*; 2015; EL-DEMERDASH, *et al.*, 2018).

Segundo o *World Porifera Database*, quatorze espécies de esponjas estão incluídas no gênero *Monanchora*. As espécies já estudadas do ponto de vista químico incluem *Monanchora arbuscula*, *Moanchora pulchra*, *Monanchora sp.* e *Monanchora unguilata*. Um total de 23 alcaloides guanidínicos foram isolados de esponjas do gênero *Monanchora* no período compreendido entre 2015 e 2020. Este número corresponde a 15,3% dos alcaloides isolados de esponjas marinhas no período (EL-DEMERDASH, *et al.*, 2018; WU, *et al.*, 2020).

Dentre os alcaloides isolados de *Monanchora arbuscula* (Figuras 1, 2 e 3), a monalidina A apresentou atividades antiproliferativas e citotóxicas contra células cancerígenas com IC_{50} micro molar de $82 \pm 1 \mu\text{M}$. A (+)-ptilocaulina apresentou atividade antimicrobiana e citotóxica contra cepa de *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina com IC_{50} de $1,3 \mu\text{M}$. (EL-DEMERDASH, *et al.*, 2018; EL-DEMERDASH, *et al.*, 2016). A arbusculidina A é o primeiro alcaloide do grupo que apresenta um anel benzênico (SANTOS, M.; *et al.*; 2015).

Figura 2. Alcaloides isolados a partir de *Monanchora arbuscula* (8)-hidroxiptilocaulina e batzellamida A.



De seis alcaloides guanidínicos tricíclicos que tiveram sua citotoxicidade avaliada contra quatro linhagens celulares cancerígenas HL-60, MDA-MB-435, HCT-8 e SF-295, a (+)-ptilocaulina (Figura 1) e (+)-8-hidroxiptilocaulina (Figura 2) apresentaram citotoxicidade com IC_{50} entre 5,8 - 40,0 e 7,9 - 61,5 μM respectivamente. Vários alcaloides da classe das batzelladinas, como as batzelladinas A (Figura 1), D, E e F, já foram sintetizadas (HUA, *et al.*, 2007). Rotas elegantes foram desenvolvidas para síntese de uma série de compostos da família das batzelladinas sendo a mais concisa síntese total

enantioseletiva obtida para o composto (-)-batzelladina D, apresentando 14 etapas sequenciais com um rendimento total de 10% (TEMPONE, *et al.*, 2021).

Análogos da batzelladina F (Figura 1) foram sintetizados visando avaliar suas atividades antivirais contra inibidores do vírus HIV-1. Apesar da batzelladina F não ter sido avaliada no mesmo *batch* analítico dos ensaios, dificultando a comparação do perfil ativo e do perfil com o produto natural, alguns análogos mostraram boa inibição das enzimas transcriptase reversa do HIV-1 e baixa citotoxicidade (BERLINCK, TRINDADE-SILVA e SANTOS, 2017).

A batzelladina L apresentou atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*, anti-HIV, antifúngica e antibacteriana, anti-malarial, anti-leishmanial além de citotoxicidade contra variadas linhagens celulares cancerígenas (SANTOS, *et al.*, 2015). Outros alcaloides, dentre eles as batzelladinas F e L, apresentaram atividades antiparasitárias *in vitro* contra os agentes etiológicos da doença de Chagas e leishmaniose visceral: *Trypanosoma cruzi* com IC₅₀ 5 µM e 2 µM e *Leishmania infantum* com IC₅₀ 4 µM e 2 µM respectivamente (SANTOS, *et al.*, 2015; BERLINCK, BERTONHA e RODRIGUES, 2017; EL-DEMERDESH, *et al.*, 2018).

As batzellamida A (Figura 1), hemibatzelladina J, Δ^{19} -hemibatzelladina J e Δ^{20} -hemibatzelladina J (Figura 3) foram isoladas da esponja *Monanchora arbuscula*. Porém, a quantidade isolada dificultou a avaliação das atividades biológicas destes compostos (SANTOS, *et al.*, 2015).

A resistência antimicrobiana frente aos antibióticos utilizados aumenta de forma alarmante, sendo uma das maiores ameaças para a saúde humana e exercendo pressão de forma crescente nos sistemas de saúde, que vislumbram em seu horizonte uma nova “era pré-antibiótica”, se não forem obtidas soluções e alternativas melhores pelas comunidades científicas e medicinais.

A era de ouro das descobertas dos antibióticos em uso até hoje está compreendida entre as décadas de 1940 e 1960. Após a descoberta da penicilina em 1928 as décadas que se sucederam apresentaram poucas descobertas, ressurgindo de maneira mais intensa apenas recentemente e ainda apresentando grandes lacunas relacionadas aos tipos de estruturas químicas e aos alvos de ação dos novos medicamentos. O contexto ressalta a necessidade de serem realizados esforços extras para contornar a resistência

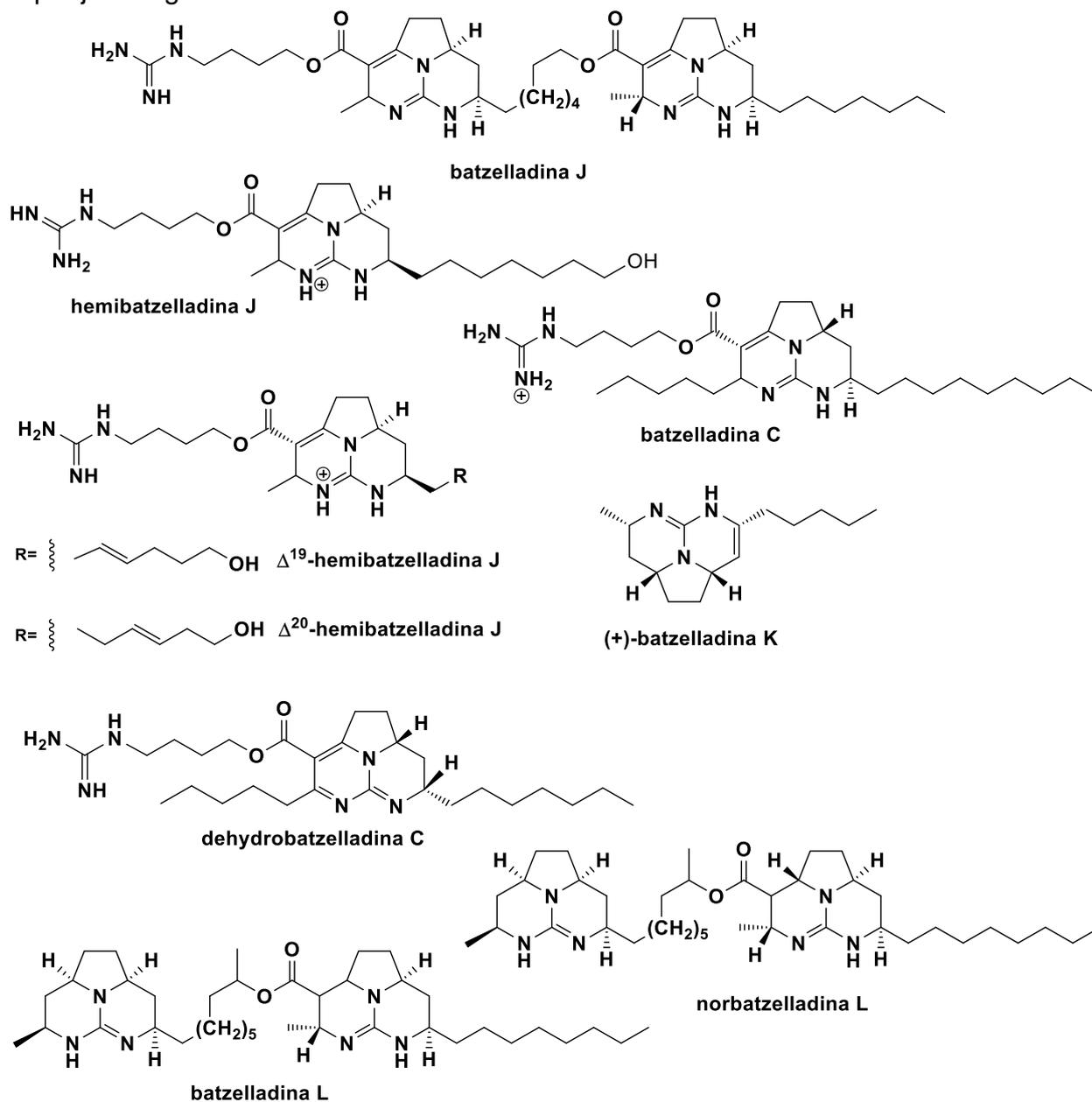
e tolerância dos organismos biológicos patogênicos resistentes a múltiplas drogas (PENA, M., A., *et al.*, 2021).

O acrônimo ESKAPE refere-se a seis patógenos que apresentam resistência múltipla contra fármacos: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumani*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter cloacae*, responsáveis pela grande maioria das infecções de origens hospitalares, sendo capazes de “escapar” da ação biocida dos medicamentos. Terapias alternativas utilizando combinações de antibióticos ou de antibióticos com adjuvantes, bacteriófagos, peptídeos antimicrobiais, nanopartículas de prata, são estratégias que têm sido descritas na literatura como alternativas, mas há ainda grande necessidade de desenvolvimento ou descoberta de novos compostos que sejam eficientes em combater as infecções causadas por estes microrganismos (Mulani, M.; *et al.*; 2019).

Os mecanismos de resistência dos microrganismos multirresistentes ESKAPE mais discutidos são a inativação do fármaco, comumente por clivagem enzimática, a modificação do sitio alvo onde o antibiótico liga-se ou a redução da acumulação do fármaco seja diminuindo a permeabilidade ou aumentando a efusão do medicamento da célula. A capacidade celular de formar biofilmes que bloqueiam fisicamente a resposta imunológica da célula hospedeira ou do antibiótico frente ao patógeno é outro agravante observado, a formação de células especializadas dormentes, chamadas de células persistentes, que são tolerantes aos antibióticos, dificultam o tratamento causando reinfecções sucessivas (Mulani, M.; *et al.*; 2019).

Compostos guanidínicos estão entre os grupos funcionais preferenciais para serem utilizados como modelos de projeto e desenvolvimento de novos bactericidas. As moléculas encontram-se protonadas em pH fisiológico, o que promove a ligação do grupo guanidínico às células alvo bacterianas (inclusive nas gram-negativas), e induz o rompimento das membranas e paredes celulares por interações eletrostáticas formadas com os envelopes das células bacterianas carregadas negativamente (Kim, S.; Semanya, D.; Castagnolo, D.; 2021).

Figura 3. Estruturas químicas de alcaloides da classe das batzelladinas, isolados de esponjas do gênero *Monanchora*.



1.2. Desreplicação e purificação das frações de alcaloides batzelladinas

A separação de alcaloides guanidínicos de esponjas marinhas é extremamente difícil pelo fato destas substâncias apresentarem caráter anfipático e por ocorrerem na forma de séries homólogas, diferenciando-se muitas vezes pela adição ou redução de uma dupla ligação ou algumas unidades de CH_2 na cadeia alquílica lateral ou central. A separação em bancada é possível quando a mistura contém alcaloides de diferentes polaridades como por exemplo, crambescidinas e batzelladinas, que pertencem a quimiotipos diferentes. A separação torna-se mais difícil e inviável por cromatografia em

bancada quando ocorrem na forma de misturas de séries homólogas ou de alcaloides de uma mesma classe, sendo necessária a separação por HPLC semi-preparativo ou preparativo (SANTOS, M.; *et al.*; 2015; KIM, *et al.*, 2001).

Por exemplo, a batzelladina A foi fracionada do extrato solúvel em diclorometano por cromatografia em coluna Sephadex LH-20 seguida de cromatografia em sílica gel, resultando em frações biologicamente ativas e inativas, as frações ativas foram posteriormente purificadas por cromatografia em camada delgada ou cromatografia em coluna sílica gel. Sua estrutura química foi elucidada no artigo com o composto estando em mistura, com quantidades minoritárias de dois homólogos. A batzelladina B foi isolada como um pó amorfo branco apresentou pequenas quantidades de dois homólogos detectados por espectrometria de massas. O mesmo ocorreu para as batzelladinas C, D e E, evidenciando a dificuldade de obter estes compostos com bom grau de pureza e de elucidar suas estruturas (PATIL, *et al.*, 1995). As batzelladinas H e I foram isoladas em mistura isomérica 43:57, com peso molecular 609 Da (GALLIMORE, KELLY e SCHEUER, 2005).

2. OBJETIVOS:

FAUSTO

*Em todo traje hei de sentir as penas,
Da vida mísera o cortejo.
Sou velho, pra brincar apenas,
Jovem sou, pra ser sem desejo.
Que pode, Fausto, o mundo dar-te?
[...]*

*O Deus, que o ser profundo me emociona
E me agita o âmago em que mora,
Que acima de meus brios todos trona,
Não pode atuar nada por fora.
E da existência, assim, o fardo me contrista,
A morte almejo, a vida me é malquista*

Fausto Uma tragédia, Johann Wolfgang von Goethe – Editora 34, 2004

Com o intuito de isolar os compostos batzelladínicos bioativos majoritários e minoritários da esponja *Monanchora Arbuscula* para o desenvolvimento de ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo* os objetivos do projeto foram definidos em:

Fracionar o extrato MeOH da esponja *Monanchora arbuscula*, utilizando diferentes abordagens e técnicas cromatográficas, de maneira a se obter quantidades significativas dos alcaloides guanidínicos presentes nessas frações.

Purificar os alcaloides guanidínicos por HPLC.

Confirmar a identidade dos alcaloides puros obtidos e identificar novos alcaloides isolados utilizando diferentes técnicas espectroscópicas.

Avaliar os alcaloides puros obtidos em quantidades necessárias nos bioensaios de atividade antiparasitária, antibacteriana e antifúngica, inclusive em testes *in vivo*.

3. PARTE EXPERIMENTAL

22 de maio

Que a vida humana é apenas um sonho outros já disseram, [...]. Quando penso nos limites que circunscrevem as altivas e investigativas faculdades humanas; quando vejo que esgotamos todas as nossas forças em satisfazer nossas necessidades, que apenas tendem a prolongar uma existência miserável; quando constato que a tranquilidade a respeito de certas questões não passa de uma resignação sonhadora, como se a gente tivesse pintado as paredes entre as quais jazemos presos com feições coloridas e perspectivas risonhas – tudo isso, [...] me deixa mudo. Meto-me dentro de mim mesmo e acho aí um mundo! Mas antes em pressentimentos e obscuros desejos que em realidade e ações vivas.

Os Sofrimentos do Jovem Werther, Johann Wolfgang Goethe – L&PM pocket, 2001

3.1. Materiais, equipamentos e técnicas utilizadas

3.1.1. Caracterização por HPLC-DAD-ELSD-MS

Cromatografia líquida de alta eficiência com detectores de arranjos de diodos, espalhamento de luz evaporativa e espectrometria de massas (HPLC-DAD-ELSD-MS) foram desenvolvidas em um sistema cromatográfico Waters®: módulo controlador Alliance, modelo Waters 2695, detector de arranjo de fotodiodos (modelo 2696) e detector de espectrometria de massas (modelo Waters Micromass ZQ 2000), operados com o software Empower.

O detector de UV foi ajustado para monitoramento na faixa de λ entre 200 e 400 nm. O espectrômetro de massas foi operado com os seguintes parâmetros: voltagem do capilar 3,00 kV, temperatura da fonte 100 °C, temperatura de dessolvatação 350 °C, ionização por electrospray (ESI) alternando entre os modos positivo e negativo com detecção na faixa de 100 – 1200 Da. O fluxo de gás no cone foi mantido em 50 L/h e o fluxo de dessolvatação em 350 L/h. A separação cromatográfica nesse equipamento foi realizada utilizando-se uma coluna analítica X-terra (Waters – C18, 4,6 x 250 mm, 5 μ m), vazão de 1 mL/min em fase reversa, a fase móvel utilizada foi H₂O (0,1% ácido fórmico) e MeOH/MeCN (1:1) contendo de 0,1% ácido fórmico como fase orgânica.

A eluição na forma de gradiente linear foi empregada variando-se o percentual de solventes orgânicos de X a 100%, sendo X entre 10% e 50% ajustado de acordo com a polaridade ou a retenção dos compostos para cada amostra. As corridas cromatográficas foram realizadas entre 30 a 50 minutos, mantendo-se por até 10 minutos na composição

de 100% de solvente(s) orgânico(s), com o objetivo de que ocorra a total eluição dos compostos e em seguida retornando à condição inicial de X% de solventes orgânicos por até 10 minutos, alcançando o equilíbrio entre as fases móvel e estacionária entre cada injeção. O volume de injeção padrão utilizado foi 10 µL, para concentrações de 1,0 - 2,0 mg/mL em extratos e frações e 0,5 - 1 mg/mL para substâncias isoladas, dependendo da sensibilidade observada ou da quantidade de massa de material disponível.

Ajustes na concentração da amostra ou no volume de injeção foram adotados quando necessário, de acordo com a sensibilidade observada para cada amostra, seja alterando-se o volume de injeção de 3 até 40 µL, ou ajustando-se a concentração inicial da amostra injetada.

A sensibilidade dos detectores ELSD e UV para a análise de alcaloides guanidínicos foi avaliada e discutida na dissertação do Dr. Mario Ferreira Conceição Santos (SANTOS, 2014). O detector de espalhamento de luz evaporativo (ELSD) apresentou maior sensibilidade para os compostos majoritários, com a desvantagem de ser um detector destrutivo: um terço da vazão de solvente, e conseqüentemente da amostra, é dividida e direcionada para passar pelo detector ELSD e o restante é enviado para o detector UV e tubos coletores no sistema cromatográfico.

A estratégia de se desenvolver a desreplicação dos compostos a serem separados em análises por HPLC-UV-MS de baixa resolução foi realizada com a injeção de amostras diluídas, adequando-se à condição cromatográfica obtida em sistema HPLC-UV semi-preparativo. Uma vez otimizada a condição cromatográfica de separação, foi realizado o aumento gradual da concentração de injeção das amostras a serem separadas, para o fracionamento e purificação dos alcaloides de *Monanchora arbuscula*.

3.1.2. Fracionamento por cromatografia por exclusão por tamanho (CET)

Para o fracionamento dos extratos utilizou-se uma coluna de vidro (215 × 5 cm d.i.) contendo fase estacionária Sephadex® LH-20 (Sigma-Aldrich) eluída com MeOH. As frações obtidas foram coletadas em tubos de ensaio numerados, secas e então analisadas por HPLC-DAD-ELSD-MS, sendo agrupadas de acordo com suas características cromatográficas.

A desreplicação para localizar as frações contendo as batzelladinas de interesse foi desenvolvida a partir da análise comparativa dos espectros de massas obtidos, com os resultados previamente reportados na literatura.

3.1.3. Fracionamento por cromatografia por adsorção em coluna DIOL

Devido à complexidade das frações contendo as batzelladinas obtidas por cromatografia por exclusão por tamanho, foi desenvolvido em pequena escala a cromatografia em coluna com cartucho contendo fase estacionária de sílica-gel derivatizada com grupos diol. As frações obtidas foram coletadas em tubos de ensaio, analisadas por HPLC-DAD-ELSD-MS, desreplicadas e comparadas como descrito no item 3.1.2.

3.1.4. Purificação por cromatografia preparativa HPLC-UV ou HPLC-UV-ELSD

As frações contendo batzelladinas de interesse foram analisadas em sistema HPLC-UV-ELSD semi-preparativo, e posteriormente fracionadas exaustivamente por HPLC-UV semi-preparativo. Cada fração obtida exigiu o desenvolvimento e/ou adequação do método de acordo com a polaridade das substâncias presentes, complexidade da fração e tempos de retenção dos compostos presentes.

As colunas mais utilizadas para os processos de separação dos alcaloides foram as colunas: Inertsil (Inertsil - Ph, 4,6 × 250 mm, 5 µm); X-terra (Waters – C18, 4,6 × 250 mm, 5 µm); X-terra (Waters – C18, 7,8 × 150 mm, 5 µm), e; Inertsil (Inertsil – C8, 4,6 × 250 mm, 5 µm). Priorizou-se utilizar colunas que fornecessem separações comparáveis sempre que possível, para dimensões, diâmetro de partícula e volume interno, visando facilitar a comparação entre os dados observados.

O uso do modo gradiente foi preferencial no desenvolvimento dos métodos e a aplicação de regiões isocráticas com rampas rápidas de duração de um minuto foi empregado para minimizar o efeito observado de variação da linha de base durante o desenvolvimento dos métodos para frações iniciais de alta complexidade e contendo muitos compostos.

3.1.5. Ressonância magnética nuclear (RMN)

As análises de RMN ^1H , ^{13}C , NOESY-1D e bidimensional ^1H - ^1H -COSY, HSQC, HMBC foram adquiridas em espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker®

Avance III HD 600 (14,1 Tesla) com sonda criogênica de 5 mm, detecção inversa de três canais (^1H , ^{13}C e ^{15}N). O solvente utilizado na dissolução da amostra para obtenção dos espectros foi CD_3OD (Cambridge Isotopes Laboratories®) com pureza $\geq 99,9\%$, utilizando-se como referência o sinal residual do solvente não-deuterado. O software Top Spin versão 3.5 foi utilizado para processamento e interpretação dos espectros de RMN.

3.1.6. Avaliação da atividade biológica *in vitro* e *in vivo* dos compostos batzelladínicos majoritários

3.1.6.1. Atividade biológica *in vitro* contra cepas bacterianas ESKAPE (realizados pelo grupo coordenado pelo Dr. André G. Tempone, Instituto Butantan, São Paulo)

Os compostos batzelladínicos majoritários batzelladina L e batzelladina F tiveram suas bioatividades avaliadas frente a cepas bacterianas gram-positivas e gram-negativas multirresistentes a fármacos ESKAPE, os seis patógenos que exibem resistência múltipla contra fármacos foram testados: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumani*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter cloacae*.

3.1.6.2. Atividade biológica *in vitro* e *in vivo* contra *P. falciparum* e *P. berguei* (realizados pelo grupo coordenado pelo Professor Rafael V. C. Guido, IFSC-USP)

A batzelladina L e a batzelladina F tiveram suas atividades antiplasmodial *in vitro* contra um dos patógenos causadores da malária, cepa de *P. falciparum* 3D7 (sensível a cloroquina), avaliada utilizando a técnica de SYBR Green I e a citotoxicidade frente a células humanas da linhagem HepG2 pelo ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazolil)-2,5-dienil-2H-tetrazólio). No ensaio SYBR green as amostras são incubadas com o parasito em diluições seriadas de fator 2 por 72h, quando adiciona-se o reagente SYBR green, que marca o DNA dos parasitos viáveis. A redução de parasitemia é calculada em relação aos controles de crescimento positivo (sem adição de compostos, 100% de viabilidade) e negativo (hemácias não-parasitadas, 0% de viabilidade), os gráficos concentração-resposta desses dados determinam a concentração inibitória média (IC_{50}) de cada composto. No ensaio MTT após incubação por 24h, o sal é adicionado aos poços permanecendo por 2 a 4 horas adicionais de incubação, quando o sal é reduzido a formazan, resultando em coloração roxa em células vivas. O meio é descartado e o sal

de formazan solubilizado em DMSO tendo a absorbância determinada. As intensidades obtidas determinam a porcentagem de células viáveis em relação ao controle, sem adição de composto (100% de viabilidade). Os gráficos concentração-resposta determinam a concentração letal média (MCL₅₀) de cada composto. O índice de seletividade (IS) de cada composto é calculado pela razão MCL₅₀/IC₅₀. A atividade antimalárica da batzelladina L e da batzelladina F verificadas nos testes *in vitro* foram avaliadas *in vivo*, em camundongos infectados com *P. berghei*, em um único experimento, o uso de animais de laboratório neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz Fiocruz (CEUA 3004230222).

Camundongos suíços Webster, fêmeas, pesando 20 +/-2 g, provenientes do biotério de produção do CPqRR, foram inoculados com hemácias infectadas com *P. berghei*, cepa NK65, sensível a cloroquina, originalmente recebida da Universidade de Nova Iorque (EUA) e mantida em camundongos por passagens sanguíneas semanais. Cada camundongo foi inoculado com 10⁵ hemácias parasitadas (0,2 mL), via intraperitoneal (1º dia de experimento). Aproximadamente 24 h após a inoculação os animais foram divididos, aleatoriamente, em grupos de 3 camundongos por gaiola. Em cada experimento, foram utilizados dois grupos controles: um não-tratado, e um tratado com cloroquina, utilizando 3 a 5 animais por grupo. Nos 2º, 3º e 4º dias, os camundongos foram tratados por via oral com os compostos testes e com o controle cloroquina, a uma concentração de 50 mg/Kg. A parasitemia foi avaliada nos dias 5º, 8º e 10º de experimento pela contagem dos parasitos presentes nos esfregaços sanguíneos dos camundongos, que foram secos ao ar, fixados com metanol e corados com solução recém diluída de Giemsa, na proporção de duas gotas para cada 1 mL de água tamponada (pH 6,8). Após 10 min, as lâminas foram lavadas em água corrente, secas ao ar e examinadas ao microscópio óptico em objetiva de imersão (1.000x).

A parasitemia foi determinada a partir da contagem das hemácias infectadas e da estimativa do número total de hemácias em cada campo microscópico, sendo quantificados os parasitos em 50 a 100 campos. A parasitemia foi expressa em porcentagem de hemácias parasitadas e a atividade antimalárica foi determinada pela porcentagem de redução da parasitemia dos animais tratados em relação aos controles. Inibição de 30% do crescimento dos parasitos, quando comparado o grupo controle com o grupo teste, foi considerada como indicador de uma amostra ativa (Andrade-Neto, *et al.*, 2003).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

22 de maio

[...] Que as crianças não sabem o porquê de desejarem algo, todos os pedagogos estão de acordo. Mas que também homens feitos se arrastem como crianças, titubeando sobre a face da terra, e, exatamente como elas, não saibam de onde vêm e para onde vão, até mesmo que não têm um fim determinado para suas ações, igualmente governados por biscoitos, balas e chibatas, ninguém faz gosto em acreditar. [...]

A coisa também vai bem para aqueles que dão um título imponente para seus trabalhos vagabundos, ou até para os seus sofrimentos, e os descrevem como obras gigantescas feitas em prol da salvação e da prosperidade do gênero humano... [...] Mas aquele que reconhece em sua humildade onde tudo isso vai parar, [...] este, asseguro, [...] ao construir um mundo dentro de si, é feliz do mesmo jeito por ser humano. E então, por mais limitado que esteja em seus movimentos, ele mantém no coração a doce sensação da liberdade, sabendo que poderá deixar o seu cárcere quando quiser.

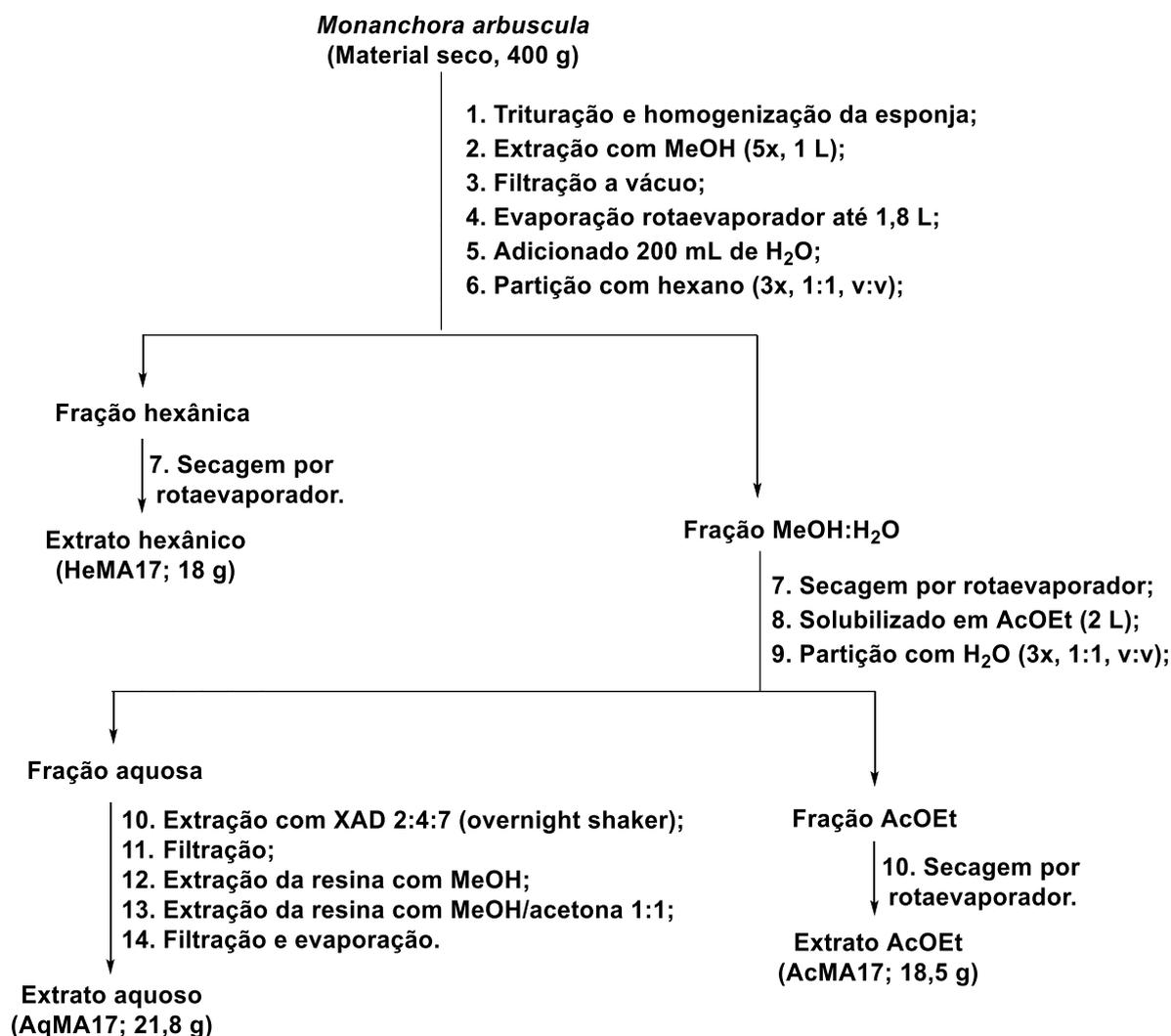
Os Sofrimentos do Jovem Werther, Johann Wolfgang Goethe – L&PM pocket, 2001

4.1. Extração da esponja marinha da espécie *Monanchora arbuscula*

Material seco da esponja marinha *Monanchora arbuscula* (MA17, 400 g), coletada em 2017 no litoral do Espírito Santo, foi homogeneizado e extraído com MeOH (5 × 1 L). O extrato MeOH foi filtrado e concentrado até um volume de 1,8 L, diluído com 200 mL de H₂O e particionado com hexano (3 × 2 L). A fração MeOH/H₂O (8:2, v/v) foi evaporada até 200 mL de H₂O. Esta fração foi particionada com AcOEt (3 × 200 mL). A fração aquosa foi extraída com uma mistura de resinas XAD-2, XAD-4 e XAD-7 em proporções iguais (1:1:1), utilizando-se 10 g da mistura de resinas/100 mL da fração aquosa, sob agitação durante uma noite. A mistura de resinas foi então recuperada por filtração e lavada com H₂O. O material orgânico adsorvido na mistura de resinas foi dessorvido utilizando-se MeOH e MeOH/acetona 50:50 (v/v) em banho de ultrassom por 10 minutos, resultando no extrato aquoso solúvel em MeOH. Todos os extratos foram evaporados, secos e preservados em freezer -4 °C (Figura 4).

Foram obtidos três extratos: Aquoso (AqMA17; 21,8 g), AcOEt (AcMA17; 18,5 g) e Hexânico (HeMA17; 18 g).

Figura 4. Fluxograma de extração para obtenção dos extratos aquoso e orgânico da esponja *Monanchora arbuscula*.



4.2. Fracionamento da fração acetato de etila do extrato MeOH de *M. arbuscula*

4.2.1. Fracionamento por cromatografia de exclusão por tamanho

A fração AcMA17 (2,9 g) foi solubilizada em MeOH (10,0 mL) com banho de ultrassom por 5 minutos, sendo então centrifugado por 10 minutos. O sobrenadante foi aplicado em coluna (215 x 5 cm d.i.) contendo Sephadex® LH-20 (Sigma-Aldrich) como fase estacionária e MeOH como fase móvel.

Frações de aproximadamente 13 mL foram coletadas utilizando-se coletor automático Redifrac (Pharmacia®), num total de 165 frações. Estas frações foram analisadas por HPLC-DAD-ELSD-MS e reunidas por similaridade cromatográfica, resultando em 10 frações finais codificadas de AcMA17_1; AcMA17_43; AcMA17_61;

AcMA17_64; AcMA17_68; AcMA17_72; AcMA17_105; AcMA17_121; AcMa17_127 e AcMa17_137.

O procedimento foi repetido mais duas vezes, utilizando-se um total de 6,0 g da fração AcMA17. Cada separação cromatográfica levou à obtenção de 172 frações, as quais foram analisadas por HPLC-DAD-ELSD-MS. Após a análise, as frações foram reunidas em 13 frações finais por similaridade cromatográfica, codificadas de MA17s2_1; MA17s2_59; MA17s2_63; MA17s2_66; MA17s2_68; MA17s2_70; MA17s2_71; MA17s2_72; MA17s2_81; MA17s2_99; MA17s2_113; MA17s2_121 e MA17s2_143.

Figura 5. Fluxograma do 1º fracionamento da fração AcMA17 por cromatografia de exclusão por tamanho (CET).

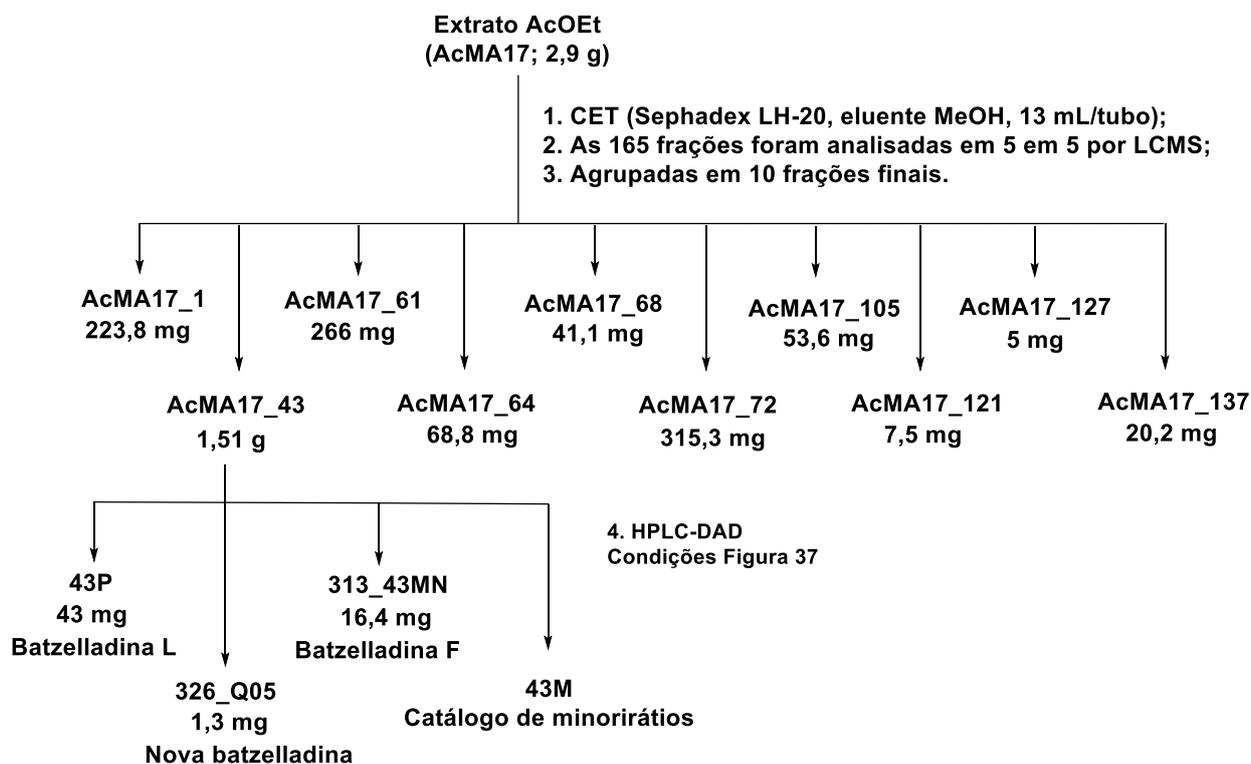
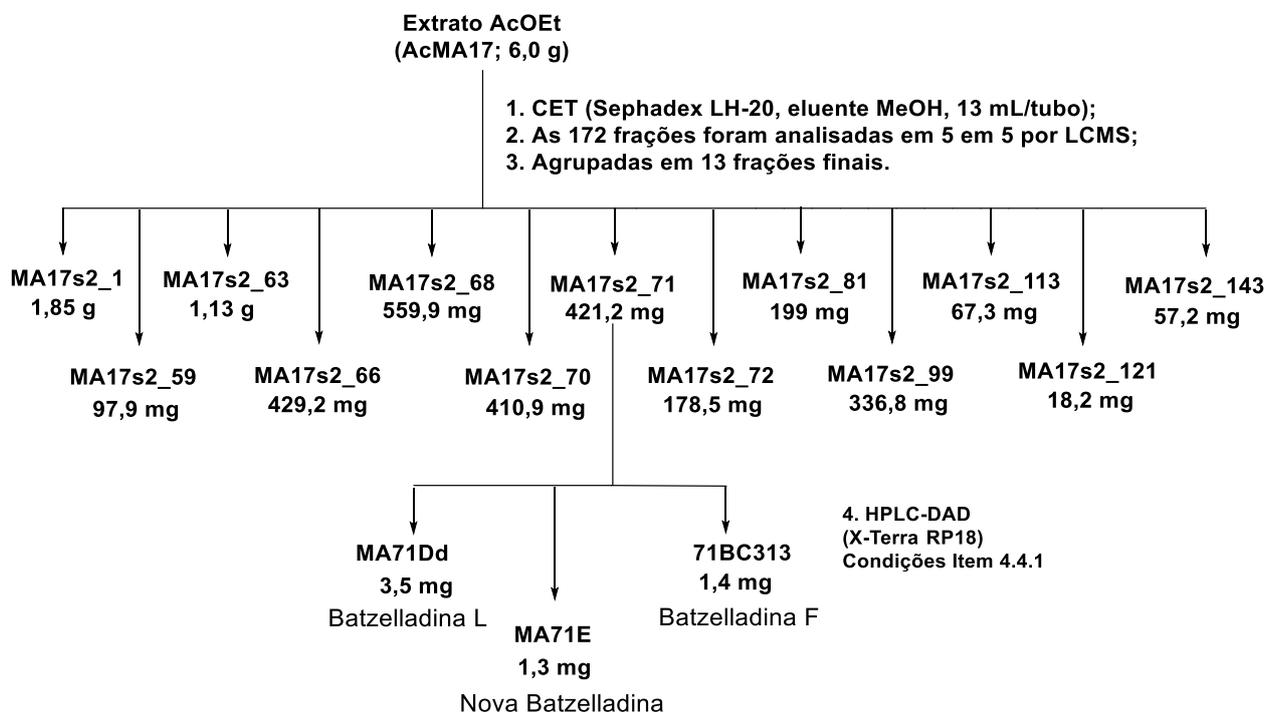


Figura 6. Fluxograma do 2º e 3º fracionamento da fração AcMA17 por cromatografia de exclusão por tamanho (CET).



4.2.2. Fracionamento por cromatografia em coluna DIOL

Constatada a complexidade elevada da fração AcMA17 apresentando alcaloides, com grande distribuição de picos cromatográficos de massas moleculares próximas e com baixa resolução cromatográfica, buscou-se condições alternativas para a separação destes compostos, para que pudessem ser obtidos em maior quantidade (item 4.4.2). O uso das colunas de sílica funcionalizada com grupo diol são primariamente empregadas em aplicações que exigem alto desempenho com princípio de separação de exclusão por tamanho (SMITH e COOPER, 1987).

Assim, foi realizado um fracionamento da mesma fração em coluna contendo fase estacionária DIOL de maneira a ser comparada com a separação realizada em Sephadex-LH20 anteriormente. A escolha da fase estacionária DIOL foi embasada por esta ter sido previamente utilizada no protocolo desenvolvido pelo Dr. Mario Ferreira Conceição Santos durante o seu doutorado (SANTOS, 2014). Para tanto, utilizou-se uma alíquota de 200 mg da fração AcMA17, adsorvida em celite aplicada na coluna DIOL pré-empacotada.

A separação foi realizada em modo normal, com as fases móveis indicadas na tabela 1, sendo a Solução A: 90% hexano + 10% CH₂Cl₂ e a Solução B: 90% AcOEt + 10% MeOH. A cromatografia foi desenvolvida coletando-se 10 tubos para cada eluente contendo aproximadamente 8 mL de volume, totalizando 110 tubos de 8 mL cada. Após a separação, as frações foram evaporadas, alíquotadas e analisadas por HPLC-MS-UV-ELSD.

Tabela 1. Fases móveis preparadas a partir das soluções A (Hexano:CH₂Cl₂, 9:1) e B (AcOEt:MeOH, 9:1).

Proporção A:B	%A	%B	Tubos coletados
100% A	100	0	1-10
19:1 A:B	95	5	11-20
18:2 A:B	90	10	21-30
17:3 A:B	85	15	31-40
16:4 A:B	80	20	41-50
15:5 A:B	75	25	51-60
14:6 A:B	70	30	61-70
13:7 A:B	65	35	71-80
12:8 A:B	60	40	81-90
11:9 A:B	55	45	91-100
1:1 A:B	50	50	101-110

Tabela 2. Frações agrupadas a partir de seus respectivos perfis cromatográficos (Disponíveis no Anexo).

Fração obtida	Tubos	Critério utilizado	Proporção A:B
DiOH1	1-2	<i>m/z</i> ⁺ 672 e tr 22,84'	100% A
DiOH2	3-10	<i>m/z</i> ⁺ 300-350 e tr 15'	100% A
DiOHF3	11-15	<i>m/z</i> ⁺ 300-350 e tr 20'	19:1 A:B
DiOH4A	16-25	<i>m/z</i> ⁺ 230-250 e tr 15'	(19:1 + 18:2) A:B
DiOH4B	26-30	-	18:2 A:B
DiOH4C	31-40	-	17:3 A:B
DiOH4D	41-52	-	(16:4 + 15:5) A:B
DiOH5A	53-65	<i>m/z</i> 181, <i>m/z</i> ⁺ 205 e tr 3'	(15:5 + 14:6) A:B
DiOH5B	66-76	<i>m/z</i> 181, <i>m/z</i> ⁺ 205 e tr 3'	(15:5 + 14:6) A:B
DiOH5C	77-90	<i>m/z</i> 181, <i>m/z</i> ⁺ 205 e tr 3'	(13:7 + 12:8) A:B
DiOH5D	91-110	<i>m/z</i> 181, <i>m/z</i> ⁺ 205 e tr 3'	(11:9 + 1:1) A:B

Tabela 3. Balanço de massa das frações obtidas, após agrupamento por semelhança.

Fração	m (g)	Tubos
DiOH1	0,0039	1-2
DiOH2	0,0930	3-10
DiOHF3	0,0235	11-15
DiOHF4	0,0377	16-52
DiOHF5	0,0103	53-110
Recuperação	0,1684	84,19 %

4.3. Caracterização das frações por HPLC-DAD-ELSD-MS

4.3.1. Frações obtidas utilizando CET por Sephadex LH-20

Os cromatogramas e os espectros de massas das frações foram registrados por HPLC-DAD-ELSD-MS e encontram-se na seção ANEXOS.

Após analisadas e agrupadas por semelhança, as frações foram secas e as massas determinadas, encontrando-se descritas nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Distribuição das massas das frações após a 1ª separação por CET do extrato AcMA17.

Frações	Agrupamento	Massa
AcMA17_1	01-42	223,8 mg
AcMA17_43	43-60	1517,7 mg
AcMA17_61	61-64	266 mg
AcMA17_64	65-67	68,8 mg
AcMA17_68	69-71	41,1 mg
AcMA17_72	72-104	315,3 mg
AcMA17_105	105-120	53,6 mg
AcMA17_121	121-126	7,5 mg
AcMA17_127	127-136	5 mg
AcMA17_137	137-165	20,2 mg
	Total	2520 mg

Tabela 5. Distribuição das massas das frações após as 2ª e 3ª separação da fração AcMA17 por CET.

Frações	Agrupamento	Massa
MA17s2_1	1-58	1,8564 g
MA17s2_59	59-62	97,9 mg
MA17s2_63	63-65	1,1259 g
MA17s2_66	66-67	429,2 mg
MA17s2_68	68-69	559,9 mg

MA17s2_70	70	410,9 mg
MA17s2_71	71	421,2 mg
MA17s2_72	72-80	178,5 mg
MA17s2_81	81-98	199 mg
MA17s2_99	99-112	336,8 mg
MA17s2_113	113-120	67,3 mg
MA17s2_121	121-142	18,2 mg
MA17s2_143	143-172	57,2 mg
Total		5,74 g

As frações foram então desreplicadas utilizando-se análise comparativa dos dados analíticos obtidos por HPLC-DAD-MS-ELSD com dados da literatura.

Íons moleculares protonados $[M+H]^+$, sodiados $[M+Na]^+$ e íons fragmento dos compostos de interesse (alcaloides guanidínicos) foram localizados e identificados. Compostos de interesse foram observados nas frações Ma71s2_71 (424,2 mg) e AcMa17_43 (1517,7 mg).

Figura 7. Cromatograma da amostra MA17s2_71 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm. Condições cromatográficas: vide item 3.1.1.

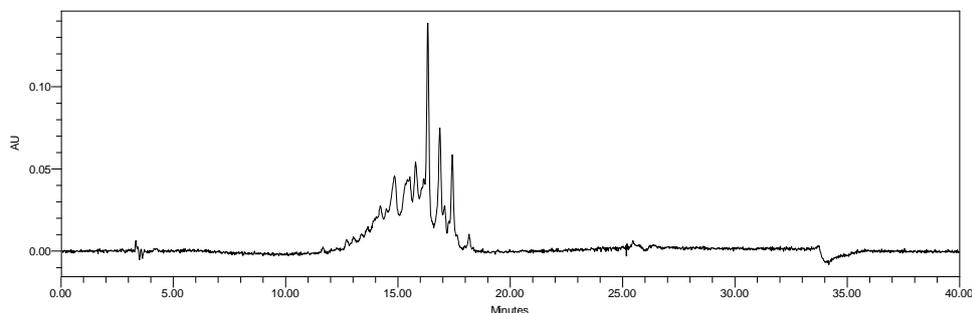


Figura 8. Cromatograma da amostra MA17s2_71 por HPLC-ELSD. Condições cromatográficas: vide item 3.1.1.

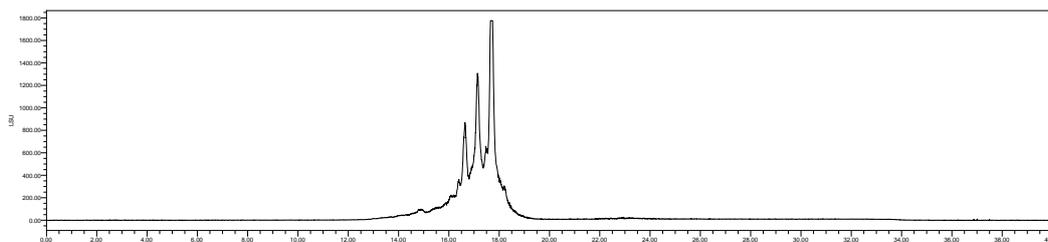


Figura 9. Cromatograma de íons totais da amostra MA17s2_71 por HPLC-MS. Condições cromatográficas: vide item 3.1.1.

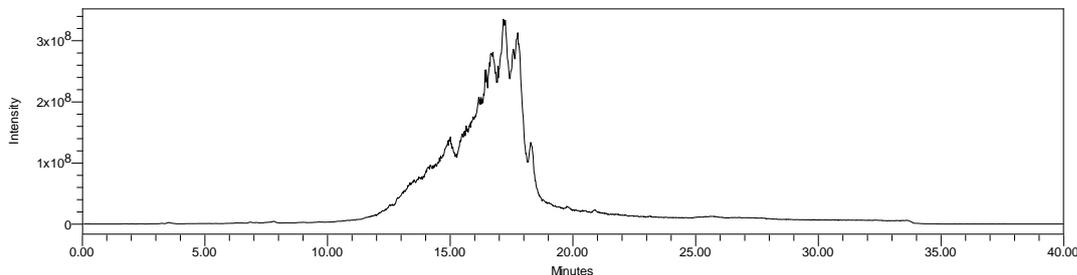


Figura 10. Espectro de ESI-MS em modo positivo da amostra MA17s2_71, TR = 17,2'.

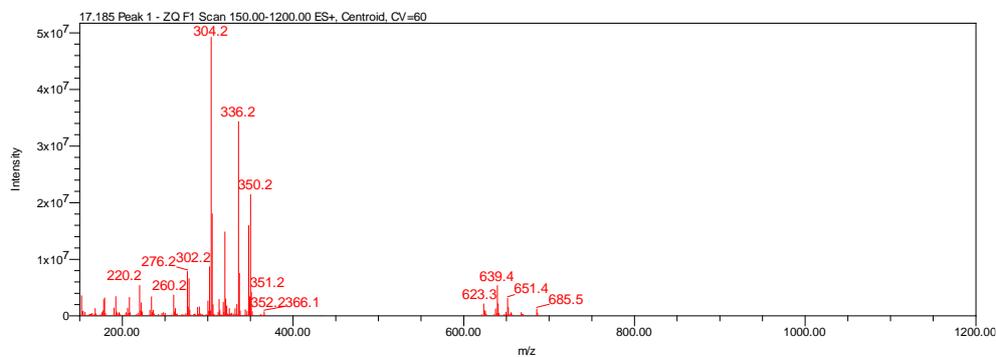


Figura 11. Cromatograma da amostra AcMA17_43 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm. Condições cromatográficas: vide item 3.1.1.

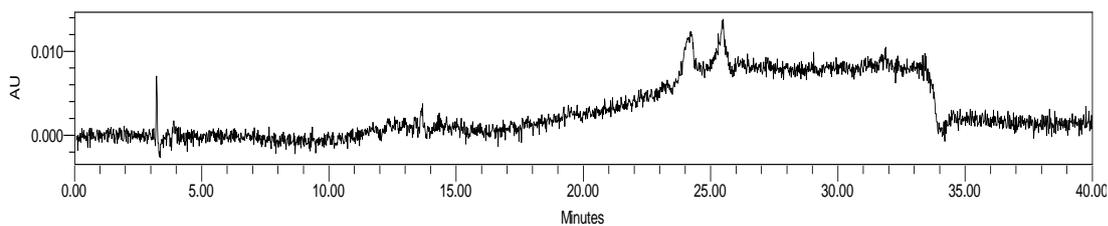


Figura 12. Cromatograma da amostra AcMA17_43 por HPLC-ELSD. Condições cromatográficas: vide item 3.1.1.

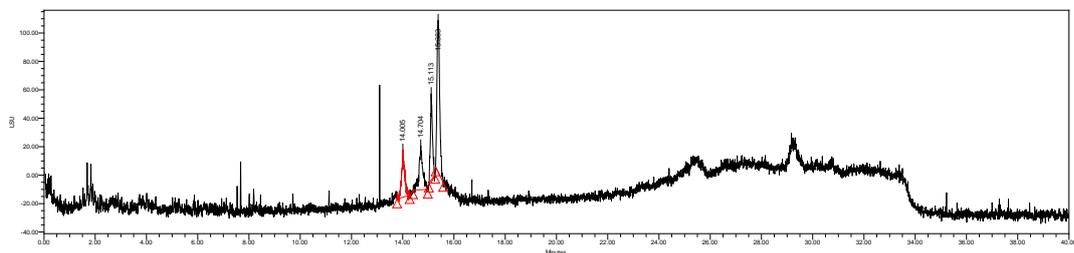


Figura 13. Cromatograma de íons totais da amostra AcMA17_43 por HPLC-MS. Condições cromatográficas: vide item 3.1.1.

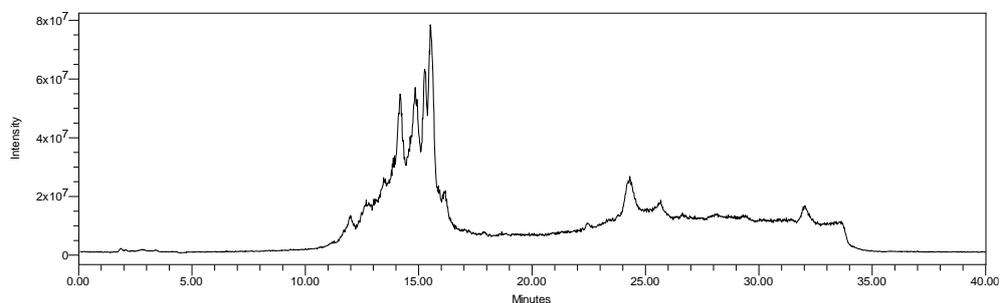
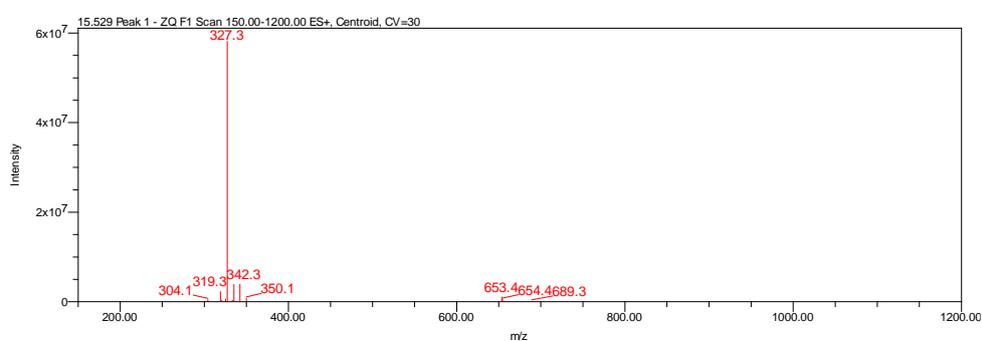


Figura 14. Espectro de ESI-MS em modo positivo da amostra AcMA17_43, TR = 15,5'.



4.3.2. Frações obtidas utilizando cromatografia em coluna com fase estacionária DIOL

Observou-se que a fração DiOH2 foi a de maior massa e que esta fração contém uma mistura complexa de várias substâncias que apresentam picos nos seus respectivos espectros de massas na faixa das batzelladinas (300-350, para íons do tipo $[M+2H]^{2+}$), mas que apresentam uma separação cromatográfica pouco satisfatória. Os alcaloides presentes nestas frações apresentaram caráter apolar, tendo ficado pouco retidas na coluna DIOL, uma vez que foram eluídas da coluna com hexano:CH₂Cl₂ 90:10.

Figura 15. Cromatograma da amostra DiOH2_Tubo_3 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm. Para condições cromatográficas, ver parte experimental, item 3.1.1.

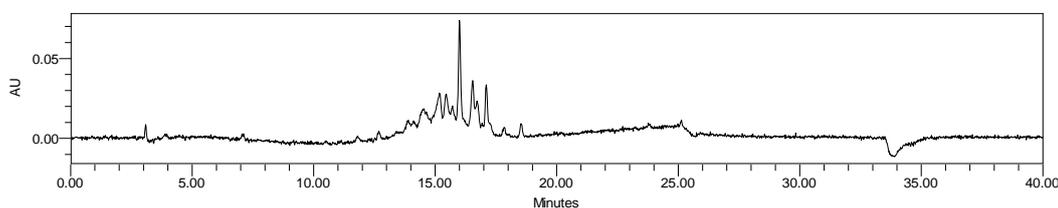


Figura 16. Cromatograma de íons totais da amostra DiOH2_Tubo_3 por HPLC-MS. Para condições cromatográficas, ver parte experimental, item 3.1.1.

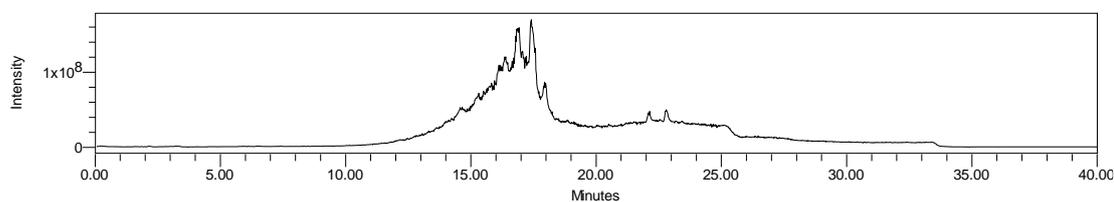


Figura 17. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra DiOH2_Tubo_3, TR = 17,4'.

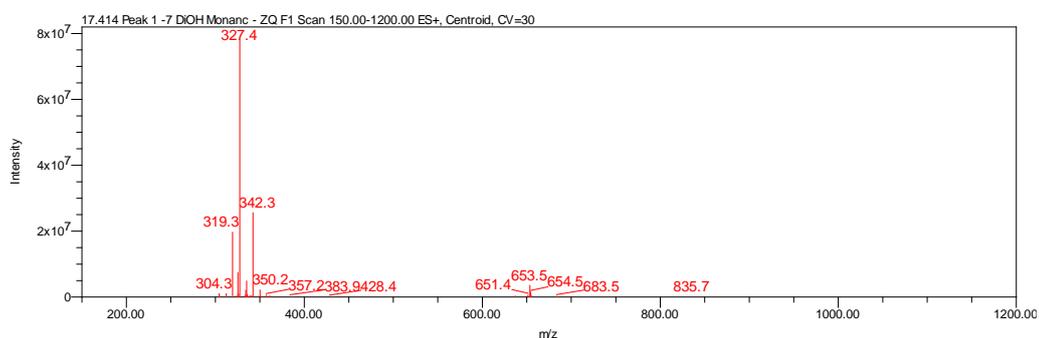


Figura 18. Cromatograma da amostra DiOH2_Tubo_5 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm. Para condições cromatográficas, ver parte experimental, item 3.1.1.

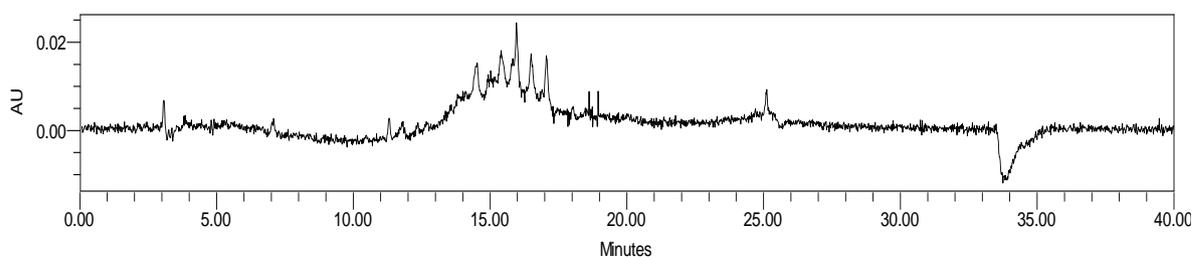


Figura 19. Cromatograma de íons totais da amostra DiOH2_Tubo_5 por HPLC-MS. Para condições cromatográficas, ver parte experimental, item 3.1.1.

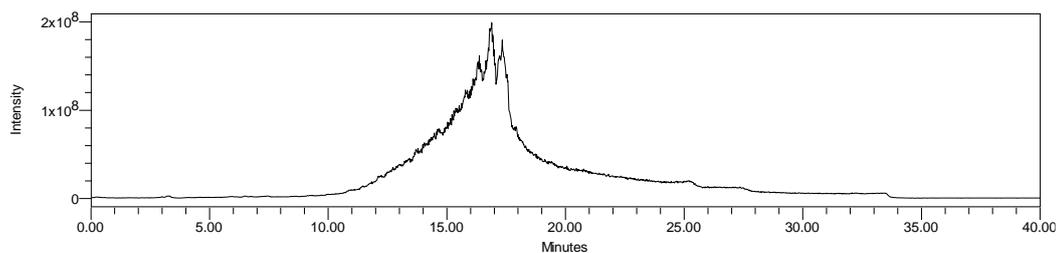


Figura 20. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra DiOH2_Tubo_5, TR = 16,9'.

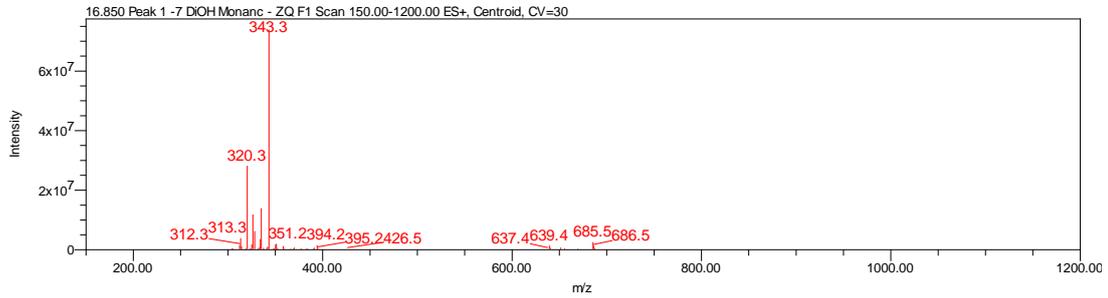


Figura 21. Cromatograma da amostra DiOH2_Tubo_10 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm. Para condições cromatográficas, ver parte experimental, item 3.1.1.

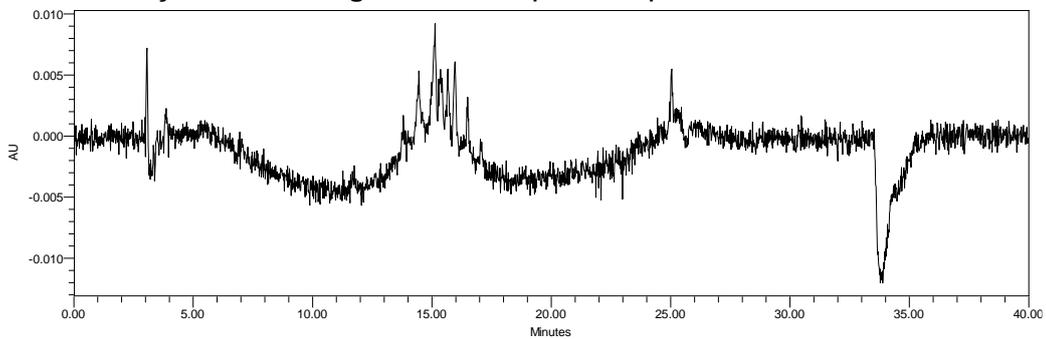


Figura 22. Cromatograma de íons totais da amostra DiOH2_Tubo_10 por HPLC-MS. Para condições cromatográficas, ver parte experimental, item 3.1.1.

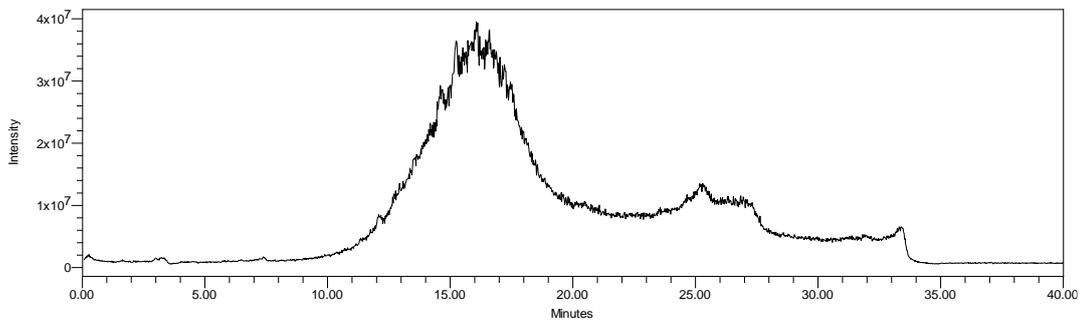


Figura 23. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra DiOH2_Tubo_10, TR = 16,1'.

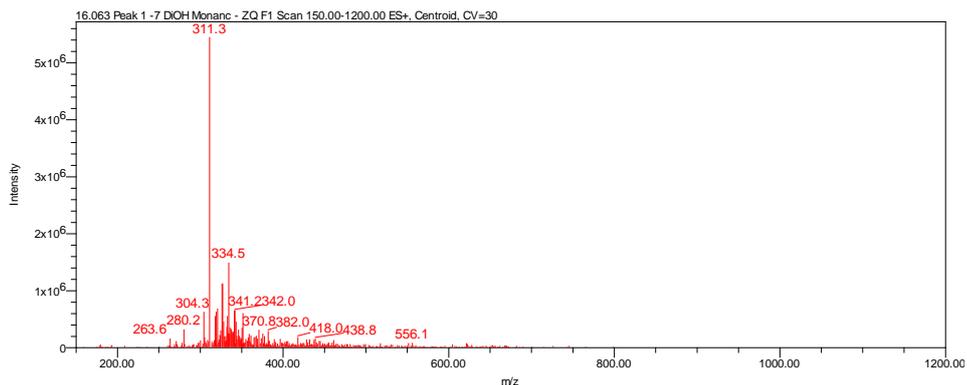


Figura 24. Cromatograma da amostra DiOH2_Tubo_15 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm. Para condições cromatográficas, ver parte experimental, item 3.1.1.

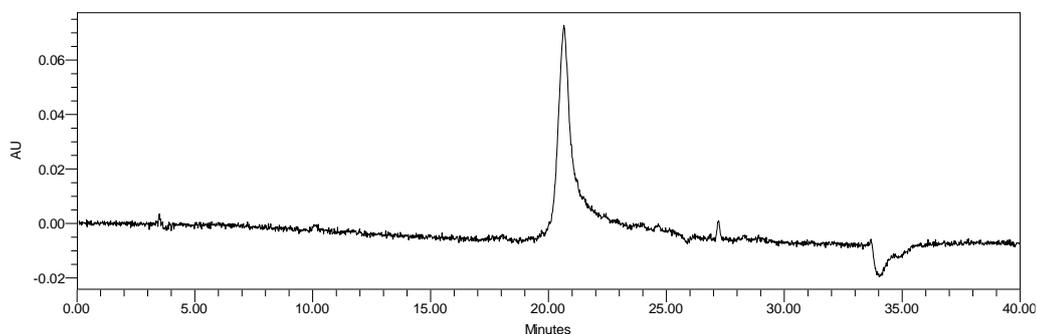


Figura 25. Cromatograma de íons totais da amostra DiOH2_Tubo_15 por HPLC-MS. Para condições cromatográficas, ver parte experimental, item 3.1.1.

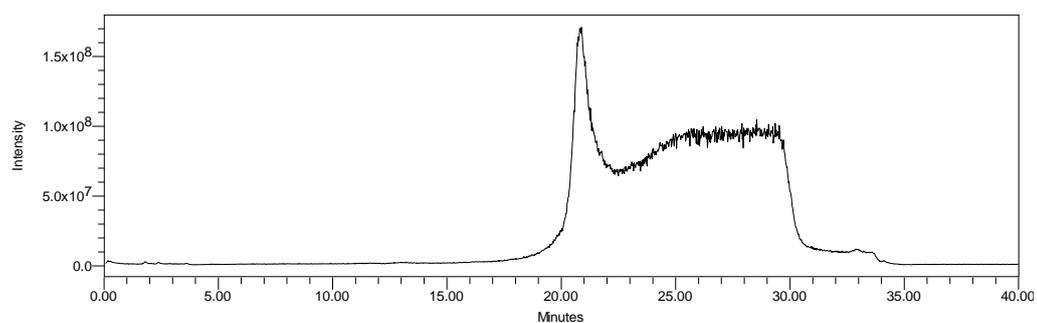
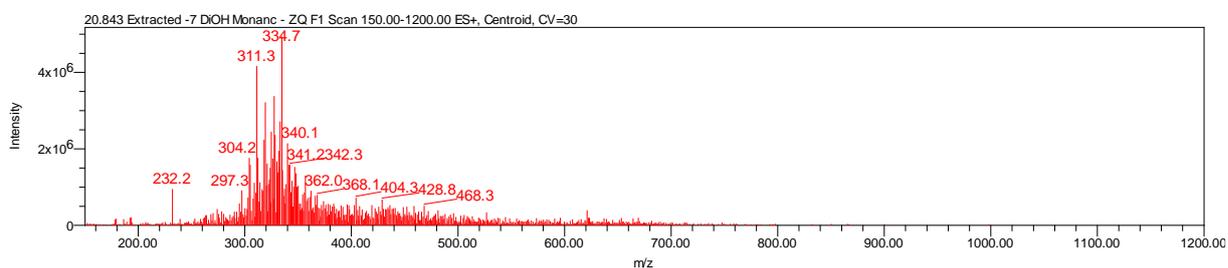


Figura 26. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra DiOH2_Tubo_15, TR = 20,8'.



A separação por cromatografia em coluna DIOL não se mostrou melhor do que a separação por cromatografia em coluna de Sephadex LH20, mas bastante semelhante, com os possíveis compostos de interesse presentes em misturas também complexas (Figura 20, 23 e 26). Desta forma, as purificações por HPLC foram realizadas com as amostras AcMa17_43 e Ma17s2_71, obtidas do fracionamento da fração AcMA17 por cromatografia em coluna de Sephadex LH20.

4.4. Purificação dos alcaloides batzelladínicos por HPLC-UV preparativo

4.4.1. Purificação do composto majoritário batzelladina L e composto minoritário (m/z 651) a partir de Ma17s2_71

Para a purificação da fração Ma17s2_71 por HPLC-UV inicialmente foi utilizada uma coluna X-terra (Waters® C18, 7,8 × 150 mm, 5 µm), com uma vazão de 2,5 mL/min de fase móvel MeOH/MeCN 1:1 em modo gradiente. O gradiente utilizado foi de 40-70% da mistura (MeOH/MeCN 1:1):H₂O durante 20 minutos, monitorando-se em 215 nm. A partir deste fracionamento foram obtidas duas frações, MA71Dd (3,5 mg) e MA71E (1,3 mg), posteriormente identificadas como a batzelladina L e um composto possivelmente inédito.

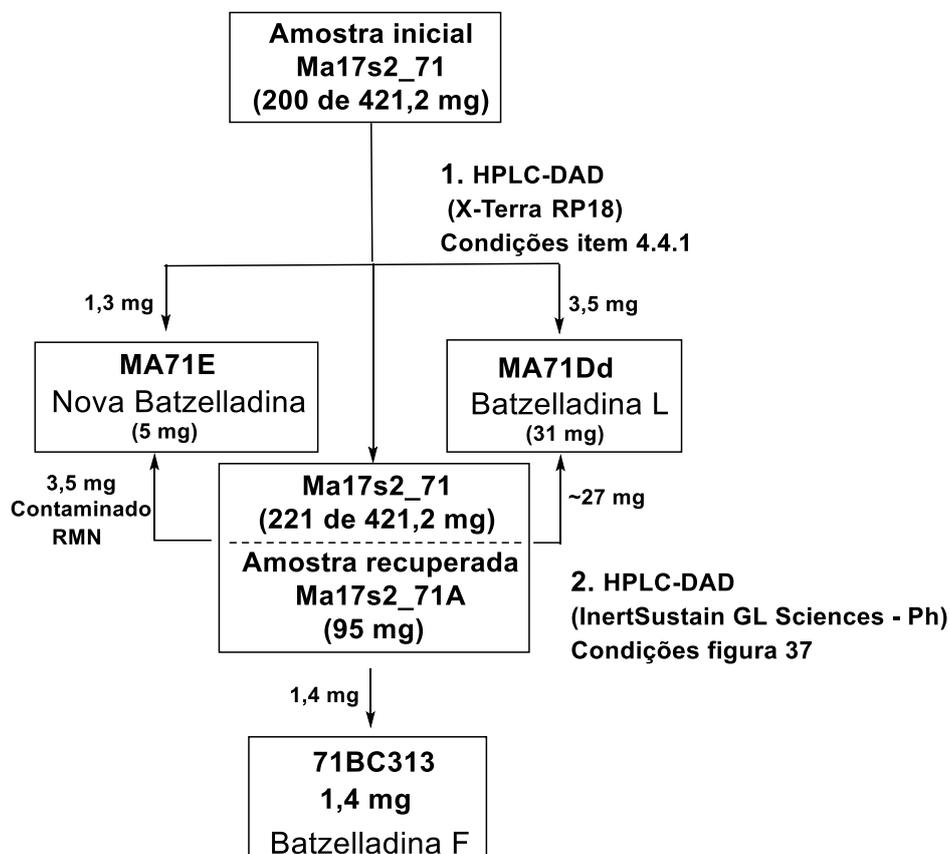
A separação cromatográfica foi desenvolvida consumindo 200 mg da fração Ma17s2_71 de um total de 421,2 mg e acumulando as substâncias MA71Dd (3,5 mg) e MA71E (1,3 mg), que foram analisadas por RMN. O restante da fração (220 mg) foi esgotado após a identificação das substâncias e da confirmação de suas purezas na mesma condição cromatográfica descrita acima, ainda acumulando os compostos de interesse, mas monitorando os seus tempos de retenção e recuperando o restante da amostra, identificada por Ma17s2_71A até o total consumo das amostras (Figura 27).

Com a massa da fração recuperada, Ma17s2_71A de 95 mg, foram empregados 20 mg em testes para desenvolver uma condição cromatográfica otimizada, descrita no item 4.4.2. Os 75 mg restantes foram consumidos obtendo mais batzelladina L na condição desenvolvida no item 4.42 para verificar sua eficácia. Ao final dos experimentos, foi acumulado 31 mg da batzelladina L (discutida no item 4.5.1., vide Figura 27).

A amostra do composto MA71E obtida de Ma17s2_71A foi contaminada na etapa de análise de RMN e perdida em tentativas de repurificação, onde ocorreu a perda da sensibilidade do detector UV, em momento anterior a queima da lâmpada.

A amostra 71BC313 foi obtida da recuperação da amostra Ma17s2_71A, sua análise por RMN e HPLC-UV-MS resultou na identificação do composto batzelladina F. Discutida no item 4.5.3.

Figura 27. Fluxograma do fracionamento da fração Ma17s2_71 e Ma17s2_71A por HPLC-UV.



Este fluxograma ilustra os compostos obtidos/acumulados nos experimentos exploratórios realizados com a amostra Ma17s2_71 e de sua massa recuperada Ma17s2_71A.

4.4.2. Desenvolvimento e otimização de método cromatográfico para obtenção de batzelladina L em maior quantidade para ensaios *in vivo*

4.4.2.1. Comparativo entre detectores ELSD vs UV (208 nm), redução da vazão de 2.5 mL/min para 1.0 mL/min.

Após as primeiras análises para separação e isolamento da batzelladina L a partir da mistura de alcaloides presentes na fração Ma17s2_71, foi realizado um estudo detalhado das condições cromatográficas objetivando desenvolver uma condição de separação melhorada para o fracionamento de 1,5 g da fração AcMa17_43.

Utilizou-se 20 mg da amostra Ma17S2_71A para estudar o comportamento cromatográfico das substâncias da classe de interesse sob diferentes condições de separação.

Foram avaliados:

- a) A utilização dos detectores ELSD e UV (208 nm).
- b) Vazão de eluente de 2,5 mL/min e 1,0 mL/min, e comparativo entre Ma17s2_71 e Ma17s2_71A.
- c) Diferentes fases estacionárias, C18, C8 e Ph, em colunas de HPLC.
- d) Acidificação das fases móveis com ácido fórmico ou ácido trifluoroacético.

Figura 28. Cromatograma de separação da fração Ma17s2_71A (Recuperação). Condições: Gradiente 40 até 70% (MeOH/MeCN 1:1):H₂O acidificado com 0,1% ácido fórmico, coluna Waters X-terra C18 (7,8 × 150 mm, 5 μm); vazão de 2,5 mL/min; detecção: UV 208 nm; tempo de corrida cromatográfica: 20 minutos. Ampliação na Figura 33.

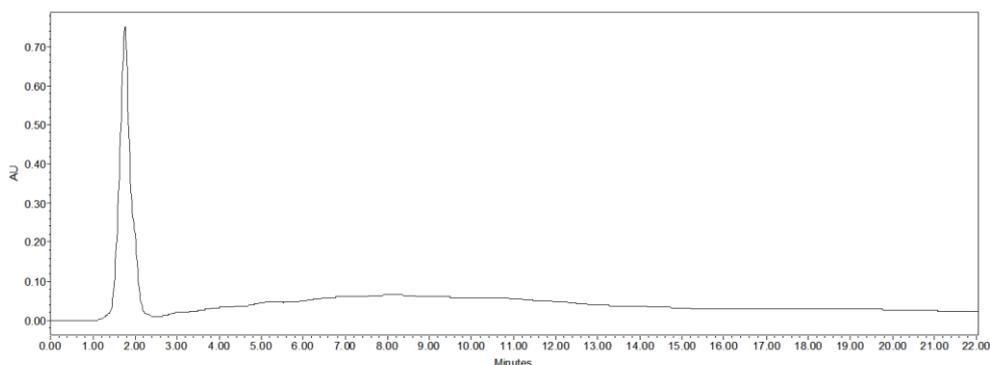


Figura 29. Cromatograma de separação da fração Ma17s2_71A (Recuperação). Condições: Gradiente 40 até 70% (MeOH/MeCN 1:1):H₂O acidificado com 0,1% ácido fórmico, coluna Waters X-terra C18 (7,8 × 150 mm, 5 μm); vazão de 2,5 mL/min; detecção: ELSD; tempo de corrida cromatográfica: 20 minutos.

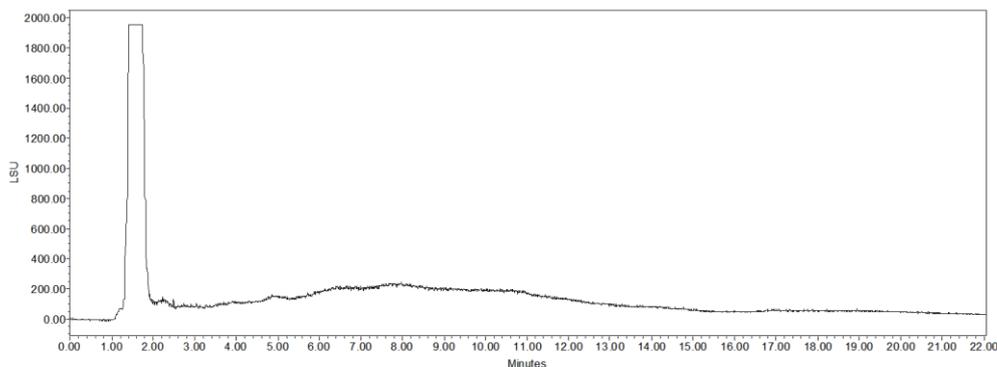


Figura 30. Cromatograma de separação da fração Ma17s2_71A (Recuperação). Condições: Gradiente 40 até 60% (MeOH/MeCN 1:1):H₂O acidificado com 0,1% ácido fórmico, coluna Waters X-terra C18 (7,8 × 150 mm, 5 μm); vazão de 1,0 mL/min; detecção: UV 208 nm; tempo de corrida cromatográfica: 40 minutos.

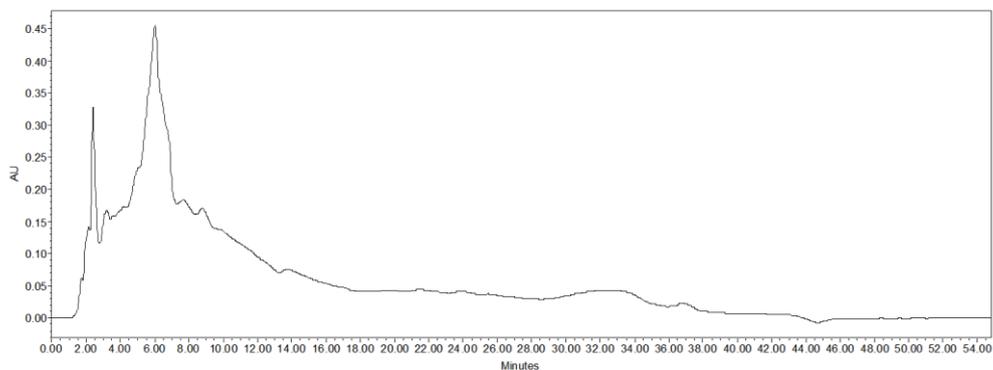


Figura 31. Cromatograma de separação da fração Ma17s2_71 (Inicial). Condições: Gradiente 40 até 60% (MeOH/MeCN 1:1):H₂O acidificado com 0,1% ácido fórmico, coluna Waters X-terra C18 (7,8 × 150 mm, 5 μm); vazão de 1,0 mL/min; detecção: UV 208 nm; tempo de corrida cromatográfica: 40 minutos.

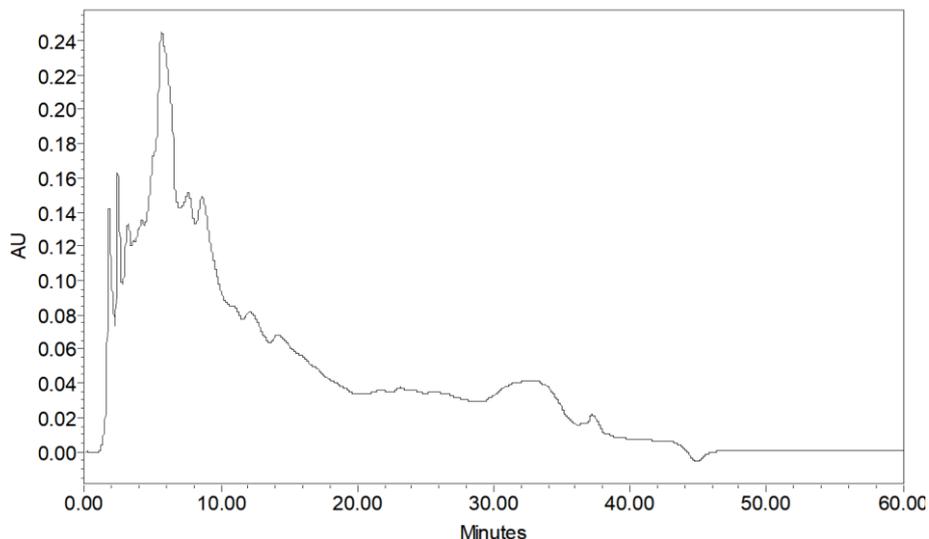
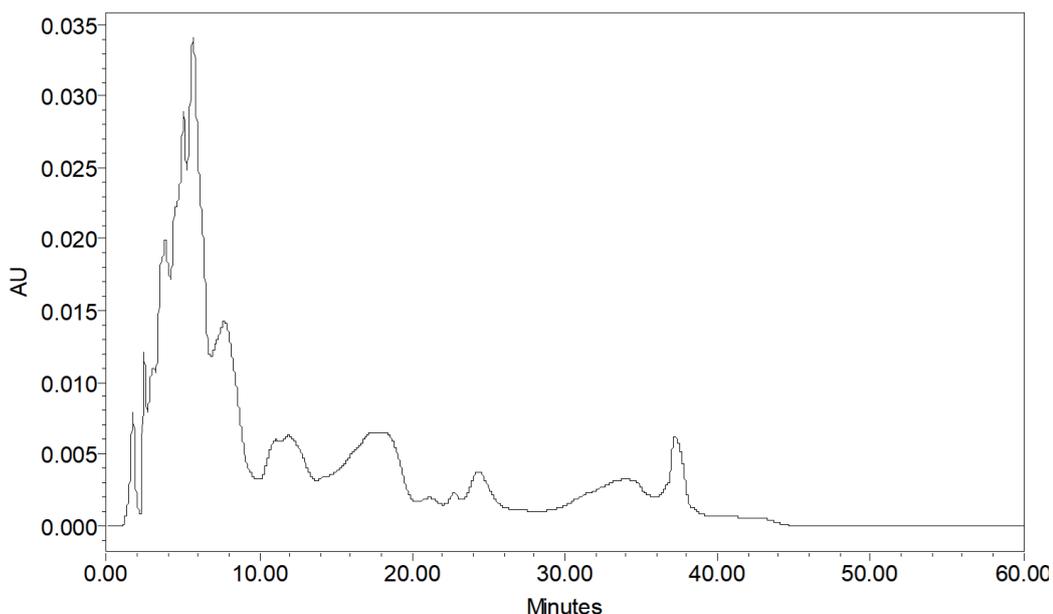


Figura 32. Cromatograma de separação da fração Ma17s2_71 (Inicial). Condições: Gradiente 40 até 60% (MeOH/MeCN 1:1):H₂O acidificado com 0,1% ácido fórmico, coluna Waters X-terra C18 (7,8 × 150 mm, 5 μm); vazão de 1,0 mL/min; detecção: UV 300 nm; tempo de corrida cromatográfica: 40 minutos



A sensibilidade dos detectores ELSD e UV foi avaliada e discutida na dissertação do Dr. Mario Ferreira Conceição Santos (SANTOS, *et al.*, 2015). O detector de

espalhamento de luz evaporativo (ELSD) apresentou melhor sensibilidade para os alcaloides majoritários, porém com a desvantagem de consumir a amostra, exigindo uso de espalhador de fluxo no sistema cromatográfico.

Os cromatogramas das figuras 28 e 29 ilustram o comportamento cromatográfico dos alcaloides de interesse utilizando detectores de ELSD (figura 28) e UV, com monitoramento em 208 nm (figura 28). Foi observado e reportado anteriormente que os alcaloides guanidínicos minoritários desta esponja apresentam baixa sensibilidade em detecção por UV por apresentarem cromóforos de baixa absorção no UV, ou nenhum cromóforo. Porém, o detector ELSD também apresentou baixa sensibilidade para a detecção destas amostras, além de ser um detector destrutivo. A utilização da detecção por ELSD consome cerca de 1/3 da amostra, separada por um separador de fluxo (split) no sistema cromatográfico. Por isso, optou-se em utilizar somente o detector de UV para o monitorar as separações cromatográficas dos alcaloides guanidínicos da esponja *Monanchora* sp.

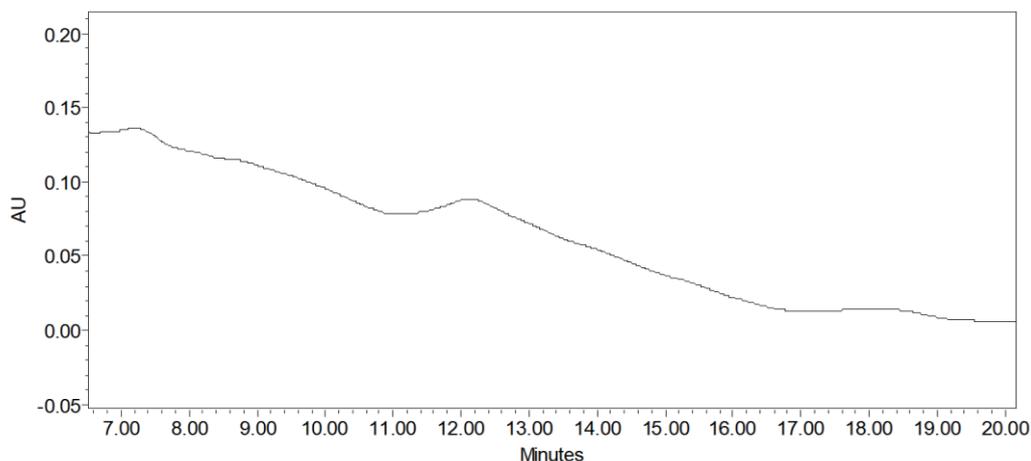
A figura 30, evidencia que foi possível reduzir o final do gradiente para 60% de fase orgânica (MeOH/MeCN 1:1), o que possibilitou a interação por mais tempo entre as fases móveis e estacionárias para cada incremento de 1% do gradiente, sem ocorrer perda da eluição do composto menos polar (último pico). A eluição do último pico da corrida cromatográfica mudou de 18-20 para 38-40 minutos com a redução do fluxo de 2,5 mL/min para 1,0 mL/min (comparativamente figuras 28 e 30, ou figuras 30 com 33 - ampliação).

Observou-se que o pico cromatográfico inicial desta fração, e que eluia entre 1-2 minutos, passou a eluir dentro de um intervalo de 1-10 minutos de corrida cromatográfica (figura 30). Esta mudança possibilitou observar a complexidade inicialmente da amostra e também estudar a retenção dos compostos presentes por análise em coluna de HPLC com fase estacionária C18.

Sob as novas condições cromatográficas empregadas, os picos referentes aos compostos Ma71Dd e Ma71E tiveram seus tempos de retenção alterados de 12-13 minutos e 18 minutos, respectivamente, para 32-33 minutos e 37-38 minutos, respectivamente (figura 33 em comparação com a figura 30).

Figura 33. Cromatograma ampliado de Ma17s2_71A, Gradiente 40 até 70% solvente orgânico (MeOH:MeCN 1:1):H₂O, fase estacionária C18, coluna X-terra (Waters – C18,

7,8 × 150 mm, 5 µm), com vazão de 2,5 mL/min, UV 208 nm, duração 20 minutos. Zoom na região de eluição dos compostos Ma71Dd e Ma71E. Ampliação da Figura 28.



Recuperando os compostos da fração Ma17s2_71A que saíam entre 1-10 minutos, obteve-se uma fração bastante enriquecida do composto 71BC313 (figura 27), que foi avaliada e discutida posteriormente (Item 4.5.3).

A eluição da amostra Ma17s2_71A também foi avaliada em outras colunas preenchidas com outras fases estacionárias (C8 e Ph), com o objetivo de tentar distribuir melhor os picos presentes ao longo do tempo de corrida cromatográfica.

4.4.2.2. Comparativo entre fases estacionárias C18 e C8, sensibilidade no detector UV em comprimentos de onda 265, 300 e 205, e uso de ácido fórmico ou ácido trifluoroacético 0.1% para acidificação da fase móvel MeCN

Nestas condições observou-se que nos comprimentos de onda 265 e 300 nm a sensibilidade é maior para os compostos que eluem em tempos de retenção maiores, inversamente do observado para 208 nm (Figuras 34 e 35).

Também, verificou-se a pequena influência com relação à seletividade da separação cromatográfica ao alterar de 0,1% ácido fórmico (pKa = 3,77) para 0,1% ácido trifluoroacético (pKa 0,23). (Figuras 35 e 36).

Figura 34. Cromatograma de separação da fração Ma17s2_71A. Condições: Gradiente 25 até 70% (MeOH/MeCN 1:1) acidificada com 0,1% de ácido fórmico, fase estacionária

C8 coluna InertSustain (GL Sciences Inc – C8, 4,6 × 250 mm, 5 µm); com vazão de 1,0 mL/min; detecção: UV 300 nm; tempo de corrida cromatográfica: 40 minutos

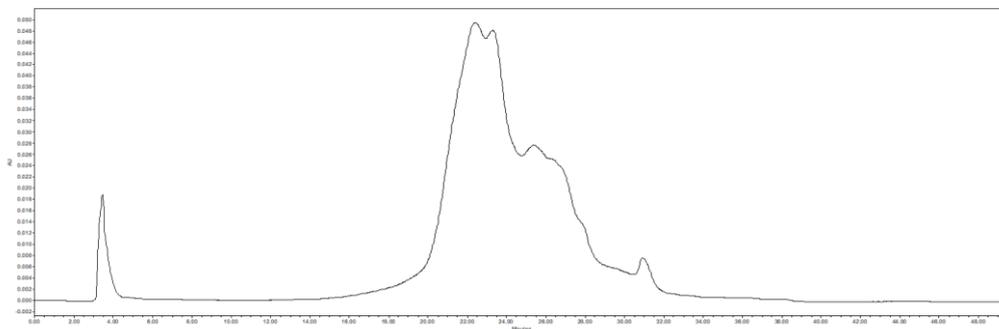


Figura 35. Cromatograma de separação da fração Ma17s2_71A. Condições: Gradiente 15 até 50% de MeCN acidificada com 0,1% de ácido fórmico, fase estacionária C8 coluna InertSustain (GL Sciences Inc – C8, 4,6 × 250 mm, 5 µm); com vazão de 1,0 mL/min; detecção: UV 265 nm; tempo de corrida cromatográfica: 40 minutos

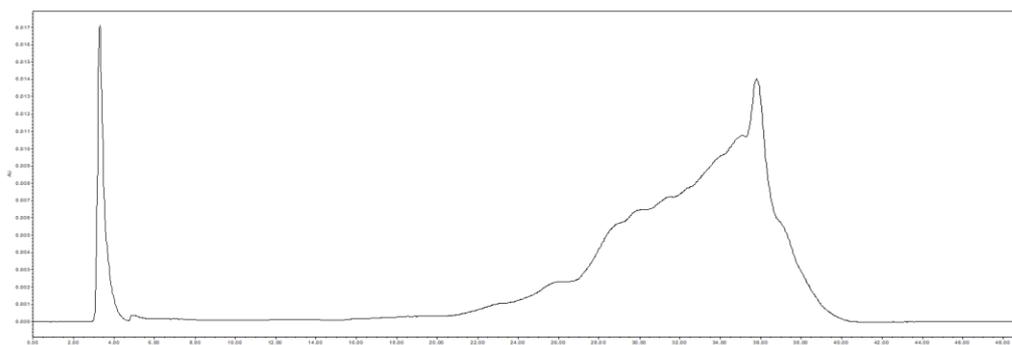
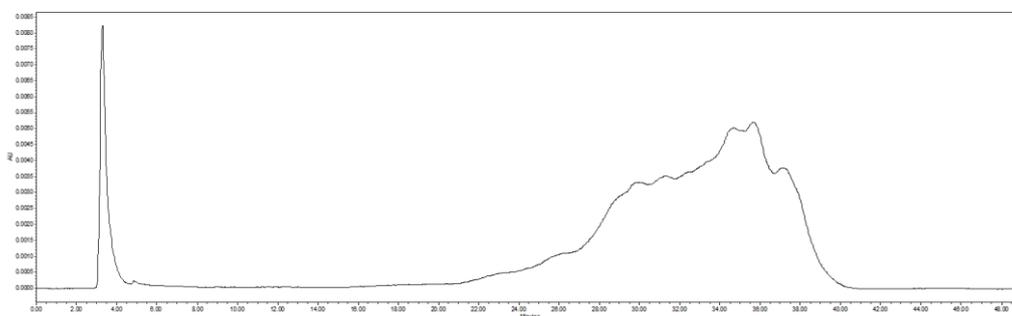


Figura 36. Cromatograma de separação da fração Ma17s2_71A. Condições: Gradiente 15 até 50% de MeCN acidificada com 0,1% de ácido tricloroacético, fase estacionária C8 coluna InertSustain (GL Sciences Inc – C8, 4,6 × 250 mm, 5 µm); com vazão de 1,0 mL/min; detecção: UV 265 nm; tempo de corrida cromatográfica: 40 minutos



Para as comparações de separação cromatográfica utilizando-se colunas C18, C8 e Ph, procurou-se utilizar colunas de mesmas dimensões. Apesar de a coluna X-terra C18 utilizada inicialmente possuir diâmetro maior, seu comprimento é menor, e o volume interno e diâmetro de partícula é bastante comparável entre as três colunas analisadas, de modo que as colunas apresentam quantidades próximas de fases estacionárias em seu interior. As colunas C8 e Ph apresentam diâmetro da coluna, diâmetro de partícula e comprimento da coluna equivalentes.

Foi observada uma maior retenção dos alcaloides em coluna C8 do que em coluna C18. Utilizando-se a coluna C8 os picos cromatográficos passaram a eluir com tempos de retenção próximos à metade da duração da corrida cromatográfica (20 min), (Figura 34 vs com condição inicial em C18). Utilizando-se metade da proporção de MeCN o tempo de retenção e o perfil cromatográfico ficou comparável, demonstrando maior força de eluição da fase móvel MeCN quando comparada à mistura 1:1 MeCN:MeOH (Figura 36), sem apresentar ganhos significativos na resolução comparativamente para as colunas avaliadas. Análise análoga foi desenvolvida utilizando-se uma coluna com fase estacionária contendo sílica-gel derivatizada com grupos fenila (Figura 37).

Objetivando-se minimizar o efeito observado da variação do gradiente que altera a linha de base dos cromatogramas, principalmente quando as concentrações das amostras e volumes de injeção foram pequenos, passou-se a adotar um padrão de eluição do tipo “escada”, com períodos de eluição sob condições isocráticas, alterando-se a composição dos “plateaus” com uma variação rápida da composição do eluente, em modo gradiente, de duração de 1 minuto. Desta forma, procurou-se verificar se nos “plateaus” de condições isocráticas não ocorreria variação da linha de base, o que provocava dúvida se algum alcaloide estaria sendo eluído, ou se apenas ocorria variação da linha de base, isso porque os picos cromatográficos dos alcaloides são alargados e pouco definidos.

Os testes realizados indicaram melhora na resolução dos picos cromatográficos adotando-se a estratégia “plateaus” + intervalos de gradientes rápidos (Figura 37). A melhor separação cromatográfica dos alcaloides foi observada utilizando-se coluna Ph e fase móvel MeCN/H₂O, sem a inclusão de MeOH.

Após sucessivos testes variando-se a composição da mistura MeCN/H₂O, a melhor condição de separação cromatográfica obtida é aquela apresentada na figura 37.

Um exemplo de separação obtida utilizando esta condição de separação é ilustrada na figura 38. O fracionamento detalhado foi discutido e registrado na tabela 8 no item 4.4.3.2.

Figura 37. Condição cromatográfica melhorada para a separação doas alcaloides presentes na fração Ma17s2_71A. Condições: coluna Ph Inertsustain (GL – Sciences Inc 4,6 × 250 mm, 5 µm); composição do eluente: MeCN/H₂O 25:75 até 3 min.; MeCN/H₂O 30:70 de 4 a 7 min; MeCN/H₂O 35:65 de 8 a 11 min; MeCN/H₂O 40:60 de 12 a 20 min; MeCN/H₂O 60:40 de 21 a 30 min; retorno à condição cromatográfica inicial e recondi-
onamento em MeCN/H₂O 25:75 entre 31 e 40 min.

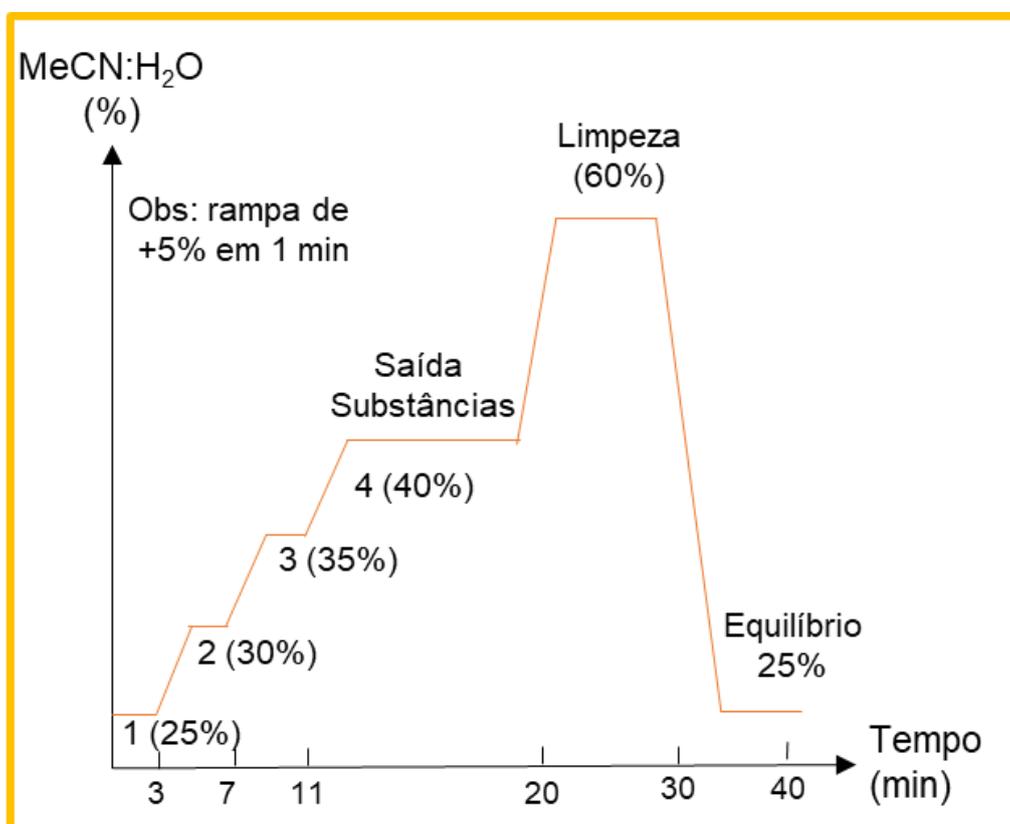
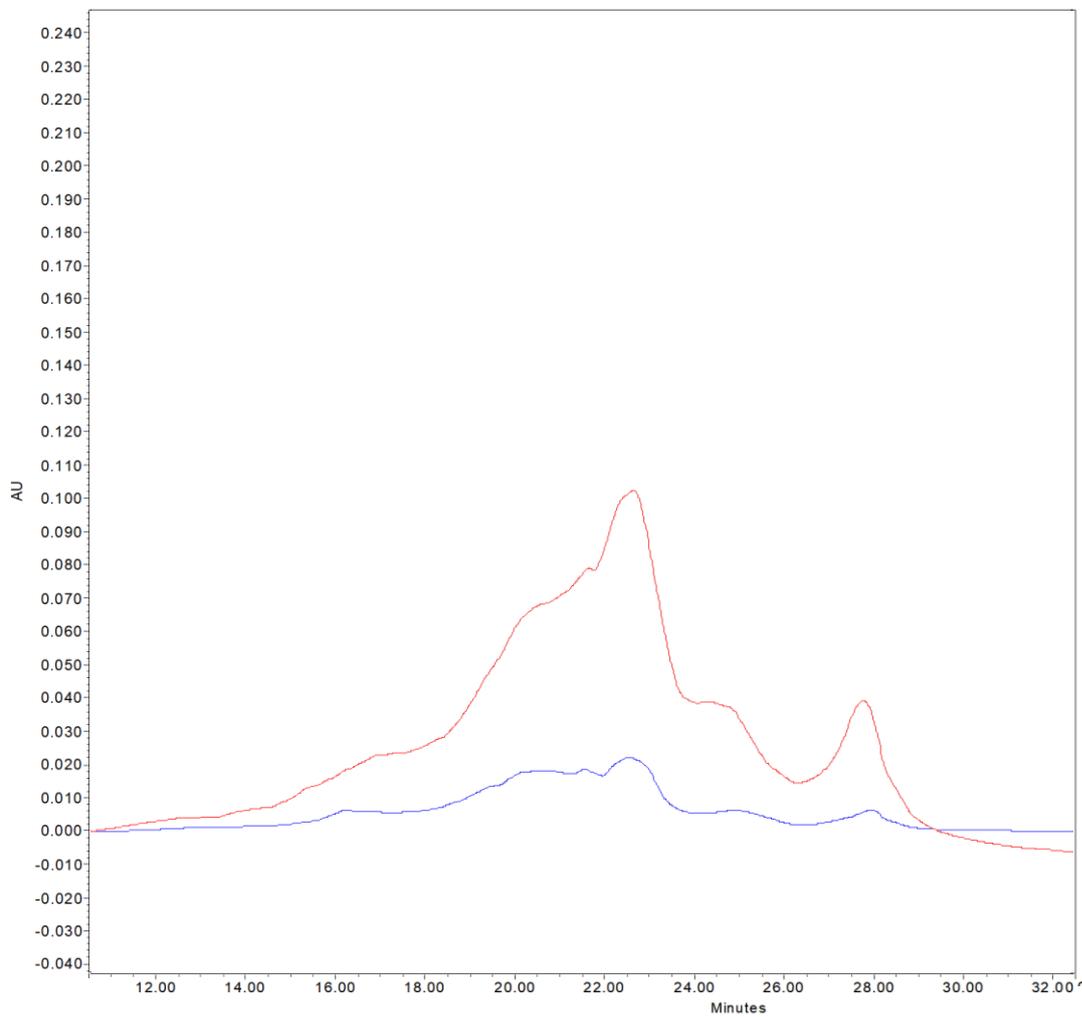


Figura 38. Cromatograma da fração Ma17s2_71A. Condição cromatográfica: Figura 37. Detecção em 208 (azul) e 300 nm (vermelho); Tempo de corrida cromatográfica: 40 minutos.



