



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JOSÉ GUSTAVO LIMA DE ALMEIDA

CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS ZOANTÍDEOS *Palythoa*
caribaeorum (Duchassaing & Michelotti, 1860) E *Protopalythoa variabilis*
(Duerden, 1898)

FORTALEZA
2011

JOSÉ GUSTAVO LIMA DE ALMEIDA

CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS ZOANTÍDEOS *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860) E *Protopalythoa variabilis* (Duerden, 1898)

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Química.

Área de concentração: Química Orgânica

Orientadora: Profa. Dra. Otília Deusdênia
Loiola Pessoa

FORTALEZA
2011

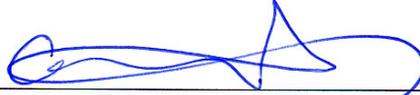
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

A448c Almeida, José Gustavo Lima de.
Constituintes químicos dos zoantídeos *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing e Michelotti, 1860) e *Protopalpythoa variabilis* (Duerden, 1898) / José Gustavo Lima de Almeida. – 2011.
219 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2011.
Área de Concentração: Química Orgânica.
Orientação: Profa. Dra. Otilia Deusdênia Loiola Pessoa.

1. Antozoários. I. Título.

Esta Tese foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Química, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.



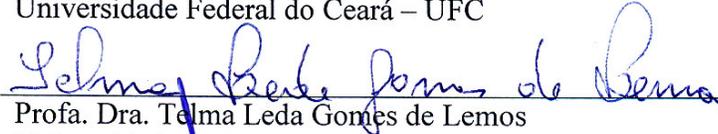
José Gustavo Lima de Almeida

TESE APROVADA EM: 24/11/2011

EXAMINADORES:



Profa. Dra. Otilia Deusdênia Lioila Pessoa
Universidade Federal do Ceará – UFC



Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Jair Marezoli
Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck
Universidade de São Paulo – USP



Profa. Dra. Sônia Soares Costa
Universidade do Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

*Dedico este trabalho a minha mãe, Antônia, meu maior orgulho e
meus irmãos Genário, Gardênia,
Garciane e sua filhinha Isadora, que o titio quer tanto bem!!!*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida,

À minha família, em especial minha mãe por ter priorizado minha educação, permitindo a realização deste sonho.

À Professora Otília Deusdênia Loiola Pessoa, pela orientação, dedicação, amizade, confiança e presteza em ajudar sempre que necessário.

Ao admirável Dr. Raimundo Braz Filho pela valorosa contribuição na elucidação estrutural das substâncias e por compartilhar sua riqueza de conhecimentos.

Ao coordenador do CENAUREMN, Prof. Edilberto Rocha Silveira, pela oportunidade de operar os equipamentos de RMN e disponibilidade sempre que precisei.

Ao Diego Veras Wilke e a Professora Letícia Costa Lotufo do Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFC, pela indicação e orientações nas coletas das espécies marinhas, e também pela realização dos ensaios de atividade citotóxica.

A professora Laila Salmén Espindola da Universidade de Brasília, pela realização da atividade antifúngica.

À Michele Asley e sua família: Sra. Célia, Sr. Alencar, Rafael e Tony pela amizade e incentivo.

Aos amigos do LAFIPLAM Patrícia Coelho, Naiara, Zelina, Deda, Paula Uchôa, Karisia, João Vitor, Mariano, Regivaldo, Honório, Elton, Duvilardo, Ana Isabel, Ceça, Thiciana, Karine, Max, Aurélio, Roberto, Andreza e outros que propiciam um ambiente descontraído com discussões construtivas e de intenso trabalho, e ainda aos colegas que ajudaram, seja emprestando uma vidraria ou disponibilizando um evaporador rotativo, auxílios importantes ao desenvolvimento do trabalho.

Ao amigo Daniel Esdras, agora Professor deste Departamento, por me ensinar na prática as técnicas de RMN ^1H , ^{13}C 1D e 2D inclusive de ^{15}N , enriquecendo meus conhecimentos e meu trabalho.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Química (UFC), pela contribuição indispensável à minha formação acadêmica.

Aos funcionários do curso de Pós-Graduação em Química: Célia, Orlando, Lana e Mundinha.

Ao CNPq, CAPES, FUNCAP, FINEP e PRONEX pelo apoio financeiro.

“Para se ter sucesso, é necessário amar de verdade o que se faz. Caso contrário, levando em conta apenas o lado racional, você simplesmente desiste. É o que acontece com a maioria das pessoas.”

Steve Jobs

RESUMO

Este trabalho descreve a composição química das espécies marinha *Palythoa caribaeorum* e *Protopalythoa variabilis*, coletadas no município de Paracuru-CE. O fracionamento cromatográfico do extrato hexânico de *P. caribaeorum*, resultou no isolamento de quatro esteróides tetracíclico de esqueleto ergostano: 24(R)-ergost-5-en-3 β -ol (**P-1**); 5 α ,8 α -epidioxi-24(R)-ergost-6-en-3 β -ol (**P-2**); 24(R)-ergost-5-en-3 β ,7 α -diol (**P-4**) e 24(R)-7 α -hidroperoxi-ergost-5-en-3 β -ol (**P-7**), um derivado do glicerol, 1-O-hexadecilglicerol (**P-3**) e quatro ceramidas: N-(2S,3R,4E,8E,1,3-dihidroxi-4,8-octadecadieno)hexadecanamida (**P-5**); N-(2S,3R,4E,1,3-dihidroxi-4-octadeceno)-hexadecanamida (**P-6**), N-[2S,3R,4E,8E,1-(2''-metilamino-etanosulfonila)-3-hidroxi-4,8-octadecadieno]hexadecanamida (**P-8**) e N-[2S,3R,4E,1-(2''-metilaminoetano-sulfonila)-3-hidroxi-4-octadeceno]hexadecanamida (**P-9**). Do fracionamento cromatográfico do extrato etanólico, foi possível isolar o esteróide 24(R)-ergost-7-en-3 β ,5 α ,6 β -triol (**P-10**) e o nucleosídeo 2-metil-timidina (**P-11**). Do estudo químico do extrato hexânico de *P. variabilis* obteve-se os mesmos constituintes químicos isolados de *P. caribaeorum* (**P-1**, **P-2**, **P-3** e **P-4**) e as quatro ceramidas (**P-5**, **P-6**, **P-8** e **P-9**). Além destes compostos foi isolado um éster de cadeia alifática, hexadecanoato de nonila (**P-12**) e o esteróide ácido 24(R)-B-norergostan-3 β -5 β -diol-6 β -carboxílico (**P-13**). O potencial citotóxico e antifúngico das ceramidas foi avaliado, entretanto, estas não apresentaram atividade. Os compostos foram isolados através de cromatografia de adsorção em gel de sílica e cromatografia líquida de alta eficiência. As estruturas dos compostos obtidos foram elucidadas utilizando técnicas espectroscópicas e espectrométricas, tais como: espectrometria de massa acoplada a cromatografia gasosa (CG/EM); espectrometria de massa de alta resolução (EMAR); espectroscopia na região do infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^1H , ^{13}C e ^{15}N) através de sequências de pulsos uni e bidimensionais e comparação com dados de RMN na literatura.

ABSTRACT

This work describes the chemical composition of the marine species *Palythoa caribaeorum* and *Protopalythoa variabilis*, both collected at Paracuru beach, state of Ceará. The chromatographic fractionation of the hexane extract from *P. caribaeorum* resulted in the isolation of four tetracyclic sterols possessing the ergostan skeleton: 24(*R*)-ergost-5-en-3 β -ol (**P-1**); 5 α ,8 α -epidioxy-24(*R*)-ergost-6-en-3 β -ol (**P-2**); 24(*R*)-ergost-5-en-3 β ,7 α -diol (**P-4**) and 24(*R*)-7 α -hydroperoxy-ergost-5-en-3 β -ol (**P-7**), a glycerol derivative, 1-*O*-hexadecylglycerol (**P-3**) and four ceramides: *N*-(2*S*,3*R*,4*E*,8*E*,1,3-dihydroxy-4,8-octadecadienyl)hexadecanamide (**P-5**); *N*-(2*S*,3*R*,4*E*,1,3-dihydroxy-4-octadecenyl)hexadecanamide (**P-6**); *N*-[2*S*,3*R*,4*E*,8*E*,1-(2''-methylamino-ethanosulfonyl)-3-hydroxy-4,8-octadecaenyl]hexadecanamide (**P-8**) and *N*-[2*S*,3*R*,4*E*,1-(2''-methylaminoethano-sulfonyl)-3-hydroxy-4-octadecenyl]hexadecanamide (**P-9**). The chromatographic fractionation of the ethanol extract permitted the isolation of a steroid, 24(*R*)-ergost-7-en-3 β ,5 α ,6 β -triol (**P-10**) and a nucleoside 2-methylthymidine (**P-11**). Column chromatography of the hexane extract of *P. variabilis* led to the isolation of nonyl hexadecanoate (**P-12**), the sterol 24(*R*)-B-norergostan-3 β -5 β -diol-6 β -carboxylic acid (**P-13**) and the same chemical constituents previously isolated from *P. caribaeorum* (**P-1**, **P-2**, **P-3** e **P-4**) including the four ceramides (**P-5**, **P-6**, **P-8** e **P-9**). The cytotoxic and antifungal properties of all ceramides were evaluated, nevertheless none of them showed any activity. All compounds were isolated through adsorption column chromatography over silica gel followed by high performance liquid chromatography. The structures of the isolated compounds were elucidated using spectrometric techniques, such as: GC/MS, HRESIMS, IR and NMR (^1H , ^{13}C and ^{15}N) through 1D and 2D pulse sequences and, whenever the case, comparison with literature data.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01:	Fotografia mostrando o aspecto geral das colônias de zoantídeos em seu habitat natural.....	25
Figura 02:	Fotografia digital mostrando o aspecto geral da colônia de <i>P. caribaeorum</i>	28
Figura 03:	Fotografias digitais mostrando o aspecto geral da colônia de <i>P. variabilis</i>	29
Figura 04:	Estrutura básica dos esteróides.....	40
Figura 05:	Esquema simplificado da rota biossintética dos esteróides.....	41
Figura 06:	Esquema simplificado da biossíntese de ácidos graxos.....	42
Figura 07:	Esquema simplificado da biossíntese do ácido palmítico C ₁₆	43
Figura 08:	Esquema simplificado da biossíntese de ceramidas.....	44
Figura 09:	Estrutura do composto P-1	47
Figura 10:	Espectro de infravermelho (KBr) de P-1	49
Figura 11:	Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de P-1	49
Figura 12:	Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de P-1	50
Figura 13:	Espectro de RMN ¹³ C-CPD (125 MHz, CDCl ₃) de P-1	50
Figura 14:	Espectro de RMN ¹³ C-DEPT 135° (125 MHz, CDCl ₃) de P-1	51
Figura 15:	Principais correlações ¹ H, ¹³ C – HMBC de P-2	54
Figura 16:	Estrutura do composto P-2	54
Figura 17:	Espectro de infravermelho (KBr) de P-2	57
Figura 18:	Espectro de massa de alta resolução [M + Na] ⁺ de P-2	57
Figura 19:	Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de P-2	58
Figura 20:	Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de P-2	58
Figura 21:	Espectro de RMN ¹³ C-CPD (125 MHz, CDCl ₃) de P-2	59
Figura 22:	Espectro de RMN ¹³ C-DEPT 135° (125 MHz, CDCl ₃) de P-2	59
Figura 23:	Espectros homonuclear ¹ H, ¹ H – COSY (500 MHz, CDCl ₃) de P-2	60
Figura 24:	Espectros de correlação heteronuclear ¹ H, ¹³ C – HSQC (500, 125 MHz, CDCl ₃) de P-2	61
Figura 25:	Espectro de correlação heteronuclear ¹ H, ¹³ C – HMBC (500, 125 MHz, CDCl ₃) de P-2	62
Figura 26:	Expansão do espectro de correlação heteronuclear ¹ H, ¹³ C – HMBC (500, 125 MHz, CDCl ₃) de P-2	63
Figura 27:	Comparação dos espectros de RMN ¹ H de P-1 e P-4	64
Figura 28:	Principais correlações ¹ H, ¹³ C – HMBC de P-4	66
Figura 29:	Estrutura de P-4	66
Figura 30:	Espectro de infravermelho (KBr) de P-4	69
Figura 31:	Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de P-4	70
Figura 32:	Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de P-4	70
Figura 33:	Espectro de RMN ¹³ C-CPD (125 MHz, CDCl ₃) de P-4	71
Figura 34:	Espectro de RMN ¹³ C-DEPT 135° (125 MHz, CDCl ₃) de P-4	71
Figura 35:	Espectro de correlação homonuclear ¹ H, ¹ H – COSY (500 MHz, CDCl ₃) de P-4	72
Figura 36:	Expansão do espectro de correlação homonuclear ¹ H, ¹ H – COSY (500 MHz, CDCl ₃) de P-4	73
Figura 37:	Espectro de correlação heteronuclear ¹ H, ¹³ C – HSQC (500, 125 MHz, CDCl ₃) de P-4	74
Figura 38:	Expansão do espectro de correlação heteronuclear ¹ H, ¹³ C – HSQC (500, 125 MHz, CDCl ₃) de P-4	75

Figura 39:	Espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (500, 125 MHz, CDCl_3) de P-4	76
Figura 40:	Expansão do espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (500, 125 MHz, CDCl_3) de P-4	77
Figura 41:	Comparação dos espectros de RMN ^1H de P-7 com P-4	78
Figura 42:	Estrutura parcial do esteróide P-7 e 24(<i>S</i>)-etil-7 α -hidroperoxi-colesta-5,25-dien-3 β -ol isolado por Sheu e colaboradores, 1995.....	81
Figura 43:	Estrutura do composto P-7	81
Figura 44:	Espectro de infravermelho (KBr) de P-7	84
Figura 45:	Espectro de massa de alta resolução $[\text{M} + \text{K}]^+$ de P-7	84
Figura 46:	Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de P-7	85
Figura 47:	Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de P-7	85
Figura 48:	Espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, CDCl_3) de P-7	86
Figura 49:	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de P-7	86
Figura 50:	Espectros de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY (500 MHz, CDCl_3) de P-7	87
Figura 51:	Espectros de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC (500, 125 MHz, CDCl_3) de P-7	88
Figura 52:	Espectros de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (500, 125 MHz, CDCl_3) de P-7	89
Figura 53:	Expansões do espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (500, 125 MHz, CDCl_3) de P-7	90
Figura 54:	Principais correlações ^1H , ^{13}C – HMBC de P-10	92
Figura 55:	Estrutura do composto P-10	93
Figura 56:	Estruturas parciais do composto P-10 e dos esteróides 24(<i>R</i>)-ergost-7-en-3 β ,5 α ,6 β -triol e 3 β ,5 α ,6 α -triol.....	93
Figura 57:	Espectro de infravermelho (KBr) de P-10	96
Figura 58:	Espectro de RMN ^1H (500 MHz piridina- <i>d</i> ₅) de P-10	97
Figura 59:	Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz piridina- <i>d</i> ₅) de P-10	97
Figura 60:	Espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz piridina- <i>d</i> ₅) de P-10	98
Figura 61:	Expansão do espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz piridina- <i>d</i> ₅) de P-10	98
Figura 62:	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz piridina- <i>d</i> ₅) de P-10	99
Figura 63:	Espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY (500 MHz, piridina- <i>d</i> ₅) de P-10	99
Figura 64:	Expansão do espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY (500 MHz, piridina- <i>d</i> ₅) de P-10	100
Figura 65:	Espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC (500, 125 MHz, piridina- <i>d</i> ₅) de P-10	100
Figura 66:	Expansões do espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC (500, 125 MHz, piridina- <i>d</i> ₅) de P-10	101
Figura 67:	Espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (500, 125 MHz, piridina- <i>d</i> ₅) de P-10	102
Figura 68:	Expansão do espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (500, 125 MHz, piridina- <i>d</i> ₅) de P-10	103
Figura 69:	Espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H – NOESY (500 MHz, piridina- <i>d</i> ₅) de P-10	104
Figura 70:	Principais acoplamentos de ^1H , ^1H – COSY de P-3	105
Figura 71:	Estrutura de P-3	106
Figura 72:	Espectro de massa do composto P-3	106
Figura 73:	Espectro de infravermelho (KBr) de P-3	108

Figura 74:	Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de P-3	109
Figura 75:	Espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, CDCl_3) de P-3	109
Figura 76:	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de P-3	110
Figura 77:	Espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY (500 MHz, CDCl_3) de P-3	110
Figura 78:	Principais correlações ^1H , ^{13}C – HMBC de P-5	113
Figura 79:	Estrutura parcial do composto P-5	114
Figura 80:	Cromatograma e espectro de massa do hexadecanoato de metila.....	115
Figura 81:	Estrutura do composto P-5	115
Figura 82:	Espectro de infravermelho (KBr) de P-5	117
Figura 83:	Espectros de massa de alta resolução $[\text{M} + \text{Na}]^+$ e $[\text{M} - \text{H}]^-$ de P-5	117
Figura 84:	Espectro de RMN ^1H (500 MHz, piridina- d_5) de P-5	118
Figura 85:	Espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, piridina- d_5) de P-5	118
Figura 86:	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz piridina- d_5) de P-5	119
Figura 87:	Espectros de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY (500 MHz, piridina- d_5) de P-5	120
Figura 88:	Espectros de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC (500, 125 MHz, piridina- d_5) de P-5	121
Figura 89:	Espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (500, 125 MHz, piridina- d_5) de P-5	122
Figura 90:	Expansão do espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (500, 125 MHz, piridina- d_5) de P-5	123
Figura 91:	Expansão do espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (500, 125 MHz, piridina- d_5) de P-5	124
Figura 92:	Principais correlações ^1H , ^{13}C – HMBC de P-6	126
Figura 93:	Espectro de infravermelho (KBr) de P-6	128
Figura 94:	Espectros de massa de alta resolução $[\text{M} + \text{Na}]^+$ e $[\text{M} - \text{H}]^-$ de P-6	128
Figura 95:	Espectro de RMN ^1H (500 MHz, piridina- d_5) de P-6	129
Figura 96:	Espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, piridina- d_5) de P-6	129
Figura 97:	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, piridina- d_5) de P-6	130
Figura 98:	Espectro heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC (500, 125 MHz, piridina- d_5) de P-6	130
Figura 99:	Espectro heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (500, 125 MHz, piridina- d_5) de P-6	131
Figura 100:	Estrutura parcial de P-8	133
Figura 101:	Principais correlações ^1H , ^{13}C – HMBC de P-8	134
Figura 102:	Principais correlações ^1H , ^{13}C – HMBC de P-8	135
Figura 103:	Principais correlações ^1H , ^{15}N – HMBC de P-8	135
Figura 104:	Cromatograma e espectro de massa do éster metílico (hexadecanoato de metila).....	136
Figura 105:	Estrutura dos fragmentos EM/EM obtidos dos espectros de massa de alta resolução de P-8	137
Figura 106:	Estrutura do composto P-8	137
Figura 107:	Espectro de infravermelho (KBr) de P-8	139
Figura 108:	Espectro de massa de alta resolução $[\text{M} - \text{H}]^-$ de P-8	140
Figura 109:	Espectro de massa precursor do íon $[\text{M} - \text{H}]^-$ m/z 655 de P-8	140
Figura 110:	Espectro de massa de alta resolução $[\text{M} + \text{H}]^+$ de P-8	140
Figura 111:	Espectro de massa precursor do íon $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z 657 de P-8	140
Figura 112:	Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de P-8	141
Figura 113:	Espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de P-8	141

Figura 114:	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de P-8	142
Figura 115:	Espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de P-8	142
Figura 116:	Expansão do espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de P-8	143
Figura 117:	Espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de P-8	144
Figura 118:	Expansões do espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de P-8	145
Figura 119:	Espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de P-8	146
Figura 120:	Expansão do espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de P-8	147
Figura 121:	Expansão do espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de P-8	148
Figura 122:	Espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{15}N – HMBC ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de P-8	149
Figura 123:	Expansão do espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{15}N – HMBC ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de P-8	149
Figura 124:	Principais correlações ^1H , ^{15}N – HMBC de P-9	152
Figura 125:	Fragmentações observadas nos espectros de massas EM/EM no modo positivo (a) e negativo (b).....	153
Figura 126:	Estrutura do composto P-9	153
Figura 127:	Espectro de infravermelho (KBr) de P-9	154
Figura 128:	Espectro de massa de alta resolução $[\text{M} - \text{H}]^-$ de P-9	155
Figura 129:	Espectro de massa precursor do íon $[\text{M} - \text{H}]^-$ m/z 657 de P-9	155
Figura 130:	Espectro de massa de alta resolução $[\text{M} + \text{H}]^+$ de P-9	155
Figura 131:	Espectro de massa precursor do íon $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z 659 de P-9	155
Figura 132:	Espectro de RMN ^1H ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de P-9	156
Figura 133:	Espectro de RMN ^{13}C -CPD ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de P-9	156
Figura 134:	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de P-9	157
Figura 135:	Espectro heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de P-9 ...	158
Figura 136:	Espectro heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de P-9 ..	159
Figura 137:	Expansão do espectro heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de P-9	160
Figura 138:	Espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{15}N – HMBC ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de P-9	161
Figura 139:	Expansão do espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{15}N – HMBC ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de P-9	161
Figura 140:	Estrutura e correlações ^1H , ^{13}C – HMBC de PC-11	162
Figura 141:	Espectro de RMN ^1H (500 MHz, piridina- d_5) de P-11	163
Figura 142:	Espectros de massa $[\text{M} + \text{H}]^+$ e $[\text{M} - \text{H}]^-$ de P-11	163
Figura 143:	Espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, piridina- d_5) de P-11	164
Figura 144:	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, piridina- d_5) de P-11	164
Figura 145:	Espectro heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (500, 125 MHz, piridina- d_5) de P-11	165
Figura 146:	Cromatograma e espectro de massa do éster metílico de P-12	167
Figura 147:	Estrutura de P-12	167
Figura 148:	Espectro de massa de alta resolução $[\text{M} + \text{H}]^+$ de P-12	167

Figura 149:	Espectro de infravermelho de P-12	168
Figura 150:	Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de PC-12	168
Figura 151:	Espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, CDCl_3) de PC-12	169
Figura 152:	Espectro de RMN ^{13}C -DEP-135° (125 MHz, CDCl_3) de PC-12	169
Figura 153:	Espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY (500 MHz, CDCl_3) de P-12	170
Figura 154:	Espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC (500, 125 MHz, CDCl_3) de P-12	170
Figura 155:	Subestrutura de P-13	172
Figura 156:	Estrutura de P-13 e do esteróide semelhante isolado por Scheinost, 2009.....	173
Figura 157:	Esteróides isolados por MIYAMOTO <i>et al.</i> , 2001 e WEI <i>et al.</i> , 2007.....	173
Figura 158:	Esteróides isolados por Lin, 1998.....	173
Figura 159:	Espectro de infravermelho de P-13	176
Figura 160:	Espectro de massa de alta resolução [M – H] ⁻ de P-13	176
Figura 161:	Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de P-13	177
Figura 162:	Espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, CDCl_3) de P-13	177
Figura 163:	Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de P-13	178
Figura 164:	Espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY (500 MHz, CDCl_3) de P-13	178
Figura 165:	Espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H – NOESY (500 MHz, CDCl_3) de P-13	179
Figura 166:	Espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC (500, 125 MHz, CDCl_3) de P-13	179
Figura 167:	Expansão do espectro de correlação Heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC (500, 125 MHz, CDCl_3) de P-13	180
Figura 168:	Espectro de correlação Heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (500, 125 MHz, CDCl_3) de P-13	180
Figura 169:	Expansão do espectro de correlação Heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (500, 125 MHz, CDCl_3) de P-13	181
Figura 170:	Local de coleta, A – mapa indicando a posição do ponto de coleta, a praia de Paracuru relativa à capital Fortaleza e B, fotografia do local de coleta durante a maré baixa.....	186
Figura 171:	Cromatograma da fração 36-45.....	191
Figura 172:	Cromatograma da fração 29-38.....	193
Figura 173:	Espectro de massa de alta resolução das frações 9-12 e 13-34.....	204
Figura 174:	Espectro de massa de alta resolução da fração 8-10.....	206

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Substâncias isoladas de <i>Palythoa</i> e <i>Protopalythoa</i>	33
Tabela 2:	Padrão de hidrogenação dos carbonos de P-1	47
Tabela 3:	Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e ¹³ C de P-1 (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) comparados com os descritos na literatura para campesterol (CDCl ₃ , 75 e 300 MHz).....	48
Tabela 4:	Padrão de hidrogenação de P-2	53
Tabela 5:	Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e ¹³ C de P-2 (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) comparados com os descritos na literatura para o 5 α ,8 α -epidioxi-24(<i>R</i>)-ergost-6-en-3 β -ol (CDCl ₃ , 300 e 75 MHz) [IOANNOUA <i>et al.</i> , 2009].....	55
Tabela 6:	Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C e ¹ H e correlação heteronuclear ¹ H, ¹³ C (HSQC e HMBC) de P-2	56
Tabela 7:	Padrão de hidrogenação de P-4	65
Tabela 8:	Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C de P-4 (CDCl ₃ , 125 MHz) comparados com os descritos na literatura para 7 α -hidroxicampesterol (piridina- <i>d</i> ₅ , 100 MHz) [KOBAYASHI <i>et al.</i> , 1993].....	67
Tabela 9:	Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e ¹³ C e correlação heteronuclear ¹ H, ¹³ C (HSQC e HMBC) de P-4	68
Tabela 10:	Comparação entre os dados de RMN ¹³ C de P-7 com os dados de P-4 (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz).....	79
Tabela 11:	Comparação entre os dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C-CPD de P-7 (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) com os descritos na literatura para 24(<i>S</i>)-etil-7 α -hidroperoxi-colesta-5,25-dien-3 β -ol (CDCl ₃ , 300 e 75 MHz) [SHEU <i>et al.</i> , 1995].....	81
Tabela 12:	Comparação dos dados de RMN ¹ H de P-7 (CDCl ₃ , 500 MHz), com os da literatura para os esteróides 7 α e 7 β hidroperóxido (CDCl ₃ , 300 MHz).....	82
Tabela 13:	Dados de RMN ¹ H, ¹³ C e correlação heteronuclear ¹ H, ¹³ C (HSQC e HMBC) de P-7	83
Tabela 14:	Padrão de hidrogenação de P-10	92
Tabela 15:	Comparação entre os dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C-CPD de P-10 (piridina- <i>d</i> ₅ , 500 e 125 MHz) com os descritos na literatura para o esteróide 24(<i>R</i>)-ergost-7-en-3 β ,5 α ,6 β -trioi (piridina- <i>d</i> ₅ , 400 e 100 MHz) [MADAIO <i>et al.</i> , 1989].....	94
Tabela 16:	Dados de RMN ¹ H, ¹³ C e correlação heteronuclear ¹ H, ¹³ C (HSQC e HMBC) de P-10	95
Tabela 17:	Padrão de hidrogenação determinado através da comparação dos espectros de RMN ¹³ C-CPD e DEPT 135°.....	106
Tabela 18:	Deslocamentos químicos de RMN ¹ H e ¹³ C de P-3 (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) comparado com dados descritos na literatura para o derivado do glicerol (1- <i>O</i> -hexadecilglicerol) (CDCl ₃ , 300 e 75 MHz) [QUIJANO <i>et al.</i> , 1994].....	107
Tabela 19:	Padrão de hidrogenação determinado através da comparação dos espectros de RMN ¹³ C-CPD e DEPT 135°.....	113
Tabela 20:	Dados de RMN ¹ H, ¹³ C e correlação heteronuclear ¹ H, ¹³ C (HSQC e HMBC) de P-5	116
Tabela 21:	Comparação entre os dados de RMN ¹³ C-CPD de P-5 (piridina- <i>d</i> ₅ , 125	