4.4.2.3. Verificação da eficácia da condição cromatográfica melhorada

A reprodutibilidade da condição de separação cromatográfica descrita na Figura 37 foi verificada para a batzelladina L, utilizando-se o restante da amostra Ma17s2_71A (75 mg), e posteriormente à fração AcMa17_43 (frações AcMa17_43K até AcMa17_43T).

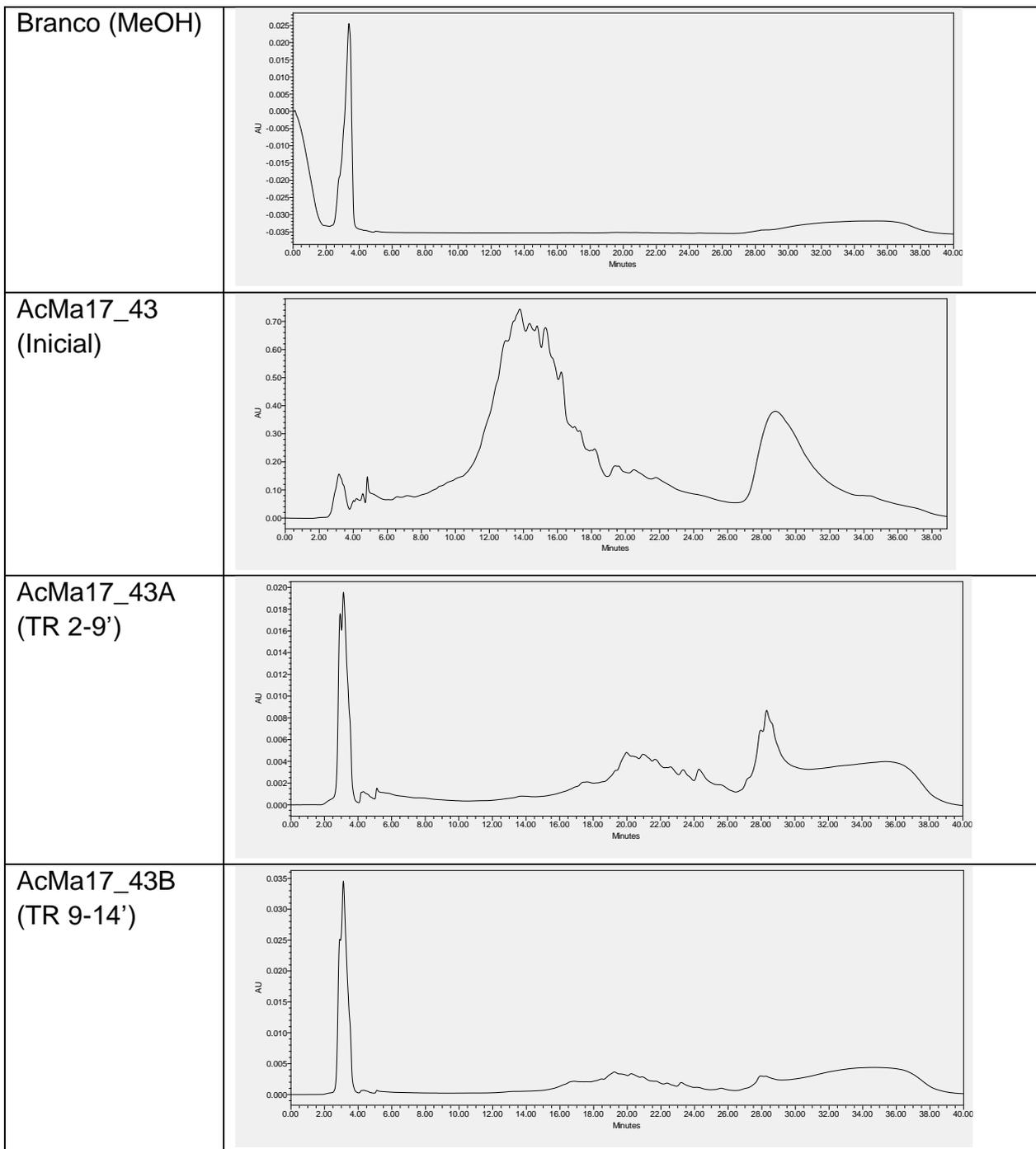
O perfil cromatográfico do fracionamento no HPLC-UV foi avaliado para as frações AcMa17_43A até AcMa17_43J utilizando-se o mesmo método. O perfil das frações obtidas foi registrado (Tabela 6). Este teste foi desenvolvido em equipamento HPLC-UV diferente do que o método foi desenvolvido, seguindo as adaptações necessárias. Esperava-se que a batzelladina L fosse obtida em elevada pureza nas subfrações G, H, P e Q, de acordo com o tempo de retenção monitorado para a substância no teste realizado com a fração Ma17s2_71A.

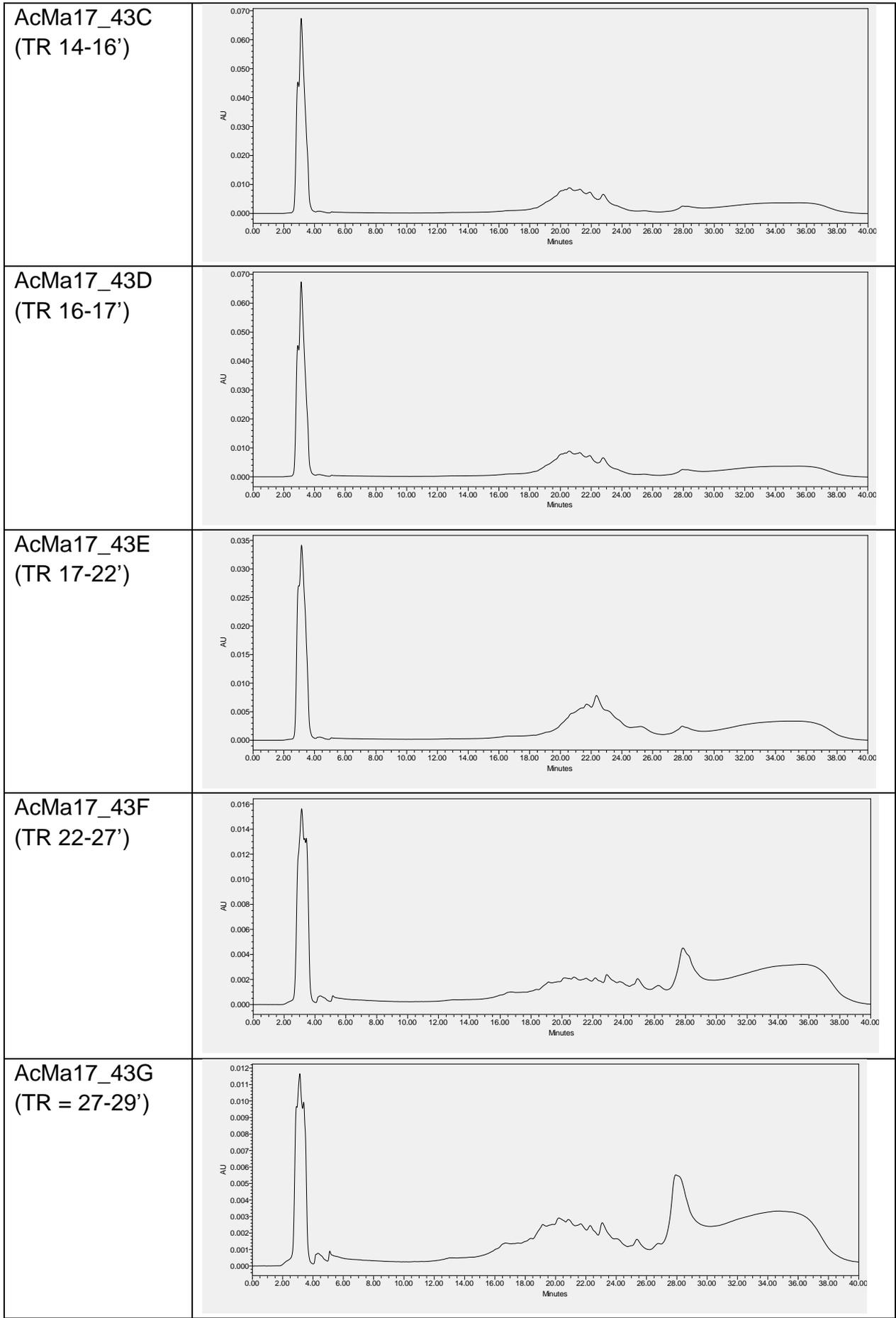
Entretanto não foi observada boa reprodutibilidade do método entre equipamentos para a separação das frações 43A até 43J objetivando-se isolar a batzelladina L.

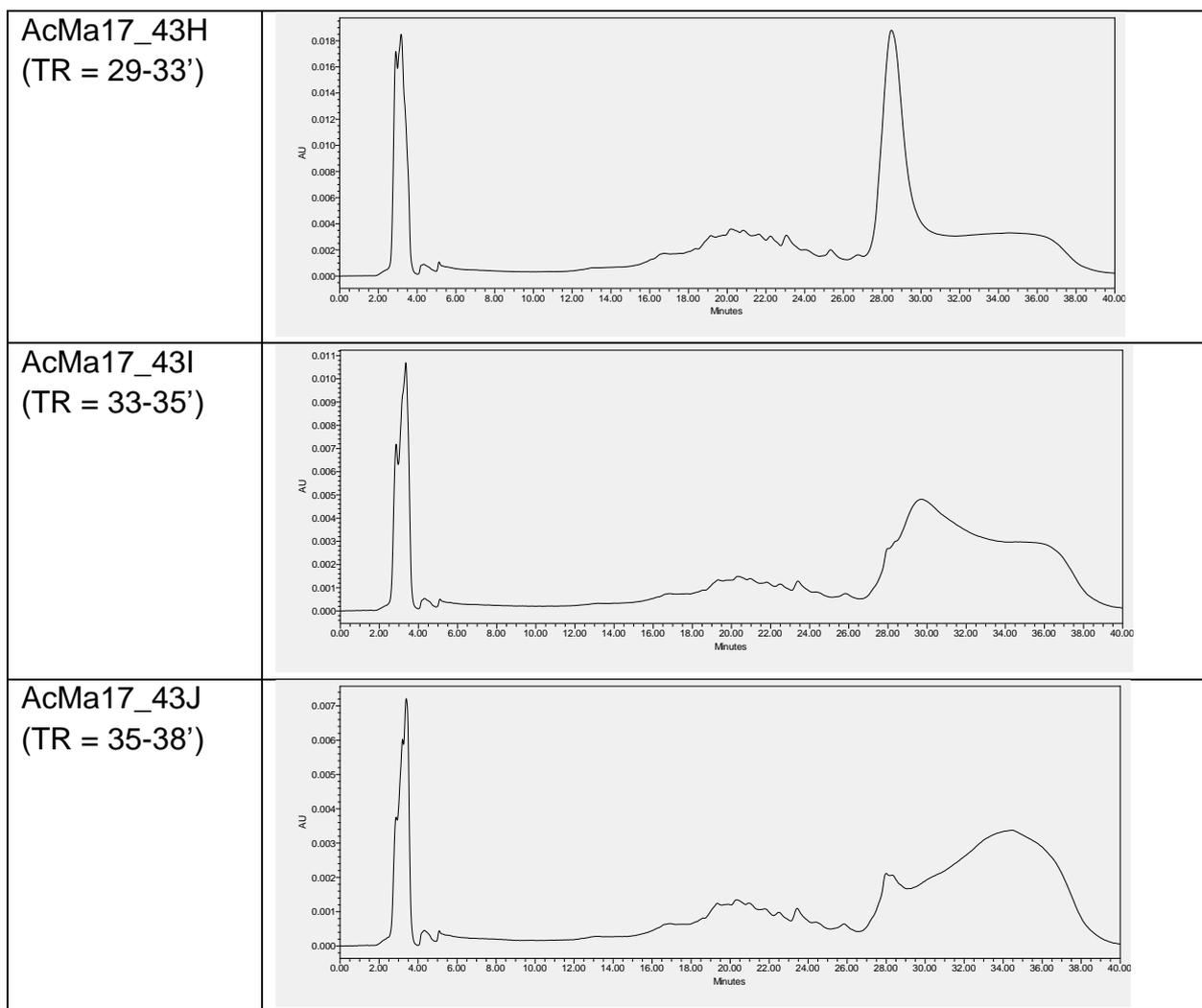
A batzelladina L foi observada principalmente na fração 43G, porém ainda com pureza insatisfatória. Foram utilizados 100 mg da amostra AcMa17_43 nestas análises e separações. Um perfil do processo de separação foi obtido e apresentado na Tabela 6.

Posteriormente, os 1,4 g restantes da amostra AcMa17_43 foi fracionada no mesmo equipamento em que desenvolveu-se a condição cromatográfica (Figura 37), resultando nas frações de AcMa17_43K até AcMa17_43T. A batzelladina L foi obtida na fração 43P com bom grau de pureza.

Tabela 6. Comportamento cromatográfico das frações AcMa17_43A até AcMa17_43J. As amostras foram preparadas na concentração de 1-2 mg/mL; volume de injeção: 100 uL. Condições: coluna Ph Inertsustain (GL – Sciences Inc 4,6 x 250 mm, 5 µm); composição do eluente: MeCN/H₂O 25:75 até 3 min.; MeCN/H₂O 30:70 de 4 a 7 min; MeCN/H₂O 35:65 de 8 a 11 min; MeCN/H₂O 40:60 de 12 a 20 min; MeCN/H₂O 60:40 de 21 a 30 min; retorno à condição cromatográfica inicial e recondicionamento em MeCN/H₂O 25:75 entre 31 e 40 min.







Na tabela 6 encontram-se ilustrados os cromatogramas das frações resultantes da separação após aplicada a condição cromatográfica descrita na Figura 37.

Verifica-se que à medida que o tempo de retenção da fração coletada aumenta, visualiza-se (de A para J), os picos mais intensos são em maiores tempos de retenção, demonstrando que a fração resultante (coletada) é mais concentrada nos componentes mais apolares conforme o tempo de retenção coletado aumenta, sendo também diferente da fração original apresentando menos compostos presentes. Porém, os cromatogramas indicam ainda grande quantidade de alcaloides presentes em cada fração, evidenciando a dificuldade de se separar estes compostos quando em mistura com uma única purificação por HPLC preparativo. Sendo assim, necessárias purificações subsequentes, até que sejam obtidos composto(s) com elevado grau de pureza. Perdas de massa ocorrem em cada repurificação, exigindo constante desenvolvimento de condições otimizadas para cada amostra de interesse, tornando o processo laborioso.

As tabelas abaixo apresentam o balanço de massa obtido para as purificações discutidas acima.

Tabela 7. Balanço de massa do subfracionamento das frações AcMa17_43A até AcMa17_43J, desenvolvido em sistema cromatográfico preparativo equivalente: mesma coluna, marca Waters e detectores equivalentes.

Frações	TR (min)	Massa (g)
AcMa17_43	-	0,100
43A	2-9	0,003
43B	9-14	0,016
43C	14-16	0,009
43D	16-17	0,014
43E	17-22	0,037
43F	22-27	0,004
43G	27-29	0,007
43H	29-33	0,006
43I	33-35	0,002
43J	35-38	0,003
Recuperação		101 %
		0,101 g

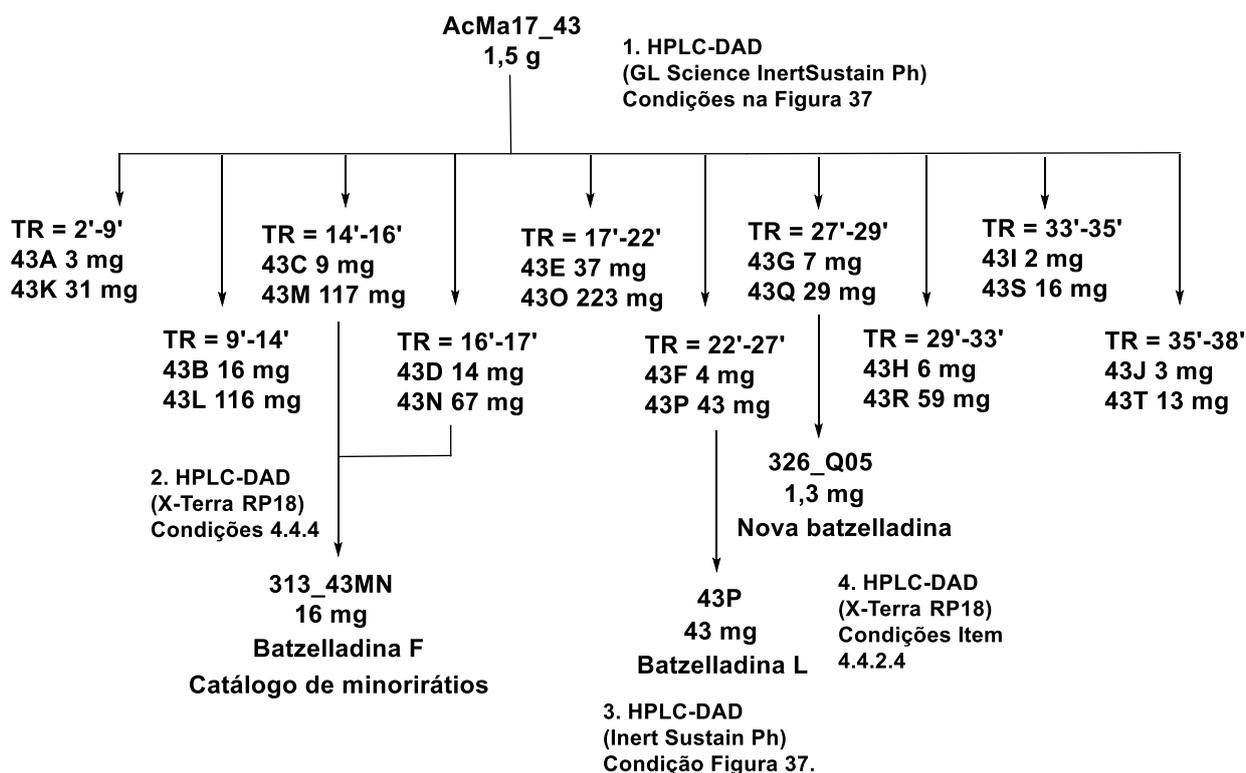
Tabela 8. Balanço de massa do subfracionamento das frações AcMa17_43K até AcMa17_43T.

Frações	TR (min)	Massa (g)
AcMa17_43	-	1,400
43K	2-9	0,031
43L	9-14	0,116
43M	14-16	0,117
43N	16-17	0,067
43O	17-22	0,223
43P	22-27	0,043
43Q	27-29	0,029
43R	29-33	0,059
43S	33-35	0,016
43T	35-38	0,013
AcMa17_43 Rec	-	0,199
Recuperação		65%
		0,913

A fração AcMa17_43P é a batzelladina L, obtida com êxito no mesmo sistema cromatográfico com a condição otimizada e com boa repetibilidade mesmo em condições de elevada concentração da amostra injetada. 40 mg desta batzelladina L foi enviada para que experimentos *in vivo* de bioatividade antileishmanial fossem realizados, mas os resultados dos experimentos ainda não foram disponibilizados e os experimentos encontram-se em andamento sendo realizados pela equipe orientada pelo Pr. Dr. Danilo Miguel da Unicamp.

O volume e concentração de injeção da amostra AcMa17_43 foi gradualmente incrementado até atingir 90 mg/mL e 100 uL por injeção. Foi possível a recuperação de massa de 65% ao final do procedimento. Foram obtidos 42 mg da batzelladina L na fração AcMa17_43P. Dados disponíveis no item 4.5.1.

Figura 39. Fluxograma do fracionamento da fração AcMa17_43 por HPLC-UV.



A figura 39 apresenta o fluxograma descritivo das demais frações, que purificadas em etapas posteriores resultaram no acúmulo dos compostos de interesse, sendo utilizadas em ensaios *in vivo* e *in vitro*: 43M, 43N, 43P e 43Q.

4.4.2.4. Purificação da fração 43Q contendo o alcaloide minoritário (*m/z* 651)

O composto minoritário obtido na fração 43Q demonstrou estar ainda impuro. Subsequentes purificações foram desenvolvidas com o objetivo de obter o composto em maior pureza e quantidade. Avaliação detalhada do comportamento cromatográfico do composto Ma71E obtida no item 4.4.1 em C18, utilizando-se a mistura MeOH:MeCN (1:1) como solvente orgânico, foi realizada em sistema cromatográfico analítico LC-MS-UV. Informações obtidas com o sistema HPLC-UV-MS foram determinantes na definição de uma nova estratégia para seguir com a nova purificação.

Batzelladinas são reportadas na literatura apresentando pequenas quantidades de contaminantes e/ou compostos análogos pelo fato de que estruturas carbônicas homólogas muito semelhantes apresentam polaridade característica, que os tornam de difícil separação cromatográfica. Tais características os tornam extremamente difíceis de serem obtidos em grau elevado de pureza quando presentes em misturas e de terem suas estruturas elucidadas quando estão em misturas (PATIL, *et al.*, 1995; GALLIMORE, KELLY e SCHEUER, 2005).

Figura 40. Cromatograma HPLS-ESI-MS em modo TIC MS+ do composto Ma71E.

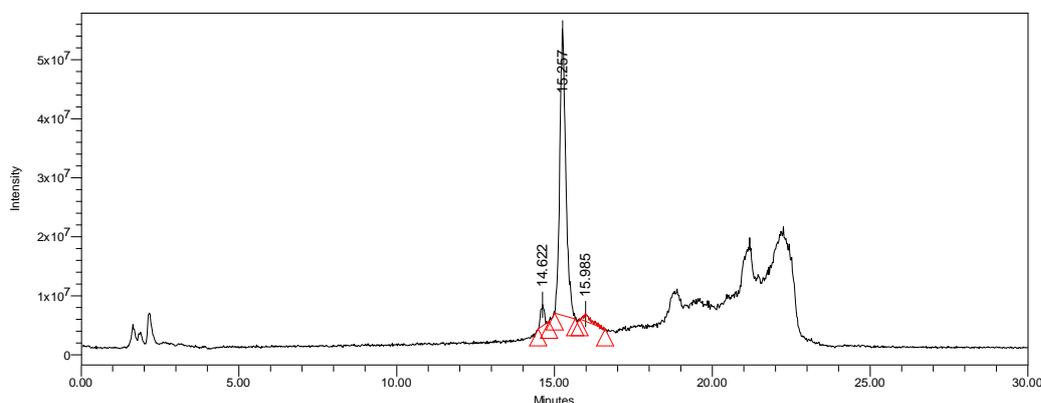
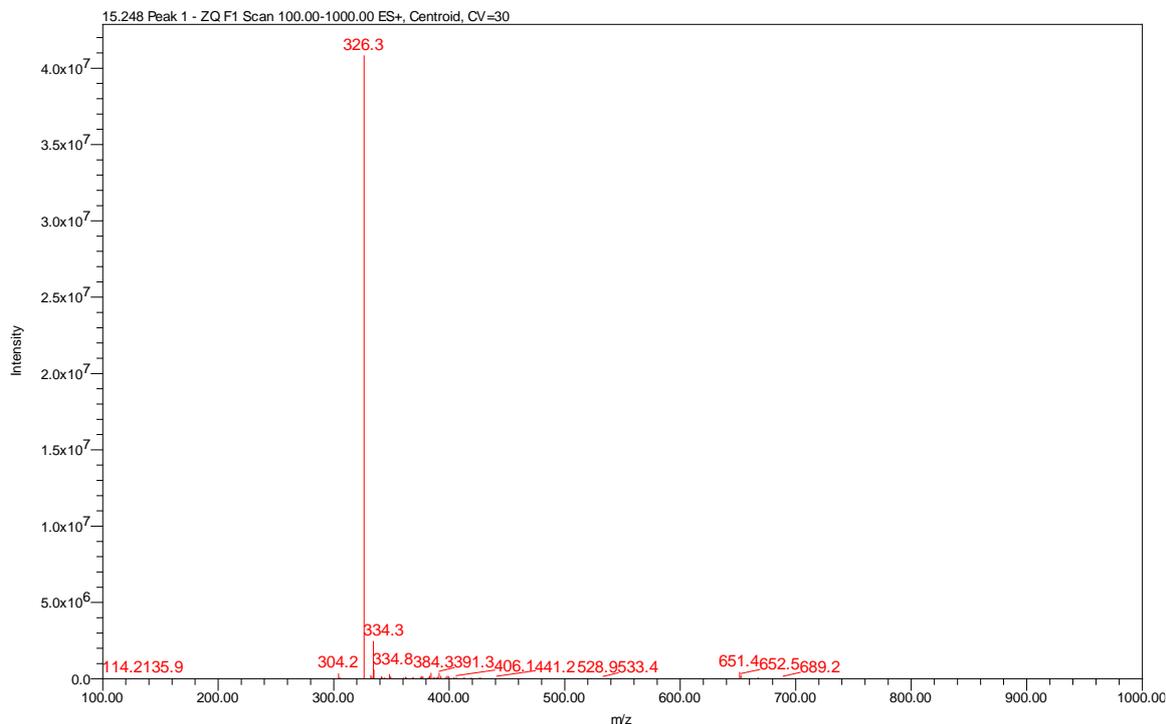


Tabela 9. Área, %Área e Altura do composto de interesse (Ma71E) e interferentes vizinhos.

	Tempo de retenção	Área	% Área	Altura
1	14.622	29493263	4.27	3255458
2	15.257	640025628	92.56	47041548
3	15.985	21984023	3.18	1080334

Figura 41. Espectro de massas ESI-quadrupolo MS+ do composto Ma71E, TR = 15,2'.



Pode-se observar ao longo da extensão do pico cromatográfico do composto Ma71E um interferente com m/z 334 que elui pouco antes do composto m/z 326, o mais abundante na amostra. Sendo assim, uma condição cromatográfica que melhor separasse outros dois compostos foi desenvolvida e reproduzida no cromatógrafo preparativo.

Um gradiente mais lento foi utilizado com coluna C18. Mesmo assim não foi possível se obter uma resolução cromatográfica ótima para completa separação dos dois compostos; foi necessário coletar parte da área do pico majoritário.

A melhor condição cromatográfica obtida no sistema HPLC-MS-UV analítico foi um gradiente lento de 57 até 63% (MeOH+MeCN 1:1)/H₂O, que foi reproduzido em cromatógrafo preparativo em um gradiente de 48 até 60% (MeOH+MeCN 1:1)/H₂O. Figuras 42, e 43.

Figura 42. Cromatograma HPLS-ESI-MS em modo TIC MS+ do composto Ma71E.

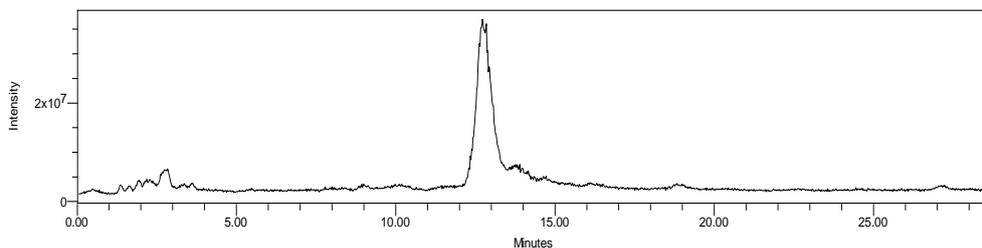


Figura 43. Cromatograma HPLS-ESI-MS em modo TIC MS+ do composto AcMa17_43Q.

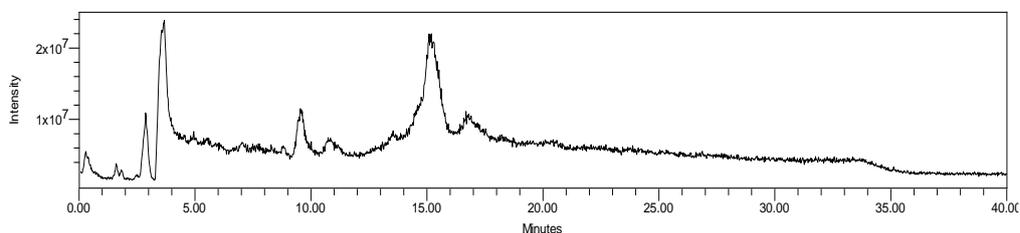


Figura 44. Cromatograma HPLS-ESI-MS em modo TIC MS+ do composto AcMa17_43Q, eluição em gradiente exploratório 20 até 100% orgânico.

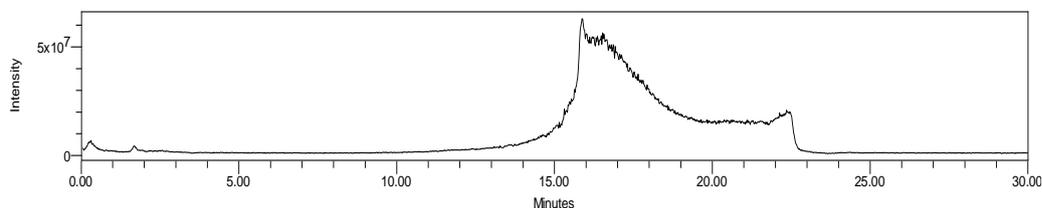
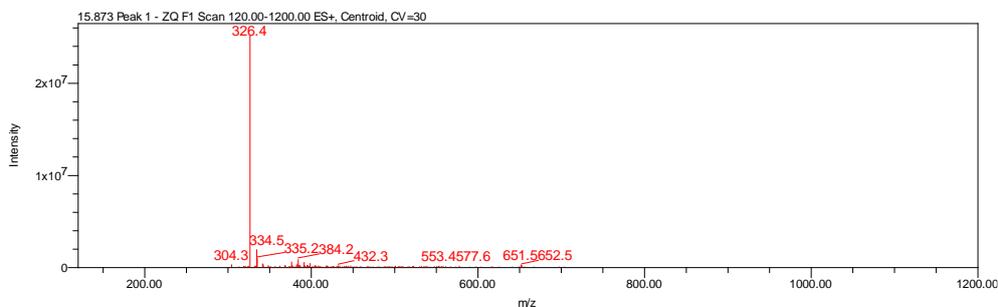


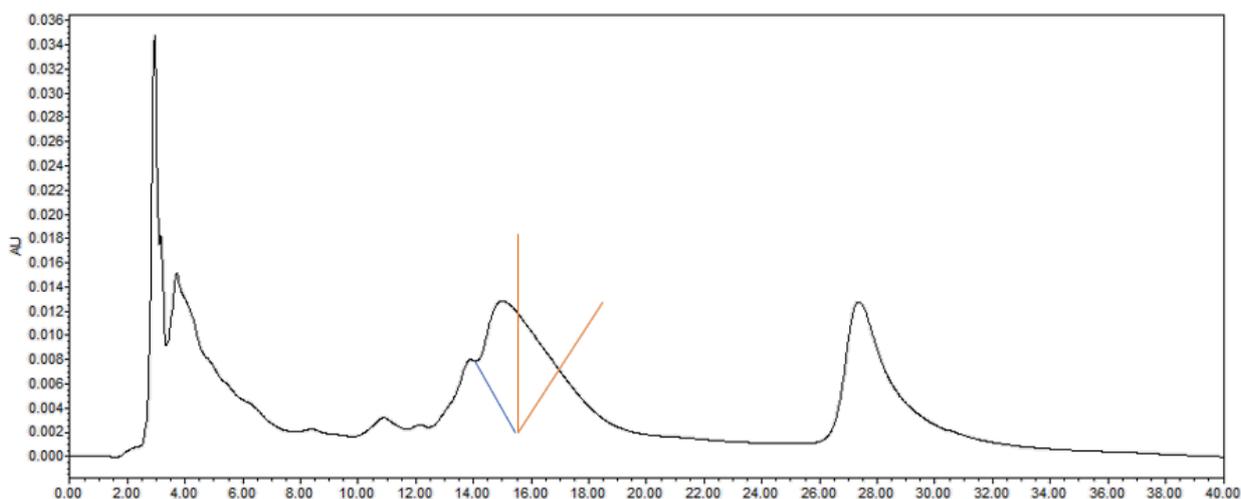
Figura 45. Espectro de massas ESI-quadrupolo MS+ do composto AcMa17_43Q, TR = 15,9'.



Como pode-se observar na figura 43 acima, inicialmente a amostra apresentou mais picos em baixa intensidade no espectro de MS do que o composto inicialmente obtido Ma71E (Figura 42).

Avaliando as frações utilizando-se gradiente lento, o interferente que elui antes apresenta-se ainda presente no pico principal da amostra Ma71E. Já na amostra menos pura AcMa17_43Q, foi possível inicialmente observar sua eluição no início da subida do pico em torno do tempo de retenção de 15 minutos, os demais picos que eluem antes também foram observados no HPLC-UV preparativo. (Figura 46).

Figura 46. LC-UV preparativo amostra AcMa17_43Q. Gradiente lento de 48 até 60% (MeOH+MeCN 1:1)/H₂O em 40 minutos.



Objetivando-se minimizar a presença do interferente no composto principal e obter uma amostra no maior grau de pureza possível, somente a região em destaque na descida do pico foi coletada separadamente do resto da eluição do pico, o que correspondeu a cerca de 30% da área do pico. Foi utilizado o total da amostra e das amostras recuperadas da AcMa1743_Q, que resultaram em 1,4 mg da amostra 43Q326, descrita no item 4.5.2.

4.4.3. Obtenção do alcaloide majoritário batzelladina F (m/z 624) a partir das frações 43M e 43N e do catálogo de alcaloides minoritários

4.4.3.1. Desenvolvimento da condição cromatográfica para acumular o alcaloide majoritário batzelladina F (m/z 624) e acúmulo do composto 313_43MN

A fração 43M de massa inicial 117 mg apresentava compostos com retenção menor do que a batzelladina L, sendo menos apolares em condições cromatográficas semelhantes em C18 que a amostra que continha a batzelladina L. A amostra 43M apresentou elevado número de picos que coeluem entre si, conferindo a fração grande complexidade para ser purificada.

Apesar destas características desfavoráveis a amostra foi selecionada para o trabalho pelas mesmas razões que a tornam complexa, pois possibilitaria isolar mais compostos enquanto era acumulado o composto majoritário já identificado na fração anterior, mas presente em grande quantidade na fração 43M e 43N: A batzelladina F, isolada anteriormente da fração Ma17s2_71 (Figura 27).

Outro fator que dificultou foi que a batzelladina F absorve pouco no UV, sua detecção é difícil quando encontra-se em mistura de outros compostos que absorvem mais do que ela, mesmo que em pequena quantidade, dificultando muito sua detecção em detector UV.

A estratégia de fracionamento inicial descrito a seguir teve como objetivo reduzir a complexidade da amostra inicial 43M contendo a batzelladina F, baseando-se no que ficou evidente no decorrer deste projeto, que quando menos compostos estão presentes na fração a separação é melhor do que quando a fração apresenta muitos compostos.

O espectro de massas ESI em modo positivo (Figura 50) evidencia a quantidade de compostos na fração coeluinto na condição de gradiente exploratório 20 até 100 solvente orgânico (MeOH:MeCN 1:1) e TR = 9,75; fase estacionária C18, coluna X-terra (Waters – C18, 4,6 × 350 mm, 5 μ m), com vazão de 1,0 mL/min, UV 300 nm, duração 20 minutos.

Figura 47. Cromatograma da amostra 43M por HPLC-DAD monitorado em 260 nm. Condições cromatográficas: gradiente exploratório. Item 3.1.4.

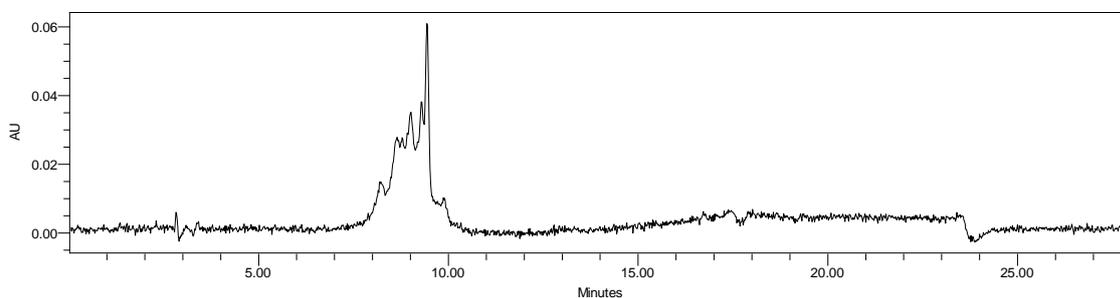


Figura 48. Cromatograma da amostra 43M, identificação da batzelladina F por HPLC-DAD monitorado em 305 nm. Condições cromatográficas: gradiente exploratório. Item 3.1.4.

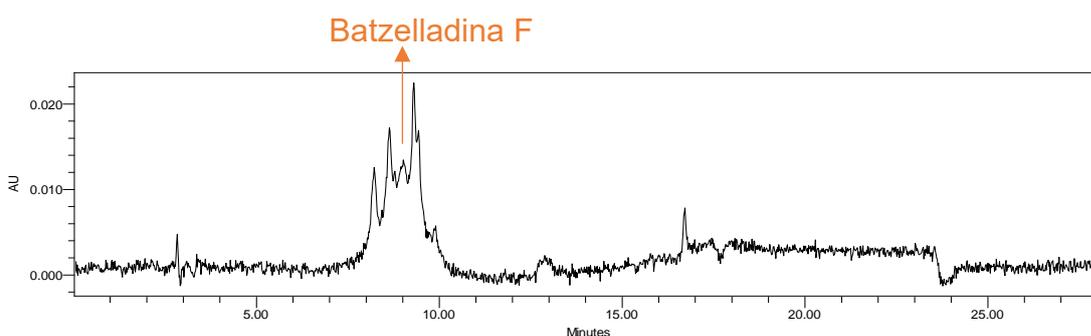


Figura 49. Cromatograma HPLS-ESI-MS em modo TIC MS+ da amostra 43M. Condições cromatográficas: gradiente exploratório. Item 3.1.4.

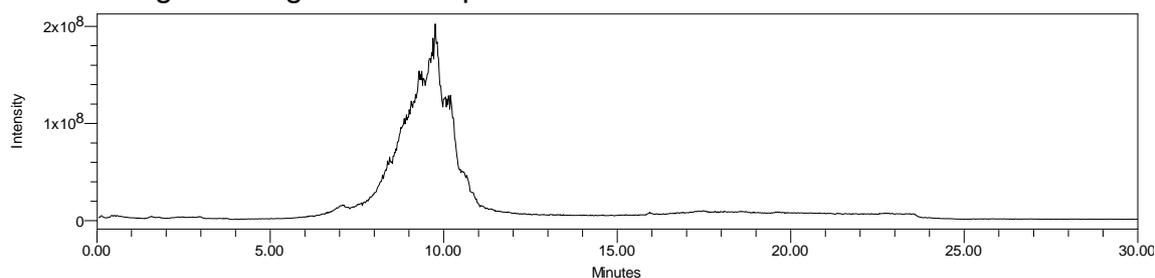
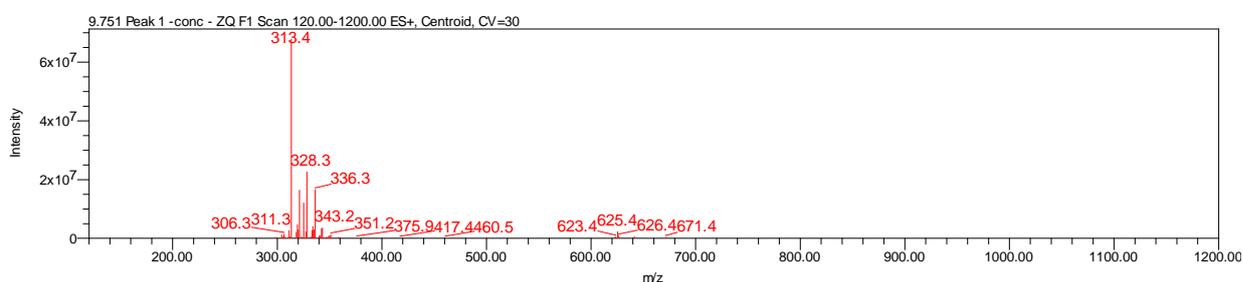


Figura 50. Espectro de massas ESI-quadrupolo MS+ da amostra 43M. Batzelladina F, [M+2H]⁺ 313,4, TR = 9,8'.



A amostra 43_M (117 mg) foi fracionada em HPLC-UV preparativos, suas frações agrupadas de acordo com as similaridades após terem sido avaliadas em HPLC-MS-DAD, resultando nas frações 43M_A, 43M_B, 43M_C e 43M_D.

A condição cromatográfica utilizada, denominada de **Gradiente A**, encontra-se descrita na tabela 10, abaixo:

Tabela 10. Condição cromatográfica: Gradiente A: Coluna X-Terra, Waters – C18, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm), vazão 1 mL/min, gradiente orgânico (MeOH:MeCN 1:1):H₂O contendo 0,1% de ácido fórmico, descrito abaixo.

% Solvente orgânico (MeOH:MeCN 1:1)	Tempo de corrida
2% até 40%	1' até 15'
40% até 25%	15' até 30'
25% até 60%	30' até 31'
60% (Limpeza)	31' até 40'
60% até 2%	40' até 45'

Devido à coeluição dos compostos da fração 43M, buscou-se uma condição cromatográfica apenas para fracionar e reduzir a complexidade dos compostos presentes nas frações resultantes, mas sem despendar tempo excessivo no desenvolvimento do método.

O objetivo foi almejado determinando o percentual necessário de fase móvel orgânica (MeOH:MeCN 1:1) de saída do composto mais retido, (último pico = 40%), feito isso um gradiente linear crescente foi utilizado até o tempo de eluição do primeiro pico (15') até 40%, quando um gradiente linear decrescente (até 25%) foi aplicado para retardar a saída dos compostos até 30', tempo em que a eluição dos compostos termina. Com a coleta sendo das frações em intervalos de 0,5 minutos entre si.

Por fim, a limpeza da coluna é realizada com 60% de solvente orgânico (MeOH:MeCN 1:1), de 31 até 40', retornando para a condição inicial até o equilíbrio do sistema (Figuras 62 e 63).

Figura 51. Cromatograma da amostra 43M, identificação da batzelladina F por HPLC-DAD monitorado em 208 nm. Condições cromatográficas: gradiente A.

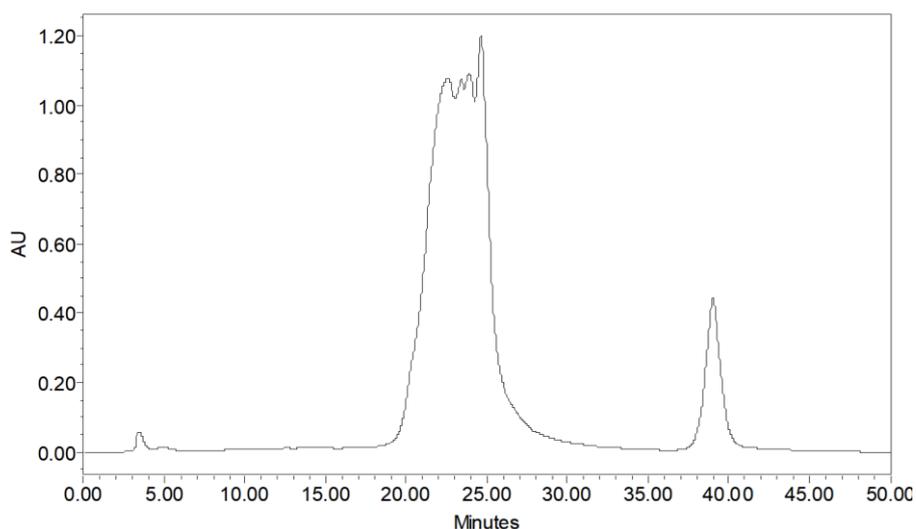
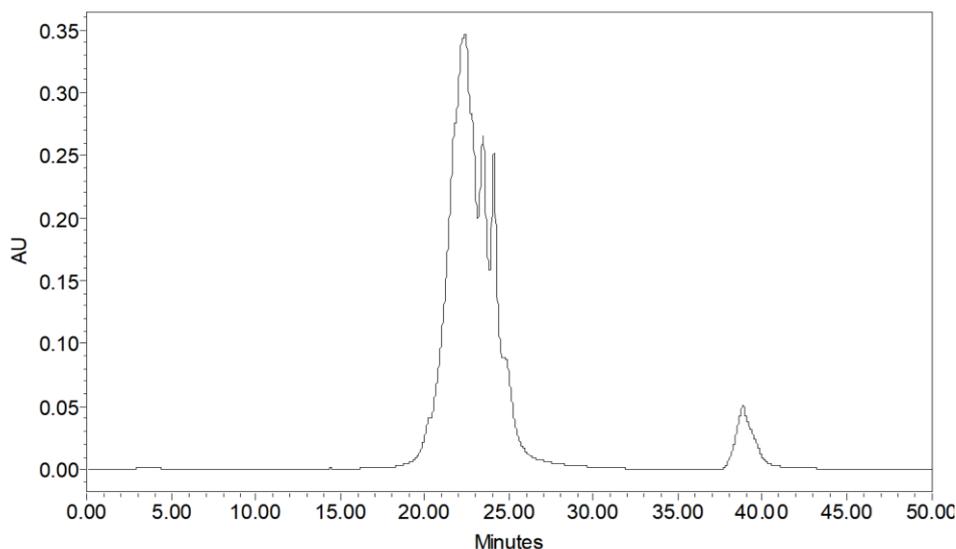


Figura 52. Cromatograma da amostra 43M, identificação da batzelladina F por HPLC-DAD monitorado em 260 nm. Condições cromatográficas: gradiente A.



Uma vez obtidas amostras mais simples, o desenvolvimento de uma condição cromatográfica para purificar a batzelladina F foi realizado primeiramente no HPLC-MS-UV analítico e posteriormente adequando a condição ao HPLC preparativo utilizando a amostra menos complexa disponível contendo a batzelladina F (71BC313), obtida da fração AcMa17_72 anteriormente.

A seletividade das colunas C8, Ph e C18 foram testadas, mas utilizando a amostra 43M_A por ser a mais complexa, porém a mais parecida com a 71BC313. O melhor resultado foi obtido utilizando a coluna C18. As colunas C8 e Ph apresentaram maior

coeluição de impurezas com a batzelladina F de forma similar entre si (Figuras 53 – 70, pico extraído m/z 313).

A melhor condição cromatográfica obtida denominada de Gradiente B foi:

Gradiente B: Coluna C18 X-Terra, Waters – C18, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm), gradiente orgânico (MeOH:MeCN 1:1):H₂O de 44 até 53% no HPLC analítico, reproduzido em 34 até 54% no sistema HPLC preparativo 4.

Os comprimentos de onda 313 nm e 265 nm foram selecionados para monitorar o composto batzelladina F indiretamente: Em 265 nm monitorava-se o composto com pico mais intenso eluindo antes da batzelladina F e em 313 nm acompanhava-se este mesmo pico e um segundo pico, que eluia após a batzelladina F, ambos picos de compostos minoritários presentes na fração mas que absorviam mais do que a batzelladina F. Deste modo, foi possível acumular a batzelladina F entre os dois picos monitorados. Vide Figuras 47 e 48.

Abaixo apresentam-se os cromatogramas comparativos entre as colunas C18, C8 e Ph (Figuras 53 – 70), onde o melhor resultado para o íon extraído m/z 313 foi obtido em C18 (Figura 58). A condição gradiente B reproduzida no cromatógrafo preparativo encontra-se na Figura 82 e 83, em coluna C18.

Figura 53. Cromatograma da amostra 43M_A por HPLC-DAD monitorado em 305 nm. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna C18, X-Terra, Waters – C18, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).

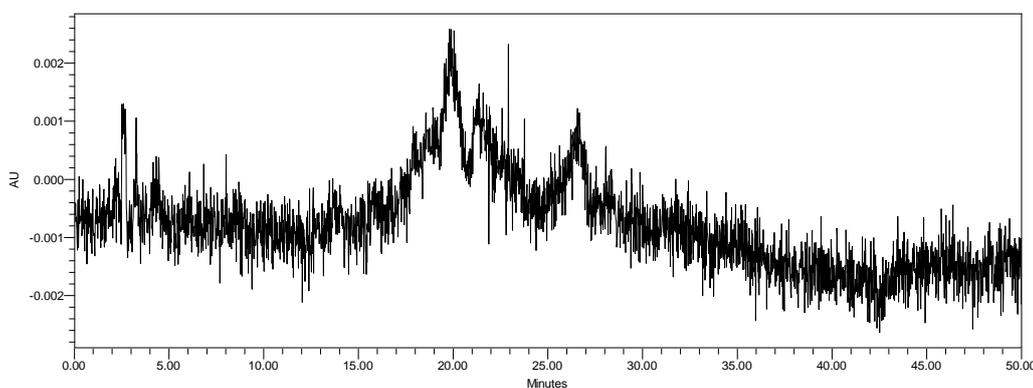


Figura 54. Cromatograma da amostra 43M_A por HPLC-DAD monitorado em 265 nm. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna C18, X-Terra, Waters – C18, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).

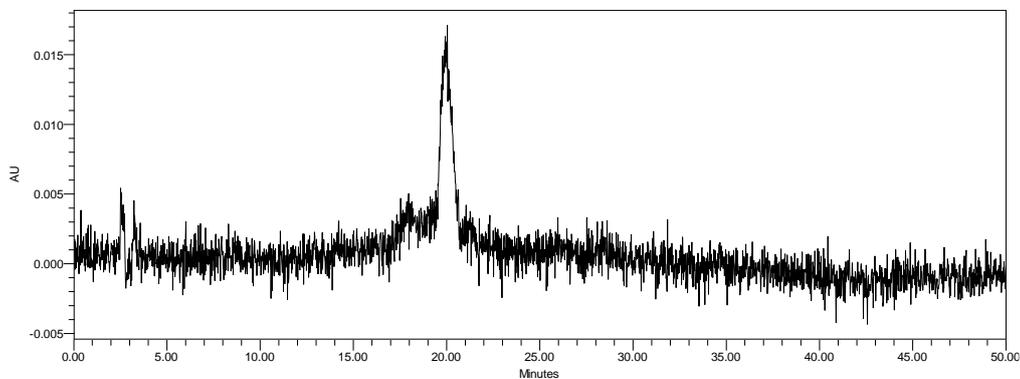


Figura 55. Cromatograma HPLS-ESI-MS em modo TIC MS+ da amostra 43M_A. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna C18, X-Terra, Waters – C18, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).

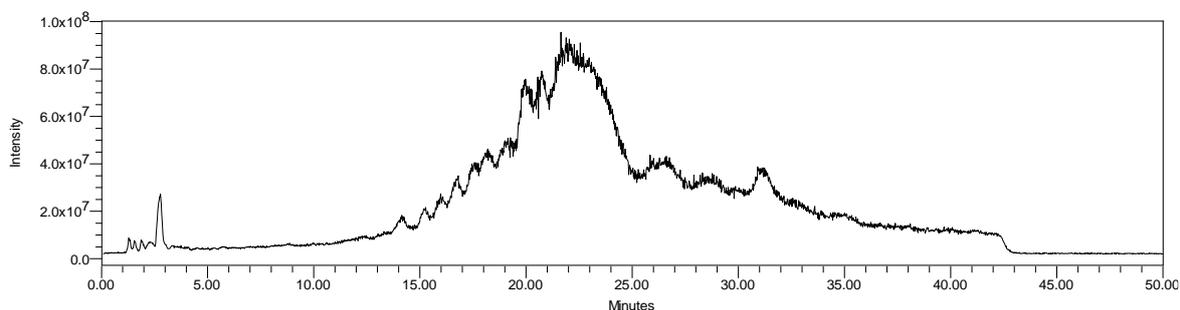


Figura 56. Espectro de massas ESI-quadrupolo MS+ da amostra 43M_A, TR = 22,2'.

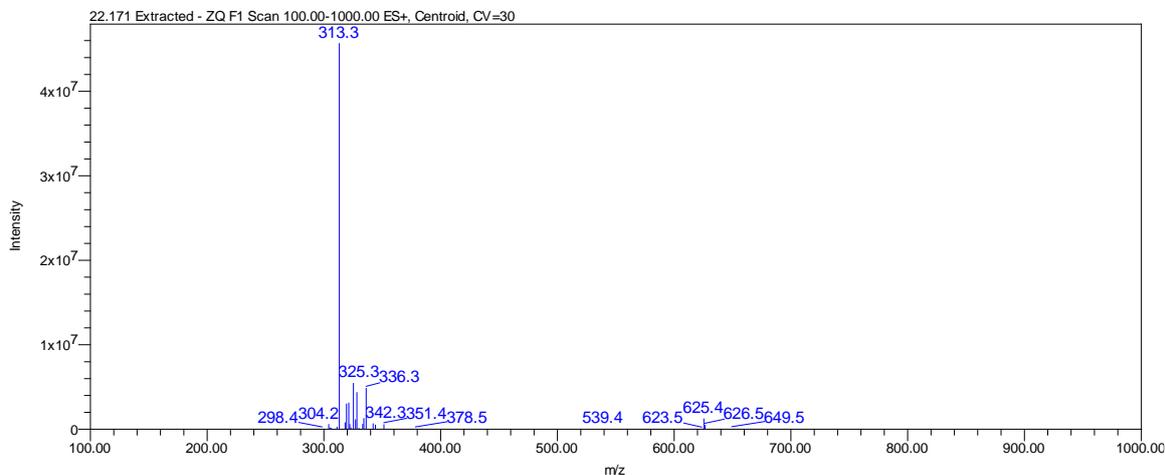


Figura 57. Cromatograma HPLS-ESI-MS extraído m/z^+ 313, MS+ da amostra 43M_A. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna C18, X-Terra, Waters – C18, (4,6 mm × 250 mm, 5 μ m).

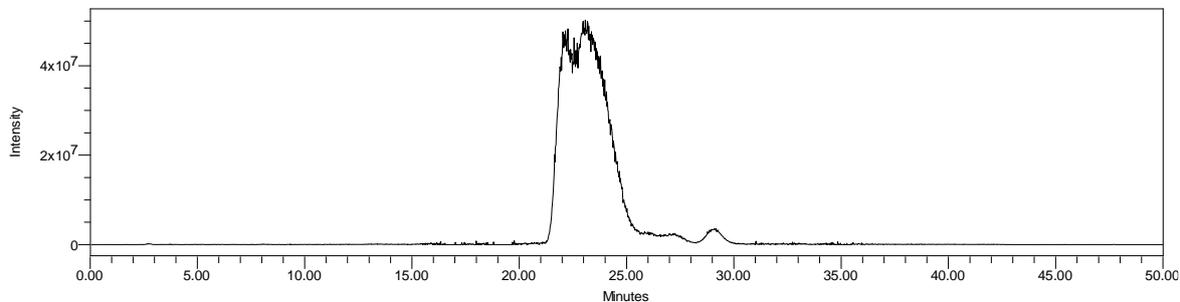


Figura 58. Espectro de massas ESI-quadrupolo MS+ extraído m/z^+ 313, da amostra 43M_A, TR = 23,1'. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna C18, X-Terra, Waters – C18.

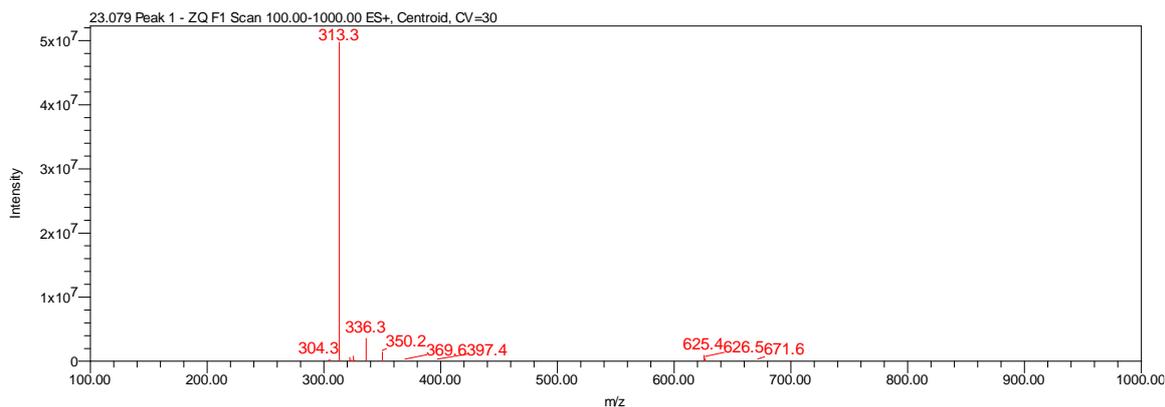


Figura 59. Cromatograma da amostra 43M_A por HPLC-DAD monitorado em 305 nm. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna InestSustain - Ph (4,6 mm × 250 mm, 5 μ m).

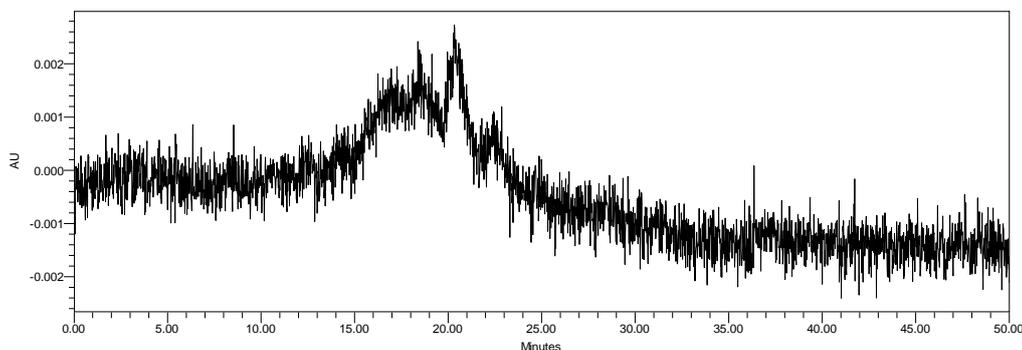


Figura 60. Cromatograma da amostra 43M_A por HPLC-DAD monitorado em 265 nm. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna InestSustain - Ph (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).

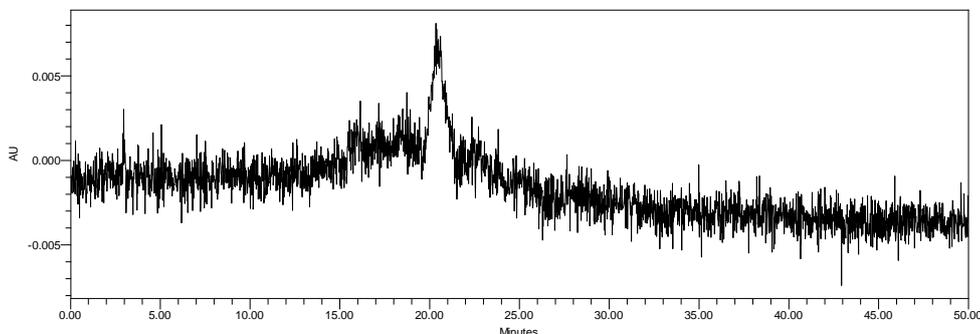


Figura 61. Cromatograma HPLS-ESI-MS em modo TIC MS+ da amostra 43M_A. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna InestSustain - Ph (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).

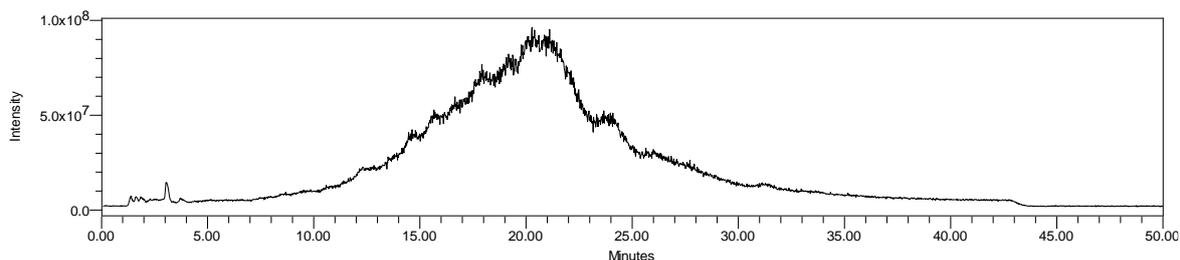


Figura 62. Espectro de massas ESI-quadrupolo MS+ da amostra 43M_A, TR = 22,3'. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna InestSustain - Ph.

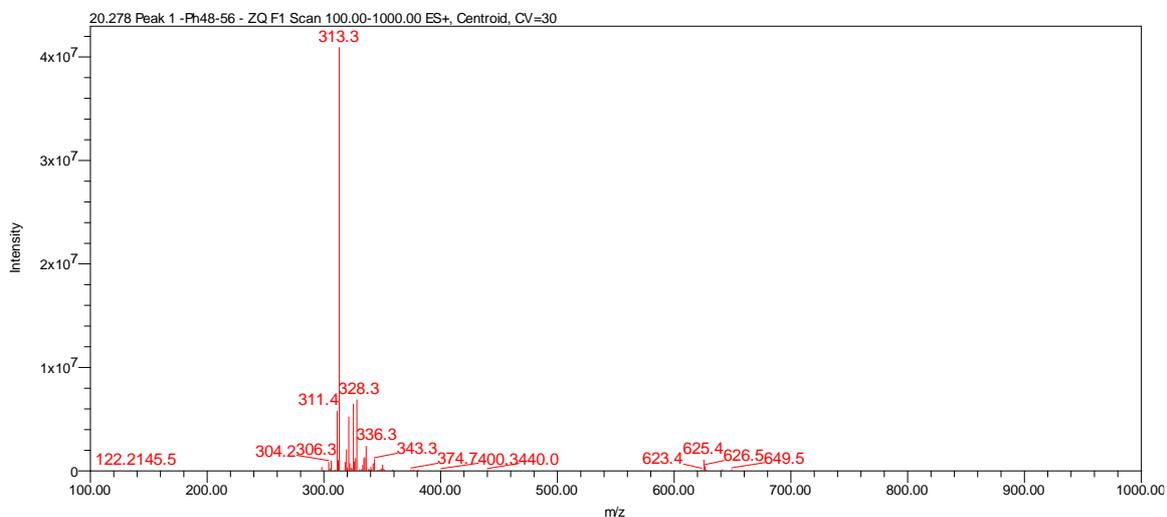


Figura 63. Cromatograma HPLS-ESI-MS extraído m/z+ 313, MS+ da amostra 43M_A. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna InestSustain - Ph (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).

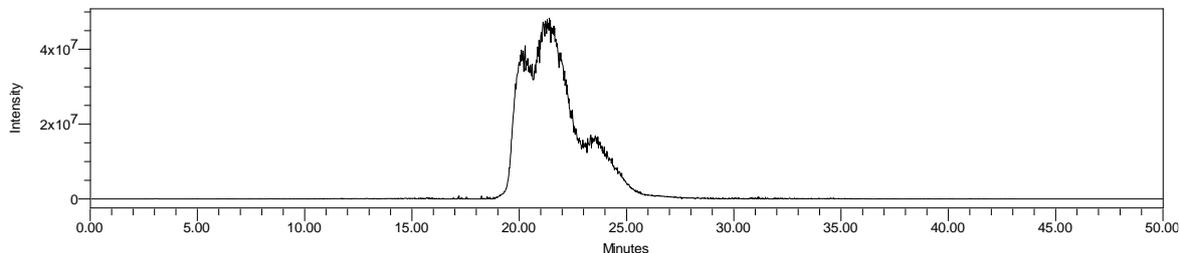


Figura 64. Espectro de massas ESI-quadrupolo MS+ extraído m/z+ 313 da amostra 43M_A, TR = 20,2'. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna InestSustain – Ph.

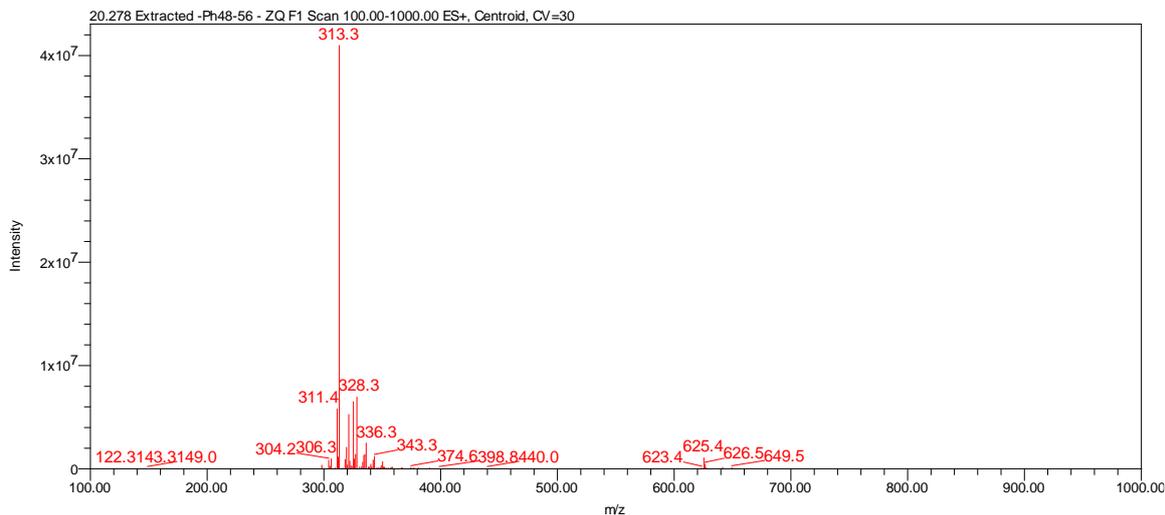


Figura 65. Cromatograma da amostra 43M_A por HPLC-DAD monitorado em 305 nm. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna InestSustain – C8 (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).

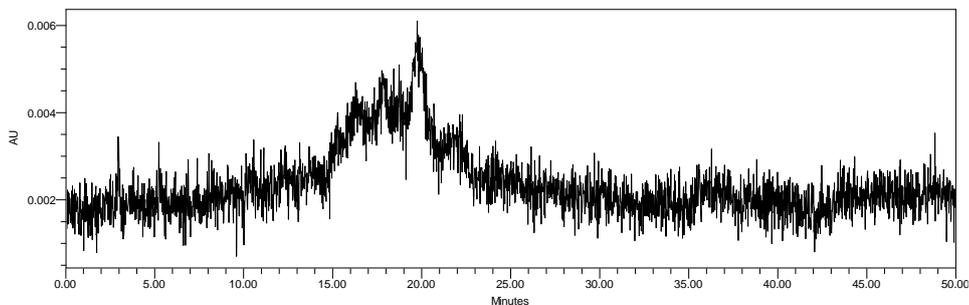


Figura 66. Cromatograma da amostra 43M_A por HPLC-DAD monitorado em 265 nm. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna InestSustain – C8 (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).

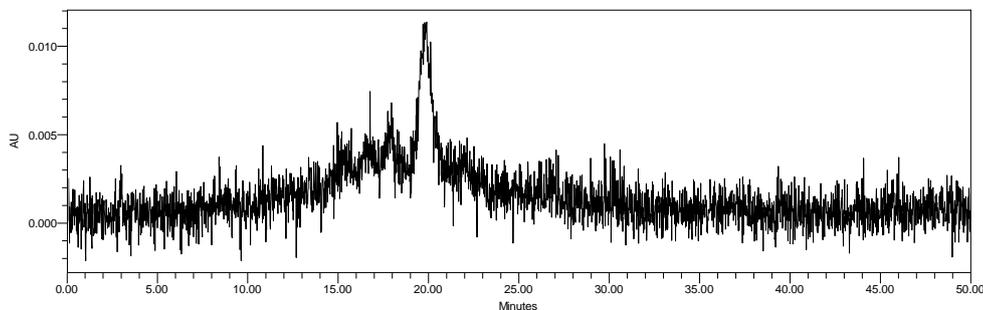


Figura 67. Cromatograma HPLS-ESI-MS em modo TIC MS+ da amostra 43M_A. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna InestSustain – C8 (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).

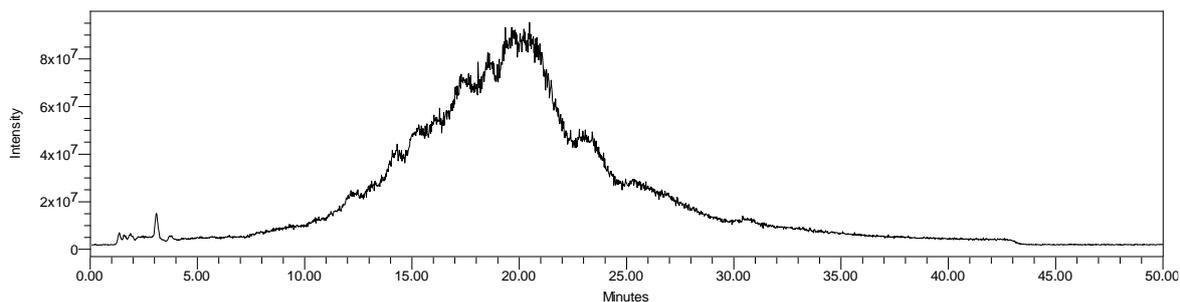


Figura 68. Espectro de massas ESI-quadrupolo MS+ da amostra 43M_A, TR = 20,5'. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna InestSustain – C8

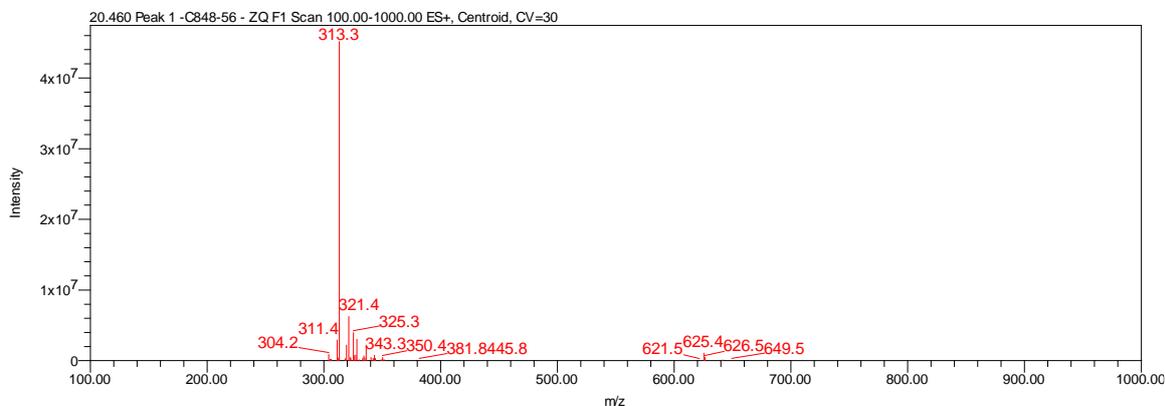


Figura 69. Cromatograma HPLS-ESI-MS extraído m/z+ 313, MS+ da amostra 43M_A. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna InestSustain – C8 (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).

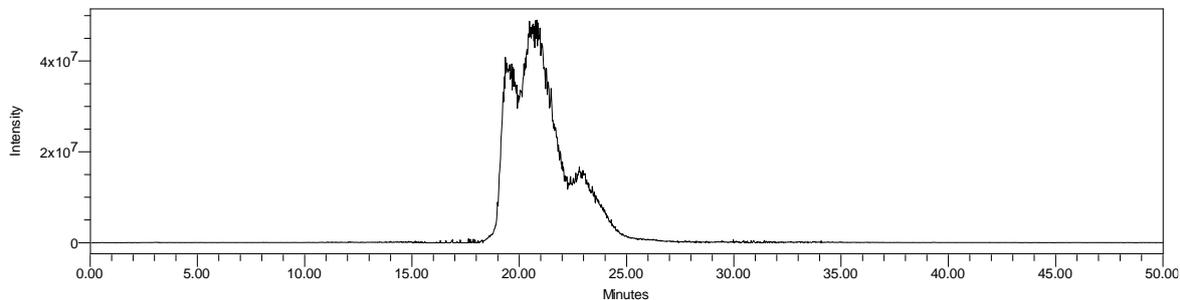


Figura 70. Espectro de massas ESI-quadrupolo MS+ extraído m/z+ 313 da amostra 43M_A, TR = 20,8'. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna InestSustain – C8

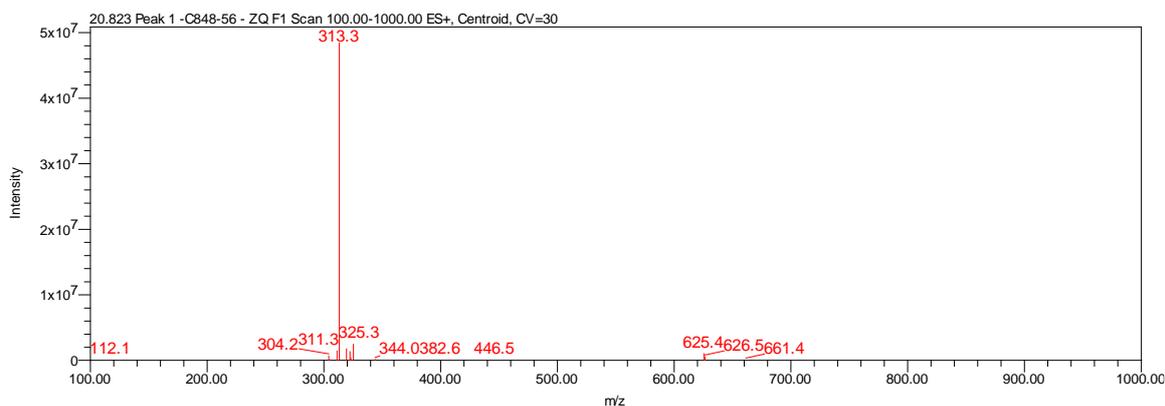


Figura 71. Cromatograma da amostra 43M_A por HPLC-DAD monitorado em 305 nm. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna C18, X-Terra, Waters – C18, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).

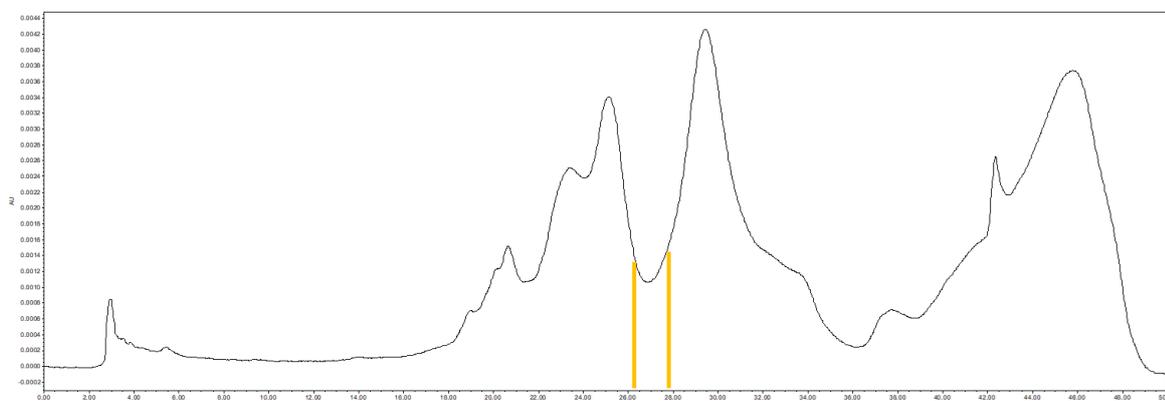
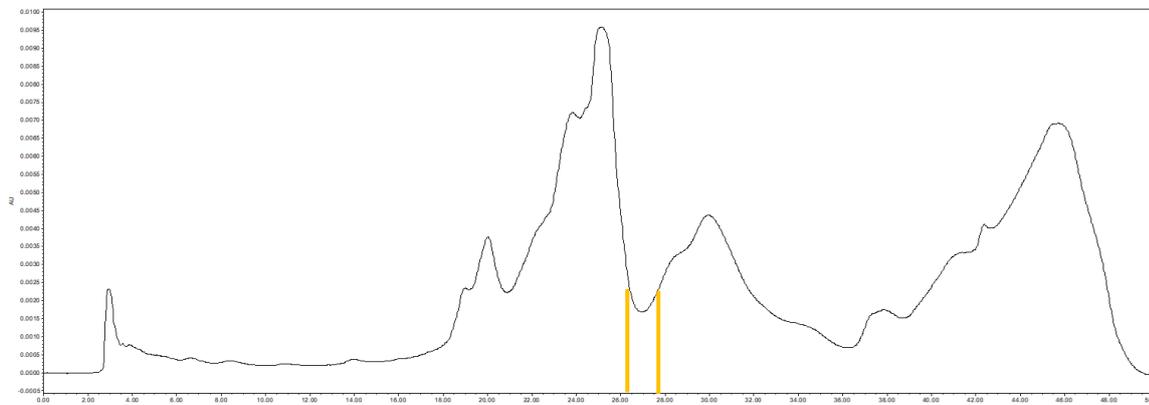


Figura 72. Cromatograma da amostra 43M_A por HPLC-DAD monitorado em 265 nm. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna C18, X-Terra, Waters – C18, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).



A condição cromatográfica foi aplicada nas frações 43M_A, 43M_B, 43M_C e 43M_D (Figuras 73 - 76), disponíveis no Anexo, abaixo apresenta-se como exemplo o os dados para a 43M_A.

O composto batzelladina F obtido após purificação na condição Gradiente B foi analisado em HPLC-DAD-MS, descritos nas Figuras 77 - 79.

Para efeito comparativo, abaixo encontram-se os cromatogramas obtidos para o composto batzelladina F (Figuras 79 e 80) com o composto batzelladina L (Figuras 80 e 81) que foi avaliado *in vivo*, ambos se encontram em pureza comparável, tal análise foi feita antes de acumular a batzelladina F das frações 43M_A, 43M_B, 43M_C e 43M_D.

Figura 73. Cromatograma HPLS-ESI-MS em modo TIC MS+ da amostra 43M_A. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna C18, X-Terra, Waters – C18, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).

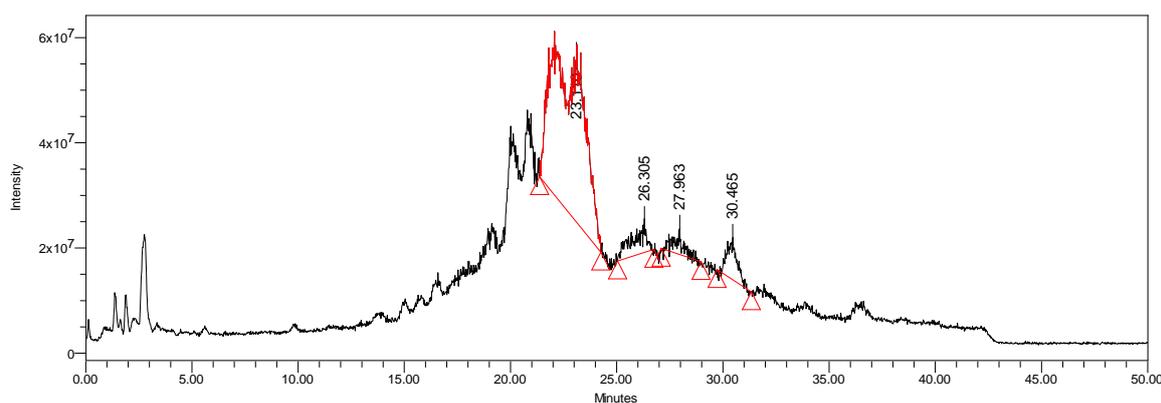


Figura 74. Espectro de massas ESI-quadrupolo MS+ da amostra 43M_A, TR = 23,1'; 26,3'; 28,0' e 30,5'.

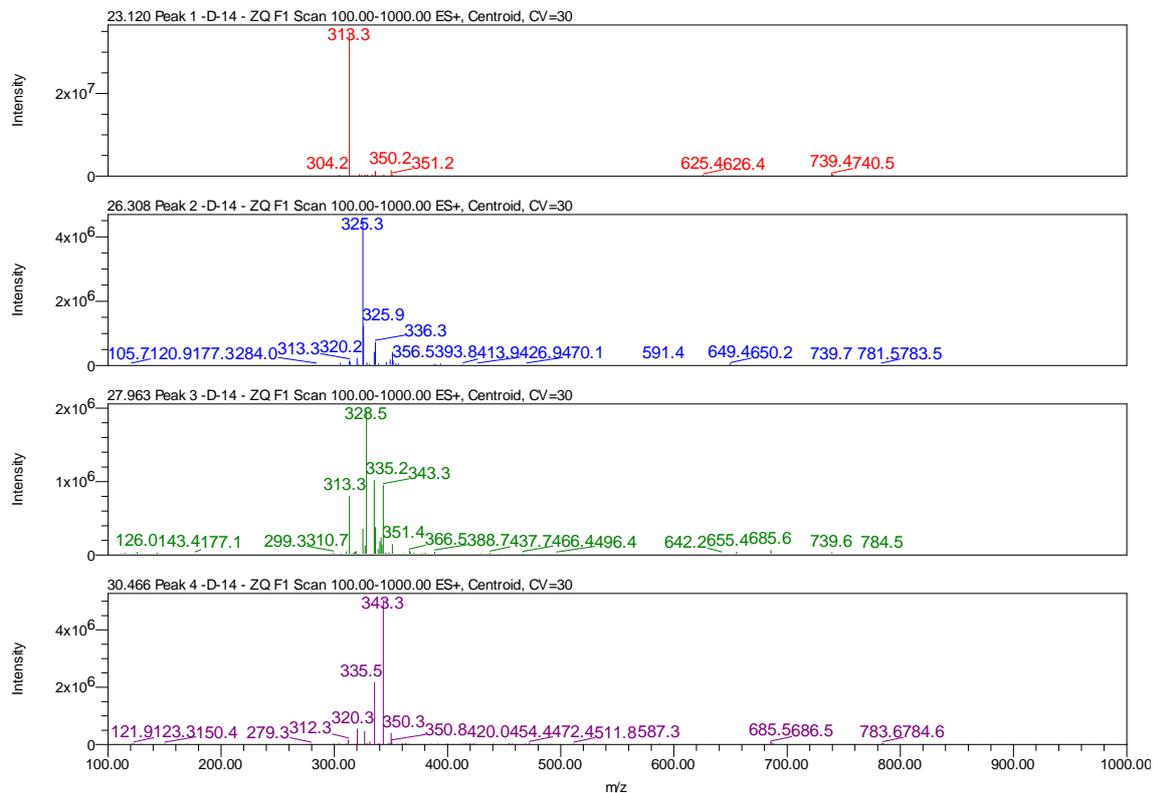


Figura 75. Cromatograma HPLS-ESI-MS em modo TIC MS+ da amostra 43M_A. Condições cromatográficas: gradiente B. Coluna C18, X-Terra, Waters – C18, (4,6 mm x 250 mm, 5 μ m).

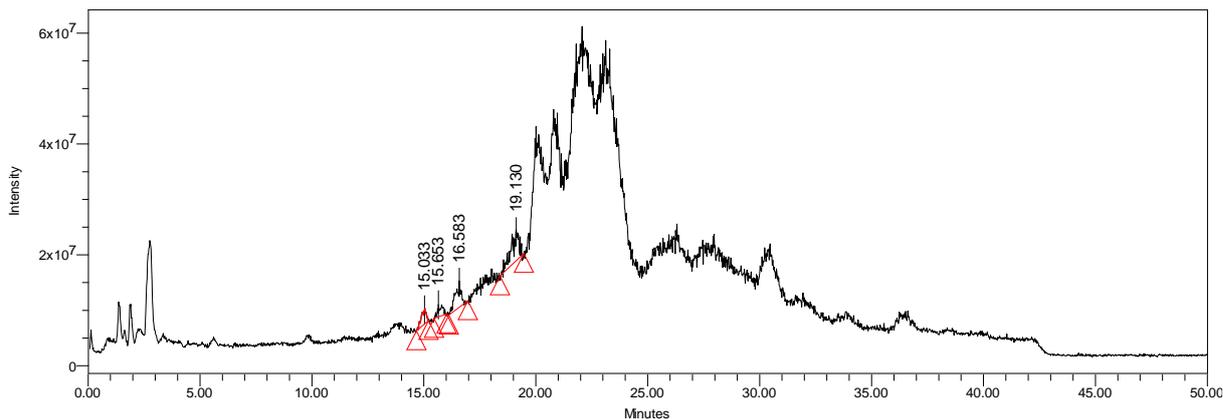


Figura 76. Espectro de massas ESI-quadrupolo MS+ da amostra 43M_A, TR = 15,0'; 15,7'; 16,6' e 19,1'.

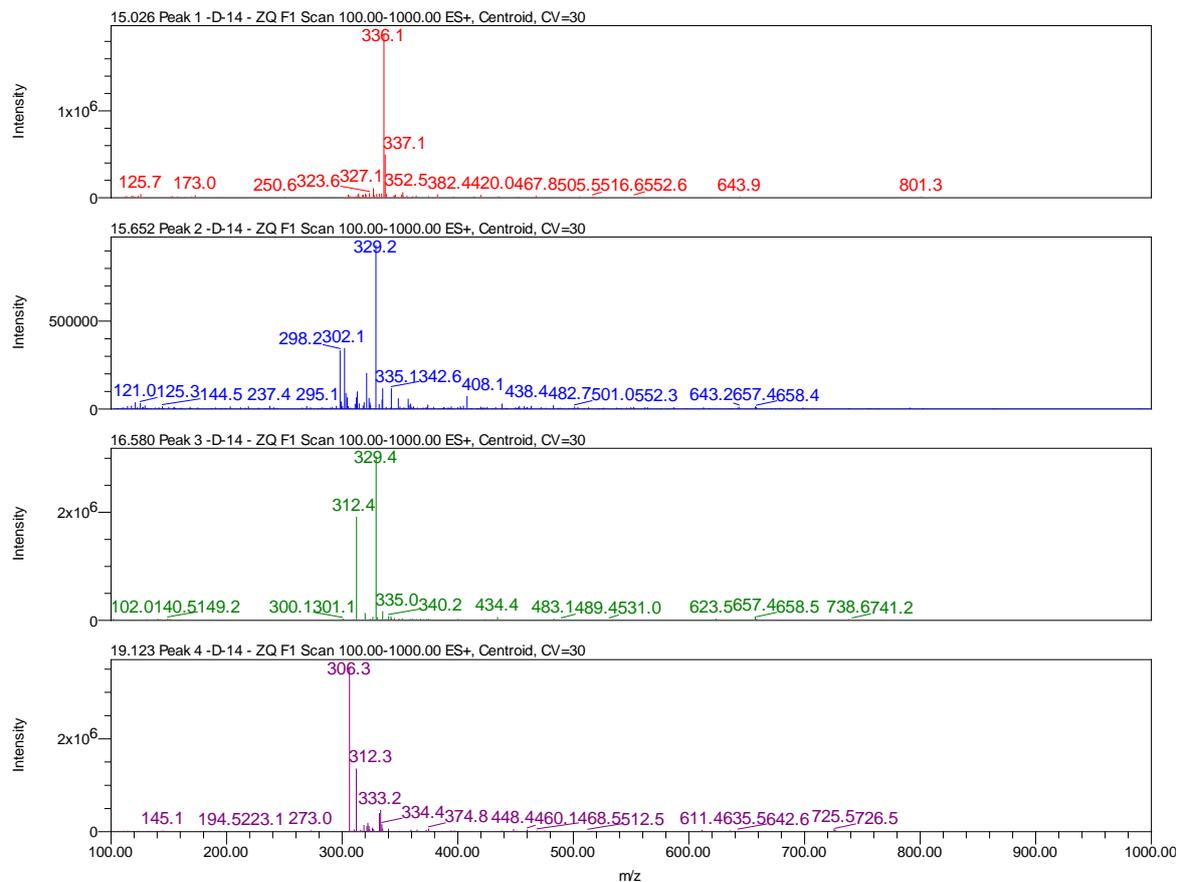


Figura 77. Cromatograma da amostra 43M_A por HPLC-DAD monitorado em 300 nm. Condições cromatográficas: Gradiente exploratório. Coluna C18, X-Terra, Waters – C18, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).

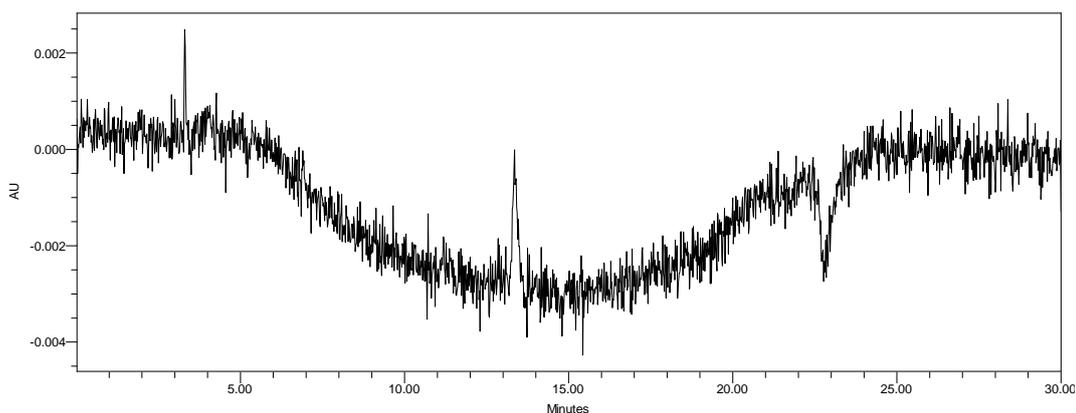


Figura 78. Cromatograma HPLS-ESI-MS em modo TIC MS+ da amostra 43M_A. Condições cromatográficas: Gradiente exploratório. Coluna C18, X-Terra, Waters – C18, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).

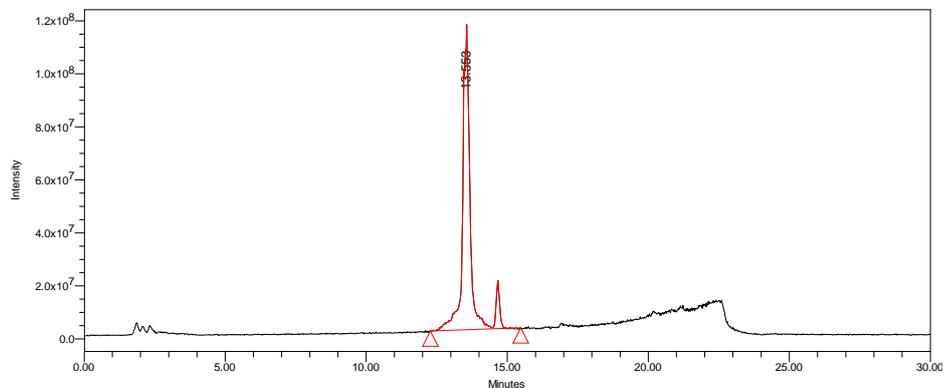


Figura 79. Espectro de massas ESI-quadrupolo MS+ da amostra 43M_A, TR = 13,6'.

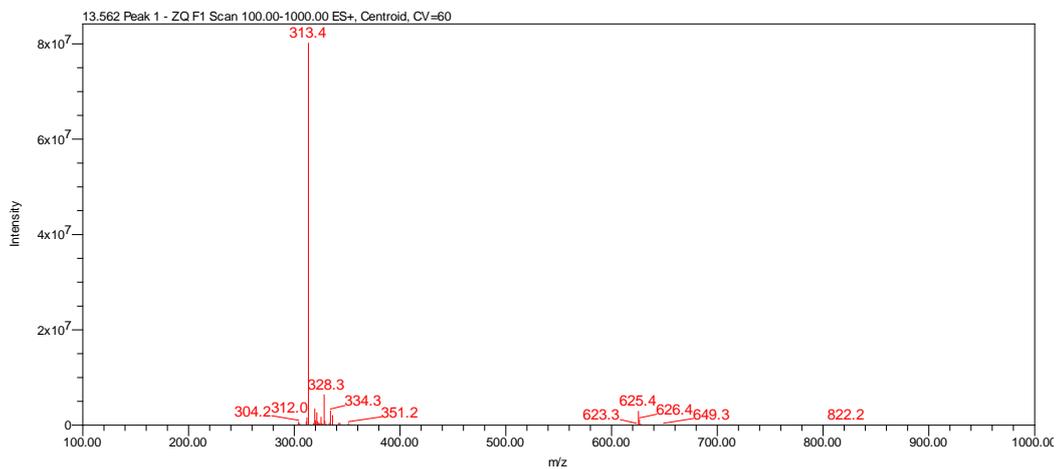


Figura 80. Cromatograma HPLS-ESI-MS em modo TIC MS+ da amostra 43P. Condições cromatográficas: Gradiente exploratório. Coluna C18, X-Terra, Waters – C18, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm). Batzelladina L.

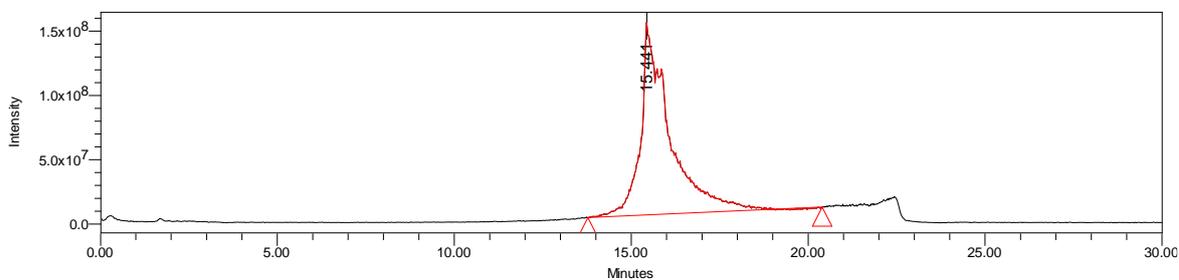
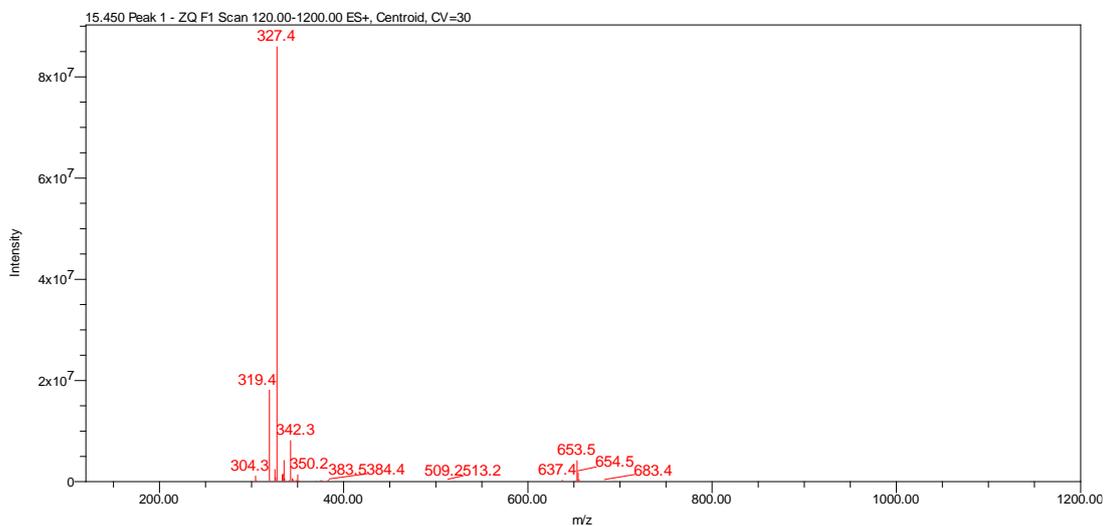


Figura 81. Espectro de massas ESI-quadrupolo MS+ da amostra 43MP, TR = 15,5'. Condições cromatográficas: Gradiente exploratório. Coluna C18, X-Terra, Waters – C18, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm). Batzelladina L.



4.4.3.2. Fracionamento da fração 43M contendo alcaloide majoritário batzelladina F

O fluxo de trabalho desenvolvido para acumular o alcaloide majoritário das frações resultantes da 43M e da fração 43N encontra-se descrito na Figura 82. O catálogo apresentado na Tabela 11 compila o balanço de massa final associado ao fluxo de trabalho da Figura 83. Recuperações exaustivas das amostras foram desenvolvidas, agrupando os compostos minoritários à medida que eram sendo coletados a cada purificação e para cada uma das amostras, monitorando no HPLC-DAD-MS analítico.

O fluxograma baixo ilustra o balanço de massa obtido após as sucessivas purificações nas condições cromatográficas descritas na parte experimental (4.4.3.1), o catálogo encontra-se na tabela 11 e no Anexo.

Figura 82. Fluxograma do fracionamento da fração AcMa17_43 por HPLC-UV.

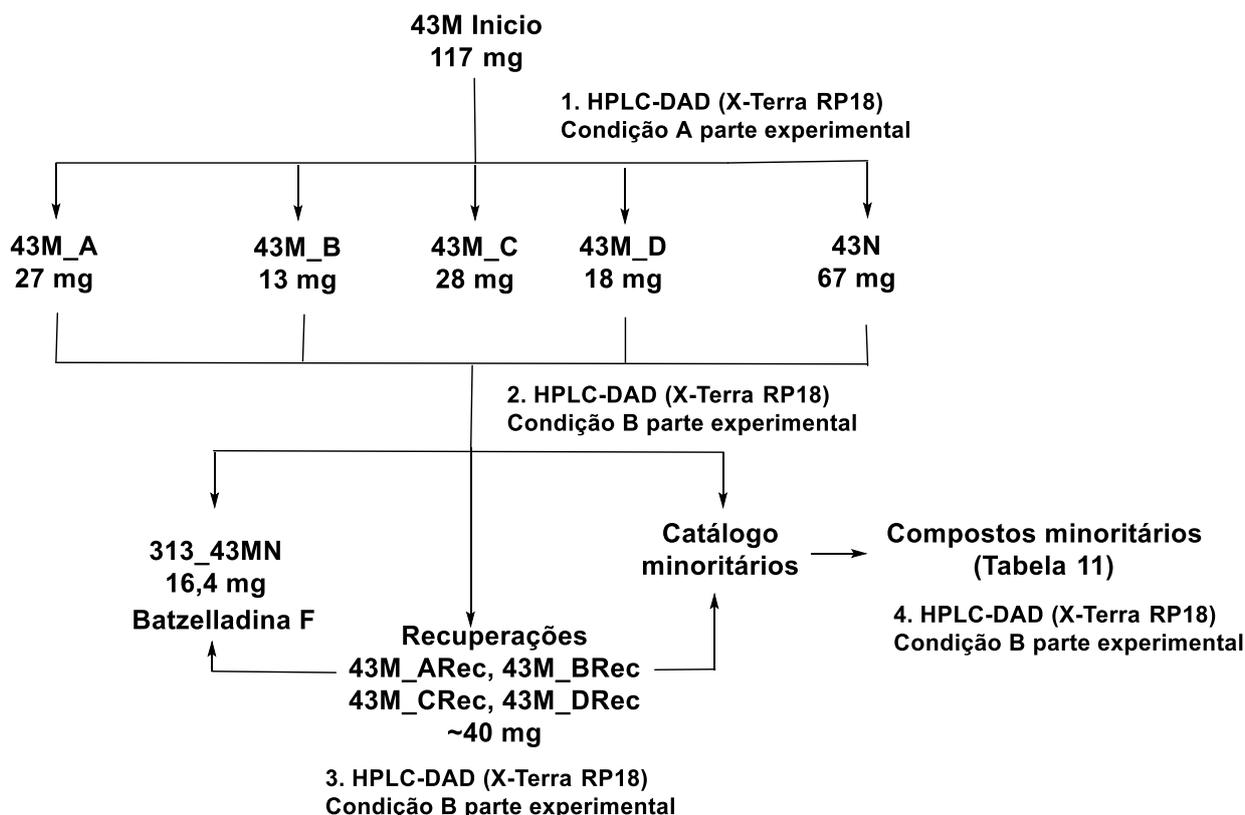


Tabela 11. Catalogo e balanço de massa final dos compostos obtidos das frações 43M e 43N.

Frações	Condição cromatográfica gradiente	Número de vezes aplicada	Massa (g)
43M Inicio	A	1	0,117
43N	B	1	0,067
43M_A	B	2	0,027
43M_B	B	2	0,013
43M_C	B	2	0,028
43M_D	B	2	0,018
71BC313	B	1	0,0009
31343M	B	1	0,0126
31343N	B	1	0,0036
311_PuroB	B	4	0,001
312_puroC	B	5	0,0009
325_PuroB	B	4	<0,001
329_PuroA	B	3	<0,001
329_PuroB	B	4	<0,001
328_PuroB	B	4	<0,001
321_PuroB	B	4	<0,001
343_PuroA	B	3	<0,001
335_PuroA	B	3	<0,001
43M_Rec Final	-	-	0,0106
43N_Rec	-	-	0,042

A elucidação estrutural dos minoritários obtidos em quantidade menor do que 1 mg não é viável, pois os experimentos de ^{13}C frequentemente apresentam ausência de picos nesta quantidade de amostra para os alcaloides batzelladínicos, com seus experimentos de RMN de ^{13}C e os bidimensionais HMBC e HSQC incompletos.

Devido a isso e ao tempo disponível para concluir este projeto tais compostos foram analisados e encontram-se nos Anexos. A prioridade para obtenção de seus os dados experimentais foram **melhor pureza E maior quantidade em massa**, de acordo com os espectros de massas ESI-quadrupolo MS+ (Vide Item 4 dos Anexos).

4.4.3.3. Exemplo das purificações sucessivas do catálogo de minoritários

O fluxograma da figura 83 e os dados do sistema cromatográfico analítico HPLC-DAD-MS apresentados nas figuras 84 – 89 exemplificam o processo de purificação desenvolvido após sucessivas cromatografias das frações resultantes, das frações iniciais (43M e 43N) enquanto acumulava-se a batzelladina F.

Como o objetivo primário foi o de acumular o majoritário batzelladina F para os ensaios *in vivo*, manteve-se como objetivo secundário agrupar os demais compostos minoritários, em frações distintas entre si, a cada nova replicação da condição cromatográfica B desenvolvida enquanto acumulava-se a batzelladina F.

O estudo desenvolvido neste projeto com a batzelladina F mostra-se aplicável e reproduzível futuramente com o restante do extrato AcOEt da esponja (9 g). Objetivando a otimização da condição cromatográfica para os compostos minoritários mais interessantes catalogados no Anexo item 4.

Mudar a coluna para outra de seletividade diferente na etapa em que as frações estiverem semi puras contendo compostos homólogos coeluinto em C18 é essencial para minimizar a perda de massa dos minoritários, não foi possível fazer isso simultaneamente ao acúmulo da batzelladina F. Sugere-se fases estacionárias diferentes das utilizadas neste trabalho (Ph-3, PFP) e se necessário condições gradiente MeOH:H₂O ou MeCN:H₂O para melhorar a seletividade, acidificados com ácido fórmico 0,1%.

O composto minoritário m/z 312 foi descrito abaixo como exemplo ilustrativo das purificações sucessivas dos minoritários, inicialmente o composto encontrava-se em mistura de outros compostos (Figuras 85 - 87) e a cada recuperação passava a ser recuperado em maior pureza, repetindo a condição cromatográfica B (Figuras 87 – 89) enquanto acumulava-se o majoritário batzelladina F.

Observa-se que a quantidade de impurezas presente é menor na figura 100, se comparado com a figura 87, primeira amostra obtida enriquecida no composto minoritário m/z 312.

Figura 83. Fluxograma das purificações sucessivas do catálogo de minoritários, por HPLC-UV.

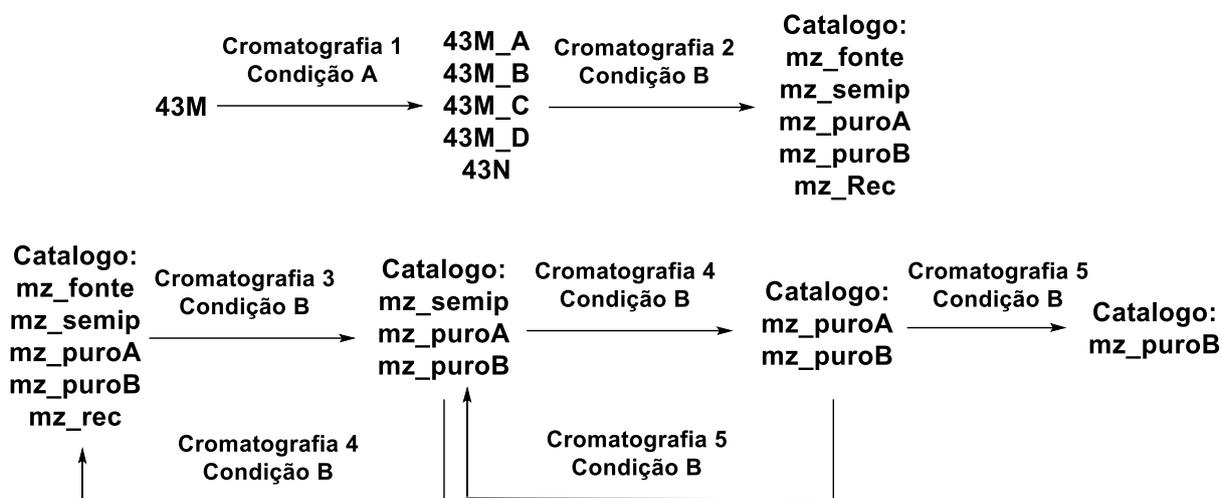


Figura 84. Cromatograma da amostra 312_Fonte por HPLC-DAD monitorado em 300 nm. Condições cromatográficas: Gradiente exploratório. Coluna C18, X-Terra, Waters – C18, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).

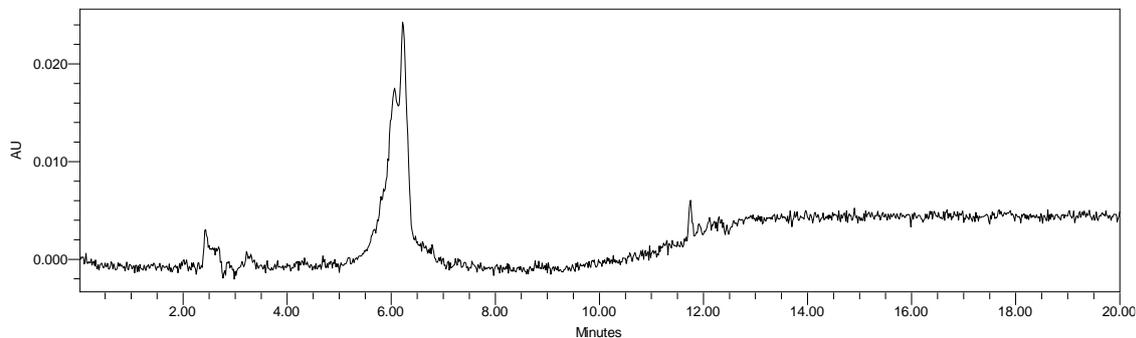


Figura 85. Cromatograma HPLS-ESI-MS em modo TIC MS+ da amostra 312_Fonte. Condições cromatográficas: Gradiente exploratório. Coluna C18, X-Terra, Waters – C18, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).

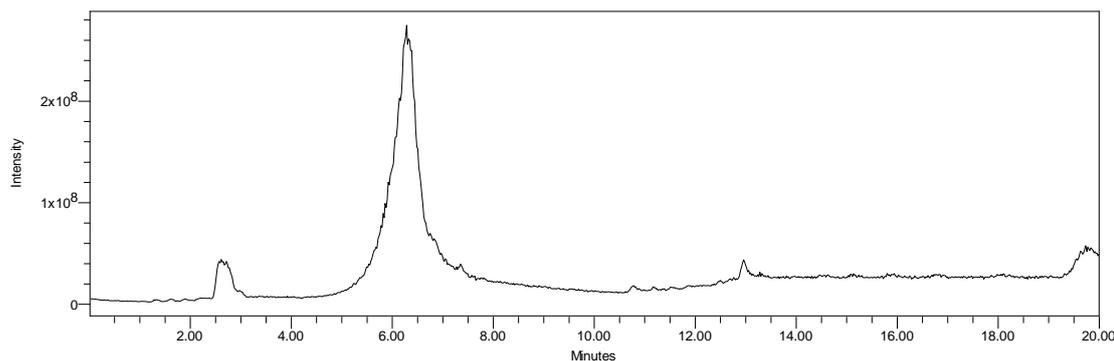


Figura 86. Espectro de massas ESI-quadrupolo MS+ da amostra 312_Fonte, TR = 6,3'.

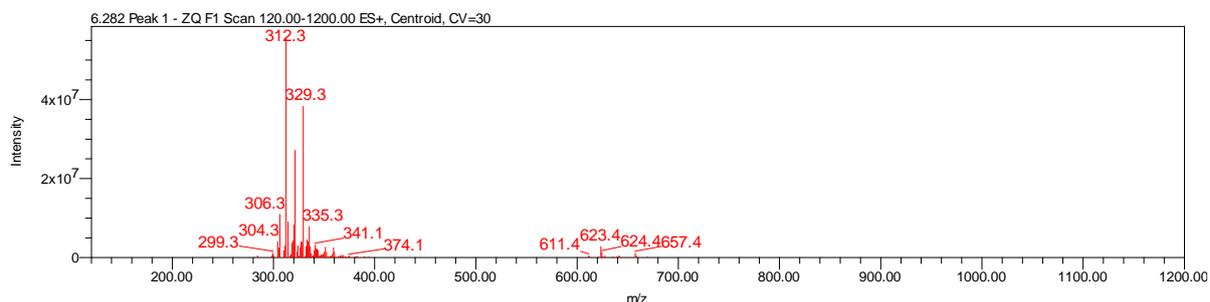


Figura 87. Cromatograma da amostra 312_PuroC por HPLC-DAD monitorado em 300 nm. Condições cromatográficas: Gradiente exploratório. Coluna C18, X-Terra, Waters – C18, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).

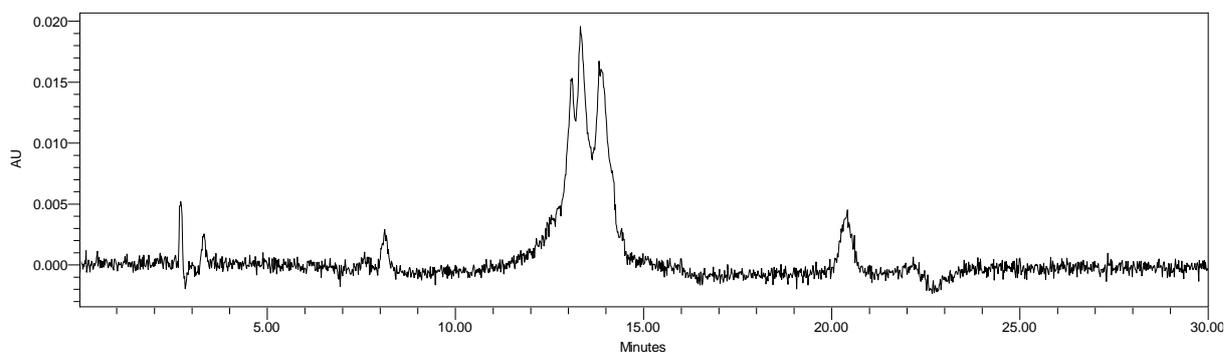


Figura 88. Cromatograma HPLS-ESI-MS em modo TIC MS+ da amostra 312_PuroC. Condições cromatográficas: Gradiente exploratório. Coluna C18, X-Terra, Waters – C18, (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).

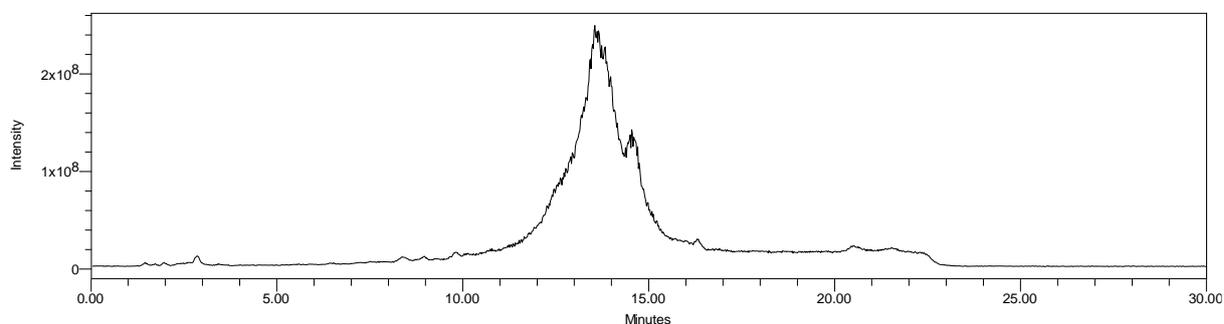
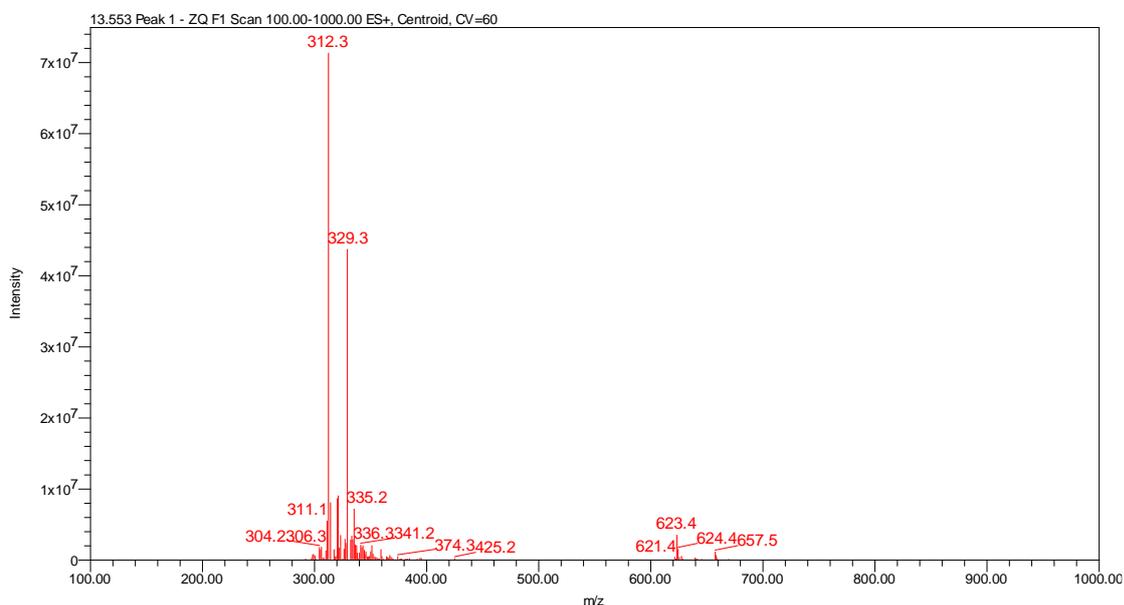


Figura 89. Espectro de massas ESI-quadrupolo MS+ da amostra 312_PuroA, TR = 6,3'.



O composto foi obtido no fim da quinta recuperação ainda em mistura com um composto homólogo (Figura 89) e até o momento sua estrutura não foi elucidada pela complexidade dos seus espectros de RMN. Uma nova repurificação da amostra é inviável devido a pequena quantidade de massa.

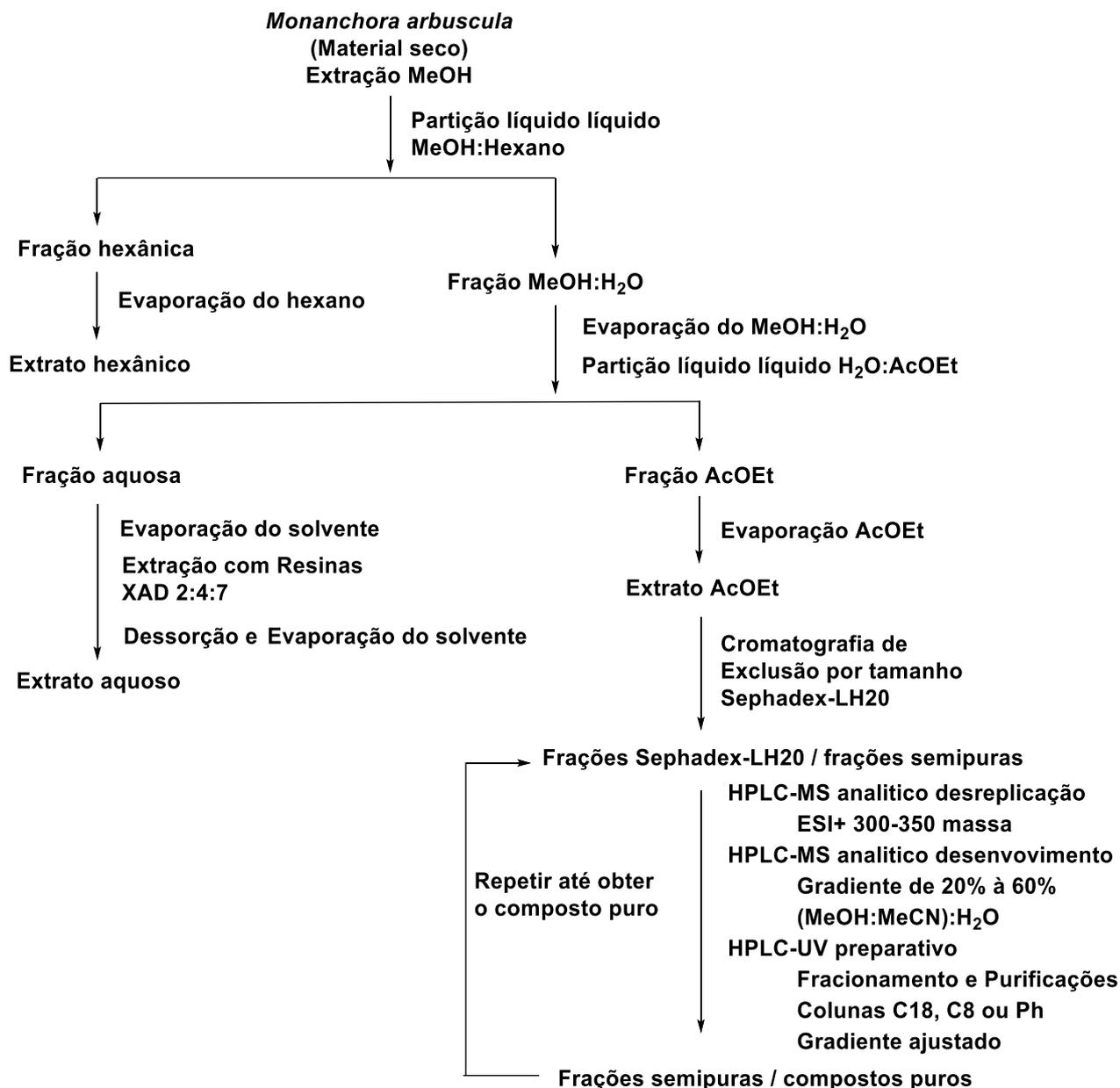
4.4.3.4. Fluxograma modelo para a purificação de compostos batzelladínicos a partir de extratos de esponjas *monanchora arbuscula*

A figura 90 apresenta uma proposta de procedimento sequencial de purificação para a obtenção e acúmulo de compostos alcaloides batzelladínicos da esponja baseado nos aprendizados descritos neste projeto, de forma resumida, desde a extração dos compostos da esponja, passando pelas purificações por cromatografia em coluna por exclusão por tamanho utilizando Sephadex-LH20 como fase estacionária, seguindo pela desreplicação das frações por HPLC-MS-DAD, desenvolvimento analítico de metodologia de purificação em HPLC-MS-UV analítico e purificações sequenciais em HPLC-UV preparativo, com acúmulo dos compostos de interesse.

A desreplicação deve ser feita para **cada amostra**, analisando as frações obtidas por HPLC-UV preparativo no HPLC-UV-MS analítico, sempre que a amostra for de elevada complexidade e número de compostos presentes. Agrupando-as por similaridade à

cada nova purificação sequencial. Estando atento a cada nova purificação para a seletividade dos compostos presentes, pois nestas últimas etapas, quando a fração já encontra-se quase pura, são necessários ajustes finos para uma melhor resolução dos picos e boa recuperação do composto de interesse.

Figura 90. Fluxograma para isolamento de compostos batzelladínicos de extratos de esponjas *monanchora arbuscula* utilizados neste trabalho.



4.5. Caracterização e análise dos compostos purificados por RMN e HPLC-MS-LSD-DAD

4.5.1. Identificação estrutural da batzelladina L

A substância MA71Dd foi isolada como um óleo marrom. A desreplicação foi realizada utilizando o dado de espectrometria de massas de baixa resolução de MA71Dd e realizando-se busca na base de dados Dictionary of Natural Products, considerando-se uma faixa de massa exata de ± 2 Da em relação ao íon $[M+H]^+$ detectado e a fonte biológica como sendo esponjas do gênero *Monanchora*. Houve coincidência para a batzelladina L. A análise de HPLC-ELSD-MS de MA71Dd mostrou a presença de um íon $[M+2H]^{++}$ em m/z 327,3 $[M+2H]^{++}$ e em m/z 653,4 $[M+H]^+$ referente ao pico cromatográfico com TR = 15,4 min (Figura 94 e Figura 95).

A partir dos espectros de RMN de 1H e ^{13}C do composto MA71Dd (Figura 91 e Figura 92) foi possível a identificação da substância como a batzelladina L (Tabela 12).

A subfração 43P obtida no item 4.4.2.3 corresponde à batzelladina L, muito semelhante a obtida inicialmente MA71Dd (figura 102), obteve-se 43 mg do composto batzelladina L a partir da fração 43P (figura 95).

Figura 91. Estrutura do composto MA71Dd.

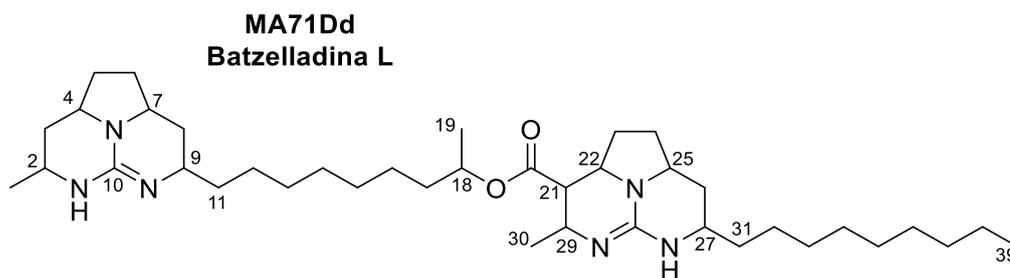


Figura 92. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) do composto MA71Dd.

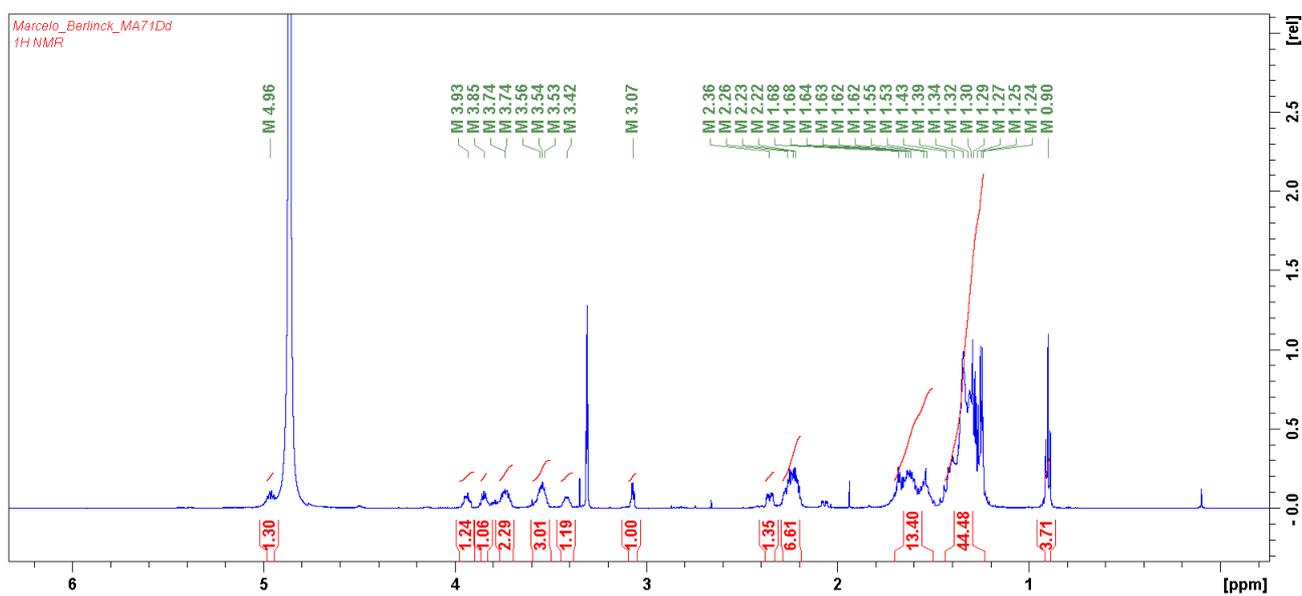


Tabela 12. Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C (14,1 T) para a substância MA71Dd com os dados reportado na literatura para a batzelladina L.

Posição	MA71Dd		batzelladina L (Hua <i>et al.</i> , 2007)	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1	1,27 (d, 6,4)	20,9	1,26 (3H, d, 6,4)	20,8
2	3,54 (m)	47,4	3,54 (m)	47,3
3	2,22 (m) e 1,25 (m)	37,0	2,22 (m) e 1,25 (m)	37,0
4	3,74 (m)	57,8	3,74 (m)	57,5
5	2,22 (m) e 1,68 (m)	31,2	2,22 (m) e 1,67 (m)	31,1
6	2,22 (m) e 1,68 (m)	31,2	2,22 (m) e 1,67 (m)	31,1
7	3,74 (m)	57,7	3,74 (m)	57,4
8	2,26 (m) e 1,24 (m)	34,9	2,24 (m) e 1,23 (m)	34,8
9	3,42 (m)	51,7	3,41 (m)	51,6
10	-	151,3	-	151,1
11	1,62 (m) e 1,53 (m)	35,9	1,60 (m) e 1,48 (m)	35,9
12	1,34 (m)	26,3	1,33 (m)	26,2
13	1,34 (m)	30,5 - 30,7	1,33 (m)	30,5
14	1,34 (m)	30,5 - 30,7	1,33 (m)	30,5
15	1,34 (m)	30,5 - 30,7	1,33 (m)	30,5
16	1,34 (m)	26,7	1,33 (m)	26,5
17	1,39 (m)	37,0	1,33 (m)	36,8
18	4,96 (m)	73,5	4,97 (m)	73,4
19	1,25 (d, 6,3)	20,6	1,24 (3H, d, 6,4)	20,5
20	-	170,4	-	170,4
21	3,07 (m)	46,0	3,08 (t, 4,0)	45,6
22	3,93 (m)	57,8	3,96 (m)	57,9
23	2,23 e 1,62	29,5	2,23 (m) e 1,62 (m)	29,2
24	2,22 e 1,64	31,6	2,20 (m) e 1,64 (m)	31,4
25	3,53	53,4	3,54 (m)	57,3
26	2,36 (m) e 1,43 (m)	34,3	2,34 (m) e 1,42 (m)	34,2
27	3,56 (m)	57,6	3,54 (m)	53,2
28	-	151,7	-	151,5
29	3,85 (m)	50,0	3,84 (m)	49,9
30	1,29 (d, 6,7)	18,6	1,28 (3H, d, 6,4)	18,6
31	1,63 (m) e 1,55 (m)	37,1	1,64 (m), 1,54 (m)	37,0

32	1,34 (m)	26,3	1,33 (m)	26,2
33	1,34 (m)	30,5 - 30,7	1,33 (m)	30,5
34	1,34 (m)	30,5 - 30,7	1,33 (m)	30,5
35	1,34 (m)	30,5 - 30,7	1,33 (m)	30,5
36	1,34 (m)	30,5 - 30,7	1,33 (m)	30,5
37	1,30 (m)	33,2	1,33 (m)	33,0
38	1,32 (m)	23,9	1,33 (m)	23,7
39	0,90 (3H, t, 7,0)	14,6	0,90 (3H, t, 7,0)	14,5

Figura 93. Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, CD_3OD) do composto MA71Dd.

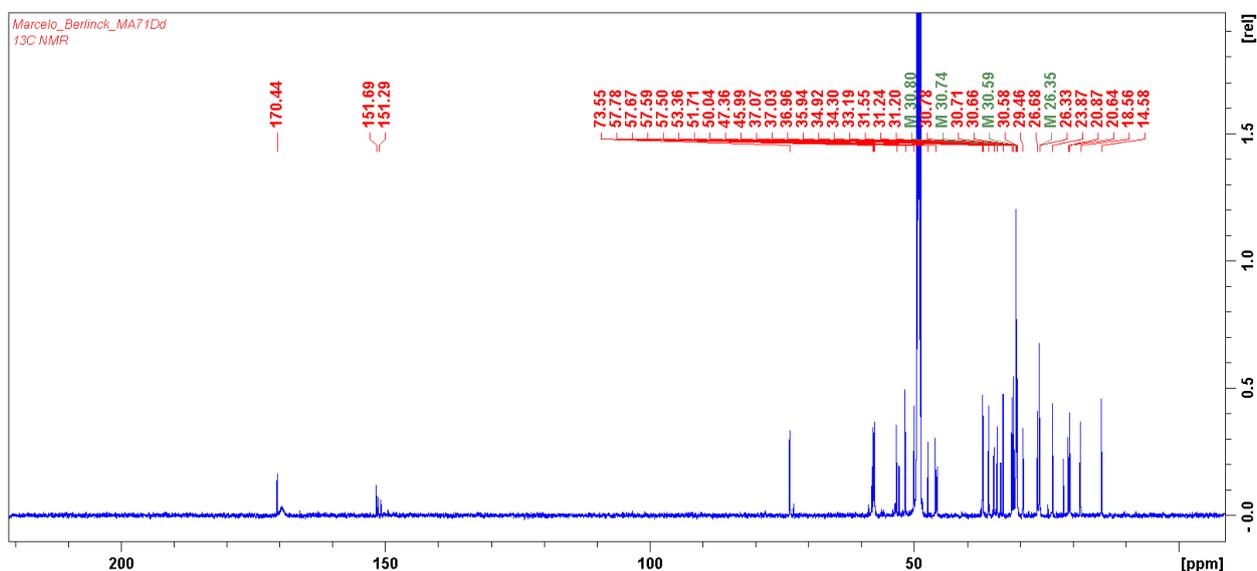


Figura 94. Espectro de massas ESI-quadrupolo MS^+ do composto MA71Dd.

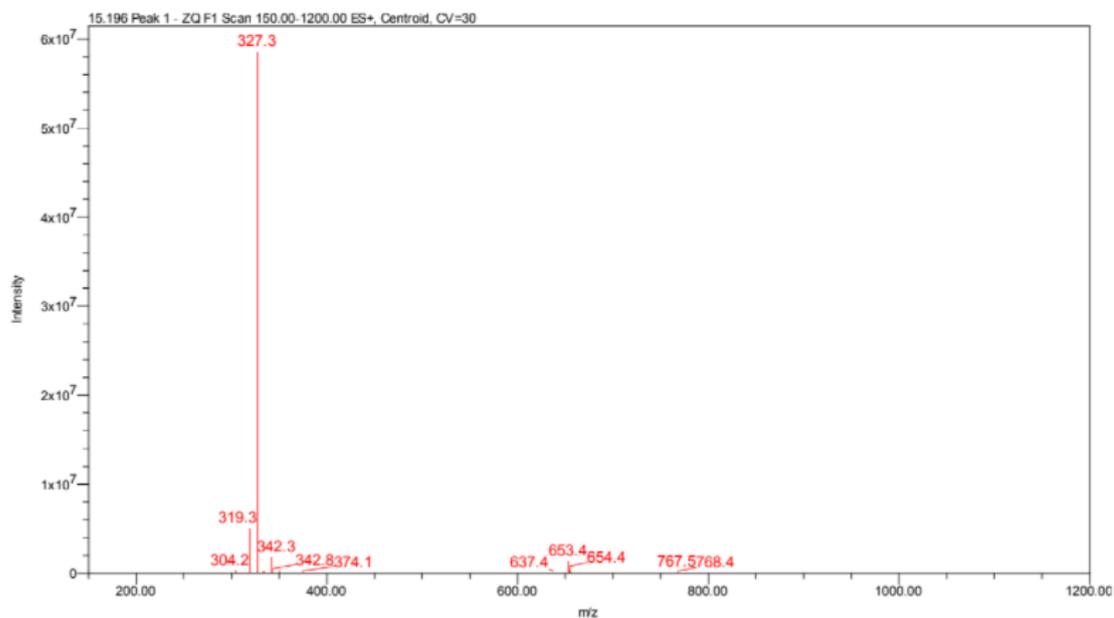


Figura 95. Cromatograma HPLS-ESI-MS em modo TIC MS+ do composto MA71Dd, eluição em gradiente exploratório 20-100% orgânico.

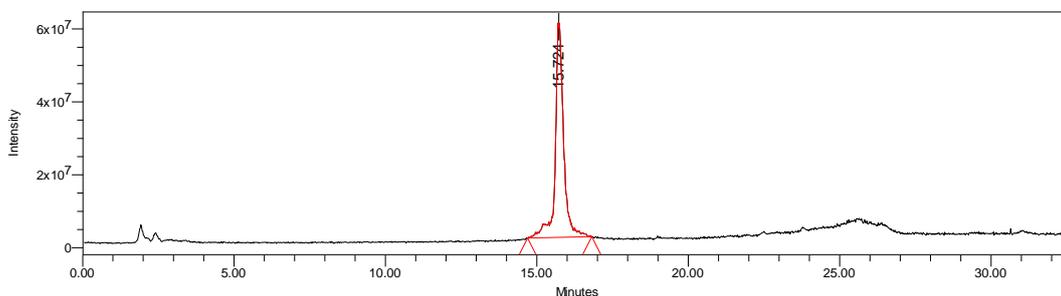
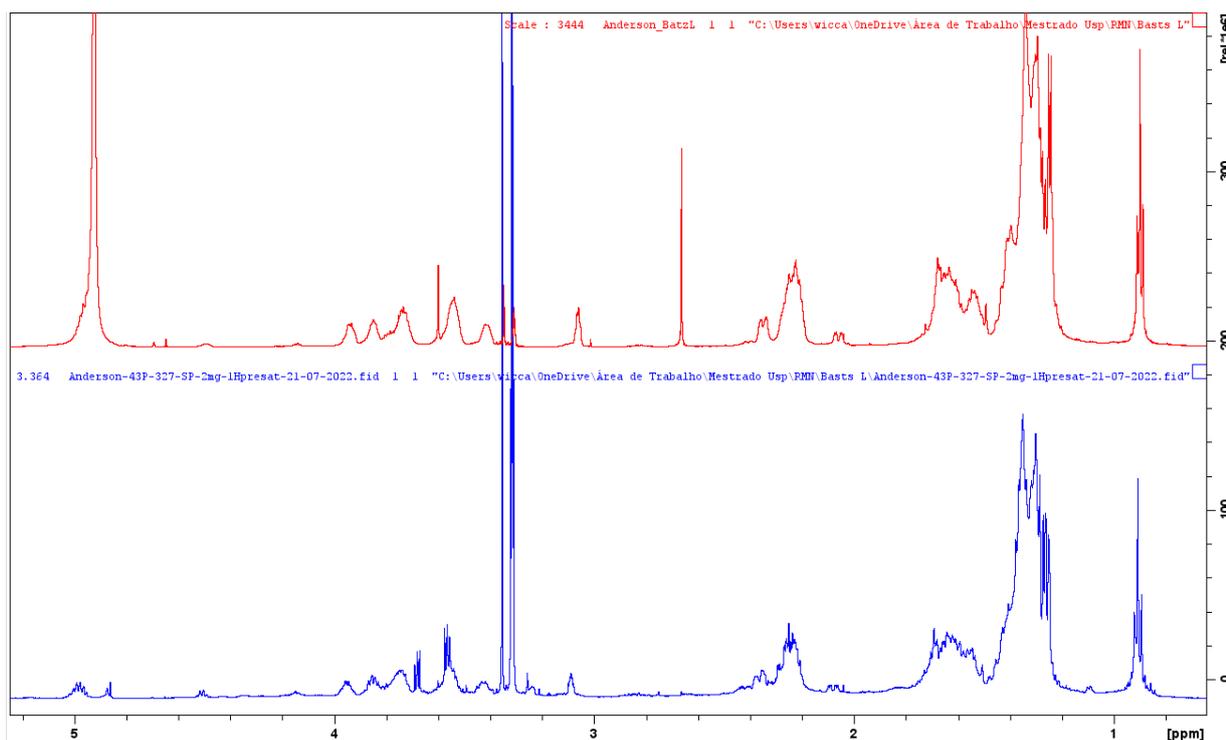


Figura 96. Espectro de RMN de ¹H (600 MHz, CD₃OD) comparativo entre o composto MA71Dd obtido da Ma17s2_71A e da subfração AcMa17_43P, de acordo com seus espectros de RMN - ¹H, (Figura 92).



4.5.2. Elucidação estrutural da substância minoritária (m/z 651)

O composto MA71E foi isolado como um óleo marrom. O seu espectro de massas de HRESIMS em modo positivo de ionização apresentou íon molecular protonado $[M+H]^+$ em m/z 651,5335 (10%), e íon referente à molécula diprotonada $[M+2H]^{++}$ em m/z 326,2676 (100%).

O espectro de RMN de 1H apresentou um sinal de hidrogênio oximetínico em δ_H 4,99 (1H, m), um sinal de hidrogênio metínico em δ_H 4,50 (1H, q, $J = 6,3$ Hz) e sete outros hidrogênios metínicos entre δ_H 3,36 e δ_H 3,86. Também foi possível observar sinais de quatro grupos de metilas em δ_H 0,90 (3H, t, $J = 7,0$ Hz), δ_H 1,25 (3H, d, $J = 6,4$ Hz), δ_H 1,26 (3H, d, $J = 6,4$ Hz) e δ_H 1,37 (3H, d, $J = 6,3$ Hz), além de sinais de hidrogênios multipletos referentes a grupos metileno entre δ_H 1,20 e δ_H 2,85.

Em análise comparativa dos espectros de massas e de RMN de 1H do novo alcaloide minoritário MA71E e da batzelladina L, foi possível observar a presença de um grau de insaturação a mais no esqueleto da molécula do novo alcaloide. A batzelladina L apresenta 8 hidrogênios metínicos entre δ_H 3,08 e 3,96 ppm, enquanto que o composto MA71E apresentou um grupo metínico a menos. Adicionalmente, o espectro de RMN de ^{13}C identificou 4 sinais entre δ_C 47,4 e 57,7 ppm associados ao sistema guanidínico da esquerda por meio das análises de HSQC e HMBC. Outros 3 sinais na mesma região estão associados ao segundo sistema guanidínico da direita, com dois sinais adicionais em δ_C 103,3 e 149,5 ppm referentes aos carbonos da dupla ligação (C-21 e C-22, Tabela 11). Os deslocamentos químicos observados para os carbonos C-21 e C-22 são característicos de um sistema α,β -insaturado conjugado com uma carbonila. O C-22 em relação ao C-21 está ligado diretamente ao nitrogênio guanidínico, contribuindo para o δ_C de cerca de 150 ppm. O carbono carbonílico do éster δ_C 166,1 apresenta diferença de 4 ppm em comparação ao carbono carbonílico do éster da batzelladina L, também associado ao efeito de ressonância do sistema conjugado da carbonila com a ligação dupla em C-21/C-22 (HUA, *et al.*, 2007).

A confirmação da posição da dupla ligação entre os carbonos C-21/C-22 foi obtida por meio das correlações da metila H₃-30 com C-21, e das correlações dos hidrogênios diastereotópicos H₂-23 com C-21 e dos hidrogênios H₂-23 e H₂-24 com o C-22 (Figuras 98 e 99), observadas no espectro de HMBC (Figura 97). Além disso, comparações dos

espectros de ^{13}C do novo alcaloide com os deslocamentos químicos da batzeladina N, substância da mesma classe que apresenta a dupla ligação em posição idêntica disponível na literatura, corroboram para a posição da insaturação nos carbonos C-21/C-22 (HUA, *et al.*, 2007).

Figura 97. Espectro de HMBC (600 MHz, CD_3OD) do composto MA71E.

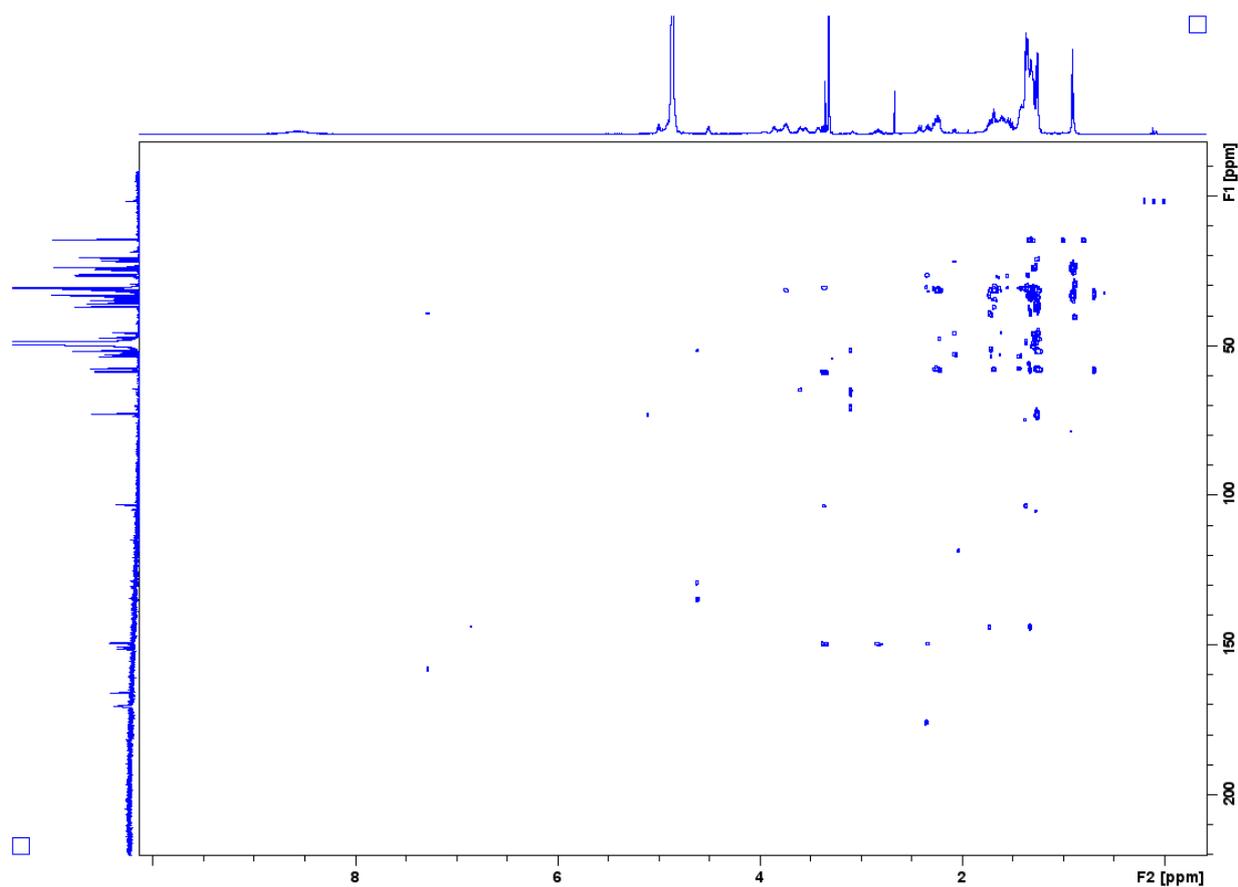


Figura 98. Ampliação do espectro de RMN HMBC (600 MHz, CD₃OD) do composto MA71E.

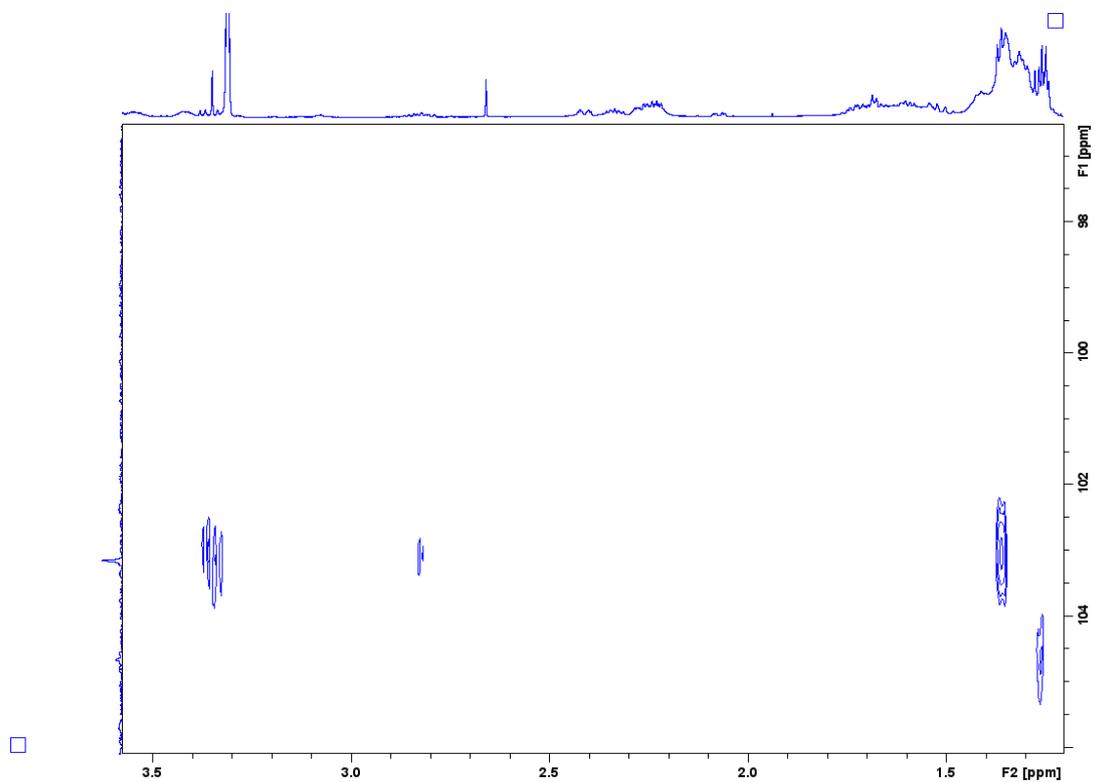


Figura 99. Ampliação do espectro de HMBC (600 MHz, CD₃OD) do composto MA71E.

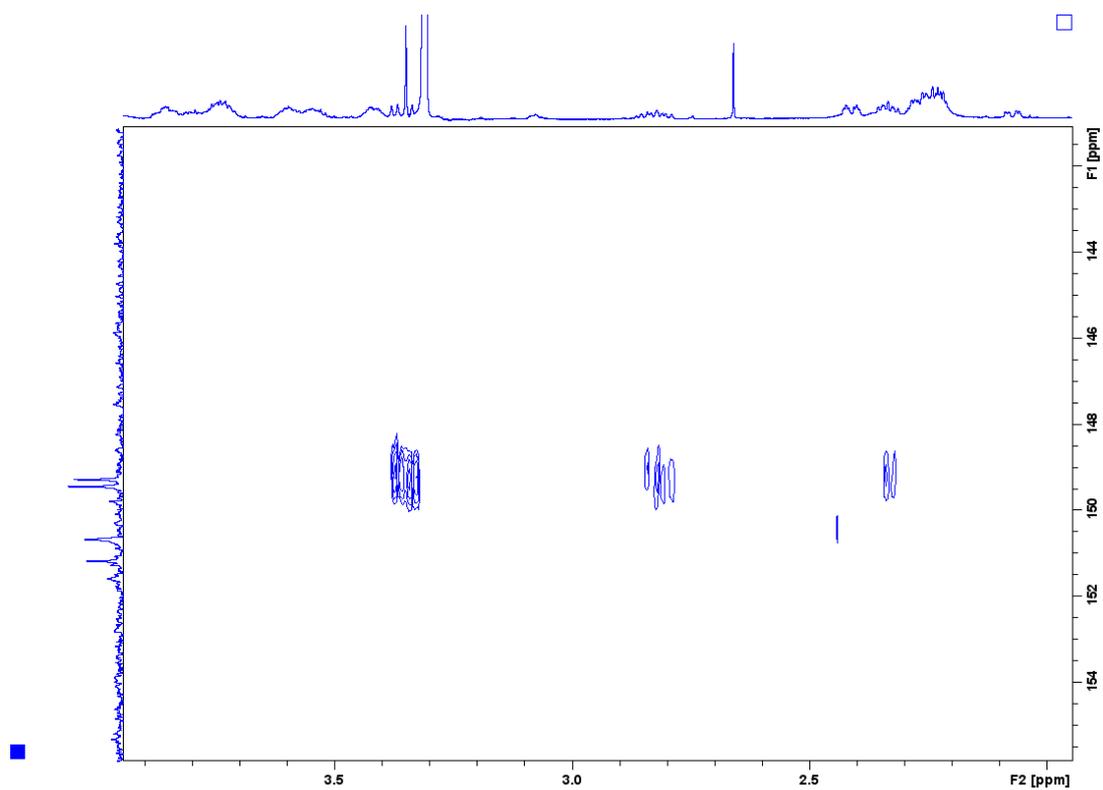


Figura 100. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) do composto MA71E.

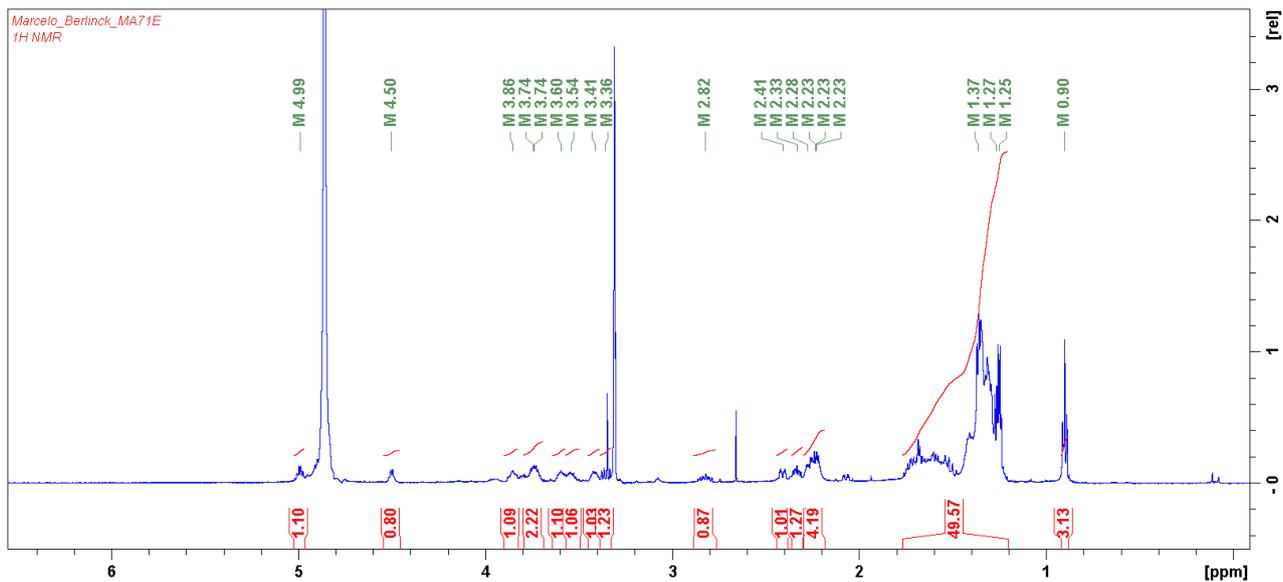


Figura 101. Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, CD_3OD) do composto MA71E.

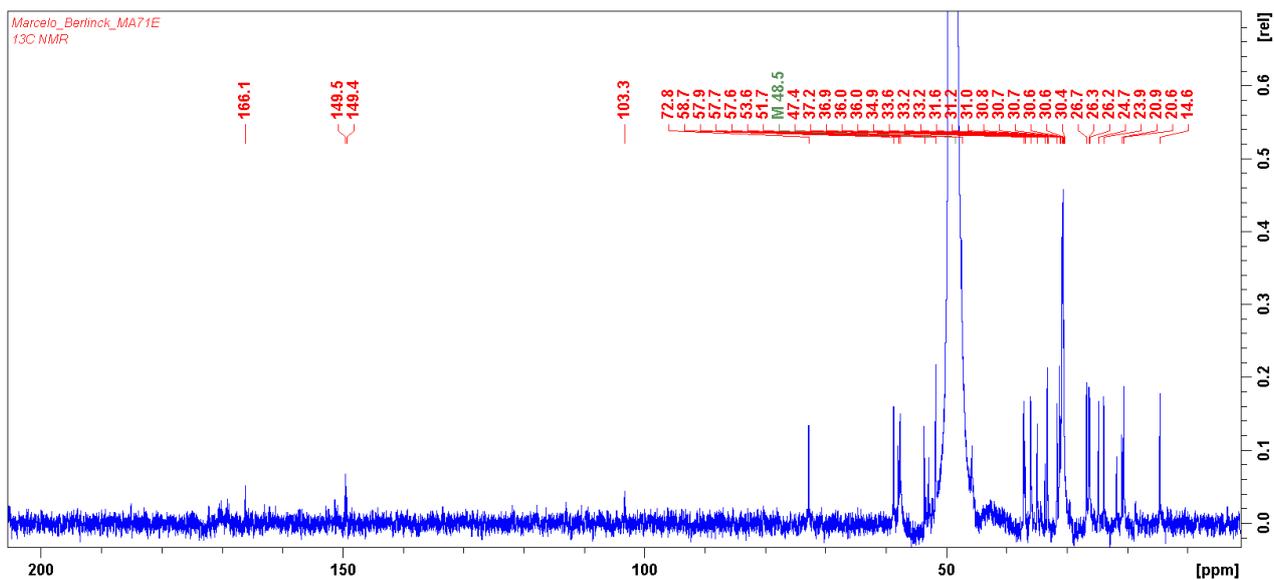
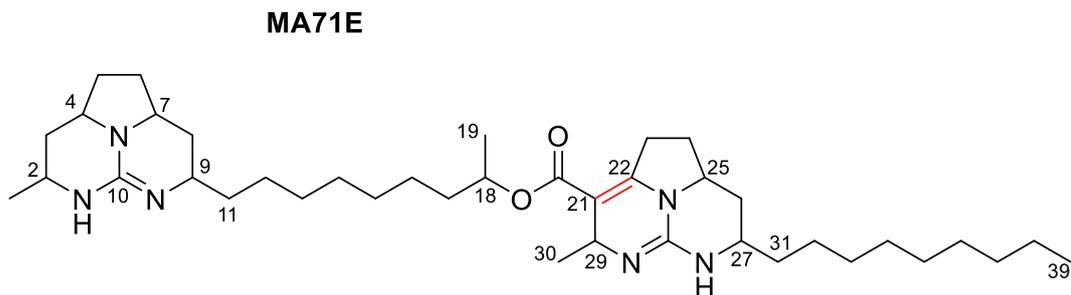


Figura 102. Estrutura do composto MA71E.



Fórmula molecular: C₃₉H₆₆N₆O₂

Massa exata: 650,5247

[M+H]⁺ m/z 651,5320 calculado

[M+2H]⁺⁺ m/z 326,2699 calculado

A análise do espectro HRESI-MS/MS do composto MA71E possibilitou obter informações de fragmentação do íon protonado [M+H]⁺ em *m/z* 651,5335. A fragmentação do íon [M+H]⁺ exibiu íons característicos em *m/z* 304,2759 (100%) e *m/z* 348,2651 (23%), resultantes de um rearranjo de McLafferty (Figuras 104 e 105), confirmando a posição da dupla ligação em C-21/C-22 no sistema guanídínico. Discussão semelhante foi apresentada anteriormente para outros compostos batzelladínicos (HUA, *et al.*, 2007).

As informações de HRMS/MS corroboram com a elucidação da estrutura, destacando mais uma vez a importância do isolamento de quantidades adicionais deste novo composto.

A confirmação da posição dos hidrogênios dos carbonos C-3, C-5, C-7, C9 e C25, C27 foi obtida por meio da verificação das correlações H₁- H₁ espaciais RMN-Noesy entre os prótons dos carbonos C-3 e C5 (Figura 112); C7 e C9 (Figura 113) e C25 e C27 (Figura 114).

Após as sucessivas purificações conforme descrito no item 4.4.2.4, a subfração 43Q obtida encontra-se descrita a seguir (Figuras 106 – 111), com resultado comparável ao obtido para o composto Ma71E. Ensaios adicionais foram desenvolvidos, para desvio da luz polarizada obteve-se (α)_D²⁴ + 22,4 (C 0,1) MeOH. Dicroísmo e UV encontram-se nas Figuras 115 e 116.

Tabela 13. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (14,1 T) de Ma71E.

Posição	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	Posição	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1	1,26 (d, 6,4)	20,9	20	-	166,1
2	3,54 (m)	47,4	21	-	103,3
3	2,23 (m) e 1,25 (m)	36,9	22	-	149,5
4	3,72 (m)	57,6	23	3,36 (m) e 2,82 (m)	31,6
5	2,23 (m) e 1,68 (m)	31,2	24	2,33 (m) e 1,73 (m)	30,4
6	2,23 (m) e 1,68 (m)	31,2	25	3,60 (m)	53,7
7	3,74 (m)	57,7	26	2,41 (m) e 1,51 (m)	33,2
8	2,28 (m) e 1,25 (m)	34,9	27	3,86 (m)	58,7
9	3,41 (m)	51,7	28	-	149,4
10	-	150,8	29	4,50 (q, 6,3)	48,5
11	1,60 (m) e 1,54 (m)	36,0	30	1,37 (d, 6,3)	24,7
12	1,41 (m)	26,2	31	1,72 (m) e 1,54 (m)	36,0
13	1,34 (m)	30,5- 30,8	32	1,41 (m)	26,3
14	1,34 (m)	30,5- 30,8	33	1,34 (m)	30,5- 30,8
15	1,34 (m)	30,5- 30,8	34	1,34 (m)	30,5- 30,8
16	1,34 (m)	26,7	35	1,34 (m)	30,5- 30,8
17	1,63 (m) e 1,54 (m)	37,2	36	1,34 (m)	30,5- 30,8
18	4,99 (m)	72,8	37	1,28 (m)	33,2
19	1,25 (d, 6,4)	20,6	38	1,32 (m)	23,8
			39	0,90 (3H, t, 7,0)	14,6

Figura 103. Proposta de fragmentação para o composto MA71E.

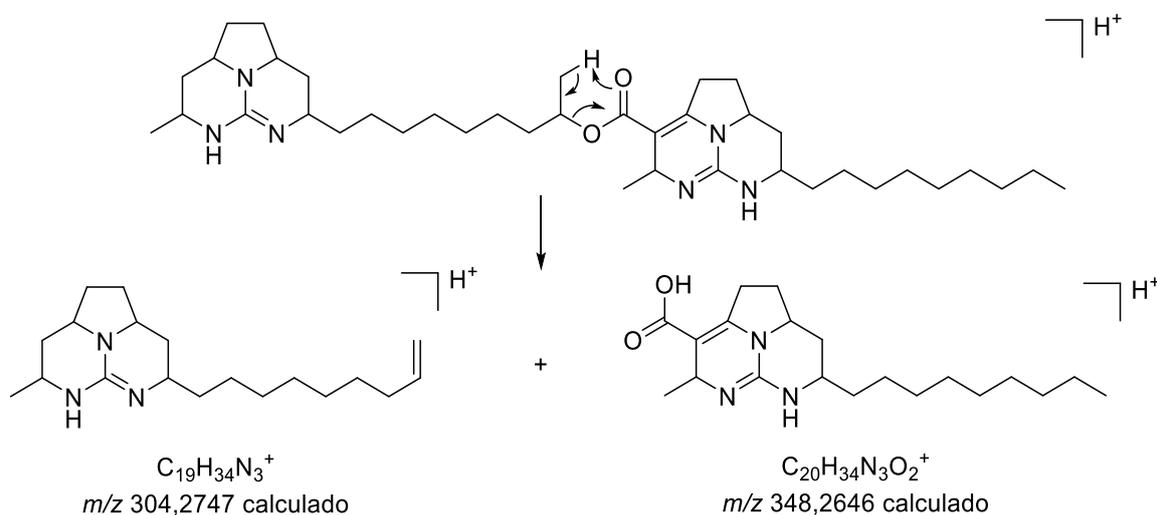


Figura 104. Espectro de MSMS do íon m/z 651,5335 $[M+H]^+$ do composto MA71E, TR = 5,1'.

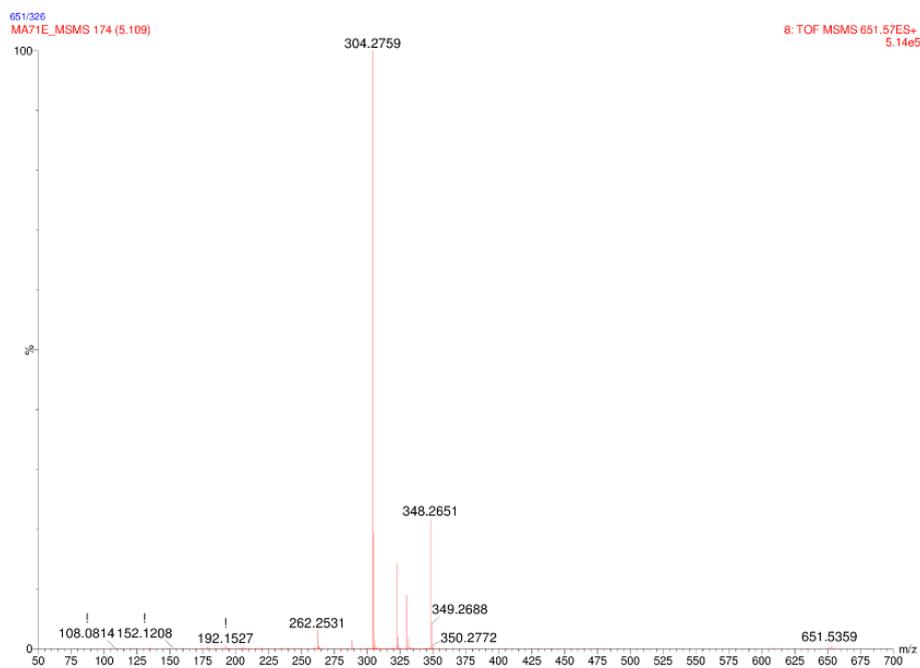


Figura 105. Espectro de HRMS do composto MA71E, TR = 5,1'.

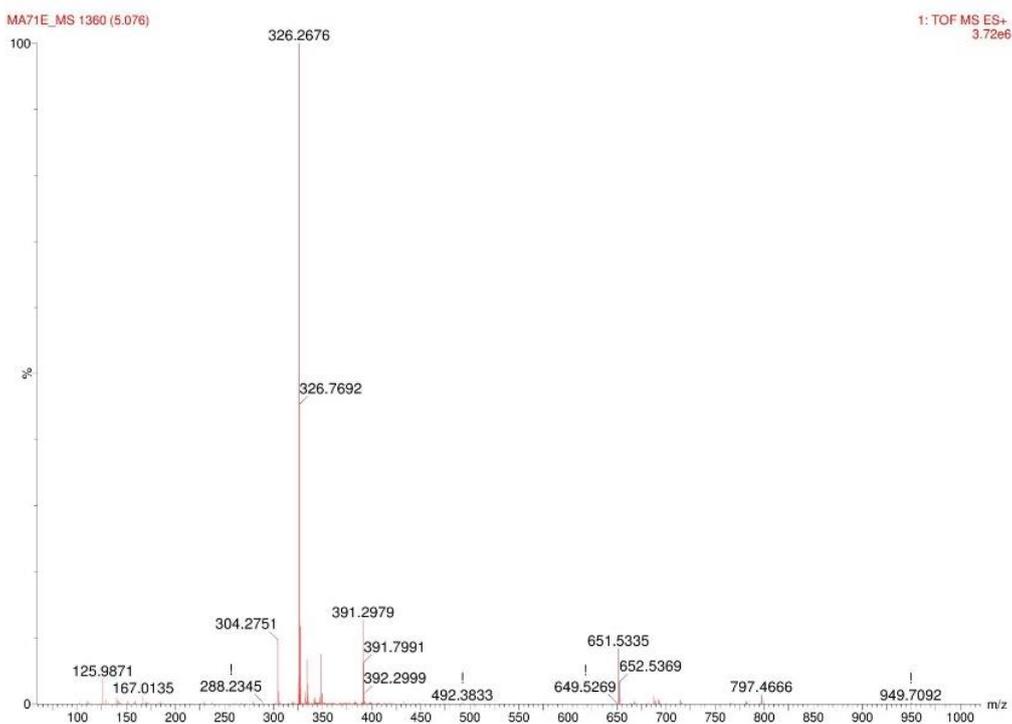


Figura 106. Cromatograma HPLS-ESI-MS em modo TIC MS+ composto 43Q326, eluição em gradiente exploratório 20-100% orgânico.

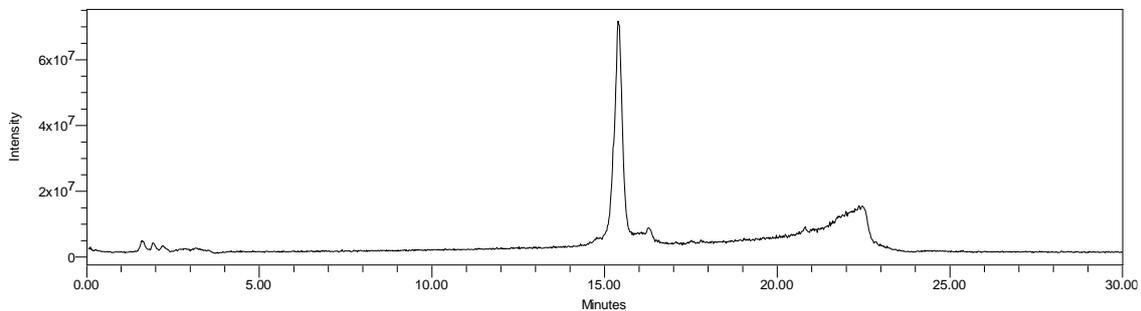


Figura 107. Espectro de massas ESI-quadrupolo MS+ do composto 43Q326, TR = 15,4'.

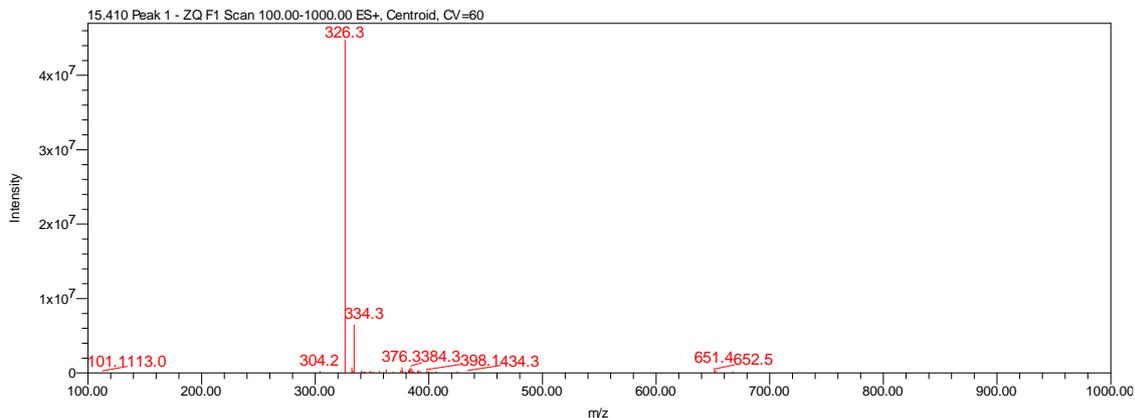


Figura 108. Cromatograma HPLS-UV detecção em 300 nm do composto 43Q326, eluição em gradiente exploratório 20-100% orgânico.

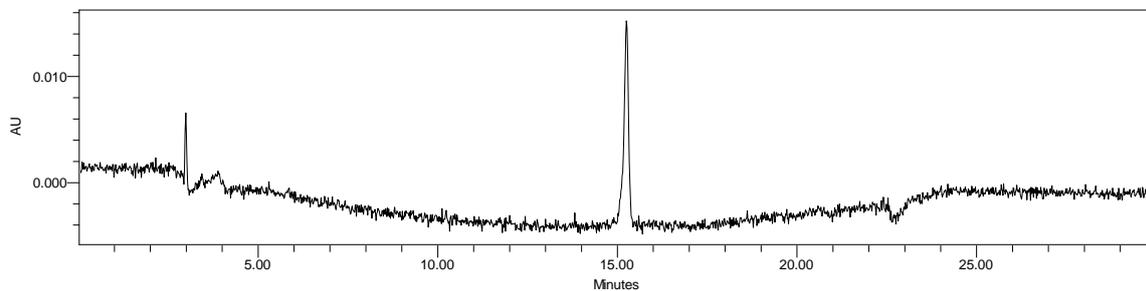


Figura 109. Absorção UV do composto 43Q326.

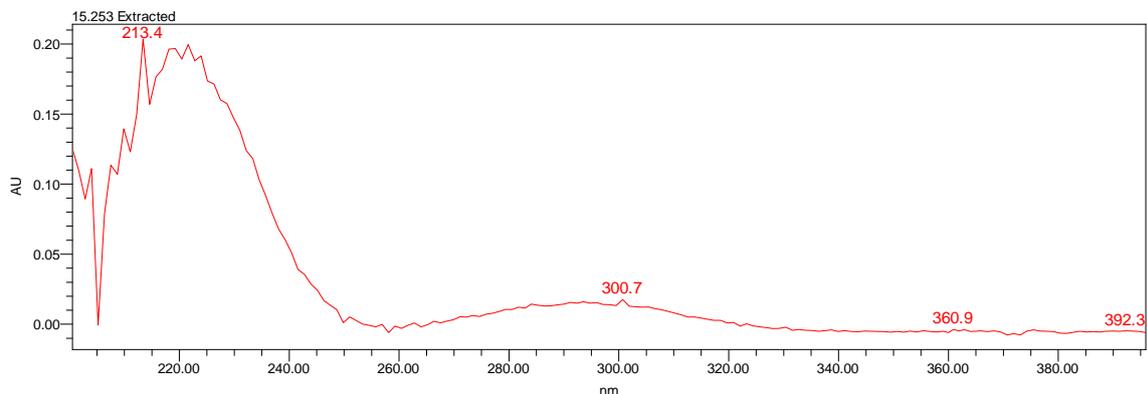


Figura 110. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) do composto 43Q326. (Comparativo com o Ma71E obtido anteriormente).

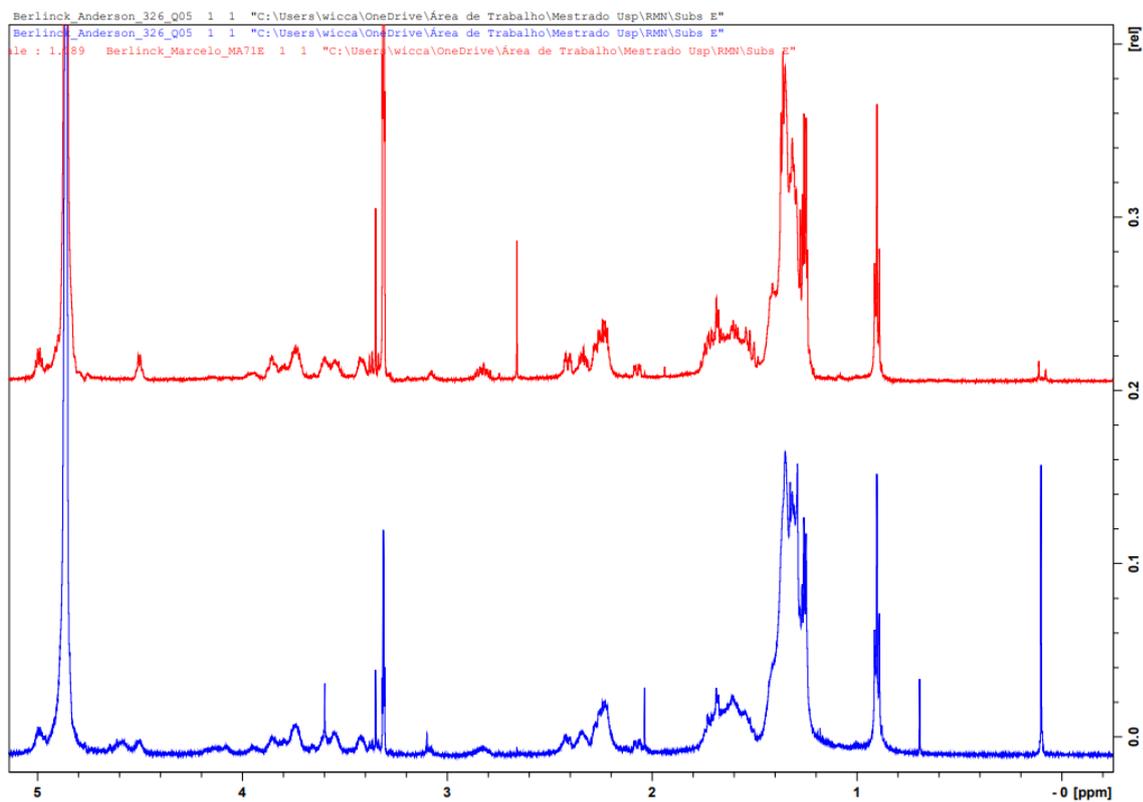


Figura 111. Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, CD_3OD) do composto 43Q326.

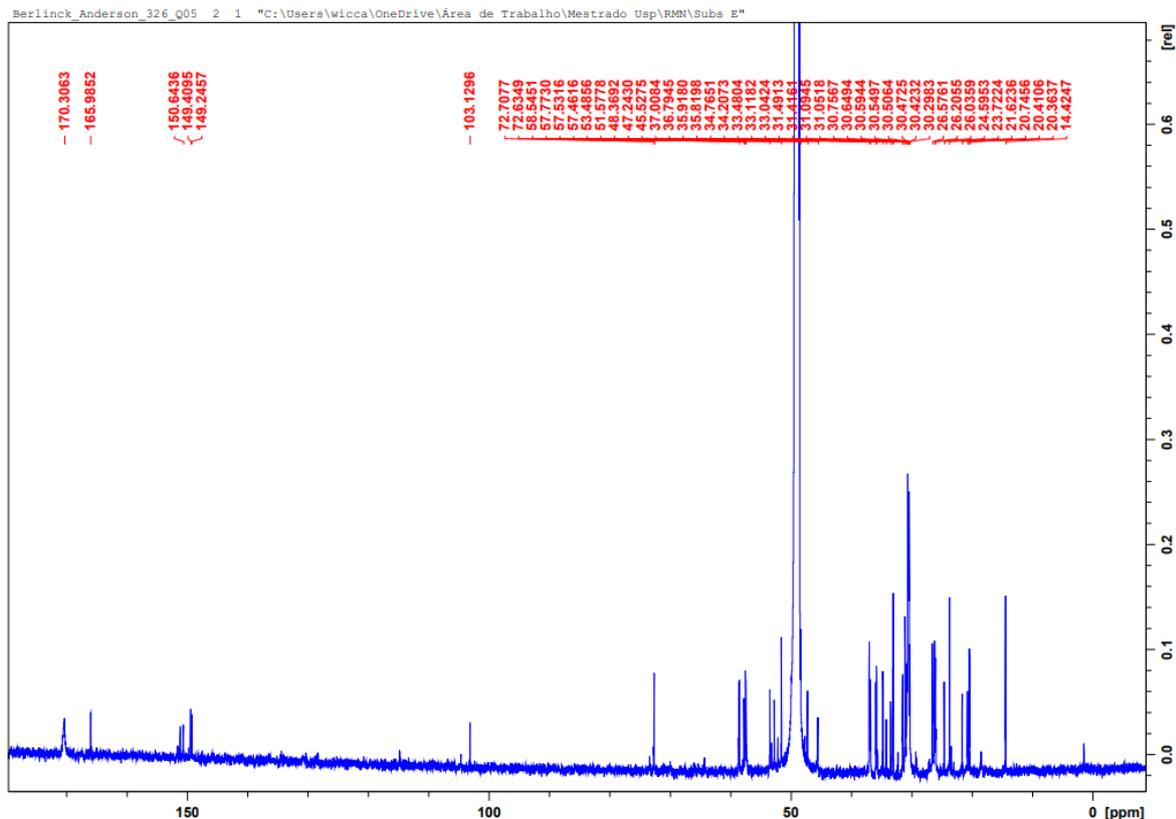


Figura 112. Espectro de RMN de ^1H -Noesy (600 MHz, CD_3OD) do composto 43Q326, acoplamento entre os prótons dos carbonos C-3 e C-5 (Tabela 13).

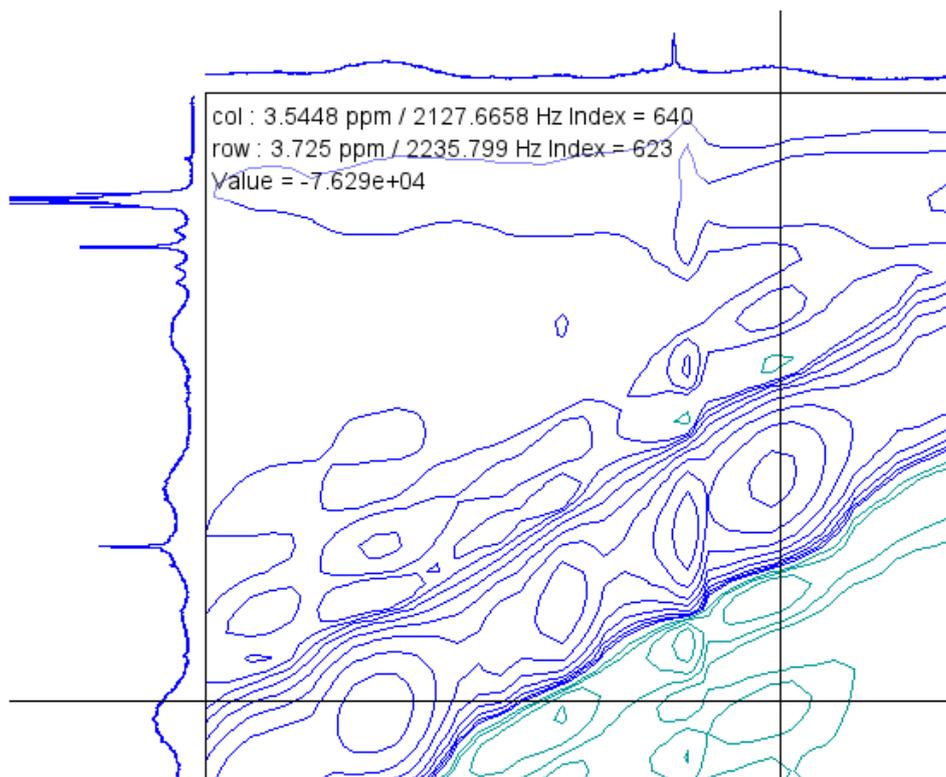


Figura 113. Espectro de RMN de ^1H -Noesy (600 MHz, CD_3OD) do composto 43Q326, acoplamento entre os prótons dos carbonos C-7 e C-9 (Tabela 13).

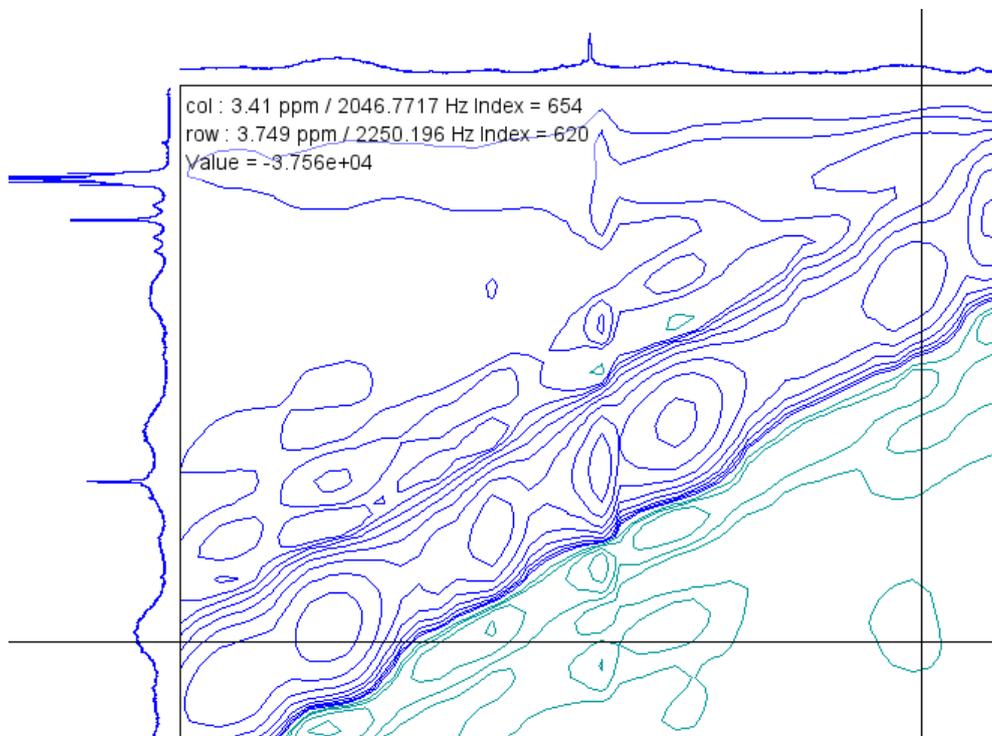


Figura 114. Espectro de RMN de ^1H -Noesy (600 MHz, CD_3OD) do composto 43Q326, acoplamento entre os prótons dos carbonos C-25 e C-27 (Tabela 13).

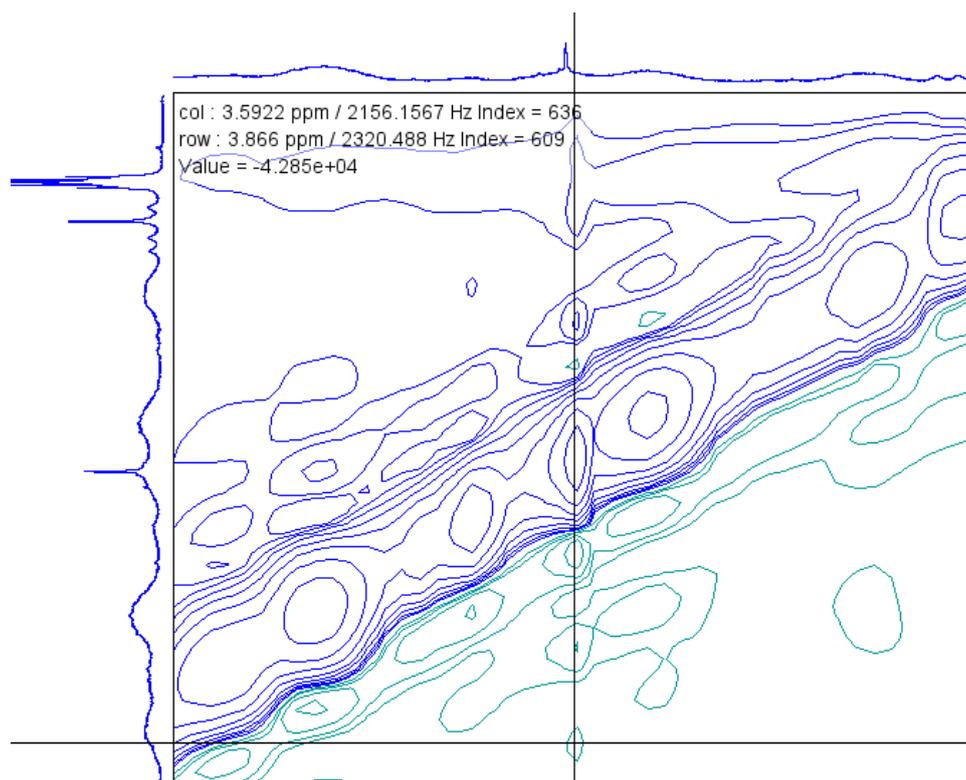


Figura 115. Espectro de UV do composto 43Q326.

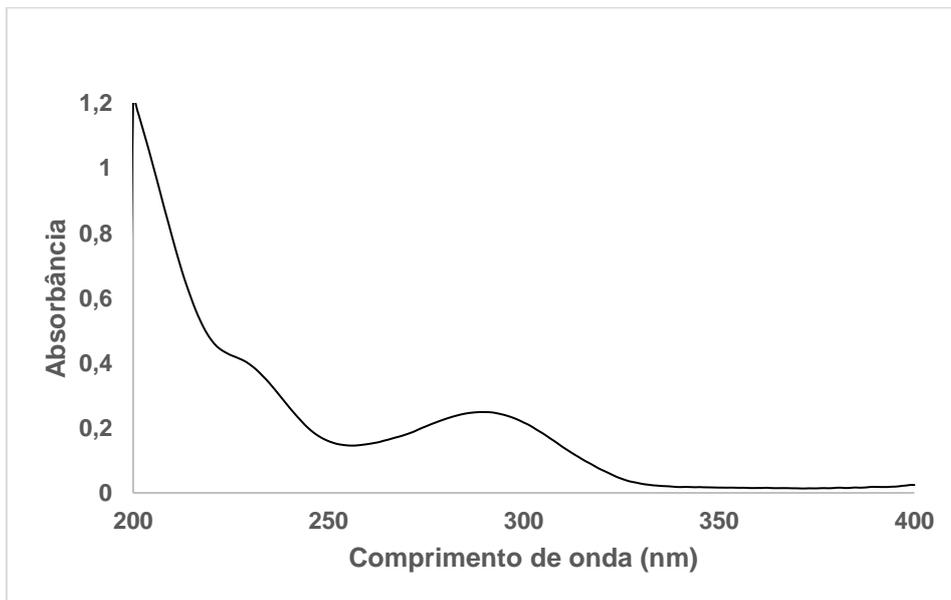
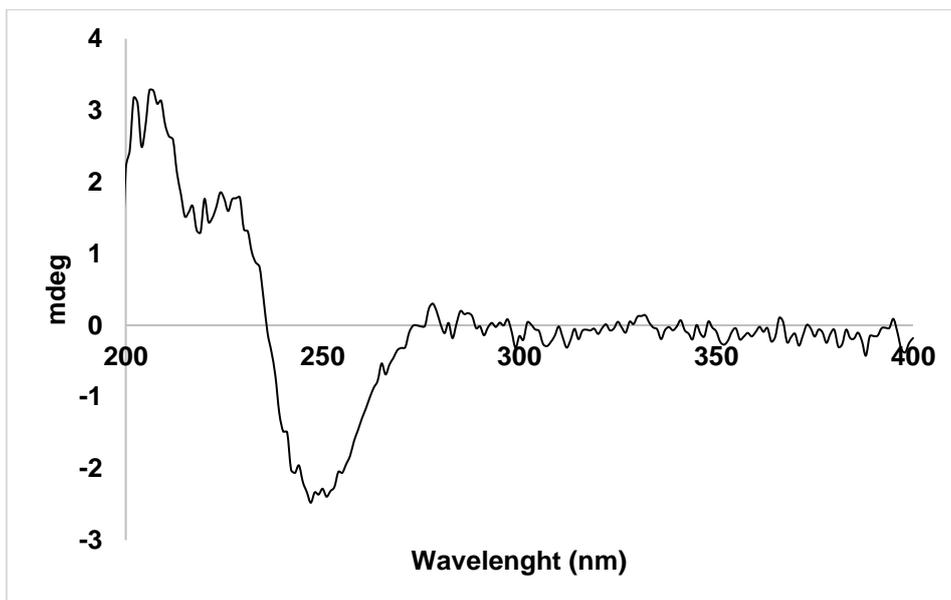


Figura 116. Espectro de dicroísmo do composto 43Q326.



4.5.3. Identificação estrutural da batzelladina F

A substância 71BC313 foi isolada como um óleo marrom. A desreplicação foi realizada utilizando o dado de espectrometria de massas de baixa resolução de 71BC313 e realizando-se busca na literatura (PATIL, A. D.; *et al*). A análise de HPLC-ELSD-MS de 71BC313 mostrou a presença de um íon $[M+2H]^{++}$ em m/z 313,4 $[M+H]^+$ e em m/z 625,4 $[M+H]^+$ referente ao pico cromatográfico com TR = 13,5 min (Figura 120 e Figura 121).

A partir dos espectros de RMN de 1H e ^{13}C do composto 71BC313 (Figura 118 e Figura 119) foi possível a identificação da substância batzelladina F (Tabela 14). A análise cuidadosa dos espectros de RMN de 1H e ^{13}C comparativamente com os dados tabelados dos alcaloides batzelladínicos reportados anteriormente corroboraram para a sua identificação. A presença do duplo-duplete no RMN 1H , com valor anotado de deslocamento químico 3,08 (dd, 1H, 4,6; 3,3), figura 122, foi determinante para a diferenciação do composto para os demais de sua classe, uma vez que outros compostos não apresentaram este sinal tabelado. (PATIL, A. D.; *et al*; 1997, PATIL, A. D.; *et al*; 1995, HUA, H.; *et al*; 2007).

Há discordância entre a tabulação do artigo que identificou a batzelladina F em comparação ao artigo que discute a batzelladina L em comparação a F publicado posteriormente, quanto ao número de carbonos na cadeia alifática do grupo ester que une os grupos guanidínicos (PATIL, A. D.; *et al*; 1997, HUA, H.; *et al*; 2007).

A subfração 43M obtida no item 4.4.2.3 correspondente à batzelladina F ainda apresentando impurezas associadas a alcaloides minoritários homólogos, o acúmulo da substância foi feito a partir da fração 43M e 43N seguindo o procedimento descrito no item 4.4.4.1.

Figura 117. Estrutura do composto 71BC313 (HUA, H. *et al*).

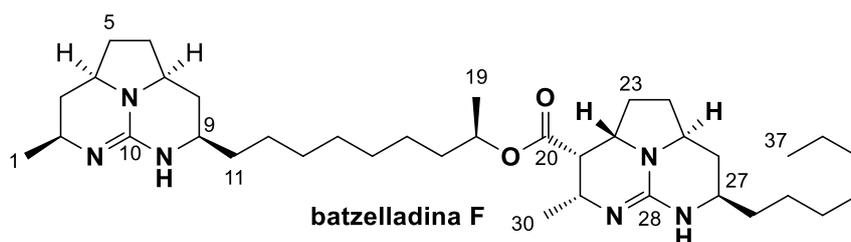


Figura 118. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) do composto 71BC313.

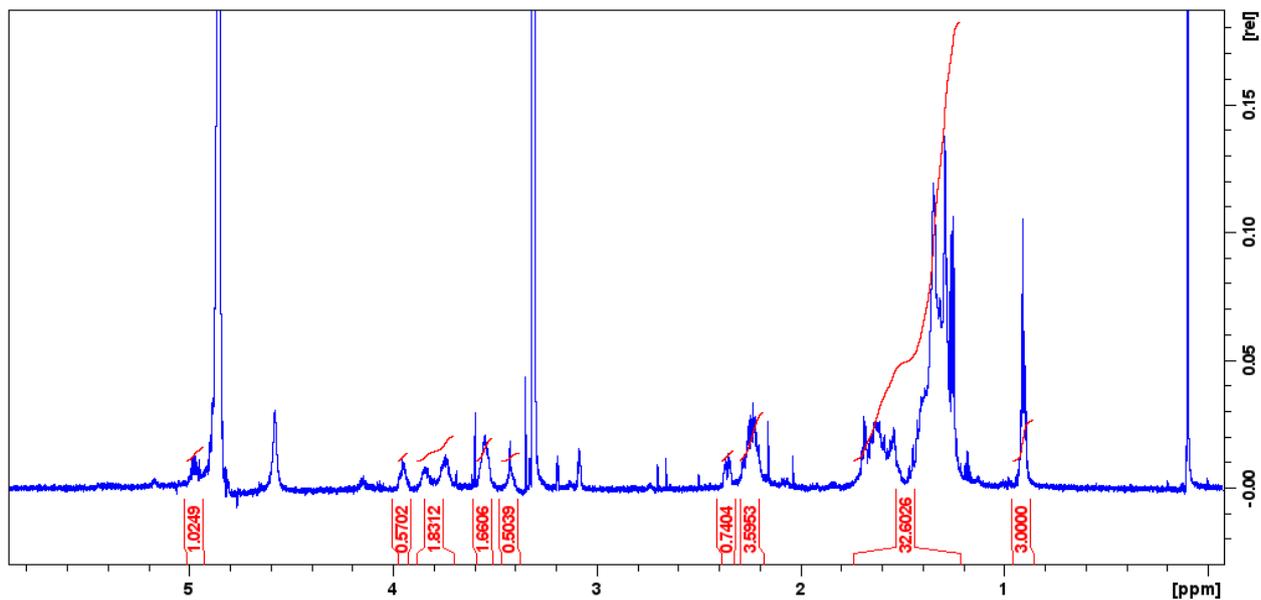


Tabela 14. Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C (14,1 T) para a substância 71BC313 com os dados reportado na literatura para a batzelladina F.

31371BC			batzelladina F (Patil <i>et al.</i> , 1997)	
Posição	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1	1,25 (d, 3H 6,3)	20,7	1,26 (d, 3H, 6,3)	20,7
2	3,55 (m, 1H)	47,3	3,52 (m, 1H)	47,2
3	2,25 (m, 1H)	36,8	2,20 (m, 1H)	36,9
	1,25 (m, 1H)		1,25 (m, 1H)	
4	3,73 (m, 1H)	57,6	3,72 (m, 1H)	57,5
5	2,22 (m, 1H)	31,1	2,20 (m, 1H)	31,1
	1,68 (m, 1H)		1,67 (m, 1H)	
6	2,22 (m, 1H)	31,1	2,20 (m, 1H)	31,1
	1,68 (m, 1H)		1,67 (m, 1H)	
7	3,73 (m, 1H)	57,5	3,72 (m, 1H)	57,4
8	2,26 (m, 1H)	34,8	2,28 (m, 1H)	34,8
	1,22 (m, 1H)		1,21 (m, 1H)	
9	3,4 (m, 1H)	51,6	3,40 (m, 1H)	51,6
10	-	150,6	-	151,2
11	1,63 (m, 1H)	35,9	1,60 (m, 1H)	35,8
	1,55 (m, 1H)		1,54 (m, 1H)	
12	1,30 (m, 2H)	26,2	1,30 (m, 2H)	26,2
13	1,30 (m, 2H)	30,7/30,6/30,4/30,3	1,30 (m, 2H)	30,5
14	1,30 (m, 2H)	26,6	1,30 (m, 2H)	26,5
15	1,60 (m, 1H)	36,9	1,60 (m, 1H)	36,9 x
	1,54 (m, 1H)		1,54 (m, 1H)	
16	4,97 (m, 1H)	73,4	4,97 (m, 1H)	73,3
17	1,25 (d; 3H; 6,1)	20,4	1,24 (d, 3H, 6,5)	20,5
18	-	170,4	-	170,3
19	3,08 (dd, 1H, 4,6; 3,3)	45,6	3,06 (dd, 1H, 4,6; 3,3)	45,6
20	3,95 (m, 1H)	58,0	3,94 (m, 1H)	57,9
21	2,25 (m, 1H)	29,2	2,24 (m, 1H)	29,2
	1,62 (m, 1H)		1,62 (m, 1H)	
22	2,21 (m, 1H)	31,4	2,18 (m, 1H)	31,4
	1,67 (m, 1H)		1,63 (m, 1H)	

23	3,56 (m, 1H)	57,3	3,52 (m, 1H)	57,3
24	2,35 (m, 1H)	34,2	2,34 (m, 1H)	34,2
	1,44 (m, 1H)		1,42 (m, 1H)	
25	3,54 (m, 1H)	53,2	3,53 (m, 1H)	53,2
26	-	151,2	-	151,6
27	3,84 (m, 1H)	49,9	3,82 (m, 1H)	49,9
28	1,27 (d, 3H 6,7)	18,5	1,27 (d, 3H, 6,7)	18,5
29	1,63 (m, 1H)	37,0	1,64 (m, 1H)	36,9
	1,55 (m, 1H)		1,54 (m, 1H)	
30	1,30 (m, 2H)	26,2	1,33 (m, 2H)	26,2
31	1,30 (m, 2H)	30,7/30,6/30,4/30,3	1,30 (m, 2H)	30,5
32	1,30 (m, 2H)	30,7/30,6/30,4/30,3	1,30 (m, 2H)	30,5
33	1,30 (m, 2H)	30,7/30,6/30,4/30,3	1,30 (m, 2H)	30,5
34	1,30 (m, 2H)	30,7/30,6/30,4/30,3	1,30 (m, 2H)	30,5
35	1,30 (m, 2H)	32,9	1,30 (m, 2H)	33,0
36	1,30 (m, 2H)	23,7	1,30 (m, 2H)	23,7
37	0,9 (m, 3H, 7)	14,4	0,90 (m, 3H, 7)	14,5

Figura 119. Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, CD_3OD) do composto 71BC313.

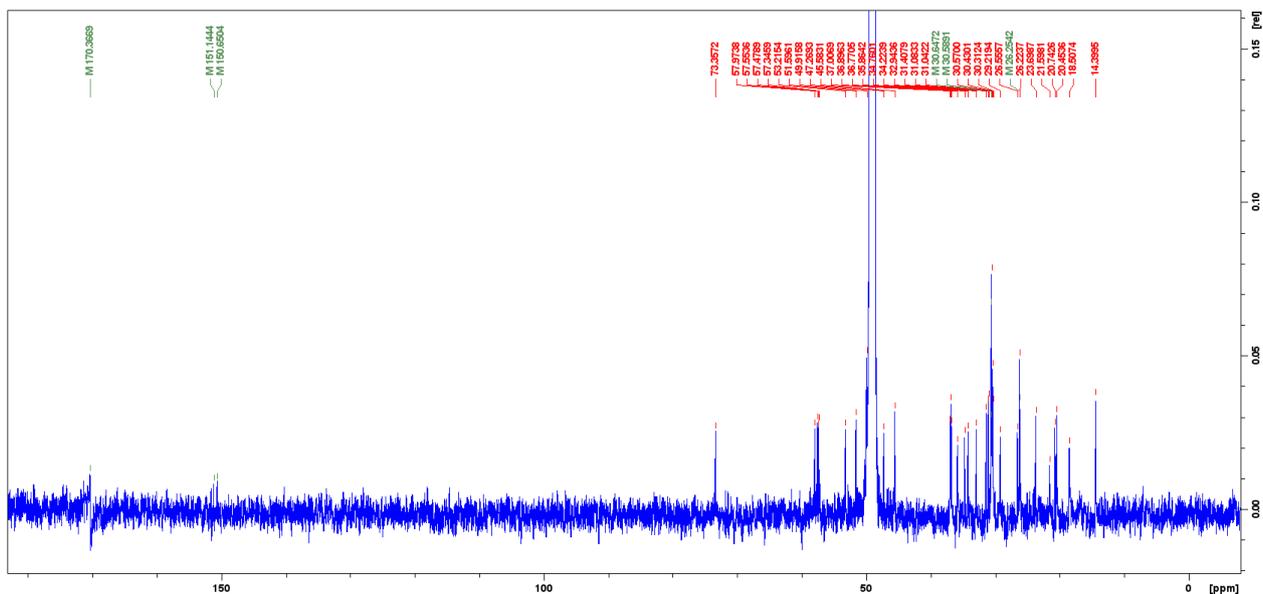


Figura 120. Espectro de massas ESI-quadrupolo MS+ do composto 71BC313.

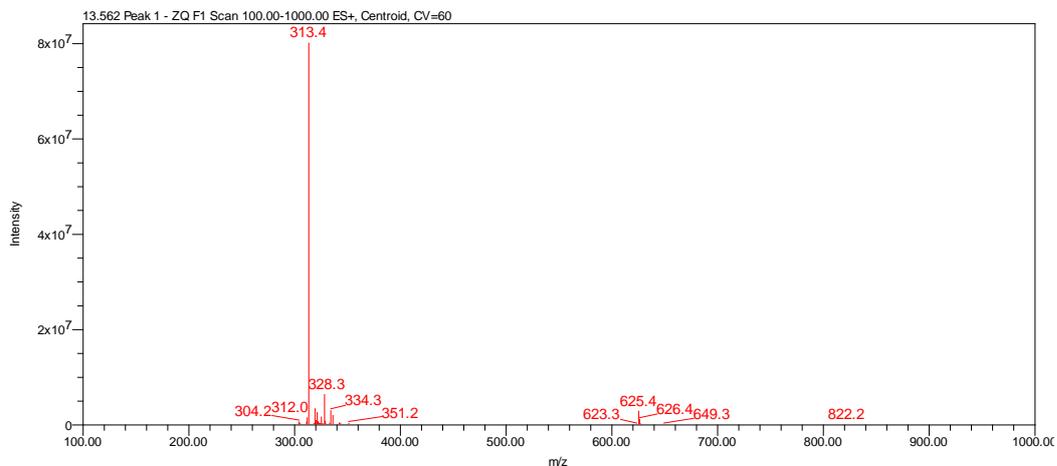


Figura 121. Cromatograma HPLS-ESI-MS em modo TIC MS+ do composto 71BC313, eluição em gradiente exploratório 20-100% orgânico.