	MHz) com os descritos na literatura para ceramida <i>N</i> -(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>E</i> ,8 <i>E</i> ,1,3-dihidroxi-4,8-octadecadieno)hexadecanamida (CDCl ₃ , 75 MHz) [MURALIDHAR <i>et al.</i> , 2005].....	116
Tabela 22:	Padrão de hidrogenação determinado através da comparação dos espectros de RMN ¹³ C-CPD e DEPT 135°.....	126
Tabela 23:	comparação dos dados de RMN ¹ H e ¹³ C de P-5 e P-6	127
Tabela 24:	Padrão de hidrogenação determinado através da comparação dos espectros de RMN ¹³ C-CPD e DEPT 135°.....	134
Tabela 25:	Dados de RMN ¹ H, ¹³ C e correlação heteronuclear ¹ H, ¹³ C (HSQC e HMBC, CDCl ₃ /CD ₃ OD 20%) de P-8	138
Tabela 26:	Comparação entre os dados de RMN ¹ H e ¹³ C de P-9 e P-8	151
Tabela 27:	Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C de P-11 (piridina- <i>d</i> ₅) comparado com dados descritos na literatura para 2-metil-timidina (metanol- <i>d</i> ₄) [PRETSCH <i>et al.</i> , 2000].....	162
Tabela 28:	Padrão de hidrogenação de P-13	172
Tabela 29:	Comparação entre os dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C-CPD de P-13 (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) com os descritos na literatura para o esteróide ácido 24(<i>R</i>)-B-norcolestano-3β-5β-diol-6β-carboxílico (CDCl ₃ , 500 e 125 MHz) [SCHEINOST, <i>et al.</i> , 2009].....	174
Tabela 30:	Dados de RMN ¹ H, ¹³ C e correlação heteronuclear ¹ H, ¹³ C (HSQC e HMBC, CDCl ₃) de P-13	175
Tabela 31:	Dados resultantes do fracionamento cromatográfico do extrato hexano...	187
Tabela 32:	Dados resultantes da cromatografia em coluna da fração 24-28.....	188
Tabela 33:	Dados resultantes da cromatografia “flash” da fração 8-13.....	188
Tabela 34:	Frações resultantes do tratamento cromatográfico da fração 29-36, Tabela 24, pág. 51.....	189
Tabela 35:	Dados do tratamento cromatográfico da fração 11-20.....	189
Tabela 36:	Dados resultantes da cromatografia “flash” da fração 18-23 Tabela 28...	190
Tabela 37:	Dados resultantes da cromatografia em coluna da fração 40.....	192
Tabela 38:	Dados resultantes da cromatografia de partição do extrato etanólico.....	194
Tabela 39:	Dados resultantes do fracionamento cromatográfico da fração CH ₂ Cl ₂	194
Tabela 40:	Dados do fracionamento cromatográfico da fração AcOEt, Tabela 32....	195
Tabela 41:	Dados resultantes do fracionamento cromatográfico da fração AcOEt, Tabela 31.....	195
Tabela 42:	Dados resultantes do fracionamento cromatográfico do extrato hexano...	198
Tabela 43:	Dados resultantes do fracionamento cromatográfico da fração hexano, Tabela 35.....	199
Tabela 44:	Dados resultantes do fracionamento cromatográfico da fração 8-24.....	199
Tabela 45:	Dados resultantes do fracionamento cromatográfico da fração CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 50%.....	200
Tabela 46:	Dados obtidos do tratamento cromatográfico da fração 60-80.....	200
Tabela 47:	Dados obtidos do tratamento cromatográfico da fração 9-13.....	201
Tabela 48:	Dados referentes ao tratamento cromatográfico da fração 81, Tabela 45.	202
Tabela 49:	Dados obtidos do tratamento cromatográfico da fração 14-26.....	203
Tabela 50:	Dados do fracionamento cromatográfico da fração metanol.....	203
Tabela 51:	Dados do fracionamento cromatográfico da fração 28-47, pág. 184.....	204
Tabela 52:	Dados da cromatografia de partição do extrato etanólico.....	205
Tabela 53:	Dados resultantes do fracionamento cromatográfico da fração CH ₂ Cl ₂	205
Tabela 54:	Dados do tratamento cromatográfico da fração CH ₂ Cl ₂ /CD ₃ OD 50%.....	206

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 01:	Reação de metanólise de P-5	114
Fluxograma 02:	Síntese do procedimento para o isolamento dos compostos P-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e P-11 de <i>P. caribaeorum</i>	197
Fluxograma 03:	Síntese do procedimento para o isolamento dos compostos P-1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 12 e P-13 de <i>P. variabilis</i>	207

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CC	Coluna Cromatográfica
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CG/EM	Cromatografia Gasosa acoplado a espectrometria de massa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CPD	<i>Carbon Proton Decoupling</i>
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
EMAR	Espectrometria de massa de alta resolução
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Connectivity</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IV	Infravermelho
IDH	Índice de Deficiência de Hidrogênio
J	Constante de acoplamento
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
p.f.	Ponto de fusão
ppm	Partes por milhão
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹⁵N	Ressonância Magnética Nuclear de Nitrogênio-15
δ_H	Deslocamento químico no espectro de RMN ¹ H
δ_C	Deslocamento químico no espectro de RMN ¹³ C
Φ	Diâmetro da coluna utilizada na cromatografia
[α]_D²⁰	Rotação óptica específica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
2. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE AS ESPÉCIES MARINHAS.....	25
2.1 Filo Cnidário.....	26
2.2 Zoantídeos.....	27
2.3 <i>Palythoa caribaeorum</i>	27
2.4 <i>Protopalythoa variabilis</i>	29
3. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO SOBRE OS COMPOSTOS ISOLADOS DOS GÊNEROS <i>PALYTHOA</i> E <i>PROTOPALYTHOA</i>.....	31
4. ASPECTOS BISSINTÉTICOS DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DE <i>Palythoa caribaeorum</i> E <i>Protopalythoa variabilis</i>.....	40
4.1 Esteróides.....	40
4.2 Ácidos graxos e Ceramidas.....	42
5.1 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DE <i>Palythoa caribaeorum</i>	
5.1.1 Determinação estrutural de P-1	46
5.1.2 Determinação estrutural de P-2	52
5.1.3 Determinação estrutural de P-4	64
5.1.4 Determinação estrutural de P-7	78
5.1.5 Determinação estrutural de P-10	91
5.1.6 Determinação estrutural de P-3	105
5.1.7 Determinação estrutural de P-5	111
5.1.8 Determinação estrutural de P-6	125
5.1.9 Determinação estrutural de P-8	132
5.1.10 Determinação estrutural de P-9	150
5.1.11 Determinação estrutural de P-11	162
5.2 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DE <i>Protopalythoa variabilis</i>	
5.2.1 Determinação estrutural de P-12	166
5.2.2 Determinação estrutural de P-13	171
6. PARTE EXPERIMENTAL	
6.1 Métodos Cromatográficos.....	183
6.2 Métodos Físicos de Análise.....	183
6.2.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	183
6.2.2 Espectrometria de Massa (EM).....	184
6.2.3 Espectrometria de Massa de Alta Resolução (EMAR).....	185
6.2.4 Espectroscopia na região do Infravermelho (IV).....	185
6.2.5 Rotação Óptica	185
6.2.6 Ponto de Fusão.....	185
6.3 Material Marinho.....	186
6.4 Isolamento dos constituintes químicos fixos de <i>Palythoa caribaeorum</i>	187
6.4.1 Preparação do extrato hexânico.....	187
6.4.1.1 Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico e isolamento do composto P-1	187
6.4.1.2 Fracionamento cromatográfico da fração 24-28.....	187
6.4.1.3 Fracionamento cromatográfico da fração 8-13 e isolamento da substância P-2	188

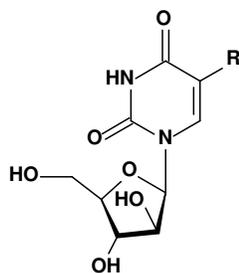
6.4.1.4	Fracionamento cromatográfico da fração 29-36.....	188
6.4.1.5	Tratamento cromatográfico da fração 11-20 e isolamento das substâncias P-4	189
6.4.1.6	Isolamento do composto P-3	190
6.4.1.7	Fracionamento cromatográfico da fração 36-45 e isolamento do composto P-5 e P-6	190
6.4.1.8	Isolamento da substância P-7	191
6.4.1.9	Tratamento cromatográfico da fração 40 e isolamento das substâncias P-8 e P-9	192
6.4.2	Preparação do extrato etanólico.....	194
6.4.2.1	Cromatografia de partição do extrato etanólico.....	194
6.4.2.2	Tratamento cromatográfico da fração AcOEt (Tabela 32) e isolamento de P-10	194
6.4.2.3	Fracionamento cromatográfico da fração AcOEt (Tabela 31) e isolamento de P-11	195
6.5	Isolamento dos constituintes químicos fixos de <i>Protopythoa variabilis</i>	198
6.5.1	Preparação do extrato hexânico.....	198
6.5.1.1	Fracionamento cromatográfico do extrato e isolamento do composto PV-1	198
6.5.1.2	Fracionamento cromatográfico da fração hexano.....	199
6.5.1.3	Fracionamento cromatográfico da fração 8-24 e isolamento da substância P-12	199
6.5.1.4	Tratamento cromatográfico da fração CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 50%.....	200
6.5.1.5	Tratamento cromatográfico das frações 60-80.....	200
6.5.1.6	Fracionamento cromatográfico das frações 9-13 e isolamento de PV-2	201
6.5.1.7	Tratamento cromatográfico das frações 81, Tabela 38.....	201
6.5.1.8	Tratamento cromatográfico da fração 14-26, Tabela 46.....	202
6.5.1.9	Tratamento cromatográfico da fração metanol.....	203
6.5.1.10	Fracionamento cromatográfico da fração 28-47.....	203
6.5.2	Preparação do extrato etanólico.....	205
6.5.2.1	Cromatografia de partição do extrato etanólico.....	205
6.5.2.2	Fracionamento cromatográfico da fração CH ₂ Cl ₂	205
6.5.2.3	Tratamento cromatográfico da fração CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH 50%.....	206
7.	CONCLUSÃO	209
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	213

INTRODUÇÃO
Produtos Naturais Marinhos

1. INTRODUÇÃO

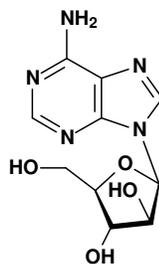
Produtos Naturais Marinhos

A imensa diversidade química produzidas por espécies de plantas, animais, microorganismos e fungos é resultado da evolução na seleção e conservação de importantes mecanismos de defesa utilizados, sobretudo para repelir, paralisar ou matar predadores [CRAGG & NEWMAN, 1999]. Os produtos naturais são substâncias produzidas por vegetais, microorganismos e animais, derivados do metabolismo primário ou secundário, e podem pertencer às mais diferentes classes de substâncias orgânicas [WINK, 1990]. A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. Dentre os diversos reinos da natureza, o reino vegetal é o que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de metabólitos secundários, muitos destes de grande valor agregado devido às suas aplicações como medicamento, cosméticos, alimentos e agroquímicos [PHILLIPSON *et al.*, 1998]. Entretanto, diversos metabólitos de organismos marinhos têm-se revelado eficientes sobre alvos biológicos. No início da década de 50, Bergmman e Feeney publicaram o isolamento dos nucleosídeos espongotimidina (1) e espongouridina (2), que serviram de inspiração para a síntese do adenina-arabinosídeo (3) um agente antiviral [ara-A (Vidarabine®)] e citosina-arabinosídeo (4) um agente antileucêmico [ara-C (Citarabine®)].



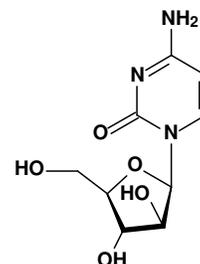
1. Espongotimidina, R = H

2. Espongouridina, R = CH₃



3. Adenina arabinosídeo

(ARA-A)

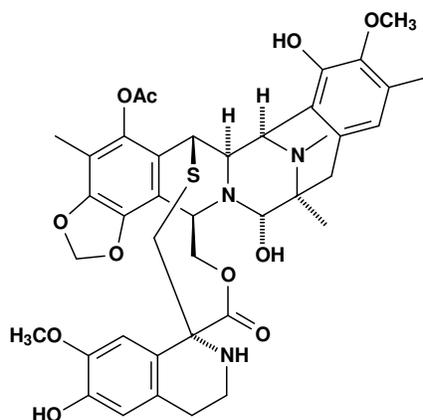


4. Citosina arabinosídeo

(ARA-C)

Recentemente, o quimioterápico antineoplásico trabectedina (5) teve sua aprovação pela agência européia de medicamentos (EMA – *European Medicine Agency*) para o tratamento de sarcoma de tecidos moles (EMA – 2009). Esta substância é um alcalóide tetra-hidroquinolínico isolado da ascídia caribenha *Ecteinascidia turbinata* que age alquilando o DNA. Ela se liga à guanina em seqüências

específicas de bases nas fendas menores da dupla hélice induzindo uma dobra nas fitas de DNA que tem diversas conseqüências como desorganização do citoesqueleto e bloqueio da divisão celular [ZEWAIL-FOOTE *et al.*, 2001; ERBA *et al.*, 2001].



5. Trabectadina

Os derivados ou isolados de produtos naturais marinhos possuem diversos alvos terapêuticos como canais iônicos, enzimas, microtúbulos, DNA, lisossomos, calmodulina, proteossomos, além de indução de estresse oxidativo e modulação do sistema imunológico [NEWMAN E CRAGG, 2006]. A identificação de novos alvos de ação tem sido de grande relevância para o tratamento do câncer, e é exatamente no estudo e na terapêutica dessa doença aonde se observa o maior impacto das substâncias de origem marinha [NEWMAN E CRAGG, 2006; HAEFNER, 2003].

Com base em levantamento bibliográfico utilizando *SciFinder ScholarTM* e *Web of Science*, a química de produtos naturais marinhos começou a evoluir a partir dos anos 70, atingindo excelência em pesquisa a partir dos anos 90, com mais de 1.700 publicações nesta última década (Gráfico 01, pág. 22). Atualmente, são conhecidas mais de 12.000 substâncias derivadas do metabolismo secundário de invertebrados e microorganismos marinhos, um número muito menor que os de substâncias isoladas a partir de plantas e microorganismos terrestres, cerca de 150.000 no total [JOSEPH, 2011 & GRAFE, 2001]. Entretanto, a diversidade estrutural das substâncias isoladas de marinhos, associadas às suas atividades biológicas, tem atraído progressivamente a atenção de diversos grupos de pesquisa do mundo inteiro [BLUNT *et al.*, 2003].

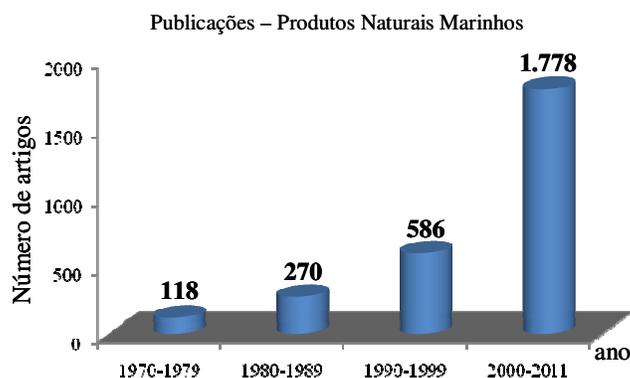


Gráfico 01: Publicações de artigos a partir de produtos naturais marinhos.

No Brasil, as pesquisas com produtos naturais marinhos tiveram início na década de 60 no Centro de Pesquisas de Produtos Naturais (CPPN) na Faculdade de Farmácia da UFRJ [KELECOM, 1997]. No entanto, ainda são poucas as informações documentadas em artigos científicos sobre as substâncias isoladas e a atividade biológica de produtos naturais de organismos marinhos coletados ao longo dos 7500 km de litoral brasileiro [PINTO *et al.*, 2002]. Apesar disso, os estudos na área têm demonstrado que os organismos marinhos são produtores em potenciais de substâncias estruturalmente inéditas, taxonomicamente relevantes e/ou biologicamente ativas [BERLINCK *et al.* 2004]. Apesar do litoral nordestino, com cerca de 3.300 km de extensão, ocupar a maior parte do litoral tropical brasileiro, este permanece praticamente inexplorado pelos grupos brasileiros de pesquisas que estudam produtos naturais marinhos, sendo, portanto, uma fonte bastante atraente para estudos.

Milhões de organismos marinhos produzem substâncias que são utilizadas na comunicação, defesa, inibição do desenvolvimento de competidores, reprodução ou simplesmente como subproduto do seu metabolismo [DONIA & HAMANN, 2003]. Sendo assim, essas moléculas podem apresentar atividades biológicas diversas, podendo ser úteis no desenvolvimento de novos fármacos contra muitas enfermidades.

Os zoantídeos, uma ordem do filo cnidário, são organismos exclusivamente marinhos, habitantes dos recifes costeiros. *Palythoa* é um zoantídeo colonial caracterizado pela incorporação de sedimentos nos tecidos de sua parede corporal. Estes organismos apresentam crescimento indeterminado, incrustante de substratos rochosos, formando extensos tapetes localizados nas áreas submersas, e quando expostas a maré baixa produzem um muco que protege a colônia da dessecação [SOARES *et al.*, 2006]. Estudos prévios têm demonstrado que o gênero constitui uma rica fonte de esteróides

[SHIGEMORI *et al.*, 1999]. *Palythoa caribaeorum* e *Protopalythoa variabilis* são encontrados em abundância no litoral cearense e de acordo com levantamento bibliográfico, ainda são poucos os estudos envolvendo estas espécies, motivando o estudo químico. Carballeira e Reyes (1995) relatam a identificação e caracterização de vários ácidos graxos a partir de uma fração lipídica, obtida da extração $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 1:1 de *P. caribaeorum*. Os ésteres metílicos, obtidos da reação com $\text{HCl}/\text{CH}_3\text{OH}$, foram analisados por CG/EM, o qual apresentou os seguintes compostos majoritários: ácido hexadecanóico (43%), octadecanóico (6,2%), 5,8,11,14-eicosatetraenóico (5,2%), 6,9,12,15-octadecatetraenóico (4,9%), 7,10,13,16-docosatetraenóico (4,8%) e heptadecenóico (4,5%).

No presente trabalho, foi investigada a composição química dos extratos hexânico e etanólico de duas espécies marinhas do litoral cearense, *P. caribaeorum* e *P. variabilis*, utilizando técnicas cromatográficas clássicas e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), o qual resultou no isolamento e identificação estrutural de seis esteróides tetracíclicos de esqueleto ergostano, um derivado do glicerol, um éster de cadeia alifática e quatro ceramidas, sendo duas delas sulfatadas. Este estudo químico de espécies marinhas fortalece a linha de pesquisa em química de produtos naturais marinhos no Curso de Pós-Graduação em Química da UFC.

CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE AS ESPÉCIES MARINHAS



2. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE AS ESPÉCIES MARINHAS

No estado do Ceará são encontradas três espécies de zoantídeos, que seguem a seguinte classificação taxonômica:

Reino Animália

Filo Cnidário

Classe Anthozoa

Família Zoanthidea

Gêneros/Espécies:

Palythoa

Palythoa caribaeorum Duchassaing & Michelotti, 1860

Protopalythoa

Protopalythoa variabilis Duerden, 1898

Zoanthus

Zoanthus sociatus Ellis, 1767



Emanuelle F. Rabelo

Figura 01: Fotografia mostrando o aspecto geral das colônias de zoantídeos em seu habitat natural (Praia de Paracuru – CE), durante a maré baixa. **A:** *Palythoa caribaeorum*, **B:** *Protopalythoa variabilis* e **C:** *Zoanthus sociatus*.

2.1 Filo Cnidário

Entre os diversos organismos encontrados nos recifes de arenito estão os cnidários. O filo cnidário é um conjunto bastante diverso que inclui as águas-vivas, anêmonas-do-mar, corais, hidrozoários e gorgônias, compreendendo cerca de 10.000 espécie separadas em quatro classes: Anthozoa, com cerca de 6.225 espécies; Hydrozoa, com 3.200 espécies; Scyphozoa, com 200 espécies e Cubozoa, com 20 espécies [BRUSCA & BRUSCA, 2007]. Apesar dessa diversidade, eles são animais relativamente simples caracterizados por possuírem nematocistos (cnidas), muito provavelmente resultado de um ancestral comum [MARQUES & COLLINS, 2004]. São animais diploblásticos, com apenas dois epitélios (epiderme e gastroderme) separados por uma camada denominada mesogléia. Possuem apenas uma cavidade corpórea denominada cavidade gastrovascular com apenas uma abertura para o ambiente, a boca. Os cnidários são em sua grande maioria marinhos, com exceção das hidras e de alguns poucos hidrozoários dulcícolas. A maioria habita águas rasas, e as formas sésseis são abundantes nas costas rochosas ou nas formações coralinas nas águas tropicais, com tendência de formar colônias por reprodução assexuada [RUPPERT *et al.*, 2004].

Todos os cnidários são carnívoros e se alimentam de pequenas presas que capturam com os tentáculos, imobilizadas pelos nematocistos. Os tentáculos carregam à presa para boca, onde é ingerida inteira. Um grande número de cnidário apresenta também associações simbióticas com algas pardas (zooxantelas) ou verdes (zooclorélas). Entre os cnidários que apresentam associações com algas estão os corais hermatípicos (formadores de recifes). Neste mutualismo, as algas fornecem nutrientes para os corais em forma de glicerol ou glicose e o cnidário produz resíduo metabólico que é absorvido pelas águas em forma de nitrogênio e fósforo [<http://www.biologia.blogger.com.br/> acessado em 18/05/2010].

2.2 Zoantídeos

Pertencentes ao filo cnidário, os zoantídeos são caracterizados por formas coloniais com duas coroas de tentáculos e um sifonoglifo [SINNIGER *et al.*, 2005]. Apresentam tendência a formar colônias de pólipos e um arranjo distinto de septos radiais internos. Os septos são pareados, cada par geralmente com um septo perfeito ou completo e um imperfeito ou incompleto [RYLAND & LANCASTER, 2003]. A Família Zoanthidae (zoantídeo) corresponde a um grupo de organismos sésseis abundantes nas regiões tropicais, particularmente em formações recifais, são cnidários polipóides exclusivamente marinhos e habitantes dos recifes costeiros. Esses organismos ficam sujeitos à subida e a descida da maré podendo permanecer por muitas horas emersos [MUIRHEAD & RYLAND, 1985].

2.3 *Palythoa caribaeorum* Duchassaing & Michelotti, 1860

Palythoa é um gênero de zoantídeos coloniais cujas espécies se caracterizam pela incorporação de grão de sedimento nos tecidos da sua parede corporal, que atuaria como uma estrutura de sustentação. Na espécie *Palythoa caribaeorum* (Fig. 02, pág. 28) [DUCHASSAING & MICHELOTTI, 1860] os pólipos estão conectados por um espesso tecido chamado cenénquima, o qual também agrega partículas na sua superfície. Estas colônias formam extensos “tapetes” localizados nas áreas submersas, mas quando estão expostos durante a maré baixa, seus pólipos produzem um muco que protege a colônia da dessecação. Em virtude deste muco, a espécie recebe a denominação popular de “baba-de-boi”.

Relatos populares, principalmente de pescadores, estimulam o estudo químico, farmacológico e toxicológico do zoantídeo *Palythoa caribaeorum*, já que o muco produzido pelo “baba-de-boi” é usado como analgésico e antiinflamatório sendo aplicado diretamente sobre as feridas e/ou pancadas [SOARES *et al.*, 2006]. Colônias desta espécie apresentam crescimento a uma velocidade média de 11,9 cm²/mês, sendo no início bem maior (exponencial) tendendo a estabilizar ao longo do tempo. Quando sujeitas à maior radiação solar apresenta crescimento mais lento, já em áreas submetidas à sombra ou nas paredes laterais mais protegidas das rochas seu crescimento é mais rápido [RABELO, 2007].