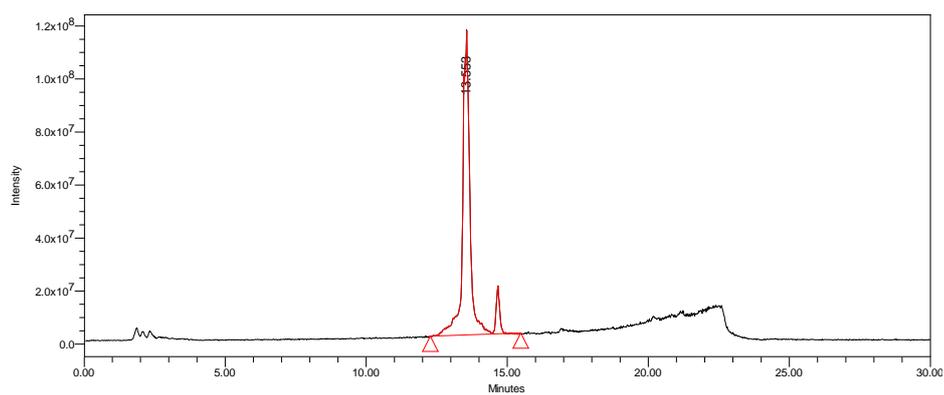
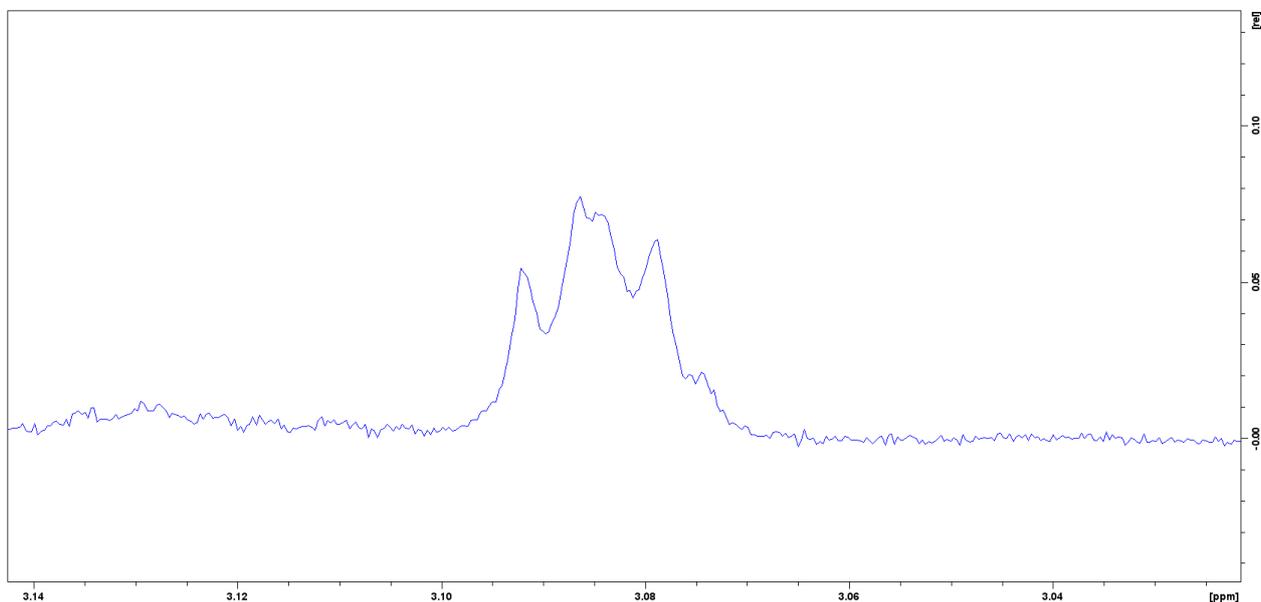


Figura 122. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) do composto 71BC313.



4.6. Avaliação das atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* dos compostos batzelladínicos da esponja *monanchora arbuscula*

4.6.1. Atividade *in vitro* da batzelladina L, batzelladina F e do composto minoritário Ma71E contra cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas multirresistentes à fármacos (ESKAPE) (realizados pelo grupo coordenado pelo Dr. André G. Tempone, Instituto Butantan)

A tabela 15 apresentam os resultados das bioatividades contra as bactérias multirresistentes de acrônimo ESKAPE:

Tabela 15. Atividade antibacteriana dos alcalóides contra as cepas de bactérias gram-positivas e gram-negativas multirresistentes à fármacos.

ESKAPE Bacteria	cepa	Gram (+/-)	Marcador de resistência	Batzelladina L MIC (µM)	Batzelladina F MIC (µM)	Ma71E MIC (µM)
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	(+)	Susceptível	≥200	12,5	NT
	ATCC 51299		Carbapenems, aminoglicosídeos, fluoroquinonas	3,12	25	NT
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	(+)	Susceptível	3,12	6,25	12,5
	33591		oxacilina	1,56	6,25	12,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	700603	(-)	Susceptível	25	200	100
	Id-146/19		Carbapenems, aminoglicosídeos, fluoroquinonas	12,5	50	100
<i>Acinetobacter baumani</i>	19606	(-)	Susceptível	25	≥200	NT
	Id-261/16		Carbapenems, aminoglicosídeos, fluoroquinonas	25	100	NT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	(-)	Susceptível	50	≥200	NT
	S-6065/06		Carbapenems, aminoglicosídeos, fluoroquinonas	25	≥200	NT
<i>Enterobacter cloacae</i>		(-)	Susceptível	25	200	NT
	534/17		Vancomicina	25	200	NT

NT = não testado.

Observa-se na Tabela 15 que a batzelladina L apresentou atividade com MIC (mínima concentração inibidora) micromolares frente a todos os patógenos, com a batzelladina L apresentando menor valor de 1,56 frente ao *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina, enquanto a batzelladina F apresentou valores 10 vezes maiores que a

batzelladina L, comparativamente para um mesmo patógeno, como o *Enterobacter cloacae*, sendo, portanto, em comparação a seus homólogos avaliados a mais bioativa. O composto Ma71E, apresenta dois prótons a menos e uma ligação dupla a mais em sua estrutura, enquanto a batzelladina F apresenta 2 unidades de CH₂ a menos na cadeia alifática lateral, tais diferenças são bons comparativos iniciais para a compreensão da relação entre a estrutura química do composto e suas bioatividades.

4.6.2. Atividade *in vitro* antiplasmodial contra *P. falciparum* da batzelladina L e da batzelladina F

Os compostos foram testados *in vitro* em diluição seriada contra o *P. falciparum* sincronizados na fase do anel, o valor de IC₅₀ foi determinado a partir das curvas concentração-resposta geradas. (Item 3.1.6)

O composto foi testado contra células de hepatocarcinoma humanas HepG2, os compostos foram visualizados em microscópio óptico após adição na placa com células, para avaliar se ocorreu sua precipitação e validar a concentração inicial ideal de cada composto testado. A tabela 16 apresenta o índice de seletividade do composto (IS), sendo este a razão entre IC₅₀^{P.fal} / IC₅₀^{HepG2}.

Tabela 16. Avaliação da atividade antiplasmodial contra *P. falciparum* (IC₅₀^{P.falc}), citotoxicidade em células de hepatocarcinoma humano (IC₅₀^{HepG2}) e valor do índice de seletividade dos compostos.

Composto	IC ₅₀ ^{3D7} (nM)	IC ₅₀ ^{HepG2} = (μM)	IS
Batzelladina L	118 ± 20	6 ± 1	47
Batzelladina F	125 ± 13	10,6 ± 0,3	85
Artesunato	13 ± 2	nd	nd

O composto batzelladina L apresentou atividade contra o *P. falciparum* (cepa 3D7, sensível a cloroquina), na faixa submicromolar (IC₅₀^{3D7} = 118 nM). Esse dado concorda com a atividade inibitória previamente observada para a batzelladina L contra o *P. falciparum* (IC₅₀ = 0,3 μM, cepa FcB1, resistente à cloroquina, (Laville, R.; et. al.; 2009). Além disso, o composto apresentou moderada atividade citotóxica em células HepG2 IC₅₀^{HepG2} = 6 μM, contudo devido a sua potente atividade inibitória contra o parasita, o índice de seletividade (IS) determinado foi 47, sendo que compostos acima de 10 são

promissores para o processo de descoberta de novos candidatos a fármacos antimaláricos.

O composto batzelladina F apresentou atividade contra o *P. Falciparum* (cepa 3D7) comparável com o obtido para a batzelladina L, com valor $IC_{50}^{3D7} = 125 \text{ nM}$ e sua citotoxicidade cerca de duas vezes menor do que a batzelladina L com valor de $IC_{50}^{HepG2} = 10,6 \pm 0,3 \text{ }\mu\text{M}$, resultando em IS duas vezes maior para a batzelladina F em comparação com a batzelladina L, sugerindo que o tamanho da cadeia lateral alifática ligada ao grupo guanidínico da direita pode estar relacionado com a redução da citotoxicidade do composto.

Os resultados obtidos para as bioatividades e citotoxicidades dos produtos naturais guanidínicos batzelladínicos apresentados neste trabalho, são dados relevantes para os grupos de química medicinal e síntese orgânica que buscam sintetizar análogos guanidínicos e modifica-los quimicamente para aumentar sua bioatividade. Pois, estes apresentam-se ativos *in vitro* contra as cepas resistentes (Laville, 2009) e sensíveis a cloroquina.

Os resultados de citotoxicidades e IS obtidos, juntamente aos estudos *in vivo* apresentados a seguir são um bom ponto de partida para embasar o desenvolvimento de novos fármacos sintéticos por outros grupos de pesquisa em trabalhos posteriores.

Figura 123. Curva concentração-resposta contra cepa 3D7 de *P. falciparum*.

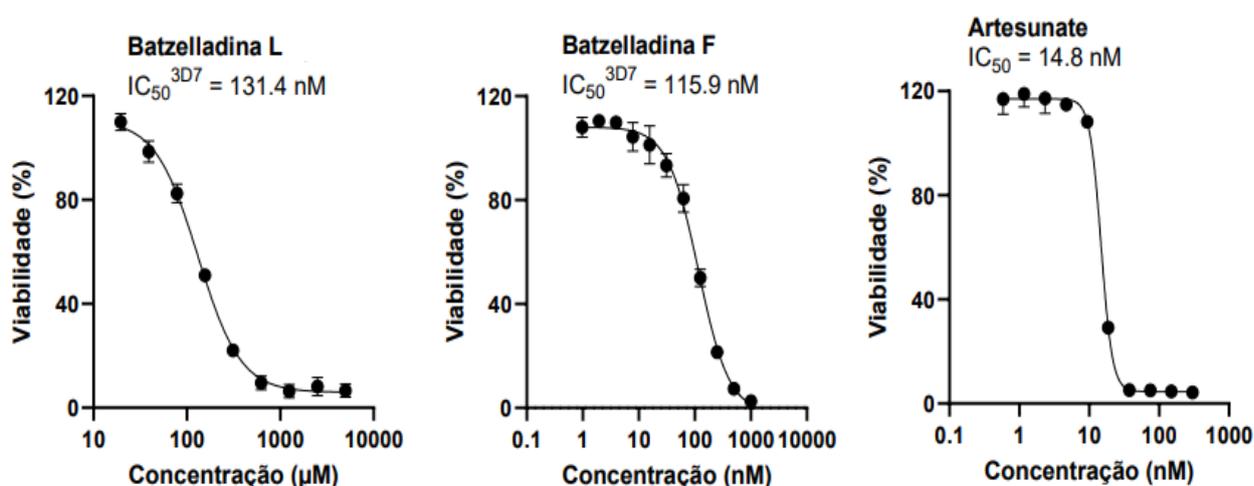
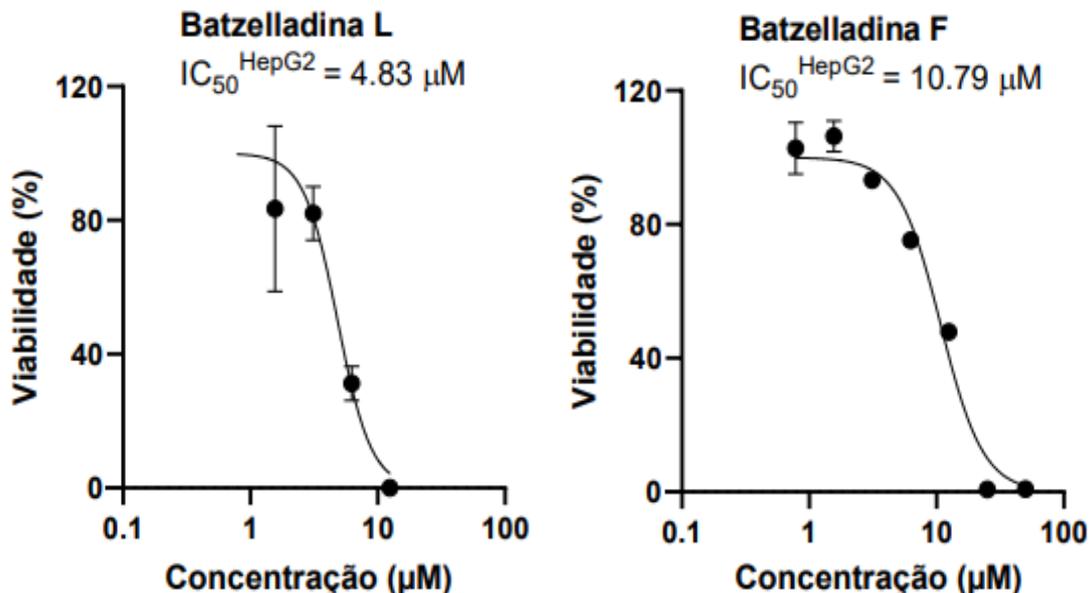


Figura 124. Curva concentração-resposta contra células HepG2.



4.6.3. Atividade *in vivo* antiplasmodial contra *P. falciparum* da batzelladina L (realizados pelo grupo coordenado pelo Professor Rafael V. C. Guido, IFSC-USP)

A atividade antimalárica da batzelladina L ($IC_{50}^{3D7} = 0,4 \pm 0,1 \mu M$) foi avaliada *in vivo*, em camundongos infectados com *P. berguei*, em um experimento. O percentual de redução de parasitemia foi calculado em relação ao grupo controle não tratado, nos dias 5^o, 8^o e 11^o após a infecção na dose de 50 mg/Kg (Tabela 17). A substância foi considerada ativa *in vivo* quando apresentou redução de 30% ou mais da parasitemia (Vide 3.1.6).

A batzelladina L apresentou redução de 33% da parasitemia, valor próximo ao limiar estabelecido. A figura 124 apresenta a % redução da parasitemia frente ao controle.

Tabela 17. Cálculo do percentual de redução da parasitemia *in vivo* contra *P. berguei*:

Composto	Dose (mg/Kg)	% Parasitemia			% Redução		
		5 ^o dia	8 ^o dia	11 ^o dia	5 ^o dia	8 ^o dia	11 ^o dia
Batzelladina L	50	2 ± 1	4 ± 1	9 ± 1	33	20	18
Cloroquina	50	0	0	0	100	100	100
Controle	-	3 ± 1	5 ± 1	11 ± 1	-	-	-

As figuras 125 – 127 apresentam os dados da redução da parasitemia dos camundongos infectados pelo *P. berguei* (Cepa NK65) tratados com batzelladina L e com cloroquina, em diferentes dias após a infecção em comparação ao controle.

Figura 125. Porcentagem de redução da parasitemia da batzelladina L em relação ao controle.

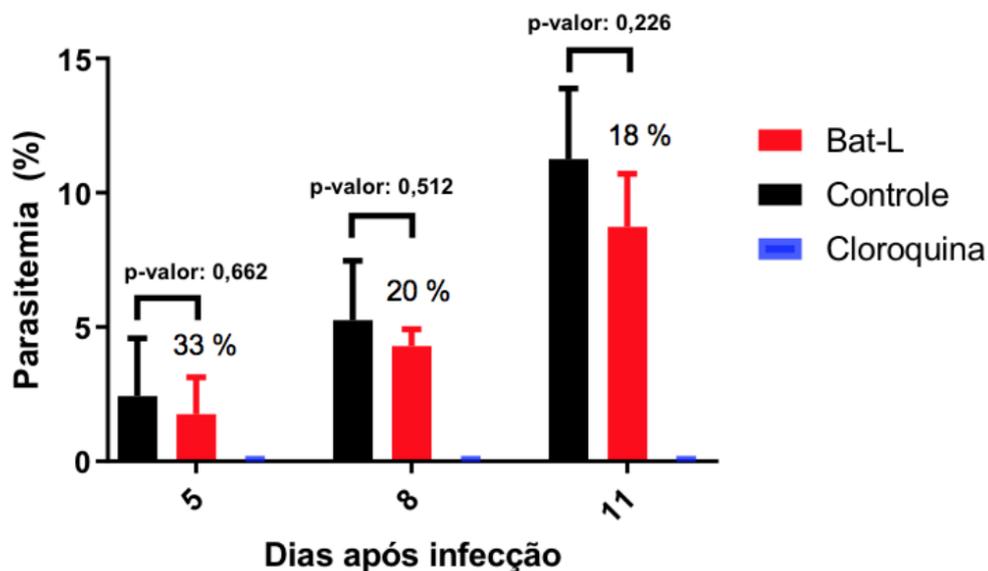


Figura 126. Evolução da parasitemia dos animais tratados e dos controles: Parasitemia média em camundongos infectados pelo *P. berguei* (cepa NK65) tratados com batzelladina L e com cloroquina, avaliada em diferentes dias após a infecção.

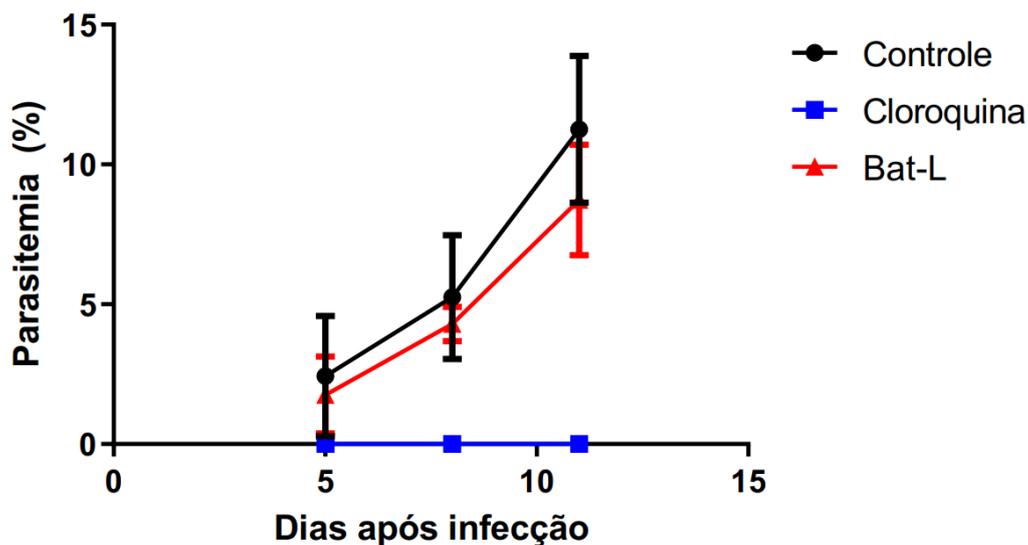
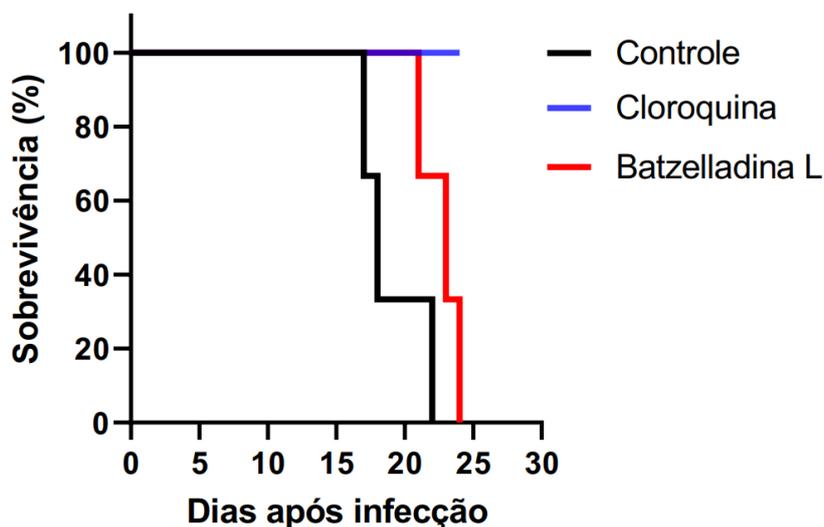


Figura 127. Taxa de sobrevivência dos animais infectados pelo *P. berguei* (cepa NK65), tratados com batzelladina L, com cloroquina e do controle, durante a duração do experimento (30 dias).



Observa-se que no ensaio *in vivo* contra *P. berguei* a batzelladina L apresentou porcentagem de inibição de 33% no 5º dia pós-tratamento (Figura 125). O valor observado para a inibição está próximo do valor mínimo considerado para a classificação de um composto com atividade *in vivo* (> 30%). As porcentagens de parasitemia *in vivo* entre o controle e a batzelladina L nos dias avaliados não mostraram diferença estatística significativa, tal resultado pode ser justificado pelo número muito baixo de animais utilizados ($n = 3$) e pela realização de apenas um experimento (Vide Figura 125, p-valor entre 0,662 e 0,226, ideal <0,05). Mas ficou evidente o efeito da influência da atividade do fármaco na sobrevivência dos animais (Figura 127), evidenciando que o composto batzelladina L apresenta potencial farmacológico contra malária, inclusive contra a cepa resistente à cloroquina do patógeno, conforme evidenciado nos testes *in vitro* anteriormente (Laville, 2009).

Portanto, os resultados observados para bioatividade *in vivo* da batzelladina L foram de grande importância para a comunidade científica de produtos naturais e de química medicinal, uma vez que esta é a primeira avaliação *in vivo* desenvolvida utilizando produtos naturais da classe dos alcalóides batzelladínicos contra malária.

Como os experimentos *in vivo* necessitam de grande quantidade de produto natural com elevado grau de pureza, um número maior de experimentos ou de animais seria ainda mais desafiador e inviável, tanto pelo comitê de ética que aprova o uso de animais quanto para obtenção e acúmulo do composto partindo de uma fonte natural. Sendo assim este objetivo e o de avaliar compostos modificados um próximo passo a ser buscado

por grupos de síntese e química medicinal, embasados pelos resultados aqui apresentados.

Experimentos de inibição da parasitemia *in vivo* com 15 mg da batzelladina F encontram-se em andamento, os resultados experimentais e a comparação de sua inibição com a inibição apresentada para a batzellaina L será um tópico a ser discutido e apresentado posteriormente pelo Grupo de Química Orgânica de Sistemas Biológicos, pelo Prof. Dr. Roberto Berlinck e pelo Pr. Dr. Rafael Guido e equipe, em trabalhos futuros.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Aos 08 de janeiro de 1772.

Que homens são aqueles, cuja alma pende inteira do cerimonial e durante longos anos encaminham todos seus esforços no fito de poderem ocupar um lugar mais perto da cabeceira da mesa! Não quer dizer que não tenham ocupações, longe disso... Esses fúteis embates dão-lhes muitas tarefas, impedindo-os de dar cabo a coisas bem mais importantes. [...]

Loucos que são! Se mostram incapazes de ver que o lugar é a coisa menos importante e que aquele que ocupa o primeiro, raras vezes desempenha o papel principal! [...]

Os Sofrimentos do Jovem Werther, Johann Wolfgang Goethe – L&PM pocket, 2001

A compreensão das propriedades cromatográficas das frações resultantes que apresentavam os compostos batzelladínicos em misturas de homólogos foi fundamental para a obtenção dos alcaloides majoritários batzelladina L e batzelladina F em quantidades suficientes para sua investigação *in vivo*. Para isso diferentes colunas, diferentes fases estacionárias e diferentes condições cromatográficas de eluição em modo gradiente foram estudadas tanto em sistema cromatográfico analítico HPLC-UV-MS quanto sistemas preparativos HPLC-UV, e os protocolos de purificação foram descritos exhaustivamente no presente trabalho.

Utilizando as condições cromatográficas desenvolvidas, foi possível a obtenção de mais de 70 mg e 15,3 mg dos alcaloides majoritários batzelladina L e batzelladina F respectivamente, resultaram em quantidades suficientes do composto batzelladina L para serem desenvolvidos os ensaios *in vivo* contra malária e leishmania. Mas, os experimentos *in vivo* contra o patógeno causador da *Leishmania*, encontram-se em andamento, e não foram concluídos a tempo de serem apresentados e discutidos no presente trabalho.

Foi ainda possível no tempo de duração deste projeto a obtenção de 5 mg de um alcaloide minoritário novo, sendo que somente 2 mg encontram-se disponíveis, pois 3 mg foi contaminado e perdido durante uma falha instrumental do HPLC preparativo.

A batzelladina L e a batzelladina F tiveram suas atividades testadas *in vitro* contra malária (*P. falciparum*) e *in vivo* em camundongos infectados pelo *P. berguei* (cepa NK65), e também contra as cepas de bactérias multirresistentes à fármacos ESKAPE, apresentando bioatividades com valores na faixa micro e nano molar. Mas, os experimentos *in vivo* para a batzelladina F ainda não foram concluídos.

Os compostos batzelladina L e batzelladina F apresentaram $IC_{50}^{3D7} = 118 \pm 20$ e $125 \pm 13 \mu M$ e $IS = 45$ e 85 respectivamente, *in vitro*. A batzelladina F apresentou menor citotoxicidade e portando, maior IS, sugerindo que há alguma relação entre o tamanho da cadeia alifática lateral e a citotoxicidade do alcaloide guanidinico. A batzelladina L *in vivo* inibiu em 33% a evolução da doença no 5º dia de infecção e prolongou a vida dos animais infectados. Ambos os resultados *in vivo* e *in vitro* apresentados contribuíram para a pesquisa de produtos naturais com dados de toxicidade e índice de seletividade dos compostos estudados, sendo um bom ponto de partida para os grupos de síntese, derivatização e química medicinal para trabalhos com compostos guanidínicos batzelladínicos sintéticos.

6. REFERÊNCIAS

FAUSTO

*Ai de mim! da filosofia,
Medicina, jurisprudência,
E, mísero eu! da teologia,
O estudo fiz, com máxima insistência.
Pobre simplório, aqui estou
E sábio como dantes sou!
De doutor tenho o nome e mestre em artes,
E levo dez anos por estas partes,
Pra cá e lá, aqui ou acolá, sem diretriz,
Os meus discípulos pelo nariz.
E vejo-o, não sabemos nada!
Deixa-me a mente amargurada.
Sei ter mais tino que esses maçadores,
Mestres, frades, escrivas, doutores;
Com dúvidas e escrúpulos não me alouco,
Não temo o inferno e Satanás tampouco
Mas mata-me o prazer no peito;
Não julgo algo saber direito,
Que leve aos homens uma luz que seja
Edificante ou benfazeja.
Nem de ouro e bens sou possuidor,
Ou de terral fama e esplendor;
Um cão assim não viveria!
Por isso entrego-me à magia,
A ver se o espiritual império
Pode entreabrir-me algum mistério,
Que eu já não deva, oco e sonoro,
Ensinar a outrem o que ignoro;
Para que apreenda o que a este mundo
Liga em seu âmago profundo,
Os germes veja e as vivas bases,
E não remexa mais em frases.*

Fausto Uma tragédia, Johann Wolfgang von Goethe – Editora 34, 2004

ANDRADE NETO V. F.; BRANDÃO M. G, STEHMANN J. R.; OLIVEIRA L. A.; KRETTLI A. U.; Antimalarial activity of Cinchona-like plants used to treat fever and malaria in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, East Park Shannon, v. 87, P. 253- 256, 2003.

BERLINCK, R. G. S.; BERNARDI, D. I.; FILL, T.; FERNANDES, A. A. G.; JURBERG, I. D. The chemistry and biology of guanidine secondary metabolites. *Natural Product Reports*, Cambridge, v. 38, p. 586-667, 2021.

BERLINCK, R. G. S.; BERTONHA, A. F.; TAKAKI, M.; RODRIGUEZ, J. P. G. The chemistry and biology of guanidine natural products. *Natural Product Reports*, Cambridge, v. 34, p. 1264-1301, 2017.

BERLINCK, R. G. S.; TRINDADE-SILVA, A. E.; SANTOS, M. F. C. The chemistry and biology of organic guanidine derivatives. *Natural Product Reports*, Cambridge, v. 29, p. 1382-1406, 2012.

EL-DEMERDASH, A.; ATANASOV, A. G.; BISHAYEE, A.; ABDEL-MOGIB, M.; HOOPER, J. N. A.; AL-MOURABIT, A. Batzella, Crambe and Monanchora: highly prolific marine sponge genera yielding compounds with potential applications for cancer and other therapeutic areas. *Nutrients*, Basel, v. 10, n. 33, p. 1-24, 2018.

EL-DEMERDASH, A.; TAMMAM, M. A.; ATANASOV, A. G.; HOOPER, J. N. A.; AL-MOURABIT, A.; KIJOA, A. chemistry and biological activities of the marine sponges of the Genera Mycale (Arenochalina), Biemna and Clathria. *Marine Drugs*, Basel, v. 16, n. 214, p. 1-24, 2018.

EL-DEMERDASH, A.; MORIOU, C.; MARTIN, M.; RODRIGUES-STIEN, A. S.; PETEK, S.; DEMOY-SCHNEIDER, M.; HALL, K.; HOOPER, J. N. A.; DEBITUS, C.; AL-MOURABIT, A. Cytotoxic guanidine alkaloids from a French Polynesian Monanchora n. sp. Sponge. *Journal of Natural Products*, Washington, v. 76, n. 8, p. 1929-1937, 2016.

GALLIMORE, W. A.; KELLY, M.; SCHEUER, P. J. Alkaloids from the Sponge Monanchora unguifera. *Journal of Natural Products*, Washington, v. 68, p. 1420-1423, 2005.

GUPTA, J. Biological activities of marine guanidine alkaloids. *Materials Today: proceedings*, Cambridge, v. 37, p. 3246-3250, 2021.

HUA, H.; PENG, J.; DUNBAR, D. C.; SCHINAZI, R. F.; ANDREWS, A. G. C.; CUEVAS, C.; GARCIA- ERNANDEZ, L. F.; KELLY, M.; HAMANN, M. T. Batzelladine alkaloids from the Caribbean sponge Monanchora unguifera and the significant activities against HIV-1 and AIDS opportunistic infectious pathogens. *Tetrahedron*, Oxford, v. 63, p. 11179-11188, 2007.

KIM, I. W.; LEE, H. S.; LEE, Y. K.; JANG, M. D.; PARK, J. H., Selectivity of amino-, cyano- and diol-bonded silica in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, Amsterdam, v. 915, p. 35-42, 2001.

KIM, S.; SEMENYA, D.; CASTAGNOLO, D.; Antimicrobial drugs bearing guanidine moieties: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, Molineaux, v. 216, p. 113293, 2021.

LAVILLE, R.; THOMAS, O.; BERRUÉ, F.; MARQUEZ, D.; VACELET, J.; AMADE, P., Bioactive guanidine alkaloids from two Caribbean marine sponges. *Journal of Natural Products*, Washington, v. 72, n.9, p. 1589-1594, 2009.

MAKARIEVA, T. N.; OGURTSOVA, E. K.; DENISENKO, V. A.; DMITRENOK, P. S.; TABAKMAKHER, K. M.; GUZII, A. G.; PISLYAGIN, E. A.; ES'KOV, A. A.; KOZHE-MYAKO, V. B.; AMININ, D. L.; WANG, Y e STONIK, V. A., Urupocidin A: A new, inducing iNOS expression bicyclic guanidine alkaloid from the marine sponge Monanchora pulchra. *Organic Letters*, Washington, v. 16, p. 4292-4295, 2014.

MULANI, M.; KAMBLE, E.; KUMKAR, S.; TAWRE, M.; PARDESI, K.; Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: a review, *Frontiers in Microbiology*, Lausanne, v. 10, p. 539, 2019.

PATIL, A. D.; FREYER, A. J.; TAYLOR, P. B.; CARTÉ, B.; ZUBER, G.; JOHNSON, R. K.; FAULKNER, D. J. Batzelladines F-I, Novel alkaloids from the Sponge *Batzella* sp.: Inducers of p56lck-CD4 dissociation. *Journal of Organic Chemistry*, Washington, v. 62, p. 1814-1819, 1997.

PATIL, A. D.; KUMAR, N. V.; KOKKE, W. C.; BEAN, M. F.; FREYER, A. J.; BROSE, C. D.; MAI, S.; TRUNEH, A.; FAULKNER, D. J.; CARTE, B.; BREEN, A. L.; HEARTZBER, R. P.; JOHNSON, R. K.; WESTLEY, J. W.; POTTS, B. C. M. Novel alkaloids from the Sponge *Batzella* sp.: Inhibitors of HIV gp120-Human CD4 Binding. *Journal of Organic Chemistry*, Washington, v. 60, p. 1182-1188, 1995.

PENA, M., A.; MASSARO, N. P.; LIN, Y.; PIERCE, J.; Leveraging marine natural products as platform to tackle bacterial resistance and persistence. *Accounts of Chemical Research*, Washington, v. 54, p. 1566-1877, 2021.

SANTOS, M. F. C. Alcaloides guanidínicos da esponja marinha *Monanchora arbuscula*: isolamento, identificação e atividades biológicas. 2015. Tese (Doutorado em Química Orgânica e Biológica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75133/tde-20052015-095824/en.php>. Acesso em: 25 ago. 2023.

SANTOS, M. F. C.; HARPER, P. M.; WILLIAMS, D. E.; MESQUITA, J. T.; PINTO, G. É.; COSTA-SILVA, T. A.; HAJDU, E.; FERREIRA, A. G.; SANTOS, R. A.; MURPHY, P. J.; ANDERSEN, R. J.; TEMPONE, A. G.; and BERLINCK, R. G. S. Anti-parasitic guanidine and pyrimidine alkaloids from the marine sponge *monanchora arbuscula*. *Journal of Natural Products*, Cambridge, v. 78, n. 5, p. 1101-1112, 2015.

SMITH, P. L.; COOPER, W. T. Retention and selectivity in amino, cyano and diol normal bonded phase high-performance liquid chromatographic columns. *Journal of Chromatography A*, Amsterdam, v. 410, p. 249-265, 1987.

TEMPONE, A. G.; PIEPER, P.; BORBOREMA, S. E. T.; THEVENARD, F.; LAGO, J. H. G.; CROFT, S. L.; ANDERSON, E. A. Marine alkaloids as bioactive agents against protozoal neglected tropical diseases and malaria. *Natural Product Reports*, Cambridge, v. 38, p. 2214-2235, 2021.

WU, W.; BIAN, C.; ZHOU, X.; WANG, J.; GUO, R. Recent advances on marine alkaloids from sponges. *Chemistry & Biodiversity*, Weinheim, v. 17, n. 10, p. 1-52, 2020.

Anexo A: Caracterização por HPLC-ELSD-UV-MS das frações do primeiro fracionamento por Sephadex LH-20 de AcMA17.

Figura 128. Cromatograma da amostra AcMA17_1 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.

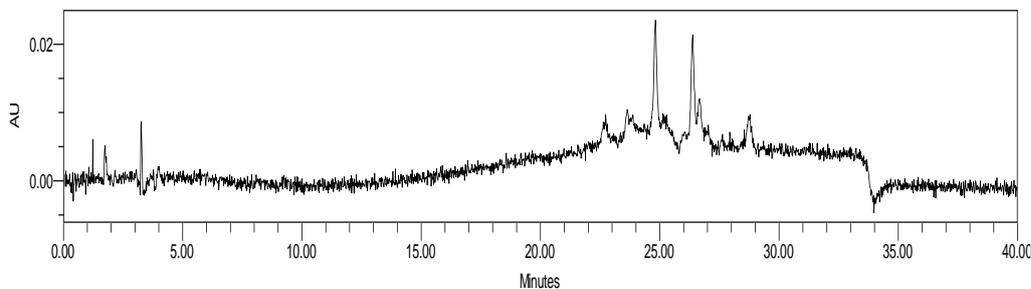


Figura 129. Cromatograma da amostra AcMA17_1 por HPLC-ELSD.

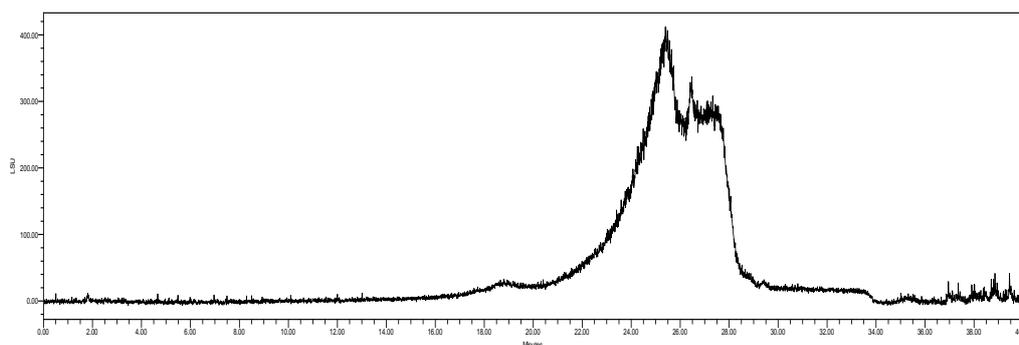


Figura 130. Cromatograma de íons totais da amostra AcMA17_1 por HPLC-MS.

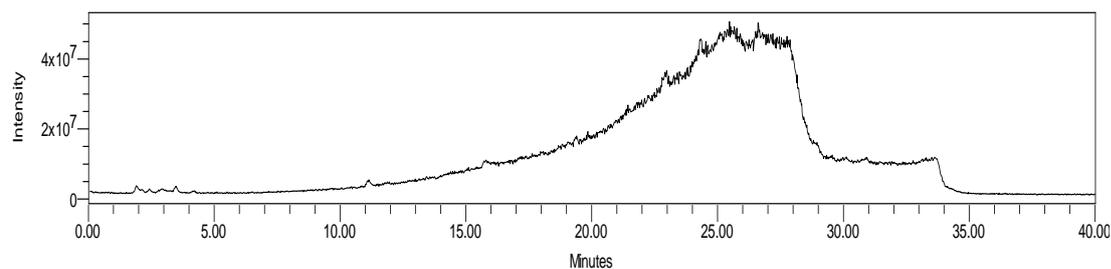


Figura 131. Cromatograma da amostra AcMA17_43 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.

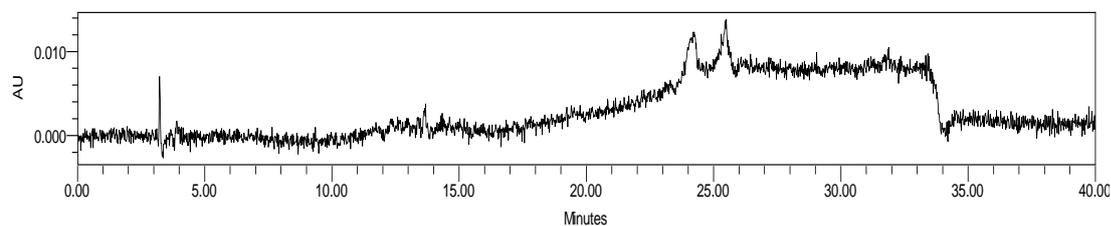


Figura 132. Cromatograma da amostra AcMA17_43 por HPLC-ELSD.

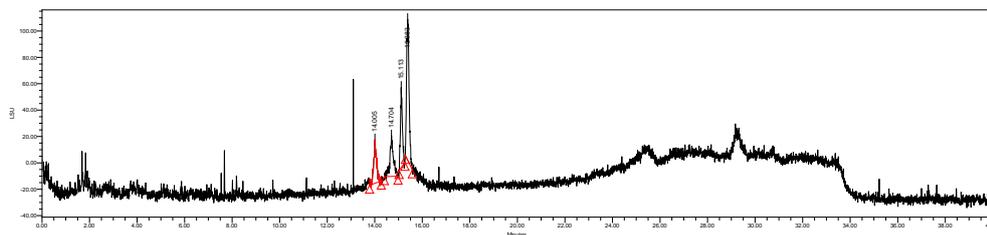


Figura 133. Cromatograma de íons totais da amostra AcMA17_43 por HPLC-MS.

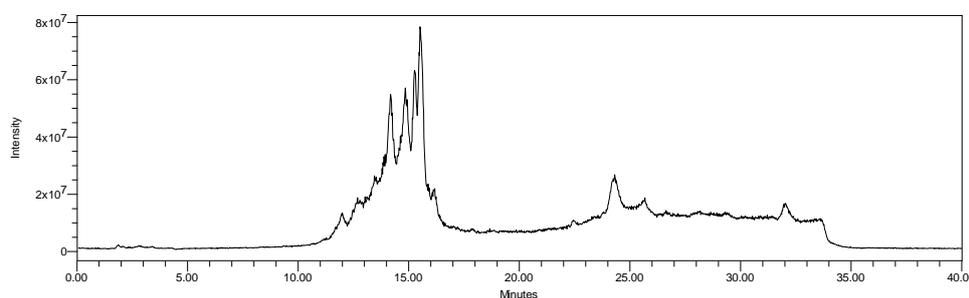


Figura 134. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra AcMA17_43.

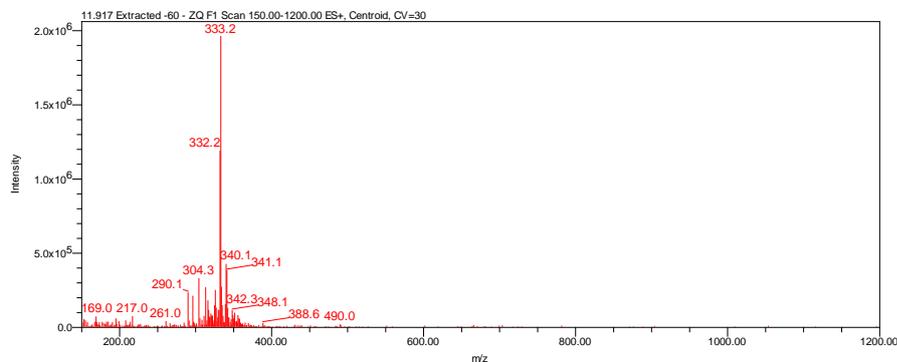


Figura 135. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra AcMA17_43.

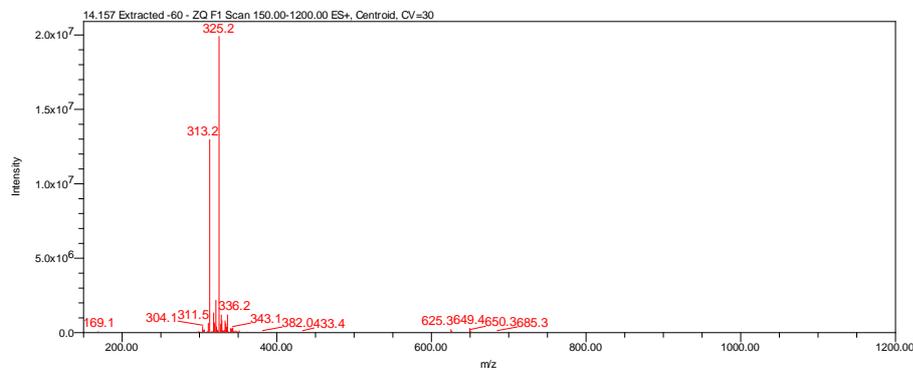


Figura 136. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra AcMA17_43.

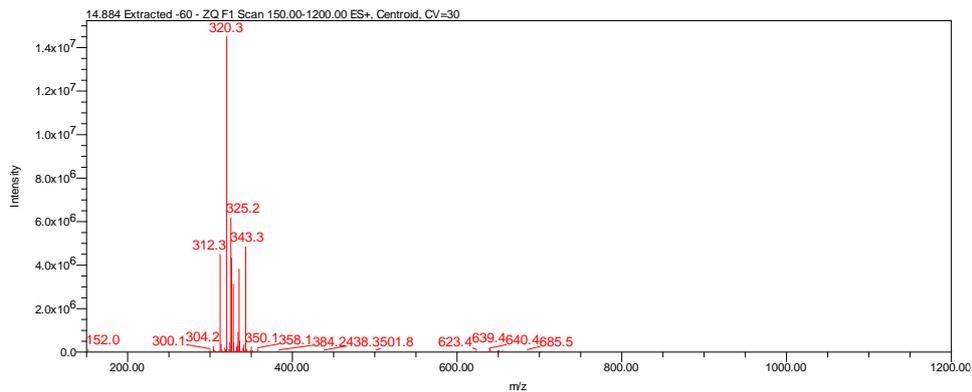


Figura 137. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra AcMA17_43.

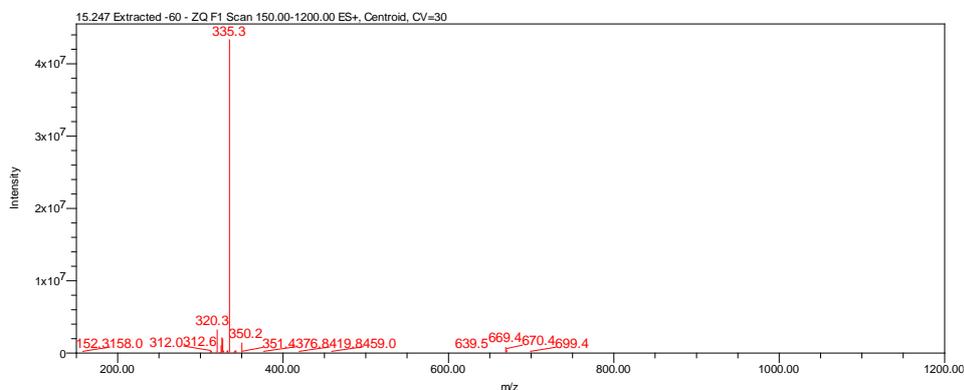


Figura 138. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra AcMA17_43.

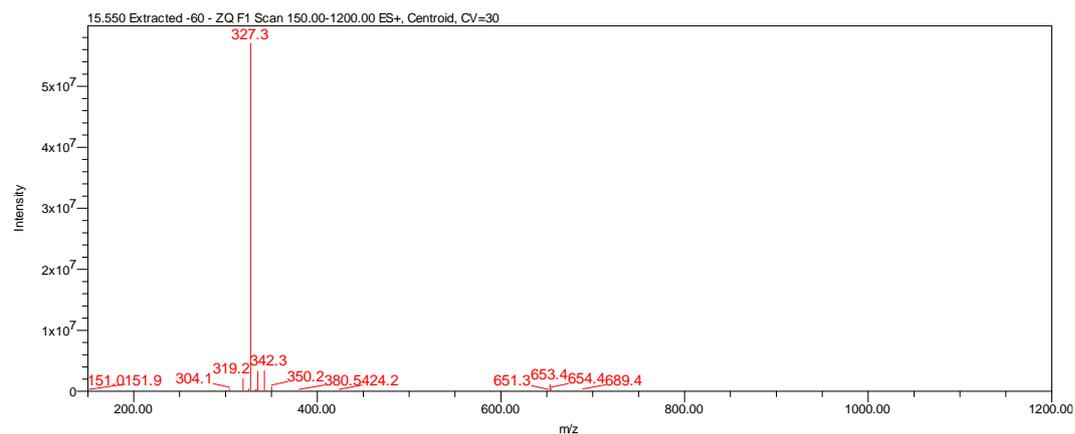


Figura 139. Cromatograma da amostra AcMA17_61 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.

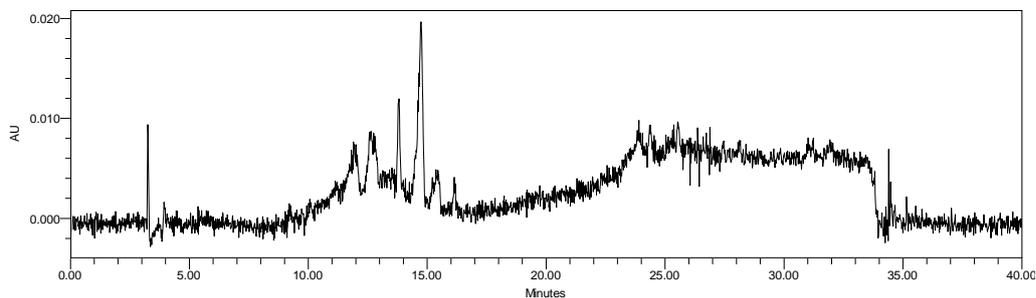


Figura 140. Espectro de UV representativo dos picos da amostra AcMA17_61.

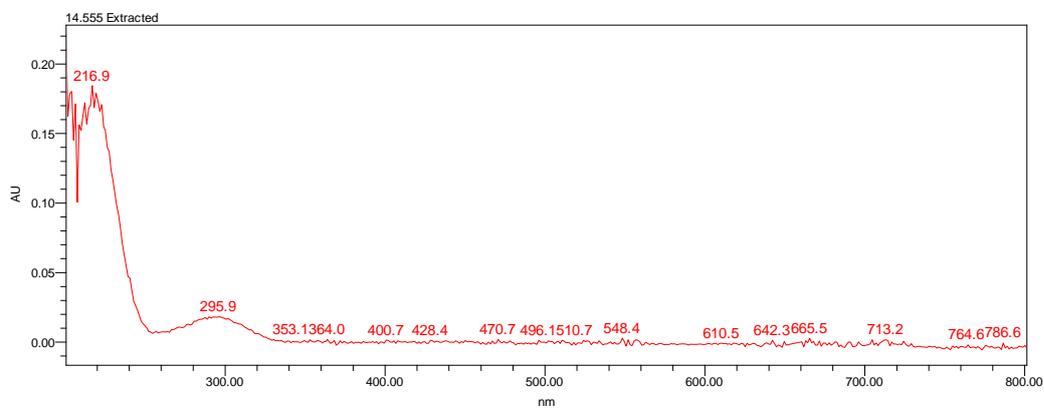


Figura 141. Cromatograma da amostra AcMA17_61 por HPLC-ELSD.

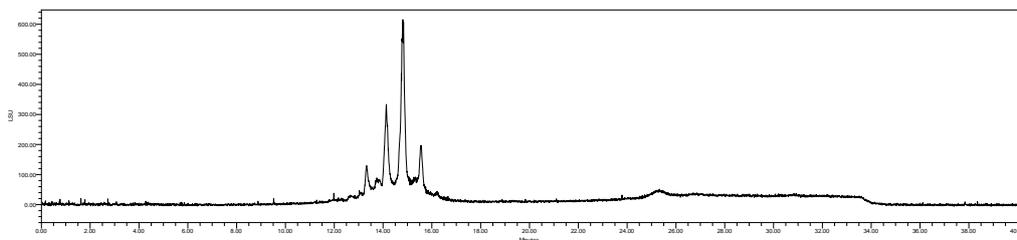


Figura 142. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização de alguns picos da amostra AcMA17_61.

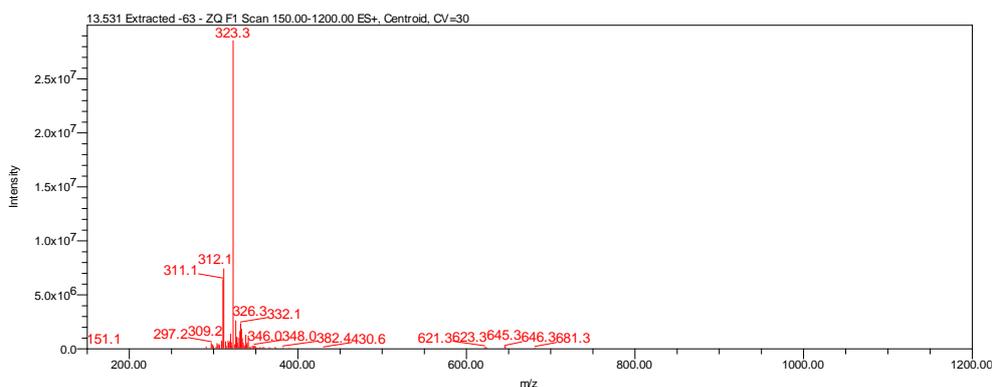


Figura 143. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização de alguns picos da amostra AcMA17_61.

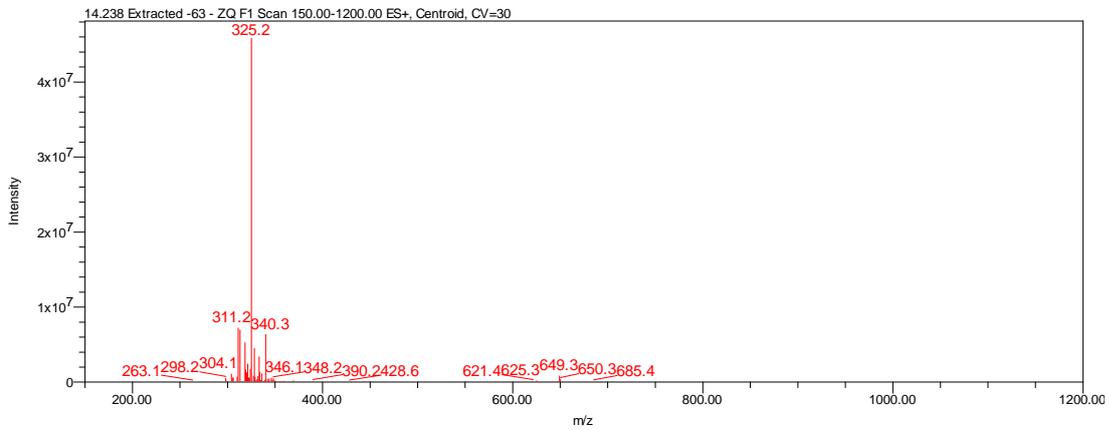


Figura 144. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização de alguns picos da amostra AcMA17_61.

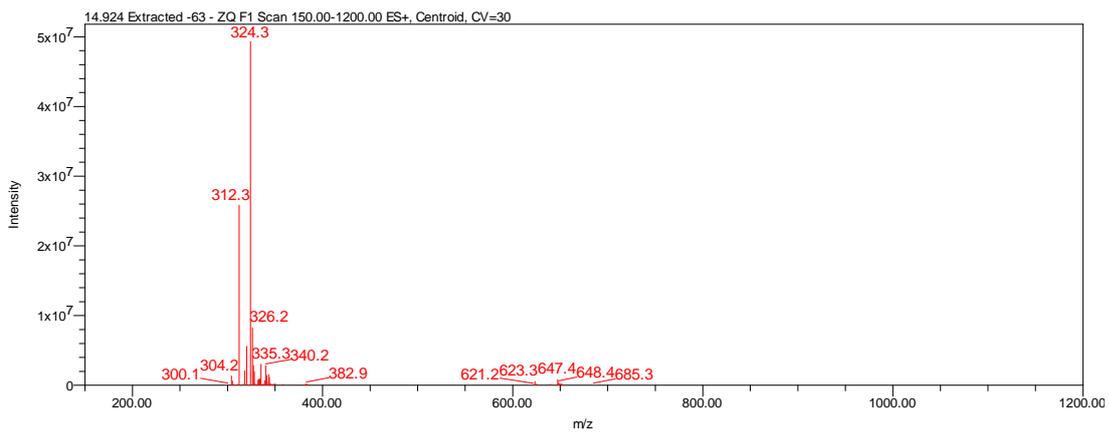


Figura 145. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização de alguns picos da amostra AcMA17_61.

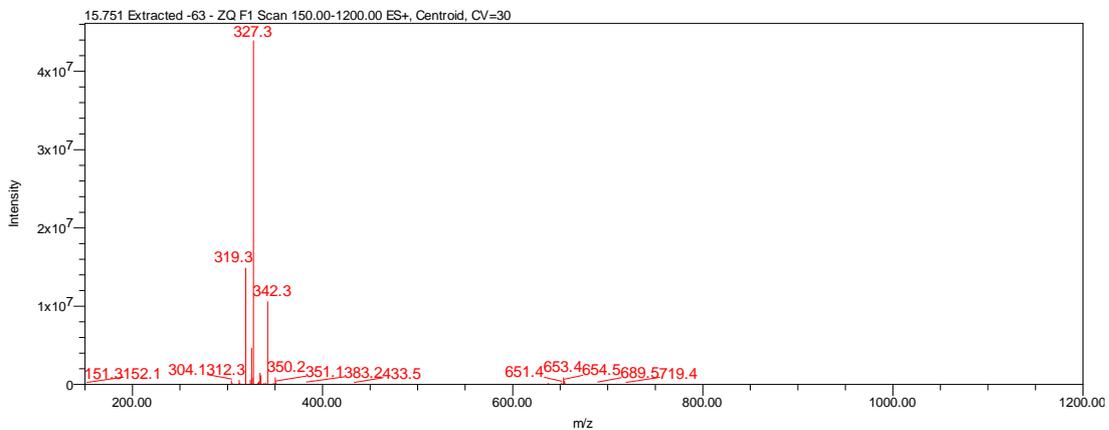


Figura 146. Cromatograma da amostra AcMA17_64 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.

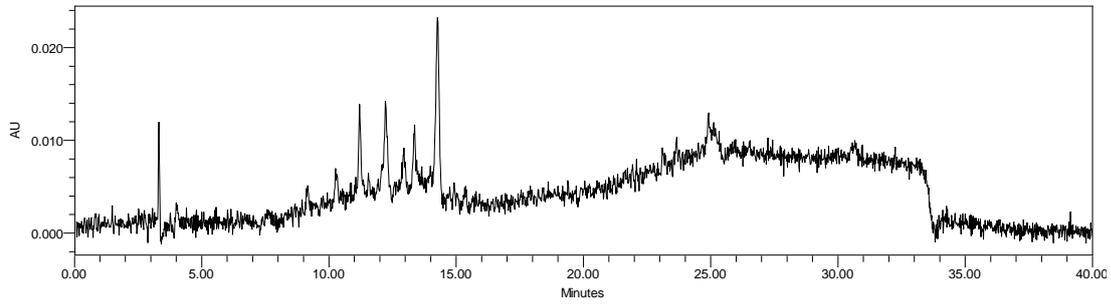


Figura 147. Espectro de UV representativo dos picos da amostra AcMA17_64.

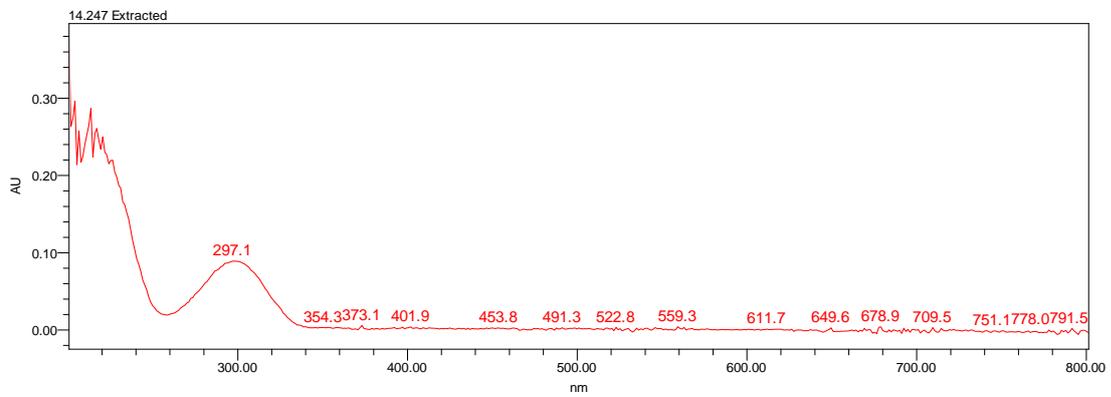


Figura 148. Cromatograma da amostra AcMA17_64 por HPLC-ELSD.

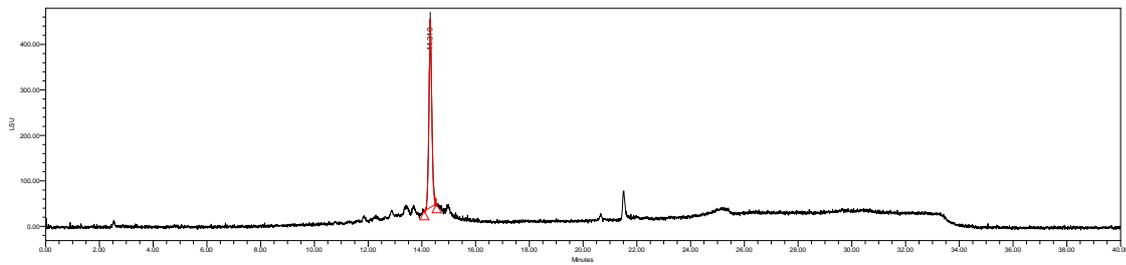


Figura 149. Cromatograma de íons totais da amostra AcMA17_64 por HPLC-MS.

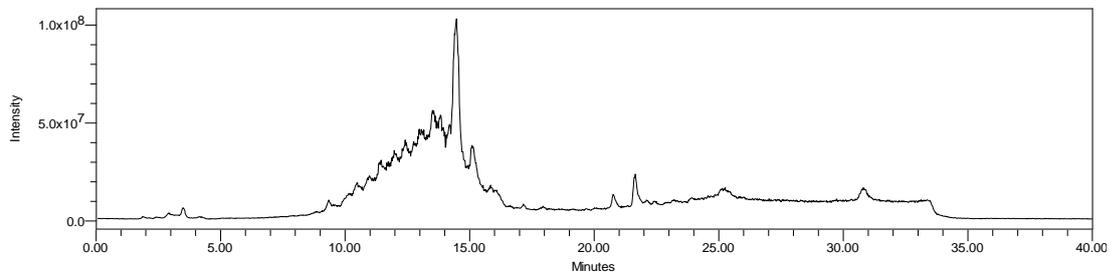


Figura 150. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização do pico mais intenso da amostra AcMA17_64.

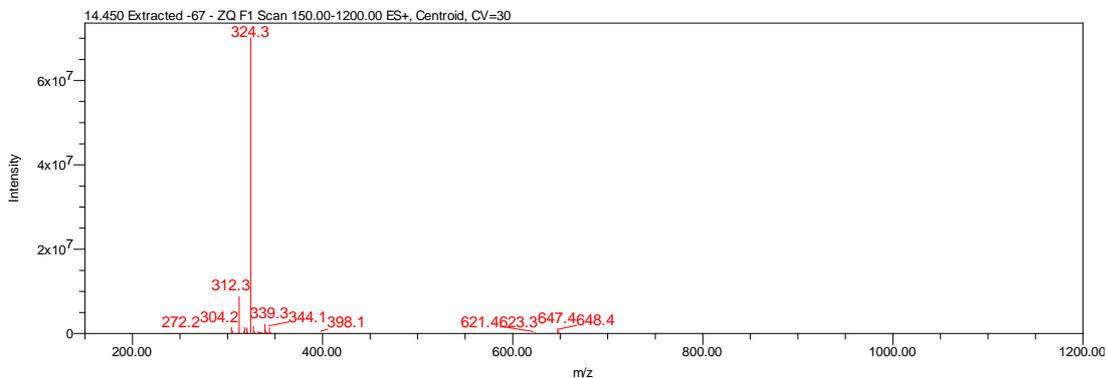


Figura 151. Cromatograma da amostra AcMA17_68 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.

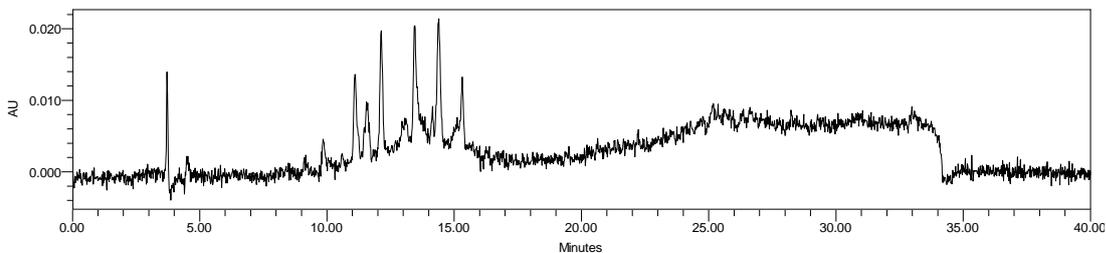


Figura 152. Espectro de UV representativo dos picos da amostra AcMA17_68.

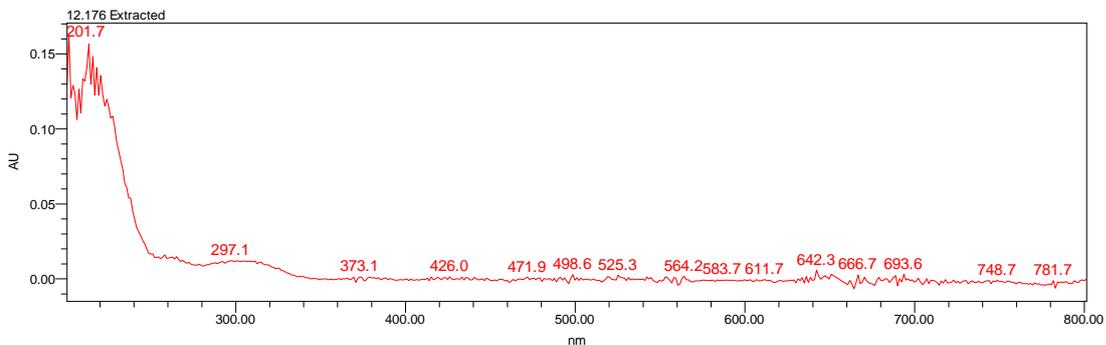


Figura 153. Cromatograma da amostra AcMA17_68 por HPLC-ELSD.

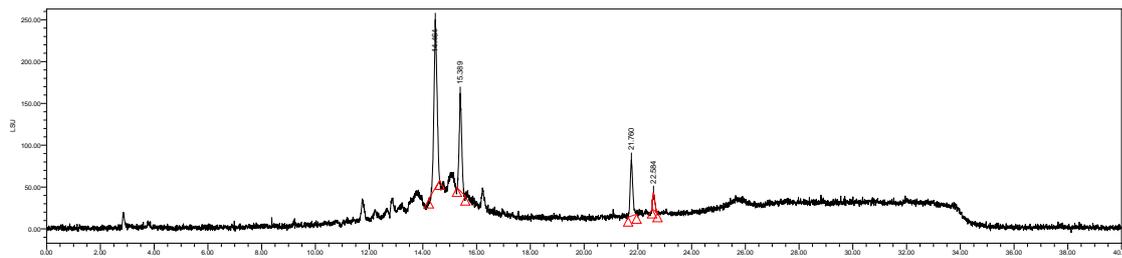


Figura 154. Cromatograma de íons totais da amostra AcMA17_68 por HPLC-MS.

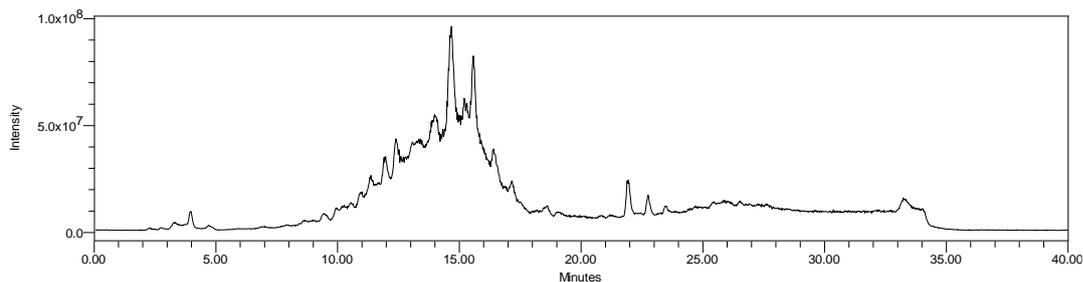


Figura 155. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização de alguns picos da amostra AcMA17_68.

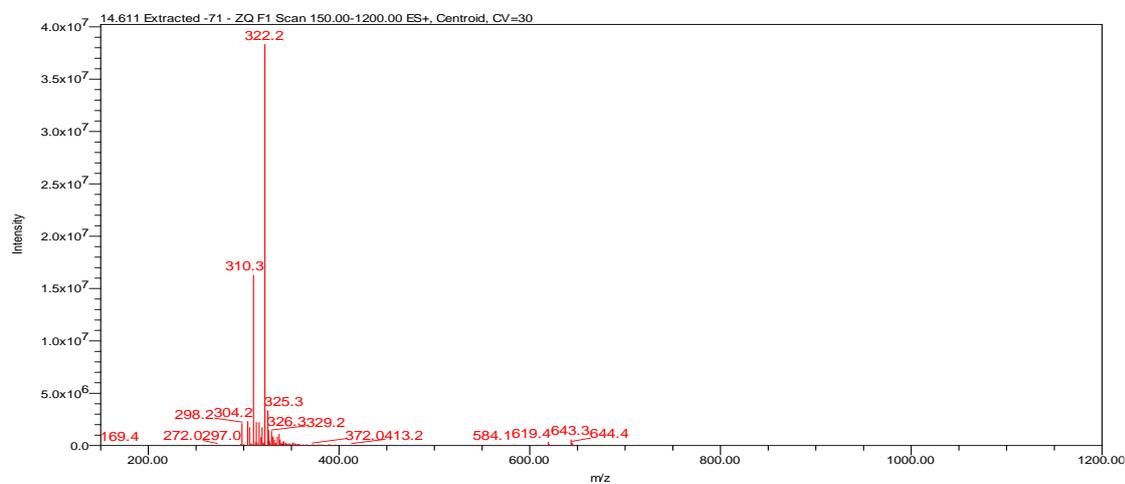


Figura 156. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização de alguns picos da amostra AcMA17_68.

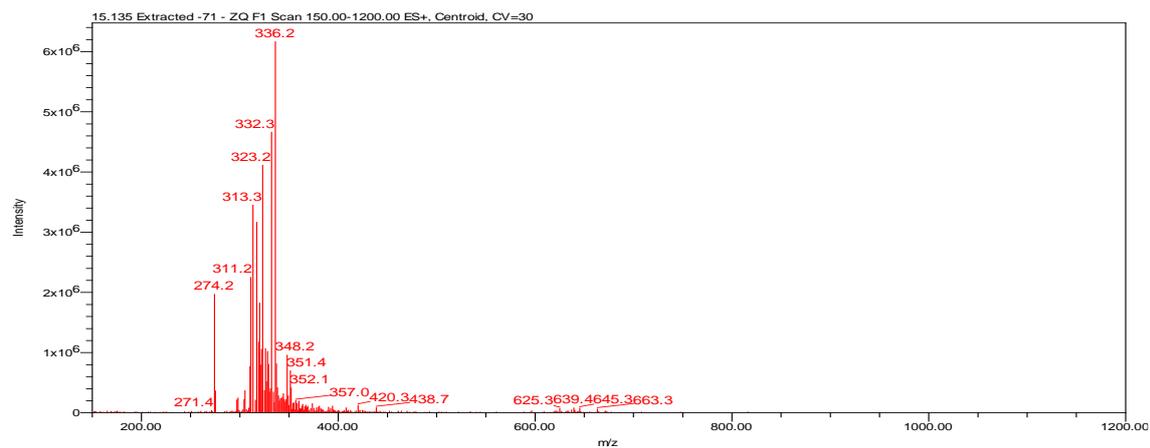


Figura 157. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização de alguns picos da amostra AcMA17_68.

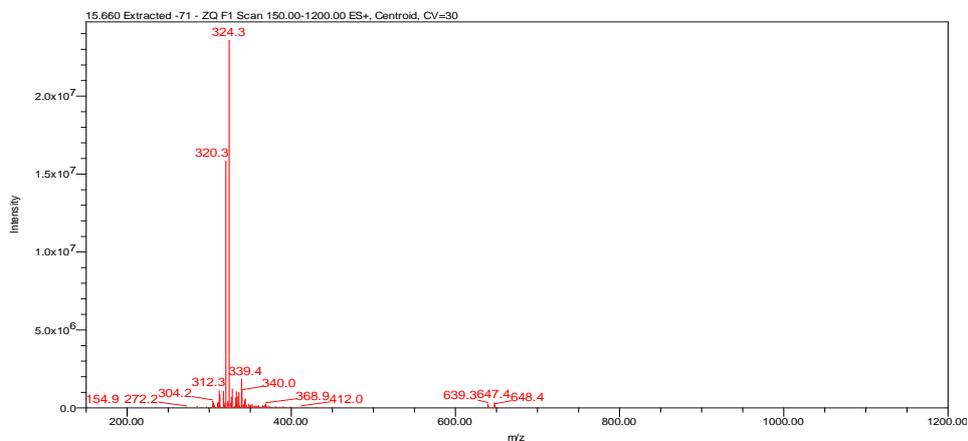


Figura 158. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização de alguns picos da amostra AcMA17_68.

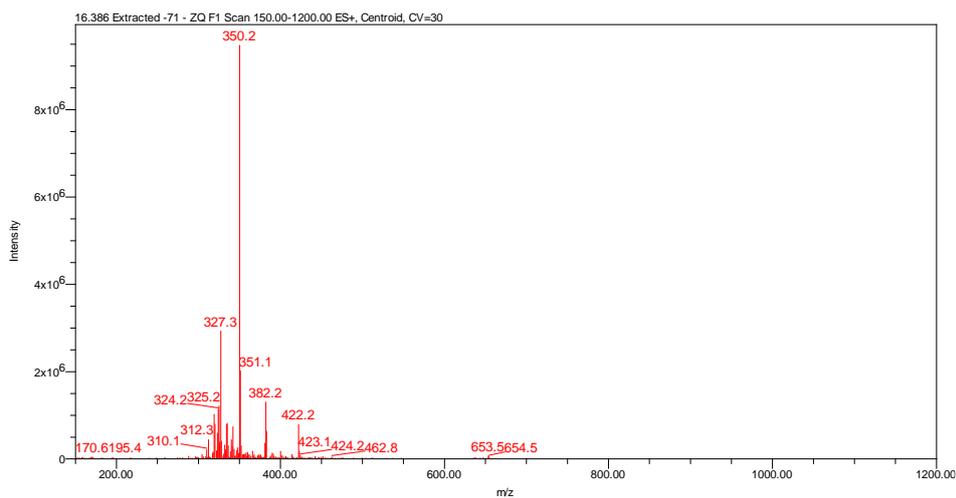


Figura 159. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização de alguns picos da amostra AcMA17_68.

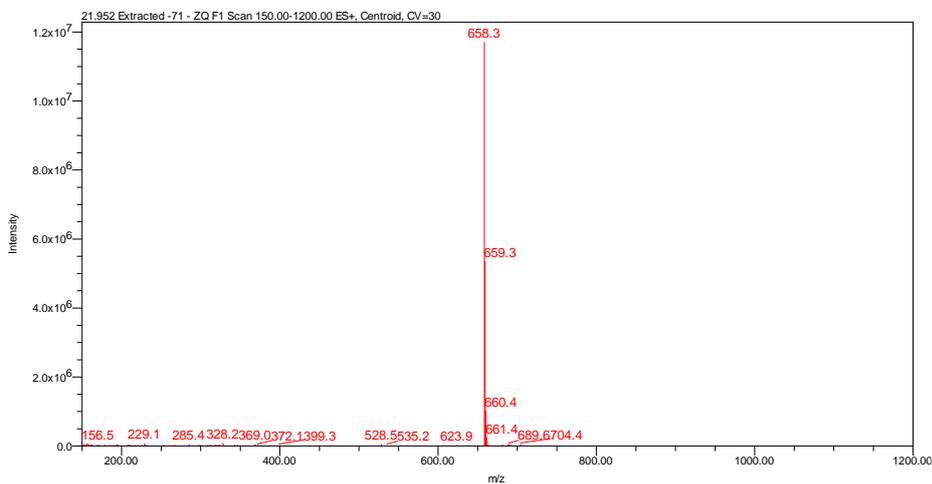


Figura 160. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização do pico mais intenso da amostra AcMA17_68.

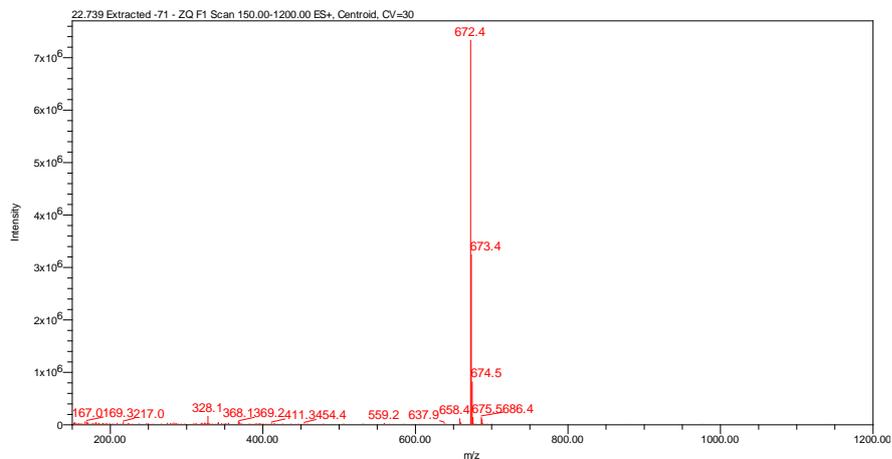


Figura 161. Cromatograma da amostra AcMA17_72 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.

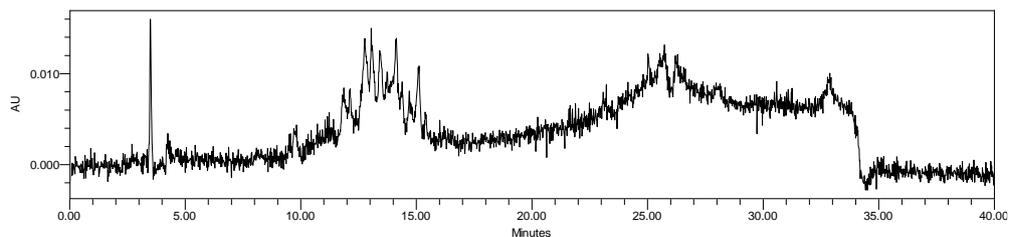


Figura 162. Cromatograma da amostra AcMA17_72 por HPLC-ELSD.

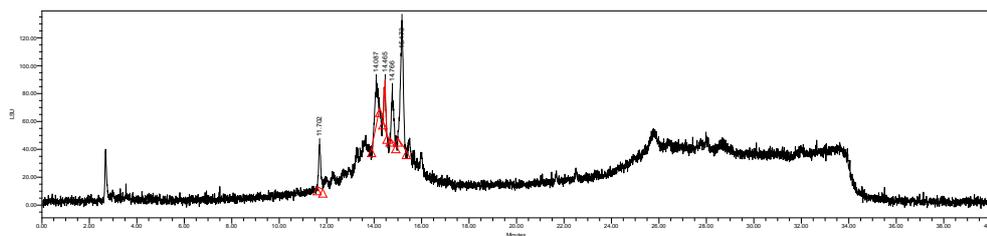


Figura 163. Espectro de UV representativo dos picos da amostra AcMA17_72.

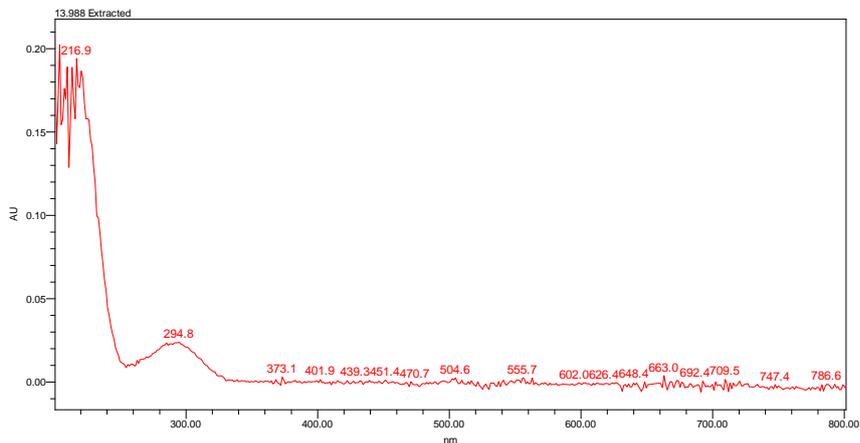


Figura 164. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização de alguns picos da amostra AcMA17_72.

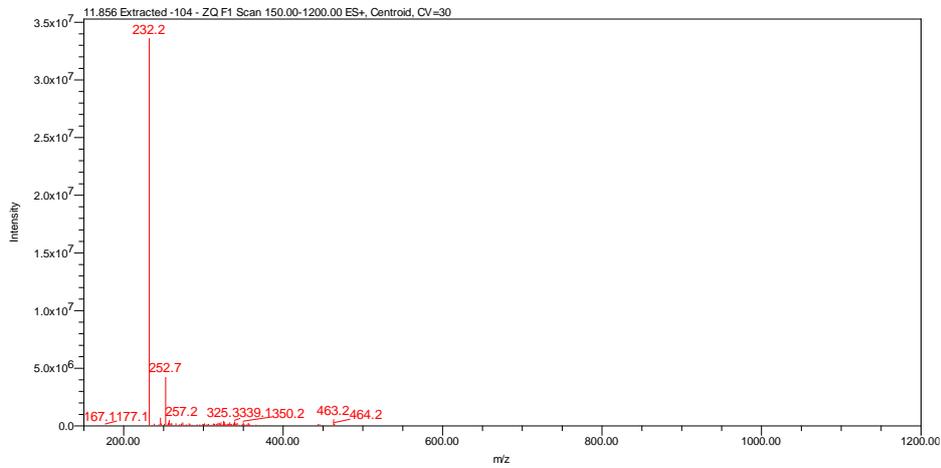


Figura 165. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização de alguns picos da amostra AcMA17_72.

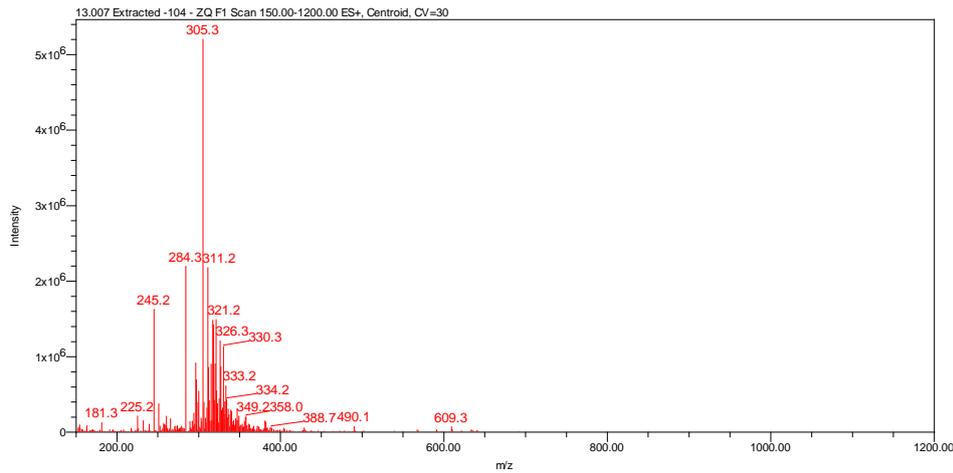


Figura 166. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização de alguns picos da amostra AcMA17_72.

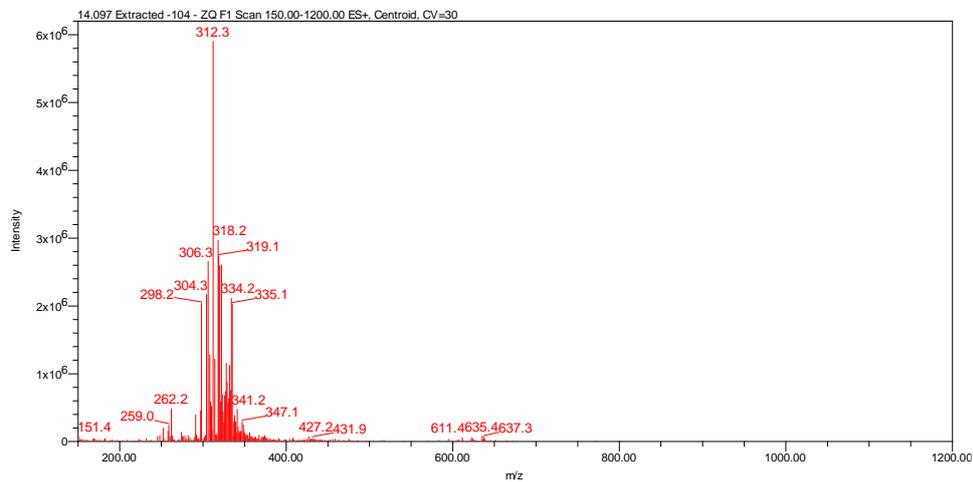


Figura 167. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização de alguns picos da amostra AcMA17_72.

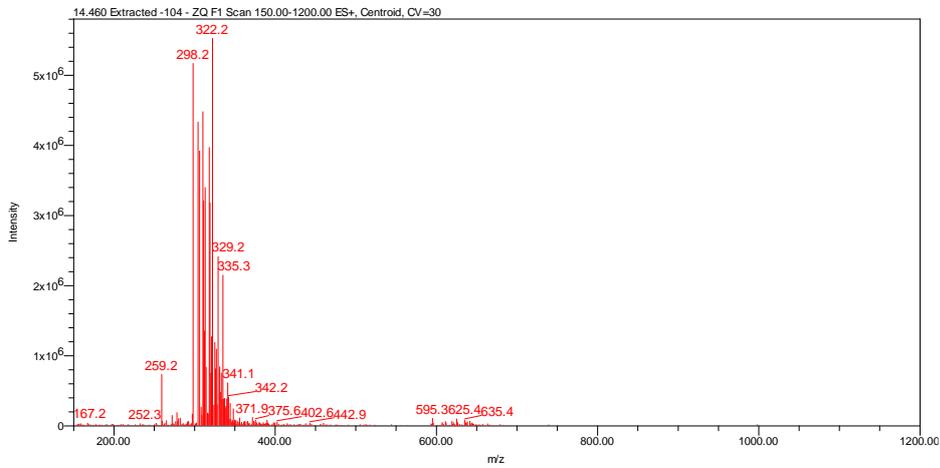


Figura 168. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização de alguns picos da amostra AcMA17_72.

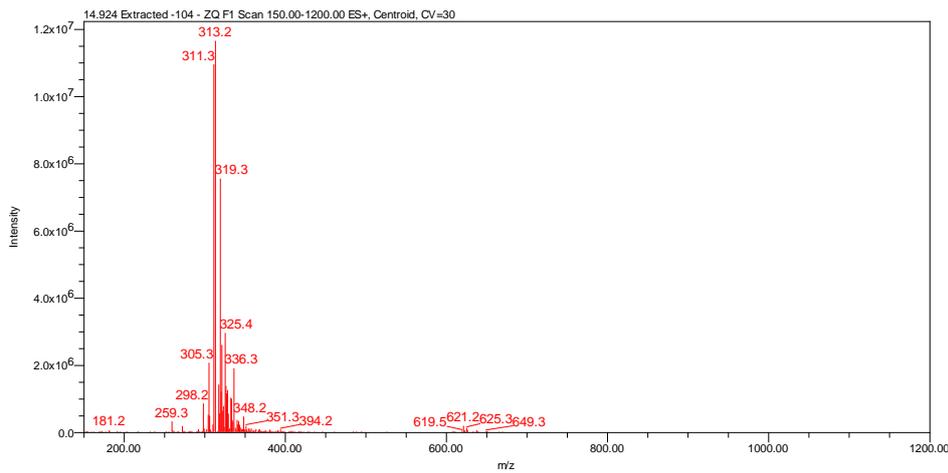


Figura 169. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização de alguns picos da amostra AcMA17_72.

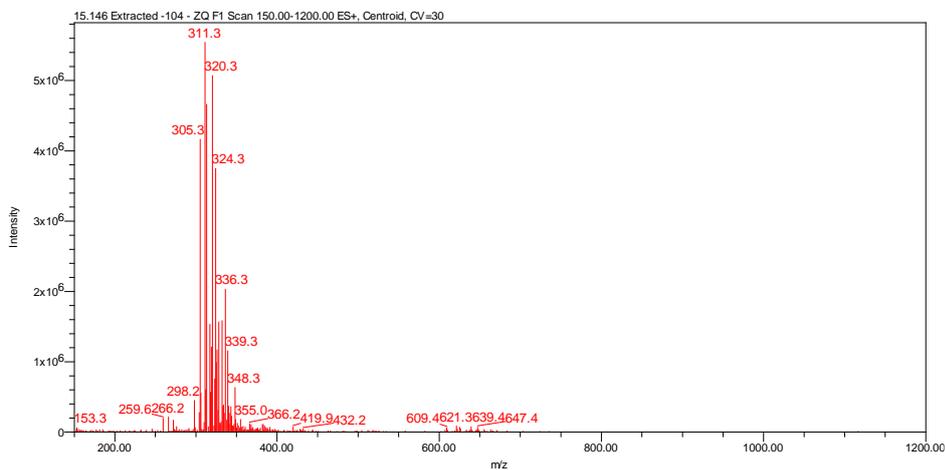


Figura 170. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização de alguns picos da amostra AcMA17_72.

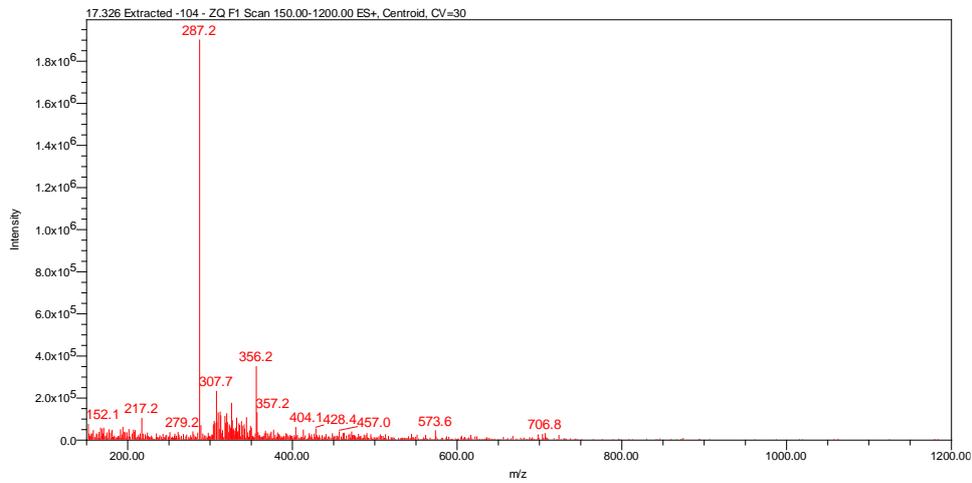


Figura 171. Cromatograma da amostra AcMA17_105 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.

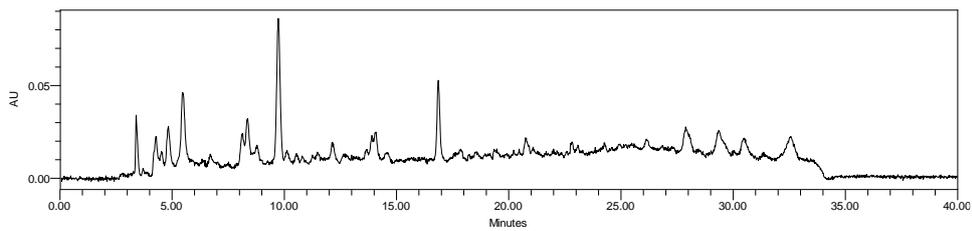


Figura 172. Espectro de UV representativo dos picos da amostra AcMA17_105.

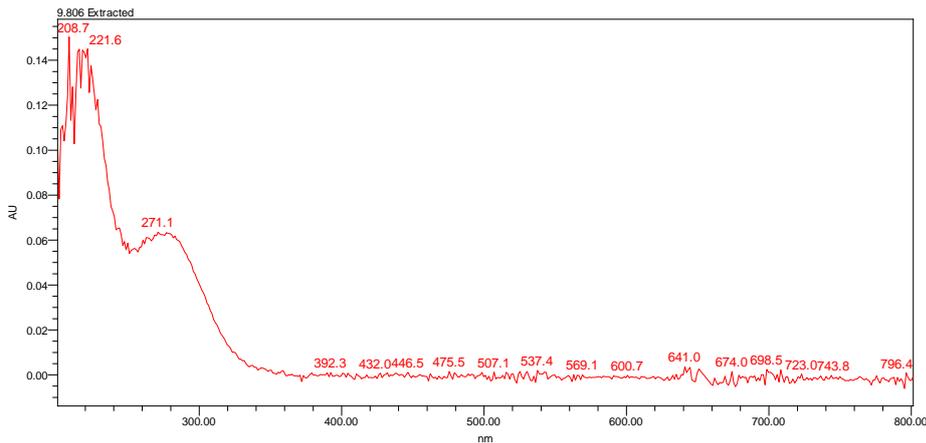


Figura 173. Cromatograma da amostra AcMA17_105 por HPLC-ELSD.

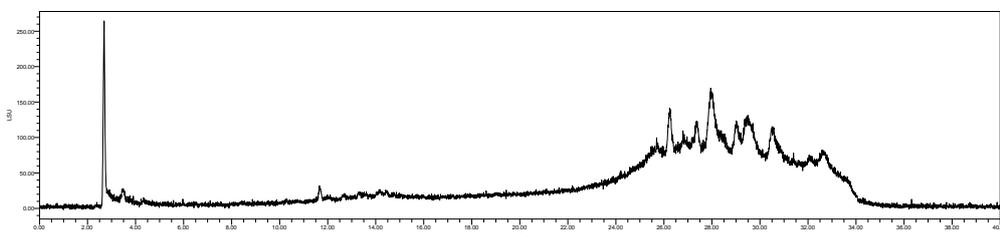


Figura 174. Cromatograma de íons totais da amostra AcMA17_72 por HPLC-ELSD.

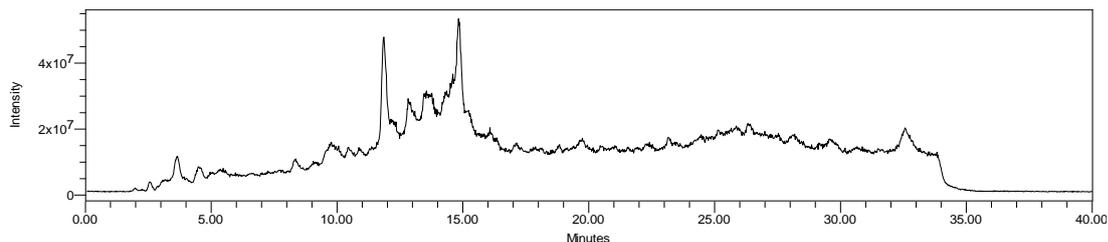


Figura 175. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização de alguns picos da amostra AcMA17_105.

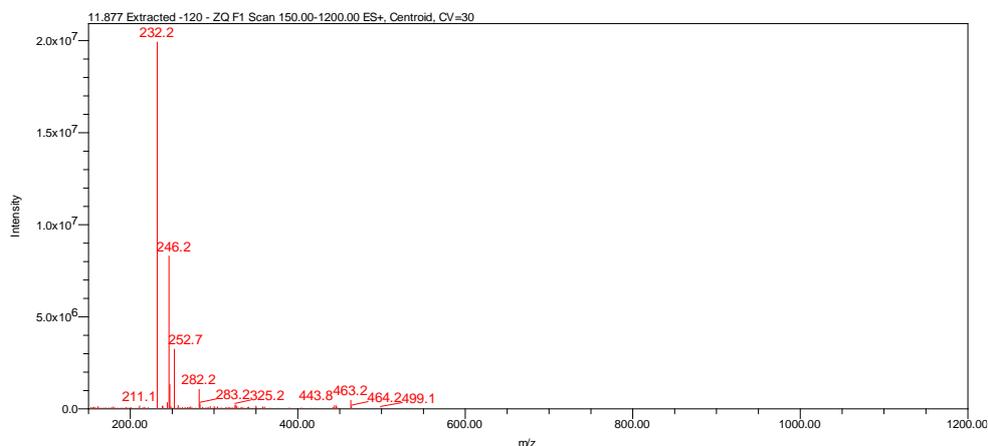


Figura 176. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização de alguns picos da amostra AcMA17_105.

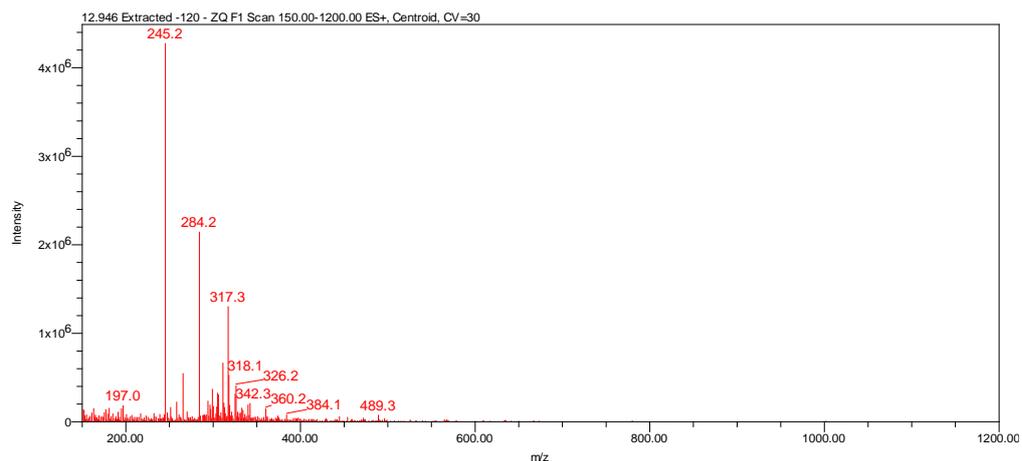


Figura 177. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização de alguns picos da amostra AcMA17_105.

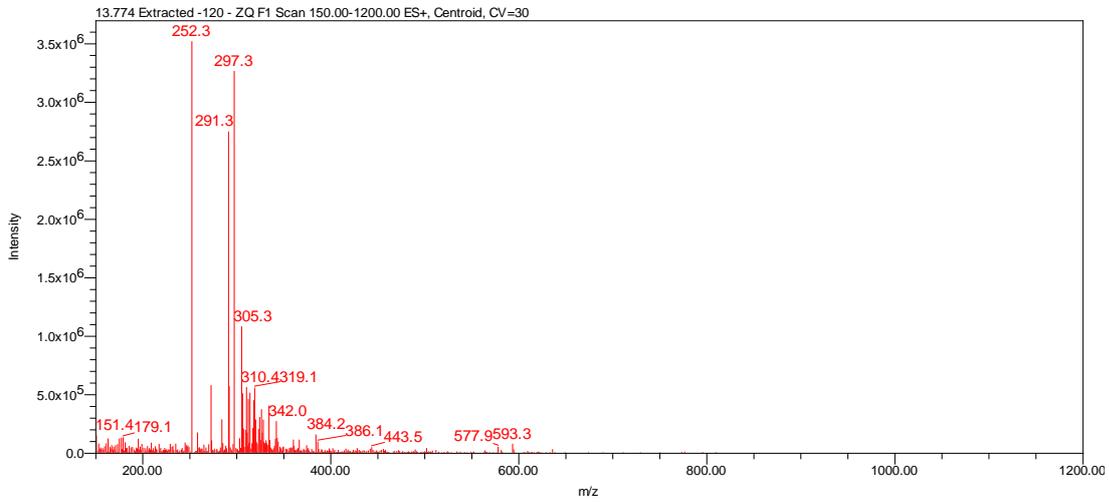


Figura 178. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização de alguns picos da amostra AcMA17_105.

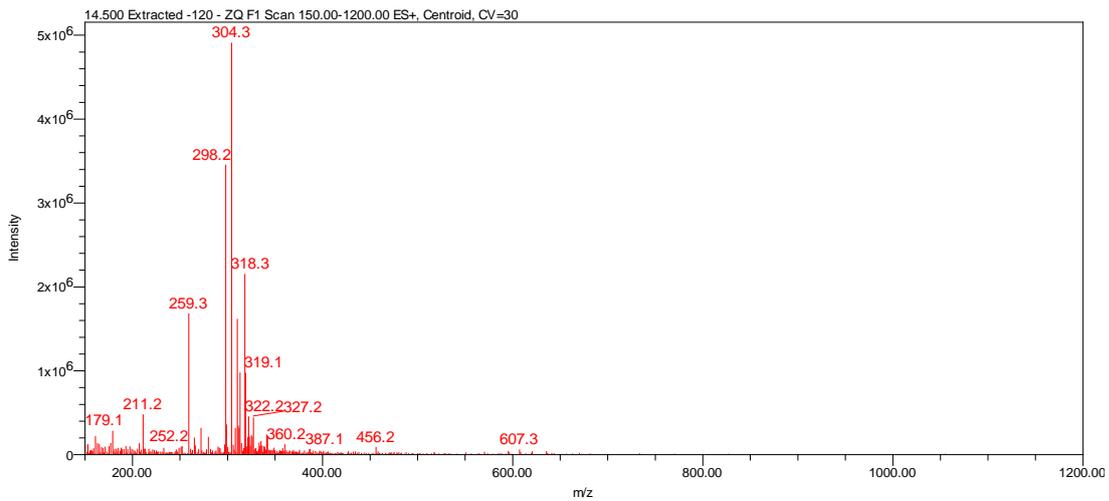


Figura 179. Cromatograma da amostra AcMA17_121 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.

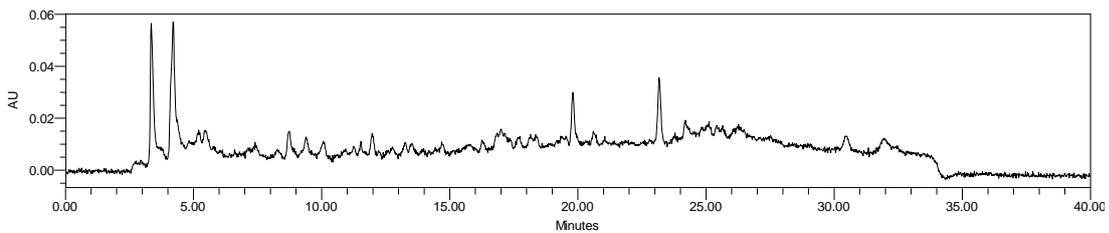


Figura 180. Espectro de UV representativo dos picos da amostra AcMA17_121.

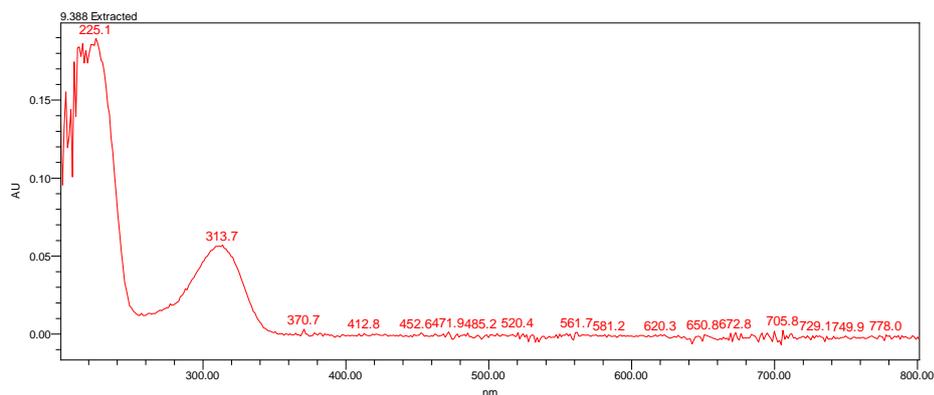


Figura 181. Cromatograma da amostra AcMA17_121 por HPLC-ELSD.

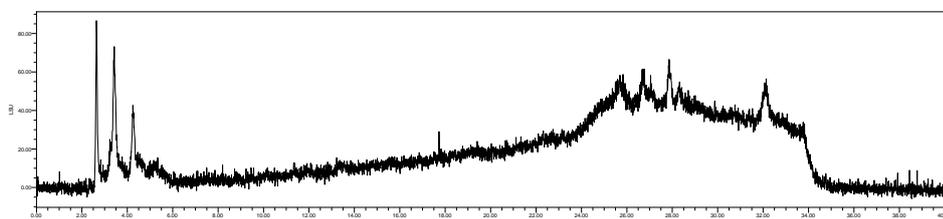


Figura 182. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização de alguns picos da amostra AcMA17_121.

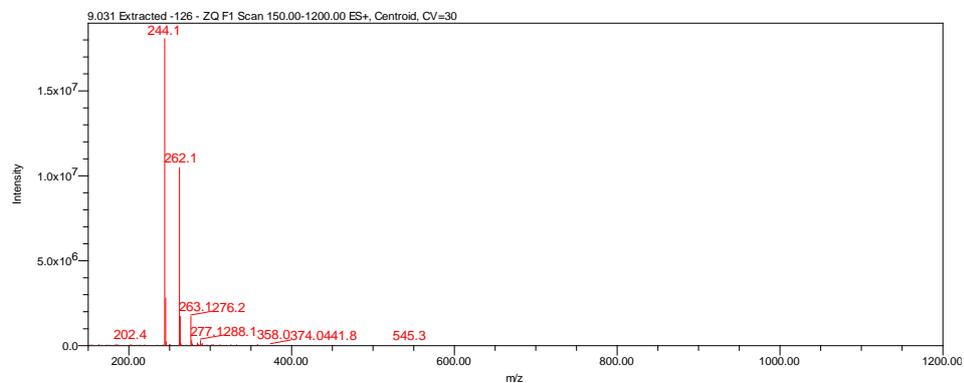


Figura 183. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização de alguns picos da amostra AcMA17_121.

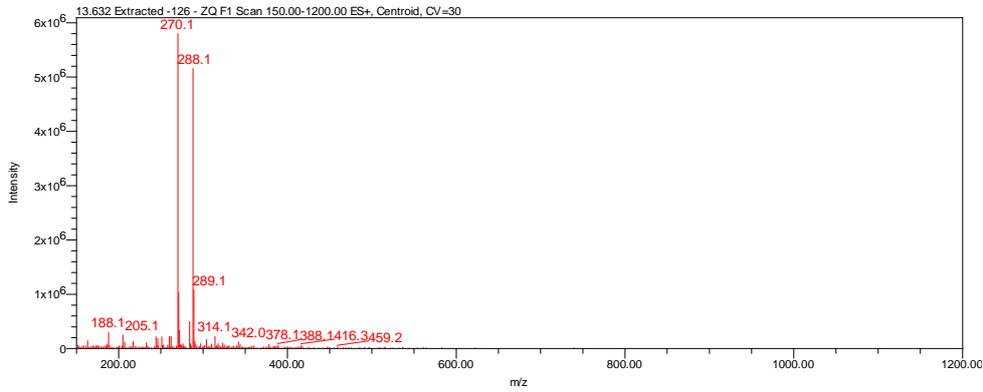


Figura 184. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização de alguns picos da amostra AcMA17_121.

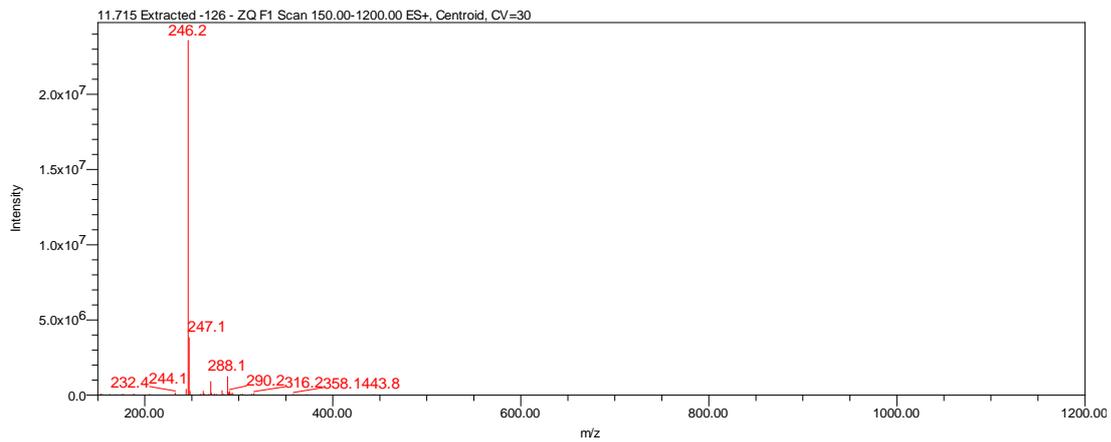


Figura 185. Cromatograma da amostra AcMA17_127 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.

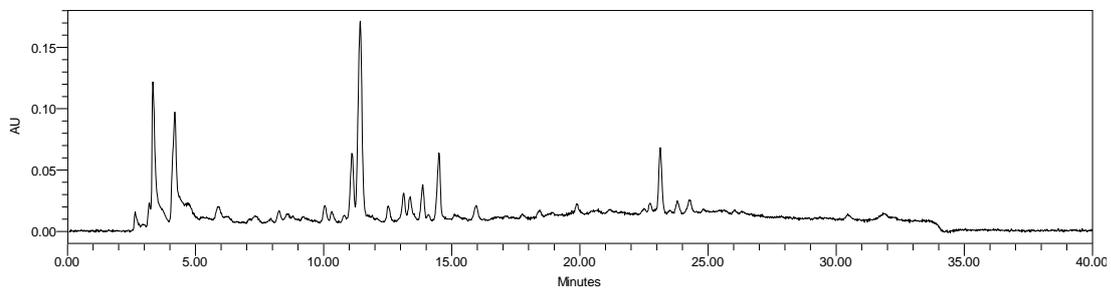


Figura 186. Espectro de UV representativo dos picos da amostra AcMA17_127.

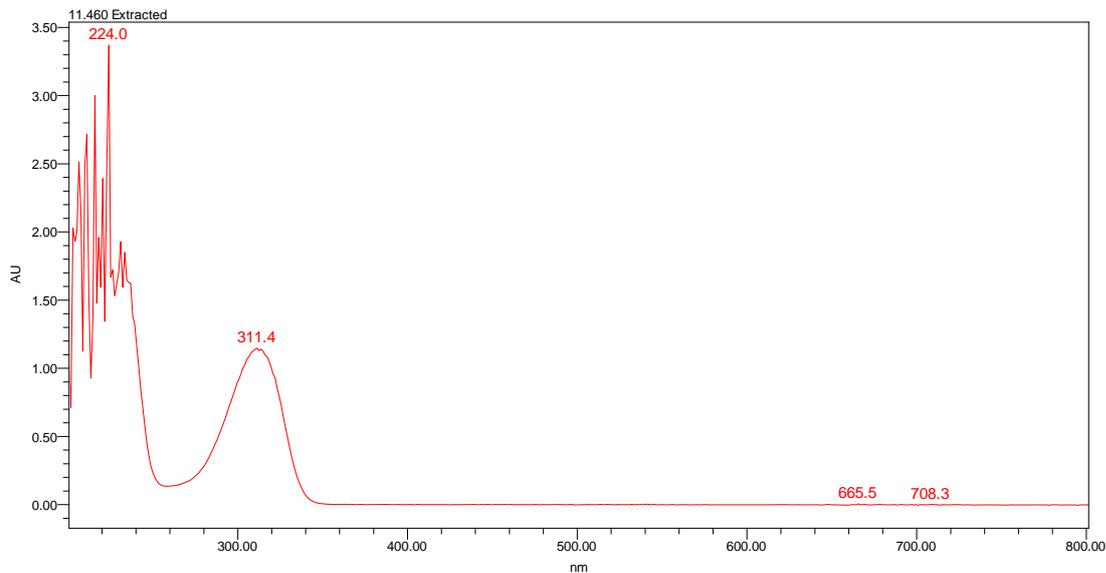


Figura 187. Cromatograma da amostra AcMA17_127 por HPLC-ELSD.

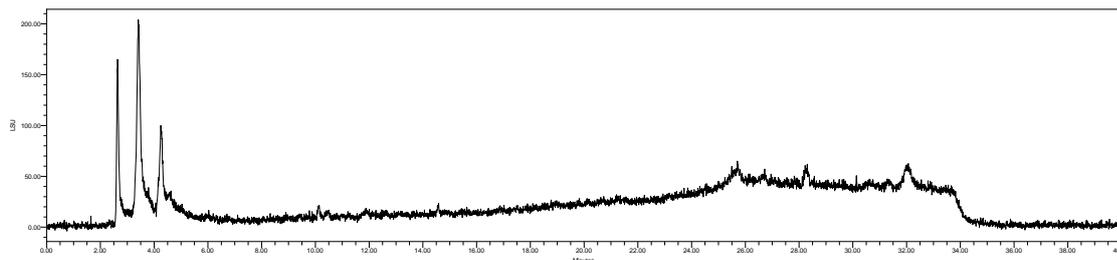


Figura 188. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização de alguns picos da amostra AcMA17_127.

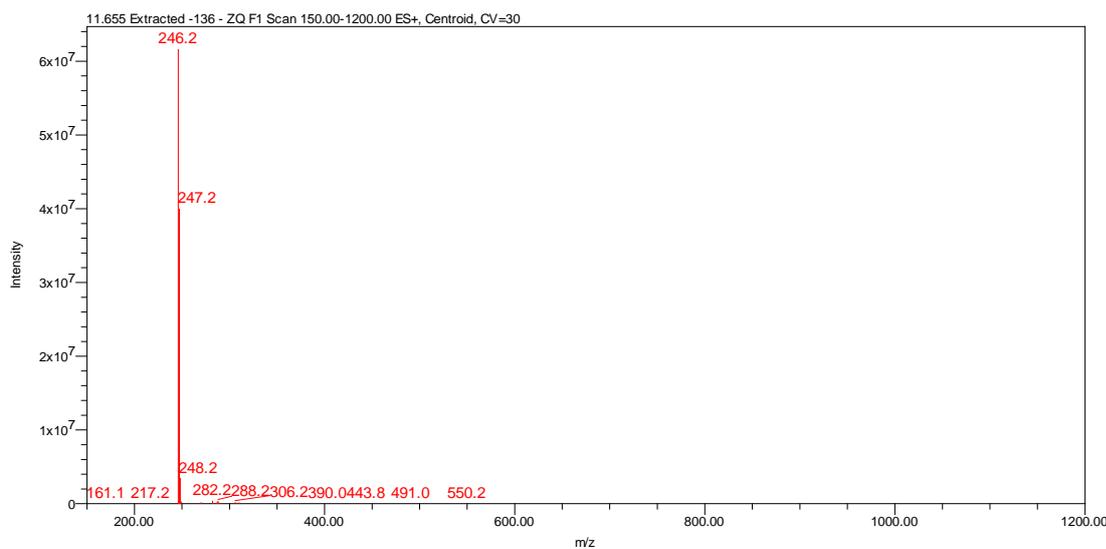


Figura 189. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização de alguns picos da amostra AcMA17_127.

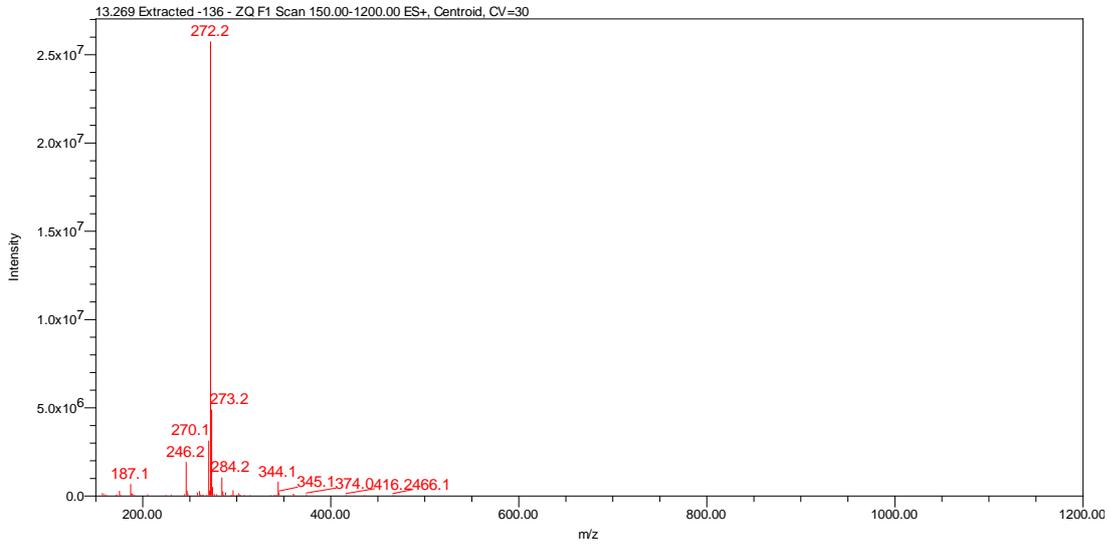


Figura 190. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização de alguns picos da amostra AcMA17_127.

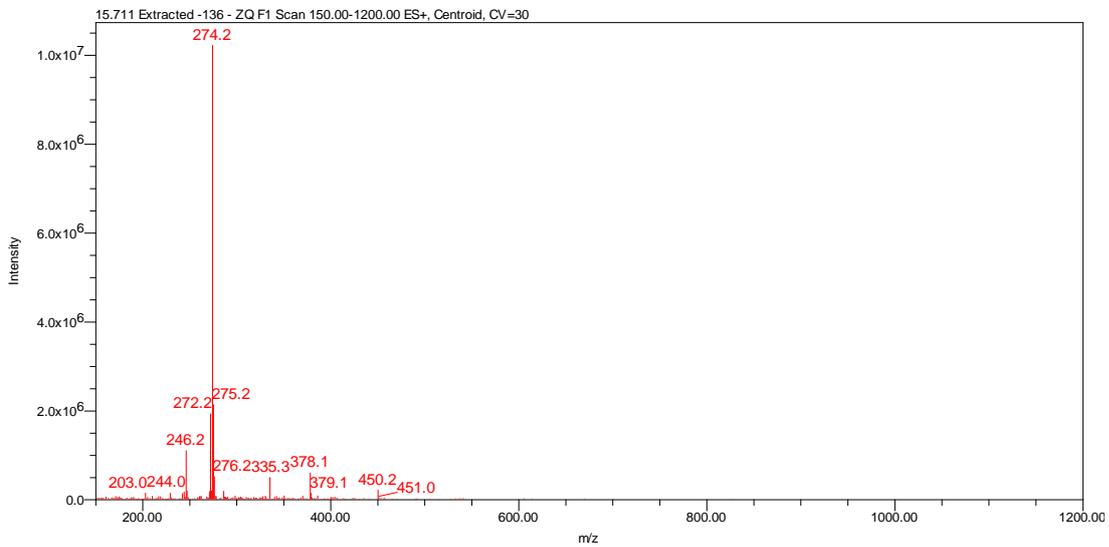


Figura 191. Cromatograma da amostra AcMA17_137 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.

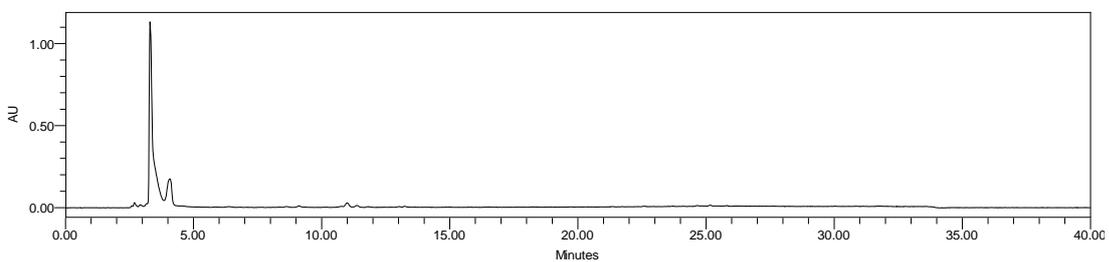


Figura 192. Cromatograma da amostra AcMA17_137 por HPLC-ELSD.

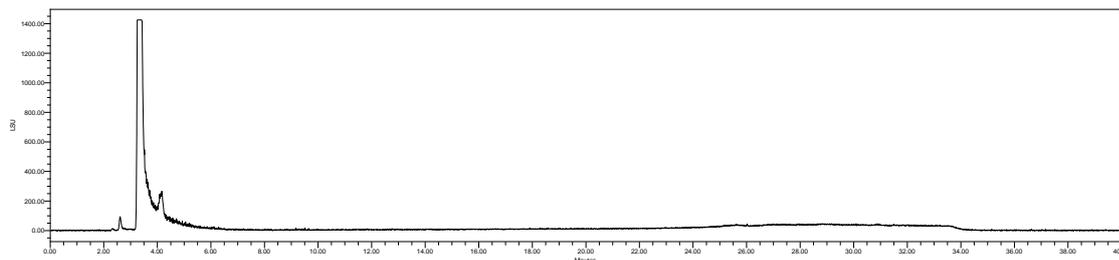


Figura 193. Cromatograma de íons totais da amostra AcMA17_137 por HPLC-ELSD.

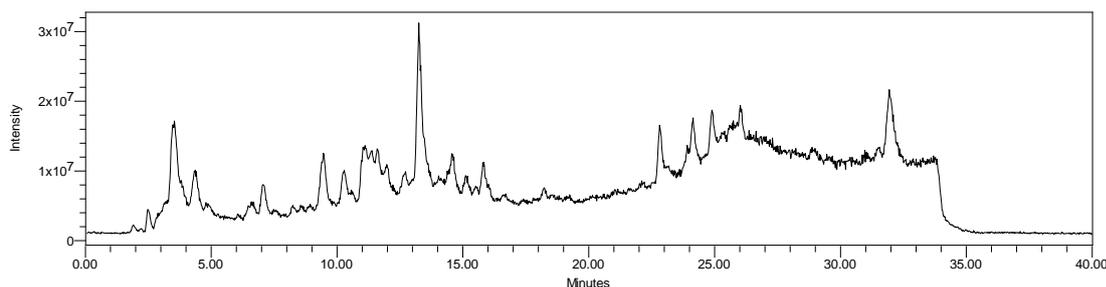


Figura 194. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização de alguns picos da amostra AcMA17_137.

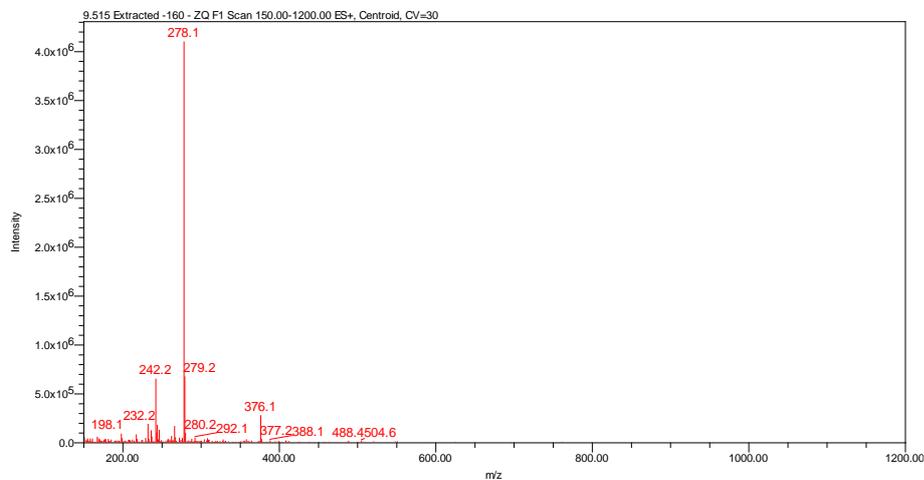


Figura 195. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização de alguns picos da amostra AcMA17_137.

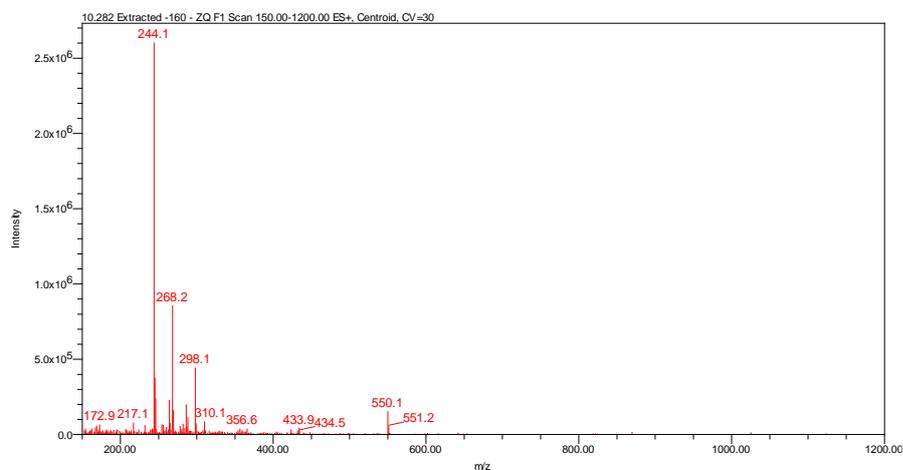


Figura 196. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização de alguns picos da amostra AcMA17_137.

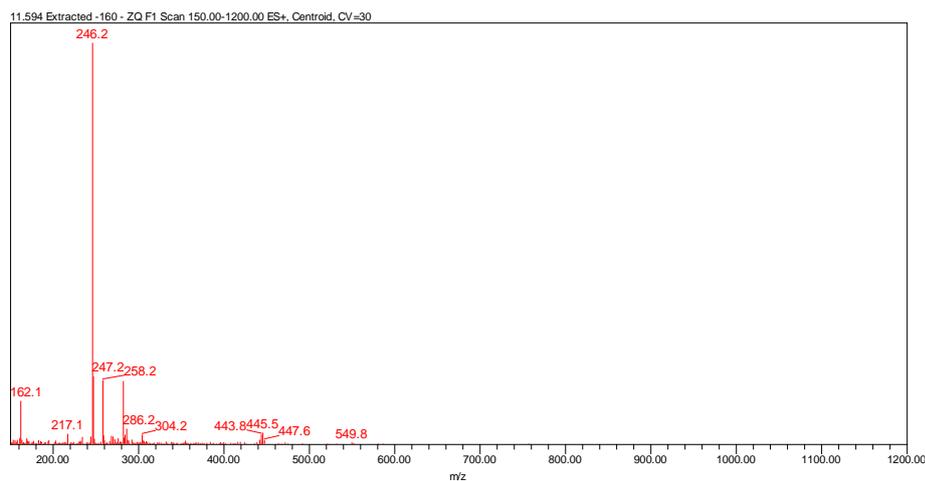


Figura 197. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização de alguns picos da amostra AcMA17_137.

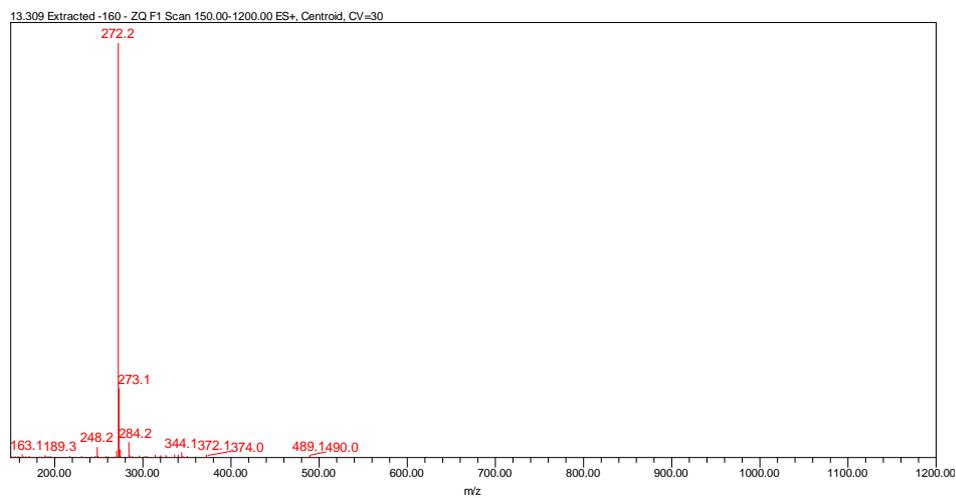
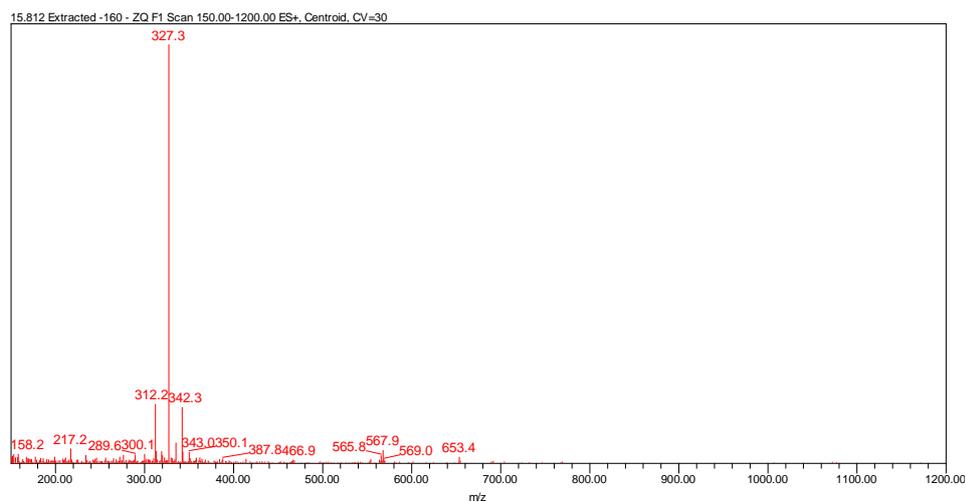


Figura 198. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização de alguns picos da amostra AcMA17_137.



Anexo B: Caracterização por HPLC-ELSD-UV-MS das frações do segundo fracionamento por Sephadex LH-20 de AcMA17.

Figura 199. Cromatograma da amostra MA17s2_1 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.

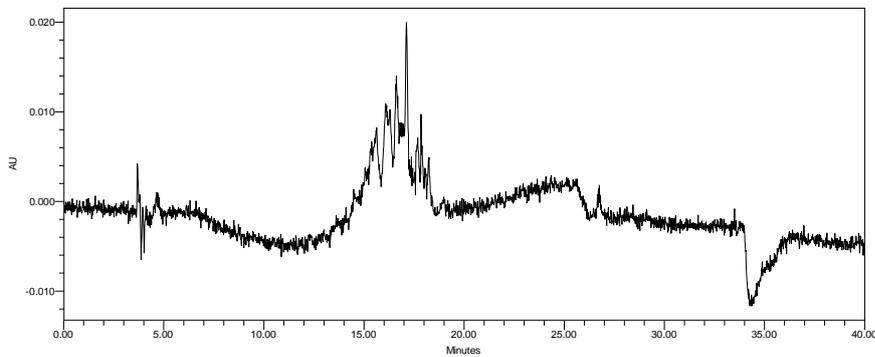


Figura 200. Espectro de UV representativo dos picos da amostra MA17s2_1.

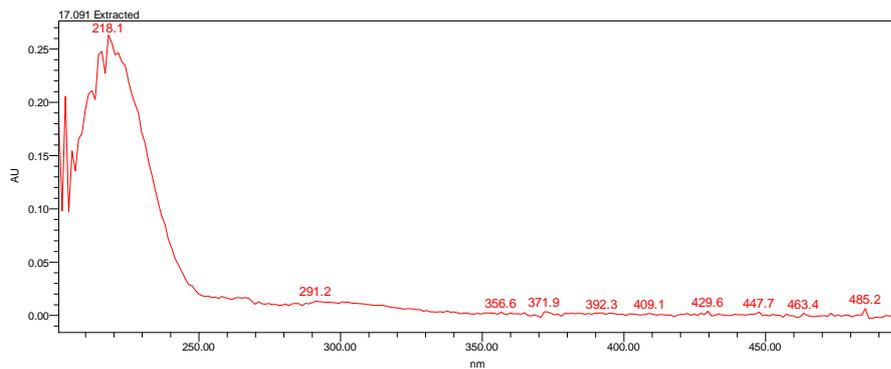


Figura 201. Cromatograma da amostra MA17s2_1 por HPLC-ELSD.

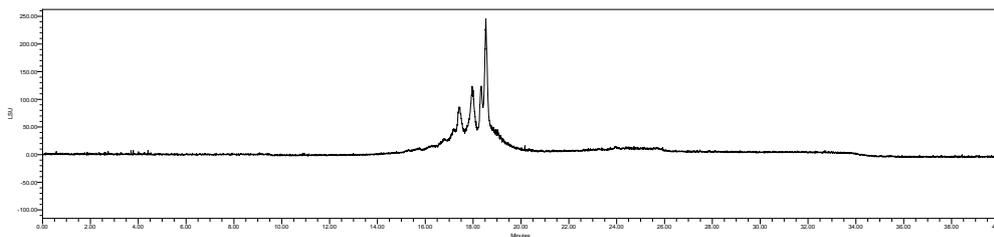


Figura 202. Cromatograma de íons totais da amostra MA17s2_1 por HPLC-MS.

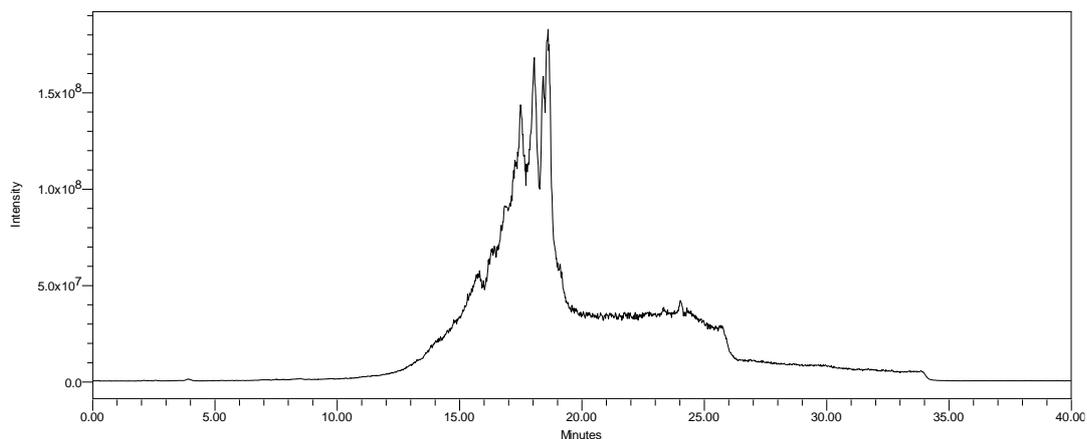


Figura 203. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_1.

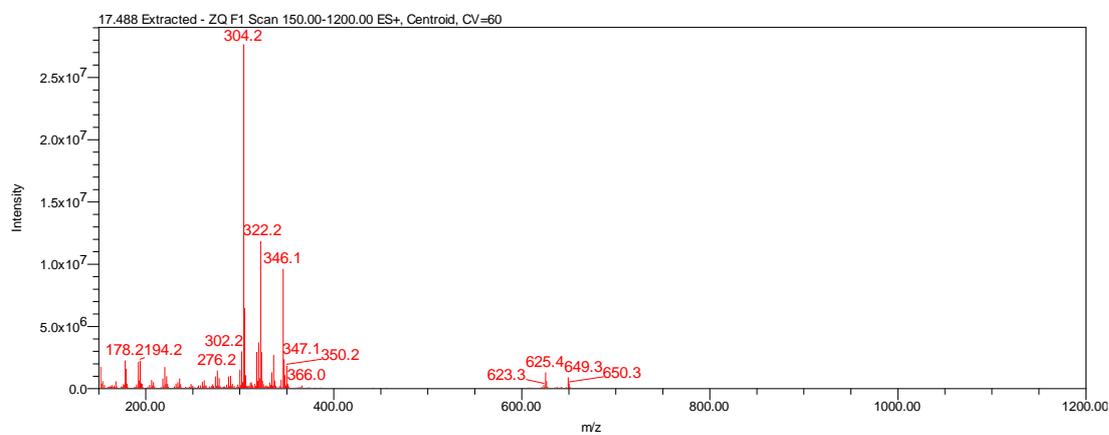


Figura 204. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_1.

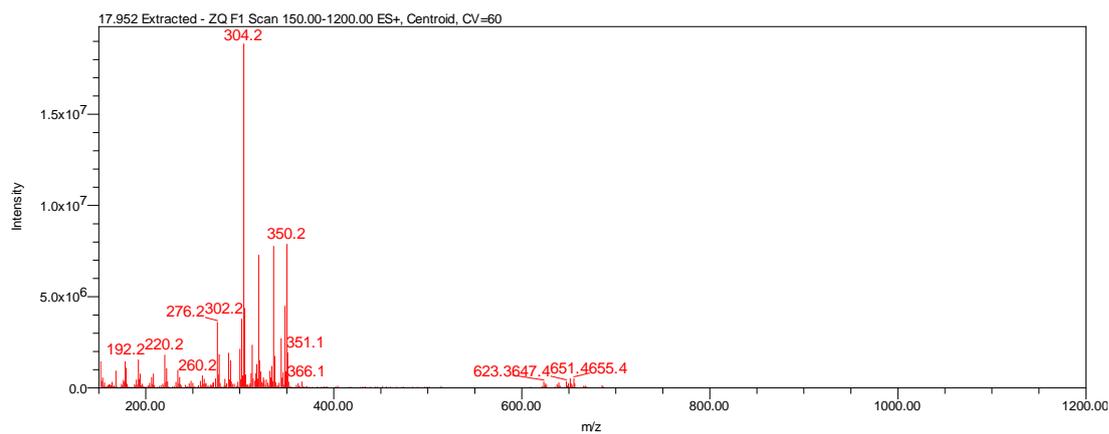


Figura 205. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_1.

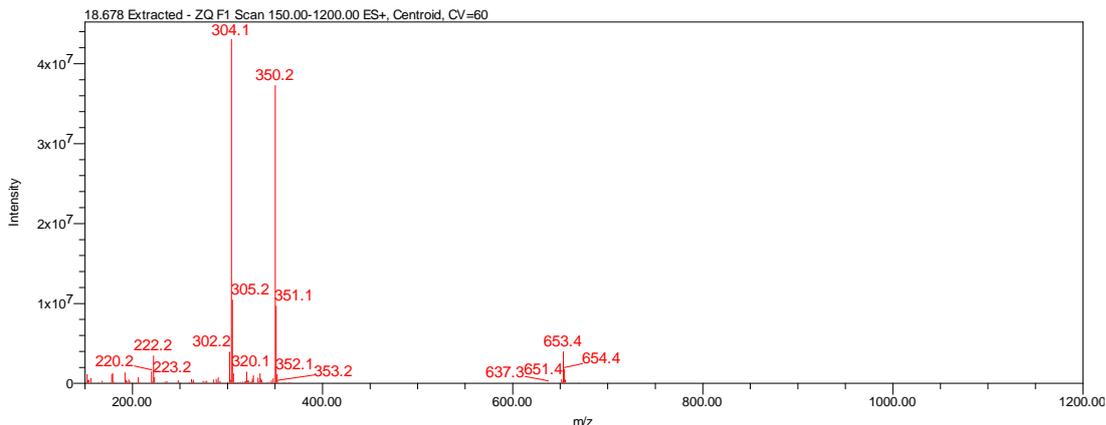


Figura 206. Cromatograma da amostra MA17s2_59 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.

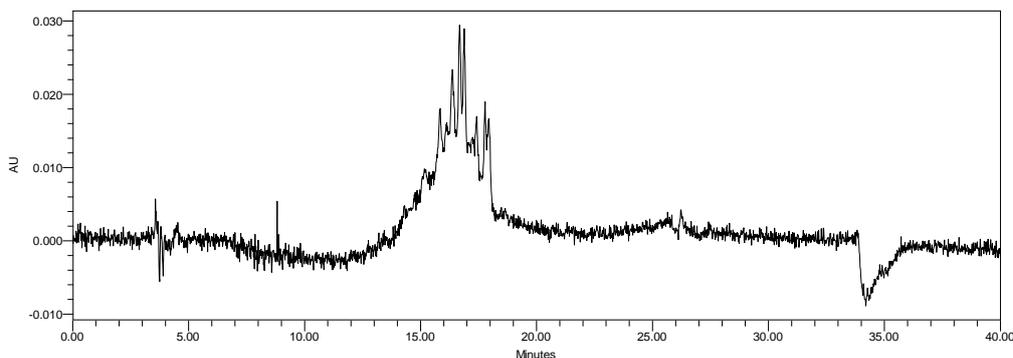


Figura 207. Espectro de UV representativo dos picos da amostra MA17s2_59.

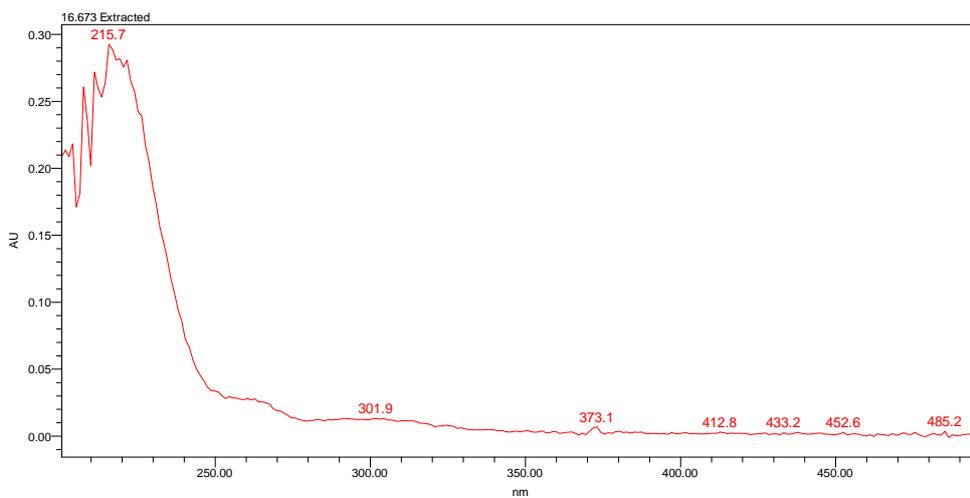


Figura 208. Cromatograma da amostra MA17s2_59 por HPLC-ELSD.

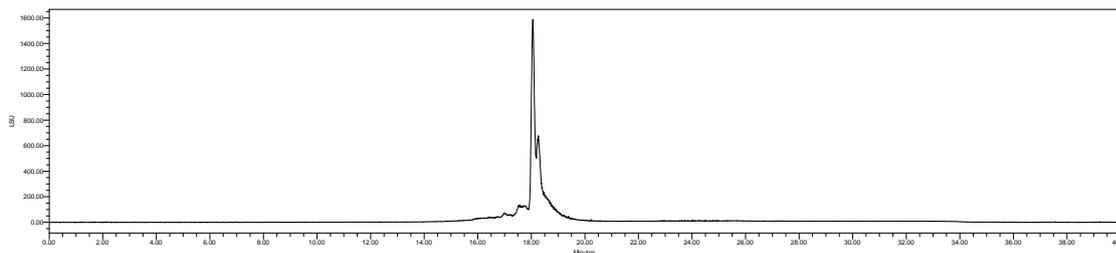


Figura 209. Cromatograma de íons totais da amostra MA17s2_59 por HPLC-MS.

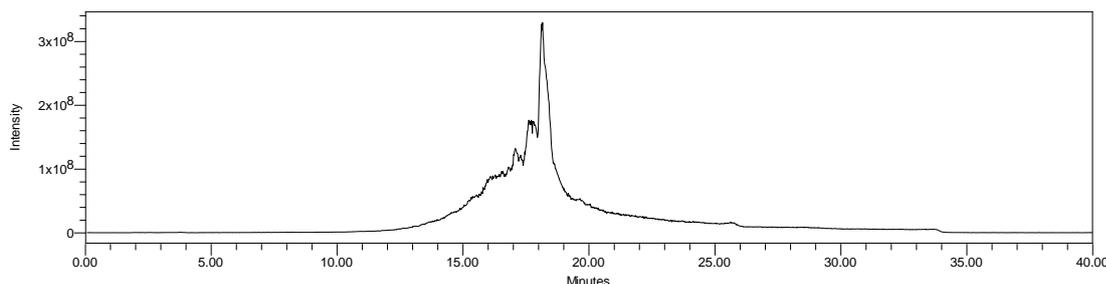


Figura 210. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_59.

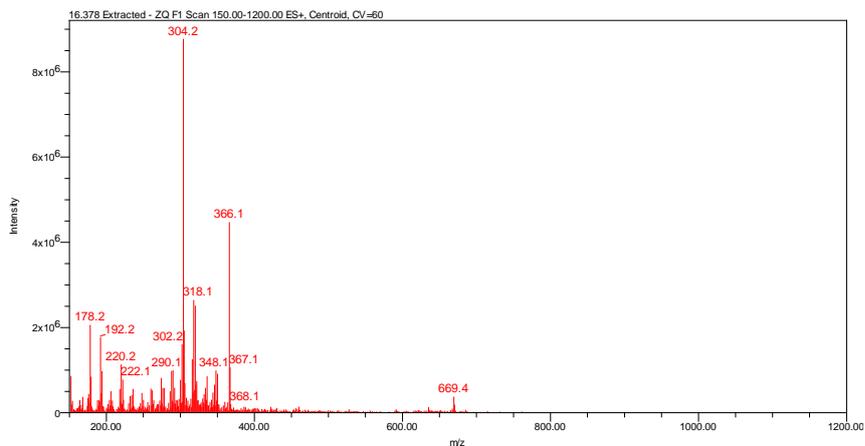


Figura 211. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_59.

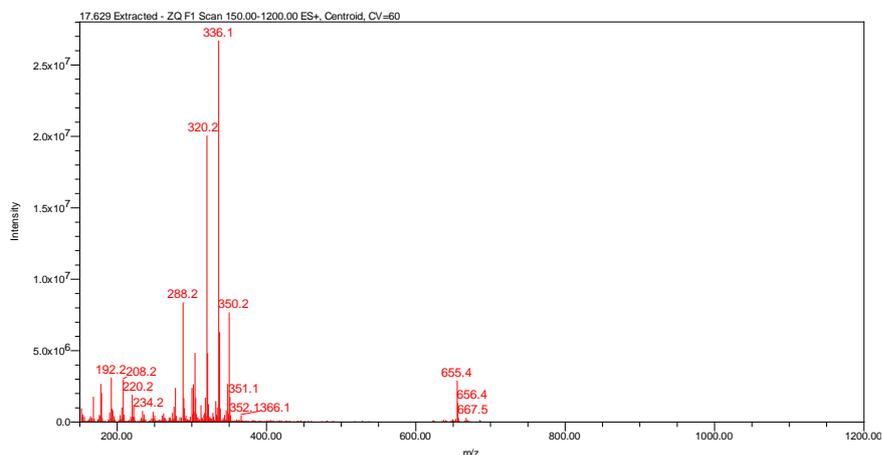


Figura 212. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_59.

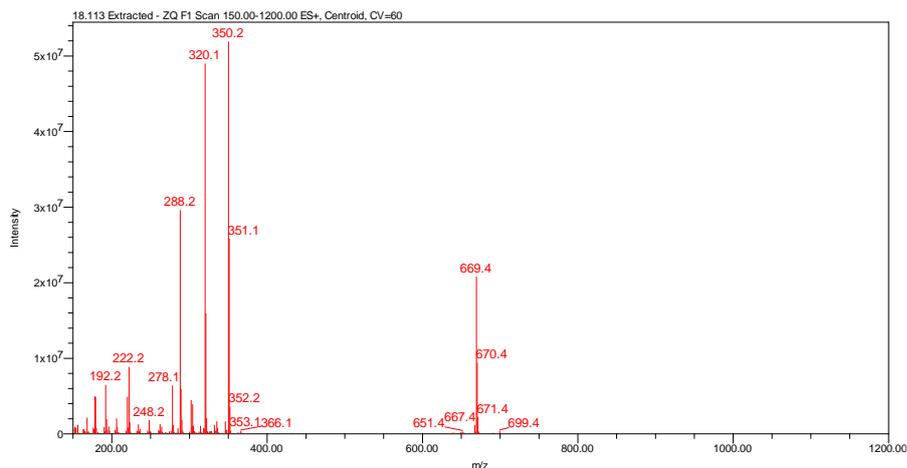


Figura 213. Cromatograma da amostra MA17s2_63 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.

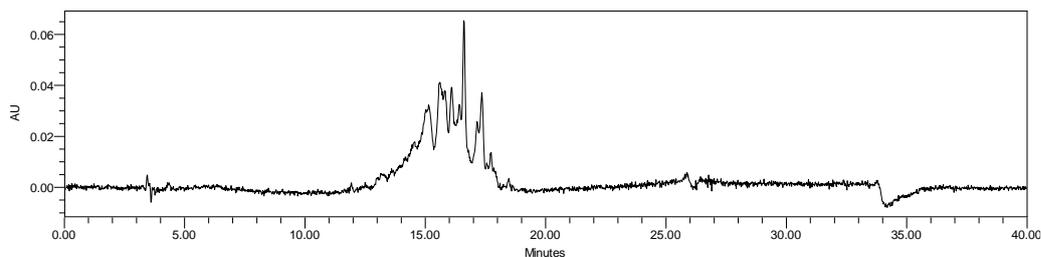


Figura 214. Espectro de UV representativo dos picos da amostra MA17s2_63.

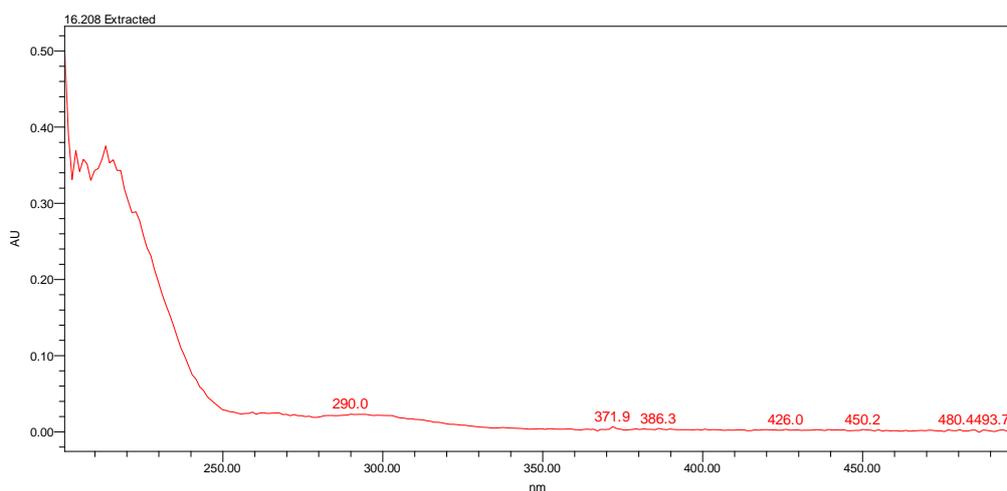


Figura 215. Cromatograma da amostra MA17s2_63 por HPLC-ELSD.

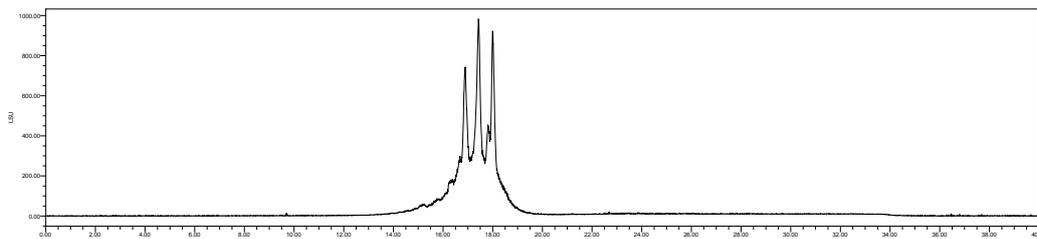


Figura 216. Cromatograma de íons totais da amostra MA17s2_63 por HPLC-MS.

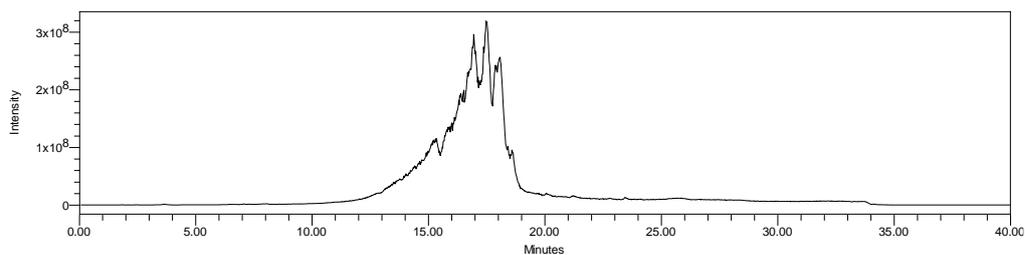


Figura 217. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_63.

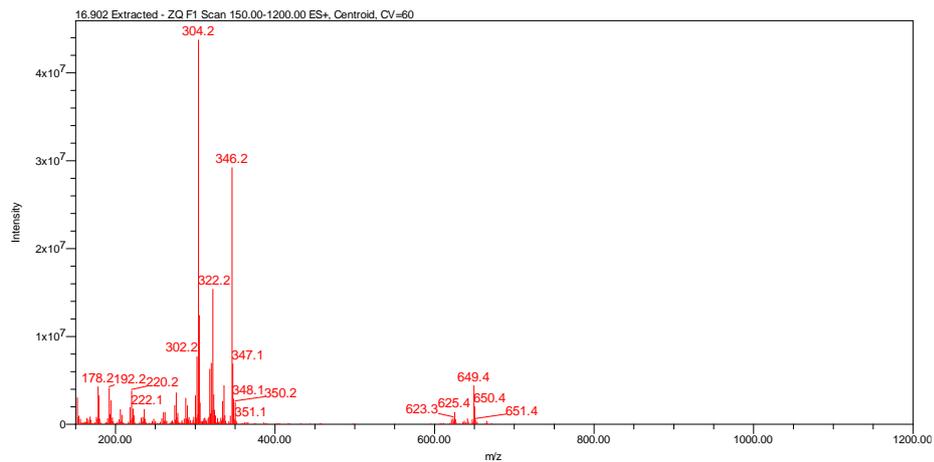


Figura 218. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_63.

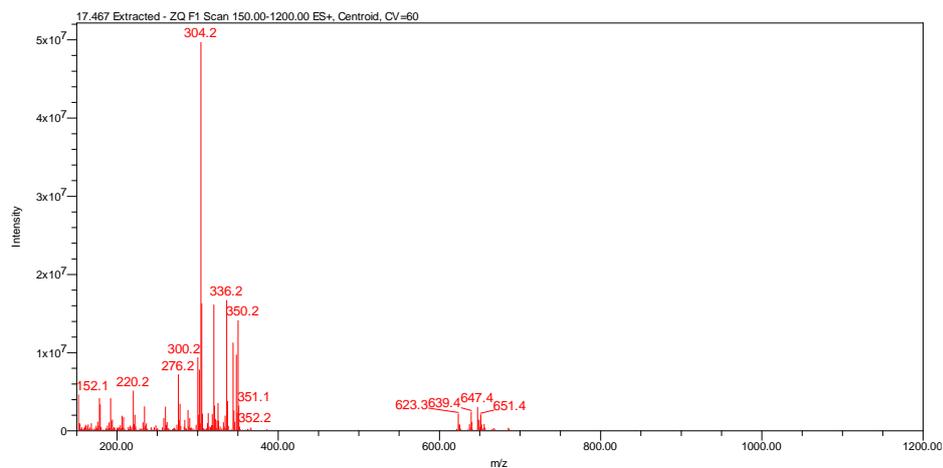


Figura 219. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_63.

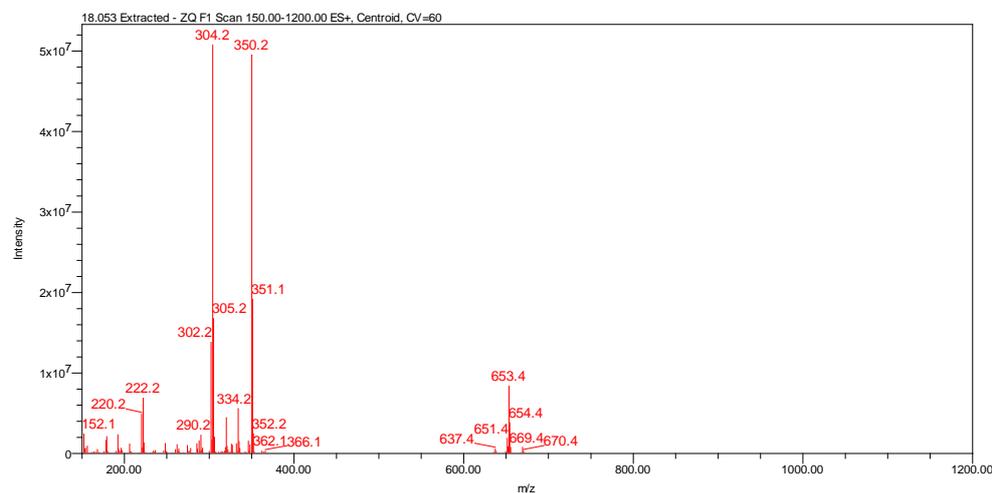


Figura 220. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_63.

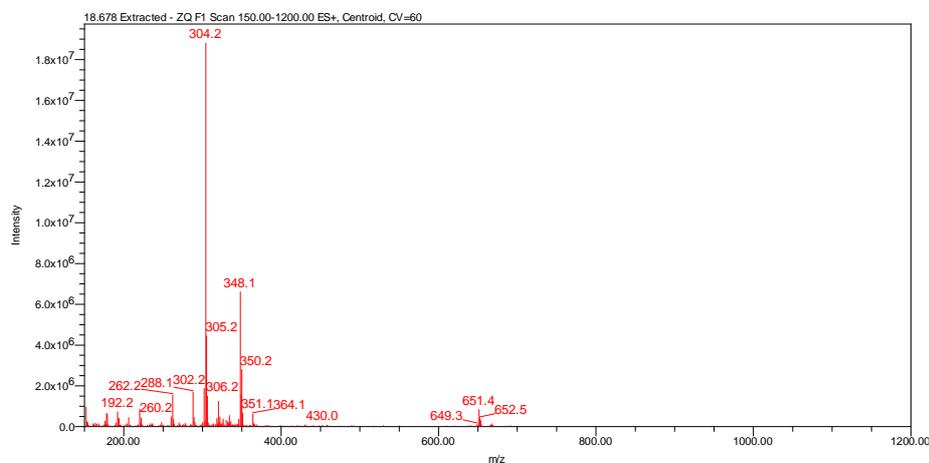


Figura 221. Cromatograma da amostra MA17s2_66 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.

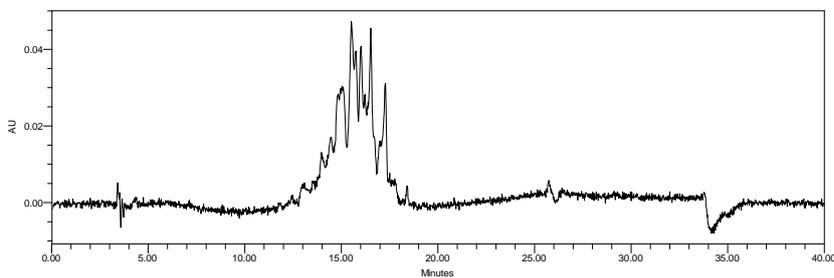


Figura 222. Espectro de UV representativo dos picos da amostra MA17s2_66.

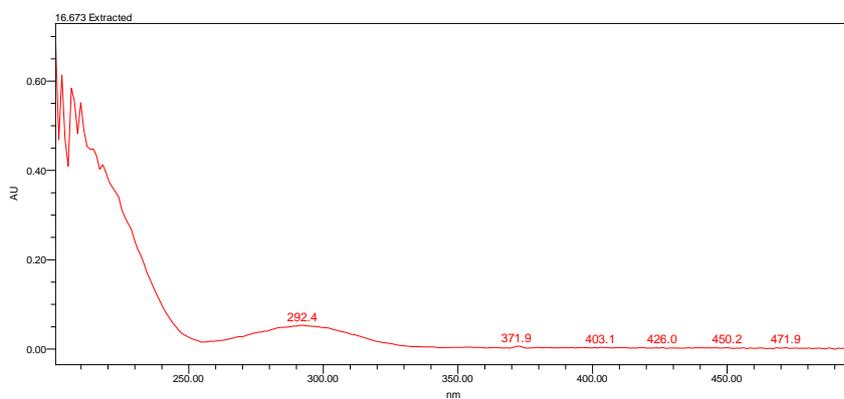


Figura 223. Cromatograma da amostra MA17s2_66 por HPLC-ELSD.

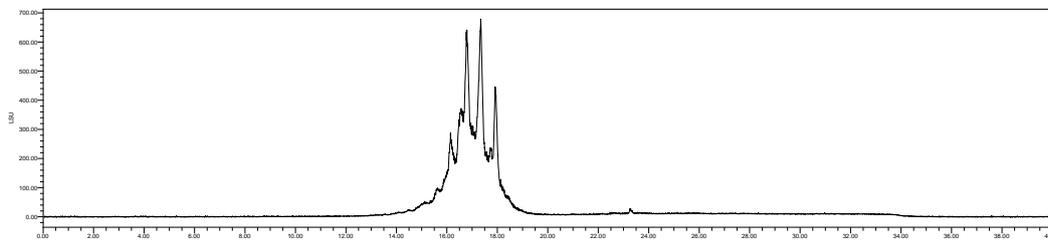


Figura 224. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_66.

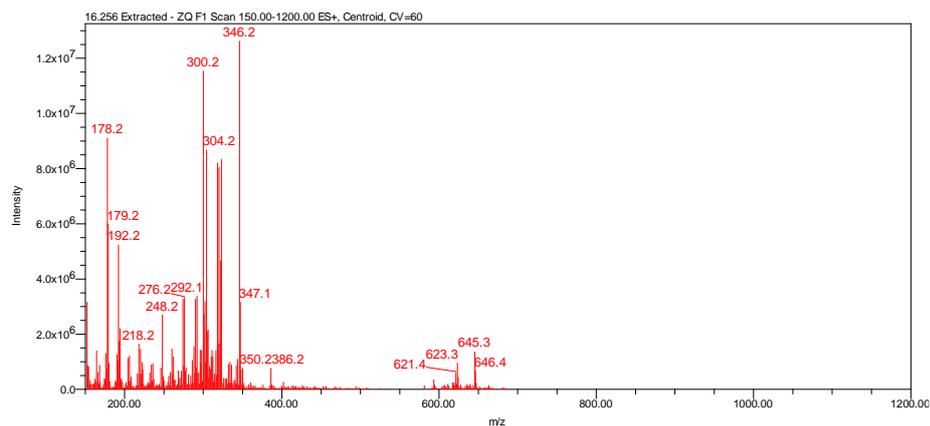


Figura 225. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_66.

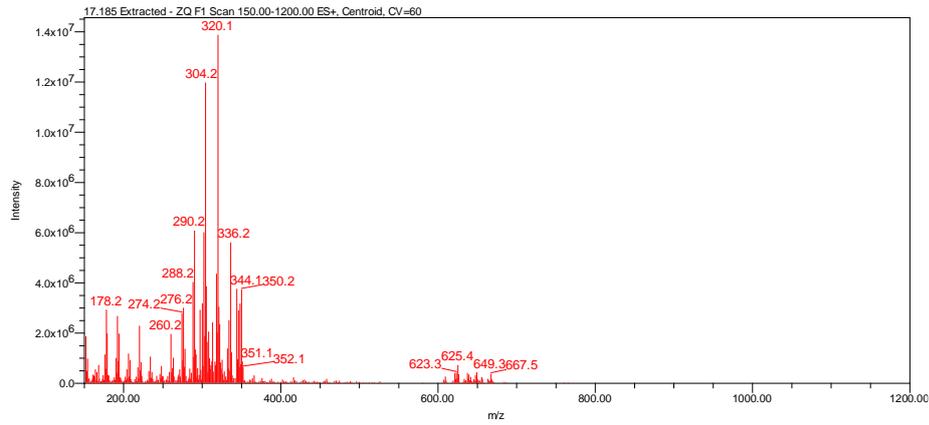


Figura 226. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_66.

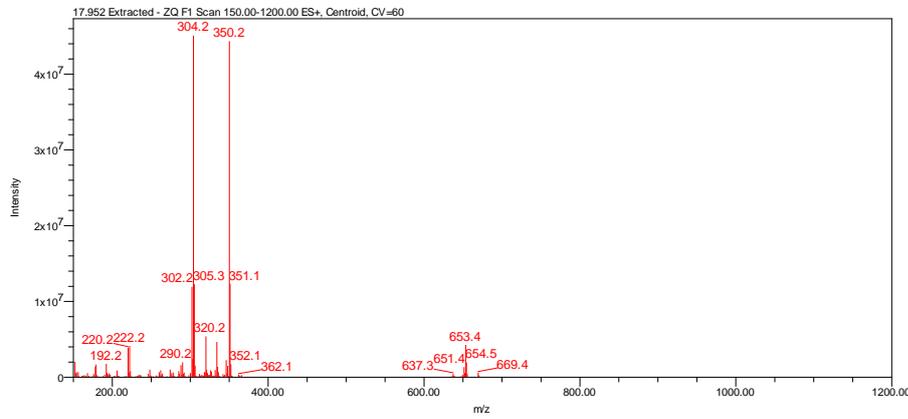


Figura 227. Cromatograma da amostra MA17s2_68 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.

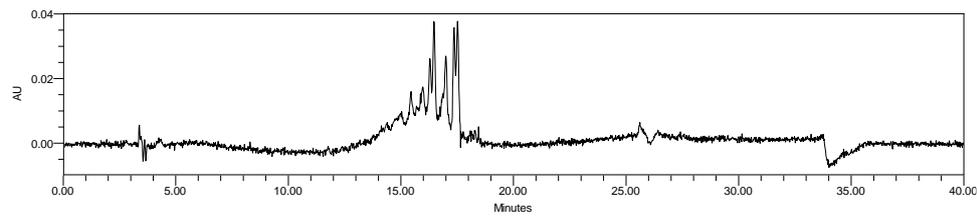


Figura 228. Espectro de UV representativo dos picos da amostra MA17s2_68.

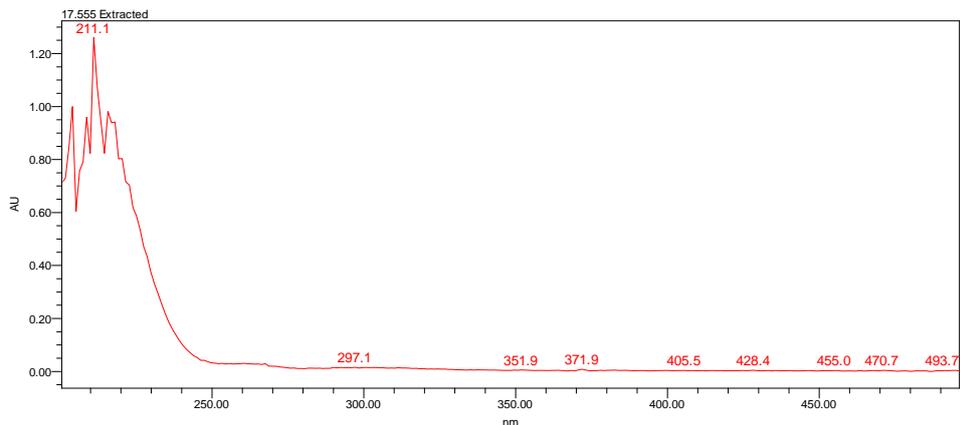


Figura 229. Cromatograma da amostra MA17s2_68 por HPLC-ELSD.

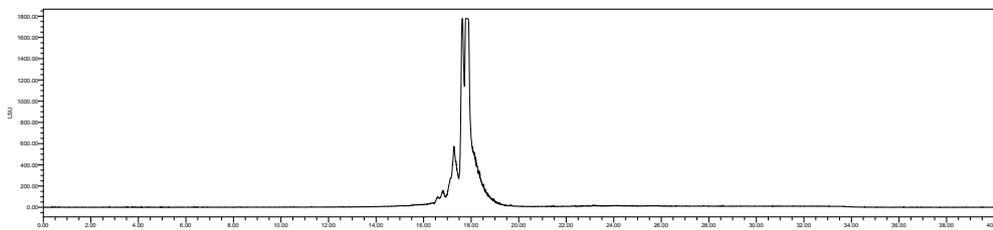


Figura 230. Cromatograma de íons totais da amostra MA17s2_68 por HPLC-MS.

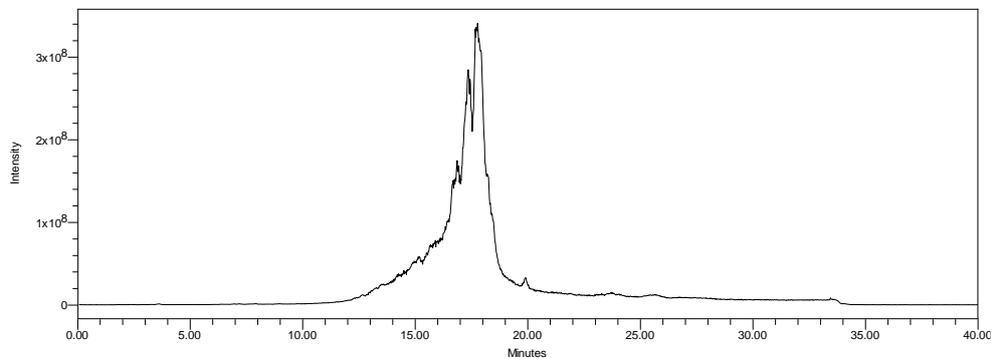


Figura 231. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_68.

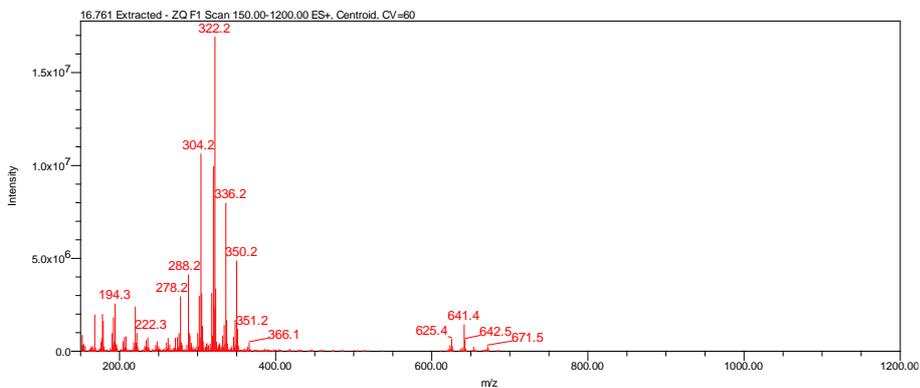


Figura 232. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_68.

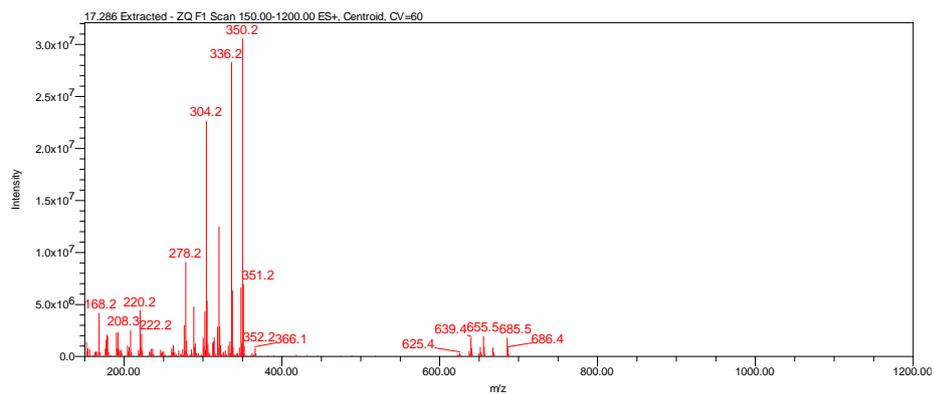


Figura 233. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_68.

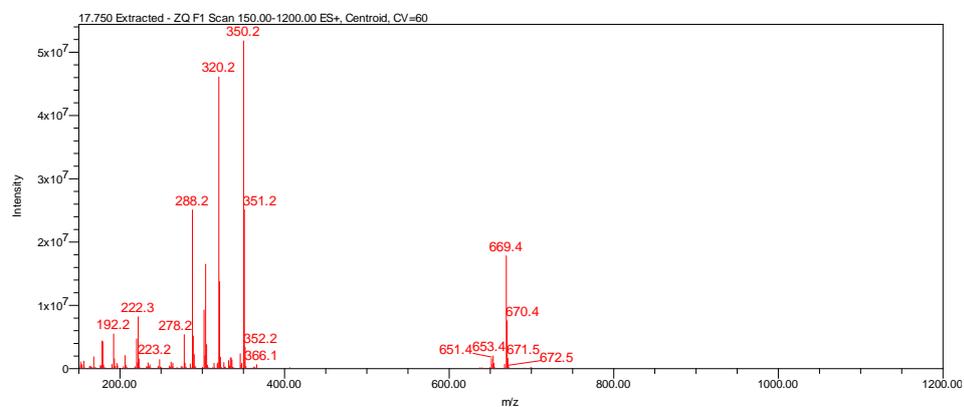


Figura 234. Cromatograma da amostra MA17s2_70 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.

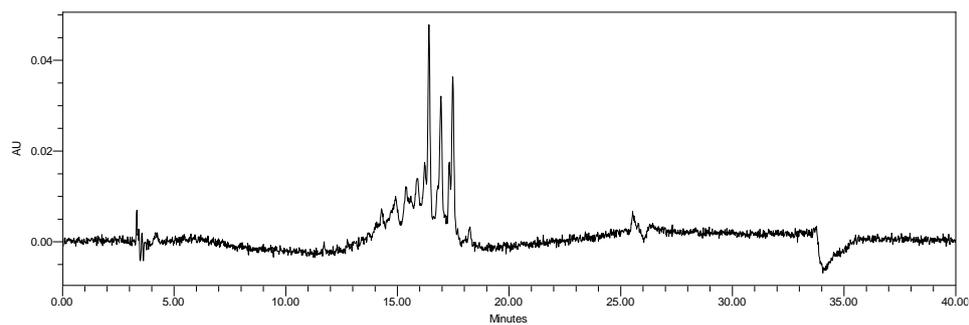


Figura 235. Espectro de UV representativo dos picos da amostra MA17s2_70.

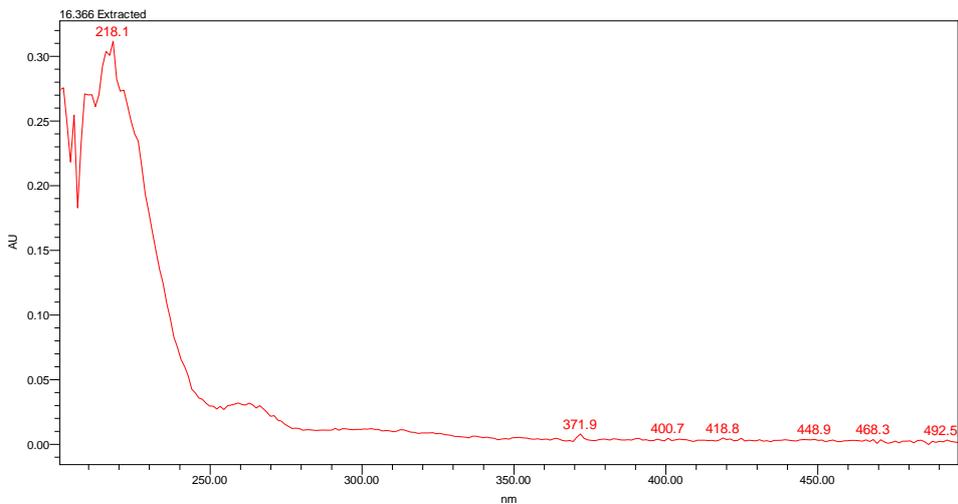


Figura 236. Cromatograma da amostra MA17s2_70 por HPLC-ELSD.

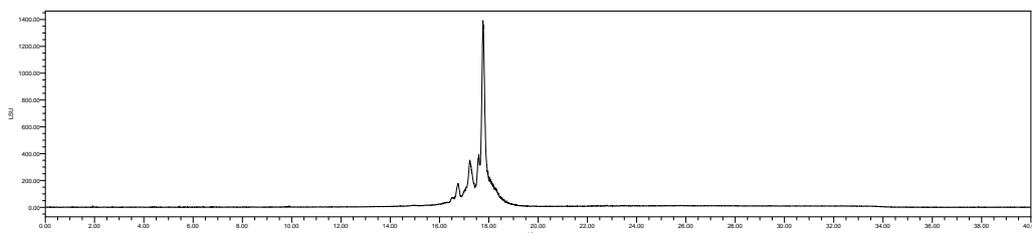


Figura 237. Cromatograma de íons totais da amostra MA17s2_70 por HPLC-MS.

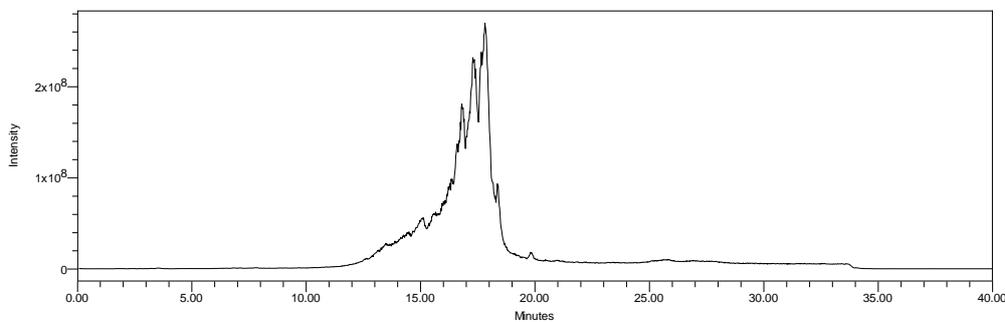


Figura 238. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_70.

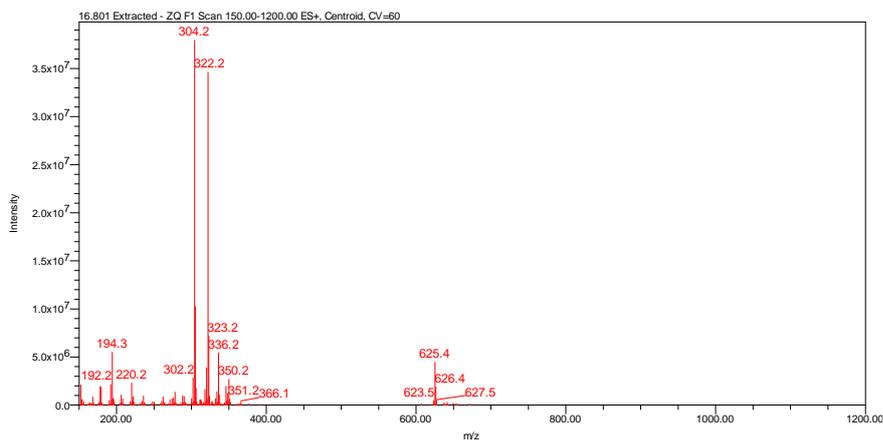


Figura 239. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_70.

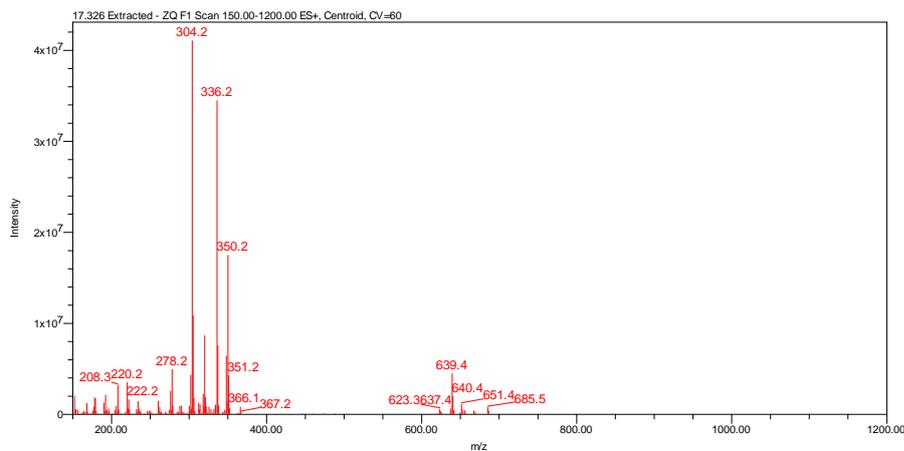


Figura 240. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_70.

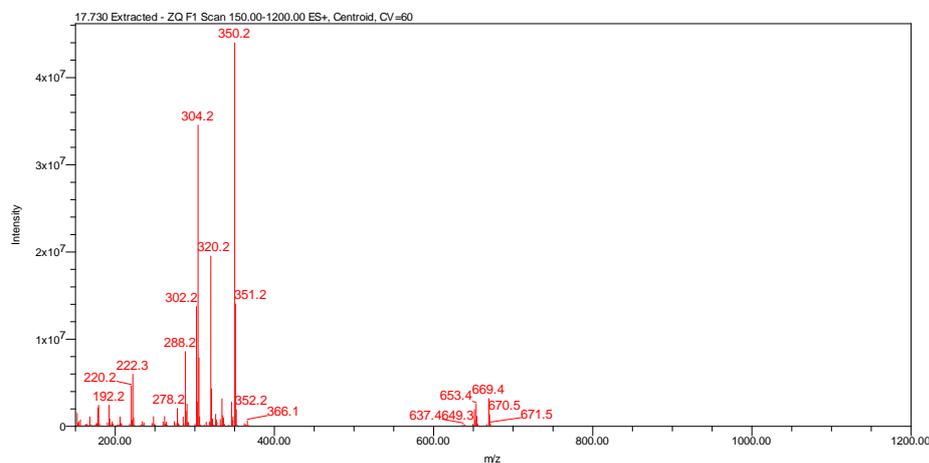


Figura 241. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_70.

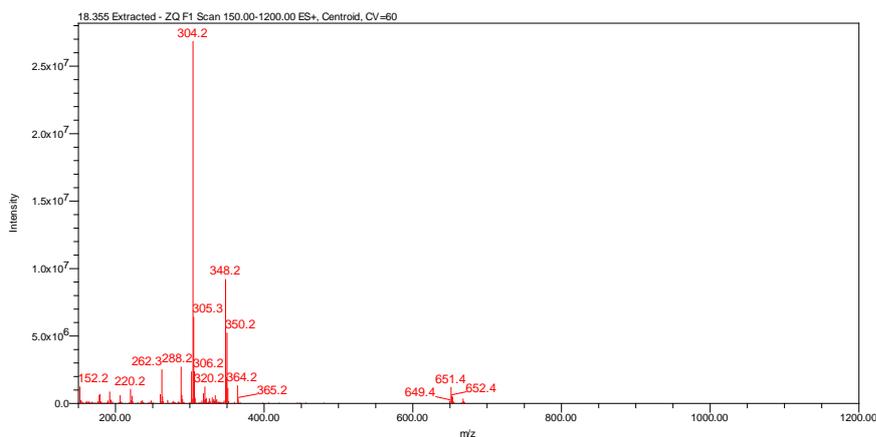


Figura 242. Cromatograma da amostra MA17s2_71 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.

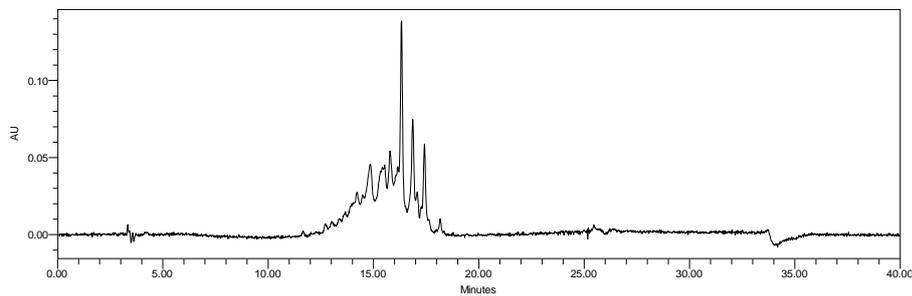


Figura 243. Espectro de UV representativo dos picos da amostra MA17s2_71.

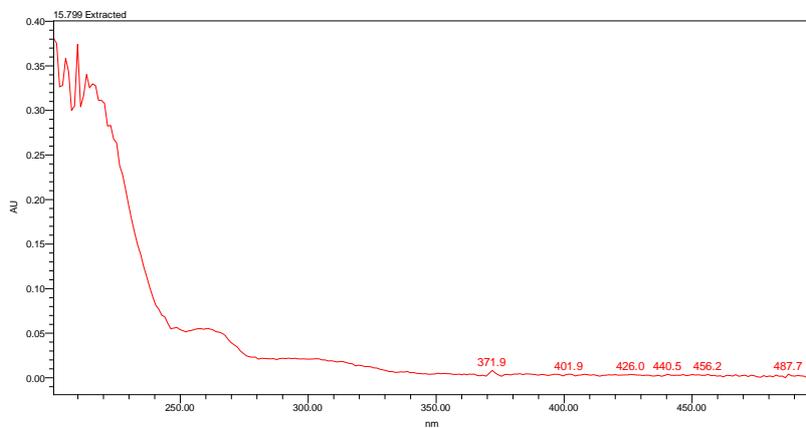


Figura 244. Cromatograma da amostra MA17s2_71 por HPLC-ELSD.

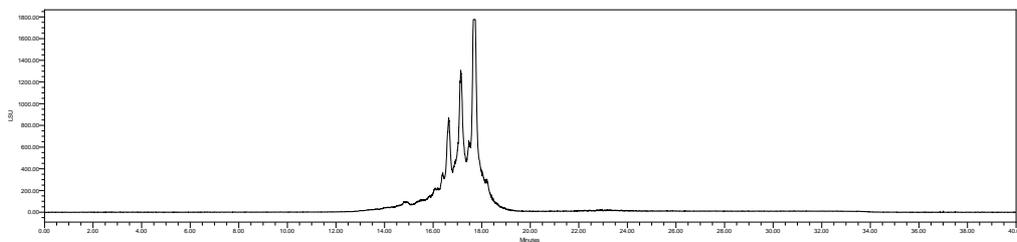


Figura 245. Cromatograma de íons totais da amostra MA17s2_71 por HPLC-MS.

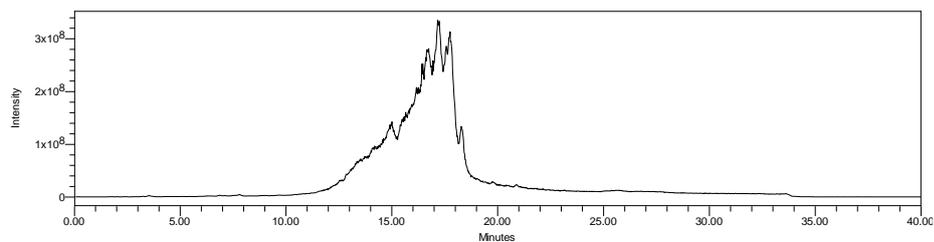


Figura 246. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_71.

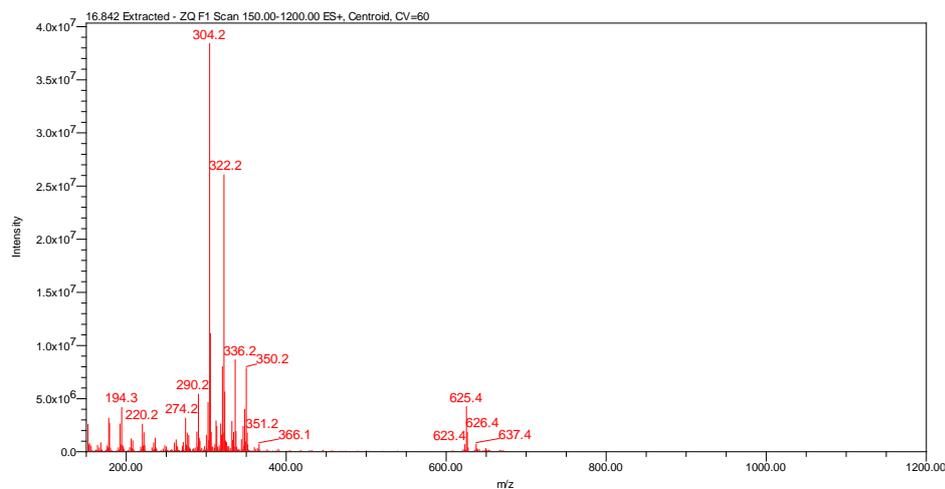


Figura 247. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_71.

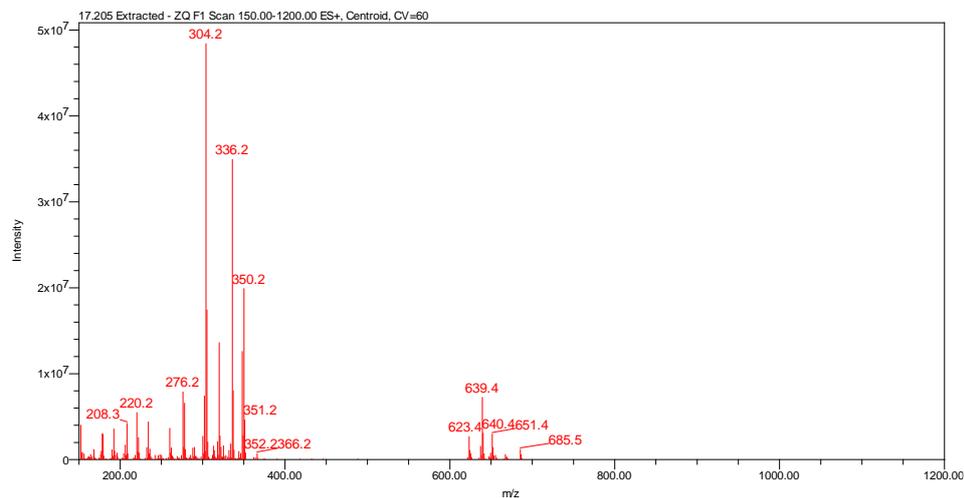


Figura 248. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_71.

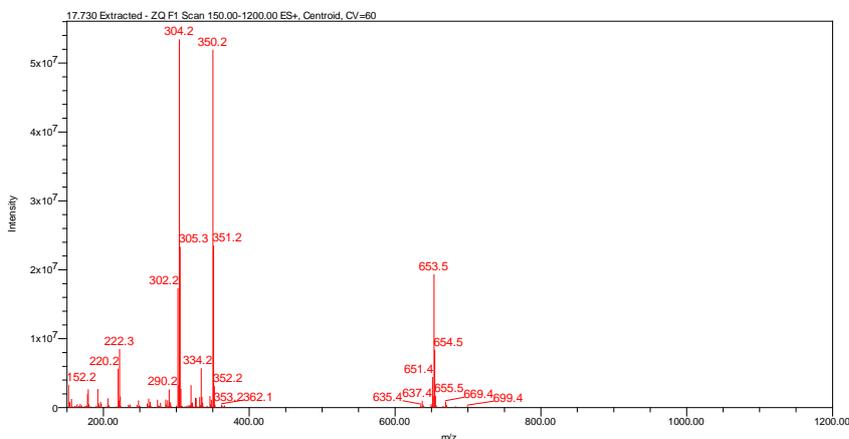


Figura 249. Cromatograma da amostra MA17s2_72 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.

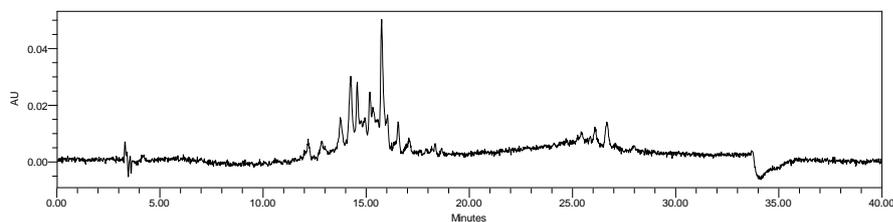


Figura 250. Espectro de UV representativo dos picos da amostra MA17s2_72.

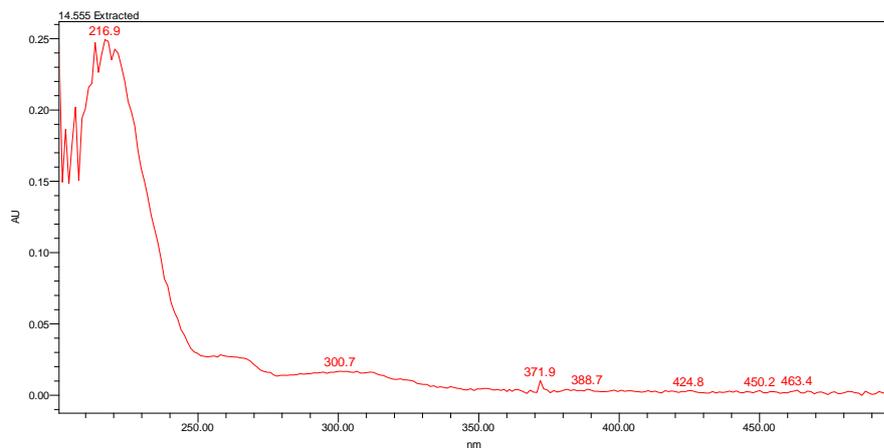


Figura 251. Cromatograma da amostra MA17s2_72 por HPLC-ELSD.

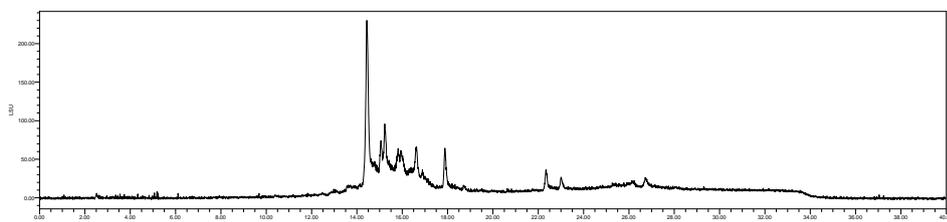


Figura 252. Cromatograma de íons totais da amostra MA17s2_72 por HPLC-MS.

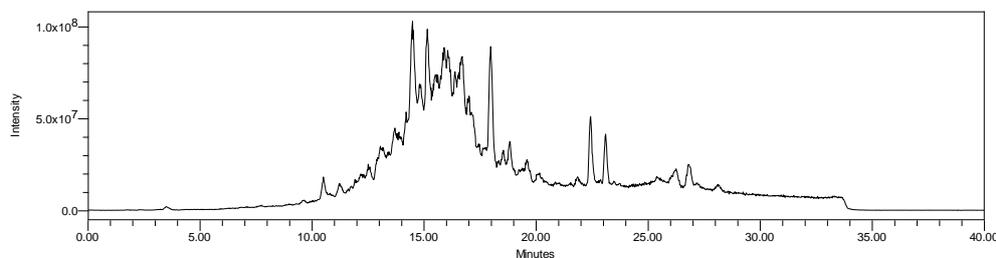


Figura 253. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_72.

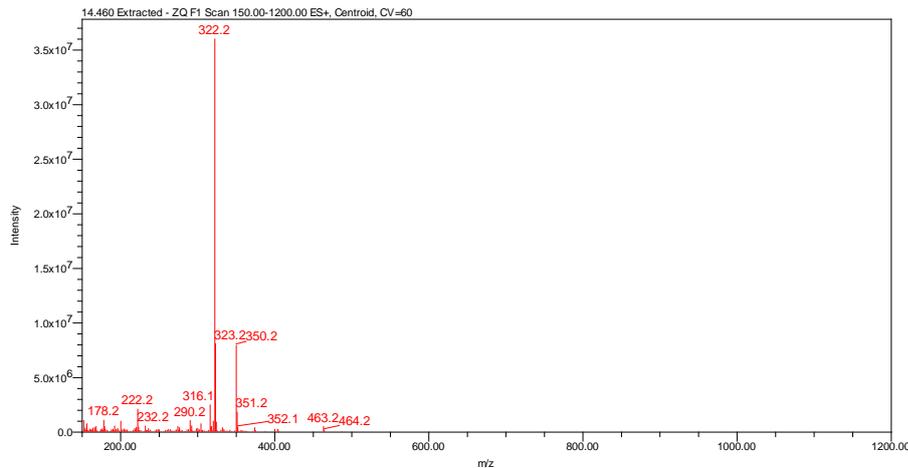


Figura 254. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_72.

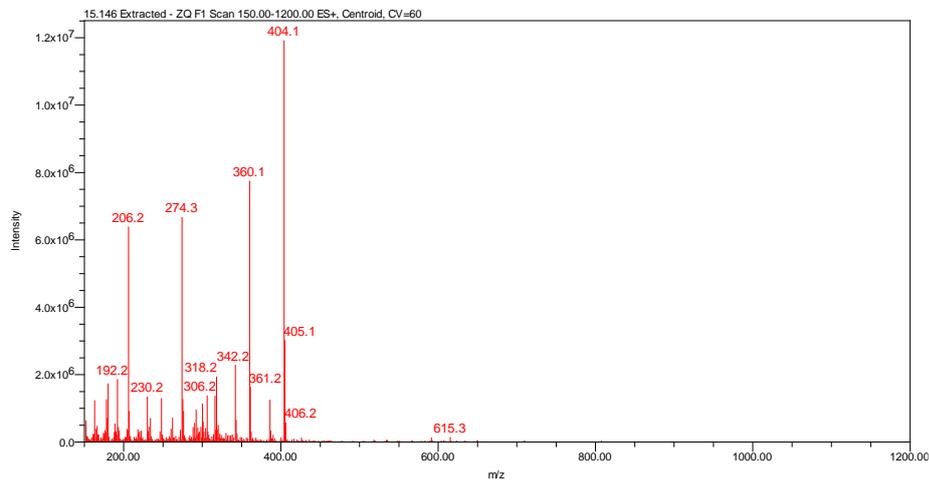


Figura 255. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_72.

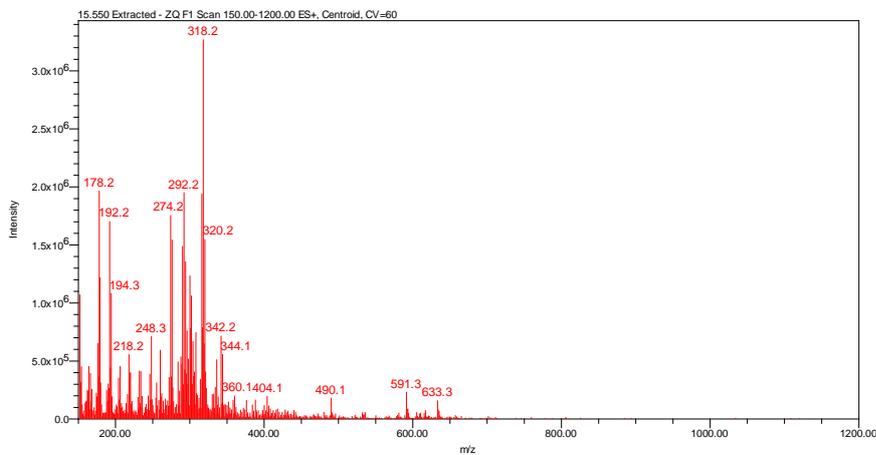


Figura 256. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_72.

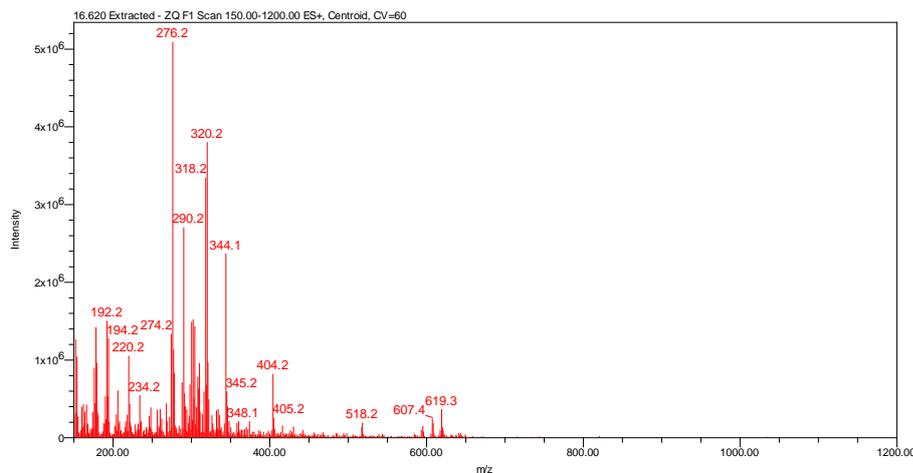


Figura 257. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_72.

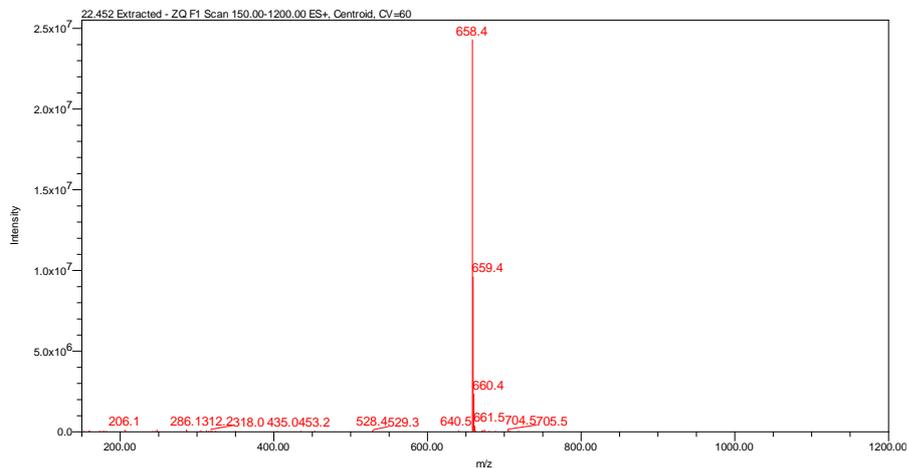


Figura 258. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_72.

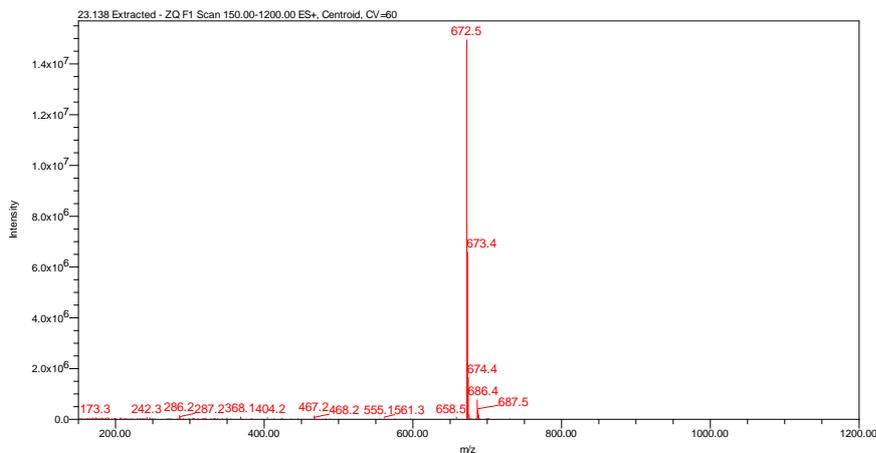


Figura 259. Cromatograma da amostra MA17s2_81 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.

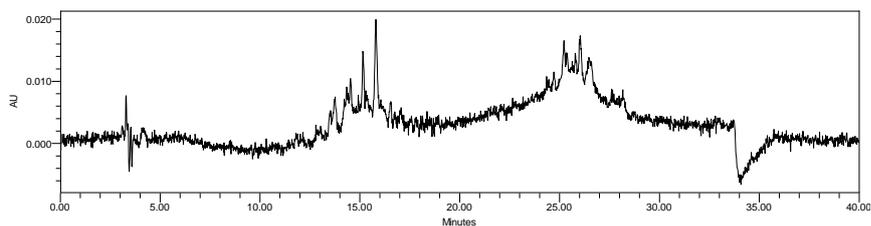


Figura 260. Espectro de UV representativo dos picos da amostra MA17s2_81.