Fotografia: Emanuelle Rabelo

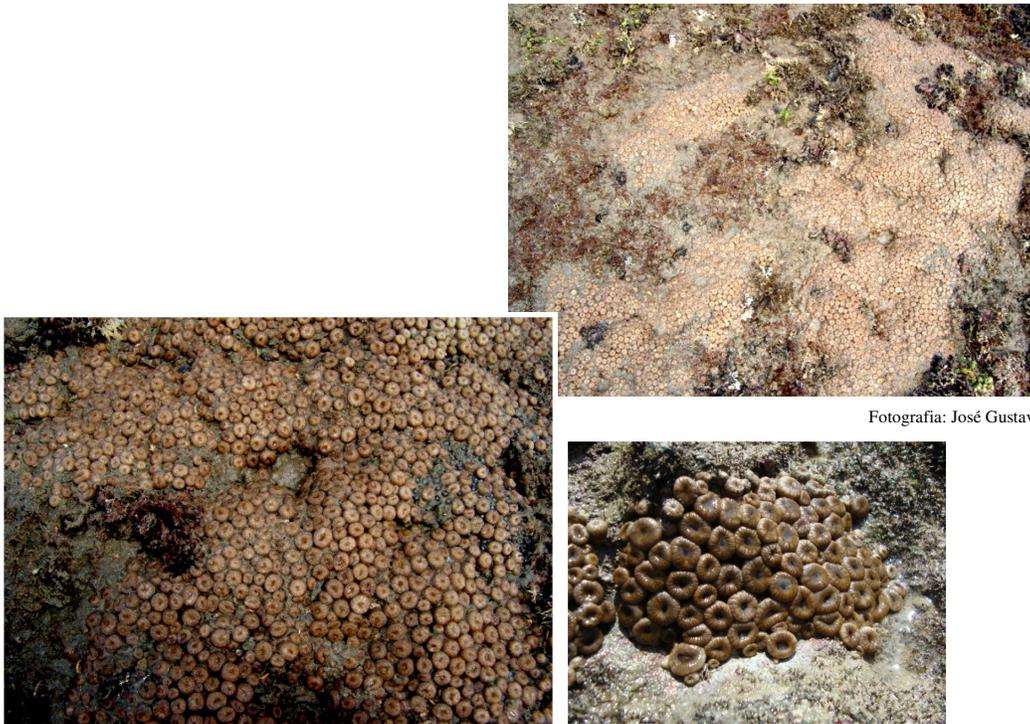


Fotografia: José Gustavo

Figura 02: Fotografias digitais mostrando o aspecto geral da colônia de *P. caribaeorum* em seu habitat natural, praia de Paracuru – CE.

2.4 *Protopalythoa variabilis* Duerden, 1898

Esta espécie marinha apresenta pólipos largos (8-14 mm de diâmetro, 15-40 mm de comprimento) com extensa abertura do disco oral. A coluna estreita em direção à base e as junções entre os pólipos são estolões filamentosos dos quais os pólipos são facilmente separados, apenas conectados por uma fina cenênquima basal, coloração da coluna marrom-clara e do disco oral marrom-escuro ou esverdeado [DUERDEN, 1902]. A longa coluna permite a essa espécie viver enterrada na areia geralmente até a base do disco oral, com a base da coluna ligada à rocha abaixo da camada de areia. *P. variabilis* (Fig. 03, pág. 29) é comumente encontrada formando grupos ou com pólipos separados. Alimenta-se de zooplâncton embora também dependa da nutrição autotrófica. Cresce a uma velocidade média de 5,74 cm²/mês, sendo este crescimento retardado na presença da alga verde *Caulerpa racemosa*, evidenciando a capacidade competitiva dessa espécie de alga [RABELO, 2007].



Fotografia: José Gustavo

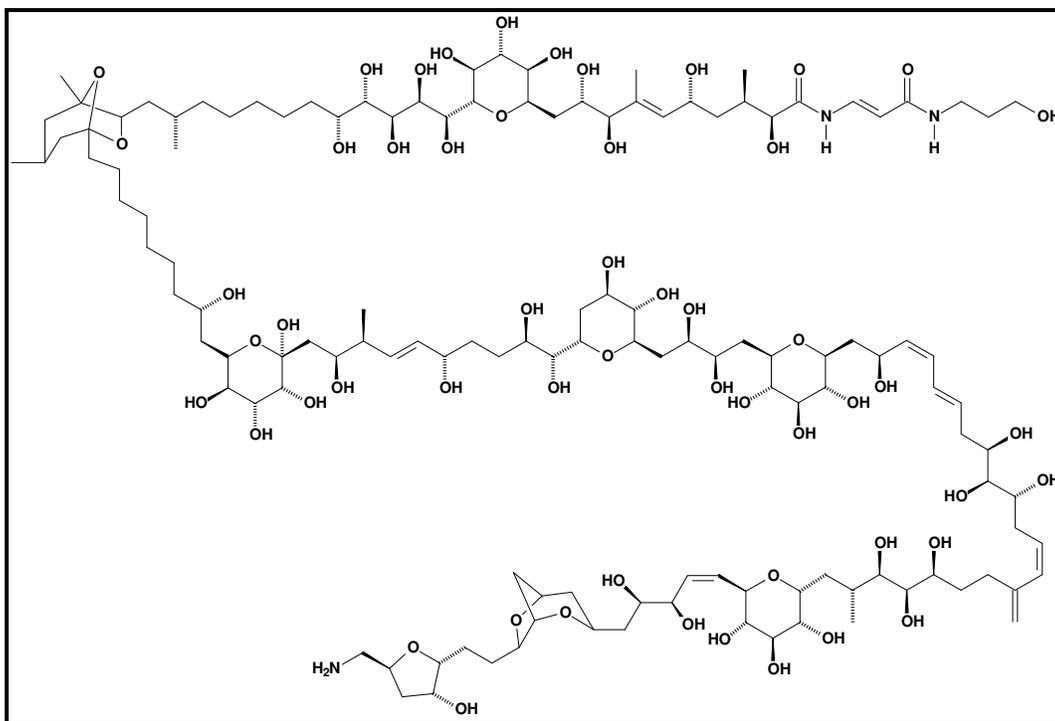
Figura 03: Fotografias digitais mostrando o aspecto geral da colônia de *P. variabilis* em seu habitat natural, praia de Paracuru – CE.

Levantamento bibliográfico sobre os compostos isolados de exemplares dos gêneros *Palythoa* e *Protopalythoa*

3. Levantamento bibliográfico sobre os compostos isolados de exemplares dos gêneros *Palythoa* e *Protopalythoa*

Espécies marinhas pertencentes ao gênero *Palythoa* (Ordem Zoantídeo) vêm sendo investigadas por mais de 50 anos. Os dados coletados de artigos publicados até julho de 2011, utilizando como ferramenta o *SciFinder Scholar*TM e *Web of Science*, mostraram um total de 31 substâncias isoladas (Tabela 01, pág. 33) de espécies do gênero *Palythoa*, e apenas dois compostos para o gênero *Protopalythoa*.

Entre os compostos isolados de *Palythoa*, destaca-se a palitoxina (PTX) (1), obtida pela primeira vez da espécie *Palythoa toxica* por Richard E. Moore e Paul J. Scheuer, 1971. Esta substância é um toxina de estrutura complexa e uma das mais tóxicas com LD₅₀ de 0,025 a 0,45 µg/kg, em experimentos *in vivo* realizados utilizando cachorros, coelhos, macacos, hamsters e camundongos através de injeção intravenosa [WILES *et al.*, 1974]. Estudos mostraram a ocorrência de PTX em *P. mammosa* [ATTAWAY & CIERESKO, 1974], *P. vestitus* [QUINN *et al.*, 1974], *P. caribaeorum* [BERESS *et al.*, 1983], *P. tuberculosa* [UEMURA *et al.*, 1985] e *P. aff. margaritae* [OKU *et al.*, 2004].



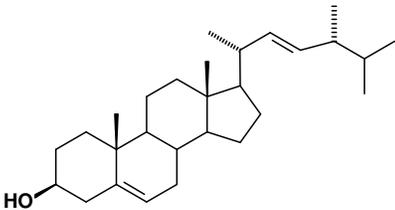
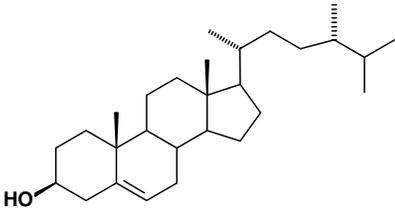
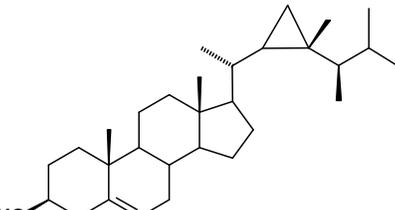
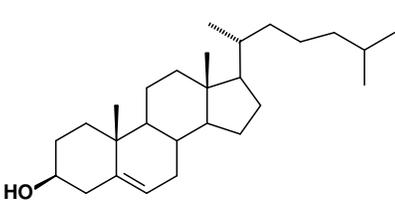
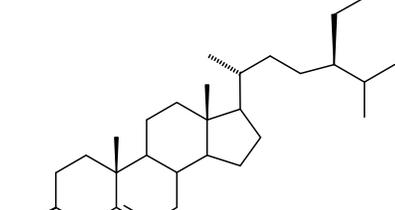
Palitoxina (1)

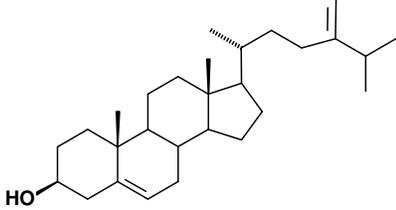
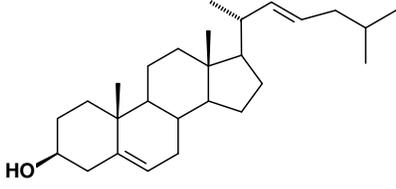
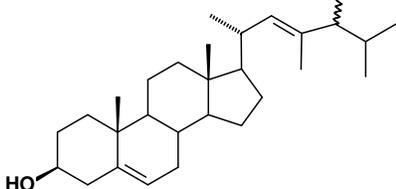
Palitoxina age ligando-se à bomba de $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ transformando-a em um canal catiônico monovalente. Devido a esse mecanismo a PTX causa lise em hemácias após um período de latência de até 2 horas e provoca alterações em células excitáveis [FRELIN & RENTERGHEM, 1995; TOSTESON *et al.*, 1991; HABERMANN *et al.*, 1981]. A PTX tem sido bastante útil como ferramenta farmacológica em estudos onde envolvem o K^+ como segundo mensageiro [JHA & ZI-RONG, 2004].

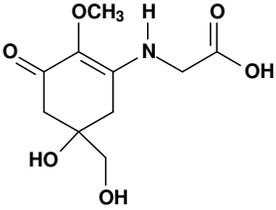
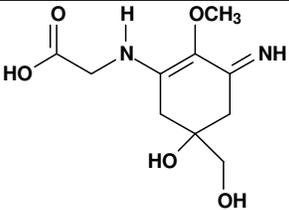
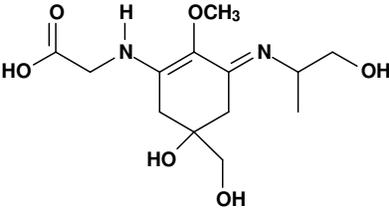
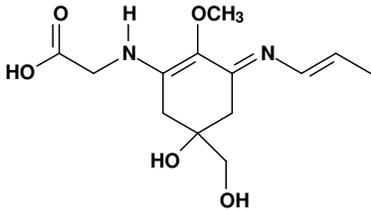
Conforme pode ser observado na Tabela 01 (pág. 33), apesar do estudo envolvendo espécies de *Palythoa* ser bastante antigo, até o presente, somente onze espécies foram investigados. Um total de 31 compostos foram isolados, na grande maioria pertencente à classe dos esteróides (**2-10**, **24-27**). Compostos nitrogenados (**11-16**), derivados do glicerol (**17-23**) e prostaglandinas (**28-29**) também foram isolados. Entre estas espécies investigadas destaca-se *P. tuberculosa*, de onde foi isolado grande número de compostos. *P. caribaeorum* também foi objeto de estudo prévio, entretanto, só foram identificados os seguintes ácidos graxos: ácido hexadecanóico (43%), octadecanóico (6,2%), 5,8,11,14-eicosatetraenóico (5,2%), 6,9,12,15-octadecatetraenóico (4,9%), 7,10,13,16-docosatetraenóico (4,8%) e heptadecenóico (4,5%) [CARBALLEIRA, 1995].

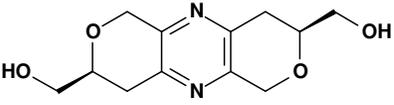
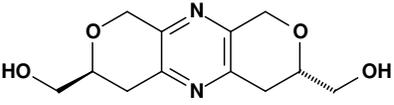
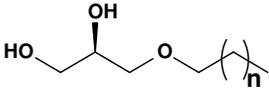
Para o gênero *Protopalythoa*, foi encontrado somente o relato do isolamento de dois constituintes químicos, dois α -aminoácidos de cadeia longa (**30-31**).

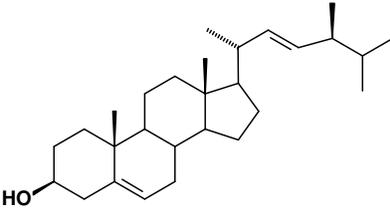
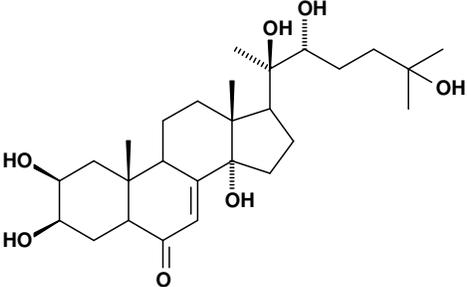
Tabela 01: Substâncias isoladas de *Palythoa* e *Protopalpythoa*

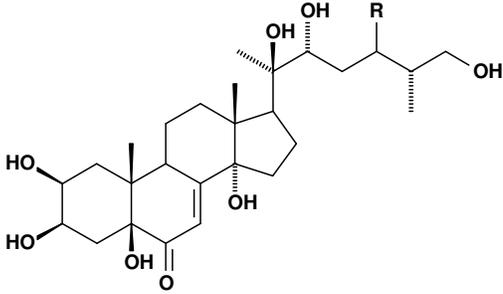
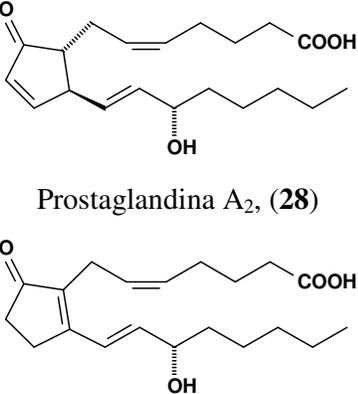
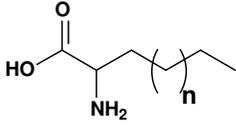
Espécie	Estrutura	Referência
<i>P. tuberculosa</i>	Campesterol (2)	GUPTA & SCHEUER, 1969
		
	Brassicasterol (3)	
		
	22,23-Diidrobrassicasterol (4)	
		
	Gorgosterol (5)	
		
Colesterol (6)		
		
β - sitosterol (7)		

Espécie	Estrutura	Referência
<i>Palythoa</i> sp.	Colesterol (8) Brassicasterol (3) 22,23-Diidrobrassicasterol (4) Gorgosterol (5)	KANAZAWA <i>et al.</i> , 1977
	 Calinasterol (8)	
	 5,22-(<i>E</i>)-dieno-colesterol (9)	
	 23,24-dimetil-5,22-(<i>E</i>)-dieno-colesterol (10)	

Espécie	Estrutura	Referência
<i>P. tuberculosis</i>	 <p>Micosporina-glicina (11)</p>	ITO, 1977
<i>P. tuberculosis</i>	 <p>Palitino (12)</p>	TAKANO, 1978a
<i>P. tuberculosis</i>	 <p>Palitinol (13)</p>  <p>Paliteno (14)</p>	TAKANO, 1978b
<i>P. tuberculosis</i>	<p>Palitoxina (1) Palitinol (13) Paliteno (14) Micosporina-glicina (11)</p>	UEDA, 1978

Espécie	Estrutura	Referência
<i>P. tuberculosis</i>	 <p style="text-align: center;">Palitazina (15)</p>  <p style="text-align: center;">Isopalitazina (16)</p>	UEMURA, 1979
<i>P. liscia</i>	 <p>glicerol 1-<i>O</i>-<i>n</i>-hexadecila n = 14, (17) glicerol 1-<i>O</i>-<i>n</i>-octadecila n = 16, (18)</p> $ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OCOCH}_2(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3 \\ \\ \text{CHOCOCH}_2(\text{CH}_2)_{n_1}\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2\text{OCOCH}_2(\text{CH}_2)_{n_2}\text{CH}_3 \end{array} $ <p>n = n₁ = n₂ = 13 (19) n = 13, n₁ = n₂ = 15 (20) n = n₂ = 15, n₁ = 13 (21) n = n₁ = 13, n₂ = 15 (22) n = n₂ = 13, n₁ = 15 (23)</p>	PETTIT, 1982

Espécie	Estrutura	Referência
<p><i>P. dartevellei</i> <i>P. monodi</i> <i>P. senegalensis</i></p>	<p>Campesterol (2) Brassicasterol (3) Gorgosterol (5) Colesterol (6)</p>  <p>Crinosterol (24) 22,23-Diidrobrassicasterol (4)</p>	<p>DIOP, 1986</p>
<p><i>Palythoa sp.</i></p>	 <p>20-hidroxicdiosona (25)</p>	<p>FEDOROV, 1988</p>

Espécie	Estrutura	Referência
<i>P. australiae</i>	 <p data-bbox="592 583 945 667">Palitoalone A, R = CH₃, (26) Palitoalone B, R = H, (27)</p>	SHIGEMORI, 1999
<i>P. kochii</i>	 <p data-bbox="625 877 912 909">Prostaglandina A₂, (28)</p> <p data-bbox="625 1119 912 1150">Prostaglandina B₂, (29)</p>	HAN, 2006
<i>Protopalythoa variabilis</i>	 <p data-bbox="568 1318 966 1402">Ácido 2-amino-<i>n</i>-triacontanóico, n = 25, (30)</p> <p data-bbox="548 1423 985 1507">Ácido 2-amino-<i>n</i>-hentriacontanóico, n = 26 (31)</p>	WILKE <i>et al</i> , 2009

**Aspectos biossintéticos dos constituintes químicos
isolados de *Palythoa caribaeorum* e *Protopalythoa
variabilis***

4. Aspectos biossintéticos dos constituintes químicos isolados de *Palythoa caribaeorum* e *Protopalythoa variabilis*

A investigação do extrato hexânico e etanólico de *P. caribaeorum* e *P. variabilis* resultou no isolamento de treze (13) metabólitos secundários, na grande maioria esteróides e ceramidas.

4.1 Esteróides

Os esteróides constituem uma classe de compostos naturais com ampla distribuição na natureza. Apresenta em sua estrutura básica um núcleo ciclopentano-perhidro-fenantreno, formado por quatro anéis condensados de hidrocarboneto (**A-D**), e uma cadeia lateral ramificada de hidrocarboneto unida ao carbono 17 do núcleo esteróidal (Fig. 04, pág. 40). Devido as suas características, estes compostos possuem caráter apolar e são insolúveis em água.

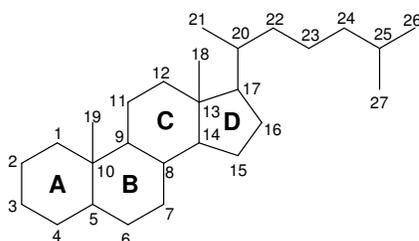


Figura 04: Estrutura básica dos esteróides

Os esteróides são derivados da via do ácido mevalônico, a partir da combinação de unidades de isopreno. O ácido mevalônico é formado a partir de duas unidades de acetil-CoA (**1**) que combinam-se através de uma condensação de Claisen formando acetoacetil-CoA (**2**) (Fig. 05, pág. 41). A incorporação de uma terceira unidade de acetil-CoA via uma adição aldólica estereoespecífica fornece o éster β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA (**3**), que é reduzido a ácido (3*R*)-mevalônico (**4**), num processo que depende de NADPH. Nos passos seguintes, o ácido mevalônico é fosforilado em seqüência e produz 5-fosfato de mevalonato, que é então descarboxilado, formando pirofosfato de isopentenila (**5**), que é a unidade de construção C₅ da biossíntese dos esteróides. A isomerização do pirofosfato de isopentenila (**5**) com a subsequente condensação cabeça-cauda destas unidades C₅, sob influência da preniltransferase, origina o pirofosfato de geranila (**6**). Este por sua vez, sofre adição seqüencial de pirofosfato de isopentenila (**5**) por conjugação entre as extremidades superior e inferior (cabeça-cauda), levando a formação do esqualeno (**7**), precursor dos esteróides

[DEWICK, 2009]. A ciclização do esqualeno origina os triterpenos (C_{30}) que leva a formação dos esteróides (C_{27} a C_{29}), por exemplo, o esteróide colesterol (C_{28}) (8), originário de várias etapas.

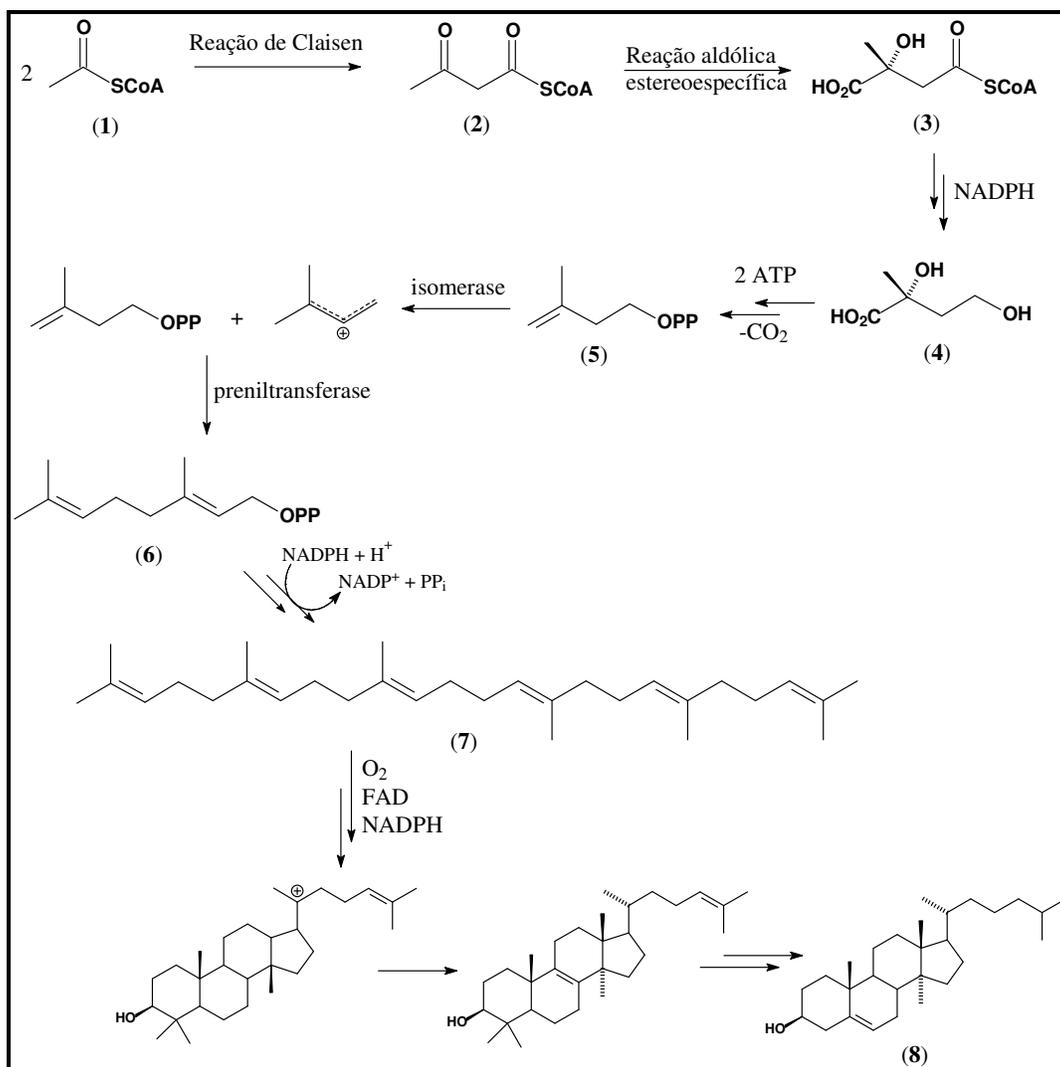


Figura 05: Esquema simplificado da rota biossintética dos esteróides (DEWICK, 2009)

4.2 Ácidos graxos e Ceramidas

Os ácidos graxos são sintetizados por uma sequência repetitiva de reações, catalisadas por um complexo enzimático, a ácido graxo sintase, o qual consiste de seis polipeptídeos que são: malonil-acetil-CoA-ACP transacetilase (**E1**), β -cetoacil-ACP sintase (KS) (**E2**), β -cetoacil-ACP redutase (KR) (**E3**), β -hidroxiacil-ACP desidratase (HD) (**E4**), enoil-ACP redutase (ER) (**E5**) e tioesterase (TE) (**E6**) [DEWICK, 2009].

A biossíntese inicia com a condensação do acetil-CoA e malonil-CoA (Fig. 06, pág. 42). A segunda etapa consiste no acoplamento de um resíduo acetila e um malonila, catalisados pelo complexo enzimático ácidos graxo sintase. Numa sequência de ciclos que se repete sete vezes, a cadeia carbonada aumenta em dois carbonos por ciclo até a formação do ácido palmítico - C₁₆ (**9**) (Fig. 07, pág. 24). A desidrogenação e/ou a oxidação dos ácidos graxos dá origem a outros produtos naturais de cadeia longa. Os ésteres de ácidos graxos são comumente encontrados esterificados com o glicerol formando os triglicerídeos e outras gorduras designadas de lipídeos, que se classificam em lipídeos simples, complexos e derivados. Ésteres alifáticos e ceramidas são exemplos de lipídeos simples [SIMÕES, 2004].