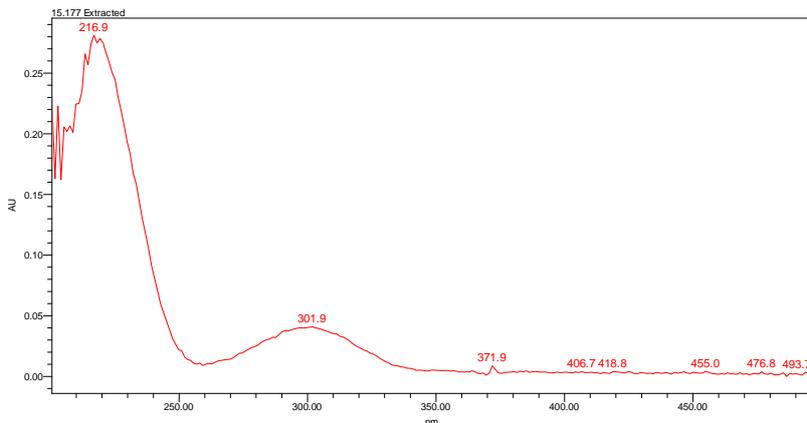


Figura 261. Cromatograma da amostra MA17s2_81 por HPLC-ELSD.

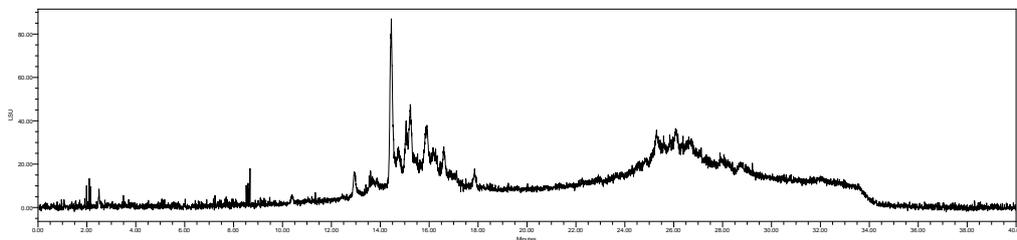


Figura 262. Cromatograma de íons totais da amostra MA17s2_81 por HPLC-MS.

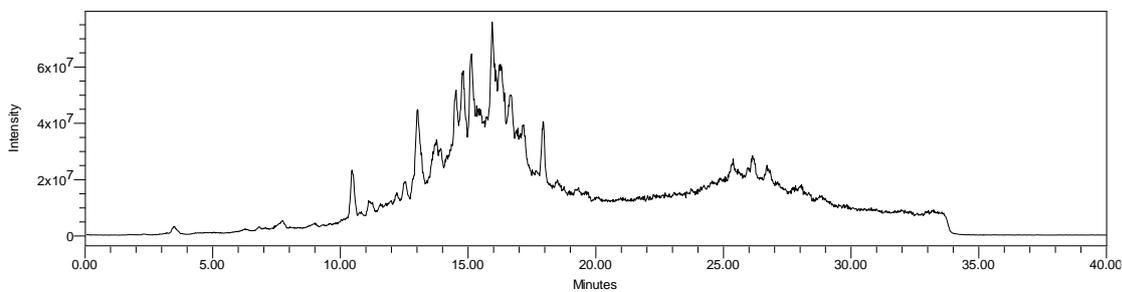


Figura 263. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_81.

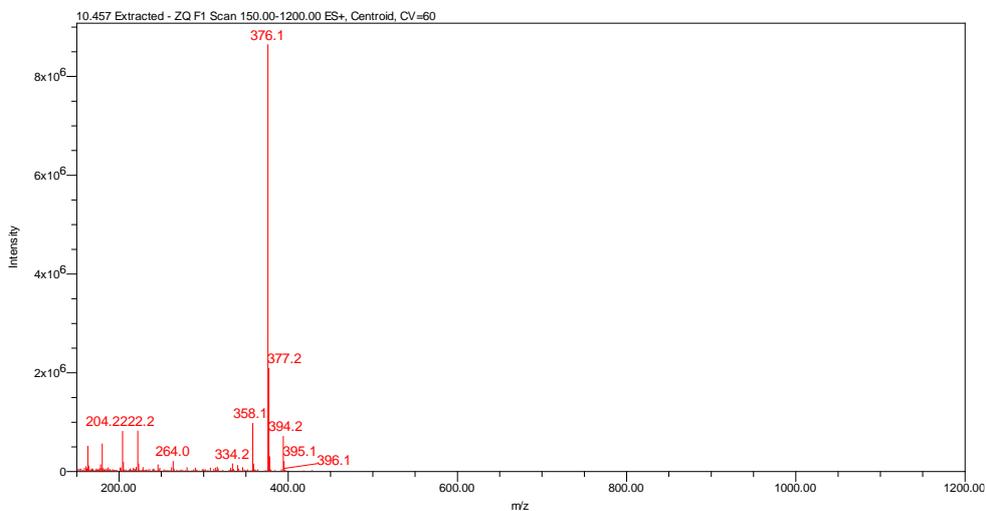


Figura 264. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_81.

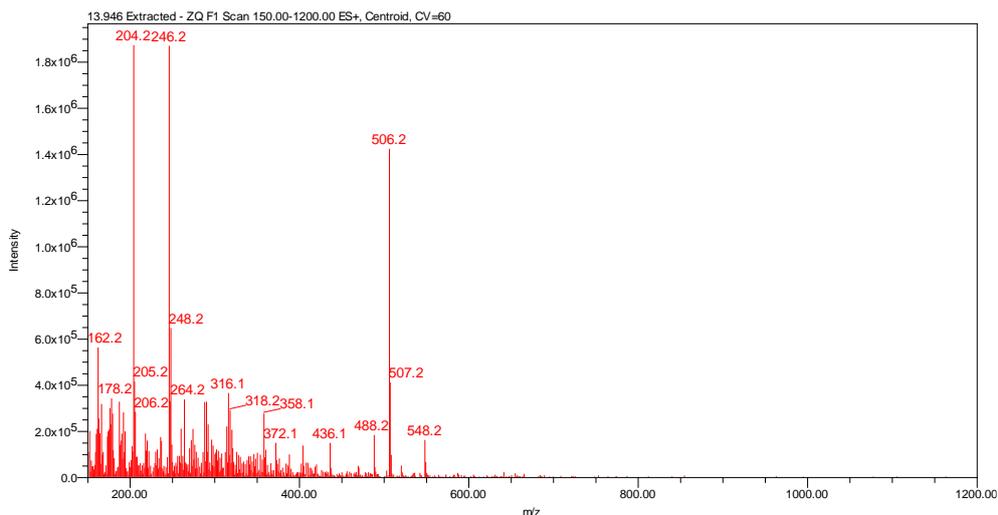


Figura 265. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_81.

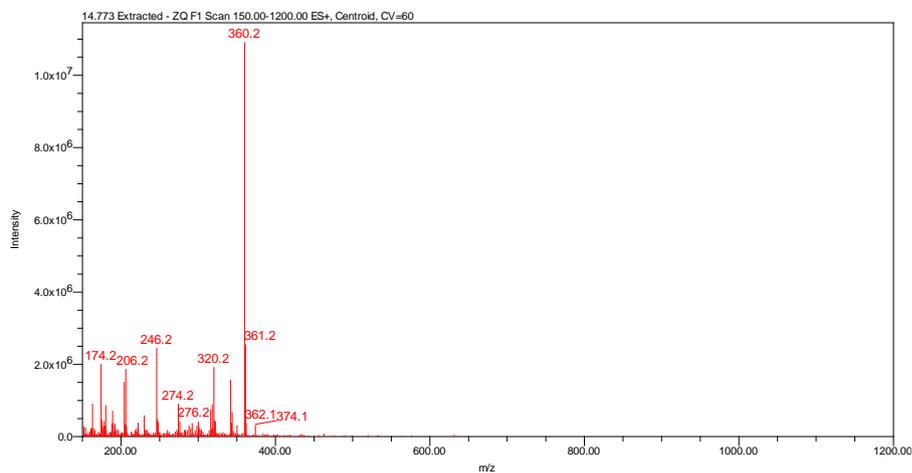


Figura 266. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_81.

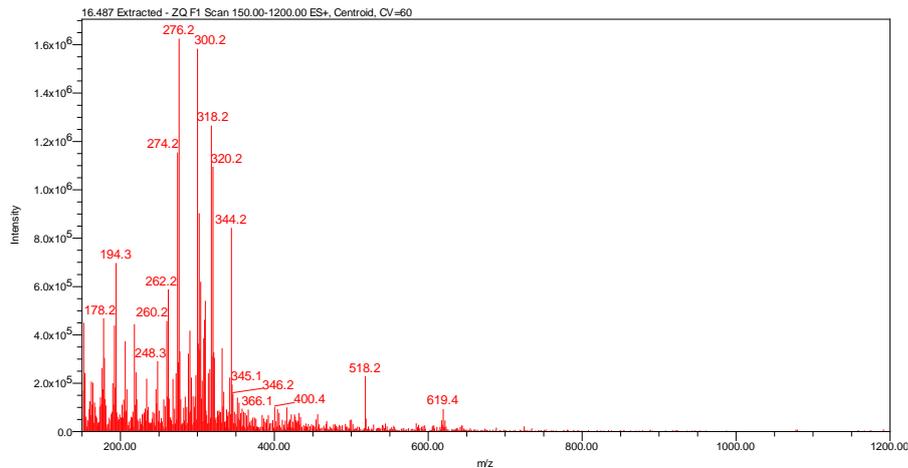


Figura 267. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_81.

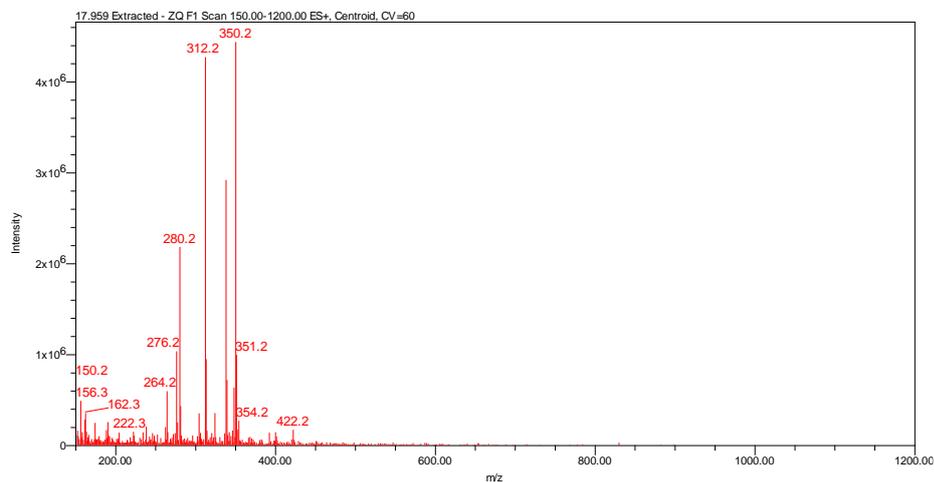


Figura 268. Cromatograma da amostra MA17s2_99 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.

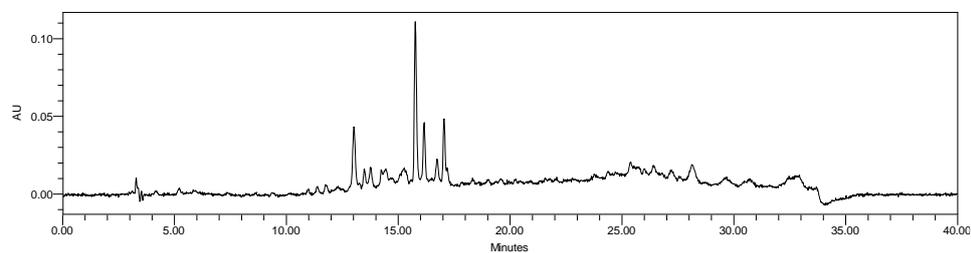


Figura 269. Espectro de UV representativo dos picos da amostra MA17s2_99.

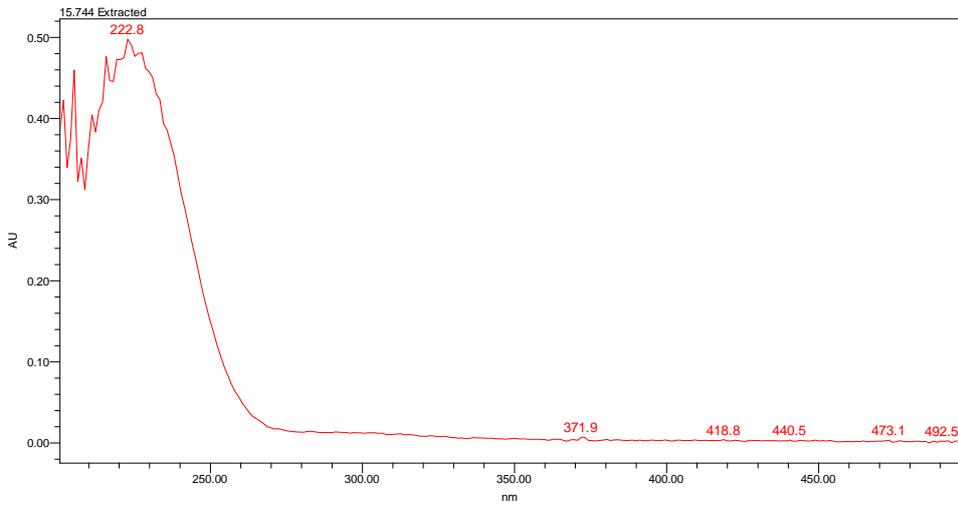


Figura 270. Cromatograma da amostra MA17s2_99 por HPLC-ELSD.

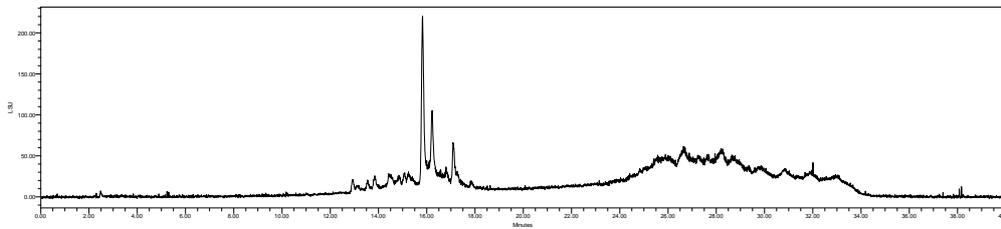


Figura 271. Cromatograma de íons totais da amostra MA17s2_99 por HPLC-MS.

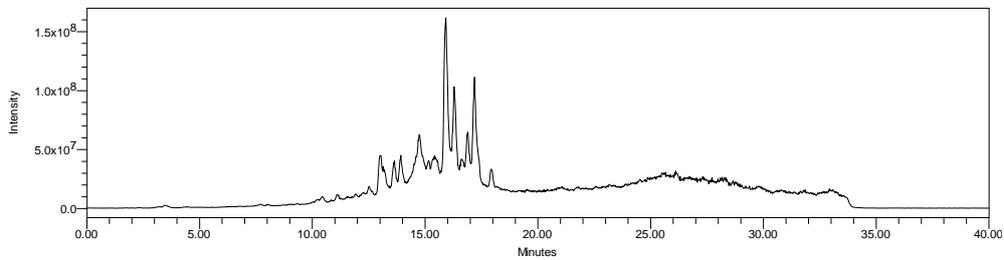


Figura 272. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_99.

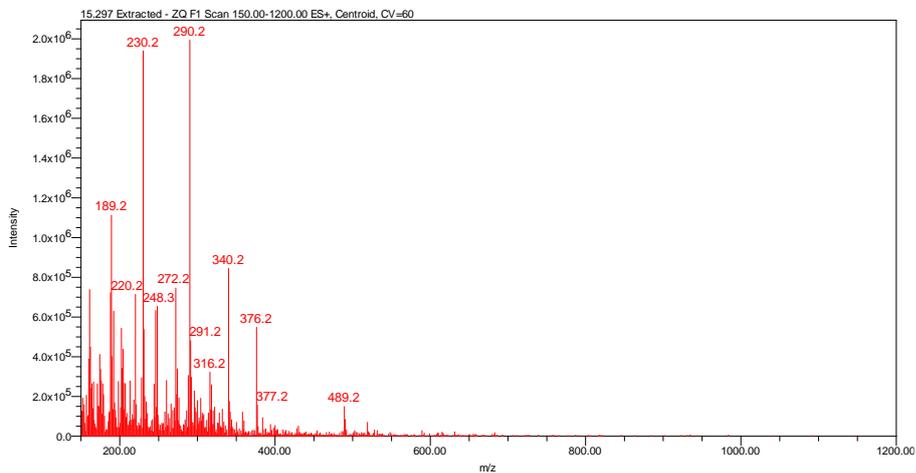


Figura 273. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_99.

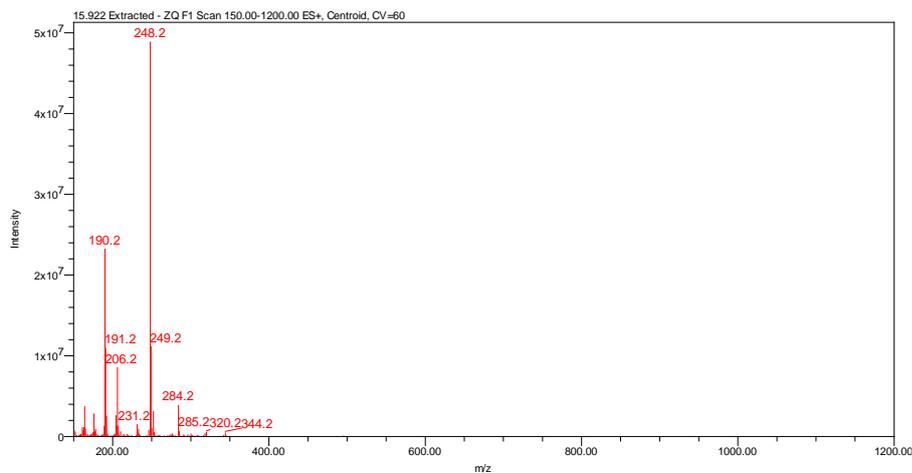


Figura 274. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_99.

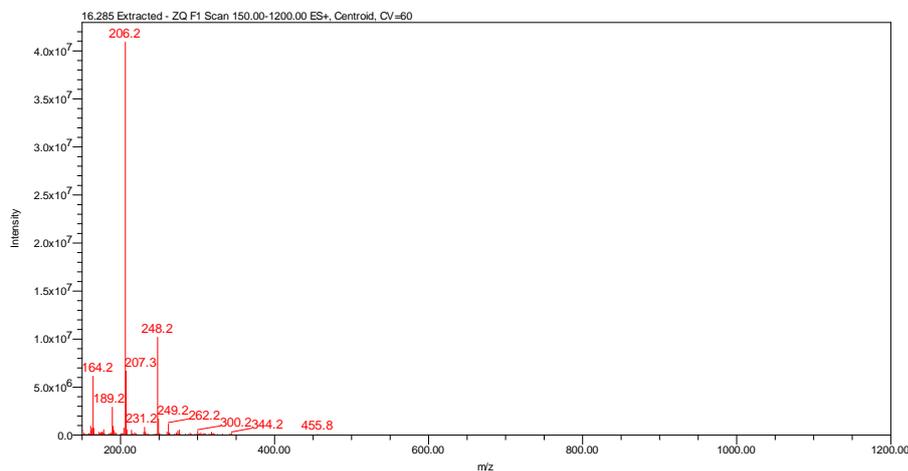


Figura 275. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_99.

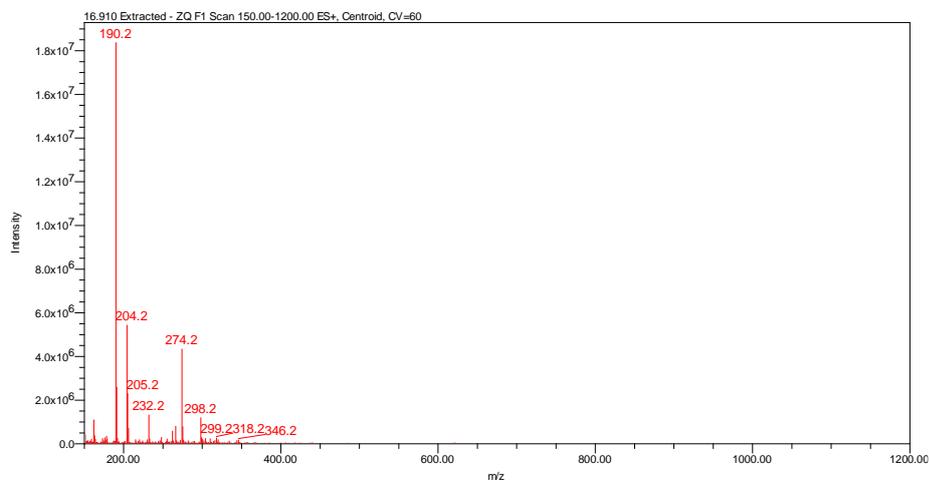


Figura 276. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_99.

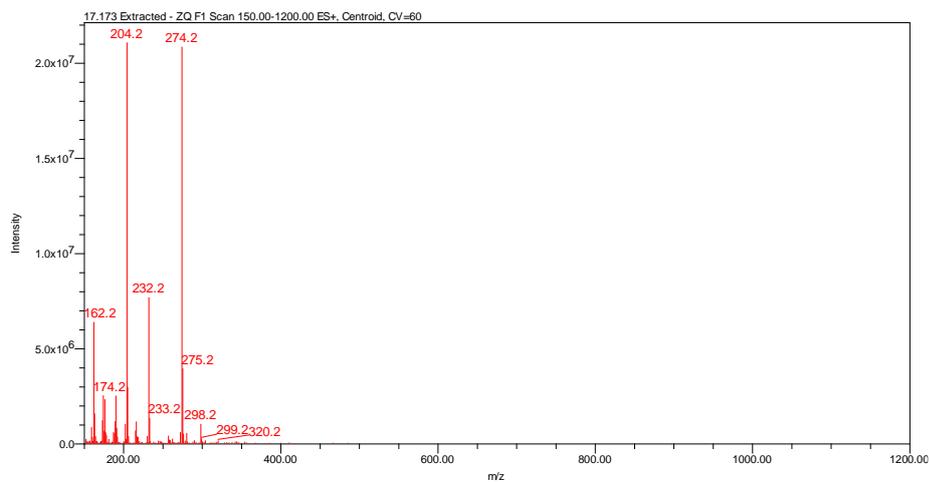


Figura 277. Cromatograma da amostra MA17s2_113 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.

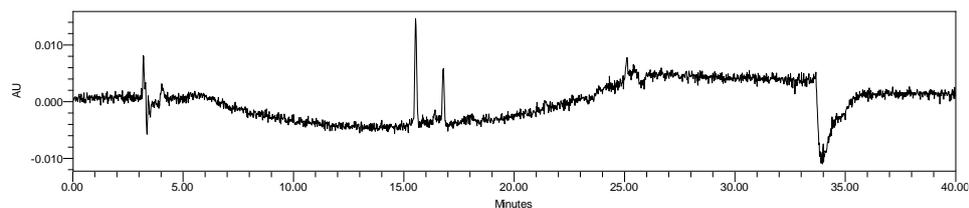


Figura 278. Espectro de UV representativo dos picos da amostra MA17s2_113.

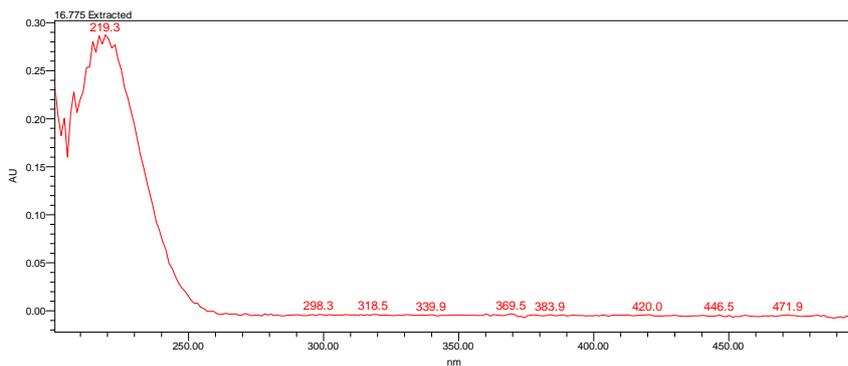


Figura 279. Cromatograma da amostra MA17s2_113 por HPLC-ELSD.

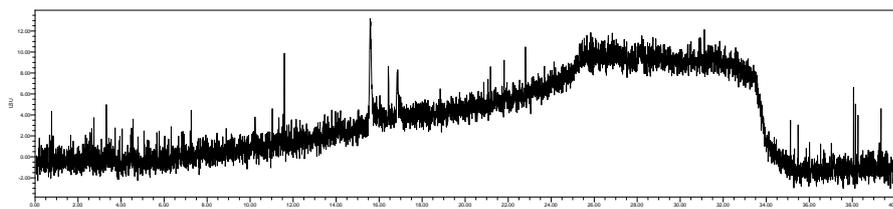


Figura 280. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_113.

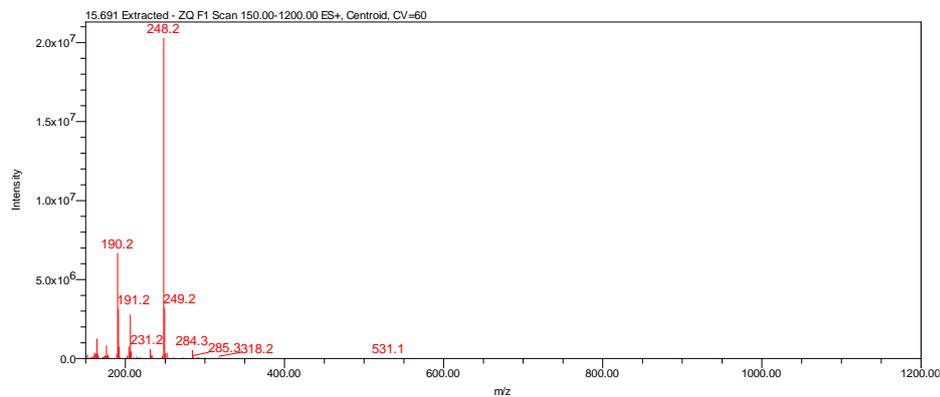


Figura 281. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_113.

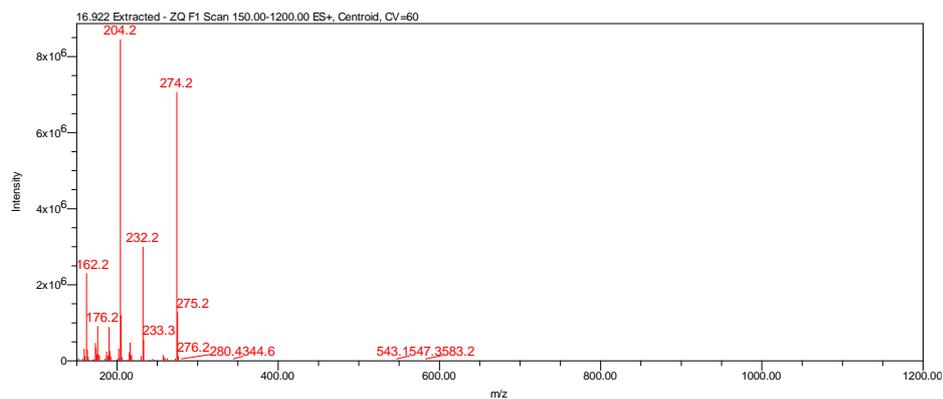


Figura 282. Cromatograma da amostra MA17s2_121 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.

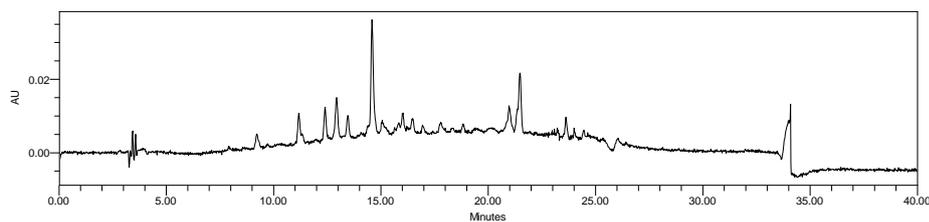


Figura 283. Espectro de UV representativo dos picos da amostra MA17s2_121.

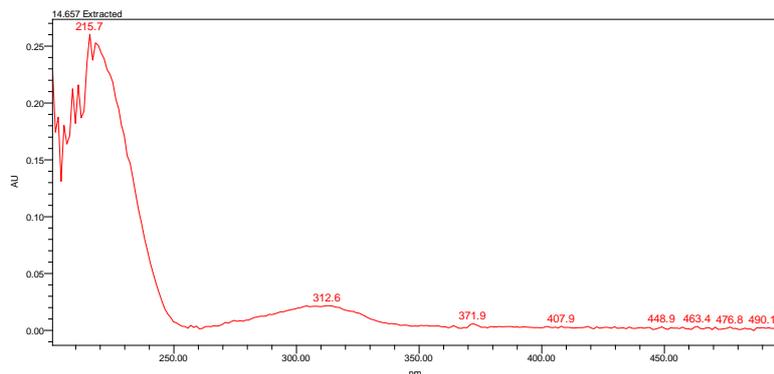


Figura 284. Cromatograma da amostra MA17s2_121 por HPLC-ELSD.

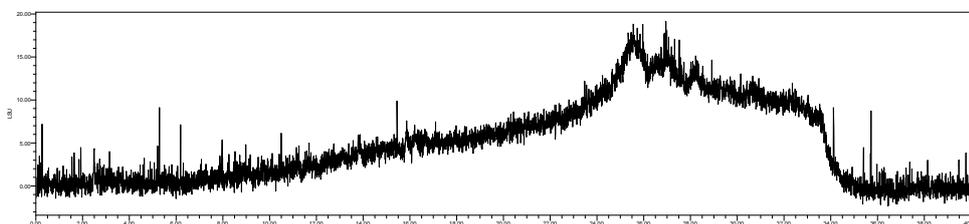


Figura 285. Cromatograma de íons totais da amostra MA17s2_121 por HPLC-MS.

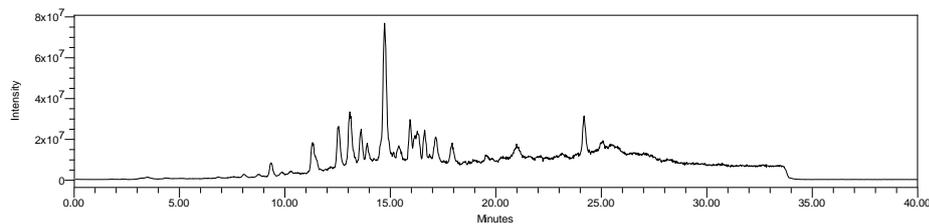


Figura 286. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_121.

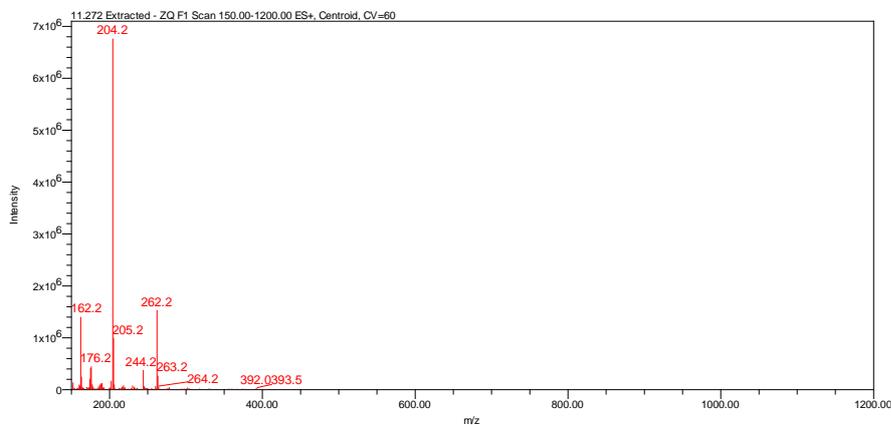


Figura 287. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_121.

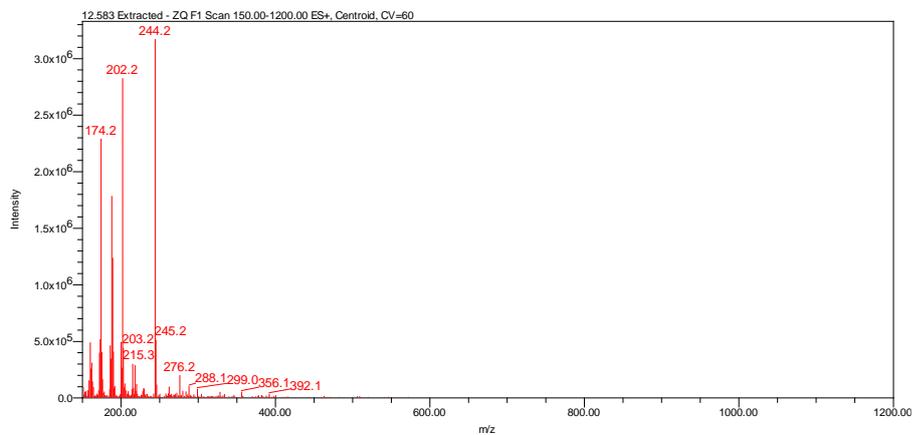


Figura 288. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_121.

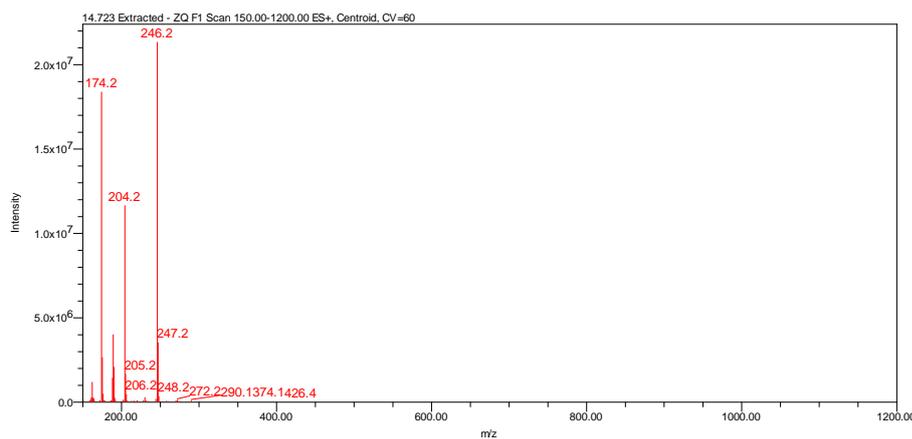


Figura 289. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_121.

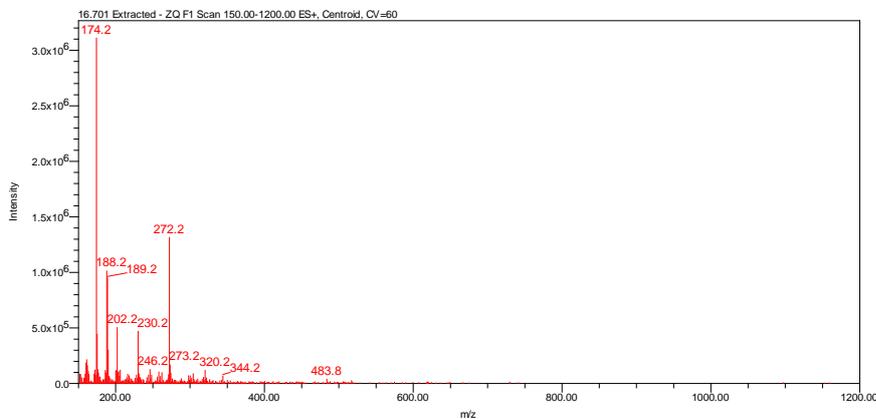


Figura 290. Cromatograma da amostra MA17s2_143 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.

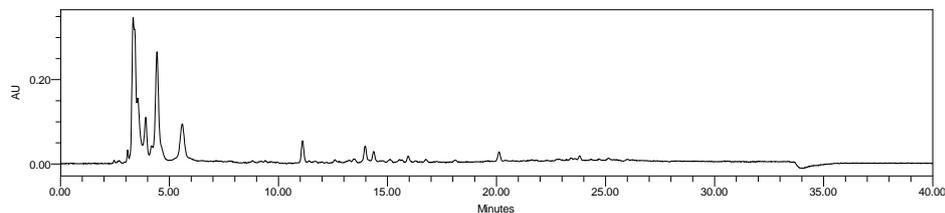


Figura 291. Espectro de UV representativo dos picos da amostra MA17s2_143.

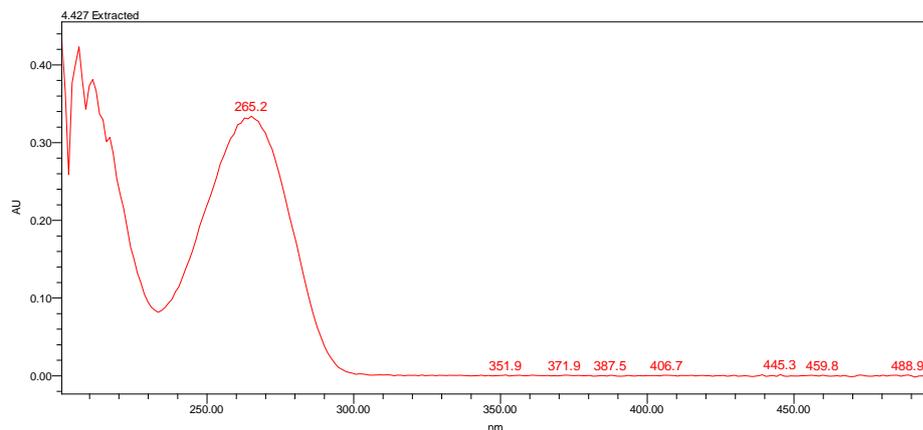


Figura 292. Cromatograma da amostra MA17s2_143 por HPLC-ELSD.

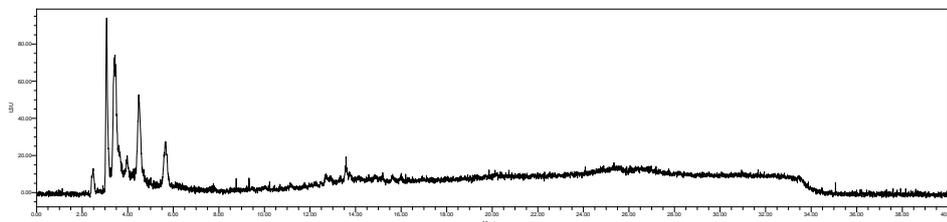


Figura 293. Cromatograma de íons totais da amostra MA17s2_143 por HPLC-MS.

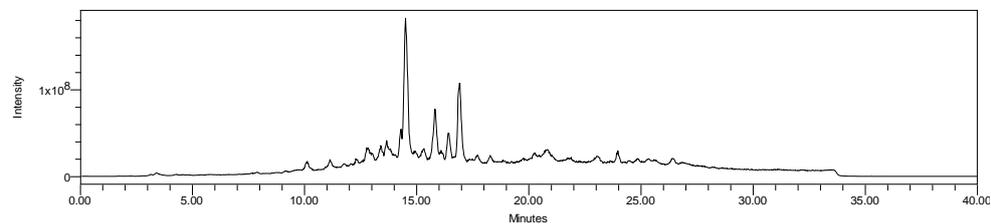


Figura 294. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_143.

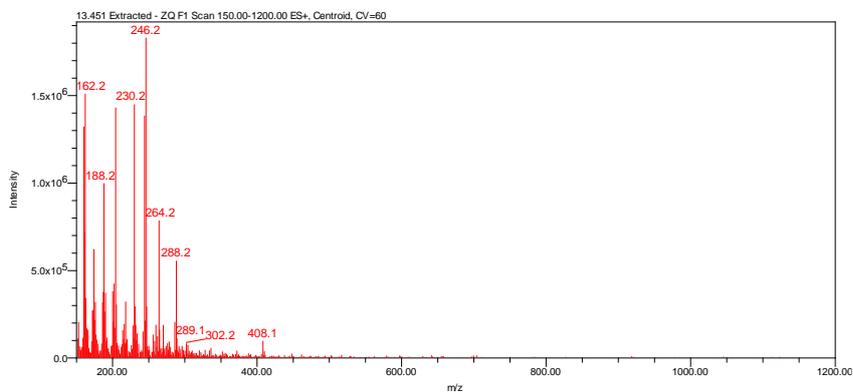


Figura 295. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_143.

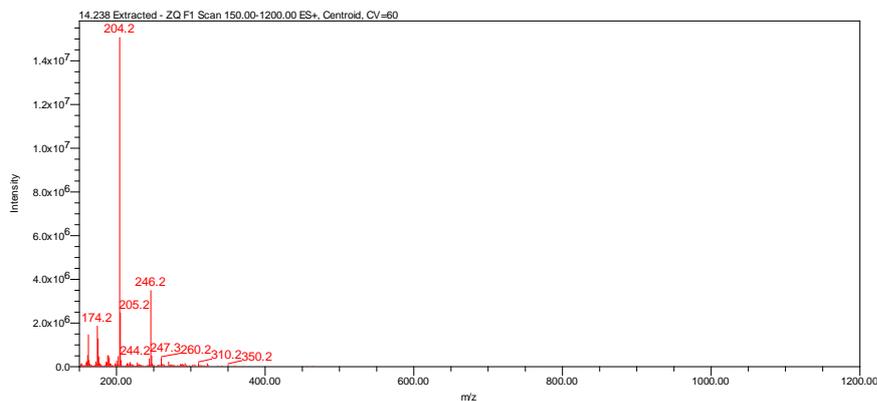


Figura 296. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_143.

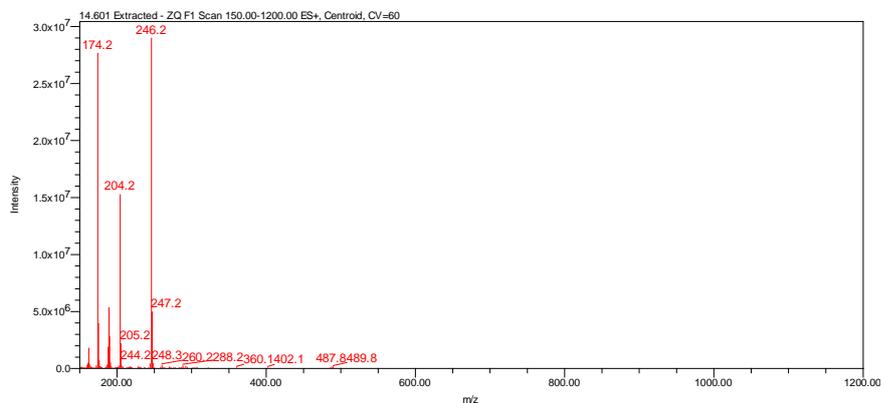


Figura 297. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_143.

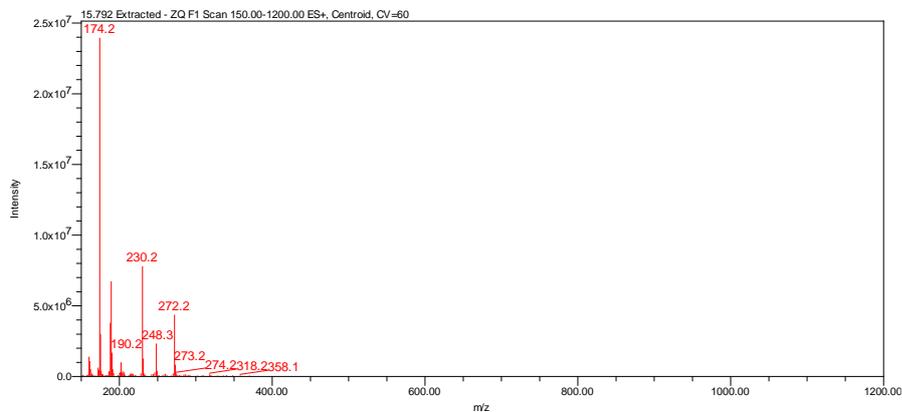
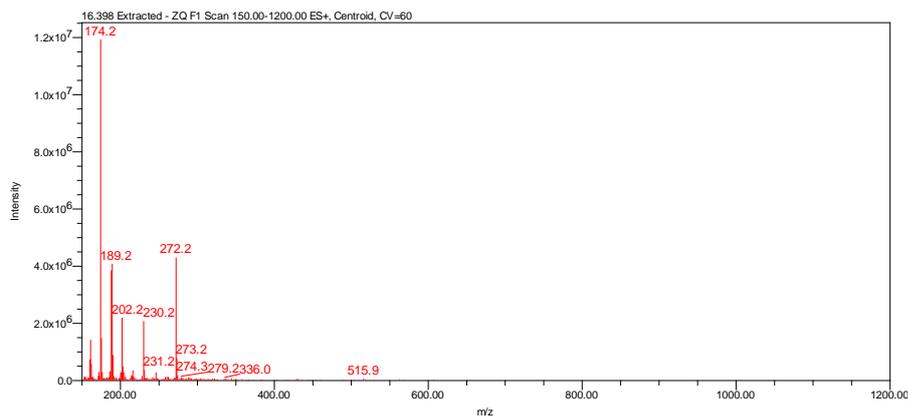


Figura 298. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra MA17s2_143.



Anexo C: Caracterização por HPLC-ELSD-UV-MS das frações do fracionamento com coluna tipo cartucho DiOH.

Figura 299. Cromatograma da amostra DiOH1_Tubo_2 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.

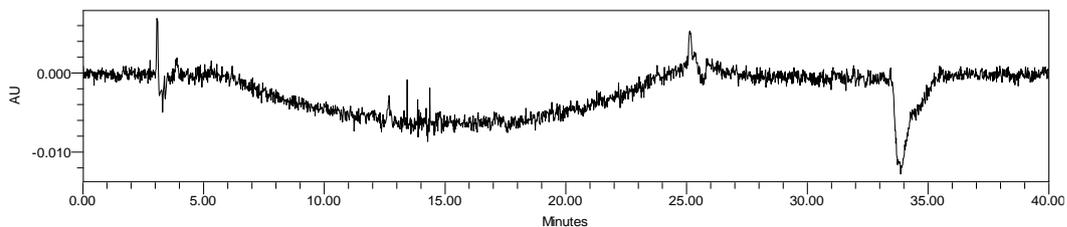


Figura 300. Cromatograma de íons totais da amostra DiOH1_Tubo_2 por HPLC-MS.

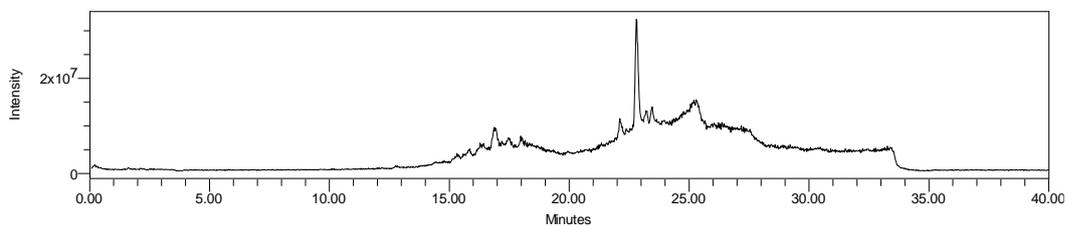


Figura 301. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra DiOH1_Tubo_2.

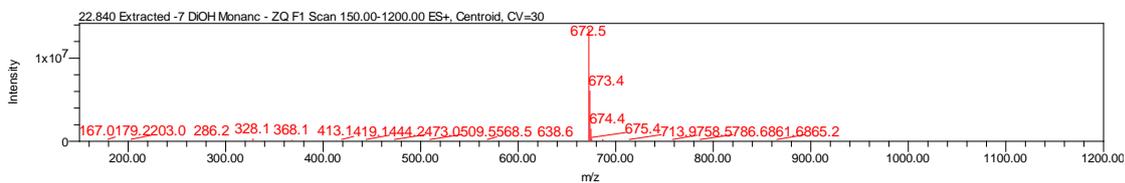


Figura 302. Cromatograma da amostra DiOH2_Tubo_3 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.

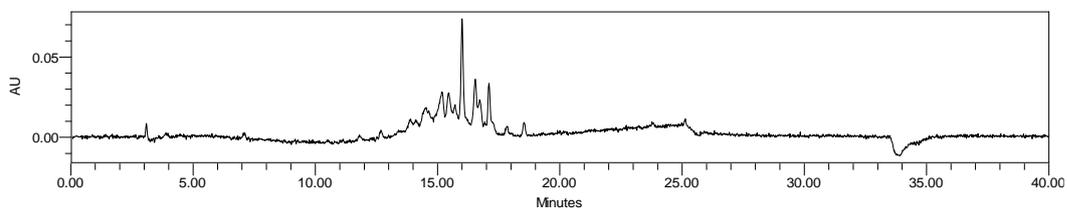


Figura 303. Cromatograma de íons totais da amostra DiOH2_Tubo_3 por HPLC-MS.

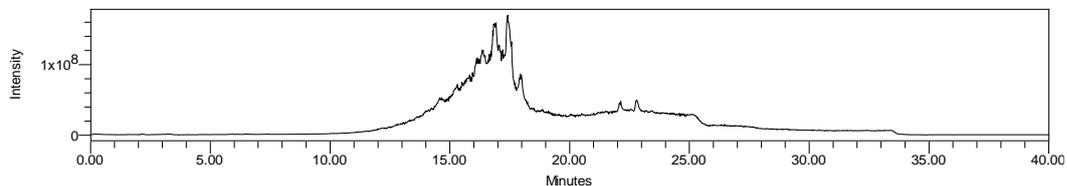


Figura 304. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra DiOH2_Tubo_3.

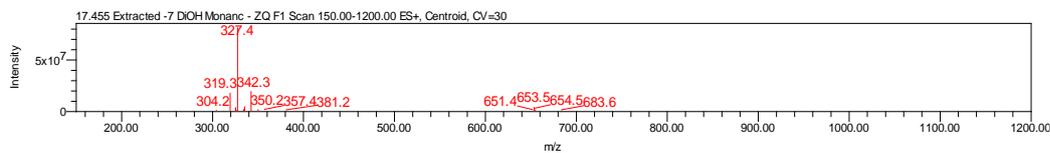


Figura 305. Cromatograma da amostra DiOH2_Tubo_5 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.

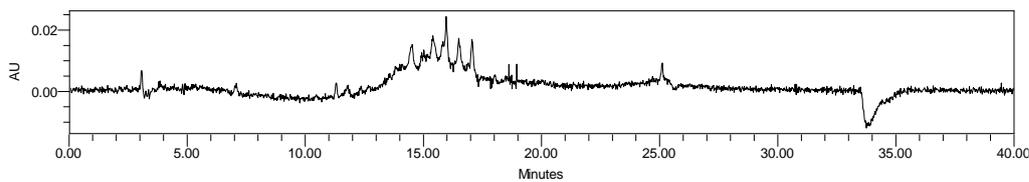


Figura 306. Cromatograma de íons totais da amostra DiOH2_Tubo_5 por HPLC-MS.

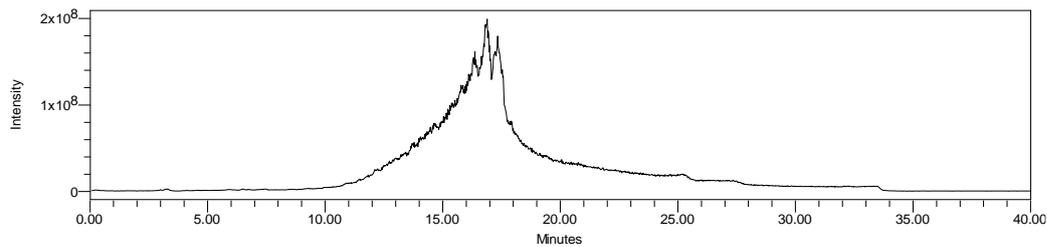


Figura 307. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra DiOH2_Tubo_5.

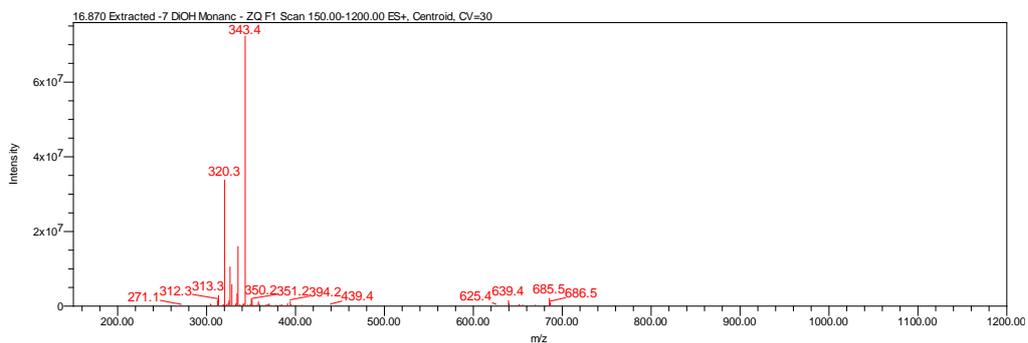


Figura 308. Cromatograma da amostra DiOH3_Tubo_15 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.

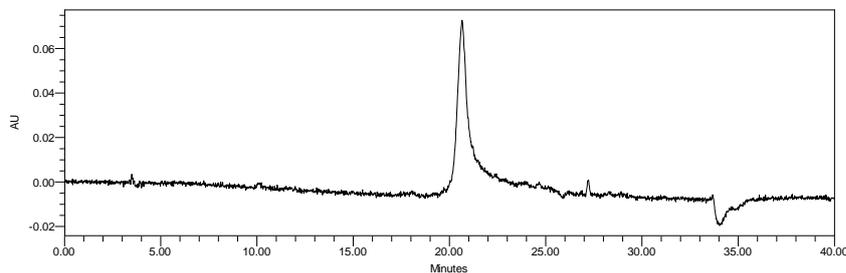


Figura 309. Cromatograma de íons totais da amostra DiOH3_Tubo_15 por HPLC-MS.

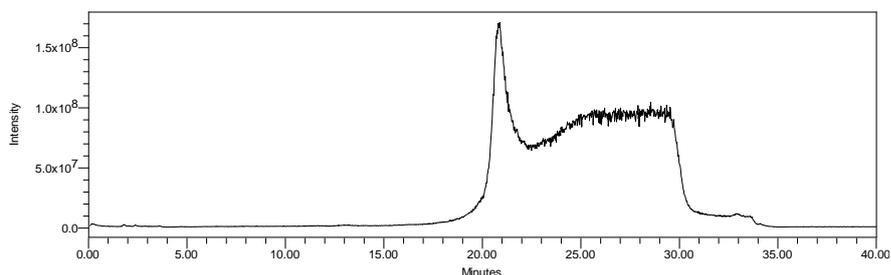


Figura 310. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra DiOH3_Tubo_15.

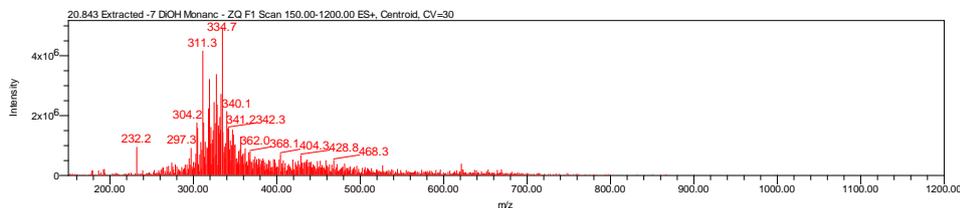


Figura 311. Cromatograma de íons totais da amostra DiOH4_Tubo_20 por HPLC-MS.

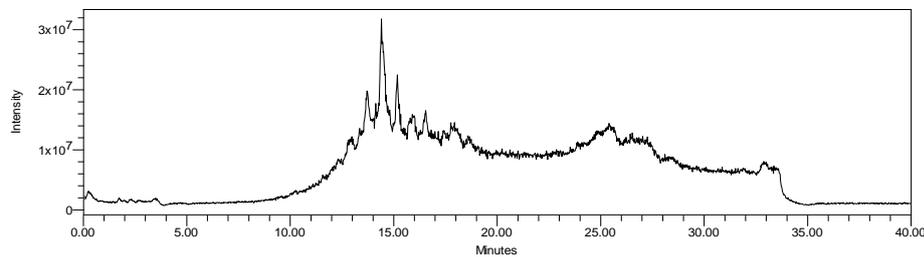


Figura 312. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra DiOH4_Tubo_20.

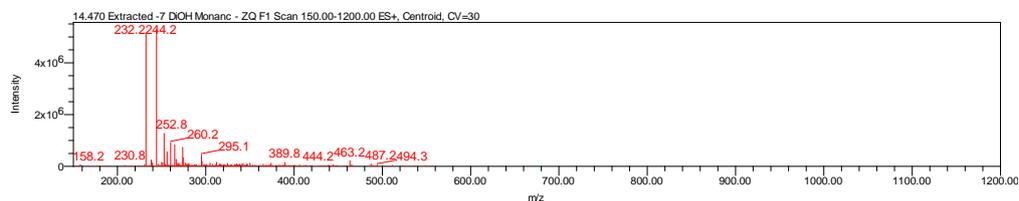


Figura 313. Cromatograma da amostra DiOH4_Tubo_25 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.

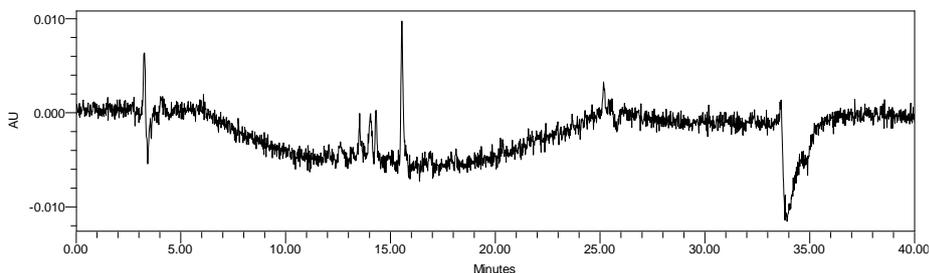


Figura 314. Cromatograma de íons totais da amostra DiOH4_Tubo_25 por HPLC-MS.

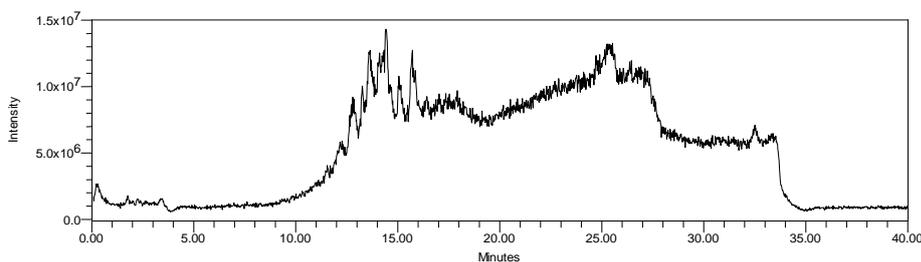


Figura 315. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra DiOH4_Tubo_25.

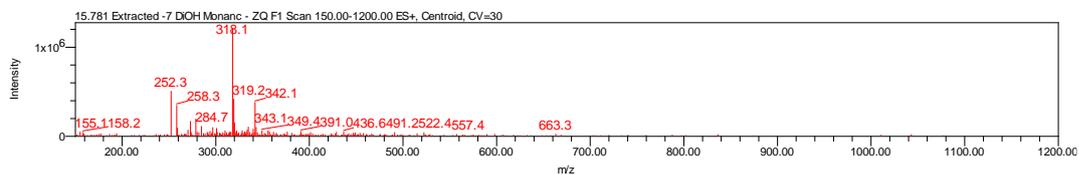


Figura 316. Cromatograma da amostra DiOH4_Tubo_30 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.

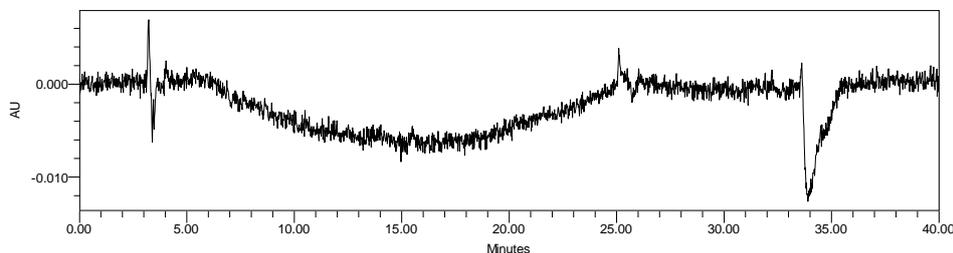


Figura 317. Cromatograma de íons totais da amostra DiOH4_Tubo_30 por HPLC-MS.

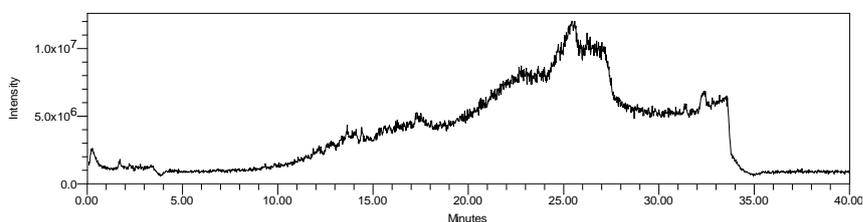


Figura 318. Cromatograma da amostra DiOH5_Tubo_60 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.

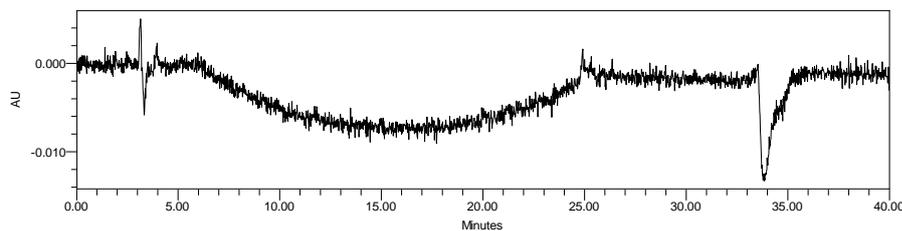


Figura 319. Cromatograma de íons totais da amostra DiOH5_Tubo_60 por HPLC-MS.

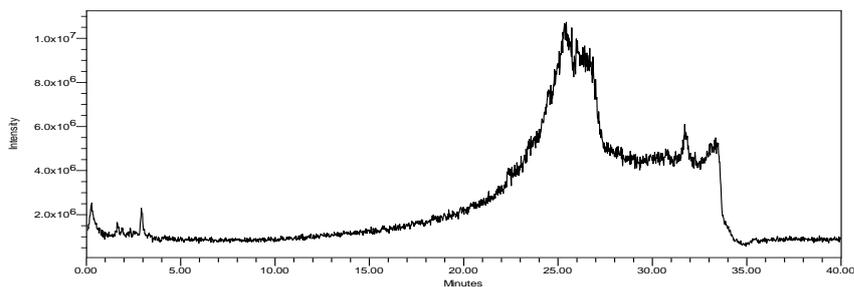


Figura 320. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra DiOH5_Tubo_60.

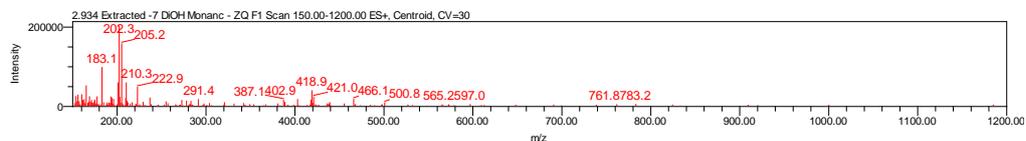


Figura 321. Cromatograma da amostra DiOH5_Tubo_60 por HPLC-ELSD.

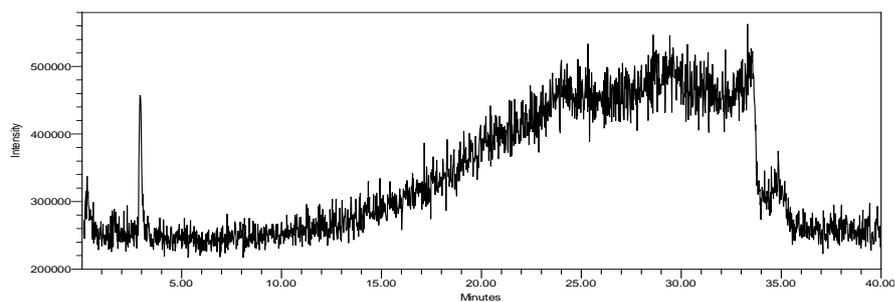


Figura 322. Cromatograma da amostra DiOH5_Tubo_90 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.

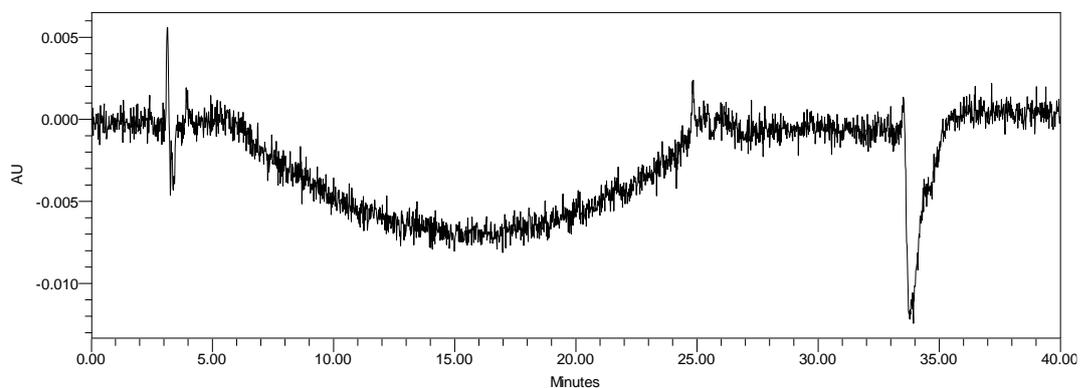


Figura 323. Cromatograma de íons totais da amostra DiOH5_Tubo_90 por HPLC-MS.

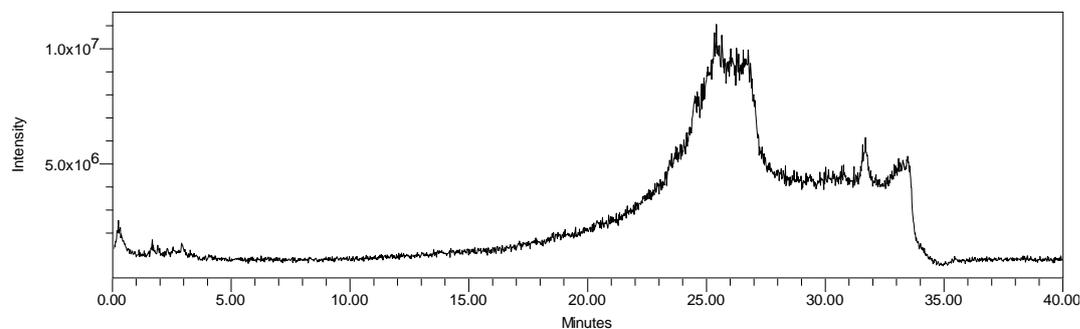


Figura 324. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra DiOH2_Tubo_90.

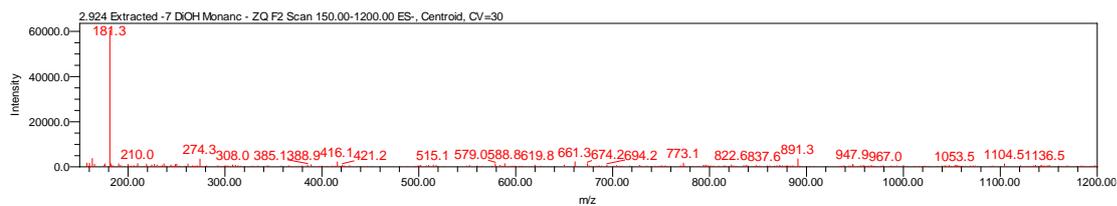


Figura 325. Cromatograma da amostra DiOH5_Tubo_90 por HPLC-ELSD.

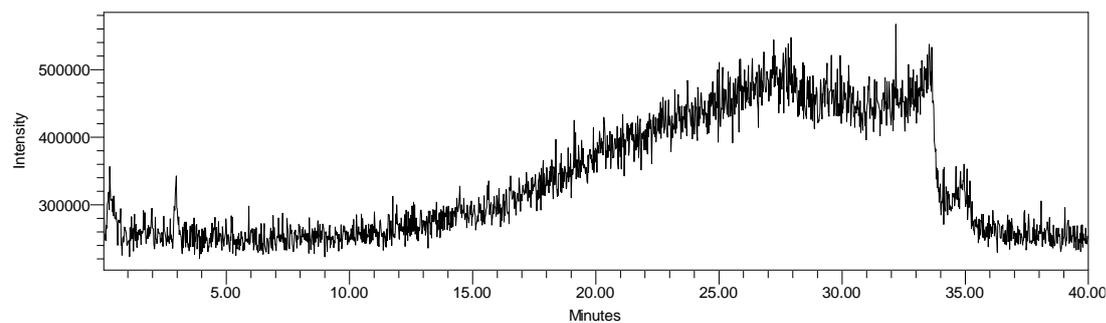


Figura 326. Cromatograma da amostra DiOH5_Tubo_110 por HPLC-DAD monitorado em 254 nm.

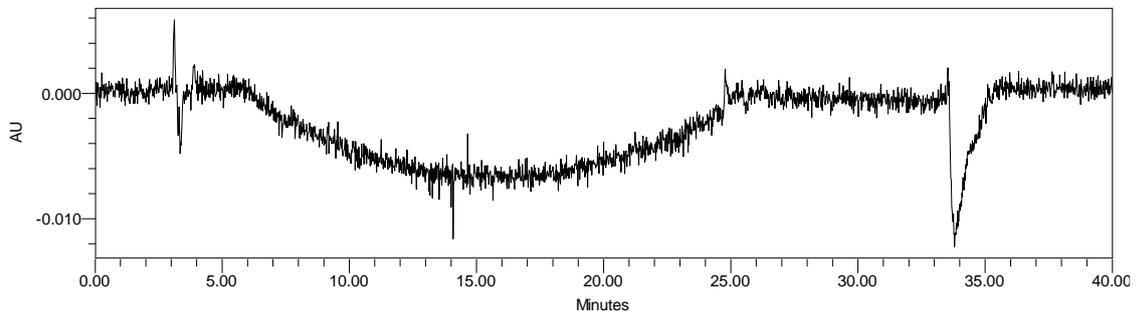


Figura 327. Cromatograma da amostra DiOH5_Tubo_90 por HPLC-ELSD.

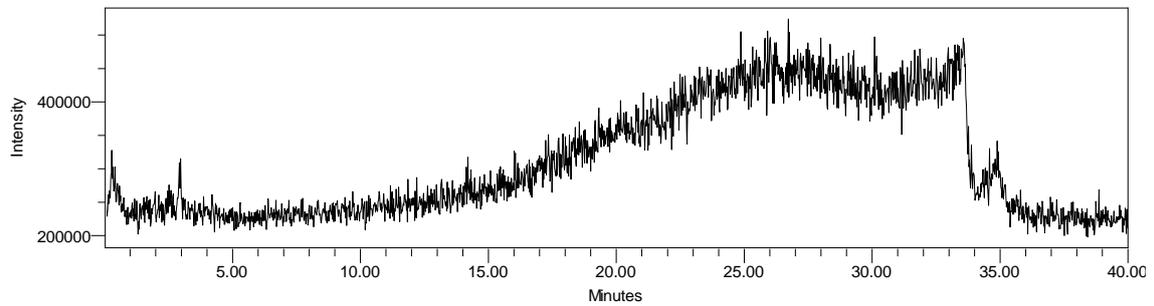
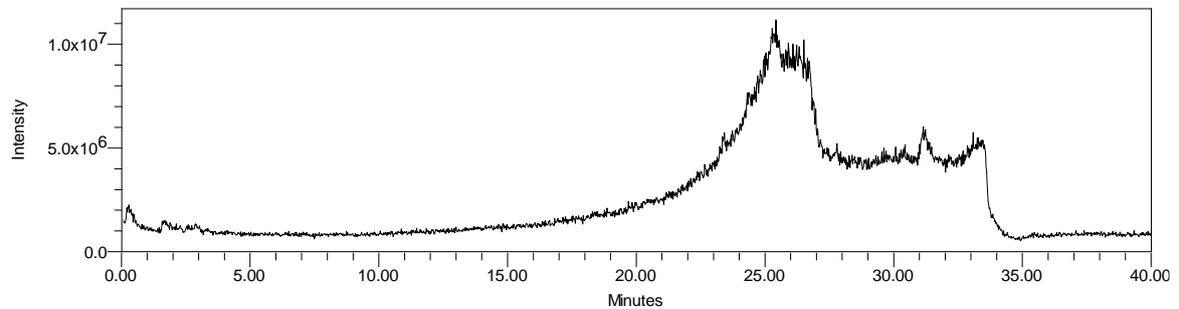


Figura 328. Cromatograma de íons totais da amostra DiOH5_Tubo_110 por HPLC-MS.



Anexo D: Caracterização por HPLC-ELSD-UV-MS das frações do fracionamento por HPLC da fração AcMA17_43 em coluna Ph.

Figura 329. Cromatograma da amostra AcMA17_43A por HPLC-DAD monitorado em 300 nm.

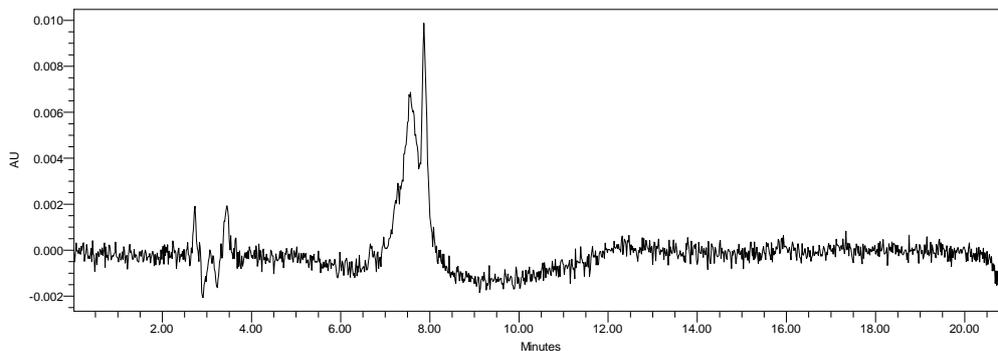


Figura 330. Cromatograma de íons totais da amostra AcMA17_43A por HPLC-MS.

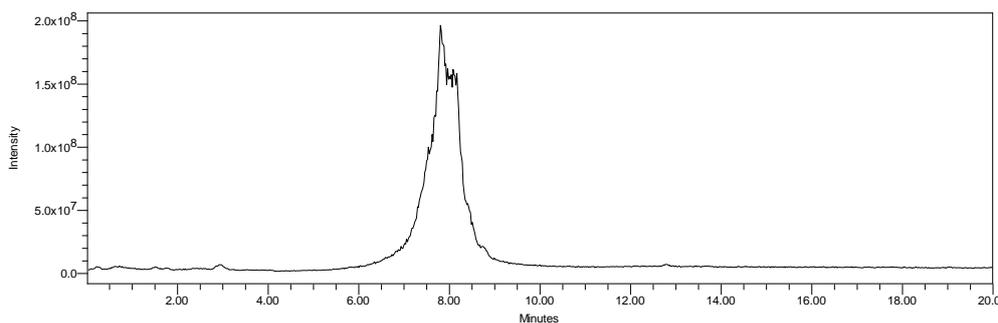


Figura 331. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra AcMA17_43A.

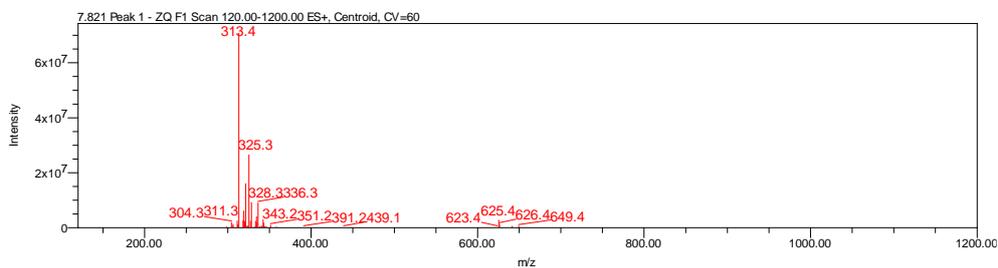


Figura 332. Cromatograma da amostra AcMA17_43A por HPLC-ELSD.

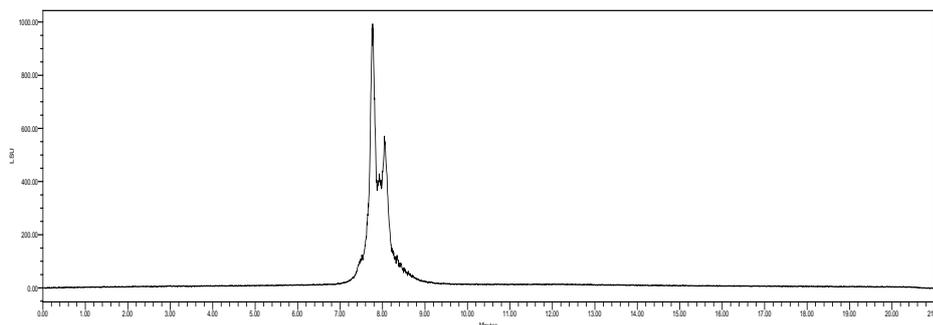


Figura 333. Cromatograma da amostra AcMA17_43B por HPLC-DAD monitorado em 300 nm.

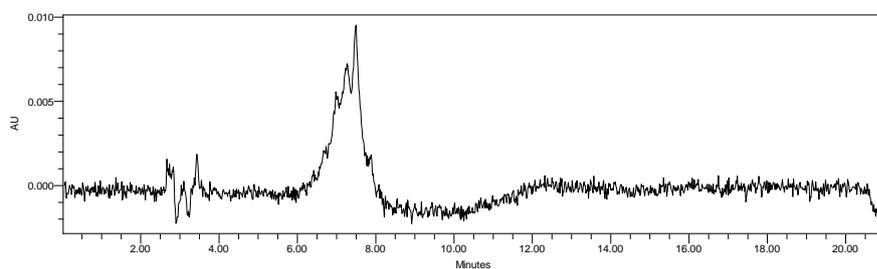


Figura 334. Cromatograma de íons totais da amostra AcMA17_43B por HPLC-MS.

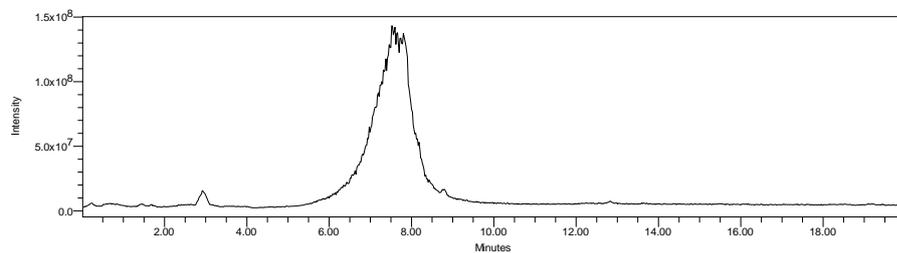


Figura 335. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra AcMA17_43B.

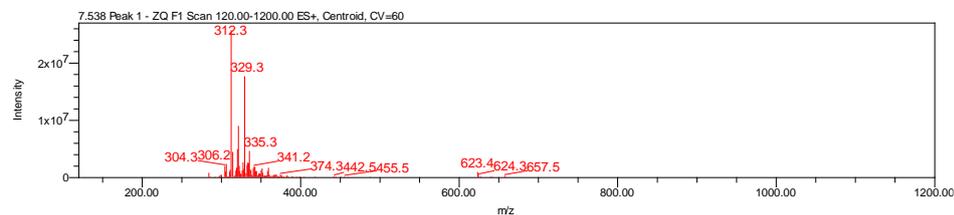


Figura 336. Cromatograma da amostra AcMA17_43B por HPLC-ELSD.

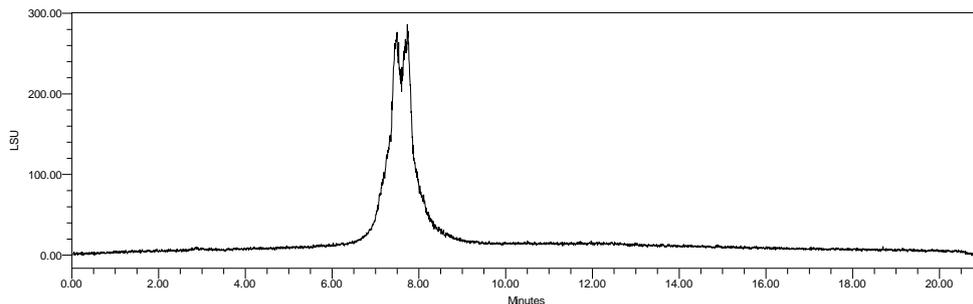


Figura 337. Cromatograma da amostra AcMA17_43C por HPLC-DAD monitorado em 300 nm.

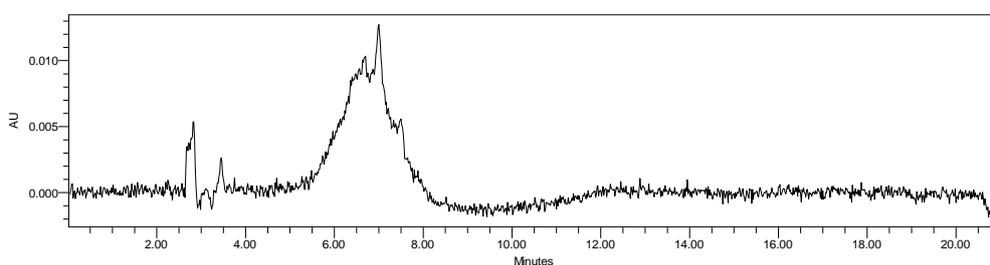


Figura 338. Cromatograma de íons totais da amostra AcMA17_43C por HPLC-MS.

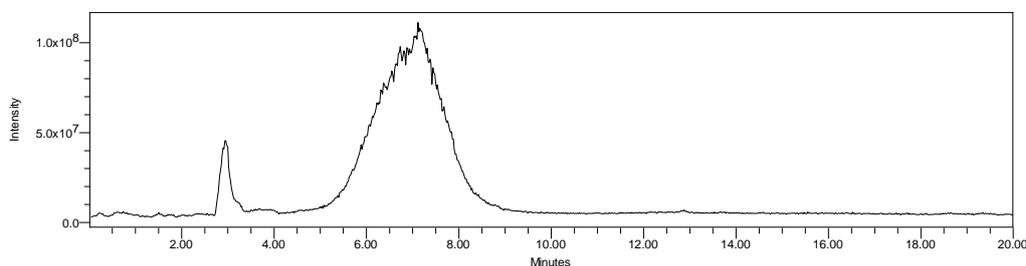


Figura 339. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra AcMA17_43C.

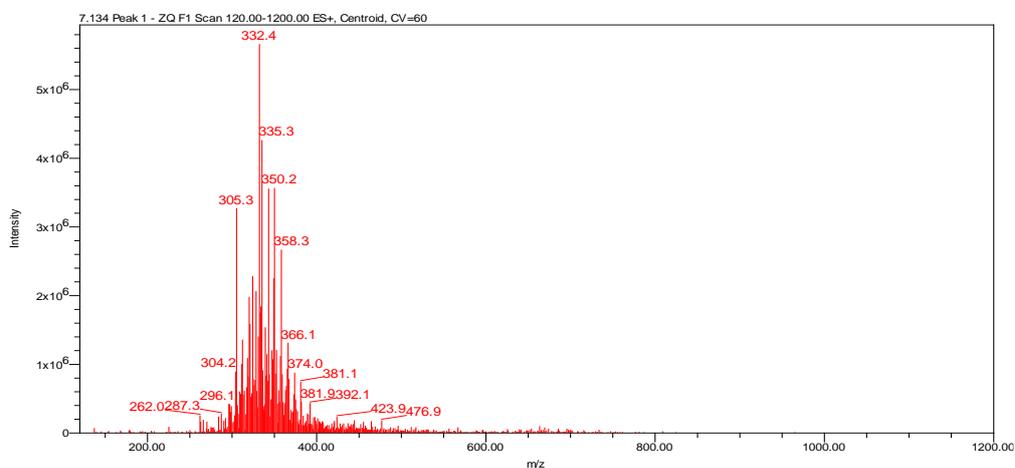


Figura 340. Cromatograma da amostra AcMA17_43C por HPLC-ELSD.

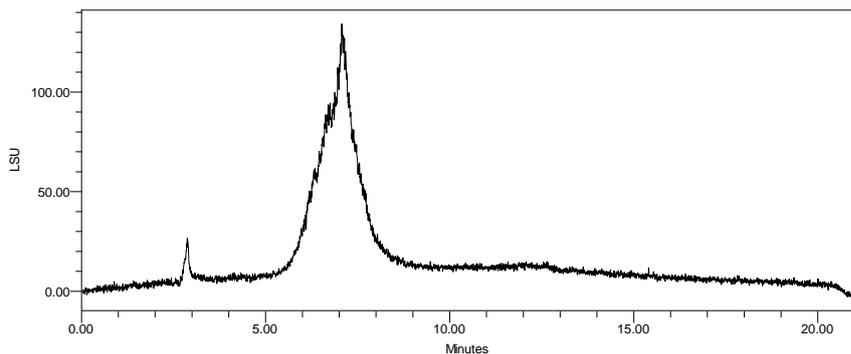


Figura 341. Cromatograma da amostra AcMA17_43D por HPLC-DAD monitorado em 300 nm.

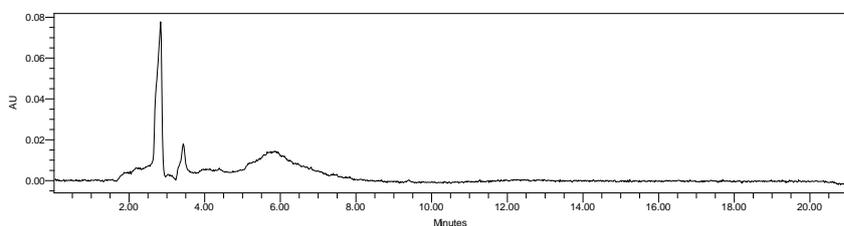


Figura 342. Cromatograma de íons totais da amostra AcMA17_43D por HPLC-MS.

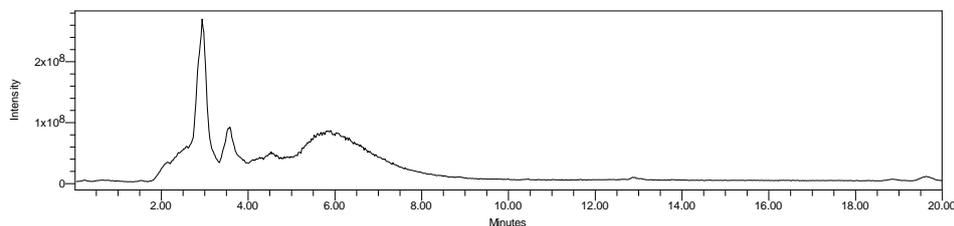


Figura 343. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra AcMA17_43D.

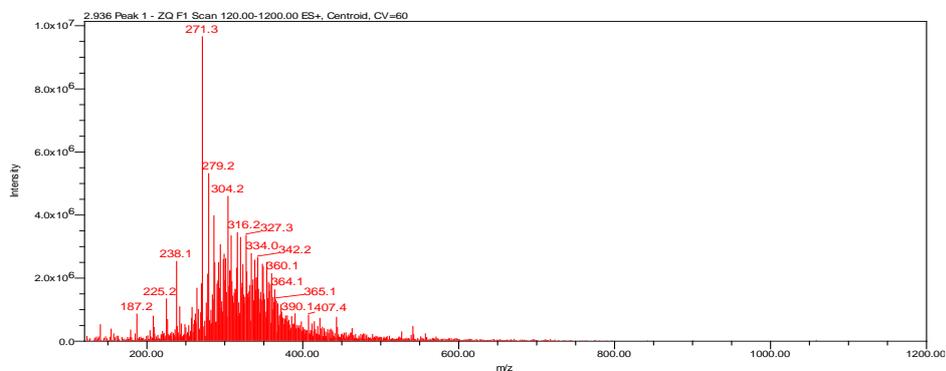


Figura 344. Cromatograma da amostra AcMA17_43D por HPLC-ELSD.

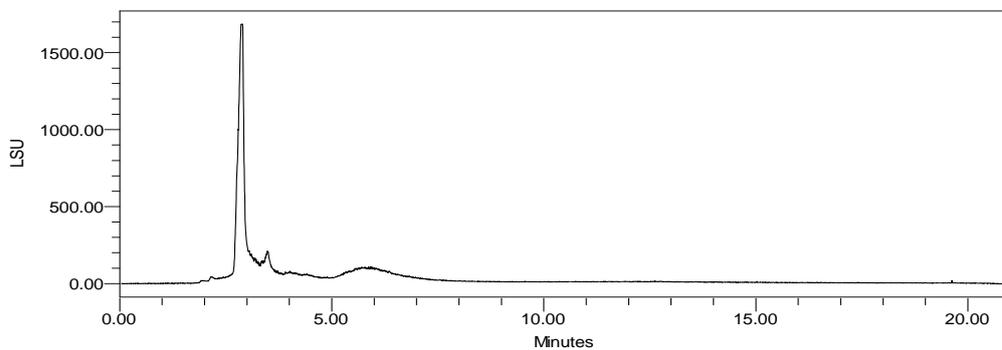


Figura 345. Cromatograma da amostra AcMA17_43E por HPLC-DAD monitorado em 300 nm.

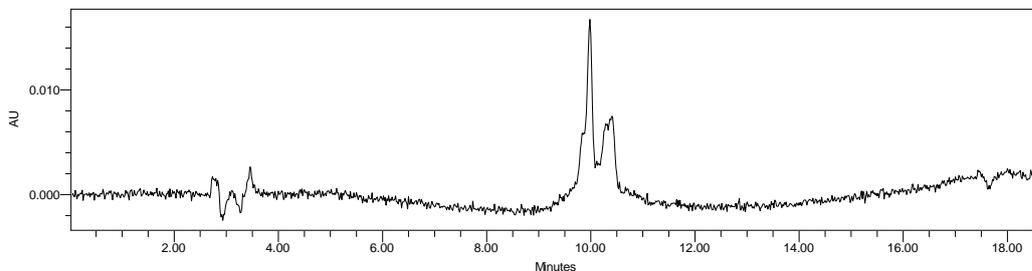


Figura 346. Cromatograma de íons totais da amostra AcMA17_43E por HPLC-MS.

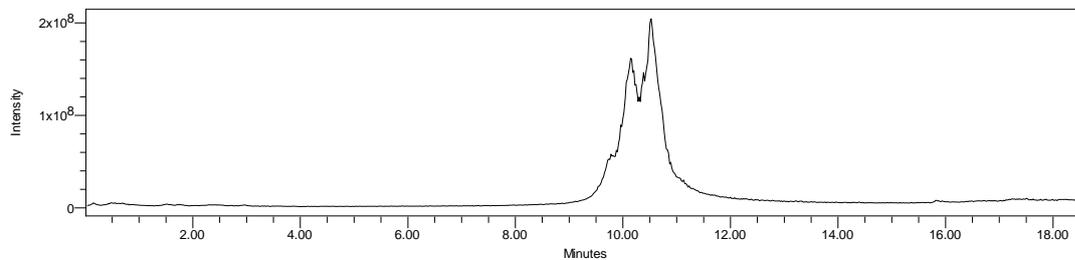


Figura 347. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra AcMA17_43E.

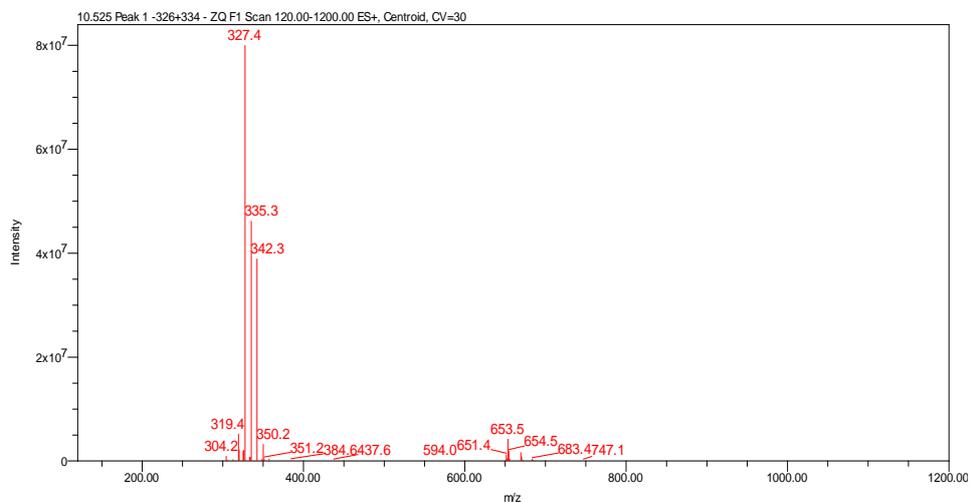


Figura 348. Cromatograma da amostra AcMA17_43E por HPLC-ELSD.

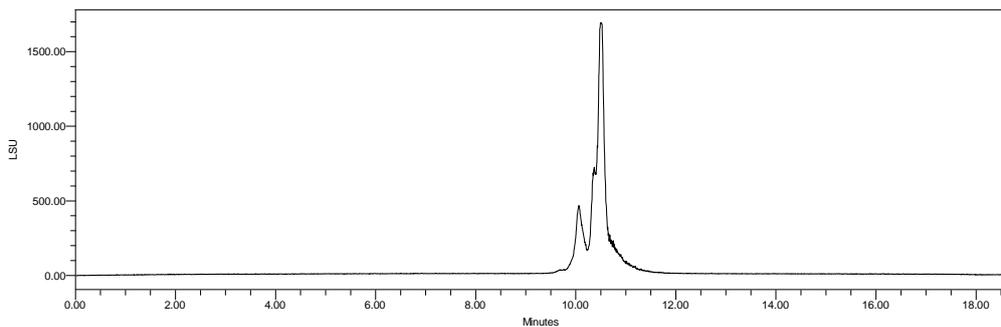


Figura 349. Cromatograma da amostra AcMA17_43F por HPLC-DAD monitorado em 300 nm.

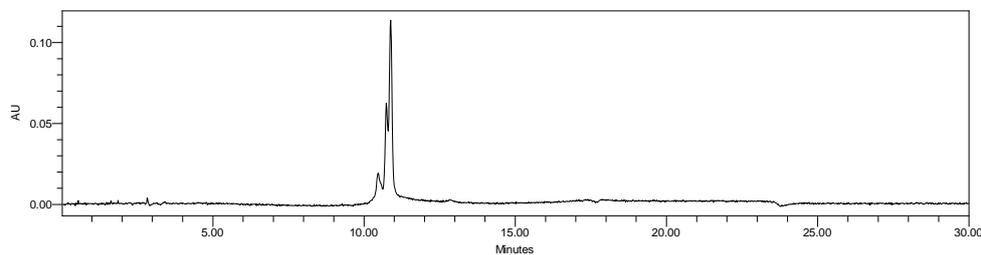


Figura 350. Cromatograma de íons totais da amostra AcMA17_43F por HPLC-MS.

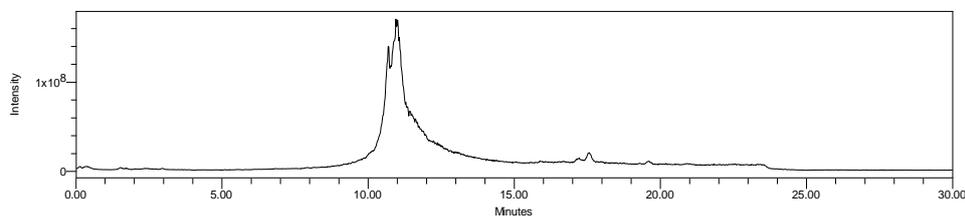


Figura 351. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra AcMA17_43F.

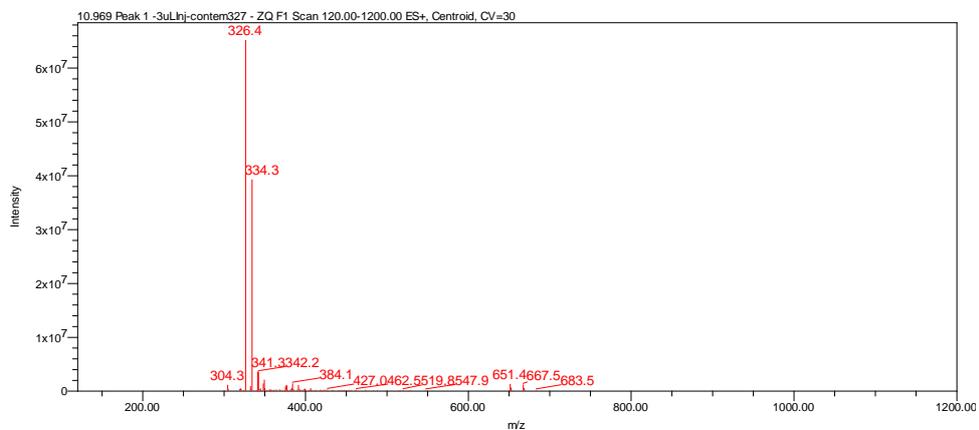


Figura 352. Cromatograma da amostra AcMA17_43F por HPLC-ELSD.

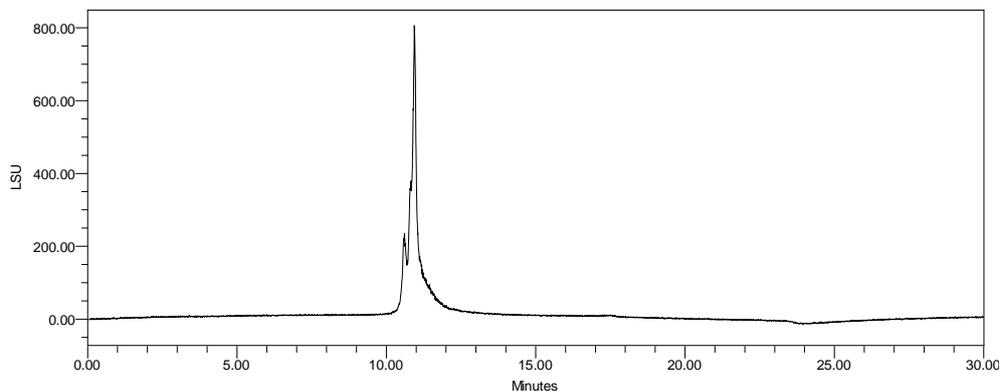


Figura 353. Cromatograma da amostra AcMA17_43G por HPLC-DAD monitorado em 300 nm.

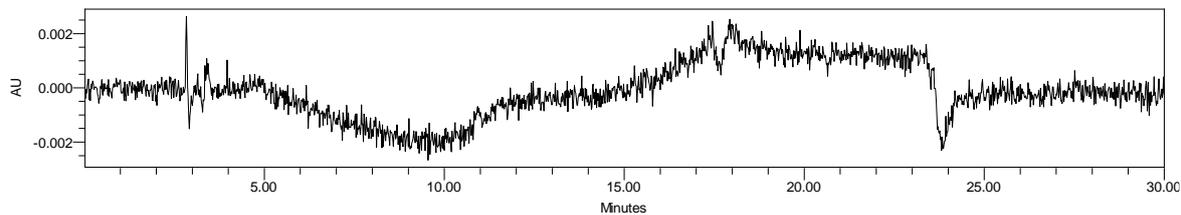


Figura 354. Cromatograma de íons totais da amostra AcMA17_43G por HPLC-MS.

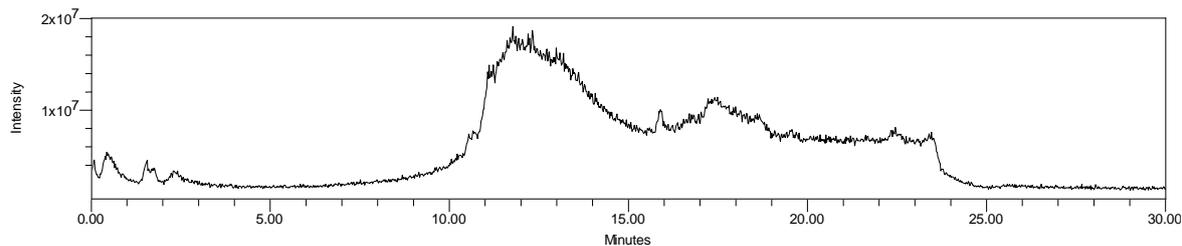


Figura 355. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra AcMA17_43G.

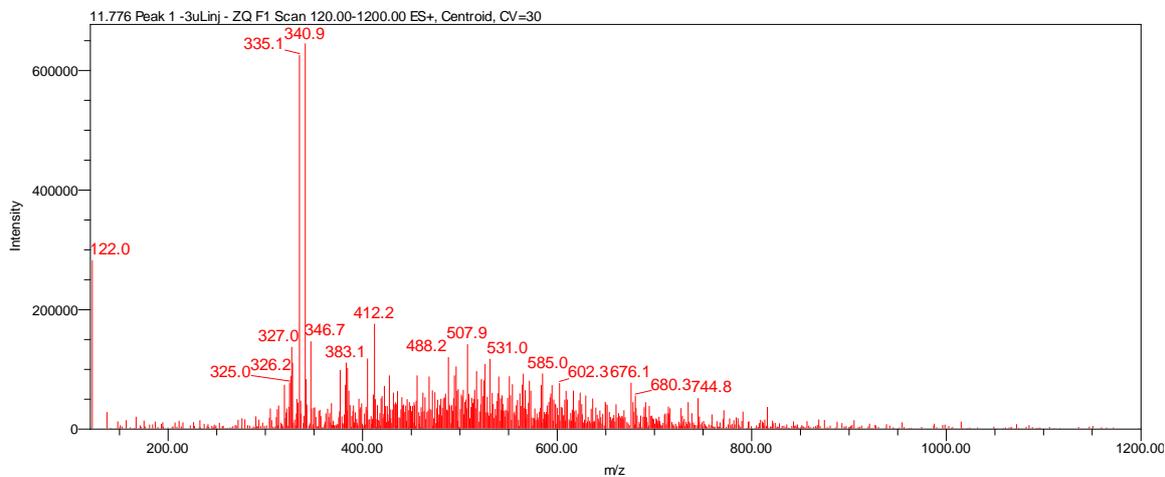


Figura 356. Cromatograma da amostra AcMA17_43G por HPLC-ELSD.

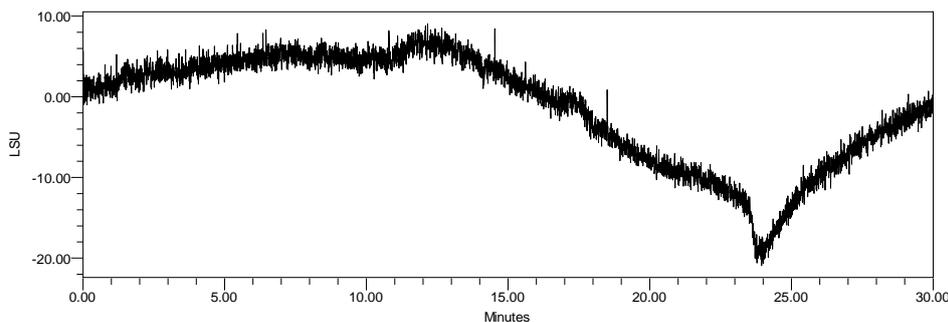


Figura 357. Cromatograma da amostra AcMA17_43H por HPLC-DAD monitorado em 300 nm.

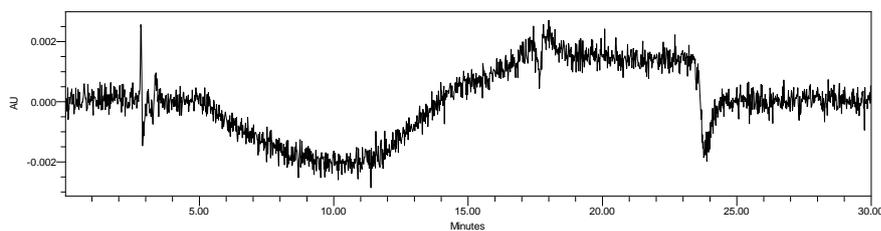


Figura 358. Cromatograma de íons totais da amostra AcMA17_43H por HPLC-MS.

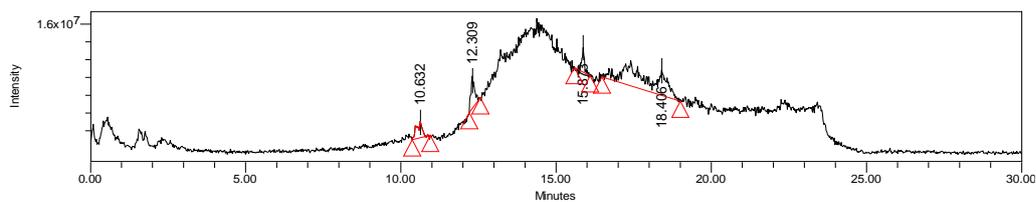


Figura 359. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra AcMA17_43H.

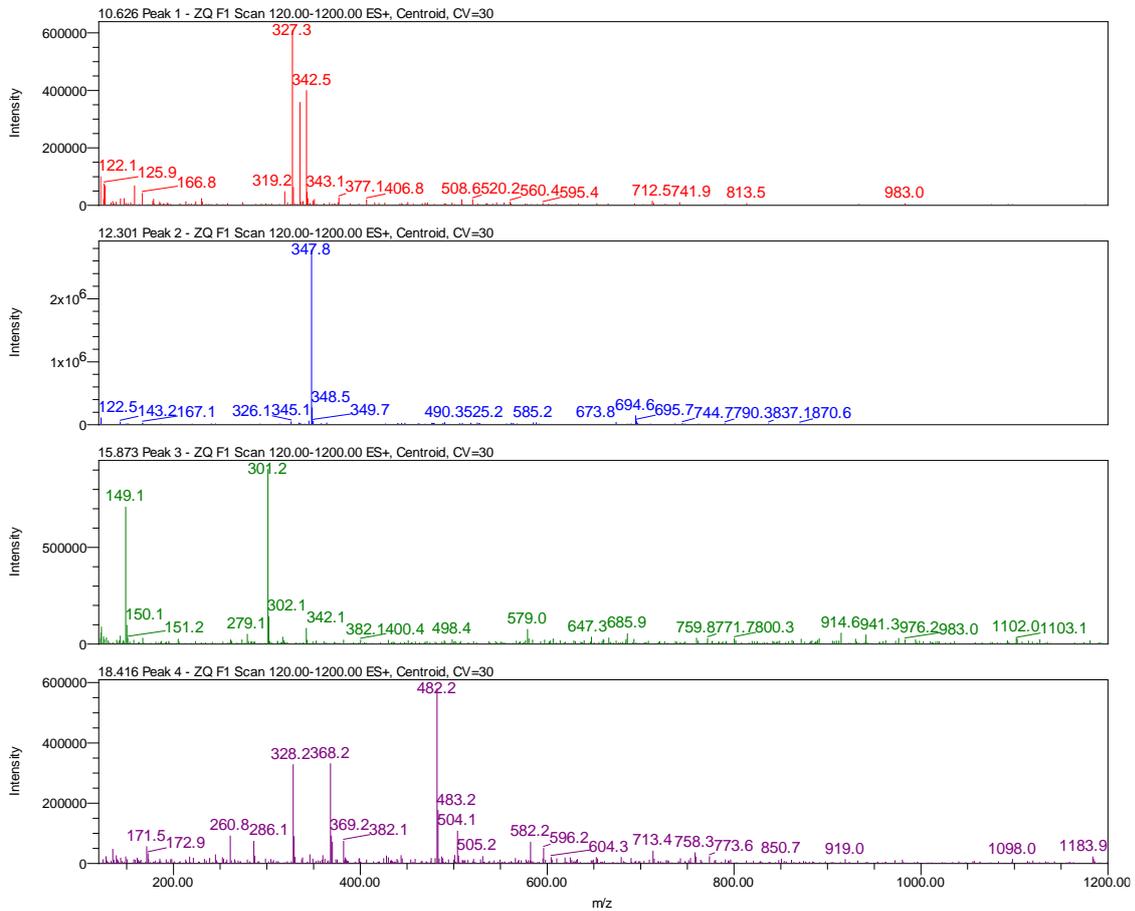


Figura 360. Cromatograma da amostra AcMA17_43H por HPLC-ELSD.

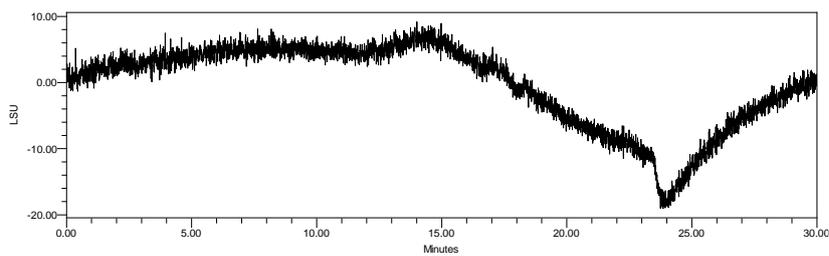


Figura 361. Cromatograma da amostra AcMA17_43I por HPLC-DAD monitorado em 300 nm.

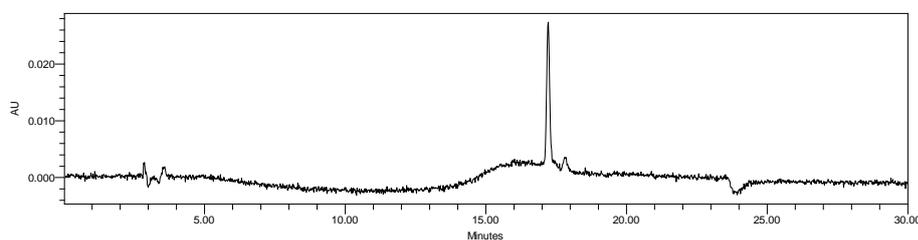


Figura 362. Cromatograma de íons totais da amostra AcMA17_43I por HPLC-MS modo positivo de ionização.

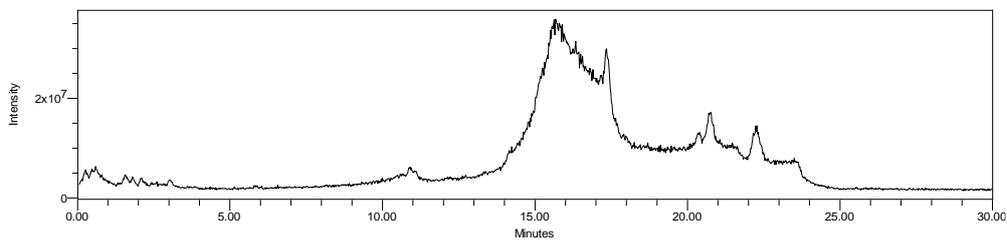


Figura 363. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra AcMA17_43I.

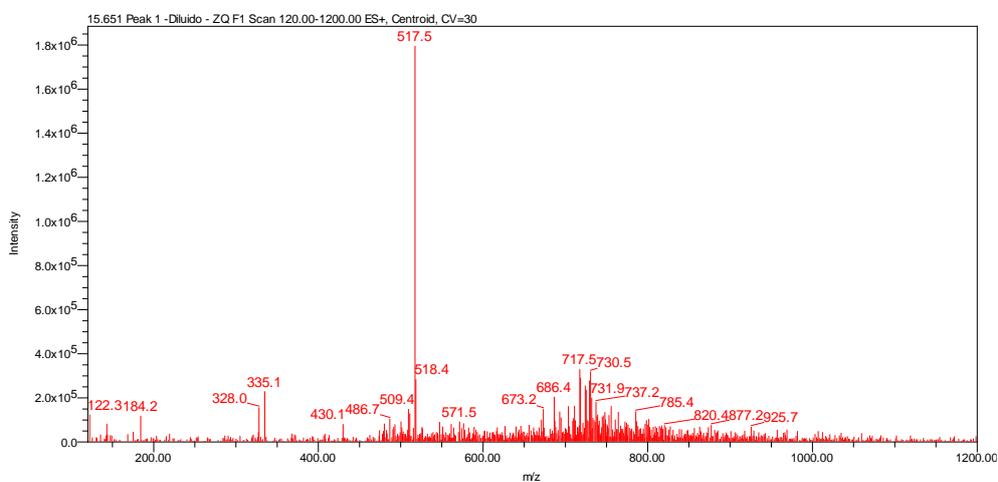


Figura 364. Cromatograma de íons totais da amostra AcMA17_43I por HPLC-MS modo negativo de ionização.

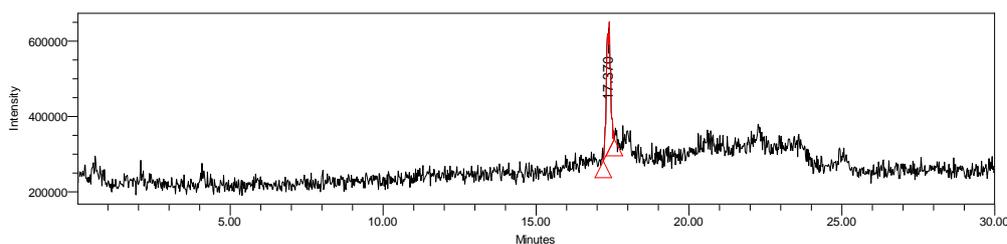


Figura 365. Espectro de ESI-MS em modo negativo de ionização da amostra AcMA17_43I.

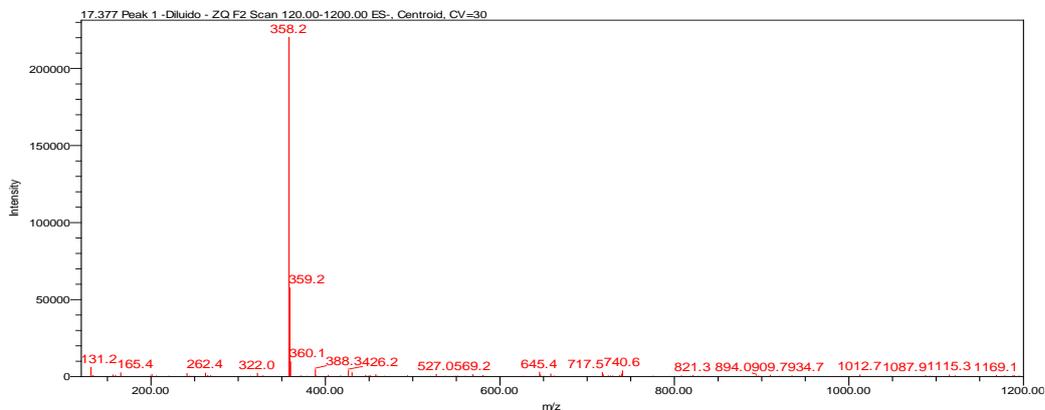


Figura 366. Cromatograma da amostra AcMA17_43I por HPLC-ELSD.

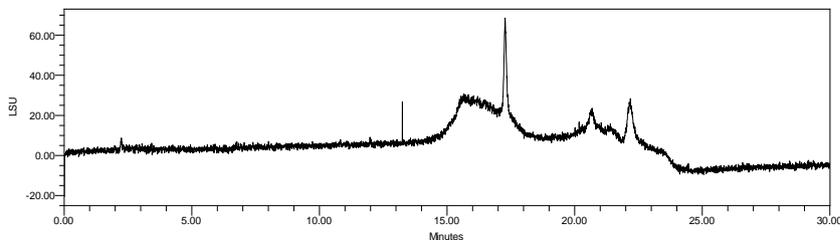


Figura 367. Cromatograma da amostra AcMA17_43J por HPLC-DAD monitorado em 300 nm.

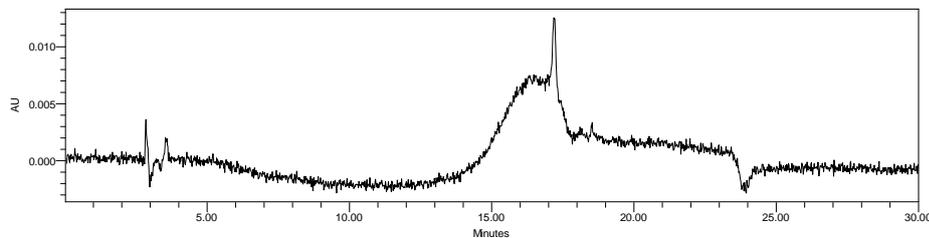


Figura 368. Cromatograma de íons totais da amostra AcMA17_43J por HPLC-MS.

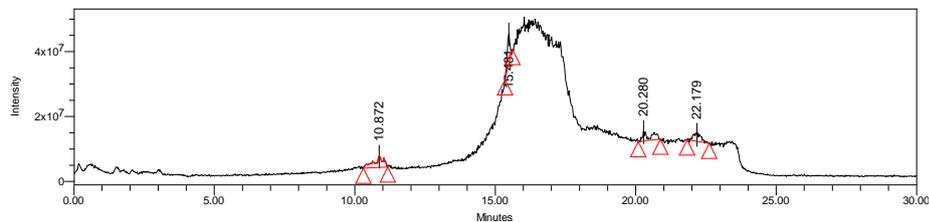


Figura 369. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra AcMA17_43J.

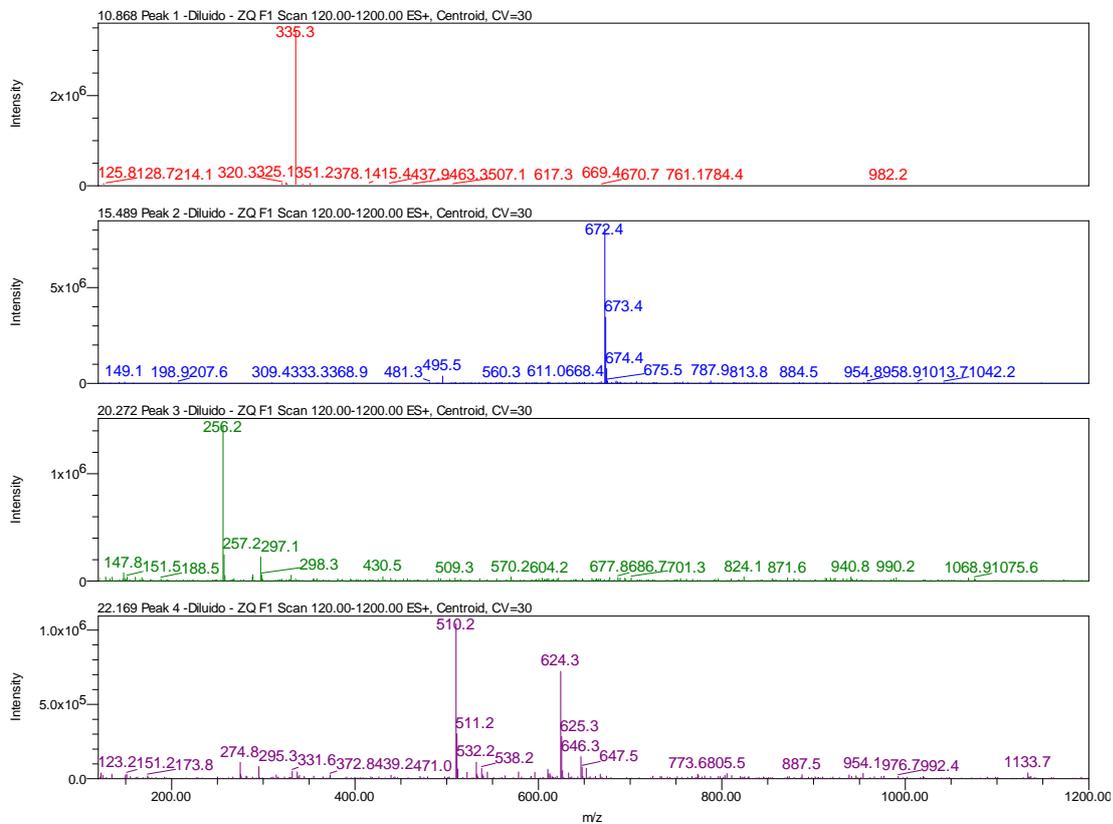


Figura 370. Cromatograma de íons totais da amostra AcMA17_43I por HPLC-MS modo negativo de ionização.

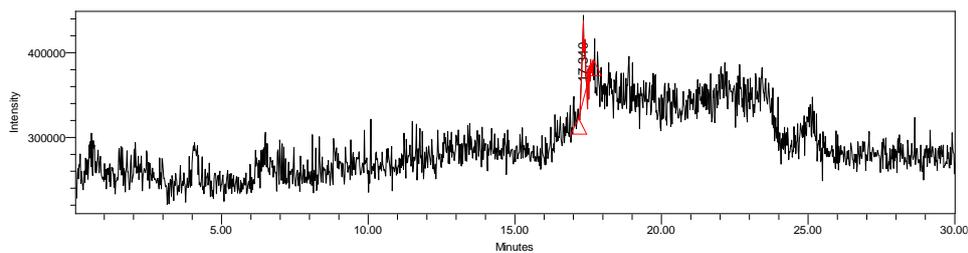


Figura 371. Espectro de ESI-MS em modo negativo de ionização da amostra AcMA17_43I.

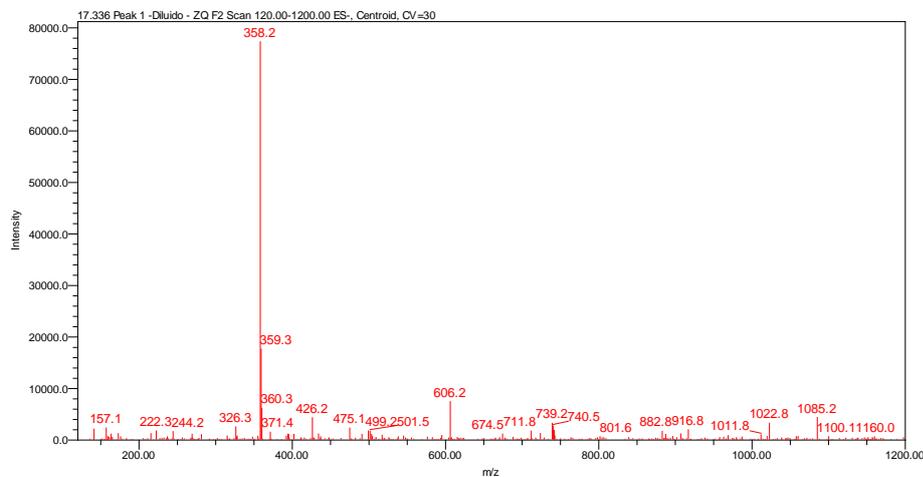


Figura 372. Cromatograma da amostra AcMA17_43J por HPLC-ELSD.

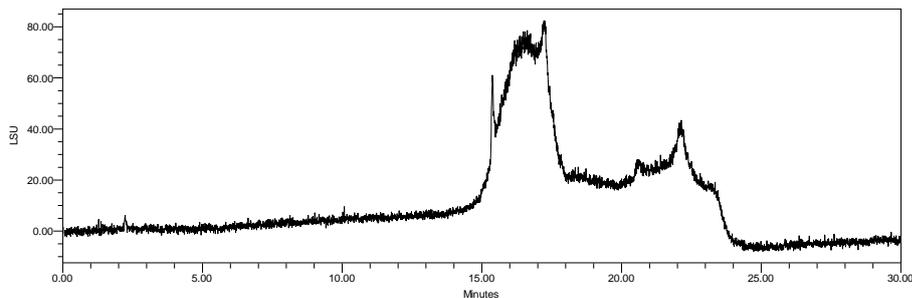


Figura 373. Cromatograma da amostra AcMA17_43K por HPLC-DAD monitorado em 300 nm.

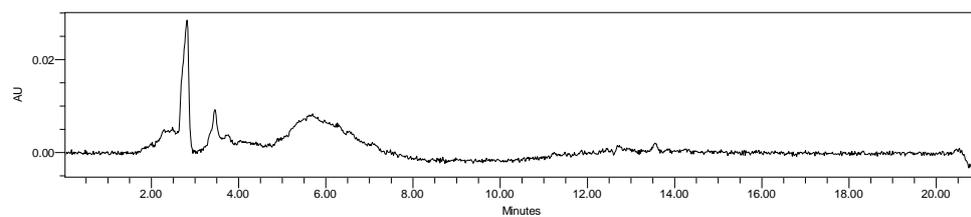


Figura 374. Cromatograma de íons totais da amostra AcMA17_43K por HPLC-MS.

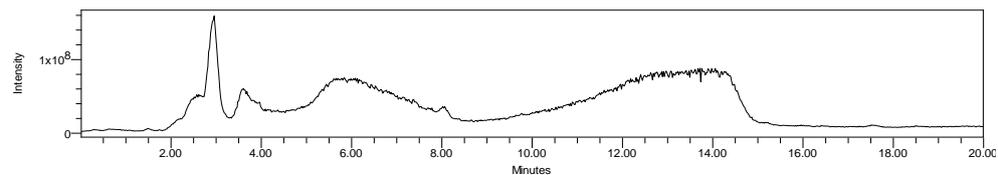


Figura 375. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra AcMA17_43K.

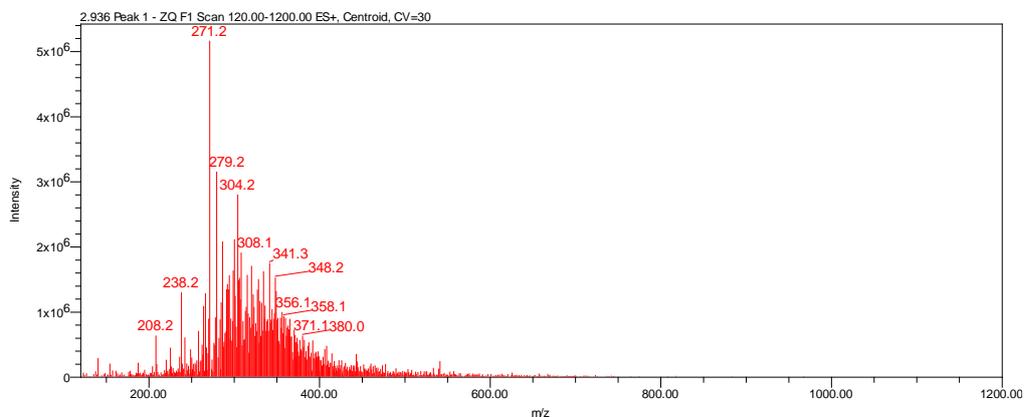


Figura 376. Cromatograma da amostra AcMA17_43K por HPLC-ELSD.

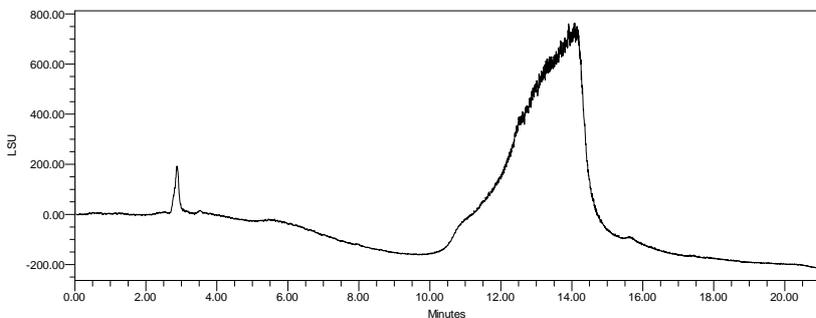


Figura 377. Cromatograma da amostra AcMA17_43L por HPLC-DAD monitorado em 300 nm.

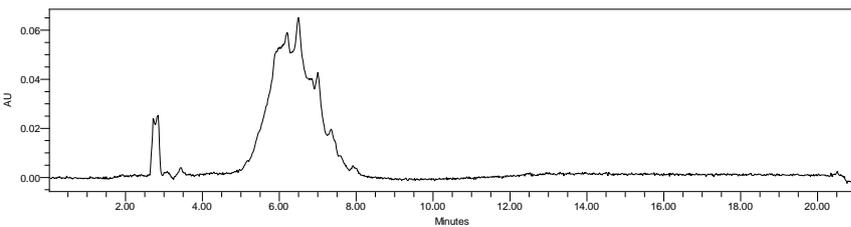


Figura 378. Cromatograma de íons totais da amostra AcMA17_43L por HPLC-MS.

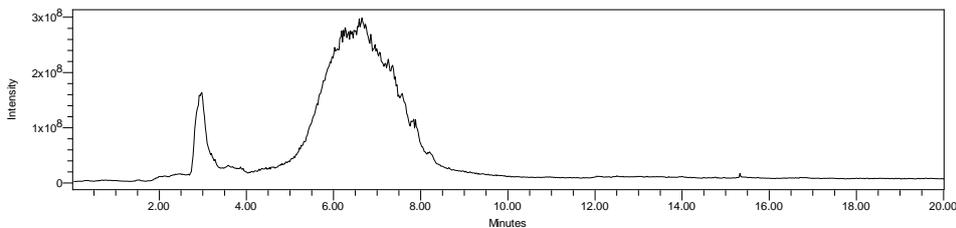


Figura 379. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra AcMA17_43L.

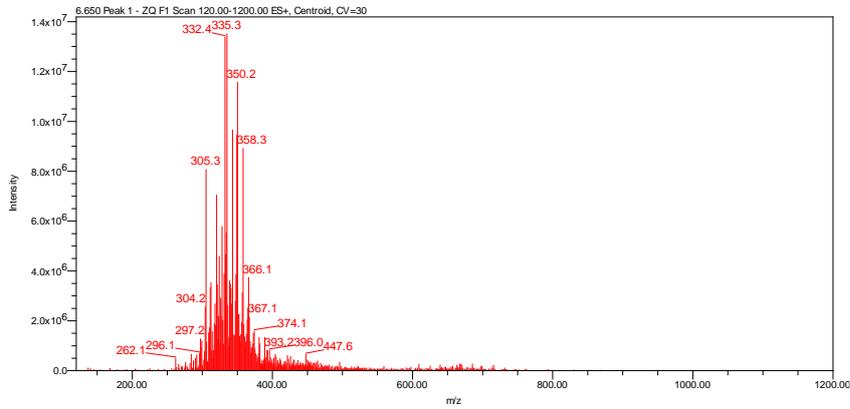


Figura 380. Cromatograma da amostra AcMA17_43L por HPLC-ELSD.

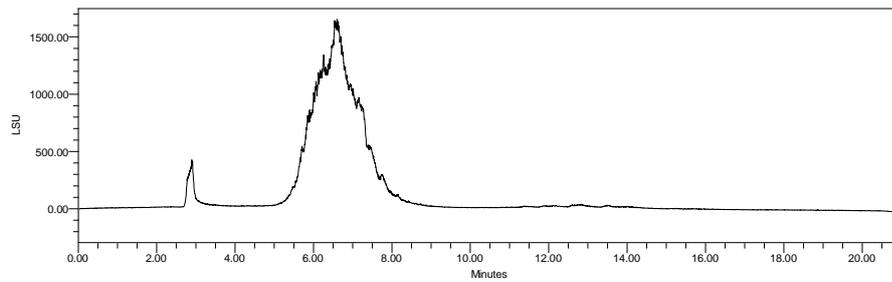


Figura 381. Cromatograma da amostra AcMA17_43M por HPLC-DAD monitorado em 300 nm.

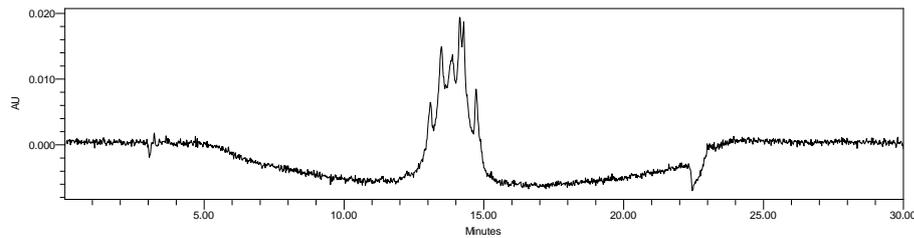


Figura 382. Cromatograma de íons totais da amostra AcMA17_43M por HPLC-MS.

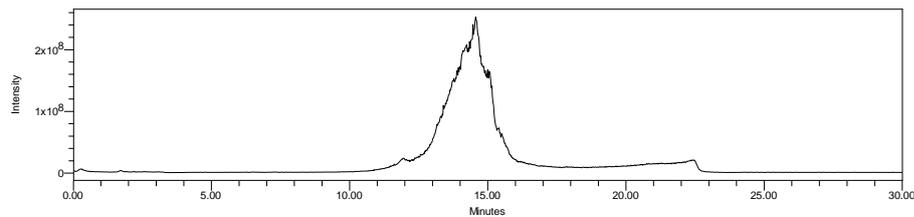


Figura 383. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra AcMA17_43M.

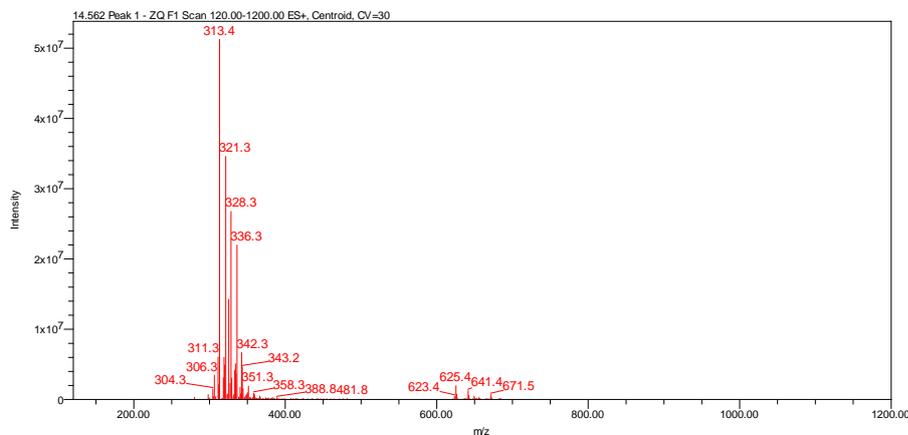


Figura 384. Cromatograma da amostra AcMA17_43M por HPLC-ELSD.

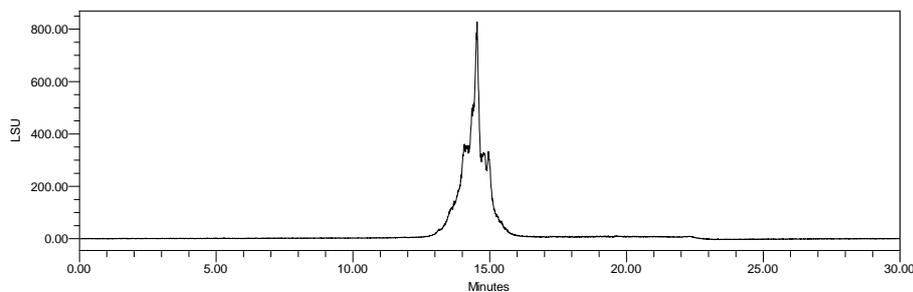


Figura 385. Cromatograma da amostra AcMA17_43N por HPLC-DAD monitorado em 300 nm.

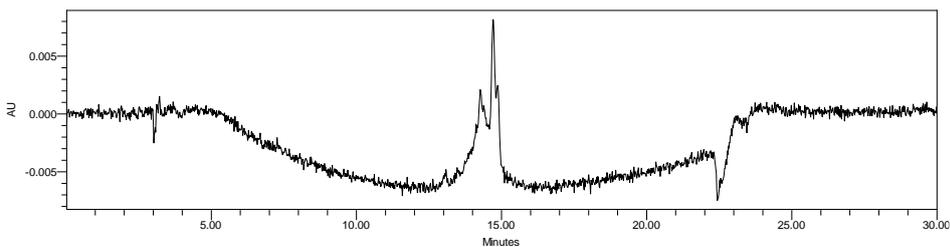


Figura 386. Cromatograma de íons totais da amostra AcMA17_43N por HPLC-MS.

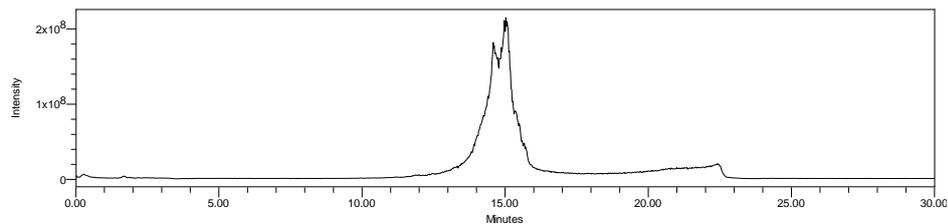


Figura 387. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra AcMA17_43N.

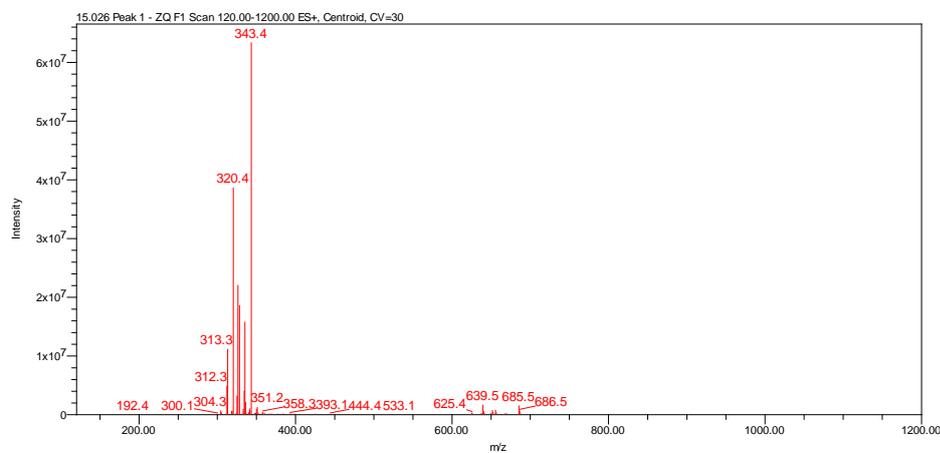


Figura 388. Cromatograma da amostra AcMA17_43N por HPLC-ELSD.

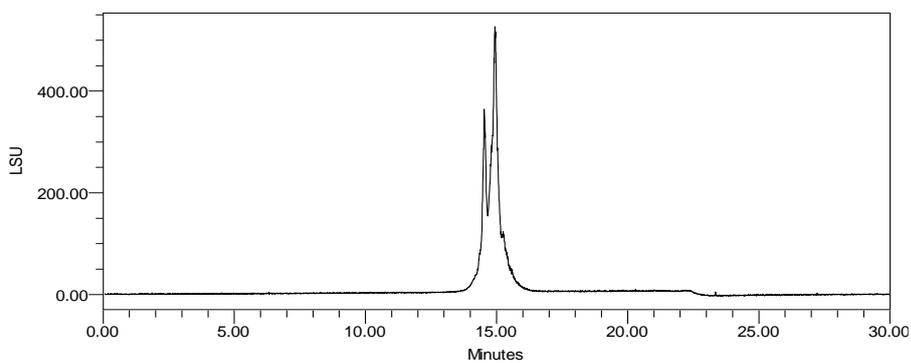


Figura 389. Cromatograma da amostra AcMA17_43O por HPLC-DAD monitorado em 300 nm.

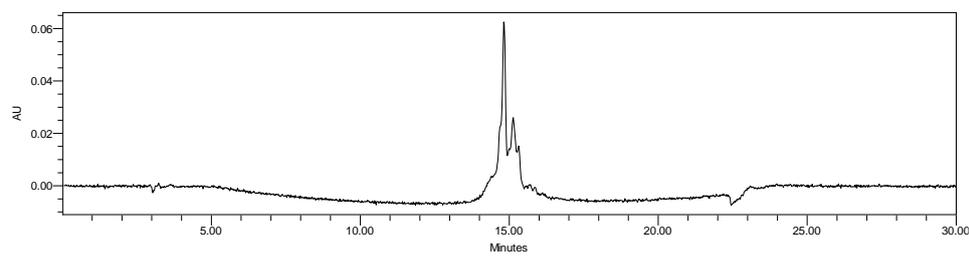


Figura 390. Cromatograma de íons totais da amostra AcMA17_43O por HPLC-MS.

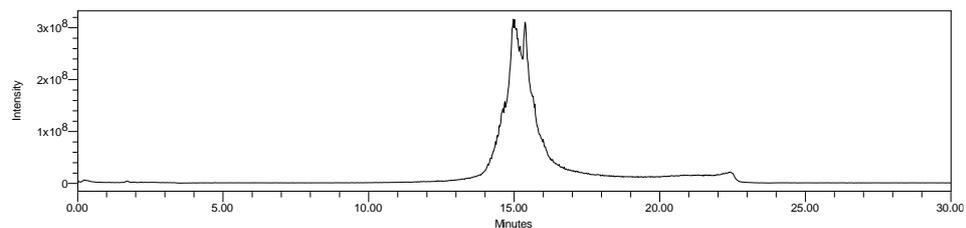


Figura 391. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra AcMA17_43O.

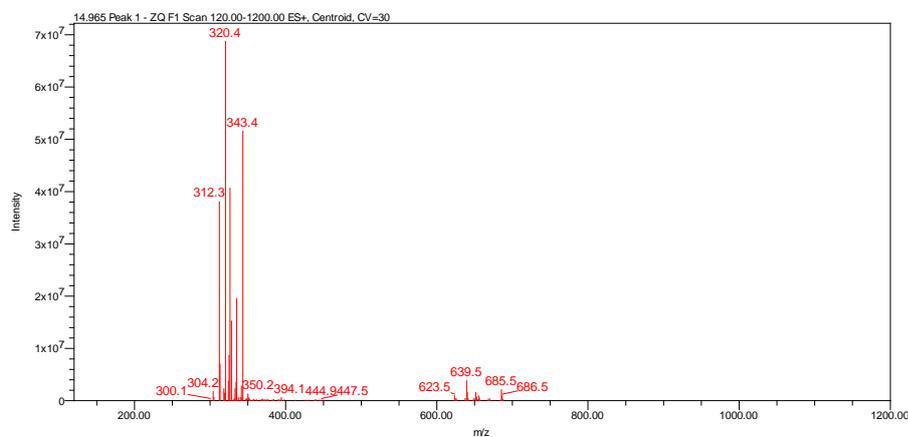


Figura 392. Cromatograma da amostra AcMA17_43O por HPLC-ELSD.

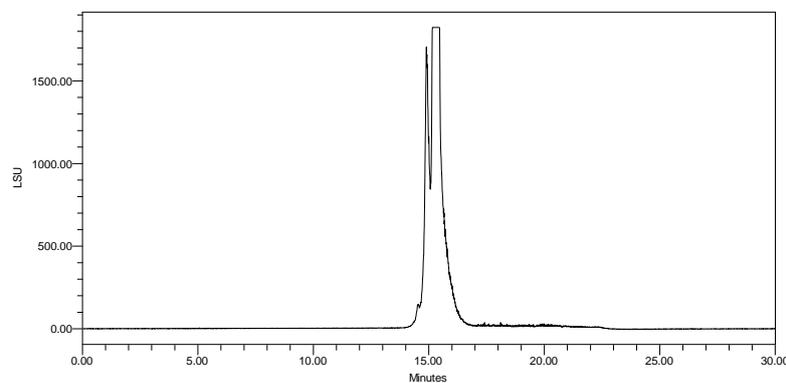


Figura 393. Cromatograma da amostra AcMA17_43P por HPLC-DAD monitorado em 300 nm.

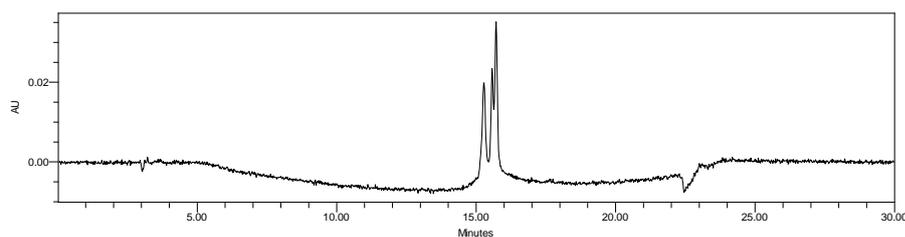


Figura 394. Cromatograma de íons totais da amostra AcMA17_43P por HPLC-MS.

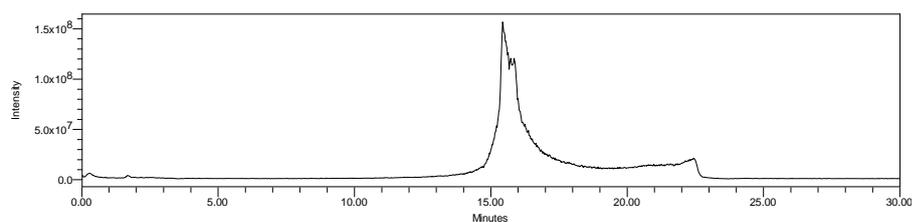


Figura 395. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra AcMA17_43P.

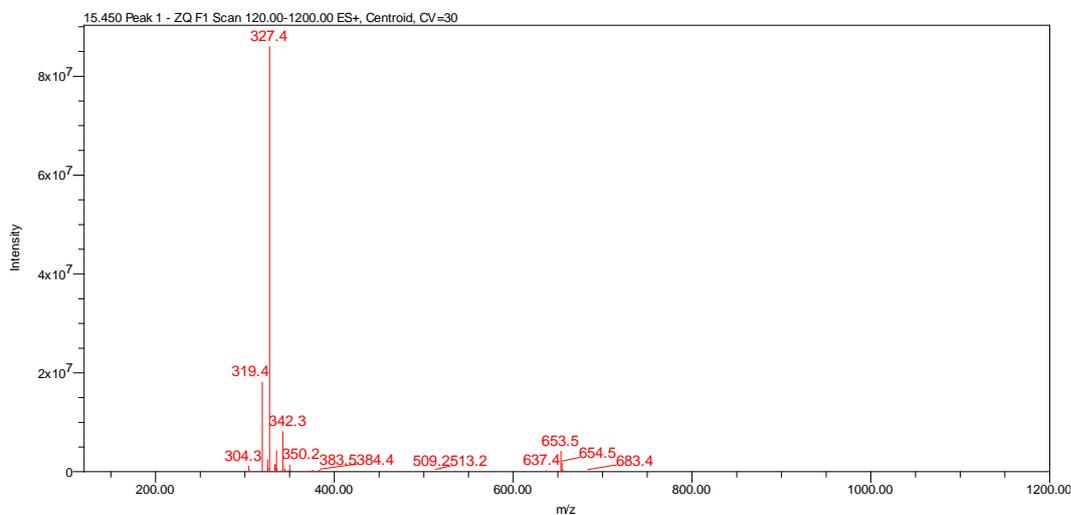


Figura 396. Cromatograma da amostra AcMA17_43P por HPLC-ELSD.

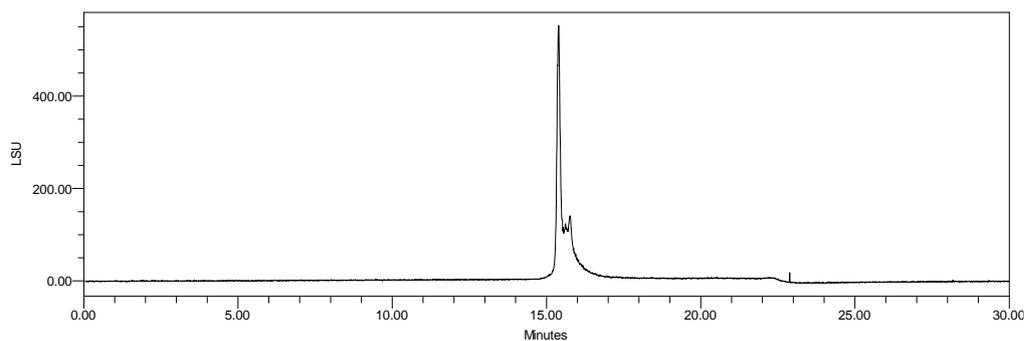


Figura 397. Cromatograma da amostra AcMA17_43Q por HPLC-DAD monitorado em 300 nm.

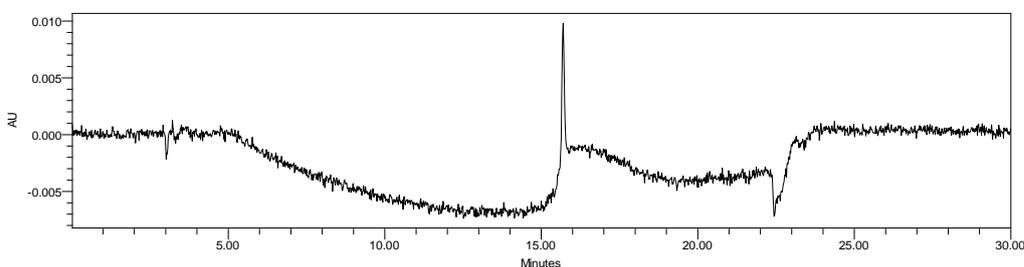


Figura 398. Cromatograma de íons totais da amostra AcMA17_43Q por HPLC-MS.

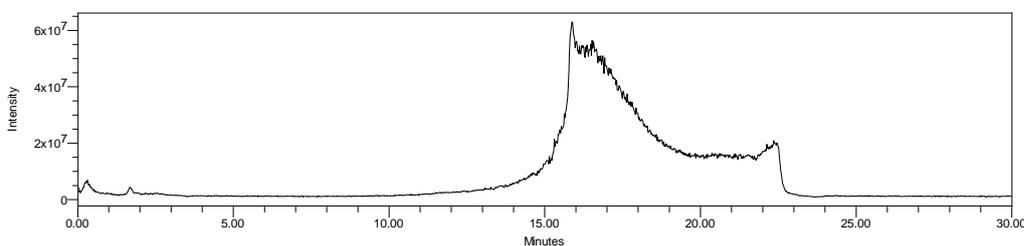


Figura 399. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra AcMA17_43Q.

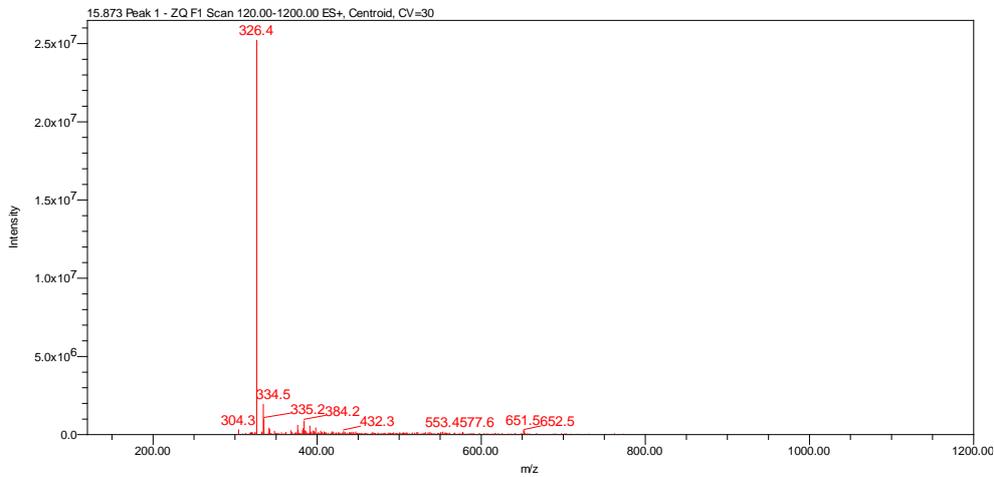


Figura 400. Cromatograma da amostra AcMA17_43Q por HPLC-ELSD.

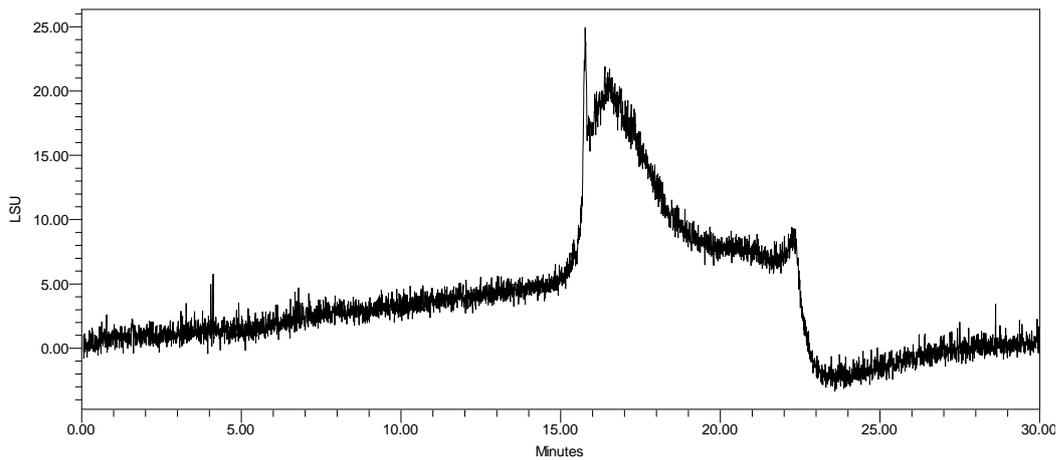


Figura 401. Cromatograma da amostra AcMA17_43R por HPLC-DAD monitorado em 300 nm.

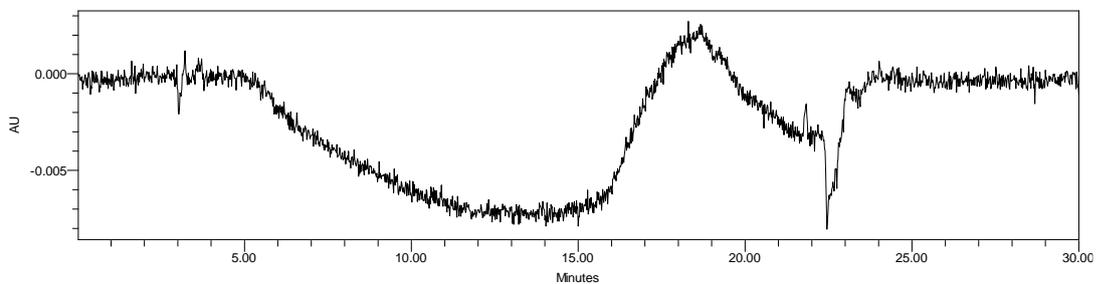


Figura 402. Cromatograma de íons totais da amostra AcMA17_43R por HPLC-MS.

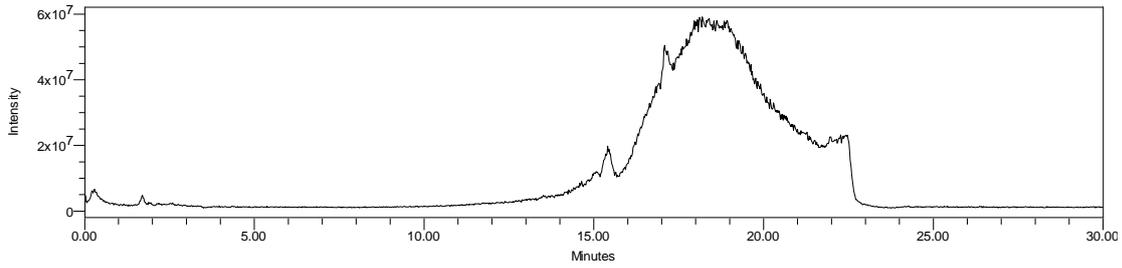


Figura 403. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra AcMA17_43R.

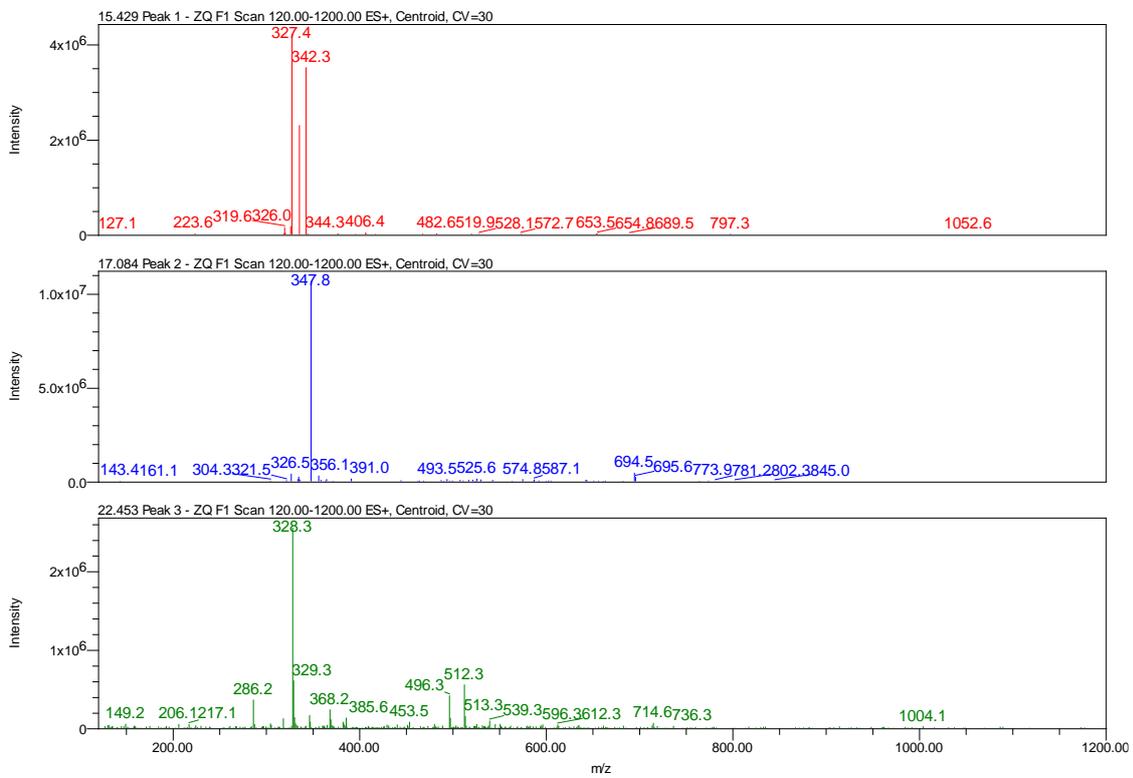


Figura 404. Cromatograma da amostra AcMA17_43R por HPLC-ELSD.

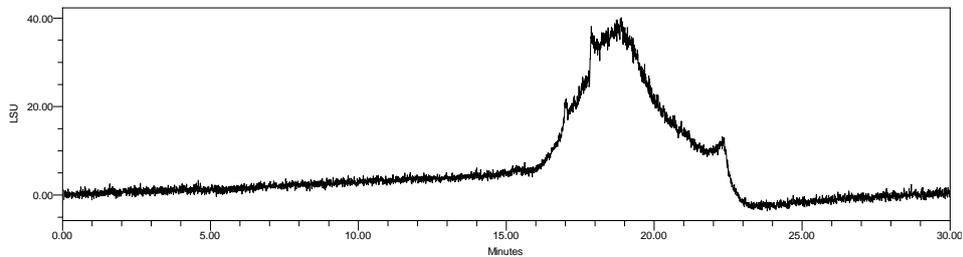


Figura 405. Cromatograma da amostra AcMA17_43S por HPLC-DAD monitorado em 285 nm.

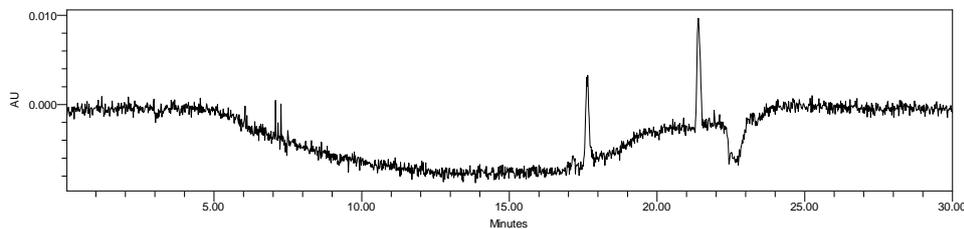


Figura 406. Cromatograma de íons totais da amostra AcMA17_43S por HPLC-MS.

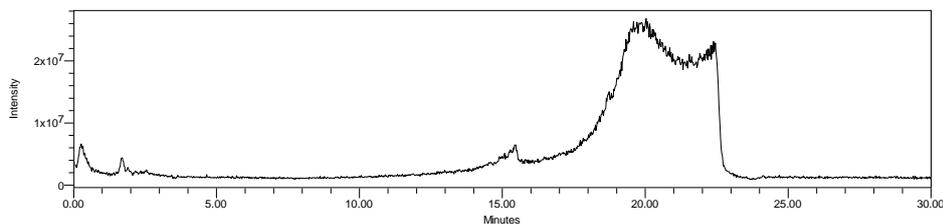


Figura 407. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra AcMA17_43S.

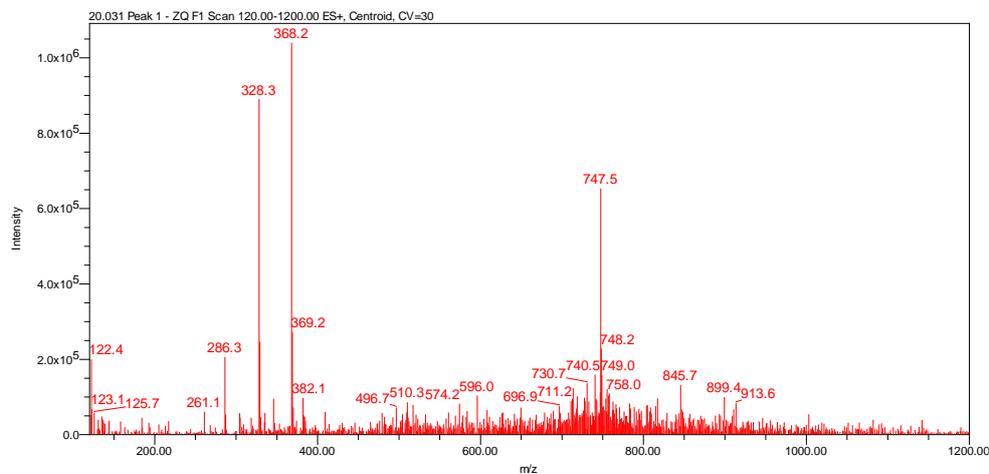


Figura 408. Cromatograma de íons totais da amostra AcMA17_43S por HPLC-MS modo negativo de ionização.

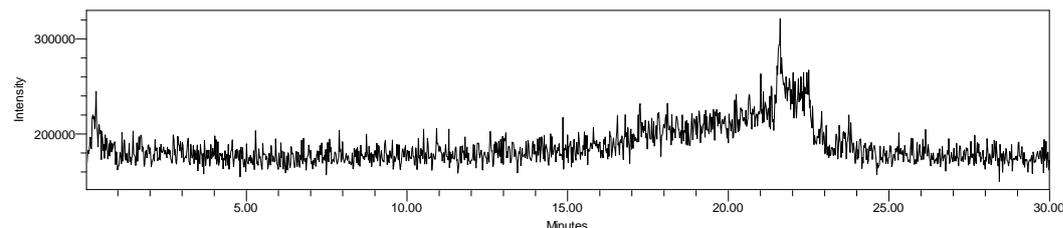


Figura 409. Espectro de ESI-MS em modo negativo de ionização da amostra AcMA17_43S.

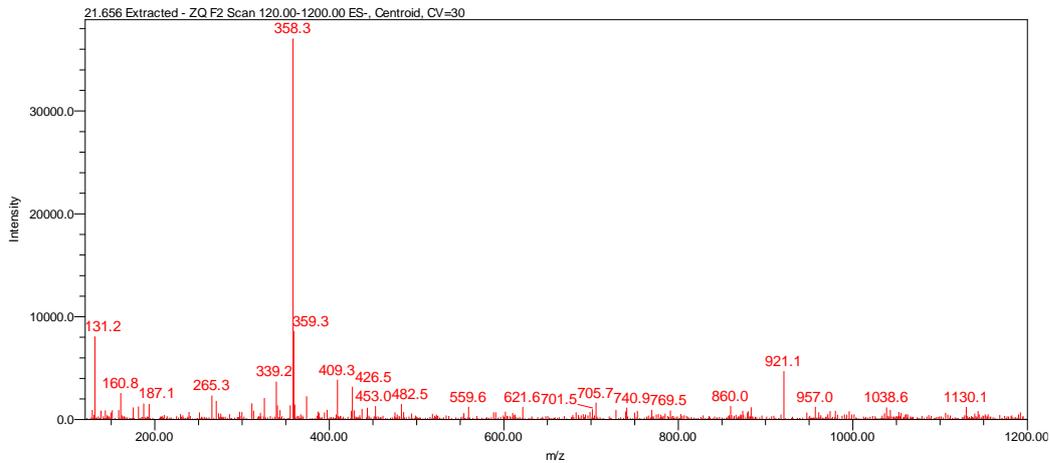


Figura 410. Cromatograma da amostra AcMA17_43S por HPLC-ELSD.

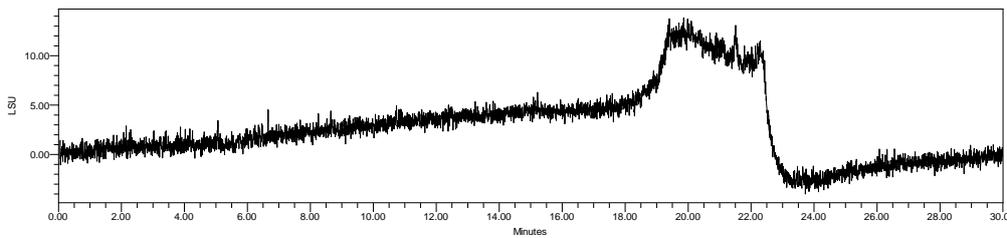


Figura 411. Cromatograma da amostra AcMA17_43T por HPLC-DAD monitorado em 285 nm.

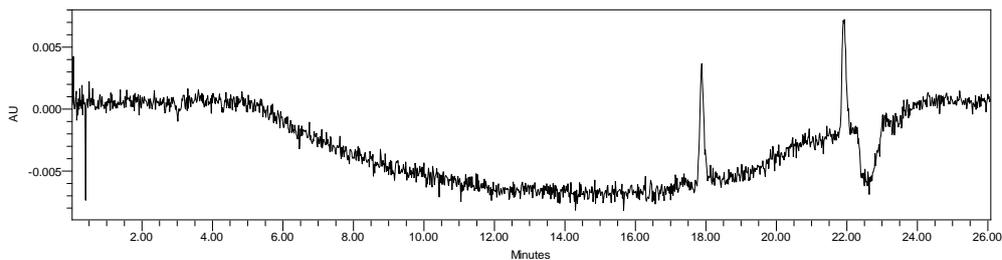


Figura 412. Cromatograma de íons totais da amostra AcMA17_43T por HPLC-MS.

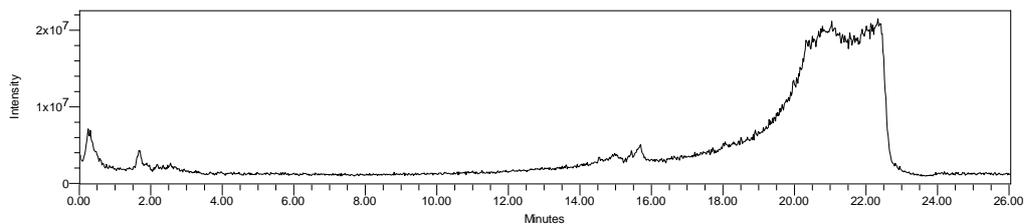


Figura 413. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra AcMA17_43T.

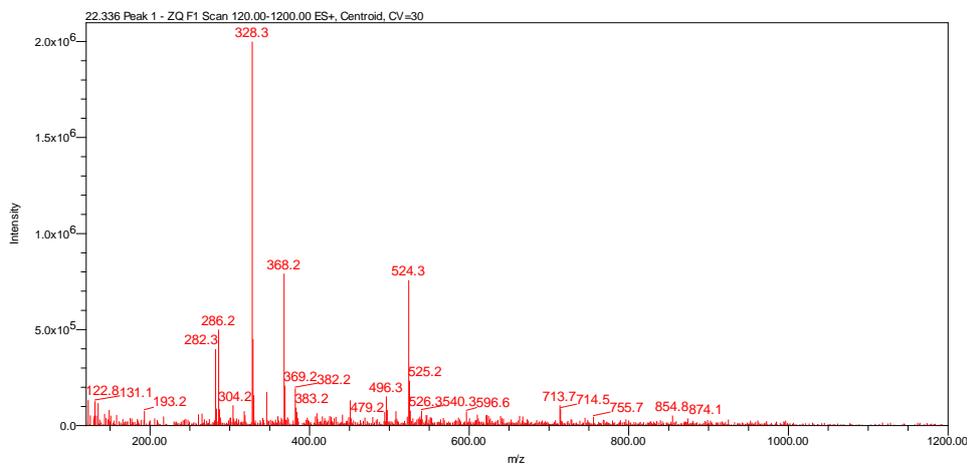


Figura 414. Cromatograma da amostra AcMA17_43T por HPLC-ELSD.

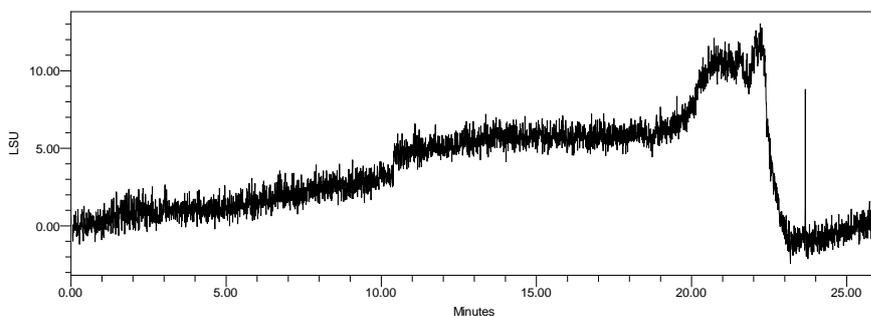


Figura 415. Cromatograma de íons totais da amostra AcMA17_43S por HPLC-MS modo negativo de ionização.

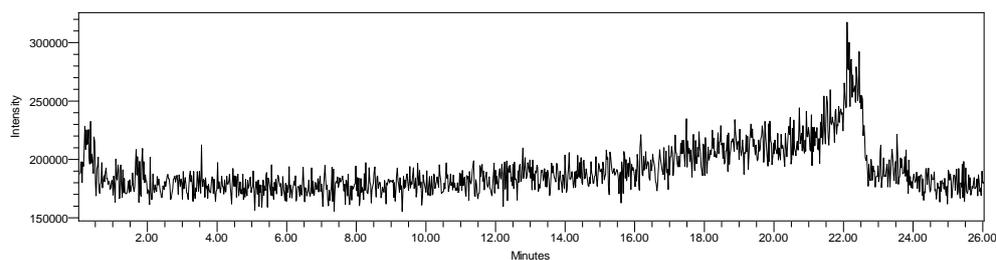
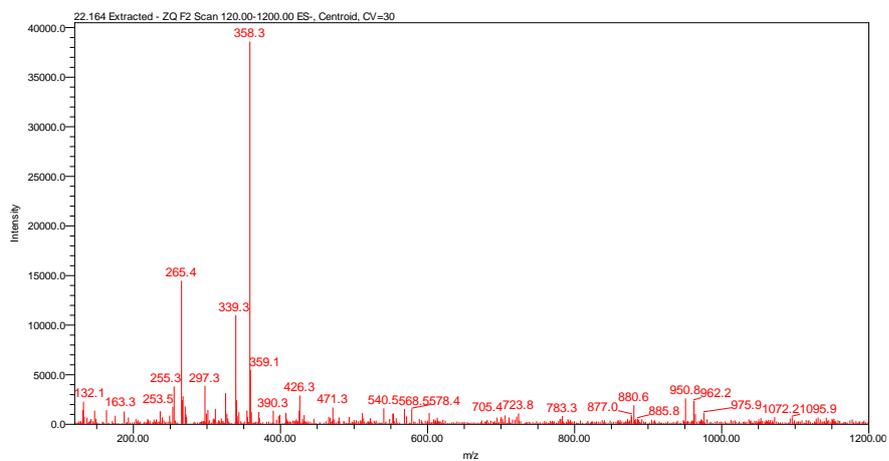


Figura 416. Espectro de ESI-MS em modo negativo de ionização da amostra AcMA17_43S.



Anexo E: Caracterização por HPLC-ELSD-UV-MS das frações de AcMa43_M e do catalogo dos compostos batzelladínicos minoritários acumulados.

Figura 417. Cromatograma de íons totais da amostra AcMA17_43M por HPLC-MS. Condição: Gradiente exploratório, coluna X-Terra RP18, gradiente de 10 até 100% orgânico em 20 minutos.

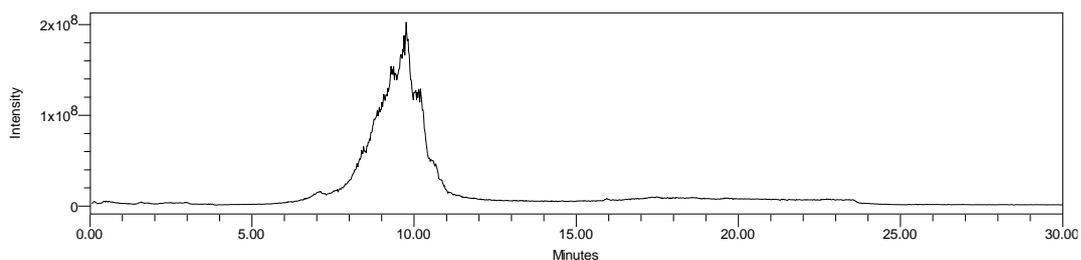


Figura 418. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra AcMA17_43M.

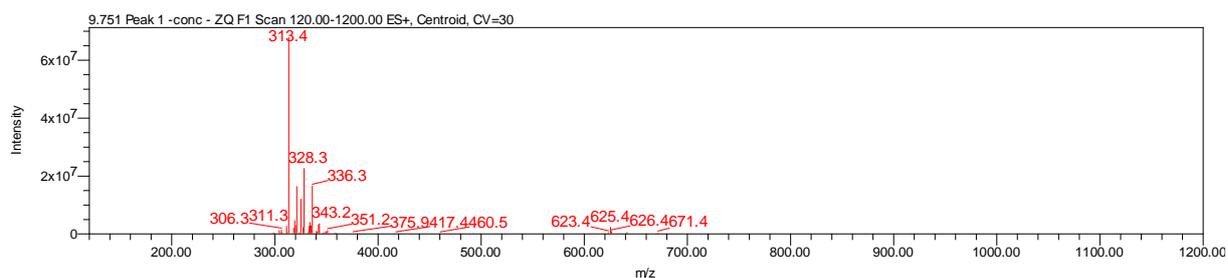


Figura 419. Cromatograma de íons totais da amostra 43M_A por HPLC-MS. Condição: Gradiente exploratório, coluna X-Terra RP18, gradiente de 10 até 100% orgânico em 20 minutos.

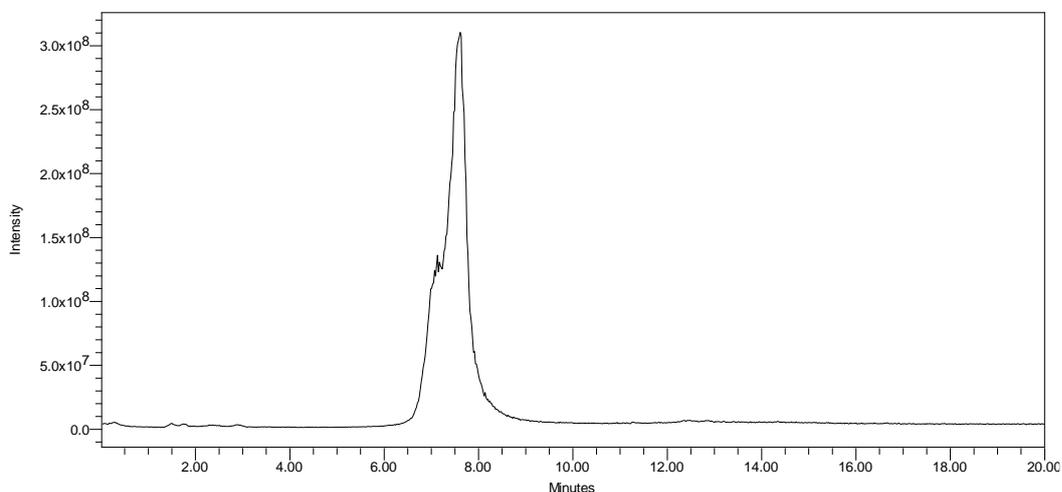


Figura 420. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra 43M_A.

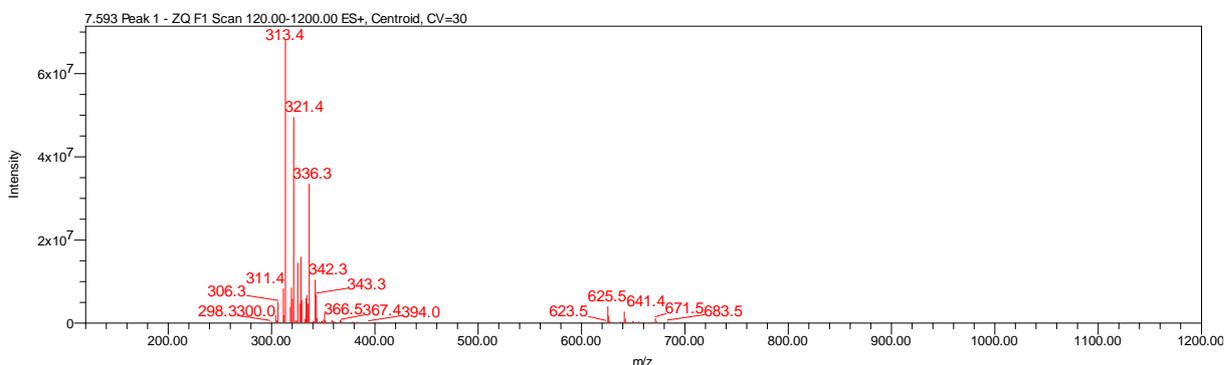


Figura 421. Cromatograma de íons totais da amostra 43M_B por HPLC-MS. Condição: Gradiente exploratório, coluna X-Terra RP18, gradiente de 10 até 100% orgânico em 20 minutos.

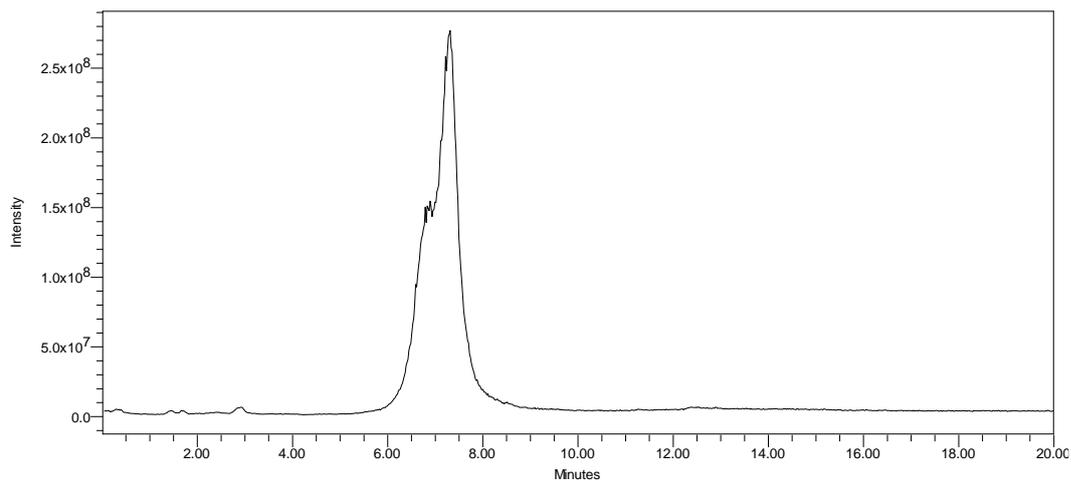


Figura 422. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra 43M_B.

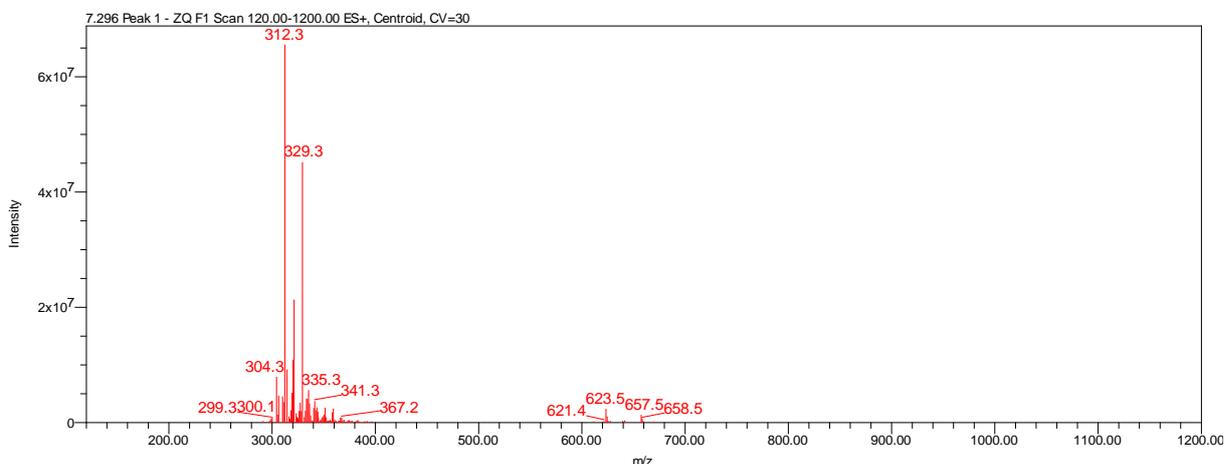


Figura 423. Cromatograma de íons totais da amostra 43M_C por HPLC-MS. Condição: Gradiente exploratório, coluna X-Terra RP18, gradiente de 10 até 100% orgânico em 20 minutos.

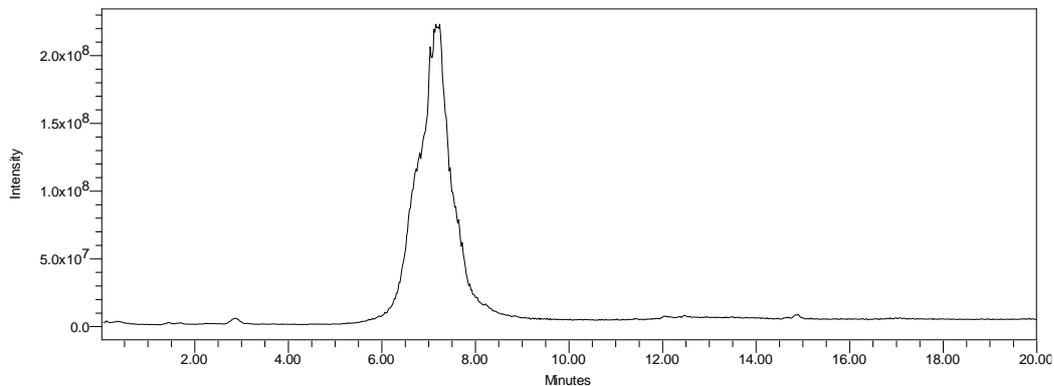


Figura 424. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra 43M_C.

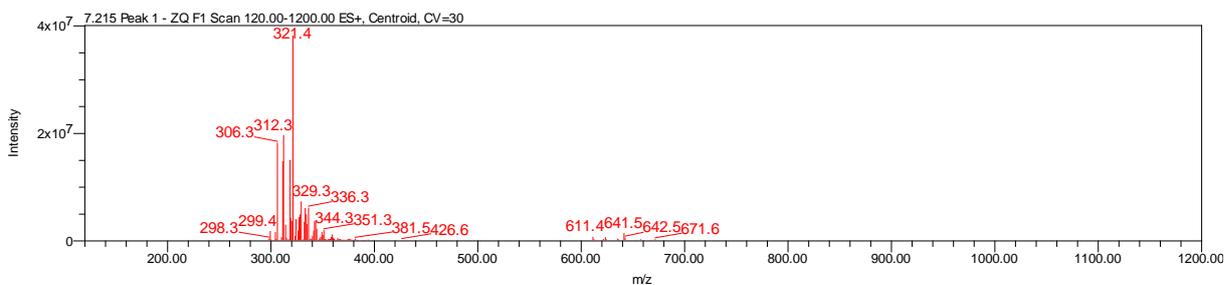


Figura 425. Cromatograma de íons totais da amostra 43M_D por HPLC-MS. Condição: Gradiente exploratório, coluna X-Terra RP18, gradiente de 10 até 100% orgânico em 20 minutos.

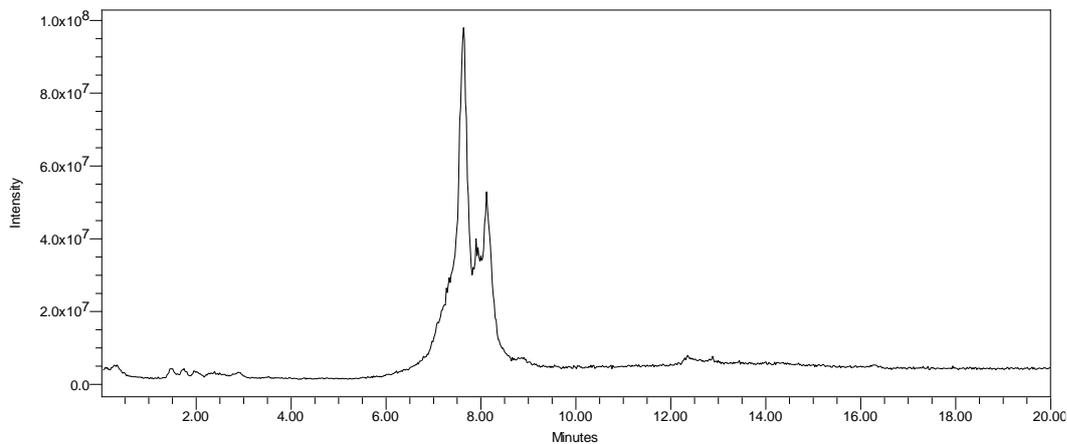


Figura 426. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra 43M_D.

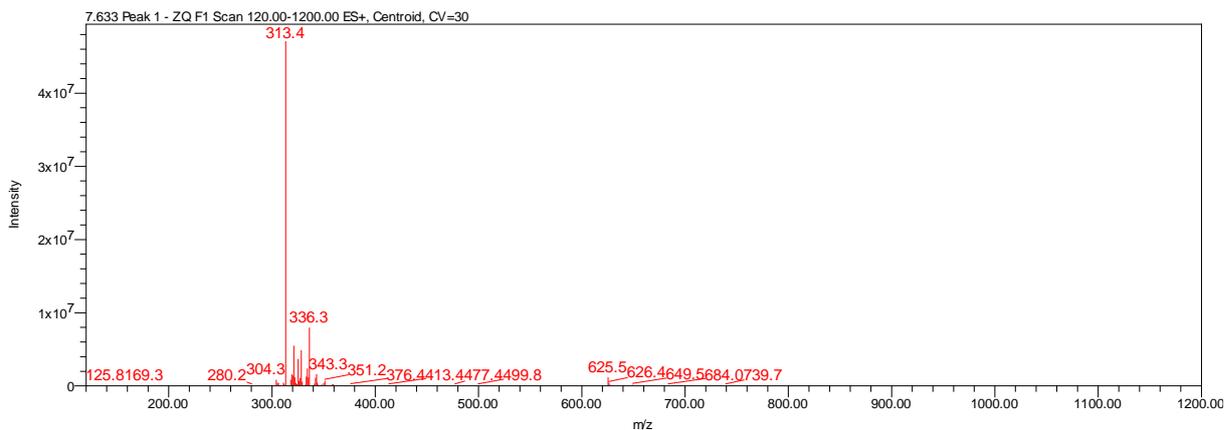


Figura 427. Cromatograma de íons totais da amostra 43M_A por HPLC-MS. Condição: Gradiente B.

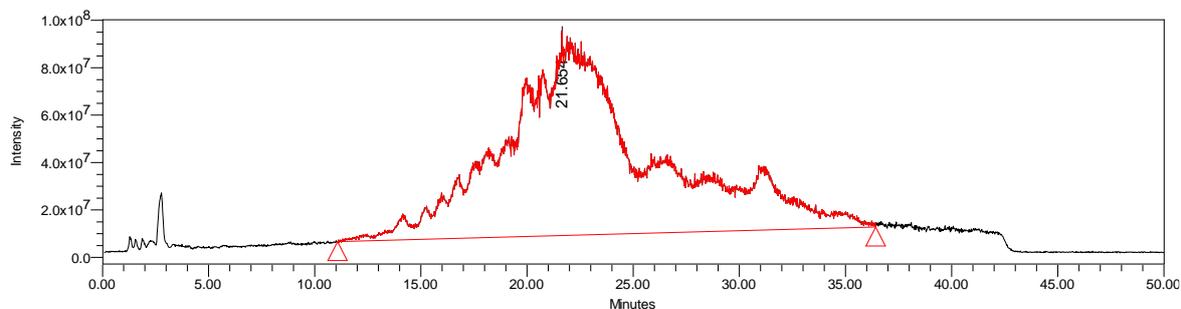


Figura 428. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra 43M_A.

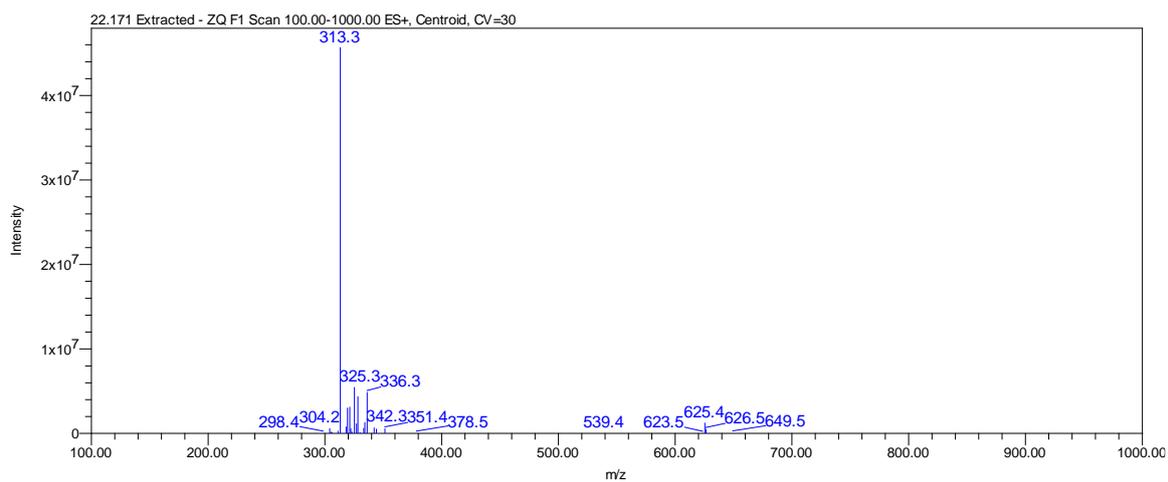


Figura 429. Cromatograma de íons totais da amostra 43M_B por HPLC-MS. Condição: Gradiente B.

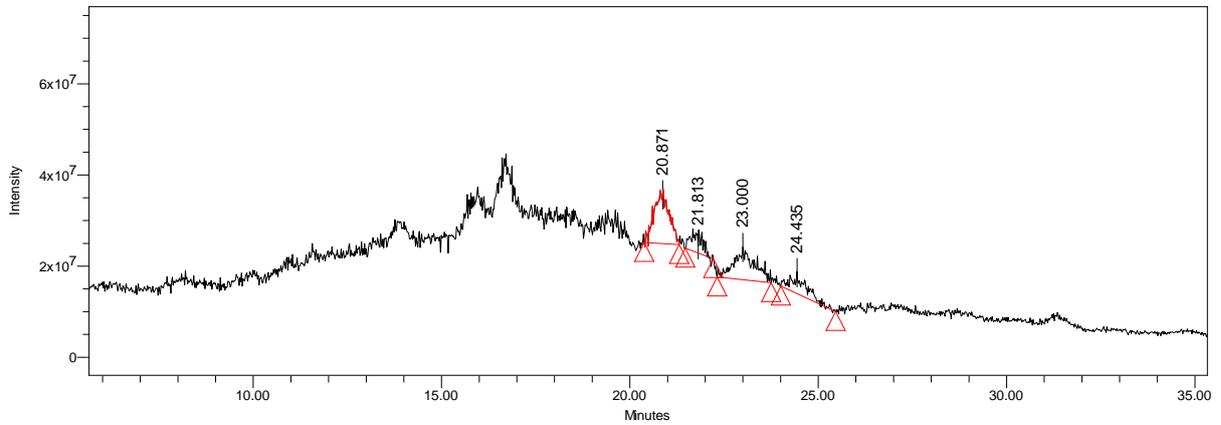


Figura 430. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra AcMA17_43M.

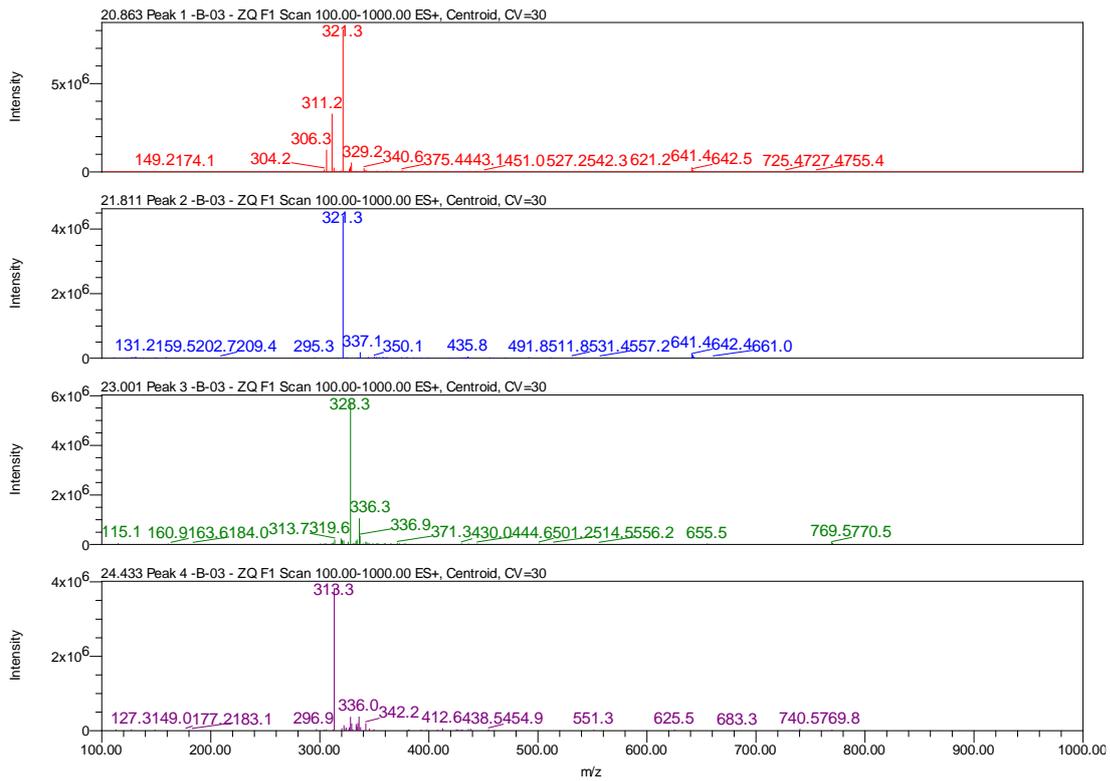


Figura 431. Cromatograma de íons totais da amostra 43M_B por HPLC-MS. Condição: Gradiente B.

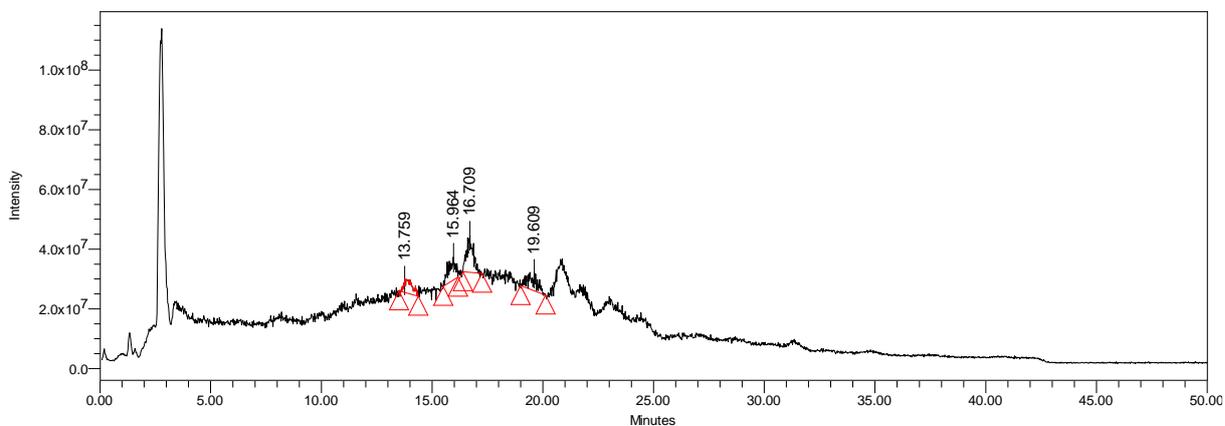


Figura 432. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra AcMA17_43M.

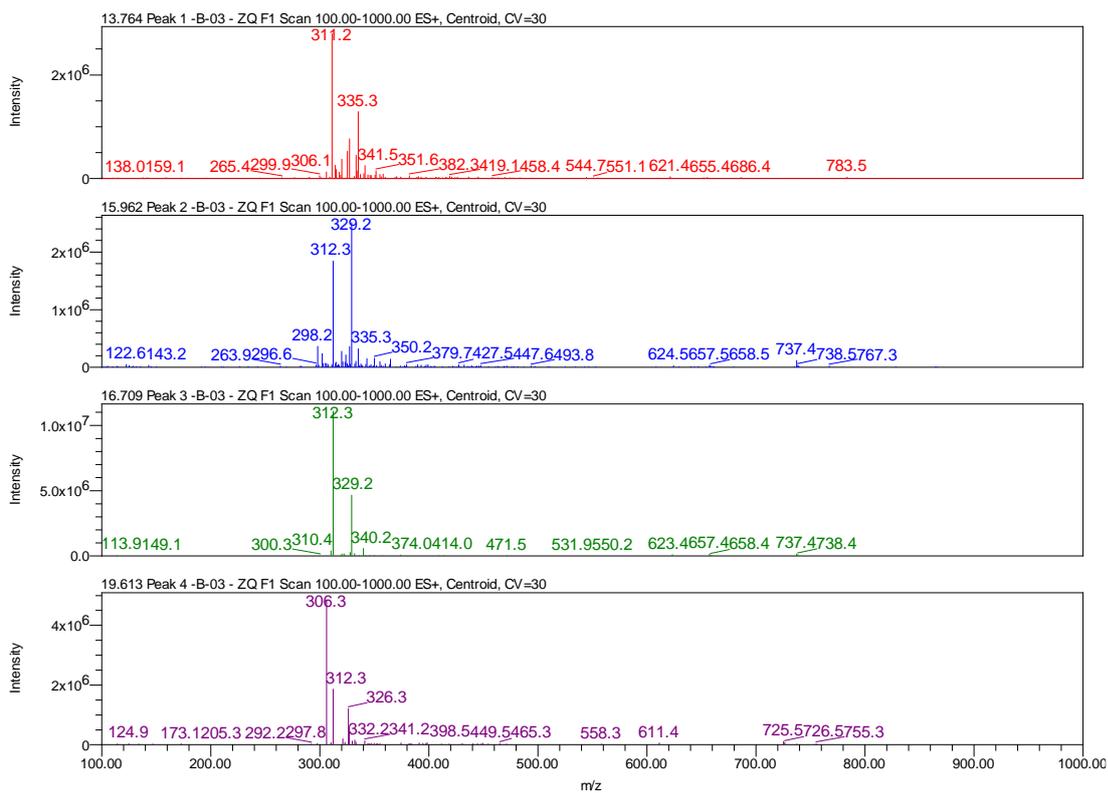


Figura 433. Cromatograma de íons totais da amostra 43M_C por HPLC-MS. Condição: Gradiente B.

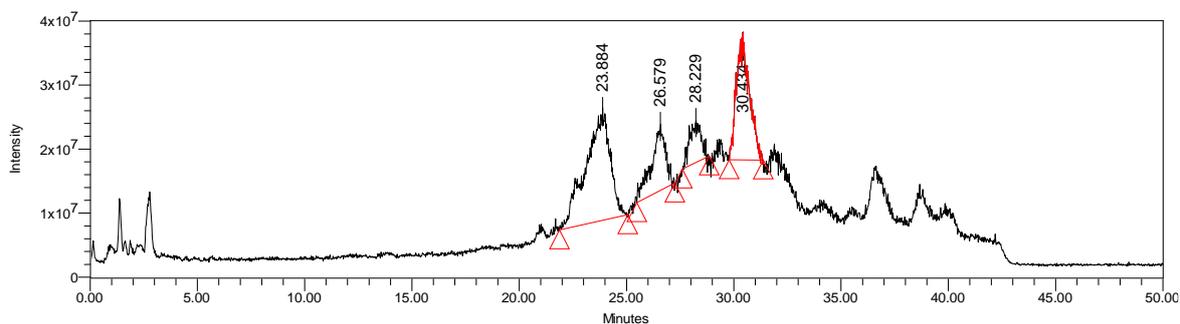


Figura 434. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra 43M_C.