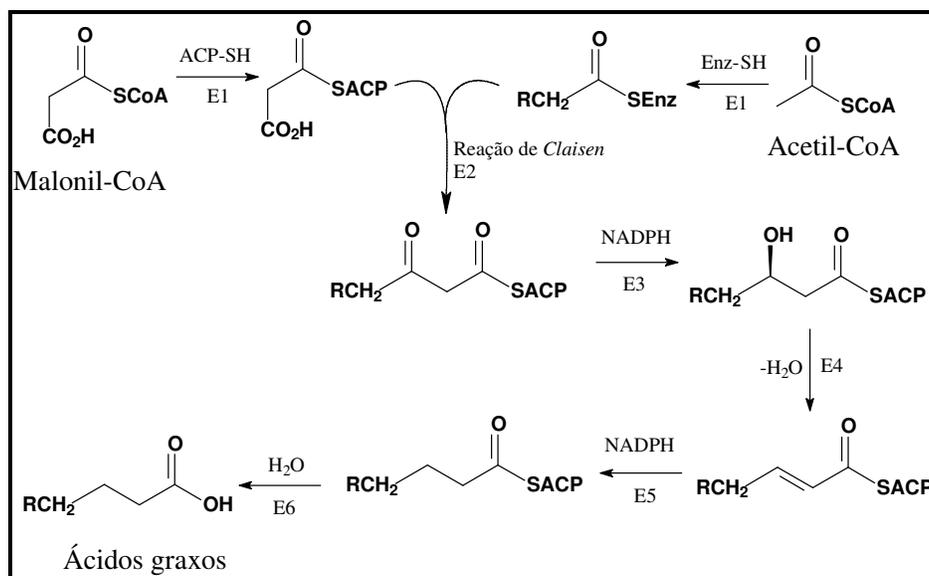


Figura 06: Esquema simplificado da biossíntese de ácidos graxos [DEWICK, 2009]

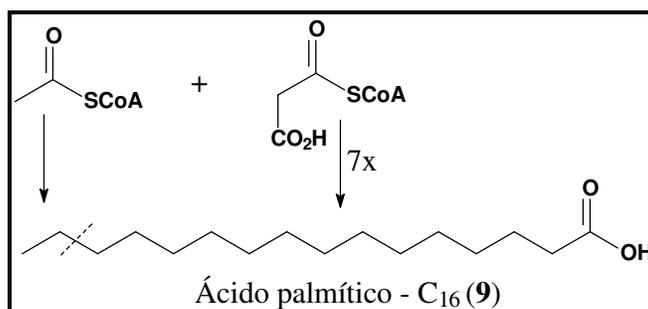


Figura 07: Esquema simplificado da biossíntese do ácido palmítico C₁₆

A esfingosina (2(*S*)-amino-4-octadeceno-1,3(*R*)-diol) (**10**) é um aminoálcool de 18 carbonos formado por um de hidrocarboneto insaturado de cadeia cadeia com dois grupos hidroxilas (-OH) e um grupo amino (-NH₂), parte principal dos esfingolipídeos, também designados de ceramidas, tipos de lipídeos presentes nas membranas celulares [RADIN, 2003]. Existe uma grande variedade de estrutural de ceramidas, podendo apresentar tanto na porção esfingosina e como na alquílica, mais de uma insaturação e ramificações com diferentes grupos alquilas [HUANG *et al.*, 2004; INAGAKI *et al.*, 2004; MURALIDHAR *et al.*, 2004].

A esfingosina (**10**) é formada pela condensação entre o palmitoil-CoA e o amino ácido serina, seguida de desidrogenação originando a diidroesfingosina que é finalmente oxidada pelo FAD a esfingosina. As ceramidas são formadas pela condensação de ácidos graxos-CoA com a esfingosina (Fig. 08, pág. 44).

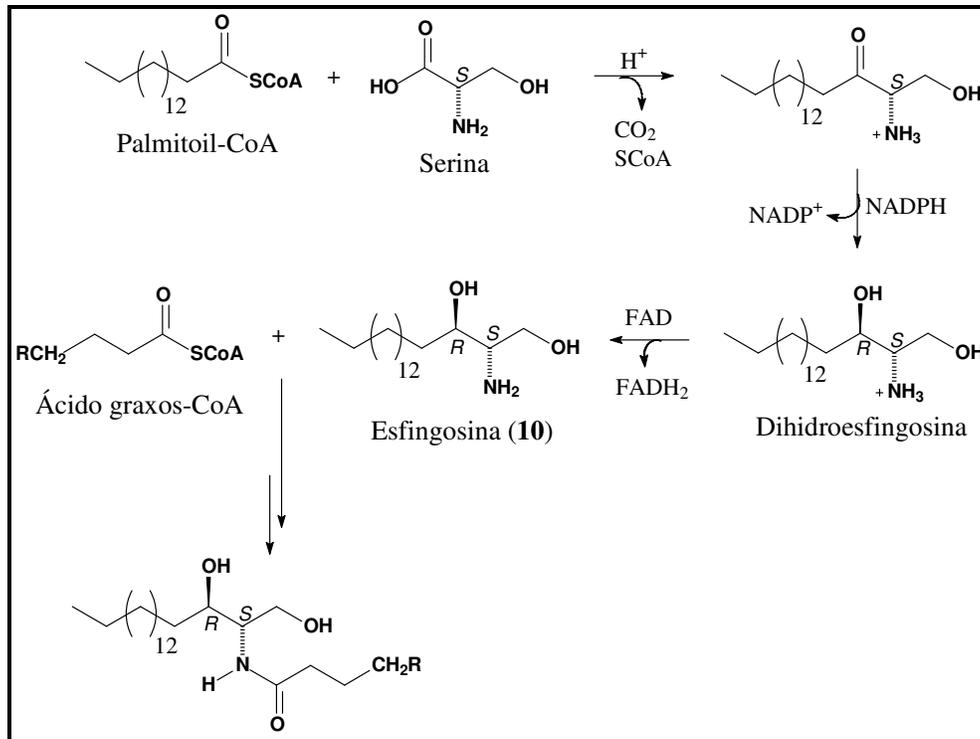
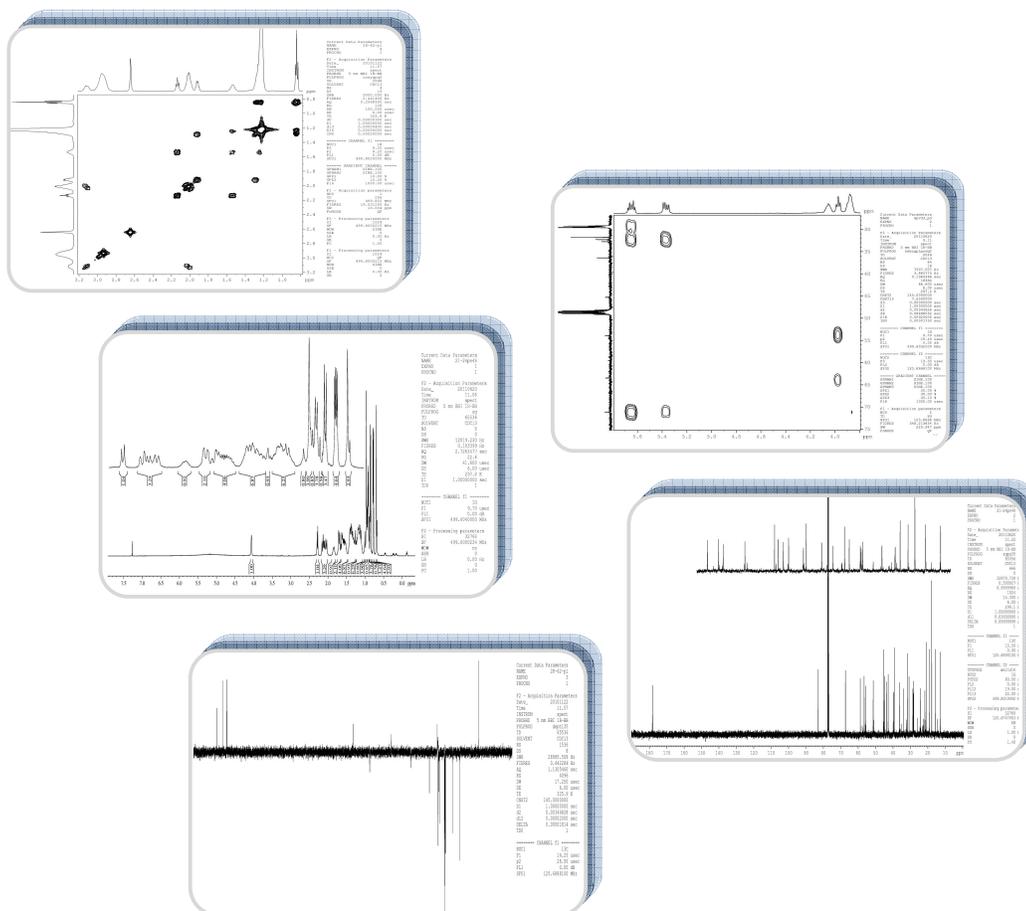


Figura 08: Esquema simplificado da biossíntese de ceramidas [RADIN, 2003; DEWICK, 2009]

**Determinação estrutural dos constituintes químicos isolados
de *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860) e
Protopalythoa variabilis (Duerden, 1898)**



5.1 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DE *Palythoa caribaeorum*

A determinação estrutural não foi escrita de acordo com a ordem cronológica de isolamento dos compostos, mas de acordo com suas semelhanças estruturais.

5.1.1 Determinação estrutural de P-1

A partir da fração hexano/AcOEt 40%, oriunda do extrato hexânico (item 6.4.1.1, pág. 187) e utilizando cromatografia em gel de sílica, foi possível isolar a substância denominada de **P-1** (~3,0 g). Este composto apresentou-se como um sólido branco amorfo, com ponto de fusão na faixa de 153-154 °C e $[\alpha]_D^{20} = -36$ ($c = 0,086$; CHCl₃), [p.f. = 157-158 °C e $[\alpha]_D^{20} = -34$ ($c = 0,01$; CHCl₃), ZHANG, 2006].

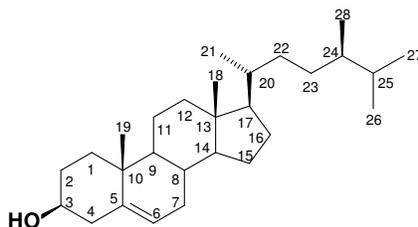
O espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) (Fig. 10, pág. 49) mostrou uma banda intensa em 3.418 cm⁻¹ característica de deformação axial de ligação O-H, absorções em 2.941 e 2.875 cm⁻¹ correspondentes a deformação axial assimétrica e simétrica de ligação C-H de grupamentos CH₂ e CH₃, respectivamente. Absorções em 1.640 cm⁻¹ de deformação axial C=C, 1.461 e 1.376 cm⁻¹ de deformação angular simétrica no plano para CH₂ e CH₃, além de absorção em 1.056 cm⁻¹ de ligação C-O [SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000].

O espectro de RMN ¹³C - CPD (Fig. 13, pág. 50), revelou sinais correspondentes a vinte e oito átomos de carbono. A análise do espectro DEPT 135° com sinais de CH e CH₃ em fase oposta a CH₂ (Fig. 14, pág. 51), possibilitou reconhecer seis carbonos metílicos (CH₃), dez metilênicos (CH₂), nove metínicos (CH) e três carbonos não hidrogenados (C) os quais foram verificados pela subtração dos espectros de RMN ¹³C-CPD e DEPT 135° (Tabela 2, pág. 47). É importante ressaltar a presença de um sinal em δ_c 72,0 referente a um carbono metínico oxigenado (HC-OH), e dois sinais olefínicos, um em δ_c 121,9 (CH) e outro em 140,9 (C).

Tabela 2: Padrão de hidrogenação dos carbonos de **P-1**

C	CH	CH ₂	CH ₃	Fórmula Molecular
140,9	121,9	40,0	20,7	
42,5	72,0 (HC-OH)	40,0	19,6	
36,7	57,0	32,1	19,1	
	56,2	33,9	17,8	
	50,3	37,4	15,6	
	39,3	21,3	12,0	
	36,4	28,4		
	32,1	28,4		
	31,6	30,8		
		31,8		
3 C	9 CH, OH	10 CH₂	6 CH₃	C₂₈H₄₈O, IDH 5

O espectro de RMN ¹H (Fig. 11, pág. 49), mostrou sinais em δ_H 0,66 (s); 0,78 (d, $J = 6,7$ Hz); 0,79 (d, $J = 6,9$ Hz); 0,86 (d, $J = 6,8$ Hz); 0,95 (d, $J = 6,6$ Hz) e 1,01 (s) ppm correspondentes a seis metilas, um multiplete em δ_H 3,52, com integração para um hidrogênio, característico de hidrogênio ligado a carbono carbinólico além de um sinal em δ_H 5,35 na região de hidrogênio ligado a carbono sp^2 (olefínico) corroborando com o espectro de RMN ¹³C. De acordo com os dados de IV, RMN ¹H, ¹³C e comparação com os dados da literatura (Tabela 3, pág. 48), foi plausível sugerir para **P-1**, um esteróide tetracíclico de esqueleto ergostano contendo uma ligação dupla entre os carbonos C-5 e C-6 de nomenclatura 24(*R*)-ergost-5-en-3 β -ol de nome usual campesterol (Fig. 9, pág. 47). Há relatos do isolamento deste composto em espécies do gênero *Palythoa* como, por exemplo, *P. tuberculosa* [GUPTA & SCHEUER, 1969], *P. senegalensis*, *P. dartavellei* e *P. monodi* por Diop e colaboradores (1986).

**Figura 9:** Estrutura do composto **P-1** (campesterol)

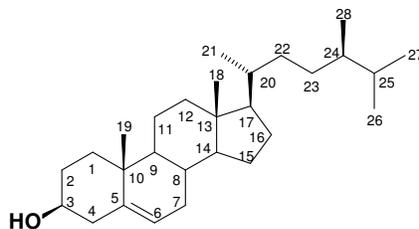


Tabela 3: Deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C de **P-1** (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) comparados com os descritos na literatura para campesterol (CDCl_3 , 75 e 300 MHz) [ZHANG *et al.*, 2006].

C	P-1	Campesterol	P-1	Campesterol
	δ_{C}			δ_{H}
1	37,4	37,2		
2	31,8	31,6	5,35	5,35
3	72,0	71,8	(1H, d largo, H-6)	(1H, d largo, H-6)
4	40,0	39,7	3,52 (1H, m, H-3)	3,53 (1H, m, H-3)
5	140,9	140,7	2,30 (2H, m)	2,27 (2H, m)
6	121,9	121,7	2,02 (2H, m)	2,00 (2H, m)
7	32,1	31,9	1,85 (m)	1,85 (m)
8	32,1	32,4	1,03 – 1,68 (m)	1,07 – 1,56 (m)
9	50,3	50,1	1,01 (3H, s, H-19)	1,01 (3H, s, H-19)
10	36,7	36,5	0,95	0,91
11	21,3	21,0	(3H, d, 6,6 Hz, H-21)	(3H, d, 6,5 Hz, H-21)
12	40,0	39,7	0,86	0,85
13	42,5	42,3	(3H, d, 6,8 Hz, H-26)	(3H, d, 6,5 Hz, H-26)
14	56,2	56,0	0,79	0,80
15	28,4	28,2	(3H, d, 6,9 Hz, H-27)	(3H, d, 6,5 Hz, H-27)
16	28,4	28,3	0,78	0,77
17	57,0	56,7	(3H, d, 6,7 Hz, H-28)	(3H, d, 6,5 Hz, H-28)
18	12,0	11,8	0,66 (3H, s, H-18)	0,68 (3H, s, H-18)
19	19,6	18,7		
20	36,4	35,8		
21	19,1	19,4		
22	33,9	33,7		
23	30,8	30,2		
24	39,3	38,8		
25	31,6	30,2		
26	20,7	20,2		
27	17,8	18,2		
28	15,6	15,3		

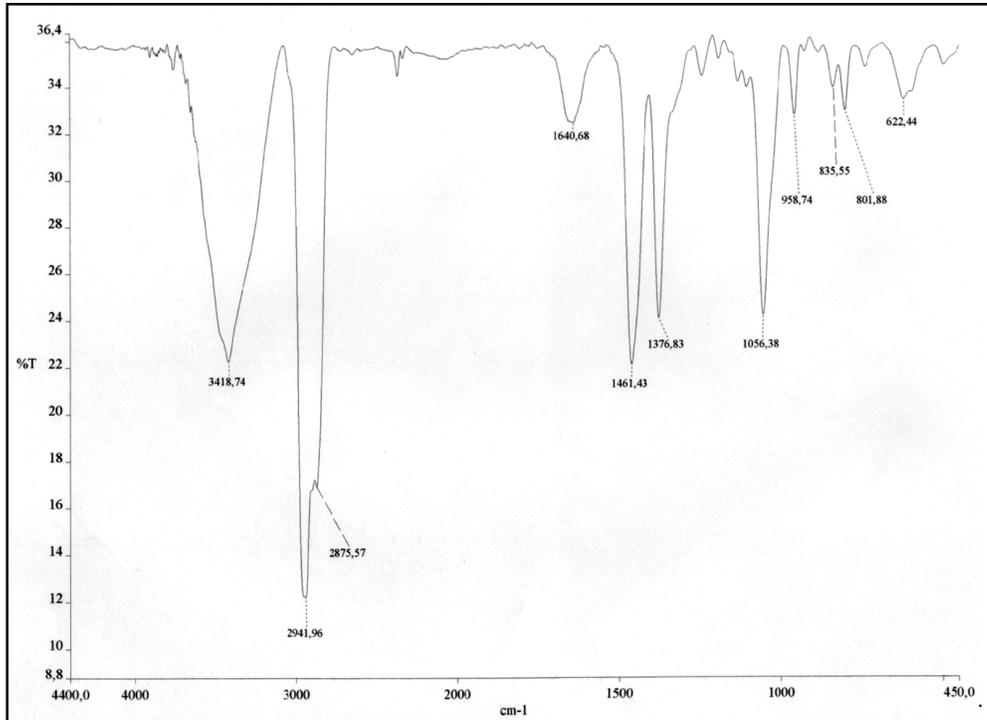


Figura 10: Espectro de infravermelho (KBr) de P-1

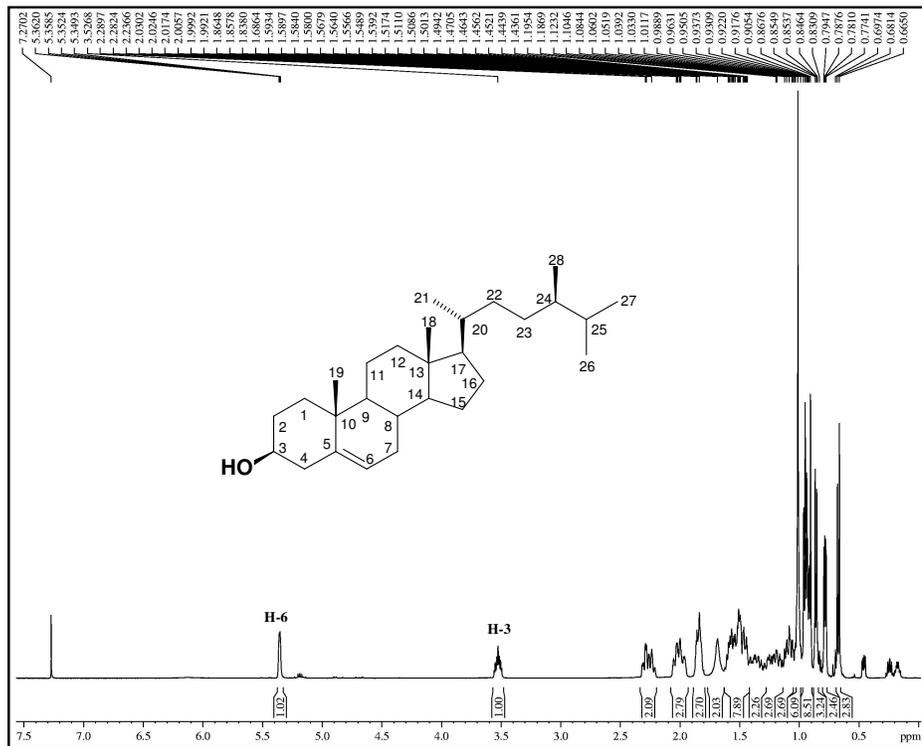


Figura 11: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de P-1

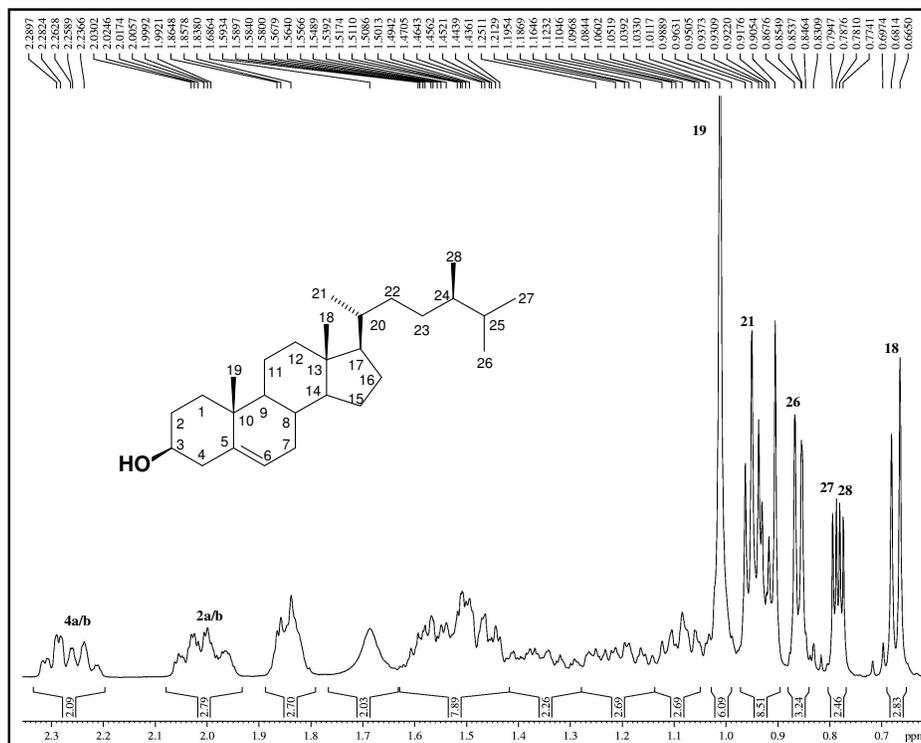


Figura 12: Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de P-1

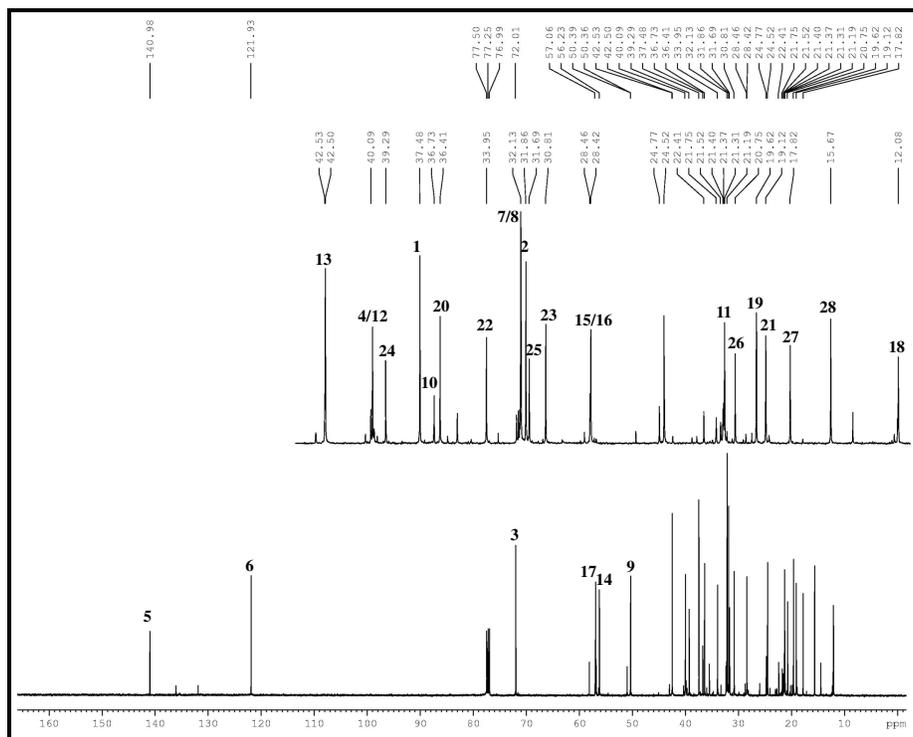


Figura 13: Espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, CDCl_3) de P-1

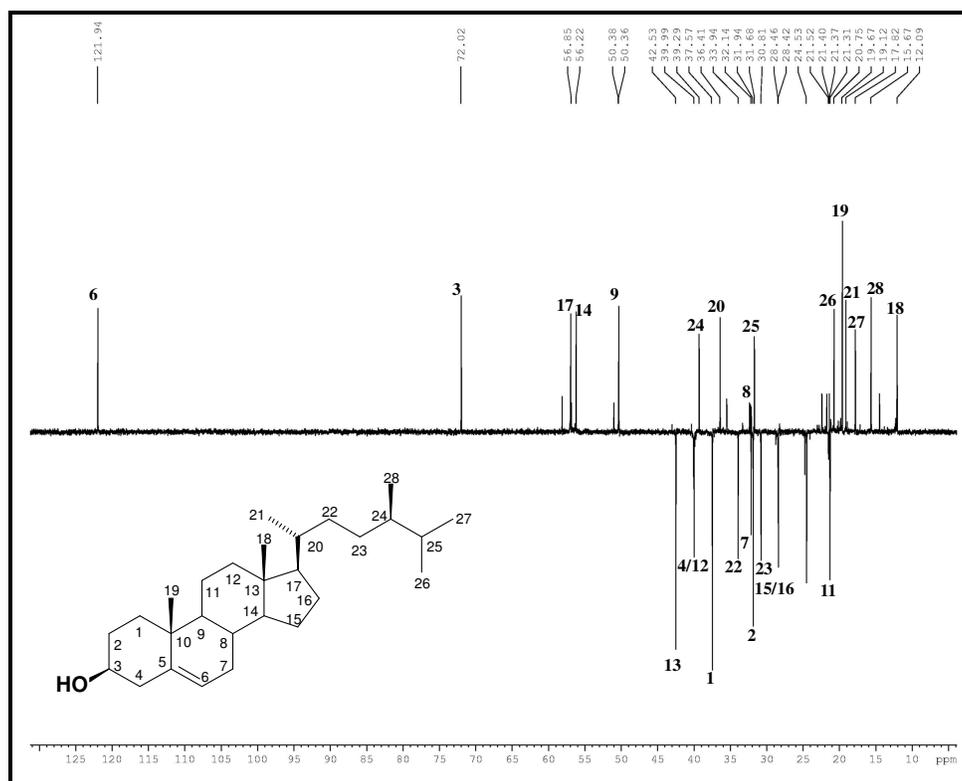


Figura 14: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de P-1

5.1.2 Determinação estrutural de P-2

A substância denominada **P-2** (15,9 mg) foi isolada a partir da cromatografia em gel de sílica da fração hexano/AcOEt 60%, oriunda do extrato hexânico (item 6.4.1.1, pág. 187). Este composto apresentou-se como um sólido branco amorfo, com faixa de fusão entre 136-137 °C e $[\alpha]_D^{20} = -46$ ($c = 0,076$; CHCl₃), [p. f. = 143 - 145 °C, GAO *et al.*, 2001].

O espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) (Fig. 17, pág. 57) mostrou absorção em 3.387 cm⁻¹ de estiramento de ligação O-H. As bandas 2.920 e 2.851 cm⁻¹ correspondentes a deformação axial assimétrica e simétrica de ligação C-H de grupamentos CH₂ e CH₃, respectivamente. Absorções de deformação axial C=C em 1.636 cm⁻¹. Apresentou bandas em 1.467 e 1.380 cm⁻¹ de deformação angular simétrica no plano para CH₂ e CH₃, além de absorções em 1.183 e 1.059 cm⁻¹ de deformação axial C-O [SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000].

O espectro de massa de alta resolução (EMAR) (Fig. 18, pág. 57) no modo positivo exibiu um pico em m/z 453,3333 [M + Na]⁺ referente ao aduto de sódio, pertinente a seguinte fórmula molecular C₂₈H₄₆O₃Na (calculado m/z 453,3339).

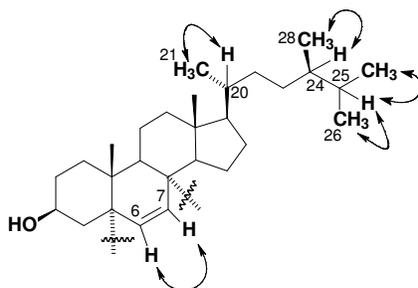
O espectro de RMN ¹H (Fig. 19, pág. 58) de **P-2** apresentou-se semelhante ao espectro de **P-1** (Fig. 11, pág. 30), onde foi observado um multipeto em δ_H 3,97 ppm característico de hidrogênio ligado a carbono carbinólico e sinais em δ_H 0,91 (d, 6,7 Hz); 0,88 (s); 0,86 (d, 6,7 Hz); 0,79 (s); 0,78 (d, 6,7 Hz) e 0,77 (d, 6,7 Hz) ppm, correspondentes a seis metilas. Além destes, verificaram-se dois sinais desprotegidos em δ_H 6,50 (d) e 6,24 (d), ambos com constante de acoplamento (J) de 6,4 Hz, compatível com hidrogênios ligados a uma dupla ligação com configuração *cis*.

O espectro de RMN ¹³C-CPD (Fig. 21, pág. 59) de **P-2** mostrou 28 linhas espectrais indicativo de esteróides. A comparação dos espectros de RMN ¹³C e DEPT 135° (Fig. 22, pág. 59) permitiu determinar o padrão de hidrogenação referente a cada carbono: seis carbonos metílicos, nove carbonos metilênicos, nove carbonos metínicos e quatro não-hidrogenados (Tabela 4, pág. 53). Os deslocamentos químicos em δ_C 82,3 (C); 79,6 (C) e 66,7 (C-H) foram característicos de carbonos oxigenados enquanto os sinais em δ_C 135,6 (C-H) e 130,9 (C-H) evidenciaram uma ligação dupla dissubstituída.

Tabela 4: Padrão de hidrogenação de **P-2**

C	CH	CH ₂	CH ₃	Fórmula Molecular
82,3 (C-O)	135,6	39,6	20,7	
79,6 (C-O)	130,9	37,1	18,9	
44,9	66,7 (CH-OH)	34,9	18,3	
37,2	56,5	33,7	17,8	
	51,8	30,7	15,6	
	51,3	30,2	12,8	
	39,2	28,4		
	35,8	23,6		
	31,6	20,8		
4 C, 2 O	9 CH, OH	9 CH₂	6 CH₃	C₂₈H₄₆O₃, IDH 6

No espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY (Fig. 23, pág. 60) foram visualizados vários acoplamentos, entre estes, podemos destacar o hidrogênio em δ_{H} 6,24 (H-6) com o sinal em δ_{H} 6,51 (H-7); e acoplamento do hidrogênio em δ_{H} 1,33 (H-20) com 0,91 (3H-21); δ_{H} 1,22 (H-24) com 0,77 (3H-28), e do sinal em δ_{H} 1,57 (H-25) correlacionando com 0,86 (H-26) e 0,78 (H-27), indicando a posição das metilas como mostra a subestrutura a seguir:



A análise detalhada do espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC (Tabela 6, pág. 56) (Fig. 24, pág. 61) permitiu a inequívoca correlação das linhas espectrais de carbono aos seus respectivos hidrogênios. Neste espectro, foram mostrados na região de carbono sp^2 as correlações dos hidrogênios em 6,24 (H-6) e 6,50 (H-7) com os carbonos em 135,6 (C-6) e 130,9 (C-7), respectivamente. A correlação dos hidrogênios em δ_{H} 0,77; 0,78; 0,79; 0,86; 0,88 e 0,91 com os carbonos em δ_{H} 15,6; 17,8; 12,8; 20,7; 18,3 e 18,9 respectivamente, assegurou a correta atribuição dos grupos metilas.

Os dados observados no espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (Fig. 25, pág. 62) foram imprescindíveis para a localização da ligação dupla bem como das funções oxigenadas no esqueleto esteroidal (Fig. 15, pág. 54). Observaram-se correlações a três ligações (3J) dos hidrogênios em δ_{H} 6,24 (H-6) com o carbono em δ_{C}

79,6 (C-8) e 6,50 (H-7) com o carbono em δ_C 82,3 (C-5), ambos oxigenados, além do hidrogênio em δ_H 1,47 (H-9) com o carbono de dupla ligação em δ_C 130,9 (C-7) ppm.

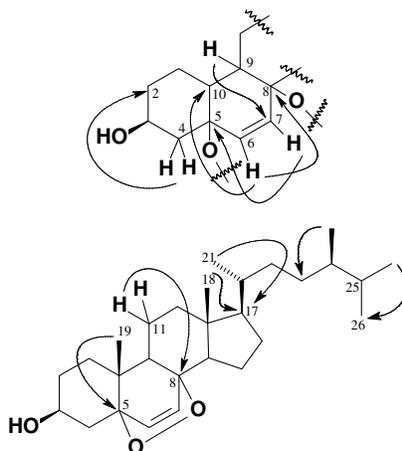


Figura 15: Principais correlações ^1H , ^{13}C – HMBC de **P-2**

Diante dos dados obtidos dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensional e posterior comparação com os dados de RMN ^1H e ^{13}C com os descritos na literatura para esteróides (Tabela 5, pág. 55), pôde-se concluir que o composto **P-2** trata-se do esteróide $5\alpha,8\alpha$ -epidioxi- $24(R)$ -ergost-6-en- 3β -ol. Seu isolamento está sendo relatado pela primeira vez no gênero *Palythoa*, entretanto, Ioannoua *et al* (2009), relatou seu isolamento e de análogos do tipo $5\alpha,8\alpha$ -epidioxiesterol das espécies marinhas *Eunicella cavolini* (Gorgônia) e *Trididemnum inarmatum* (Ascídia).

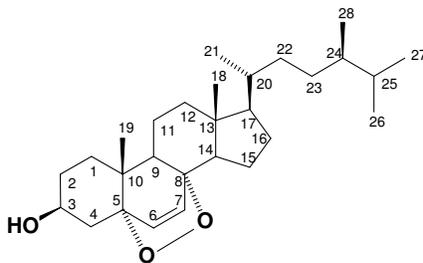


Figura 16: Estrutura do composto **P-2**

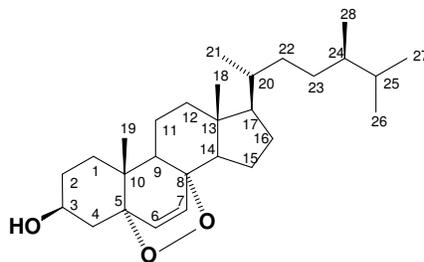


Tabela 5: Deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C de **P-2** (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) comparados com os descritos na literatura para o $5\alpha,8\alpha$ -epidioxi-24(*R*)-ergost-6-en-3 β -ol (CDCl_3 , 300 e 75 MHz) [IOANNOUA *et al.*, 2009].

P-2		5$\alpha,8\alpha$-epidioxi-24(<i>R</i>)-ergost-6-en-3β-ol		P-2		5$\alpha,8\alpha$-epidioxi-24(<i>R</i>)-ergost-6-en-3β-ol	
C	δ_{C}		δ_{H}				
1	34,9	34,4	6,50	6,49			
2	30,2	30,1	(1H, d, 6,4 Hz, H-7)	(1H, d, 8,5 Hz, H-7)			
3	66,7	66,5	6,24	6,23			
4	37,1	37,0	(1H, d, 6,4 Hz, H-6)	(1H, d, 8,5 Hz, H-6)			
5	82,3	82,1	3,97	3,95			
6	135,6	135,4	(1H, m, H-3)	(1H, m, H-3)			
7	130,9	130,8	0,93 – 2,13 (m)	1,02 – 2,09 (m)			
8	79,6	79,4	0,91	0,88			
9	51,3	51,0	(3H, d, 6,7 Hz, H-21)	(3H, d, 6,5 Hz, H-21)			
10	37,2	37,0	0,88	0,86			
11	23,6	23,4	(3H, s, H-19)	(3H, s, H-19)			
12	39,6	39,4	0,86	0,83			
13	44,9	44,7	(3H, d, 6,7 Hz, H-26)	(3H, d, 6,9 Hz, H-26)			
14	51,8	51,6	0,79	0,78			
15	20,8	20,6	(3H, s, H-18)	(3H, s, H-18)			
16	28,4	28,3	0,78	0,78			
17	56,5	56,4	(3H, d, 6,7 Hz, H-27)	(3H, d, 6,5 Hz, H-27)			
18	12,8	12,5	0,77	0,75			
19	18,3	18,2	(3H, d, 6,7 Hz H-28)	(3H, d, 6,5 Hz H-28)			
20	35,8	35,7					
21	18,9	18,7					
22	33,7	33,8					
23	30,7	30,5					
24	39,2	39,0					
25	31,6	32,4					
26	20,7	20,2					
27	17,8	18,3					
28	15,6	15,4					

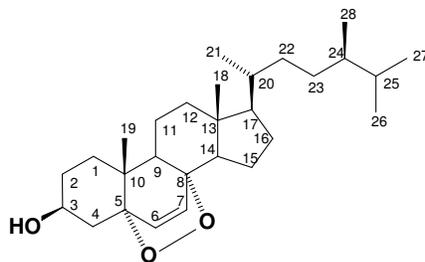


Tabela 6: Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C e ^1H e correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C (HSQC e HMBC) de **P-2**

C	HSQC		HMBC	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)(multip, $J_{\text{H,H}}$)	$^2J_{\text{C-H}}$	$^3J_{\text{C-H}}$
1	34,9	1,94; 1,70		3H-19
2	30,2	1,84; 1,52		H-4
3	66,7	3,97 (1H, m)	H-4	
4	37,1	2,08 (dd, 13,0 e 1,8 Hz) 1,90 (dd, 13,0 e 1,8 Hz)		
5	82,3	-	H-4; H-6	H-7; 3H-19
6	135,6	6,24 (1H, d, 6,4 Hz)		
7	130,9	6,50 (1H, d, 6,4 Hz)		H-9
8	79,6	-	H-7	
9	51,3	1,47		3H-19
10	37,2	-	3H-19	H-4; H-6
11	23,6	1,49; 1,20	H-9	
12	39,6	1,97		
13	44,9	-	3H-18	2H-11
14	51,8	1,54		3H-18
15	20,8	1,63; 1,38		
16	28,4	1,91; 0,94		
17	56,5	1,18		3H-18; 3H-21
18	12,8	0,79 (3H, s)		H-14
19	18,3	0,88 (3H, s)		
20	35,8	1,33		
21	18,9	0,91 (3H, d, 6,7 Hz)		
22	33,7	1,36; 0,94		
23	30,7	1,37; 0,93		
24	39,2	1,22		3H-26
25	31,6	1,57		
26	20,7	0,86 (3H, d, 6,7 Hz)	H-25	3H-27
27	17,8	0,78 (3H, d, 6,7 Hz)		3H-26
28	15,6	0,77 (3H, d, 6,7 Hz)		

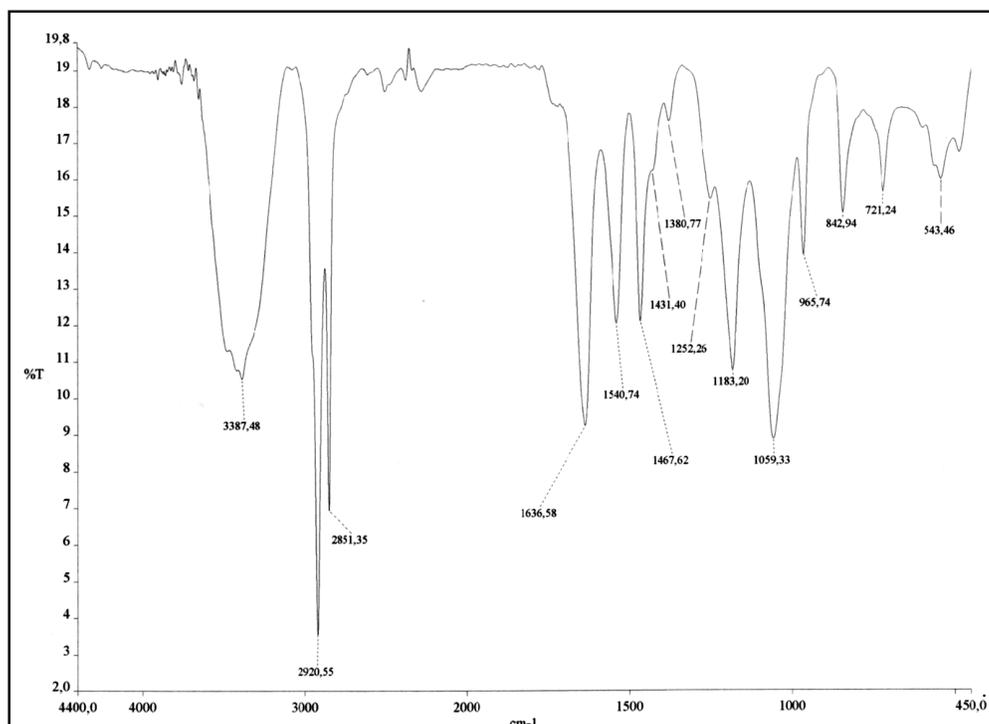


Figura 17: Espectro de infravermelho (KBr) de **P-2**

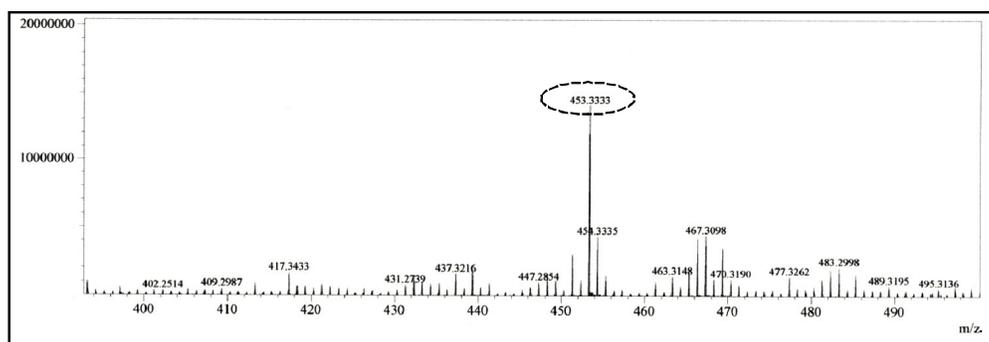


Figura 18: Espectro de massa de alta resolução $[M + Na]^+$ de **P-2**

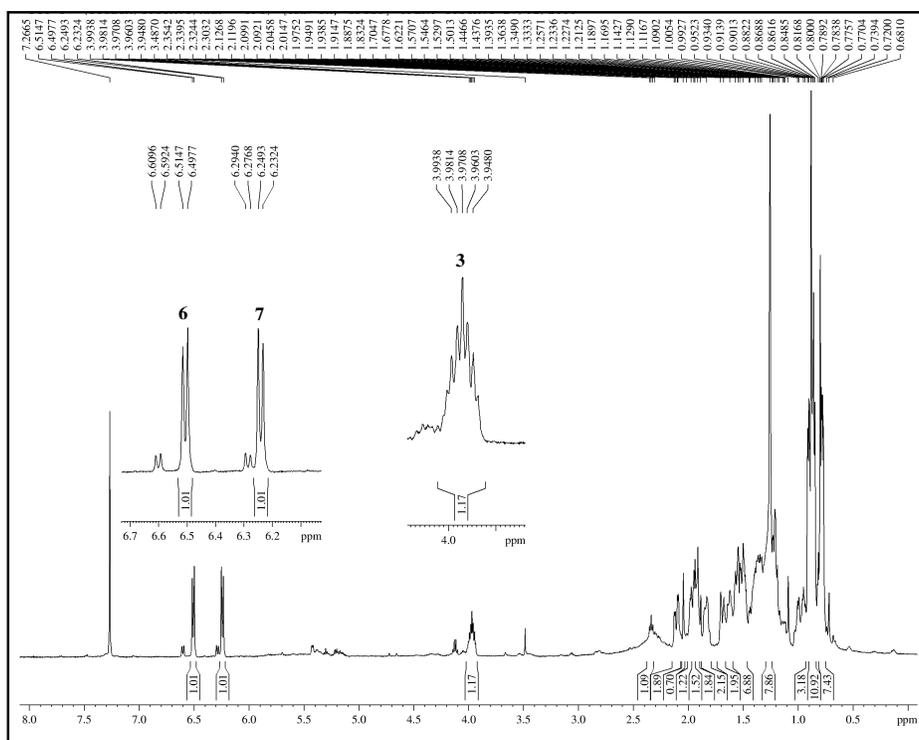


Figura 19: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de P-2

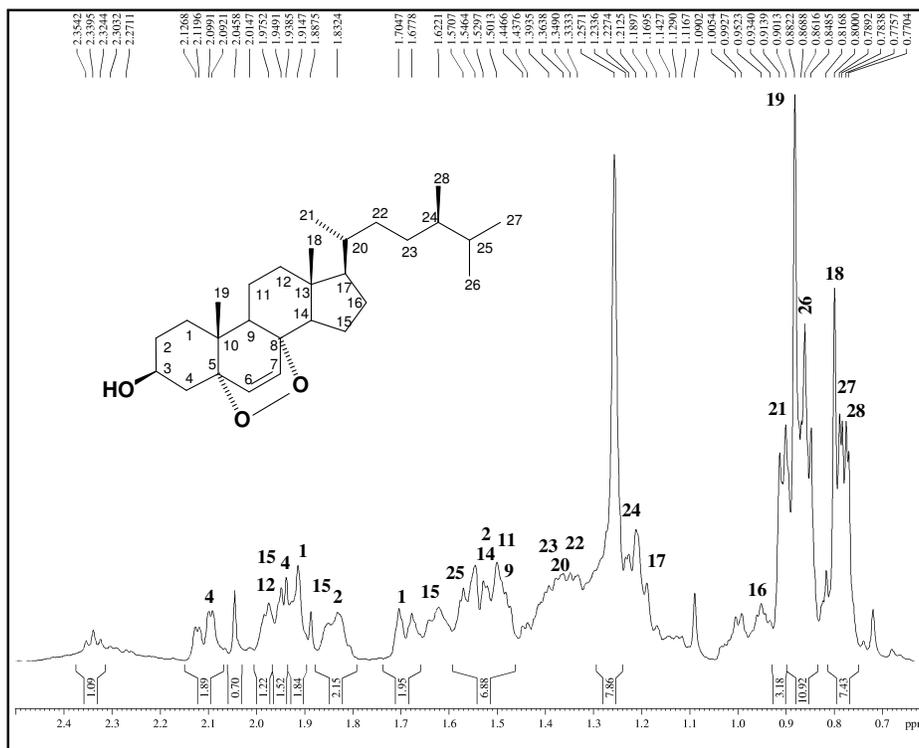


Figura 20: Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de P-2

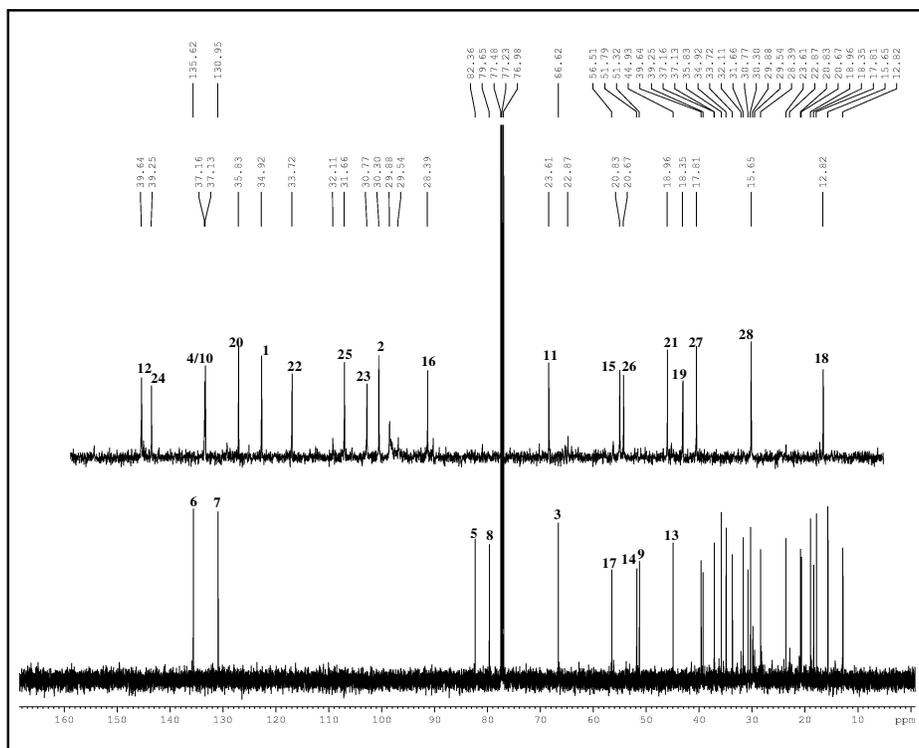


Figura 21: Espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, CDCl_3) de P-2

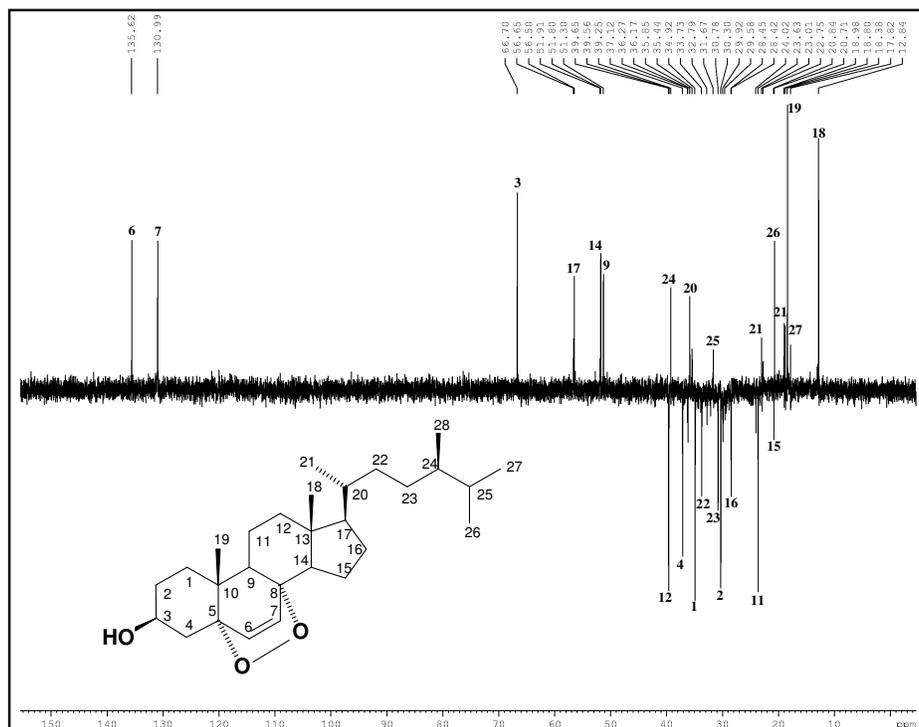


Figura 22: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de P-2

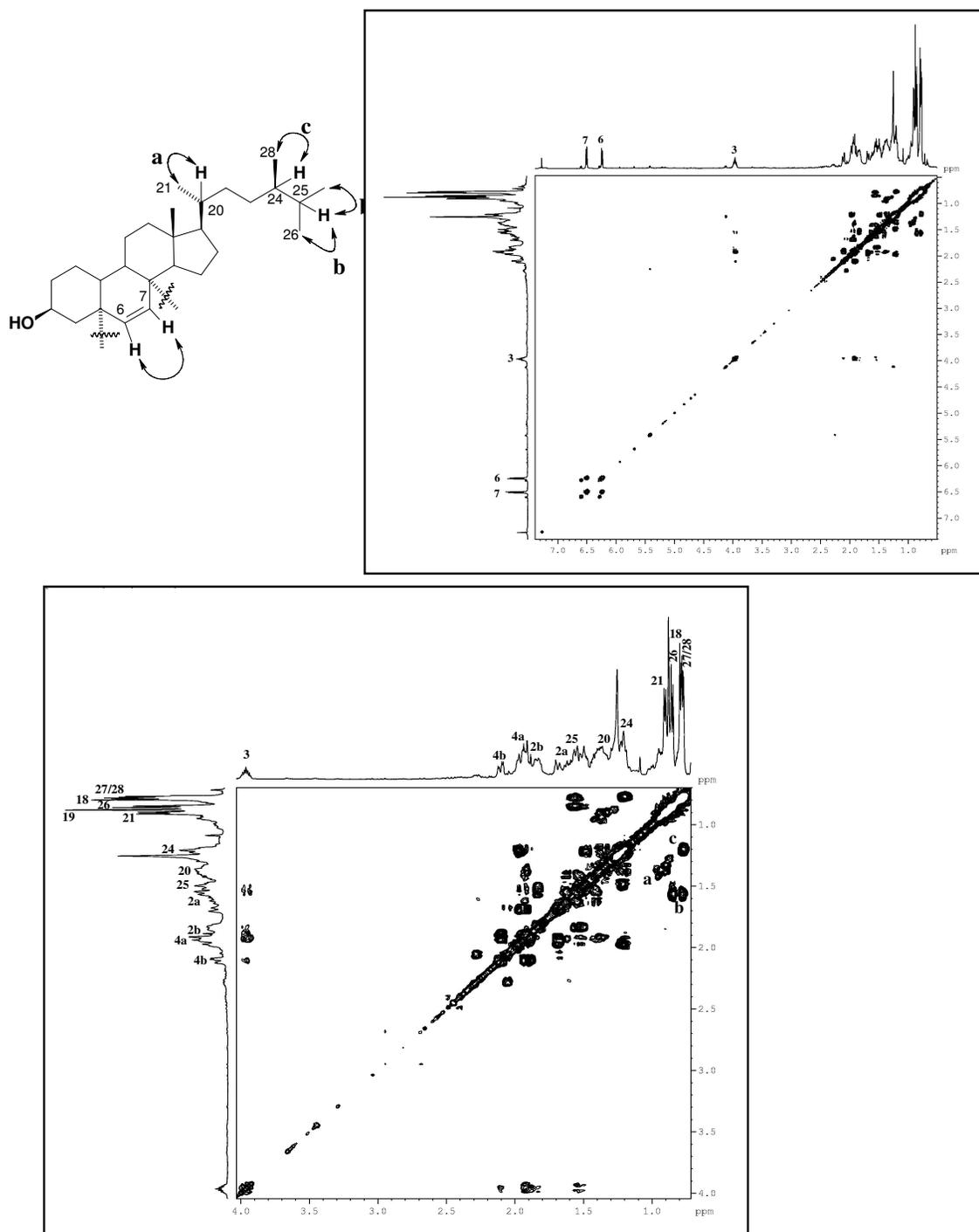


Figura 23: Espectros homonuclear ^1H , $^1\text{H} - \text{COSY}$ (500 MHz, CDCl_3) de **P-2**

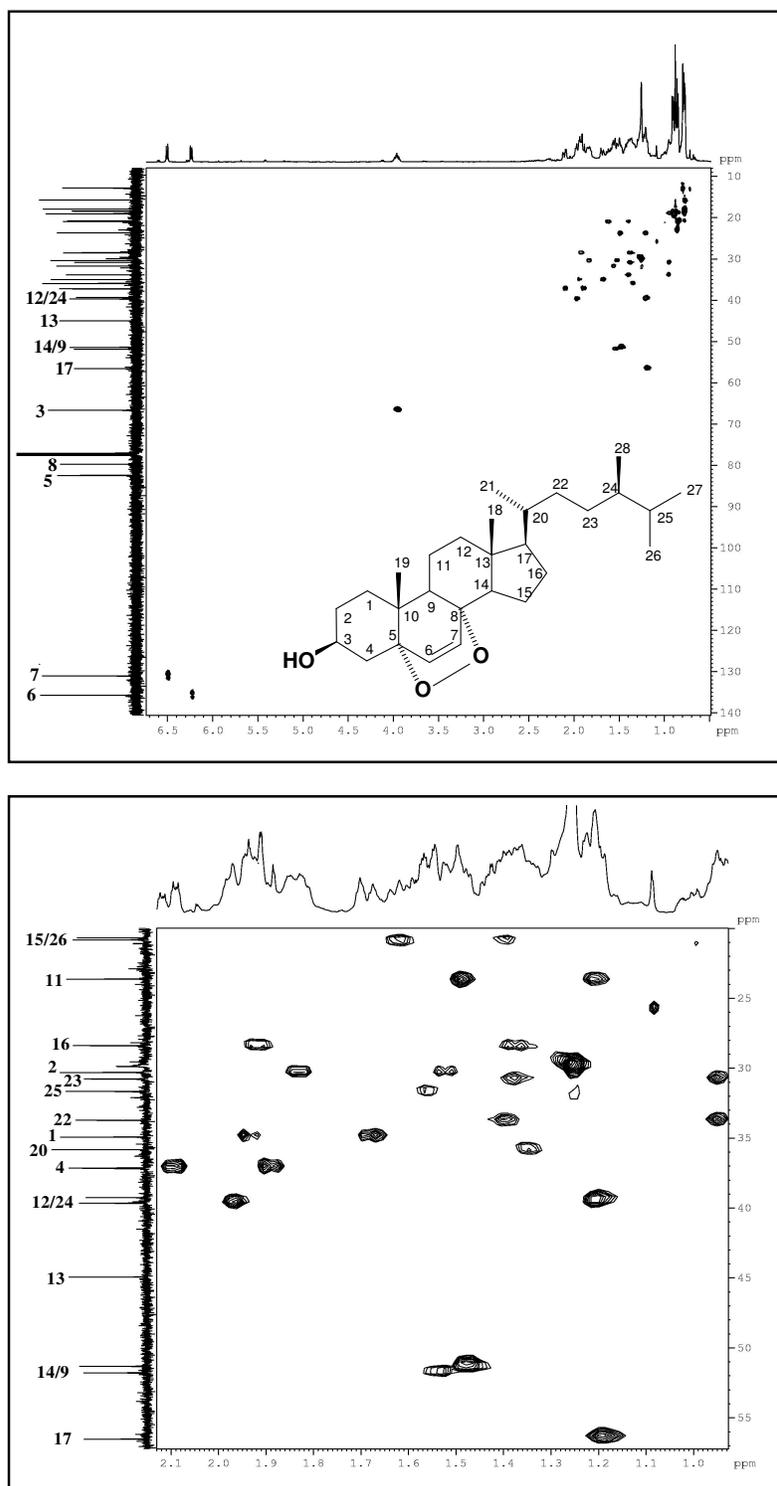


Figura 24: Espectros de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC (500, 125 MHz, CDCl_3) de P-2

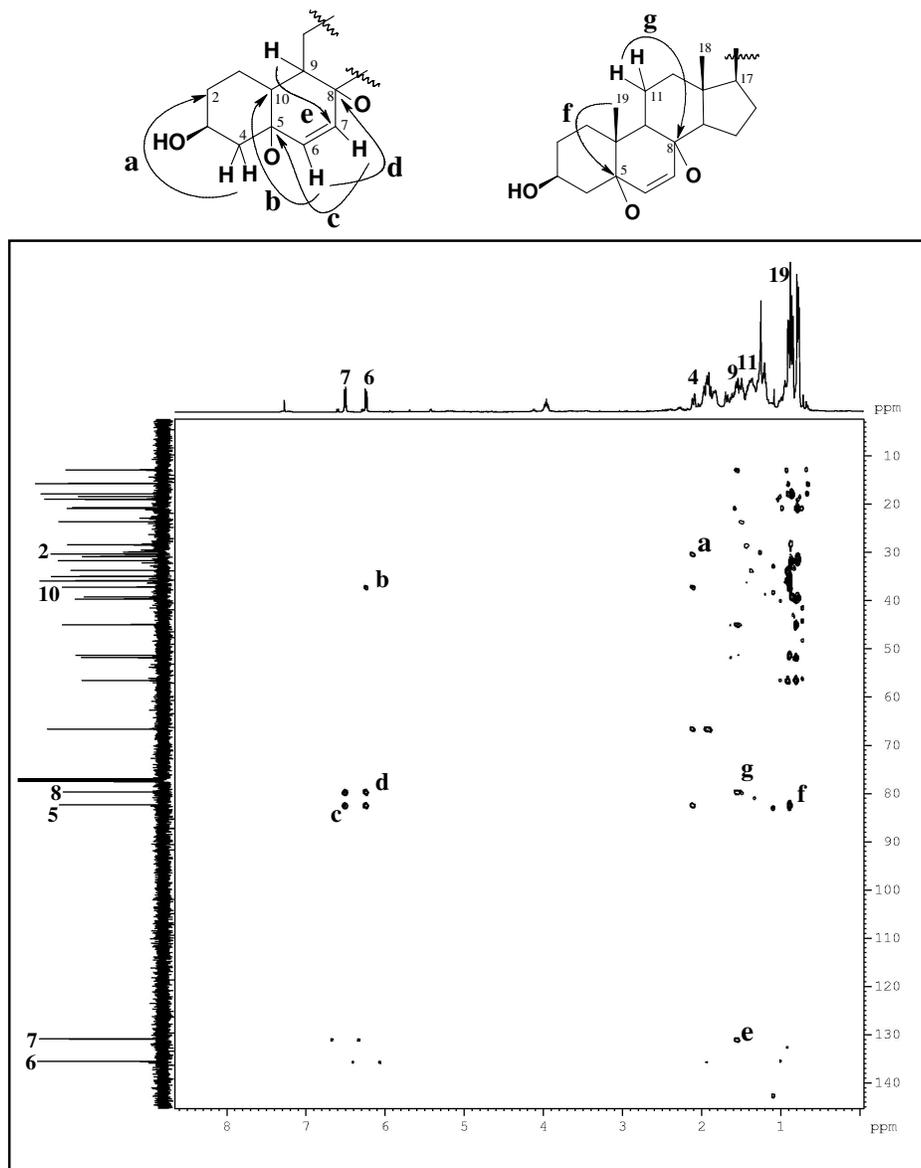


Figura 25: Espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (500, 125 MHz, CDCl_3) de **P-2**

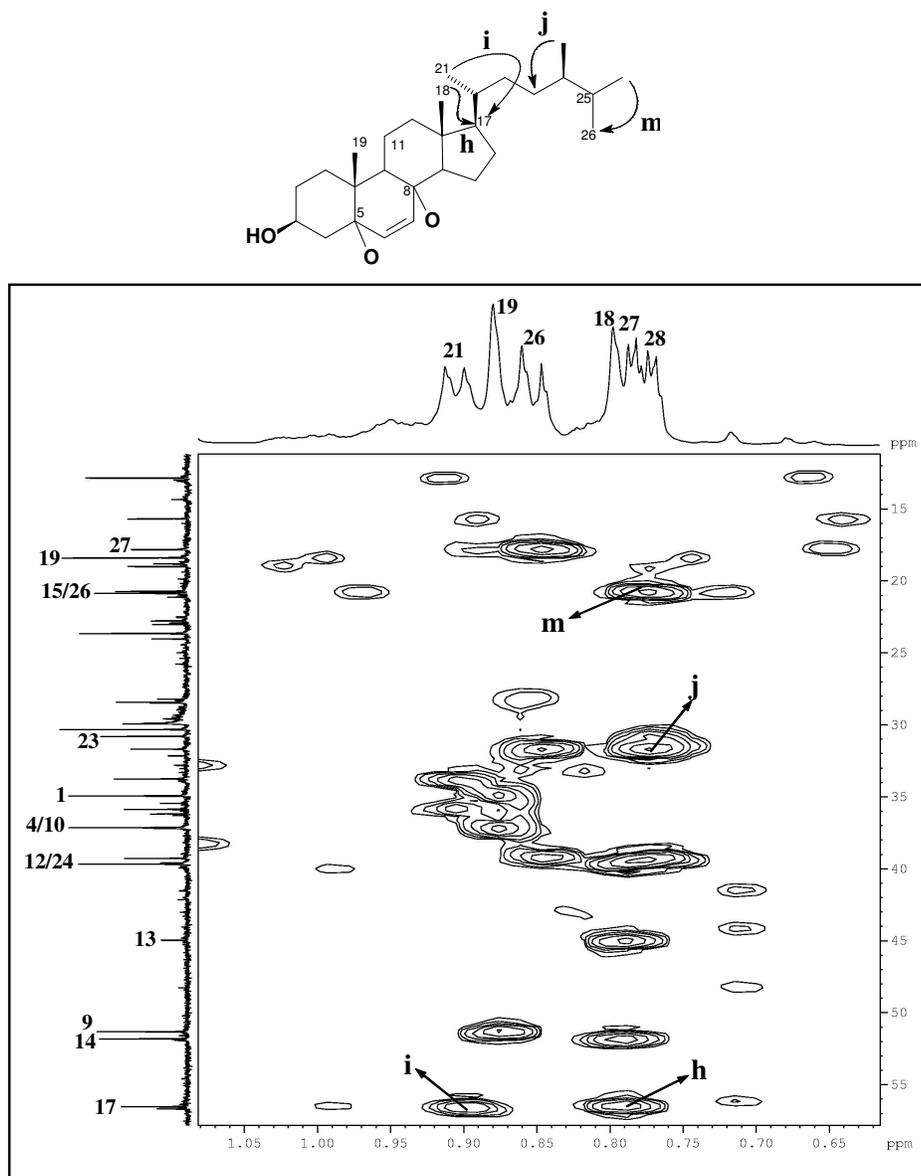


Figura 26: Expansão do espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (500, 125 MHz, CDCl_3) de **P-2**

5.1.3 Determinação estrutural de P-4

O composto denominado **P-4** foi isolado a partir de sucessivas colunas cromatográficas do extrato hexânico de *P. caribaeorum*. Este composto se apresentou como um sólido amorfo branco, com ponto de fusão de 133,0 °C e rotação específica de $[\alpha]_D^{20} = -28$ ($c = 0,050$; CHCl_3).

No seu espectro de absorção na região do IV (Fig. 30, pág. 69), observou-se uma absorção em 3.353 cm^{-1} de estiramento O-H. Bandas em 2.934 e 2.875 cm^{-1} típicos de $\nu_{\text{C-H}}$ de grupos metilênicos e metílicos. Absorção em 1.665 cm^{-1} de deformação axial C=C, além de bandas em 1.454 e 1.376 cm^{-1} de deformação angular simétrica no plano para CH_2 e CH_3 , e uma absorção em 1.049 cm^{-1} de ligação C-O [SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000].

O espectro de RMN ^1H 500 MHz (Fig. 31, pág. 70) (Fig. 27, pág. 64) de **P-4**, mostrou-se semelhante ao do espectro de **P-1**. Apresentou sinais em δ_{H} 0,68 (s); 0,78 (d, 6,6 Hz); 0,79 (d, 6,6 Hz); 0,86 (d, 6,6 Hz); 0,93 (d, 6,6 Hz) e 0,99 (s) correspondentes a seis metilas e vários sinais sobrepostos com diferentes multiplicidades e deslocamento químicos entre δ_{H} 1,16 e 2,35 ppm. O espectro apresentou também, um singleto largo em δ_{H} 3,86 e um multiplete em δ_{H} 3,59, ambos com integração para um hidrogênio e compatíveis com hidrogênios ligados a carbono oxigenado. Além destes, foi observado na região de hidrogênio ligado a carbono sp^2 um dubleto em δ_{H} 5,61 (d, 3,7 Hz).

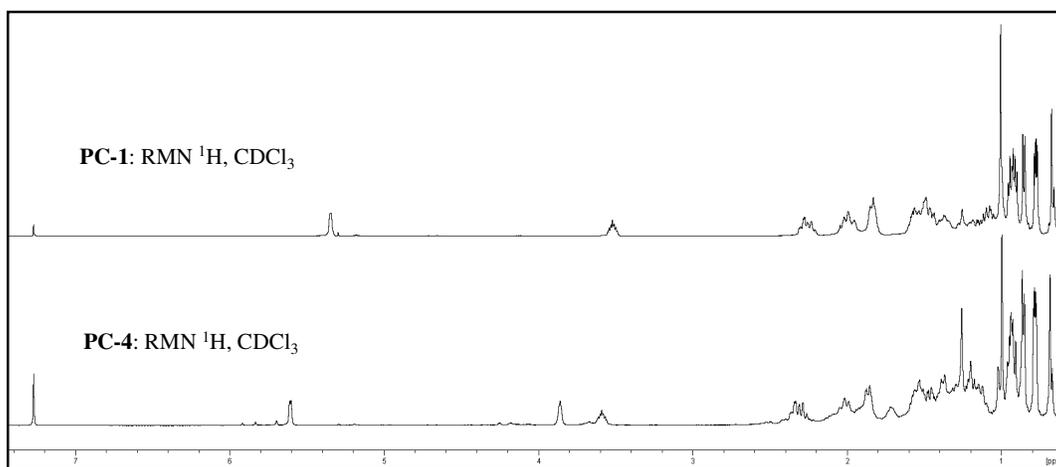


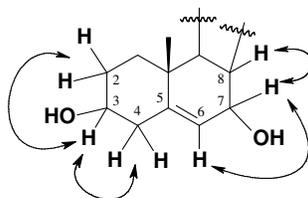
Figura 27: Comparação dos espectros de RMN ^1H de **P-1** e **P-4**

O espectro de RMN ^{13}C -CPD 125 MHz (Fig. 33, pág. 71) de **P-4** mostrou 28 linhas espectrais, típico de esteróide ergostano. Entre estas, pôde-se destacar dois sinais em δ_{C} 71,5 e 65,8 correspondentes a carbonos sp^3 oxigenados e dois sinais em δ_{C} 146,4 e 124,0 ppm atribuídos a carbonos de ligação dupla (Csp^2). A comparação dos espectros de RMN ^{13}C -CPD e RMN ^{13}C -DEPT 135° (Fig. 34, pág. 71) permitiu determinar o padrão de hidrogenação referente a cada carbono: seis carbonos metílicos, nove carbonos metilênicos, dez carbonos metínicos e três não-hidrogenados como observado na Tabela 7. Conforme o número de sinais no espectro de RMN ^{13}C -CPD pôde-se concluir que **P-4** tratava-se de um esteróide tetracíclico, semelhante a **P-1** e **P-2**, previamente isolados.

Tabela 7: Padrão de hidrogenação de **P-4**

C	CH	CH ₂	CH ₃	Fórmula Molecular
146,4	124,0	42,2	20,7	
42,3	71,5 (C-OH)	39,3	19,6	
37,7	65,8 (C-OH)	37,2	19,1	
	55,8	33,9	17,8	
	49,6	31,5	15,6	
	42,4	30,6	12,1	
	39,8	28,4		
	37,7	24,5		
	36,3	20,9		
	31,7			
3 C	10 CH, 2 OH	9 CH₂	6 CH₃	C₂₈H₄₈O₂, IDH 5

No espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY (Fig. 35, pág. 72) foram visualizados os acoplamentos dos hidrogênios em δ_{H} 3,86 (H-7) com os sinais em δ_{H} 5,61 (H-6) e 1,48 (H-8), assim como o acoplamento do hidrogênio em δ_{H} 3,59 (H-3) com os sinais em δ_{H} 2,34 (H-4) e 1,58 (H-2), como mostra a estrutura a seguir.



A análise detalhada do espectro ^1H , ^{13}C – HSQC (Fig. 37, pág. 74) permitiu a inequívoca correlação das linhas espectrais dos carbonos aos seus respectivos hidrogênios, como mostrado na Tabela 09 (pág. 68).

Os dados observados no espectro ^1H , ^{13}C – HMBC (Fig. 39, pág. 76) foram importantes para a confirmação da localização dos carbonos oxigenados e dos grupos metilas na estrutura esteroidal de esqueleto ergostano.

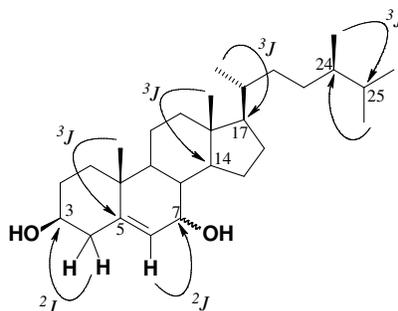


Figura 28: Principais correlações ^1H , ^{13}C – HMBC de **P-4**

A posição de um grupo hidroxila em C-7 foi definida comparando dados de RMN ^{13}C já publicados na literatura [MURALIDHAR *et al.*, 2005]. A estereoquímica do grupo hidroxila também foi determinada por comparação com a literatura [KOBAYASHI *et al.*, 1993], uma vez que, quando o grupo hidroxila encontra-se em posição beta (β), o deslocamento químico de C-7 é de 73,3 ppm, e quando a hidroxila encontra-se em alfa (α), C-7 o sinal é observado em 64,8 ppm. Isto nos permitiu atribuir a posição da hidroxila em posição α . Diante destes dados obtidos nos espectros de RMN uni e bidimensional e posterior comparação com os dados de RMN ^{13}C descritos na literatura (Tabela 8, pág. 67), concluiu-se que o composto **P-4** trata-se do esteróide 24(*R*)-ergost-5-en-3 β ,7 α -diol, usualmente conhecido como 7 α -hidroxicampesterol, Figura a seguir:

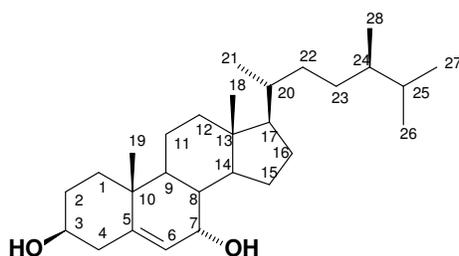


Figura 29: Estrutura de **P-4**

Tabela 8: Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de **P-4** (CDCl_3 , 125 MHz) comparados com os descritos na literatura para 7α -hidroxicampesterol (piridina- d_5 , 100 MHz) [KOBAYASHI *et al.*, 1993].

C	P-4	7α -hidroxicampesterol
	δ_{C}	
1	37,2	37,6
2	31,5	32,4
3	71,5	71,0
4	42,2	42,3
5	146,4	144,9
6	124,0	125,5
7	65,8	64,8
8	37,7	38,4
9	42,4	42,7
10	37,7	37,7
11	20,9	21,2
12	39,3	39,8
13	42,3	43,4
14	49,6	50,2
15	24,5	24,7
16	28,4	28,7
17	55,8	56,2
18	12,1	12,0
19	19,6	18,5
20	36,3	36,5
21	19,1	19,2
22	33,9	34,0
23	30,6	30,8
24	39,8	39,3
25	31,7	31,7
26	20,7	20,7
27	17,8	17,7
28	15,6	15,6

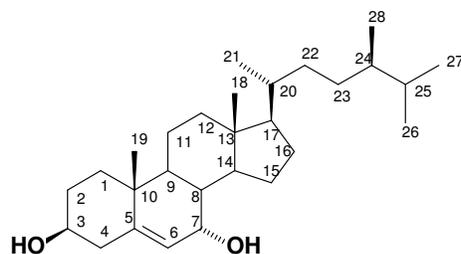


Tabela 9: Deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C e correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C (HSQC e HMBC) de **P-4**

C	HSQC		HMBC	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)(multip, $J_{\text{H,H}}$)	$^2J_{\text{C-H}}$	$^3J_{\text{C-H}}$
1	37,2	1,75; 1,15		3H-19
2	31,5	1,58; 1,48		
3	71,5	3,59 (m)	2H-4	
4	42,2	2,34 (dd, 12,7, 3,8 Hz) 2,29 (t, 12,7 Hz)		H-6
5	146,4	-	2H-4	3H-19
6	124,0	5,61 (d, 3,8 Hz)		2H-4
7	65,8	3,86 (sl)	H-6	
8	37,7	1,48		H-6
9	42,4	1,22		3H-19
10	37,7	-	3H-19	
11	20,9	1,55		
12	39,3	2,04; 1,22		3H-18
13	42,3	-	3H-18	
14	49,6	1,42		3H-18
15	24,5	1,72; 1,16		
16	28,4	1,90; 1,32		
17	55,8	1,20		3H-18; 3H-21
18	11,5	0,68 (s)		
19	18,4	0,99 (s)		
20	36,3	1,48	3H-21	
21	19,1	0,93 (d, 6,6 Hz)		
22	33,9	1,42; 0,99		
23	30,6	1,47; 0,98		3H-28
24	39,8	1,18	3H-28	3H-26; 3H-27
25	31,7	1,58	3H-26; 3H-27	3H-28
26	20,7	0,86 (d, 6,6 Hz)		
27	17,8	0,79 (d, 6,6 Hz)		
28	15,6	0,78 (d, 6,6 Hz)		

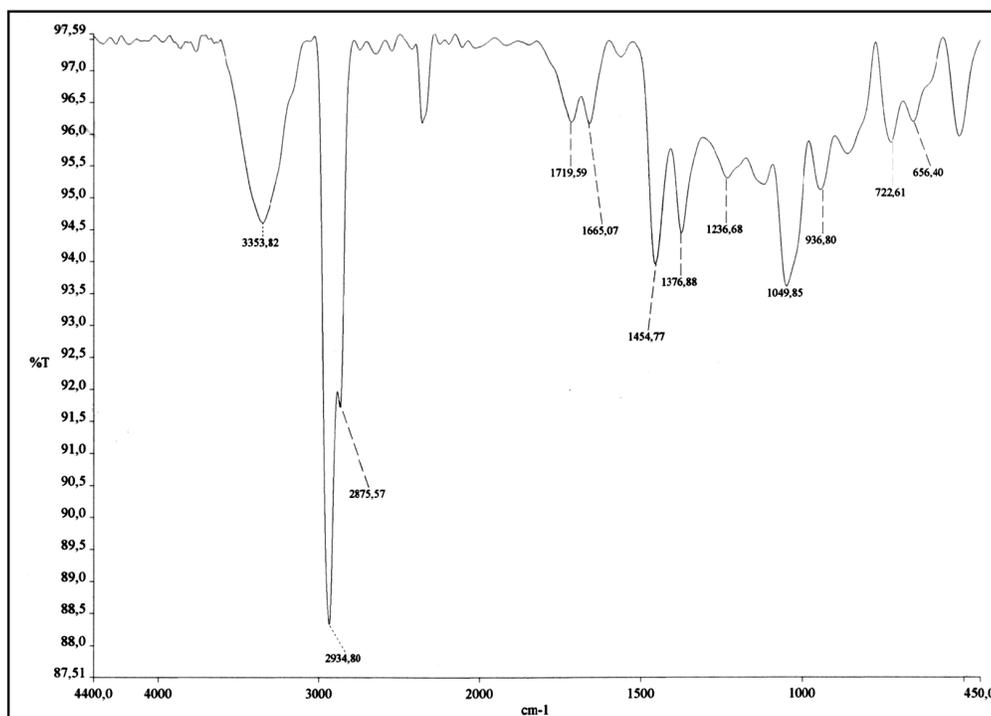
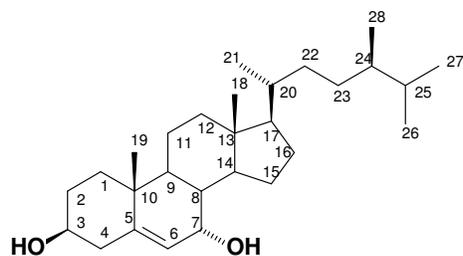