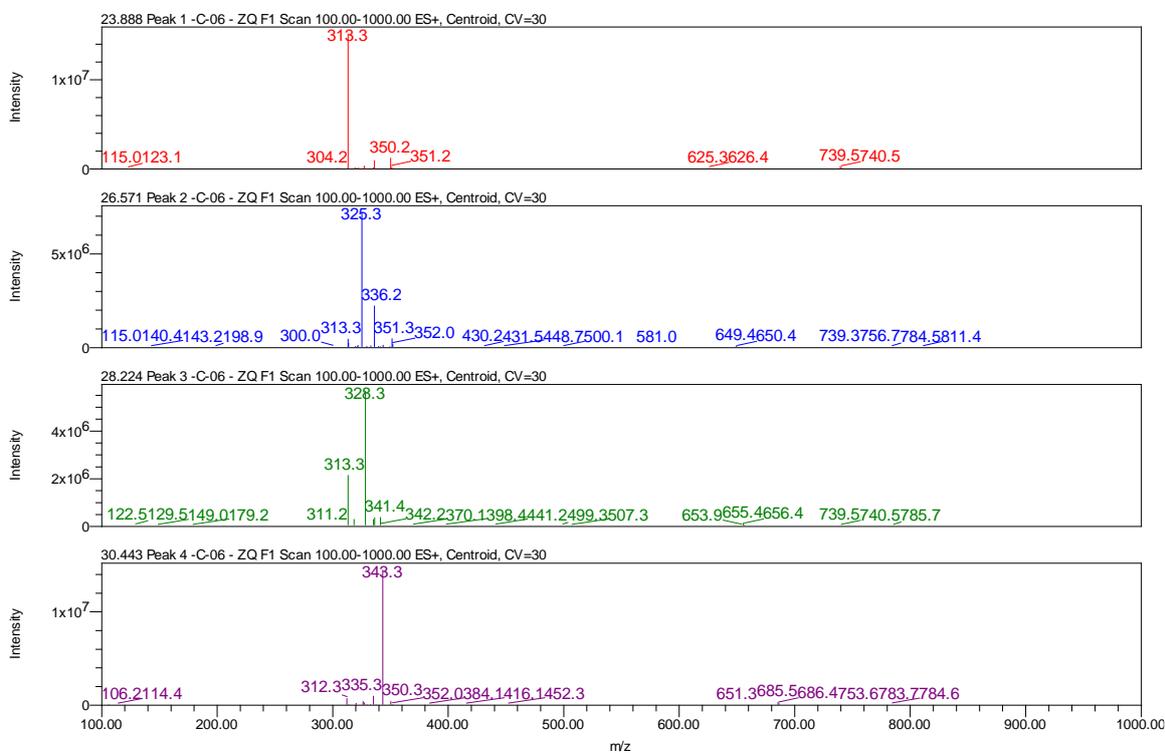


Figura 435. Cromatograma de íons totais da amostra 43M_D por HPLC-MS. Condição: Gradiente B.

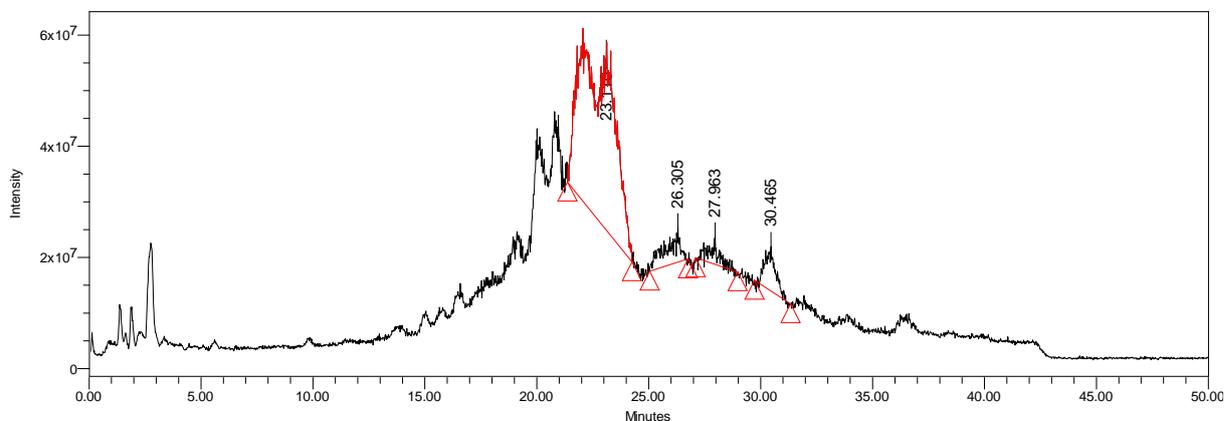


Figura 436. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra 43M_D.

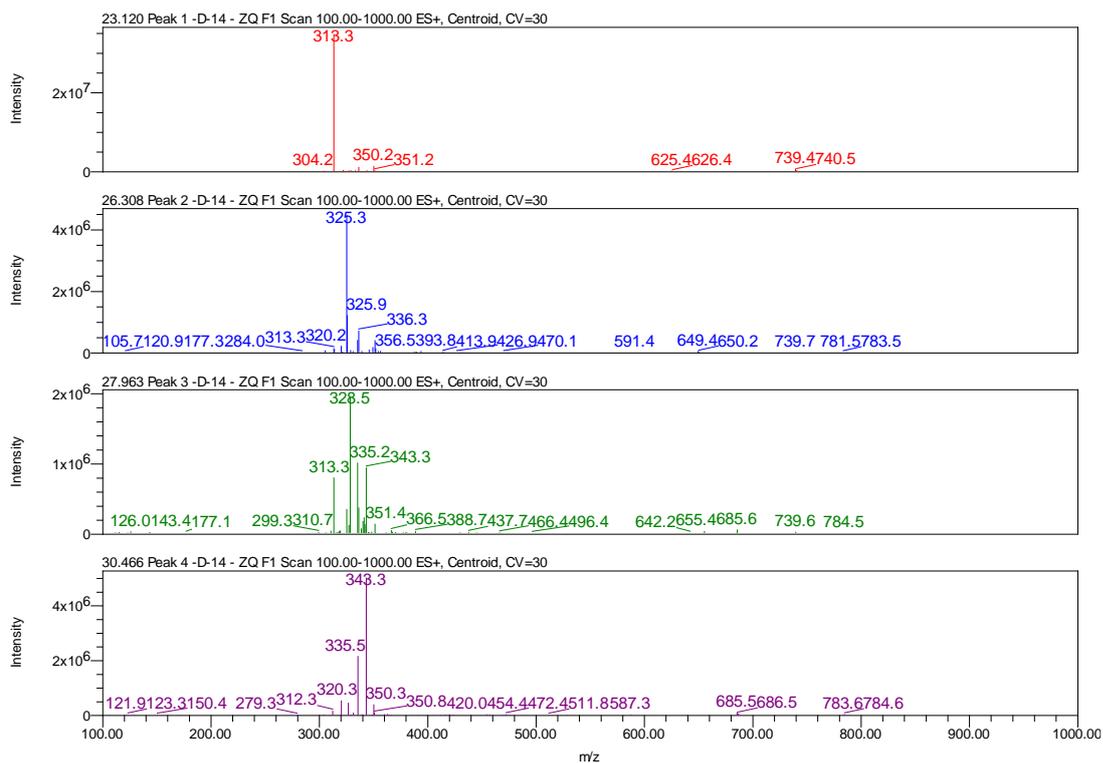


Figura 437. Cromatograma de íons totais da amostra 43M_D por HPLC-MS. Condição: Gradiente B.

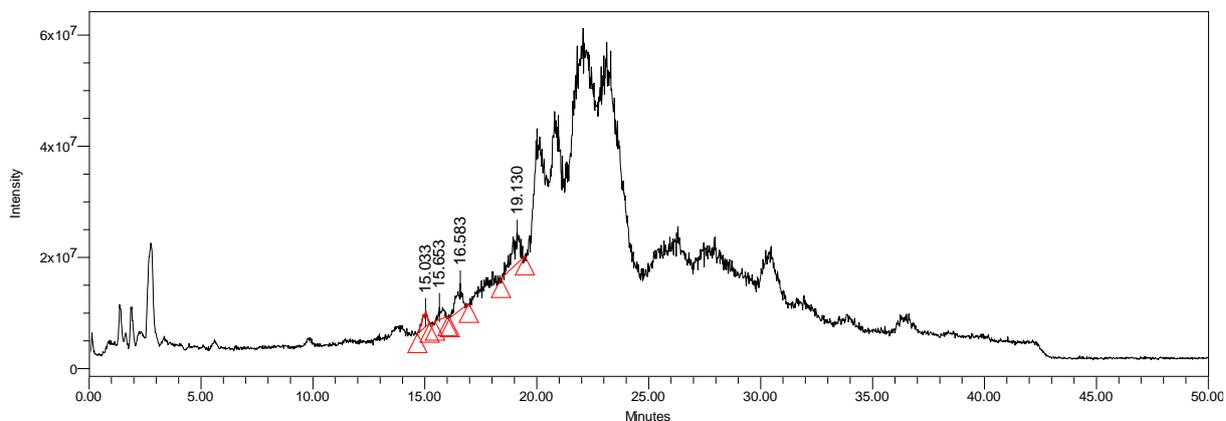


Figura 438. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra 43M_D.

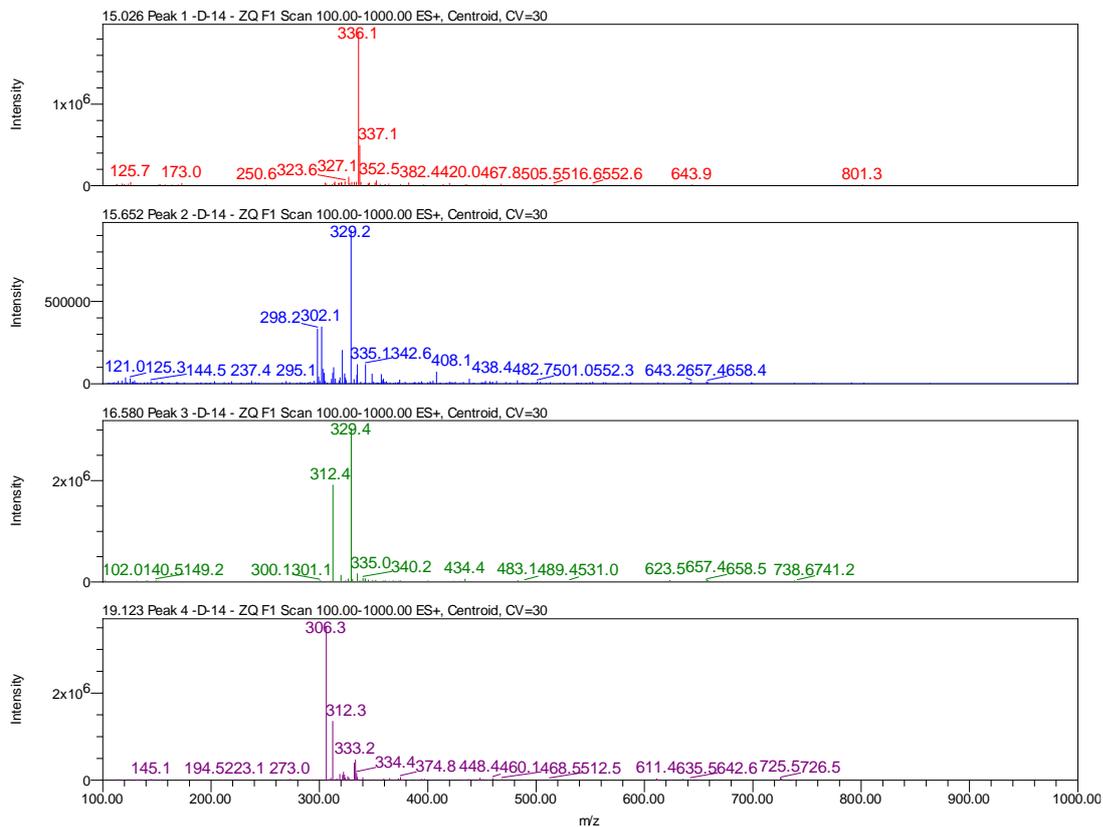


Figura 439. Cromatograma de íons totais da amostra 335_Fonte por HPLC-MS. Condição: coluna X-Terra RP18, gradiente de 30 até 100% orgânico em 9 minutos.

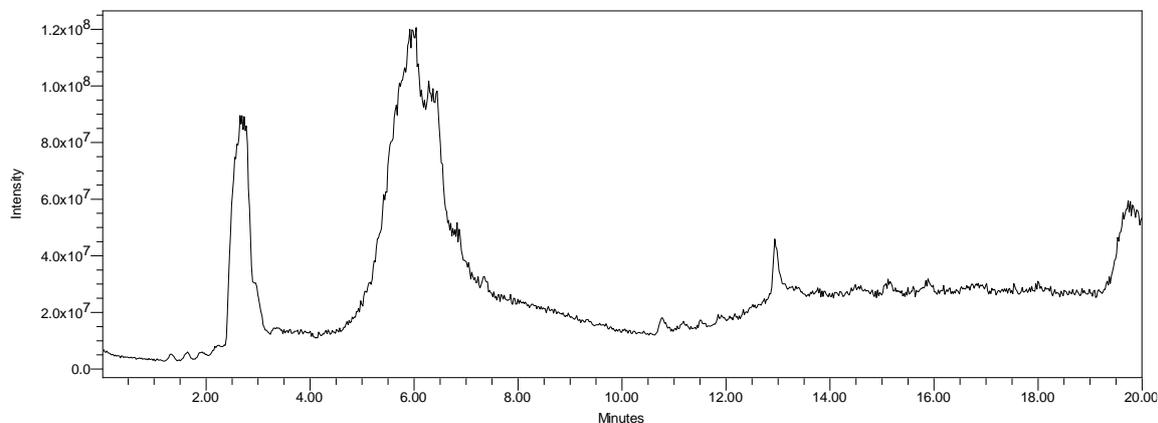


Figura 440. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra 335_Fonte.

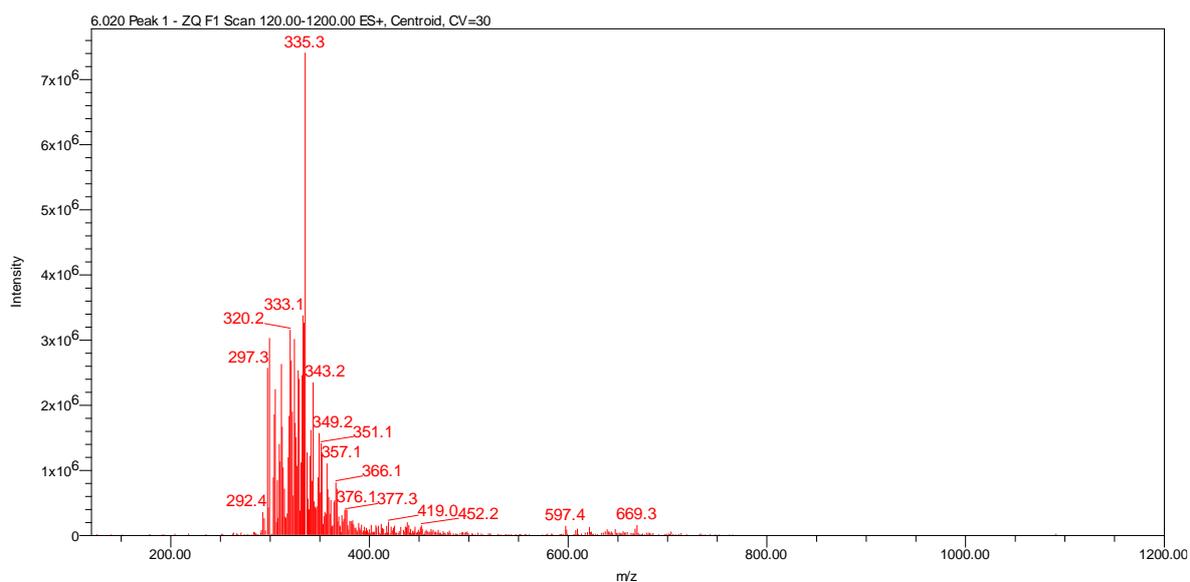


Figura 441. Cromatograma de íons totais da amostra 335_PA por HPLC-MS. Condição: coluna X-Terra RP18, gradiente de 30 até 100% orgânico em 9 minutos.

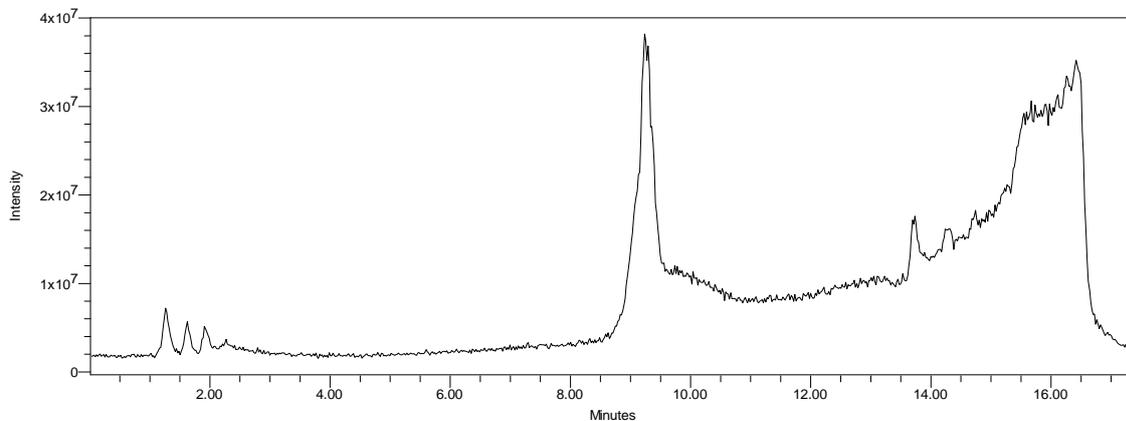


Figura 442. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra 335_PA.

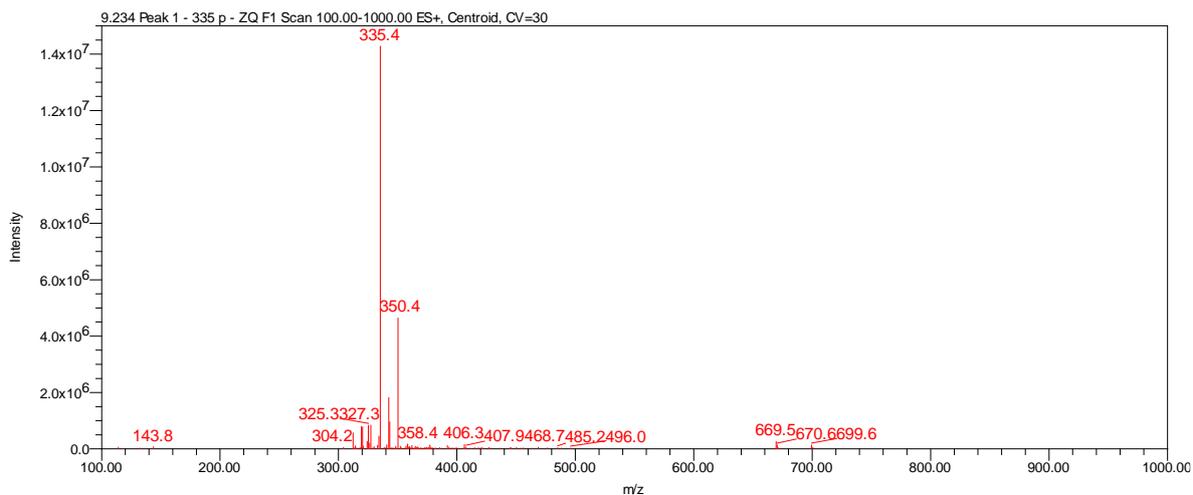


Figura 443. Cromatograma de íons totais da amostra 321_Fonte por HPLC-MS. Condição: coluna X-Terra RP18, gradiente de 30 até 100% orgânico em 9 minutos.

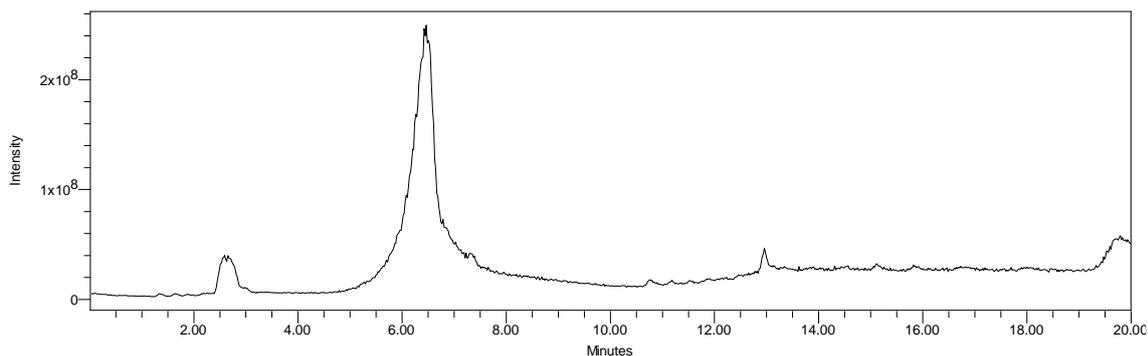


Figura 444. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra 43M_D.

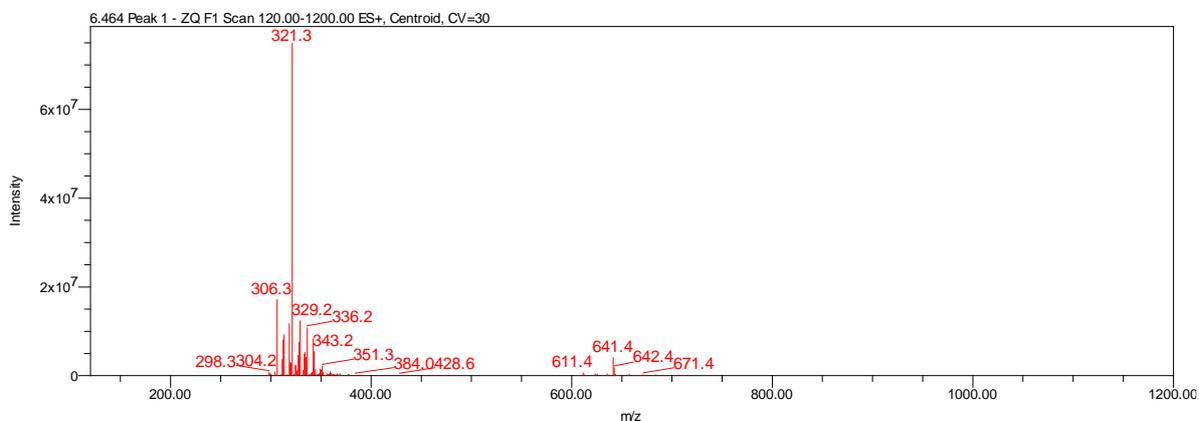


Figura 445. Cromatograma de íons totais da amostra 321_PuroA por HPLC-MS. Condição: coluna X-Terra RP18, gradiente de 30 até 100% orgânico em 9 minutos.

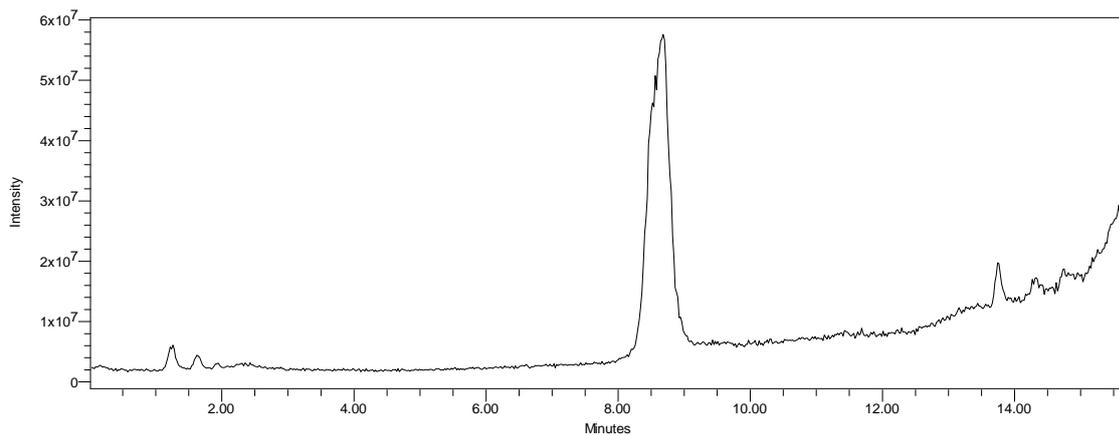


Figura 446. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra 321_PuroA.

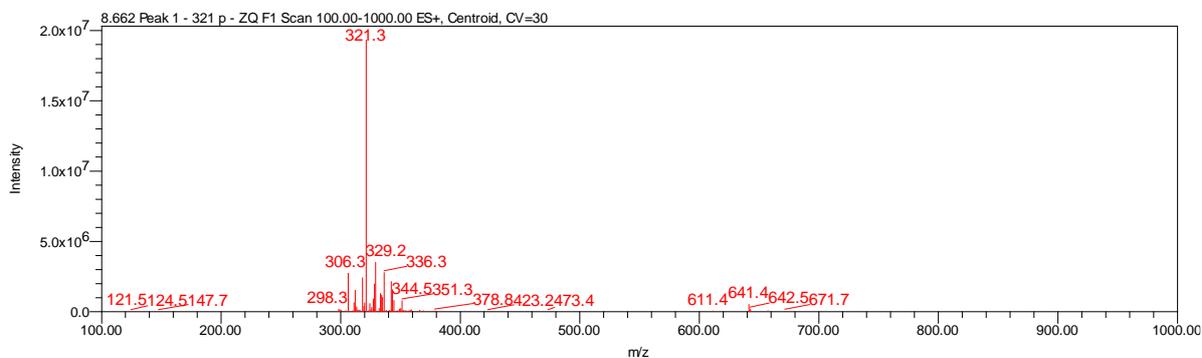


Figura 447. Cromatograma de íons totais da amostra 312_Fonte por HPLC-MS. Condição: coluna X-Terra RP18, gradiente de 30 até 100% orgânico em 9 minutos.

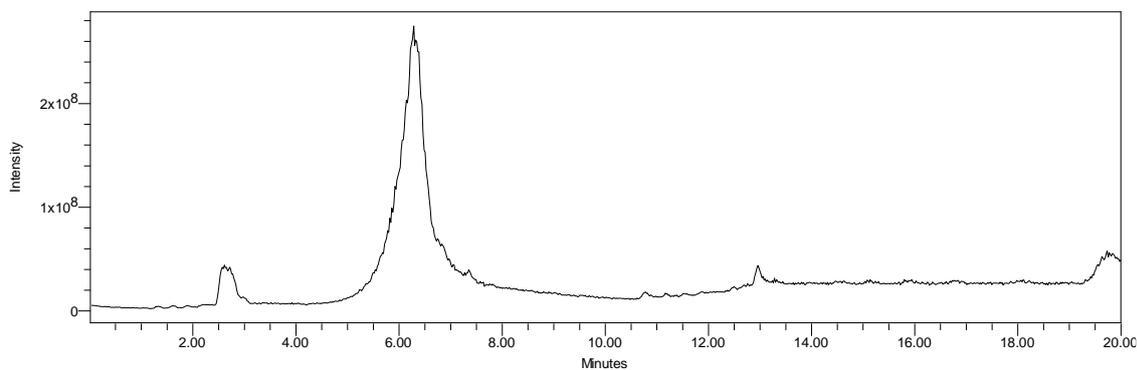


Figura 448. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra 312_Fonte.

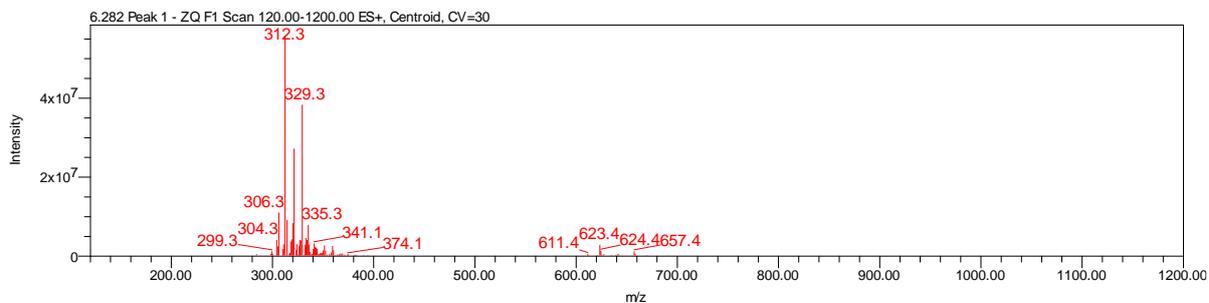


Figura 449. Cromatograma de íons totais da amostra 312_PuroA por HPLC-MS. Condição: coluna X-Terra RP18, gradiente de 30 até 100% orgânico em 9 minutos.

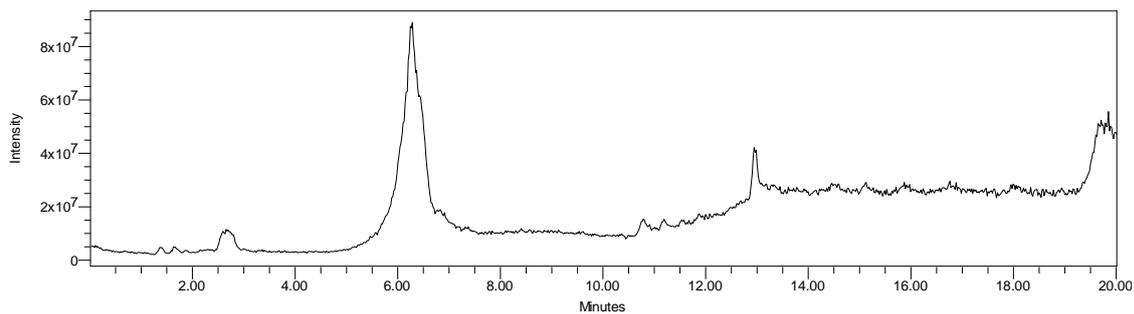


Figura 450. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra 312_PuroA.

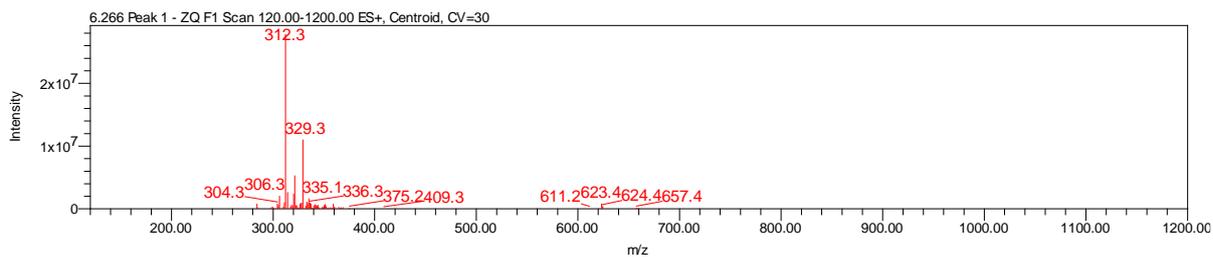


Figura 451. Cromatograma de íons totais da amostra 343_Semipuro por HPLC-MS. Condição: coluna X-Terra RP18, gradiente de 30 até 100% orgânico em 9 minutos.

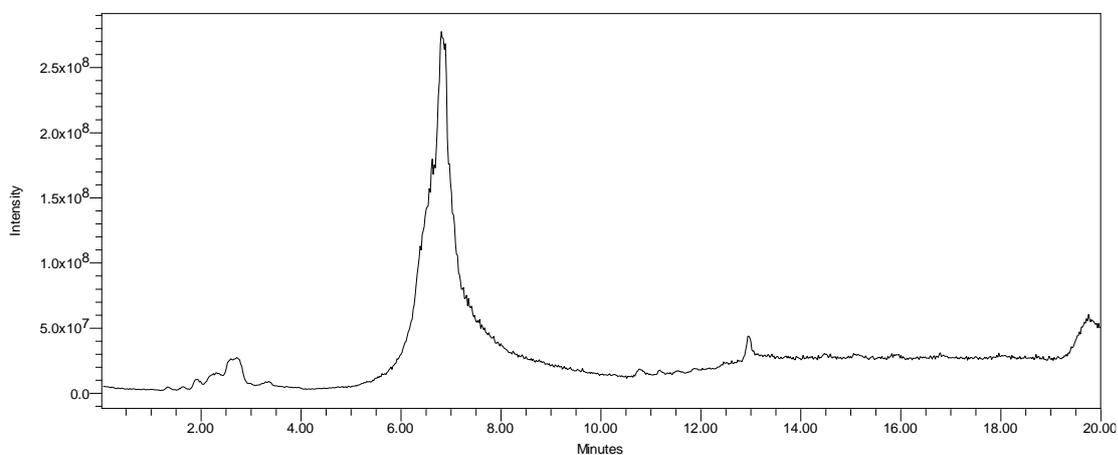


Figura 452. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra 343_Semipuro.

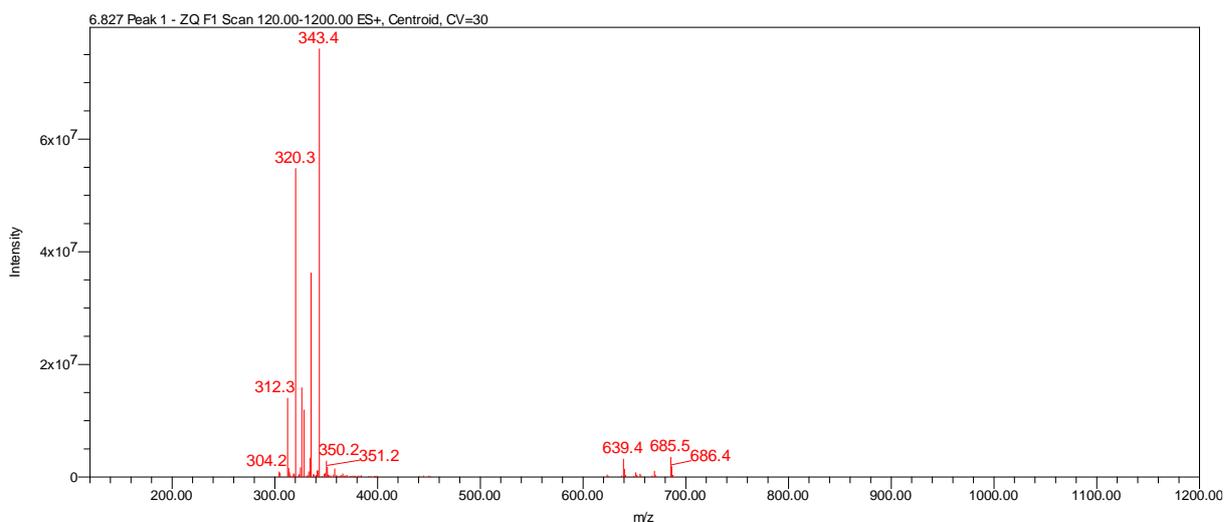


Figura 453. Cromatograma de íons totais da amostra 343_PuroA por HPLC-MS. Condição: coluna X-Terra RP18, gradiente de 30 até 100% orgânico em 9 minutos.

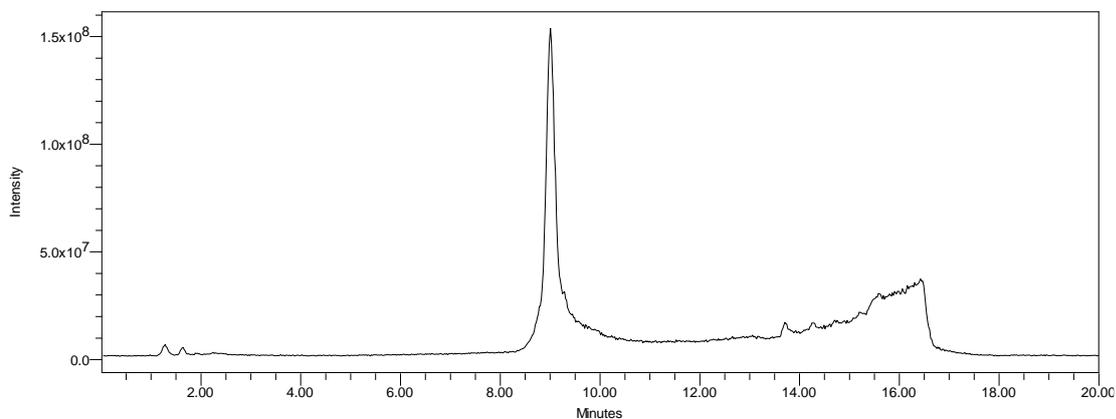


Figura 454. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra 343_PuroA.

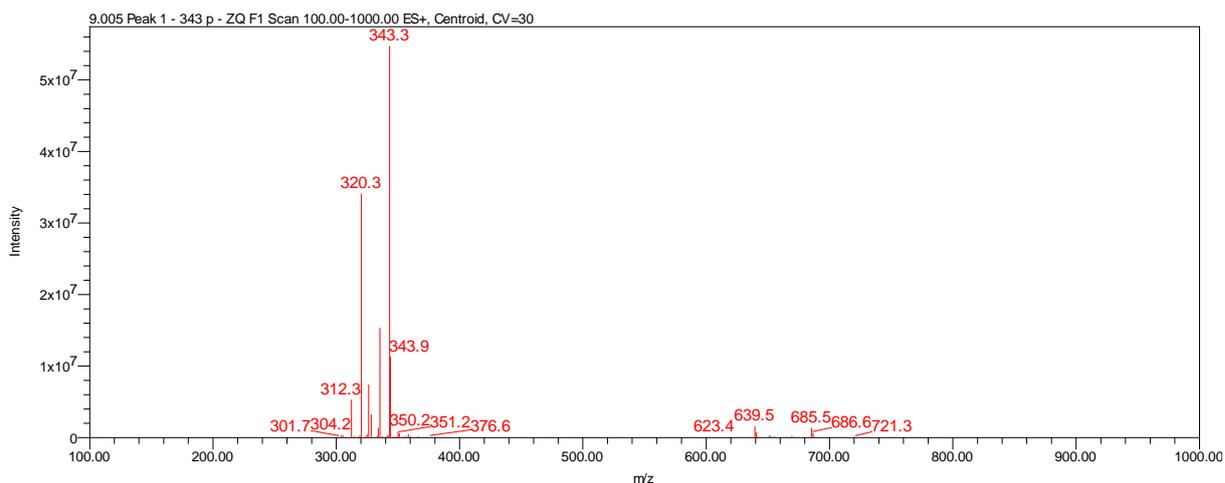


Figura 455. Cromatograma de íons totais da amostra 311_Semipuro por HPLC-MS. Condição: coluna X-Terra RP18, gradiente de 30 até 100% orgânico em 9 minutos.

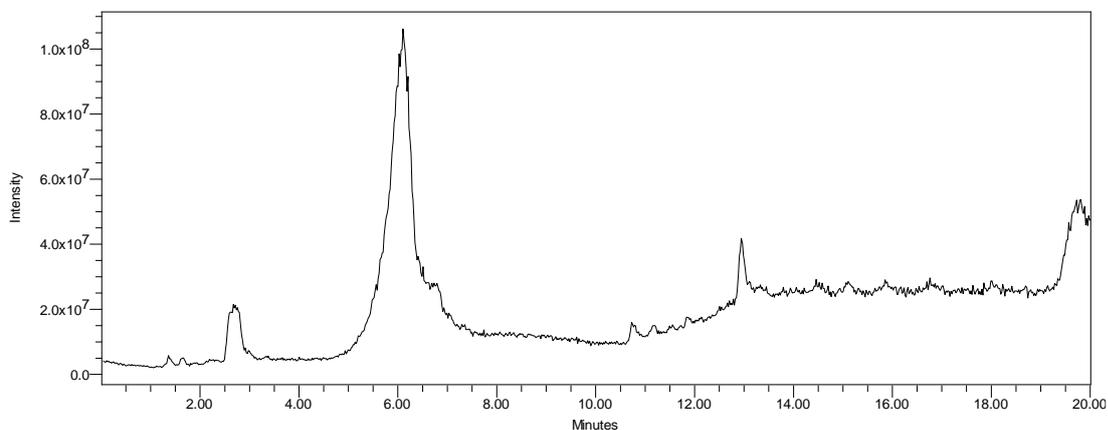


Figura 456. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra 311_Semi-puro.

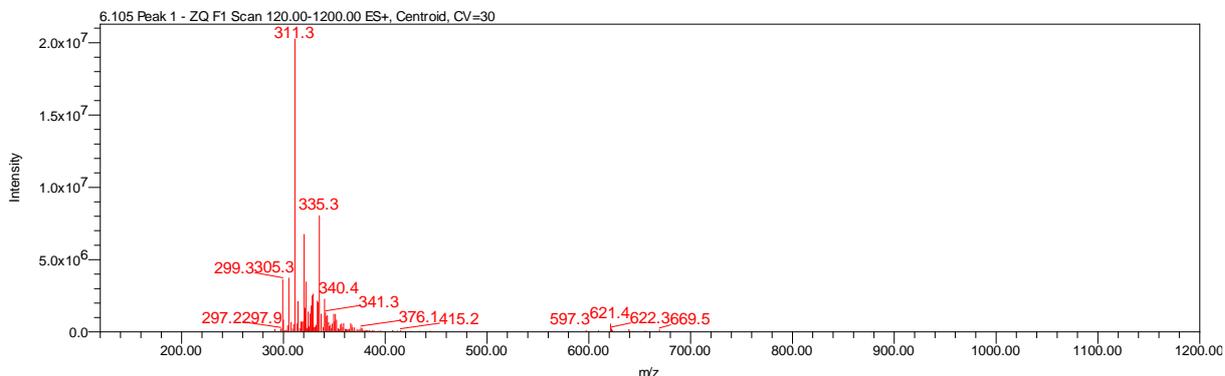


Figura 457. Cromatograma de íons totais da amostra 311_PuroA por HPLC-MS. Condição: coluna X-Terra RP18, gradiente de 30 até 100% orgânico em 9 minutos.

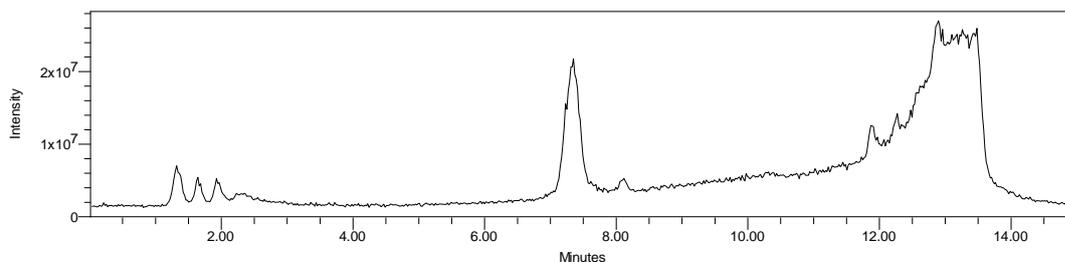


Figura 458. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra 311_PuroA

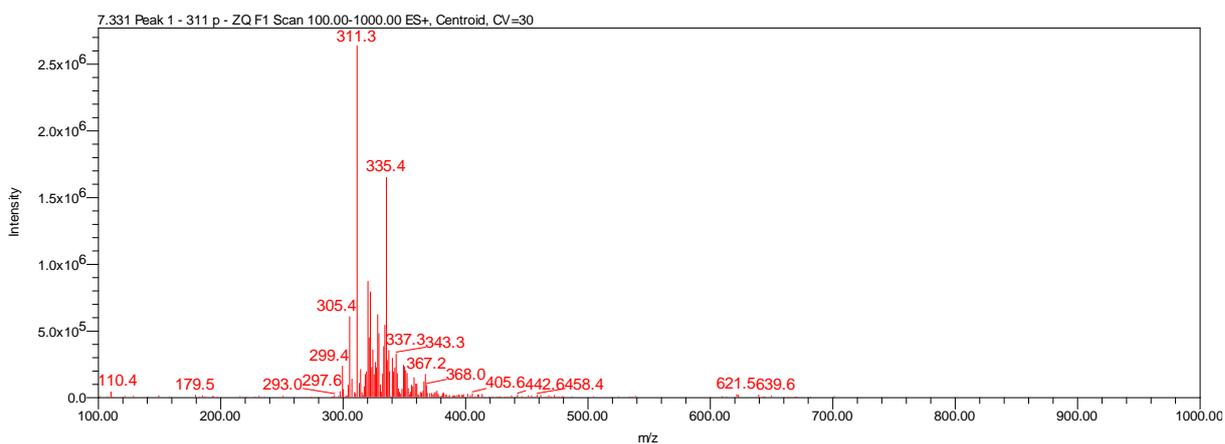


Figura 459. Cromatograma de íons totais da amostra 325_Semipuro por HPLC-MS. Condição: coluna X-Terra RP18, gradiente de 30 até 100% orgânico em 9 minutos.

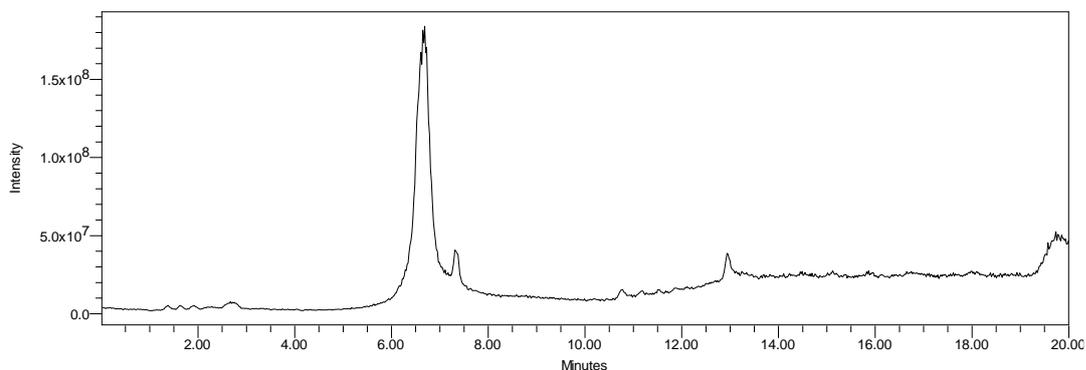


Figura 460. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra 325_Semipuro

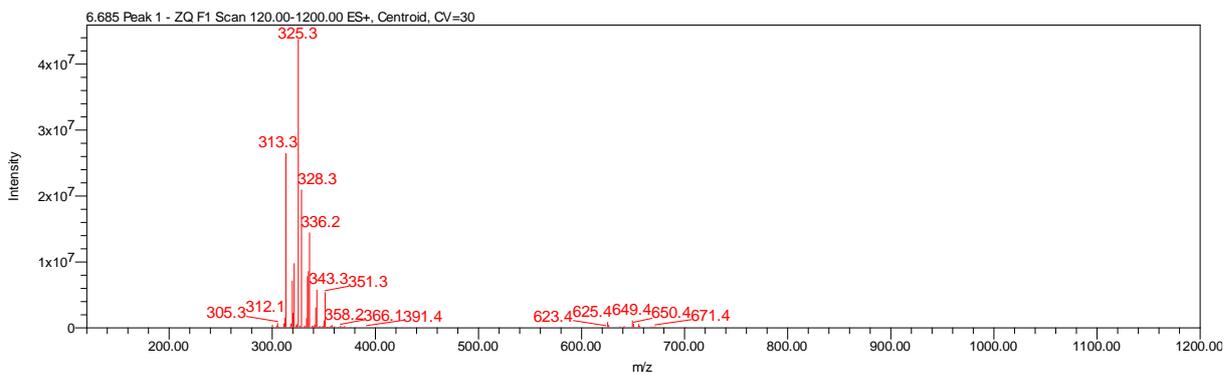


Figura 461. Cromatograma de íons totais da amostra 325_PuroA por HPLC-MS. Condição: coluna X-Terra RP18, gradiente de 30 até 100% orgânico em 9 minutos.

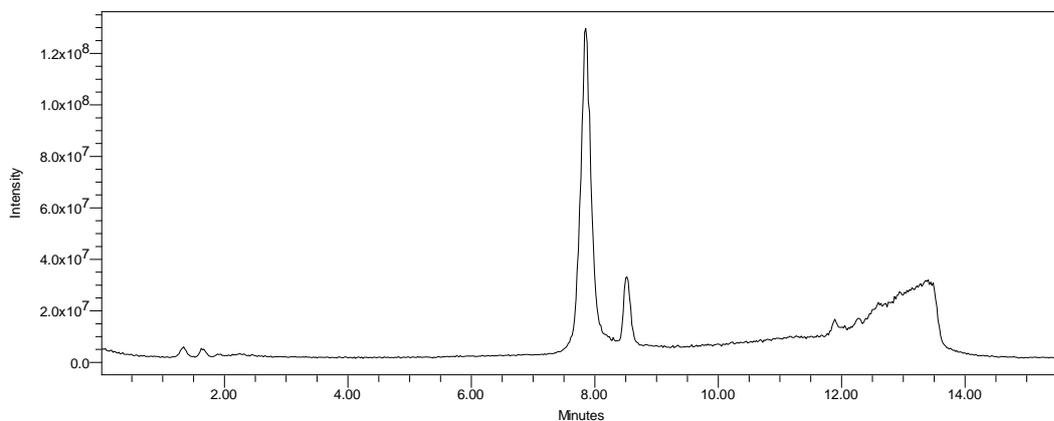


Figura 462. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra 325_PuroA

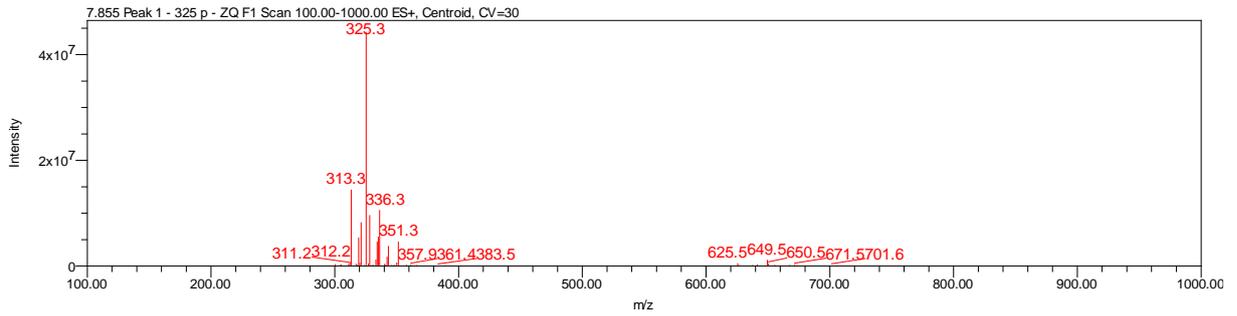


Figura 463. Cromatograma de íons totais da amostra 329_PuroA por HPLC-MS. Condição: coluna X-Terra RP18, gradiente de 30 até 100% orgânico em 9 minutos.

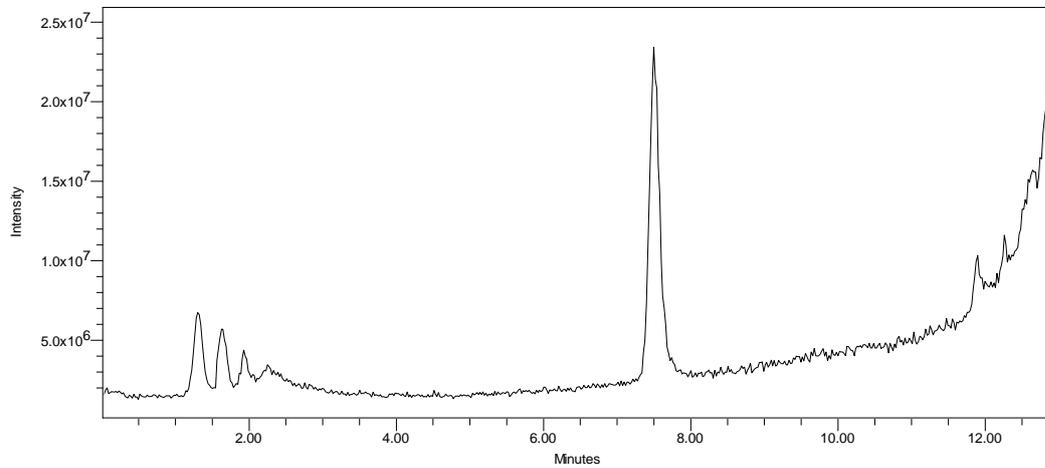


Figura 464. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra 325_PuroA

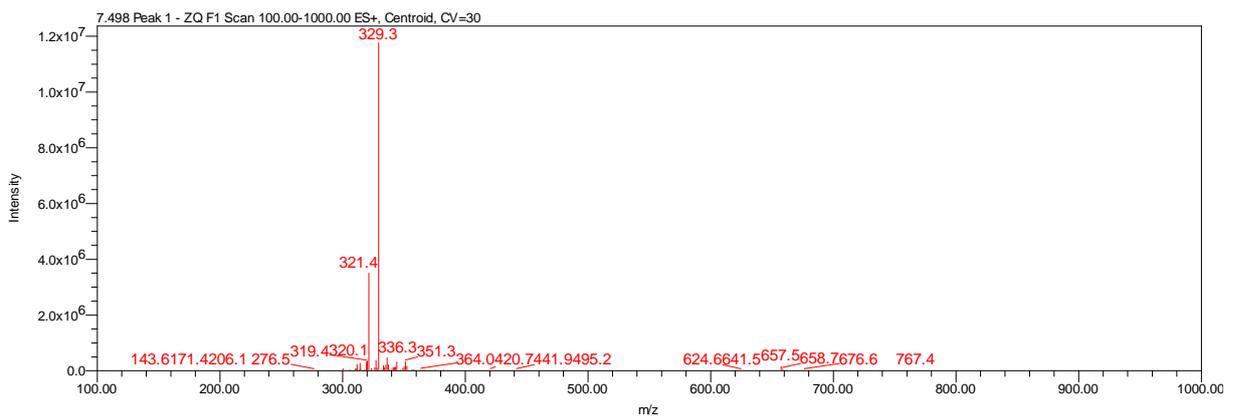


Figura 465. Cromatograma de íons totais da amostra 350_PuroA por HPLC-MS. Condição: coluna X-Terra RP18, gradiente de 30 até 100% orgânico em 9 minutos.

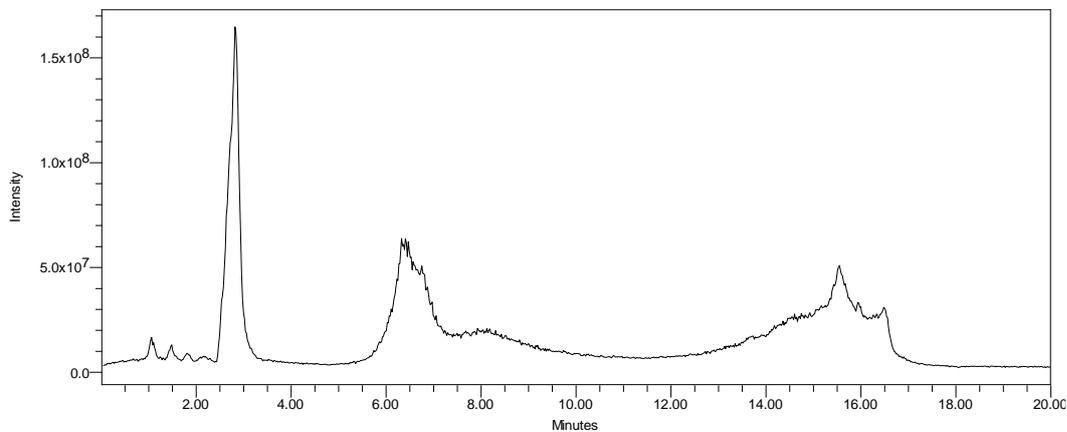


Figura 466. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra 325_PuroA

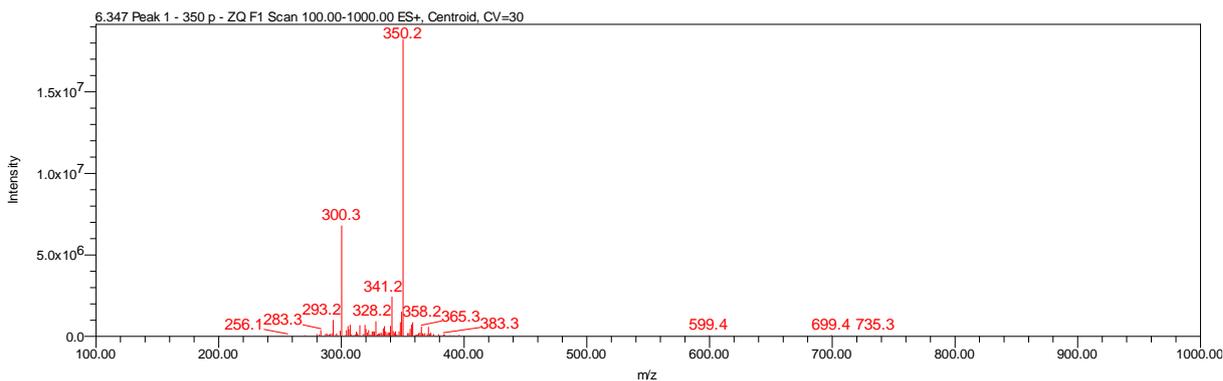


Figura 467. Cromatograma de íons totais da amostra 328_PuroA por HPLC-MS. Condição: coluna X-Terra RP18, gradiente de 30 até 100% orgânico em 9 minutos.

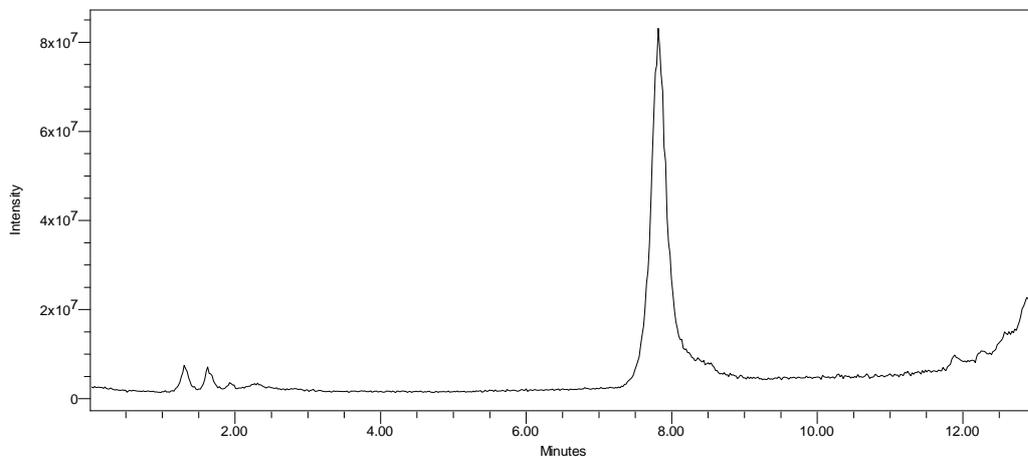


Figura 468. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra 328_PuroA

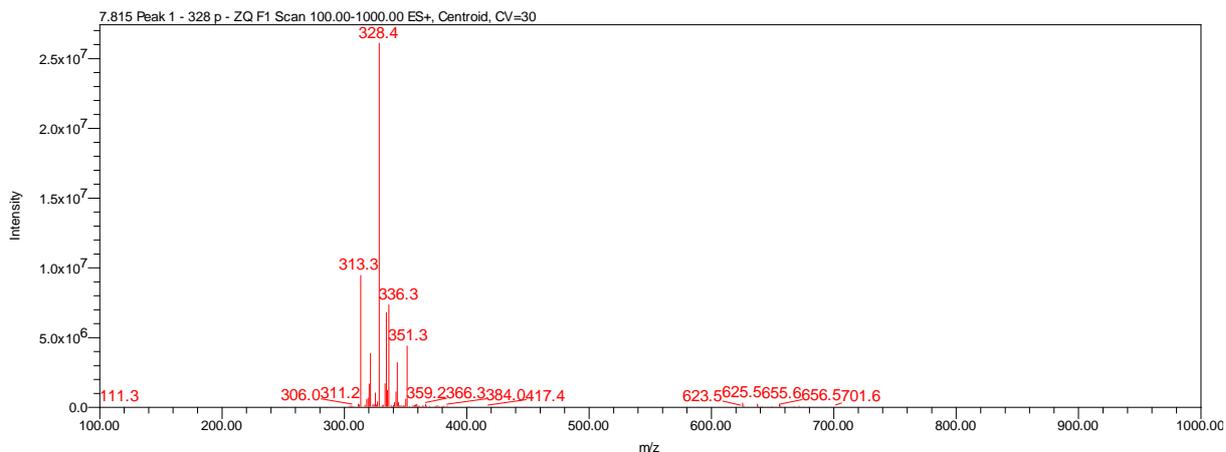


Figura 469. Cromatograma de íons totais da amostra 312_PuroB por HPLC-MS. Condição: coluna X-Terra RP18, gradiente de 30 até 100% orgânico em 20 minutos.

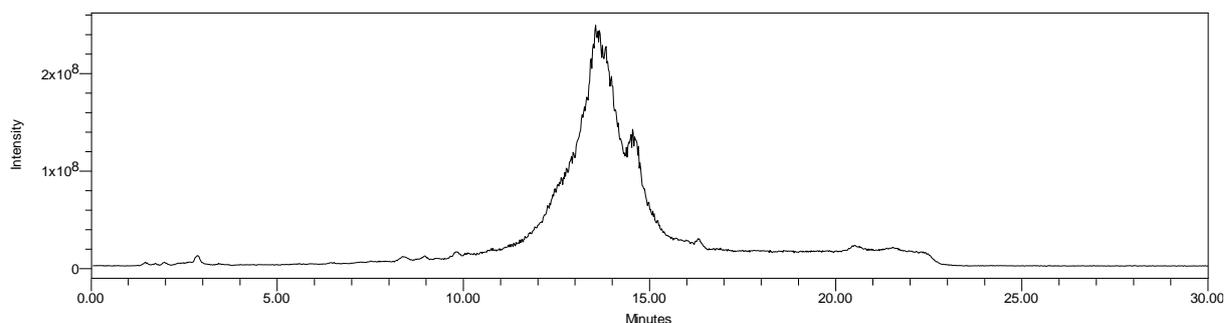
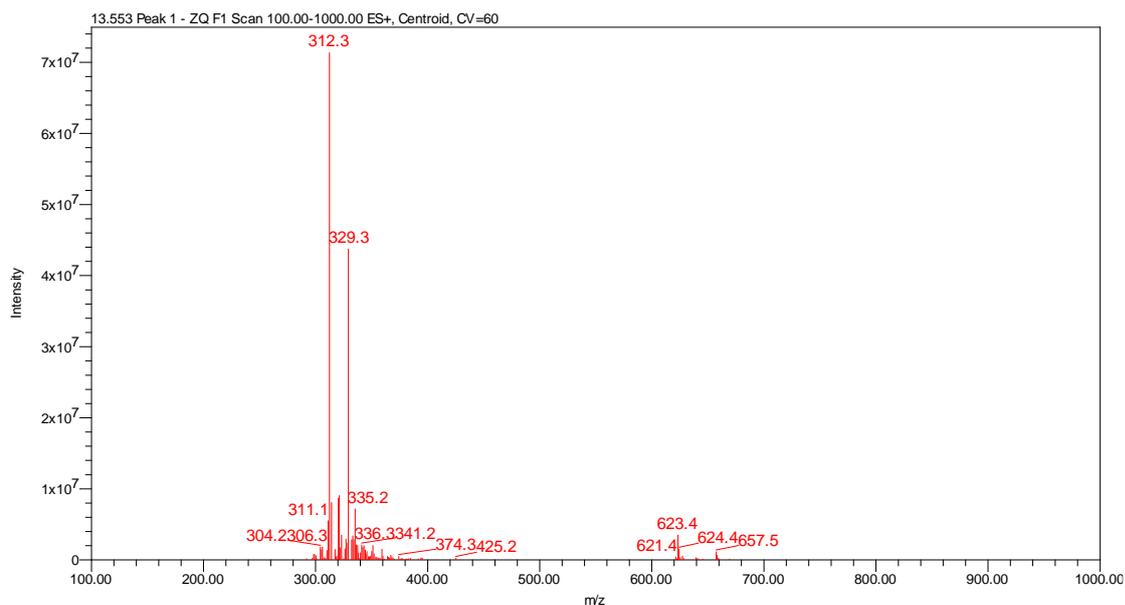


Figura 470. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra 312_PuroB.



O composto 312_PuroB apresenta-se em mistura com um composto homólogo com $[m/z]^{++} = 329,3$ correspondente a 34 unidades de massa a mais no $[m/z]^+$.

Figura 471. Cromatograma de íons totais da amostra 311_PuroB por HPLC-MS. Condição: coluna X-Terra RP18, gradiente de 30 até 100% orgânico em 20 minutos.

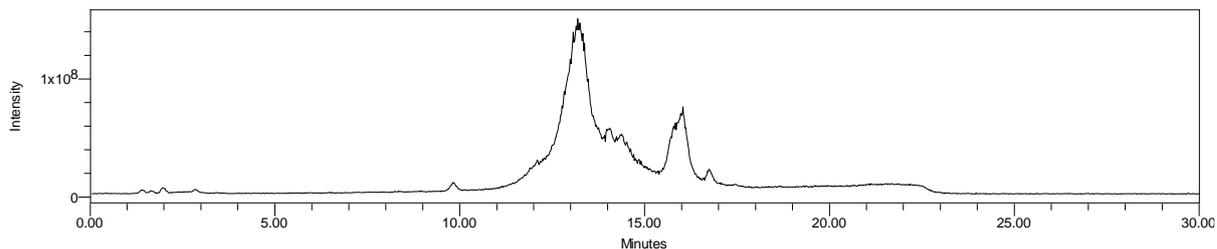


Figura 472. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra 311_PuroB.

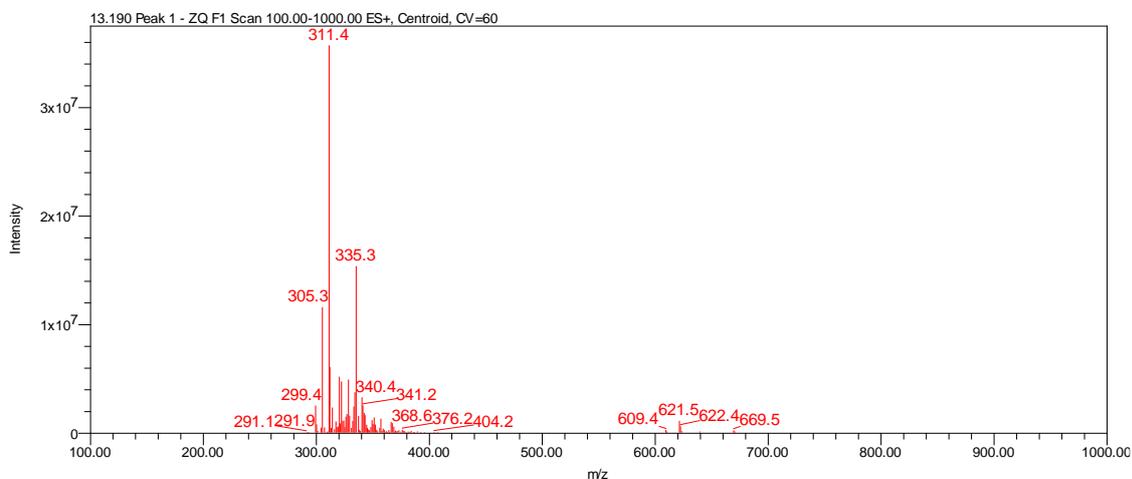


Figura 473. Cromatograma de íons totais da amostra 329_PuroB por HPLC-MS. Condição: coluna X-Terra RP18, gradiente de 30 até 100% orgânico em 20 minutos.

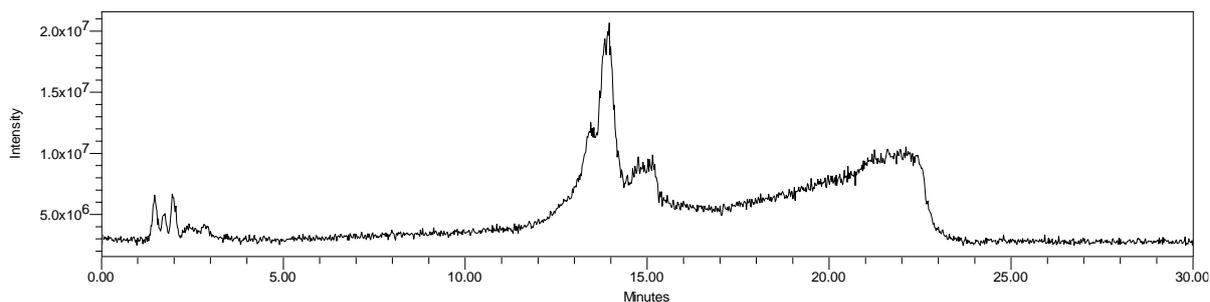


Figura 474. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra 329_PuroB.

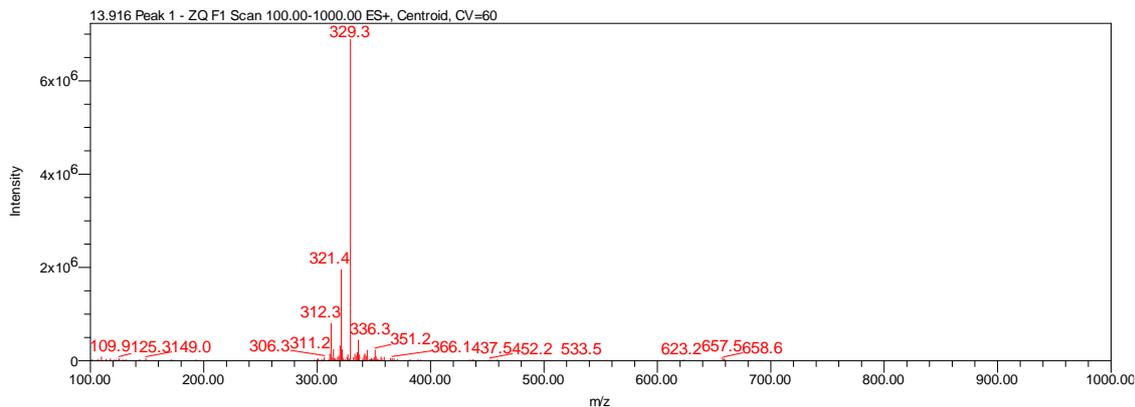


Figura 475. Cromatograma de íons totais da amostra 328_PuroB por HPLC-MS. Condição: coluna X-Terra RP18, gradiente de 30 até 100% orgânico em 20 minutos.

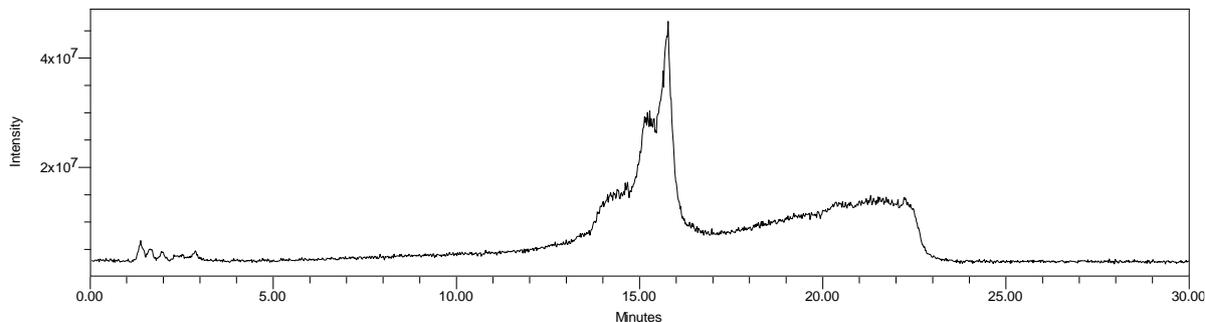


Figura 476. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra 328_PuroB.

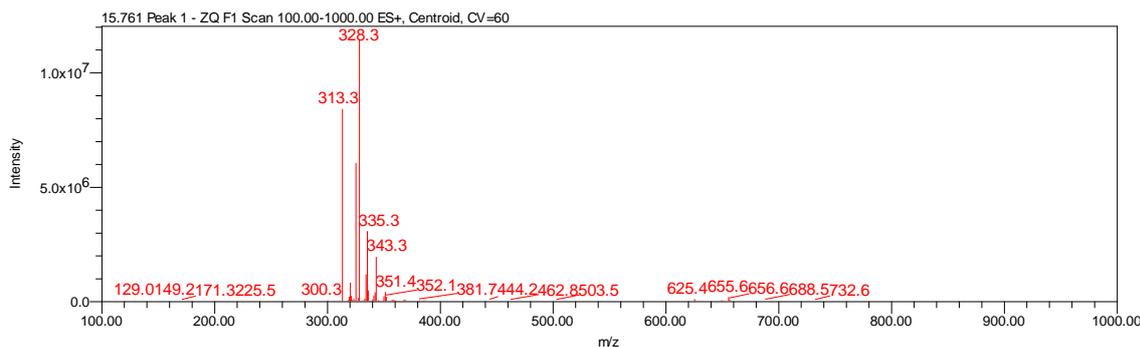


Figura 477. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra 325_PuroB.

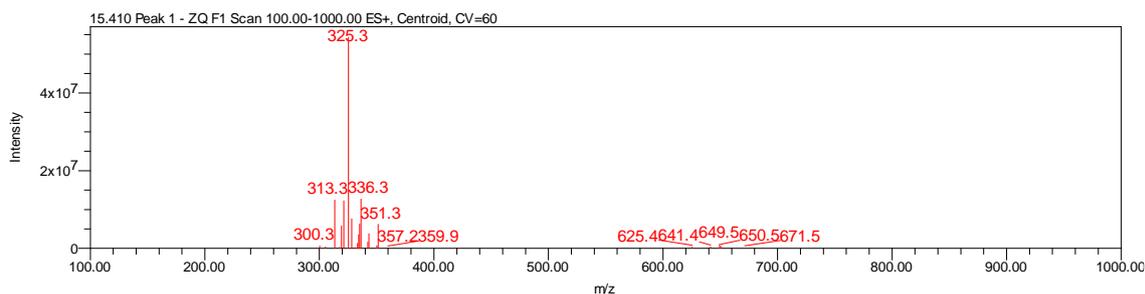


Figura 478. Cromatograma de íons totais da amostra 321_PuroB por HPLC-MS. Condição: coluna X-Terra RP18, gradiente de 30 até 100% orgânico em 20 minutos.

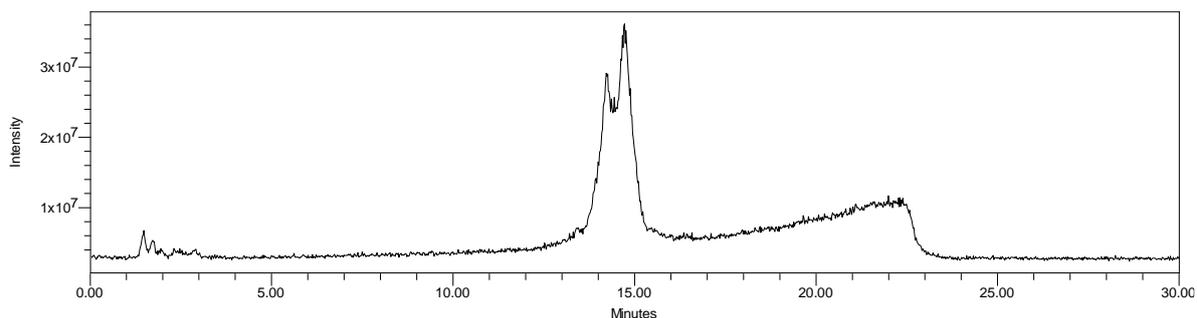


Figura 479. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra 321_PuroB.

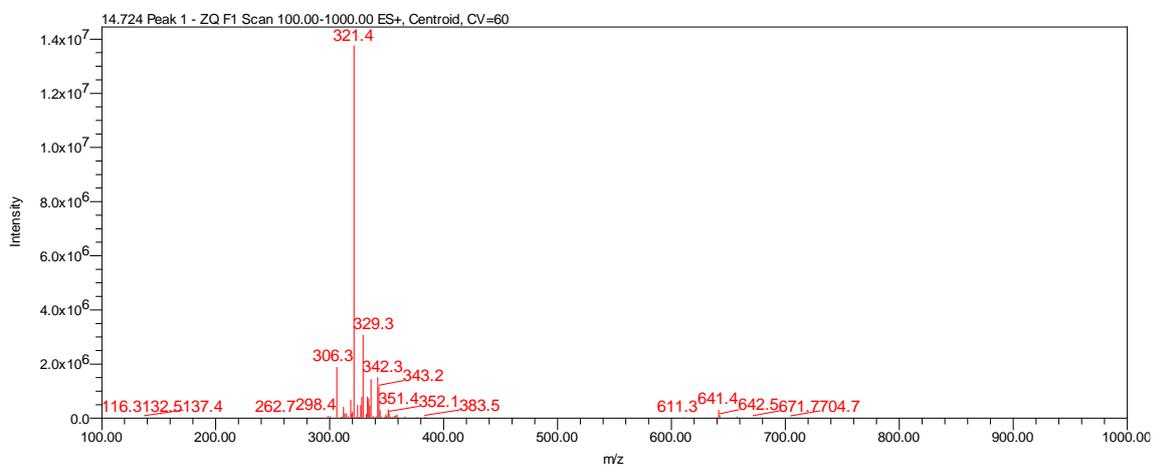


Figura 480. Cromatograma de íons totais da amostra 335_PuroB por HPLC-MS. Condição: coluna X-Terra RP18, gradiente de 30 até 100% orgânico em 20 minutos.

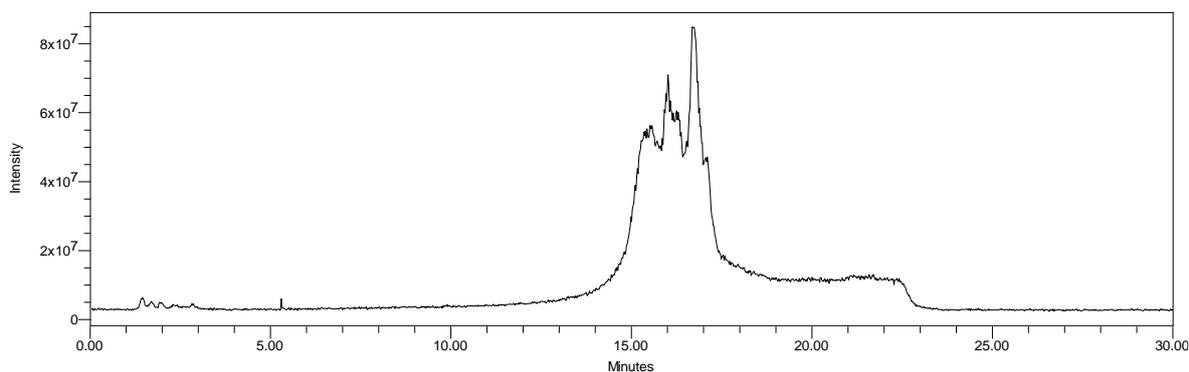


Figura 481. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra 335_PuroB.

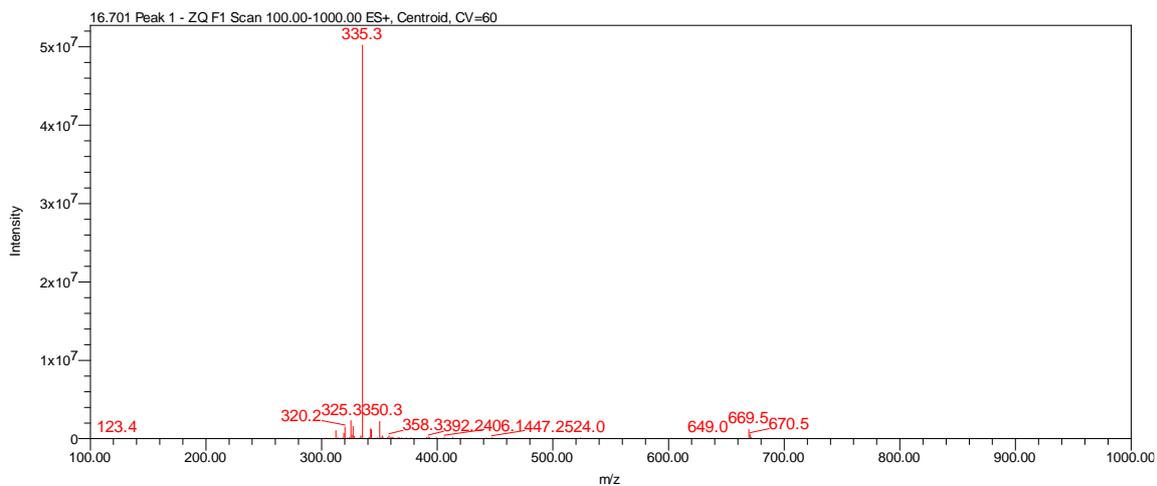


Figura 482. Cromatograma de íons totais da amostra 343_PuroB por HPLC-MS. Condição: coluna X-Terra RP18, gradiente de 30 até 100% orgânico em 20 minutos.

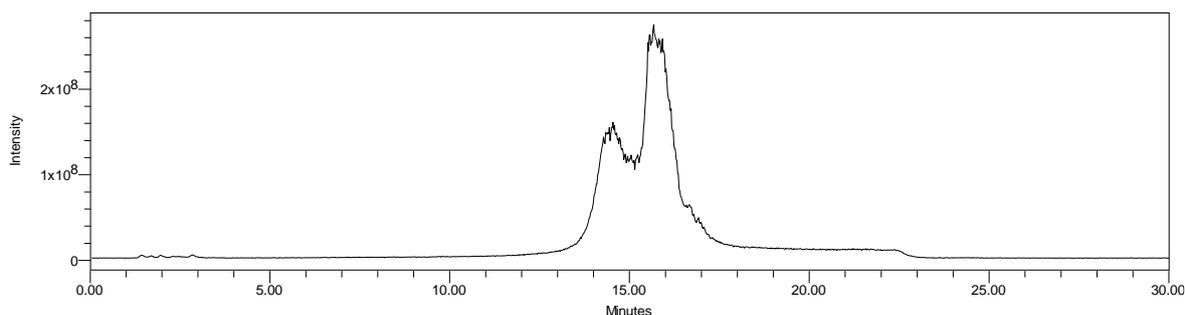


Figura 483. Espectro de ESI-MS em modo positivo de ionização da amostra 343_PuroB.

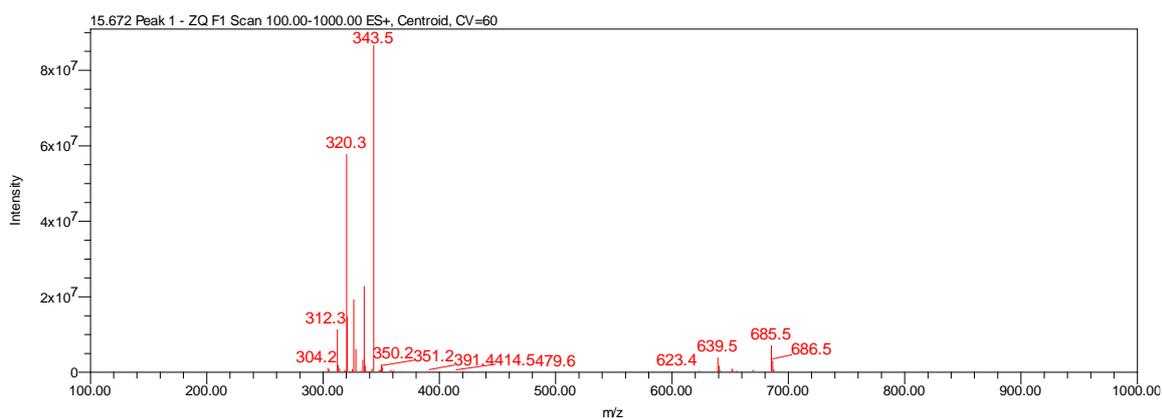


Figura 484. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) do composto 312_PuroB.

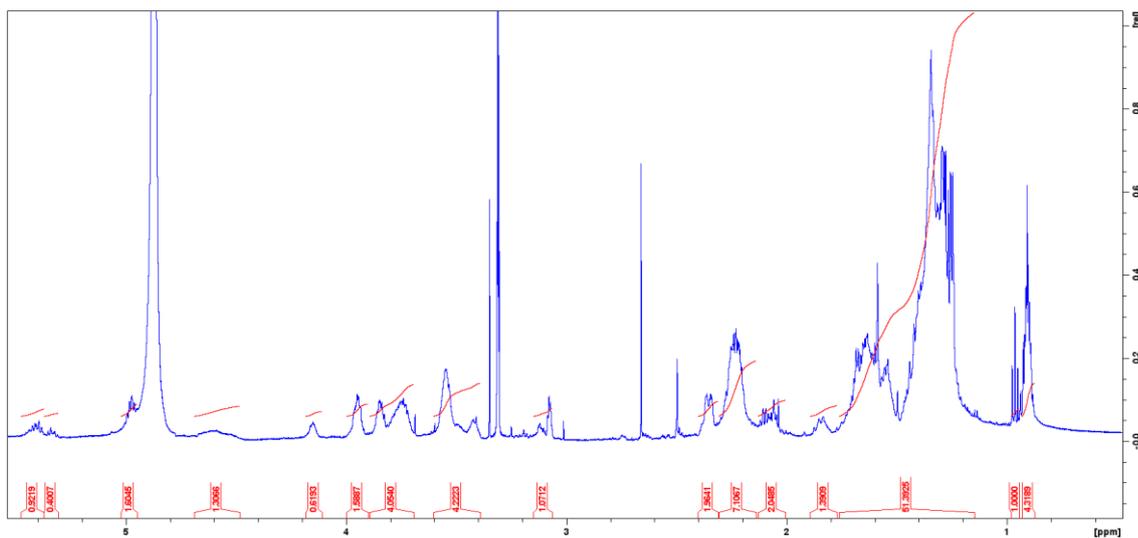


Figura 485. Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, CD_3OD) do composto 312_PuroB.

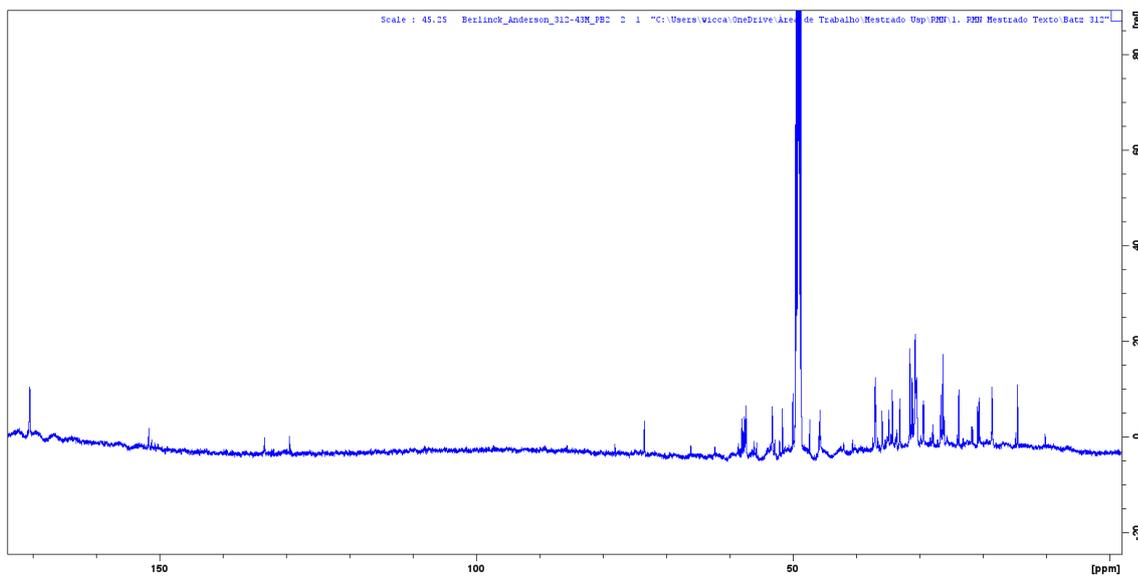


Figura 486. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) do composto 311_PuroB.

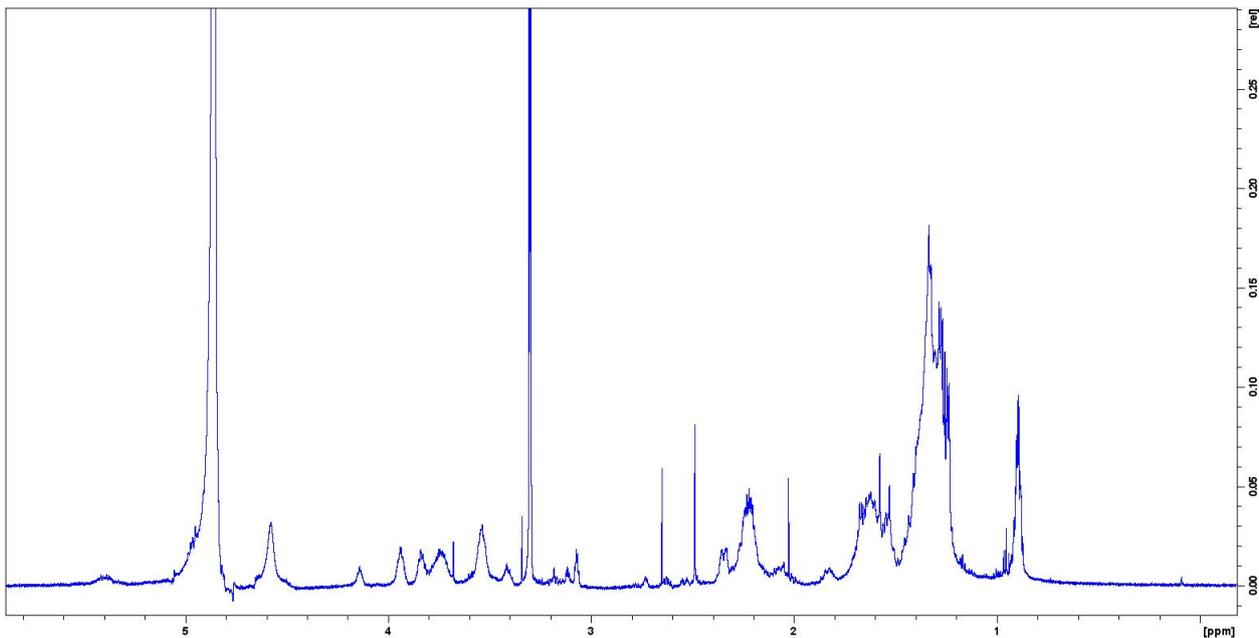


Figura 487. Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, CD_3OD) do composto 311_PuroB.

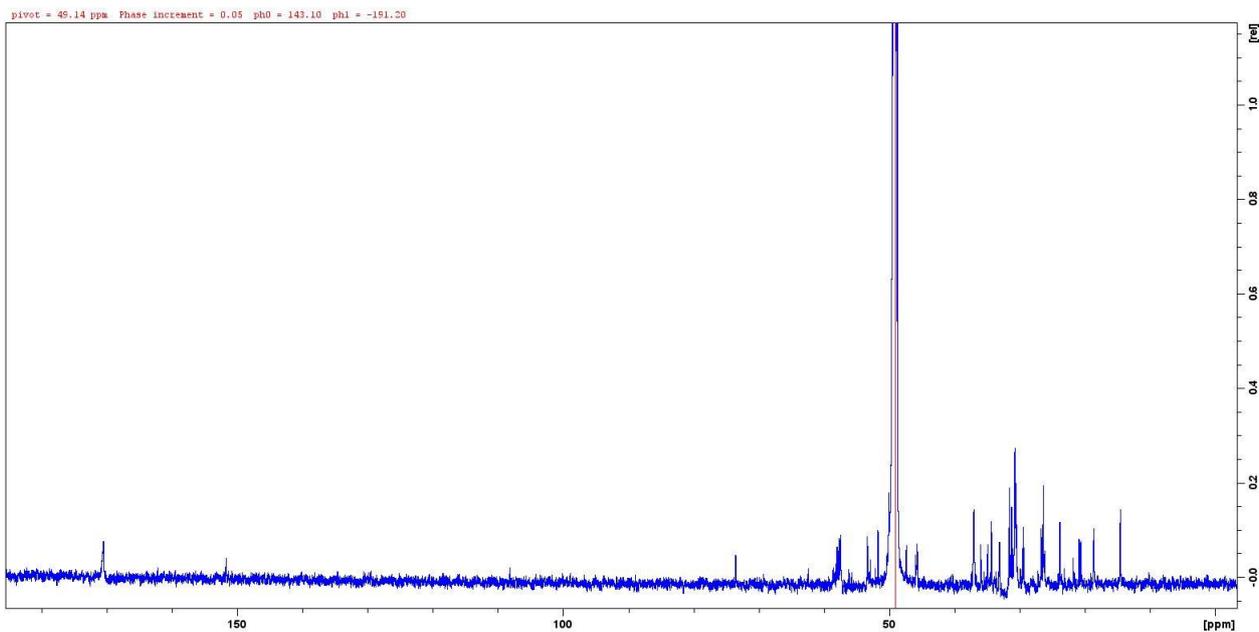


Figura 488. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) do composto 335_PuroB.

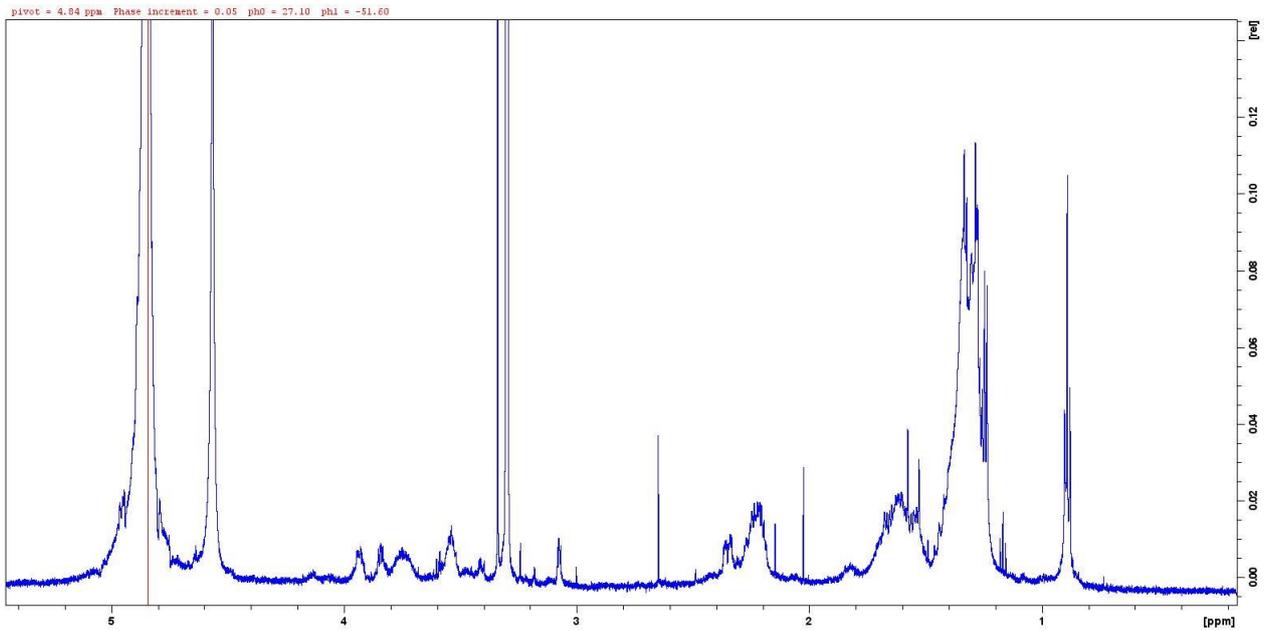


Figura 489. Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, CD_3OD) do composto 335_PuroB.

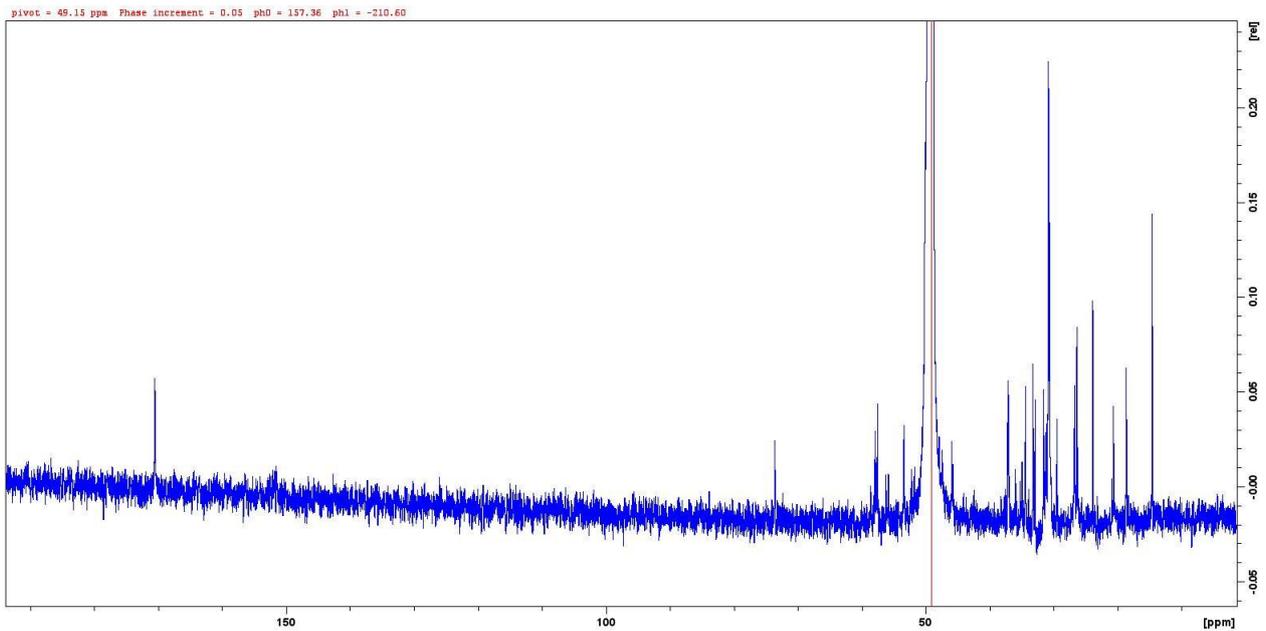
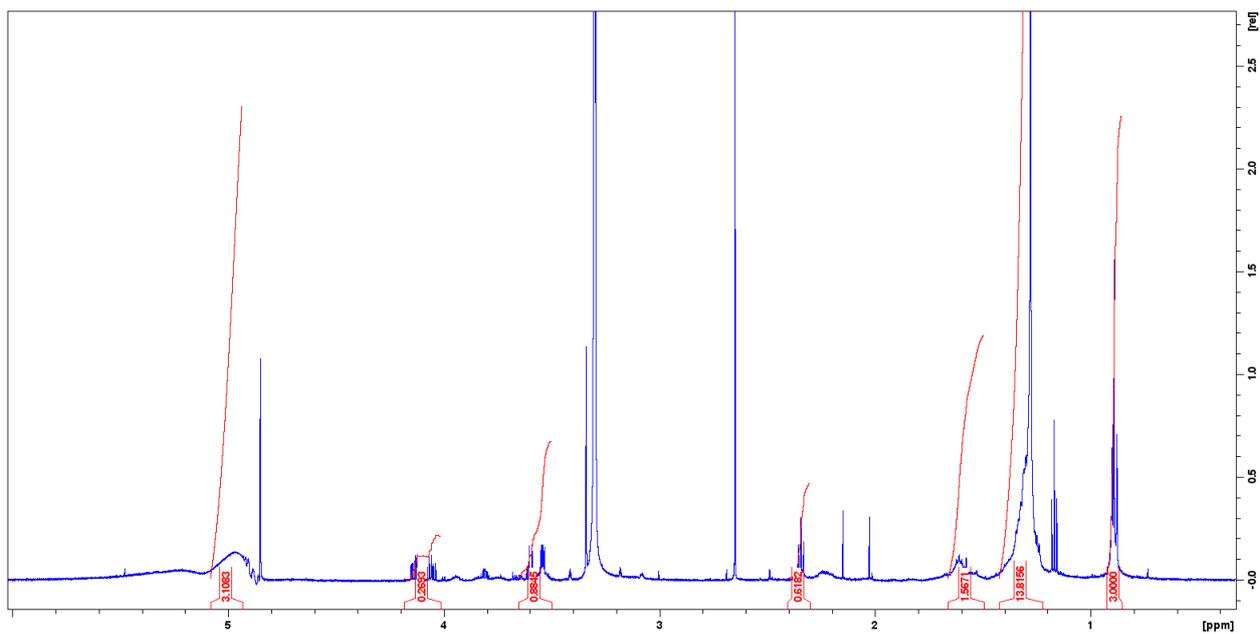


Figura 490. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) do composto 329_PuroB.



As amostras mais puras foram enviadas para obtenção dos experimentos de RMN, sendo estas a 335_PuroB e as amostras 312_PuroB e 311_PuroB. Em caso positivo de sua elucidação estrutural apesar da baixa quantidade de material acumulada, as amostras seguintes serão analisadas: 329_PuroB, 321_PuroB e 325_PuroB por RMN.

As amostras 312_PuroB e 311_PuroB foram enviadas primeiro por estarem disponíveis em maior quantidade (cerca de 1 mg), mas estas encontram-se em misturas com outros compostos homólogos, o que tem dificultado sua elucidação estrutural, principalmente ao serem analisados os seus espectros bidimensionais (omitidos do Anexo).

As demais amostras obtidas apresentam mais impureza do que as selecionadas para avaliação por RMN, e não serão priorizadas as suas análises.

O composto 335_PuroB obtido em excelente pureza, mas em menor quantidade que os 312_PuroB, 311_PuroB teve seus espectros de ^1H e ^{13}C obtidos para verificar se seria possível sua elucidação estrutural, como modelo para os demais minoritários obtidos em quantidade menor de 1 mg.

Foi verificado em seu RMN ^{13}C que, conforme já era esperado, houve sinais ausentes: Esperava-se a visualização de dois sinais próximos de 150 em seus ^{13}C dos seus carbonos guanidínicos, que frequentemente são de difícil visualização para esta quantidade em massa e para este tipo de estrutura.

Isso foi observado para o minoritário 329_PuroB no ^1H , cujas integrais estão com valores bem abaixo do esperado, por isso, não fazia sentido seguir obtendo os espectros de RMN ^{13}C e bidimensionais para os demais minoritários obtidos em quantidades menor do que 1 mg apresentados no catálogo e neste anexo. Pois, para garantir a elucidação estrutural desta classe de composto seria necessário mais tempo de dedicação ao projeto desenvolvendo um trabalho semelhante ao que foi realizado com o composto minoritário 43Q-326 discutido no texto principal, onde foi feita a busca do composto em outras frações. Ou ainda, poderia ser necessário partir desde o extrato da fração acetato de etila da esponja.