Figura 30: Espectro de infravermelho (KBr) de P-4



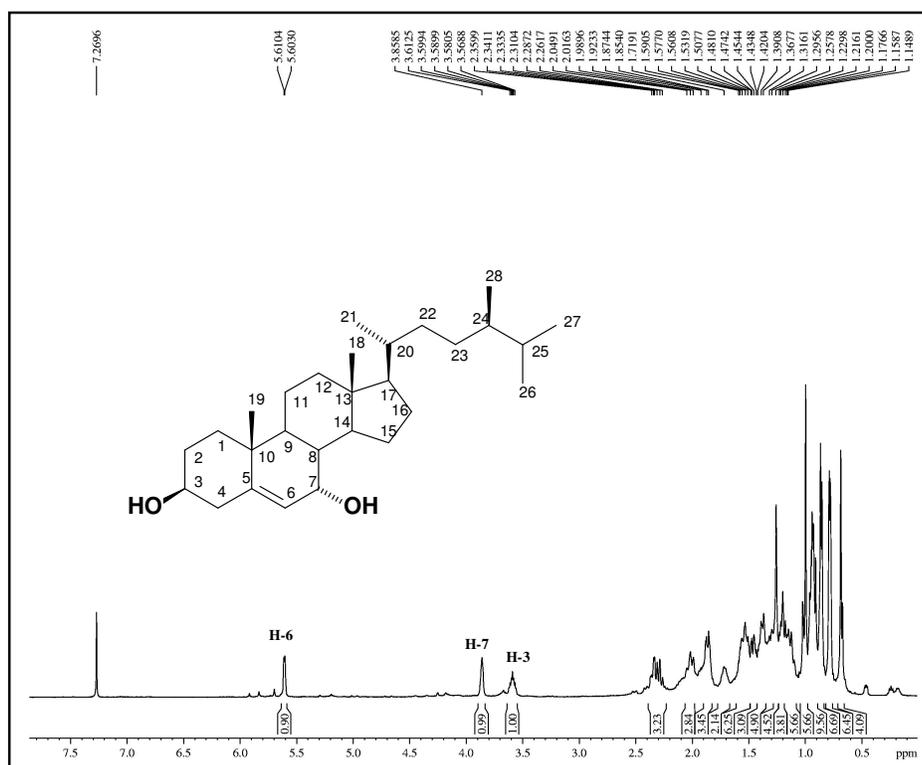


Figura 31: Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de P-4

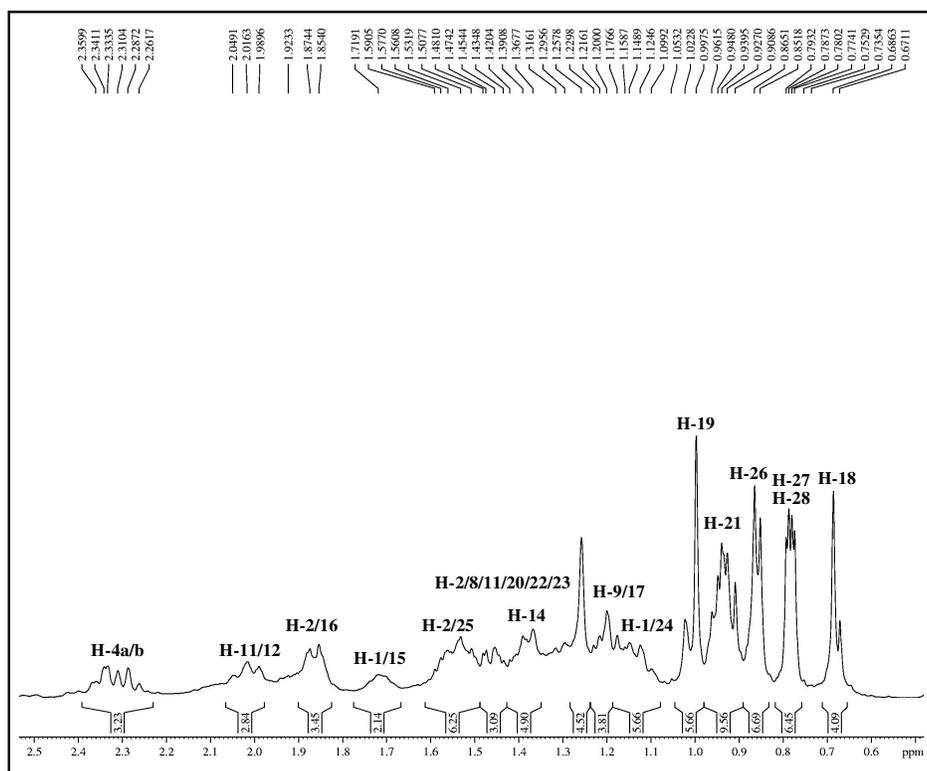


Figura 32: Expansão do espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de P-4

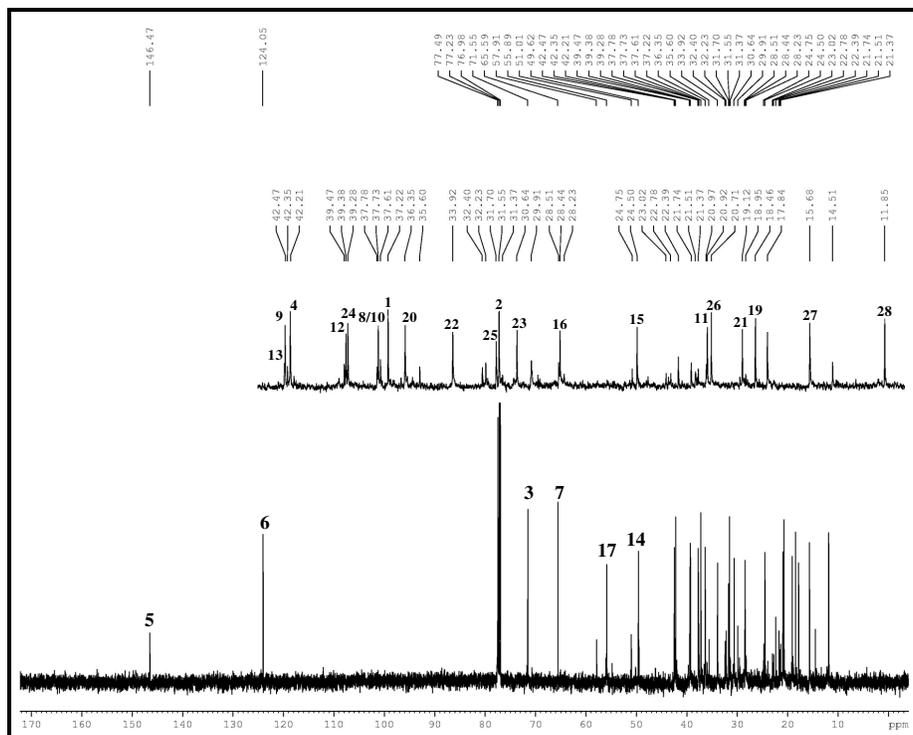


Figura 33: Espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, CDCl_3) de P-4

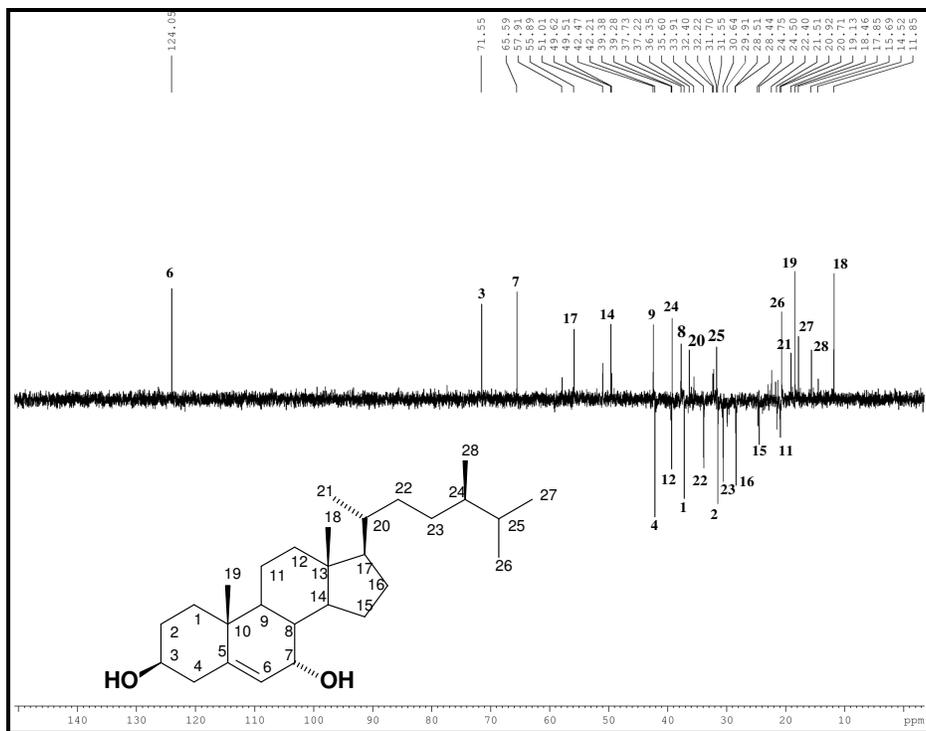


Figura 34: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 $^\circ$ (125 MHz, CDCl_3) de P-4

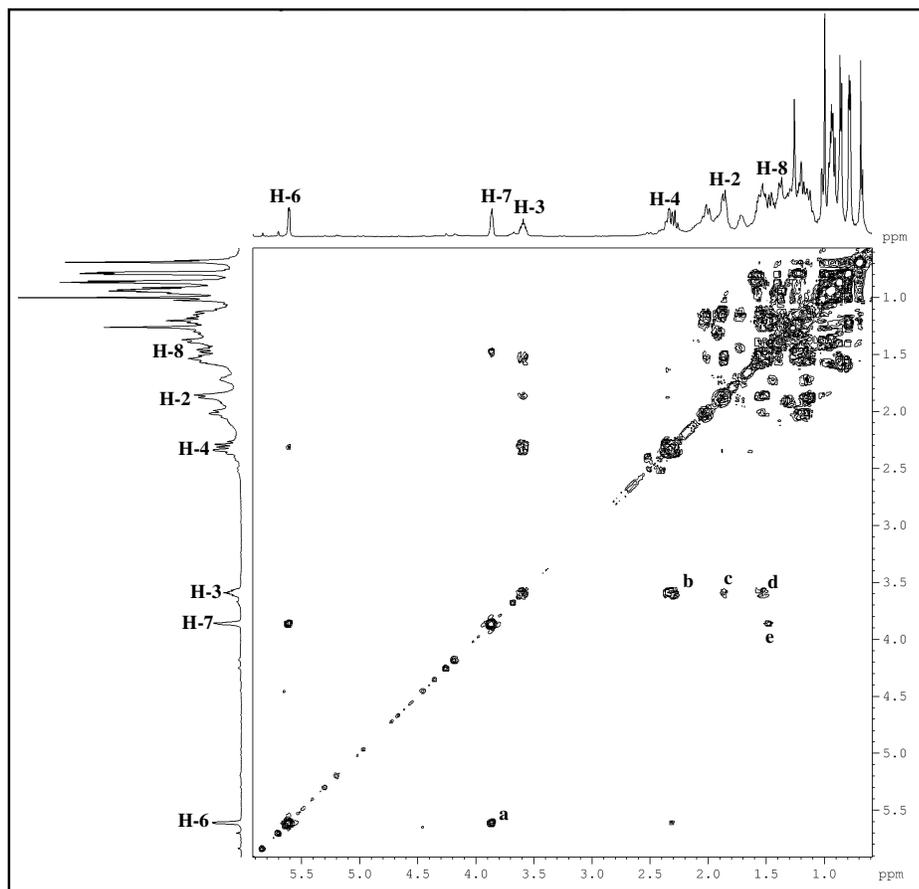
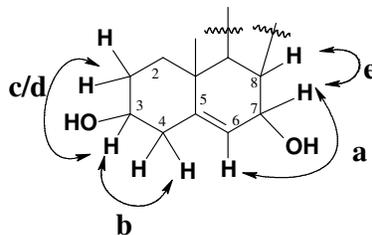


Figura 35: Espectro de correlação homonuclear ^1H , $^1\text{H} - \text{COSY}$ (500 MHz, CDCl_3) de P-4



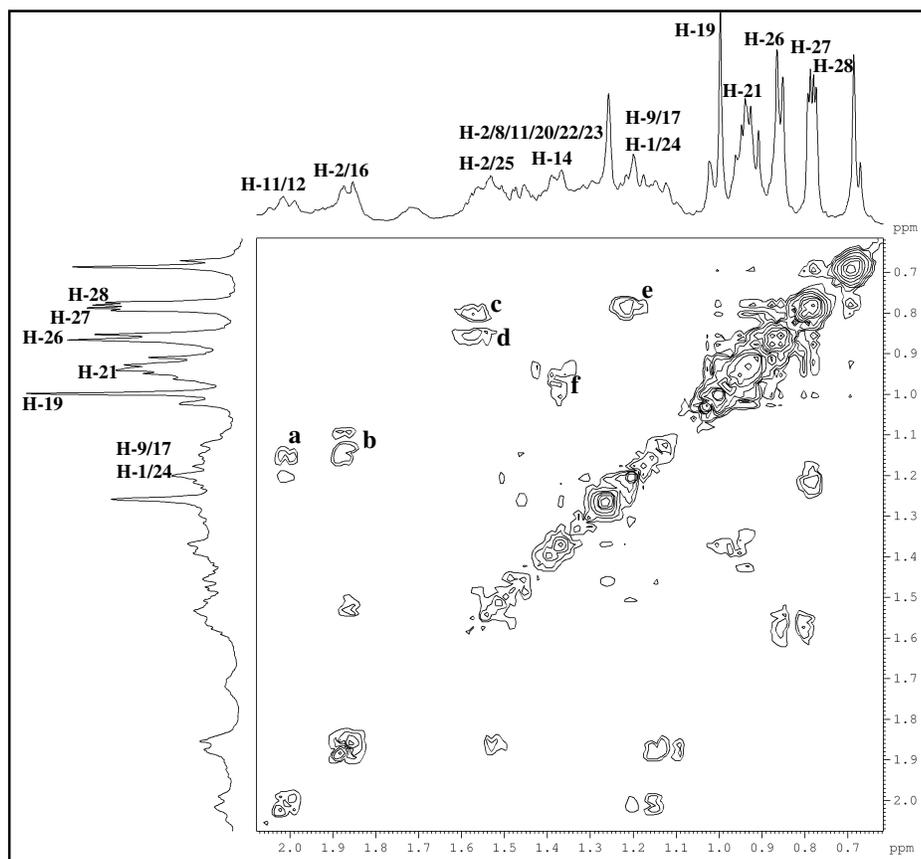
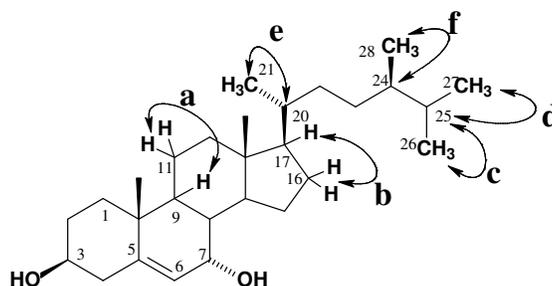


Figura 36: Expansão do espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY (500 MHz, CDCl_3) de **P-4**



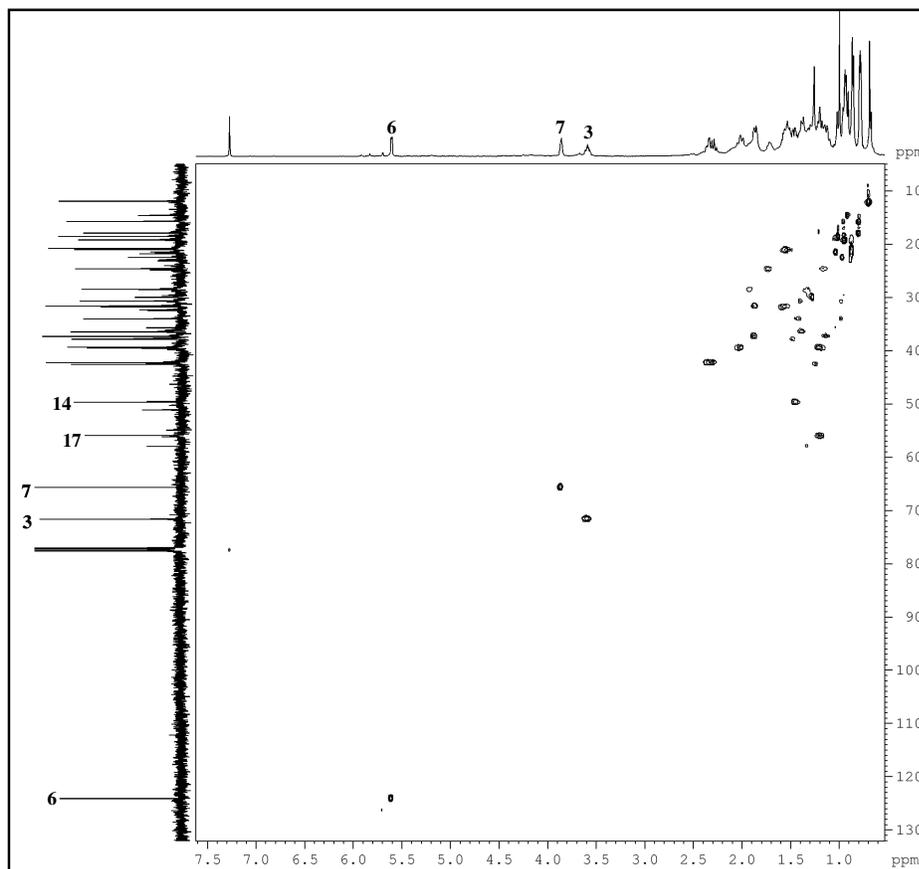
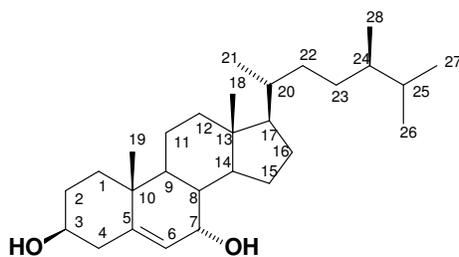


Figura 37: Espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC (500, 125 MHz, CDCl_3) de **P-4**



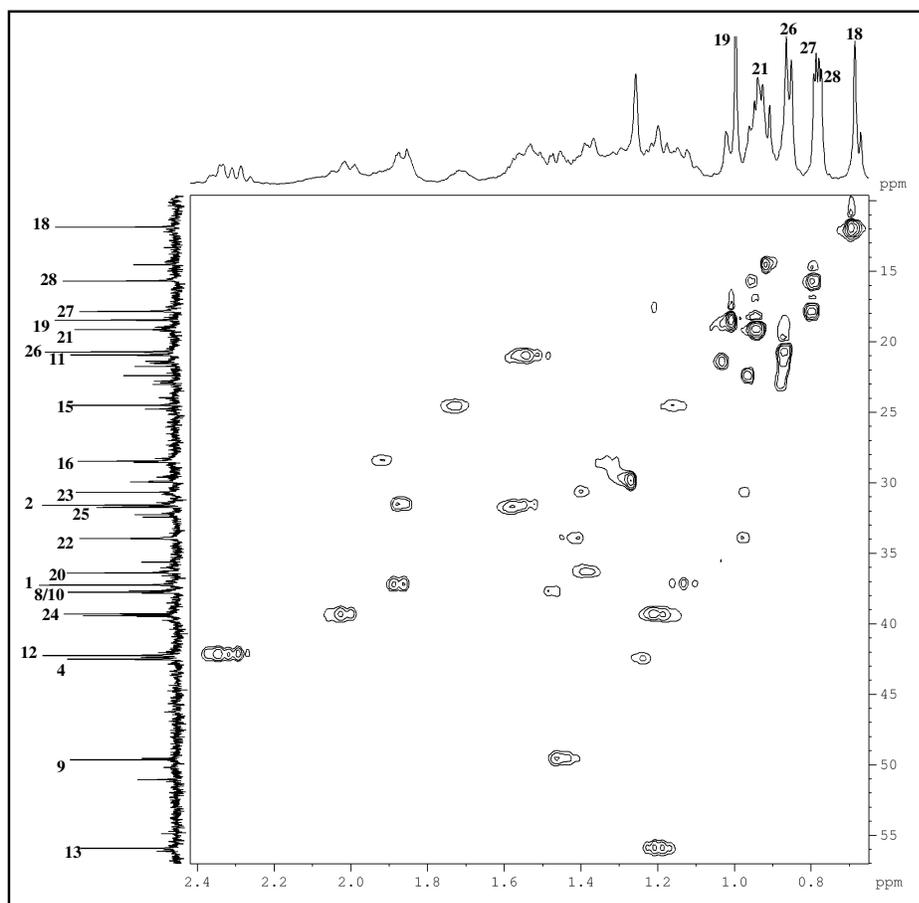
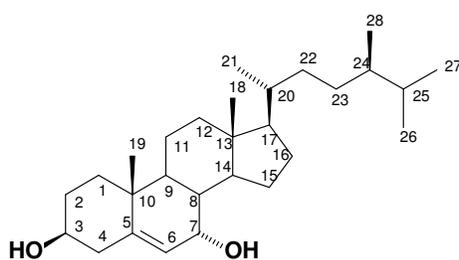


Figura 38: Expansão do espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC (500, 125 MHz, CDCl_3) de **P-4**



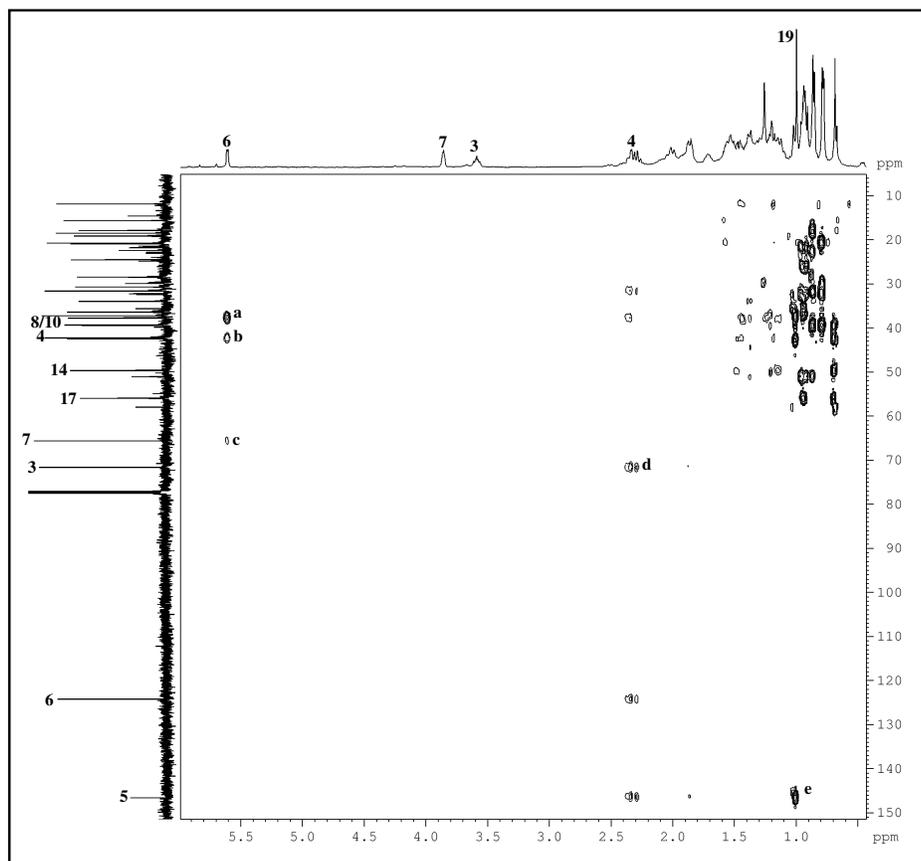
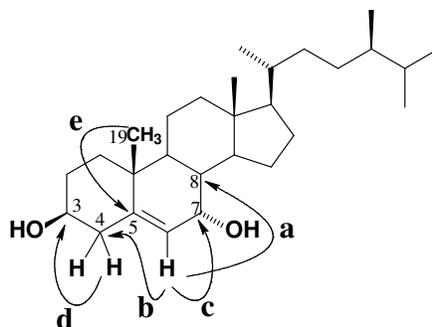


Figura 39: Espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (500, 125 MHz, CDCl_3) de **P-4**



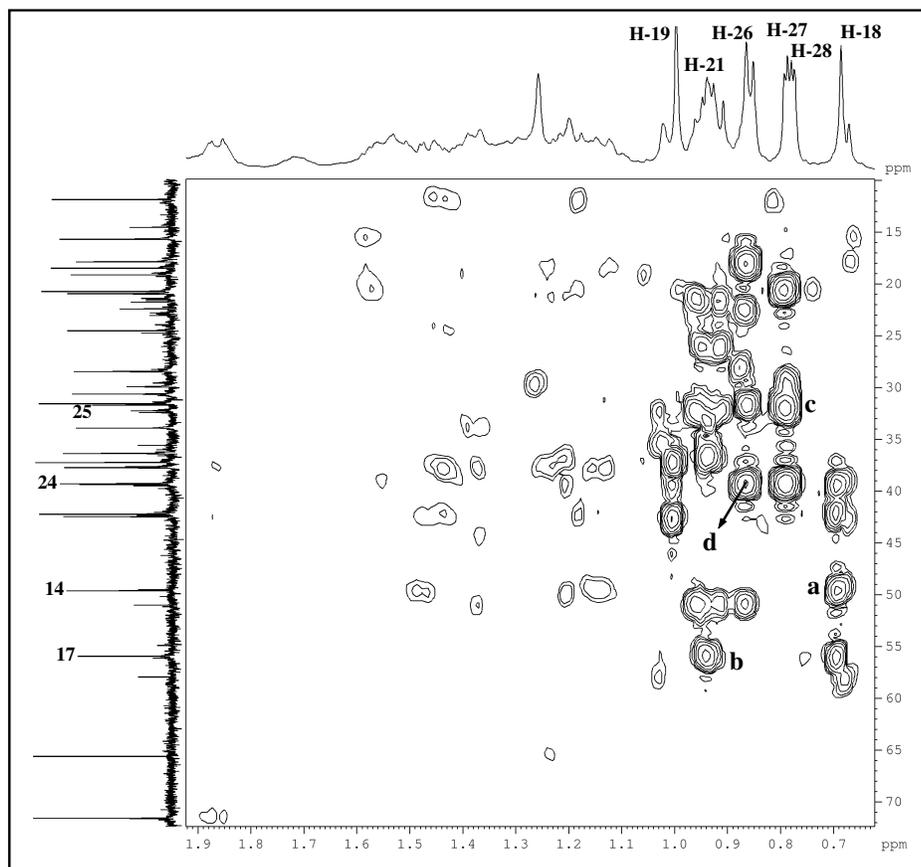
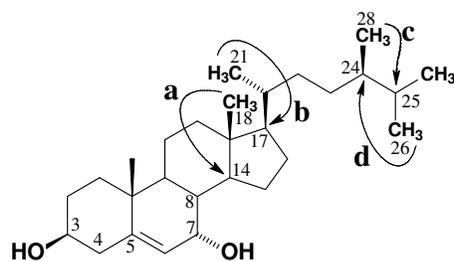


Figura 40: Expansão do espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (500, 125 MHz, CDCl_3) de **P-4**



5.1.4 Determinação estrutural de P-7

Sucessivos tratamentos cromatográficos do extrato hexânico de *P. caribaeorum* forneceu um sólido amorfo branco denominado de **P-7**, com ponto de fusão de 127,1 °C e rotação específica de $[\alpha]_D^{20} = -34$ ($c = 0,04$; CHCl_3).

O espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) (Fig. 44, pág. 84) apresentou duas absorções intensas em 3.425 e 3.297 cm^{-1} característica de deformação axial H-O-C de grupo hidroxila; duas absorções em 2.936 e 2.875 cm^{-1} correspondentes a deformação axial assimétrica e simétrica de ligação C-H de grupamentos CH_2 e CH_3 . Bandas em 1.461 cm^{-1} e 1.376 cm^{-1} de deformação angular simétrica no plano para CH_2 e CH_3 , além de absorção em 1.058 cm^{-1} de estiramento de ligação C-O [SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000].

O espectro de massa de alta resolução (Fig. 45, pág. 84), revelou pico em m/z 471,3226 $[\text{M} + \text{K}]^+$ referente ao aduto de potássio, indicando a seguinte fórmula molecular $\text{C}_{28}\text{H}_{48}\text{O}_3\text{K}$ (calculado m/z 471,3229 $[\text{M} + \text{K}]^+$).

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) (Fig. 46, pág. 85) de **P-7** mostrou-se bastante semelhante ao espectro de **P-4** (Fig. 41, pág. 78), revelando sinais em δ_{H} 0,66 (s); 0,78 (d, 6,6 Hz); 0,79 (d, 6,6 Hz); 0,86 (d, 6,6 Hz); 0,91 (d, 6,6 Hz) e 0,99 (s) correspondentes a seis metilas e vários sinais sobrepostos com diferentes multiplicidades e deslocamento químico entre δ_{H} 1,12 e 2,10 ppm. O espectro apresentou, também, um singlete largo em δ_{H} 4,15 (H-7) e um multiplete em δ_{H} 3,62 (H-3), ambos com integração para um hidrogênio, e com deslocamento químico hidrogênios ligados a carbonos oxigenados, bem como um dubleto em δ_{H} 5,73 (d, 3,2 Hz, H-6) evidenciando uma ligação dupla.

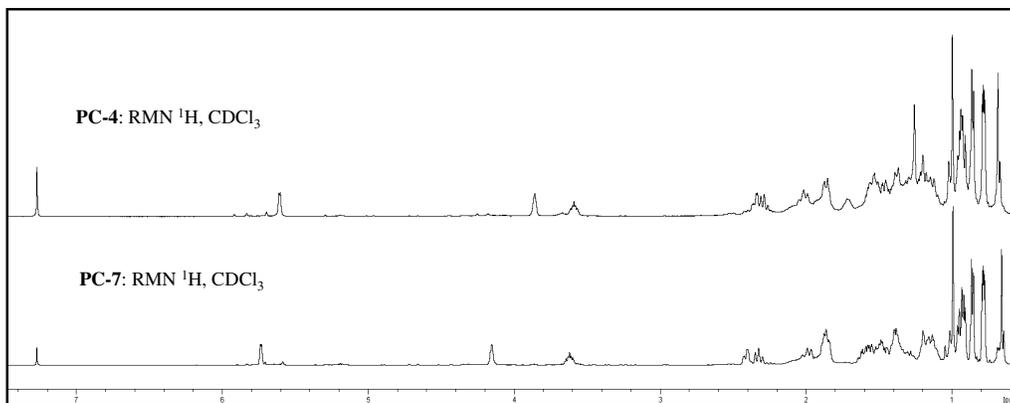
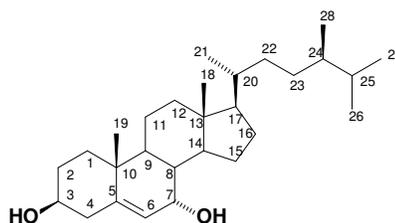


Figura 41: Comparação dos espectros de RMN ^1H de **P-7** com **P-4**

O espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) (Fig. 48, pág. 86) de **P-7** mostrou 28 linhas espectrais, destacando os sinais em δ_{C} 71,5 e 78,6 relativos a carbonos oxigenados e dois sinais em δ_{C} 148,8 e 120,3 para carbonos olefínicos (Csp^2). A comparação dos dados de RMN ^{13}C de **P-7** com os de **P-4** (Tabela 10), confirma que estes compostos são bastante semelhantes, porém apresentando significativa diferença no deslocamento químico do carbono C-7 ($\Delta\delta_{\text{C}}$ 12,8 ppm) o que nos permite atribuir um grupo peróxido (-OOH) em vez de uma hidroxila, conferindo maior efeito desprotetor, por efeito indutivo.

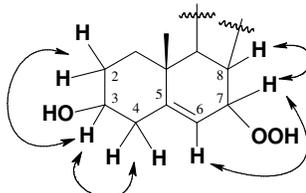
Tabela 10: Comparação entre os dados de RMN ^{13}C de **P-7** com os dados de **P-4** (CDCl_3 , 500 e 125 MHz).

P-7		P-4
#C	δ_{C}	
1	37,0	37,2
2	31,4	31,5
3	71,5	71,5
4	42,3	42,2
5	148,8	146,4
6	120,3	124,0
7	78,6	65,8
8	37,3	37,7
9	43,7	42,4
10	37,6	37,7
11	21,1	20,9
12	39,2	39,3
13	42,5	42,3
14	49,2	49,6
15	24,6	24,5
16	28,4	28,4
17	55,9	55,8
18	11,5	12,1
19	18,4	19,6
20	36,3	36,3
21	19,1	19,1
22	33,9	33,9
23	30,6	30,6
24	39,2	39,8
25	31,7	31,7
26	20,7	20,7
27	17,6	17,8
28	15,4	15,6



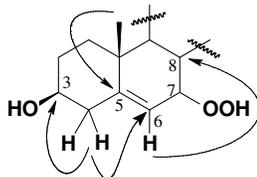
PC-4

No espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY (Fig. 50, pág. 87) foram visualizados os acoplamentos dos hidrogênios em δ_{H} 4,15 (H-7) com os sinais em δ_{H} 5,73 (H-6) e 1,60 (H-8), assim como o acoplamento do hidrogênio em δ_{H} 3,62 (H-3) com os sinais de hidrogênios diastereotópicos em δ_{H} 2,42; 2,32 (2H-4) e 1,86; 1,59 (2H-2).



O espectro de RMN bidimensional ^1H , ^{13}C – HSQC (Fig. 51, pág. 88) permitiu a inequívoca correlação das linhas espectrais dos carbonos aos seus respectivos hidrogênios, como mostrado na Tabela 13 (pág. 83), com destaque para a correlação do carbono em δ_{C} 120,3 (C-6) com o sinal do hidrogênio em δ_{H} 5,73 (H-6); a correlação do carbono δ_{C} 78,6 (C-7) com o hidrogênio em δ_{H} 4,15 (H-7), além da correlação do carbono carbinólico em δ_{C} 71,5 (C-3) com o hidrogênio em δ_{H} 3,62 (H-3).

Os dados observados no espectro ^1H , ^{13}C – HMBC (Fig. 52, pág. 89) (Tabela 13, pág. 83) foram importantes para a confirmação da localização dos carbonos oxigenados e olefínicos na estrutura esteroidal. Observaram-se as principais correlações do sinal em δ_{H} 1,86 (2H-4) com os carbonos δ_{C} 71,5 (C-3) e 120,3 (C-6); do sinal em 5,73 (H-6) com o carbono em 37,3 (C-8); correlação do sinal em δ_{H} 0,99 (3H-19) com o carbono em 148,8 (C-5), como ilustrado na Figura a seguir:



A comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C com aqueles disponíveis na literatura para um esteróide semelhante (24(S)-etil-7 α -hidroperoxi-5,25-colestadien-3 β -o-1, obtido de alga verde marinha *Codium arabicum* por Sheu *et al.* 1995 (Tabela 11, pág. 81), reforça a veracidade da estrutura proposta para **P-7** (Fig. 42, pág. 81).

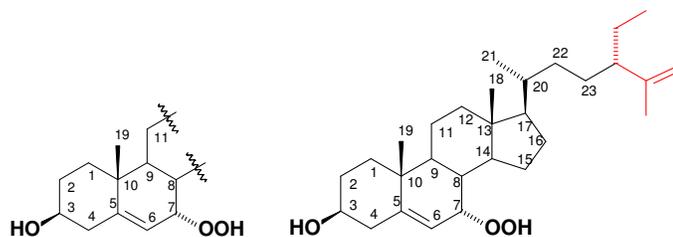


Figura 42: Estrutura parcial do esteróide **P-7** e 24(*S*)-etil-7 α -hidroperoxi-colesta-5,25-dien-3 β -o1 isolado por Sheu e colaboradores, 1995.

Tabela 11: Comparação entre os dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C -CPD de **P-7** (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) com os descritos na literatura para 24(*S*)-etil-7 α -hidroperoxi-colesta-5,25-dien-3 β -o1 (CDCl_3 , 300 e 75 MHz) [SHEU *et al.*, 1995]

#C	P-7		7 α -hidroperoxi	
	δ_{C}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{H}
1	37,0	36,7		
2	31,4	31,3		
3	71,5	71,4	3,62 (m)	3,62 (m)
4	42,3	42,2		
5	148,8	148,8		
6	120,3	119,9	5,73 (d, 3,2)	5,72 (dd, 4,8 e 1,5 Hz)
7	78,6	78,4	4,15 (sl)	4,16 (t, 5,1 Hz)
8	37,3	37,1		
9	43,7	43,7		
10	37,6	37,4		
11	21,1	20,8		
.				
.				

A comparação dos dados de RMN ^{13}C de **P-7** com dados de RMN ^{13}C de esteróides previamente isolados nos permitiu concluir a estrutura deste esteróide, como mostrado na Figura 43 a seguir.

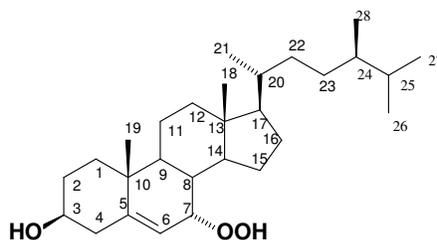


Figura 43: Estrutura do composto **P-7**

A posição e configuração do C-7 (7 α -hidroperóxido) foram definidas comparando os dados de RMN ^1H do composto (24(*S*)-etil-7 α -hidroperoxi-colesta-5,25-dien-3 β -o1 disponível na literatura [SHEU *et al.*, 1995]. Como pode ser observado na

Tabela 16 os deslocamentos químicos para H-6, 3H-18 e 3H-19 são influenciados pela orientação do grupo hidroperóxido.

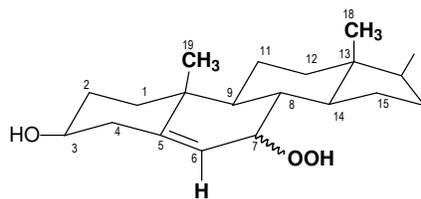


Tabela 12: Comparação dos dados de RMN ^1H de **P-7** (CDCl_3 500 MHz), com os da literatura para os esteróides 7α e 7β hidroperóxido (CDCl_3 300 MHz)

	P-7	7α -hidroperóxido	7β -hidroperóxido
	δ_{H}		
H-6	5,73	5,72	5,58
3H-18	0,66	0,65	0,68
3H-19	0,99	0,99	1,04

Diante dos dados discutidos, podemos concluir que o composto **P-7** trata-se do esteróide $24(R)$ - 7α -hidroperóxi-ergost-5-en- 3β -ol (Fig. 43, pág. 81), que de acordo com um prévio levantamento bibliográfico, apresenta caráter inédito.

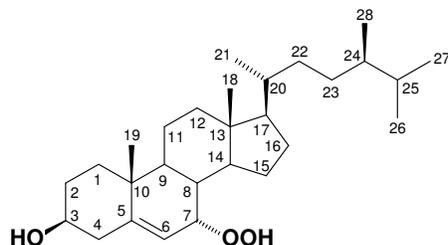


Tabela 13: Dados de RMN ^1H , ^{13}C e correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C (HSQC e HMBC) de **P-7**

	HSQC		HMBC	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)(multip, $J_{\text{H,H}}$)	$^2J_{\text{C-H}}$	$^3J_{\text{C-H}}$
1	37,0	1,80; 1,12		3H-19
2	31,4	1,86; 1,59		
3	71,5	3,62 (m)	2H-4	
4	42,3	2,42 2,32 (t, 11,8 Hz)		H-6
5	148,8	-	2H-4	H-7; 3H-19
6	120,3	5,73 (d, 3,2 Hz)	H-7	2H-4
7	78,6	4,15 (sl)		
8	37,3	1,60		H-6
9	43,7	1,30		H-7; 3H-19
10	37,6	-	3H-19	2H-4; H-6
11	21,1	1,50		
12	39,2	2,00; 1,20		3H-18
13	42,5	-	3H-18	
14	49,2	1,42		3H-18
15	24,6	1,88; 1,12		
16	28,4	1,90; 1,30		
17	55,9	1,20		3H-18; 3H-21
18	11,5	0,66 (s)		
19	18,4	0,99 (s)		
20	36,3	1,38	3H-21	
21	19,1	0,91 (d, 6,6 Hz)		
22	33,9	1,32; 0,98		3H-21
23	30,6	1,40; 0,99		
24	39,2	1,20	3H-24	3H-27
25	31,7	1,58	3H-27; 3H-27	3H-28
26	20,7	0,86 (d, 6,6 Hz)		
27	17,8	0,79 (d, 6,6 Hz)		
28	15,6	0,78 (d, 6,6 Hz)		

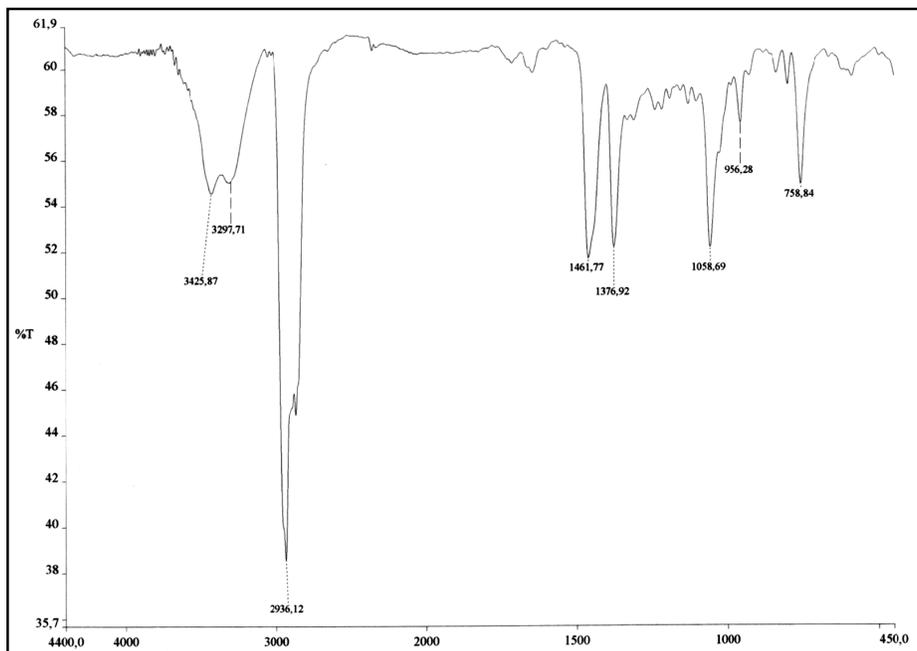


Figura 44: Espectro de infravermelho (KBr) de P-7

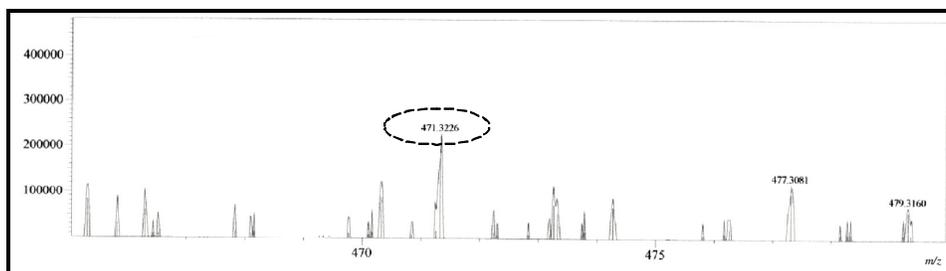
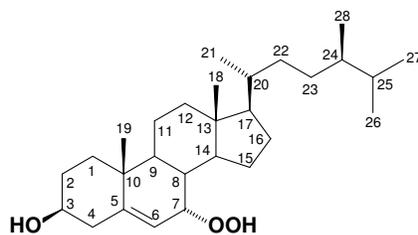


Figura 45: Espectro de massa de alta resolução $[M + K]^+$ de P-7



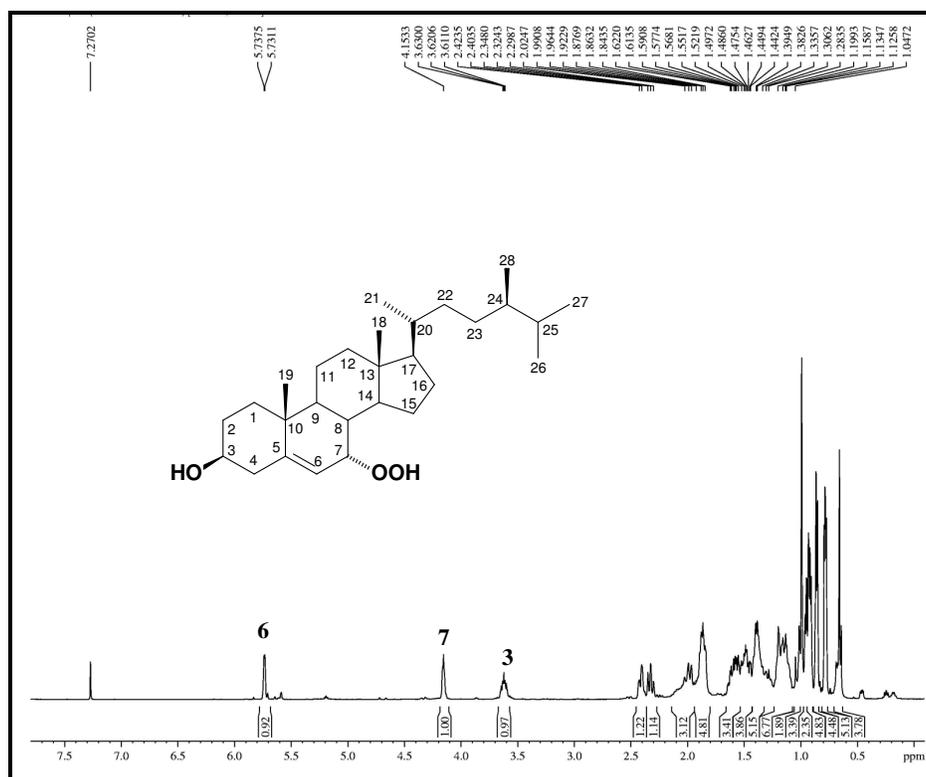


Figura 46: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de P-7

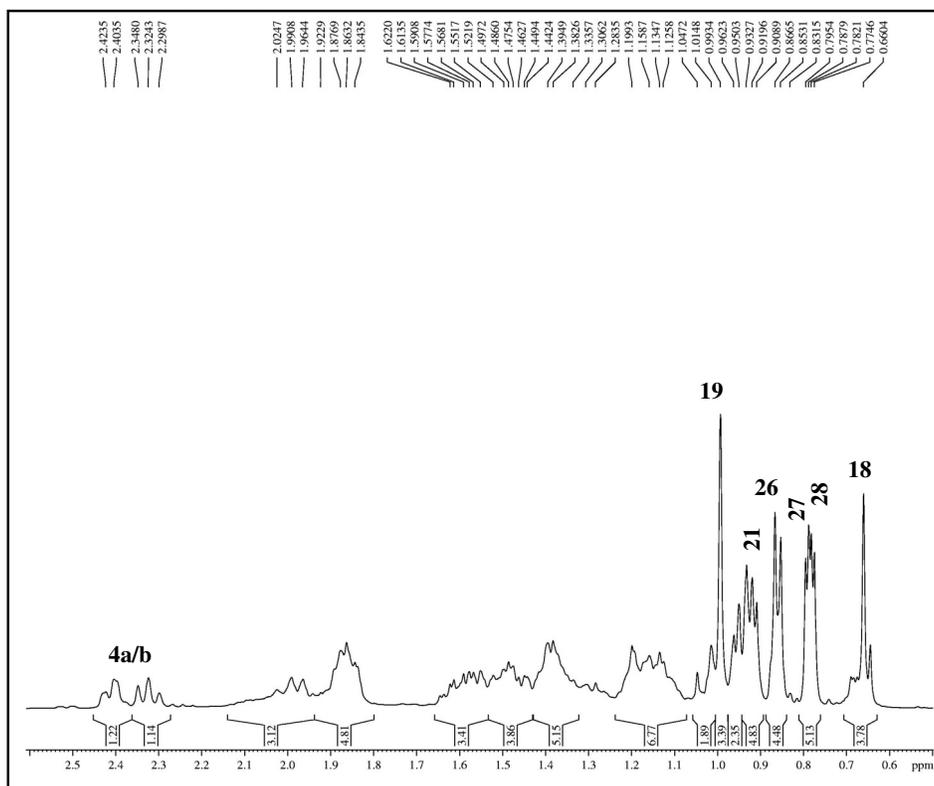


Figura 47: Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de P-7

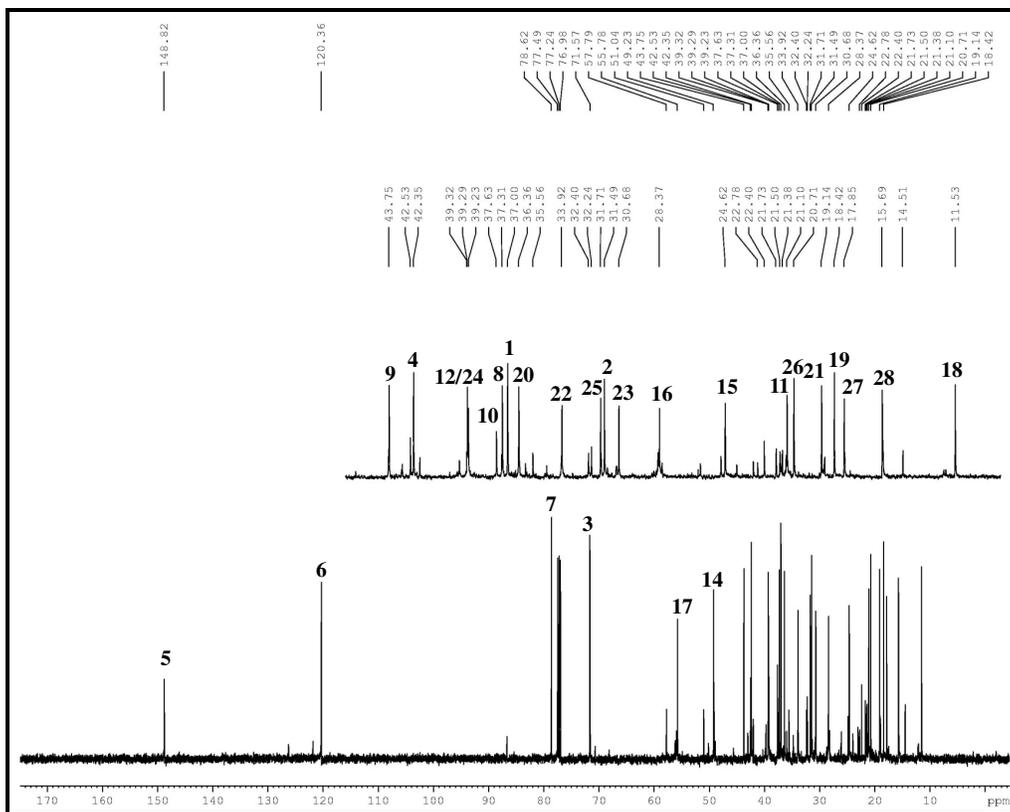


Figura 48: Espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, CDCl_3) de P-7

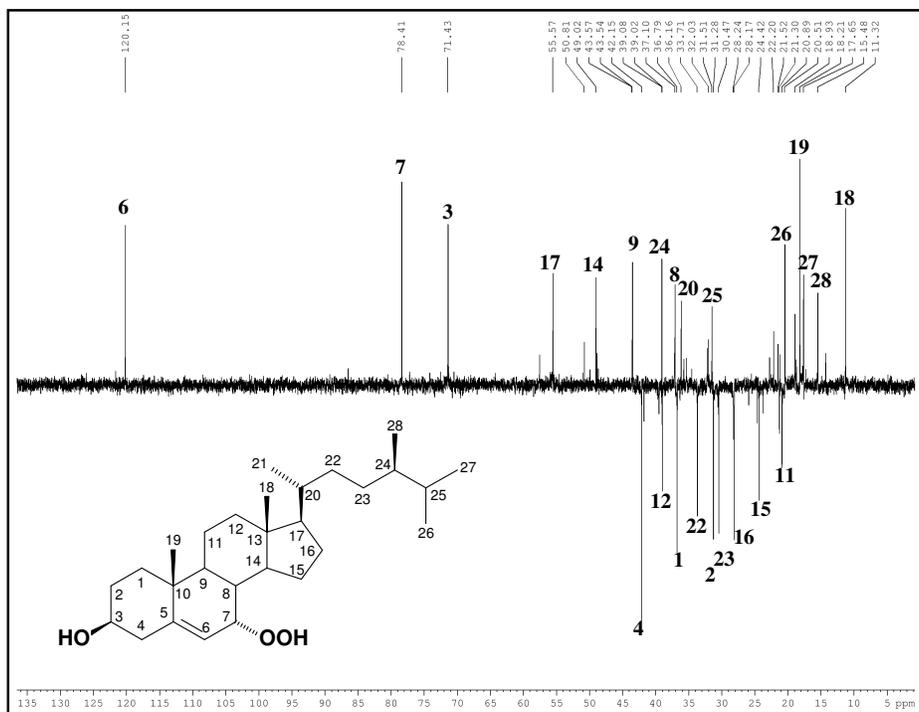


Figura 49: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de P-7

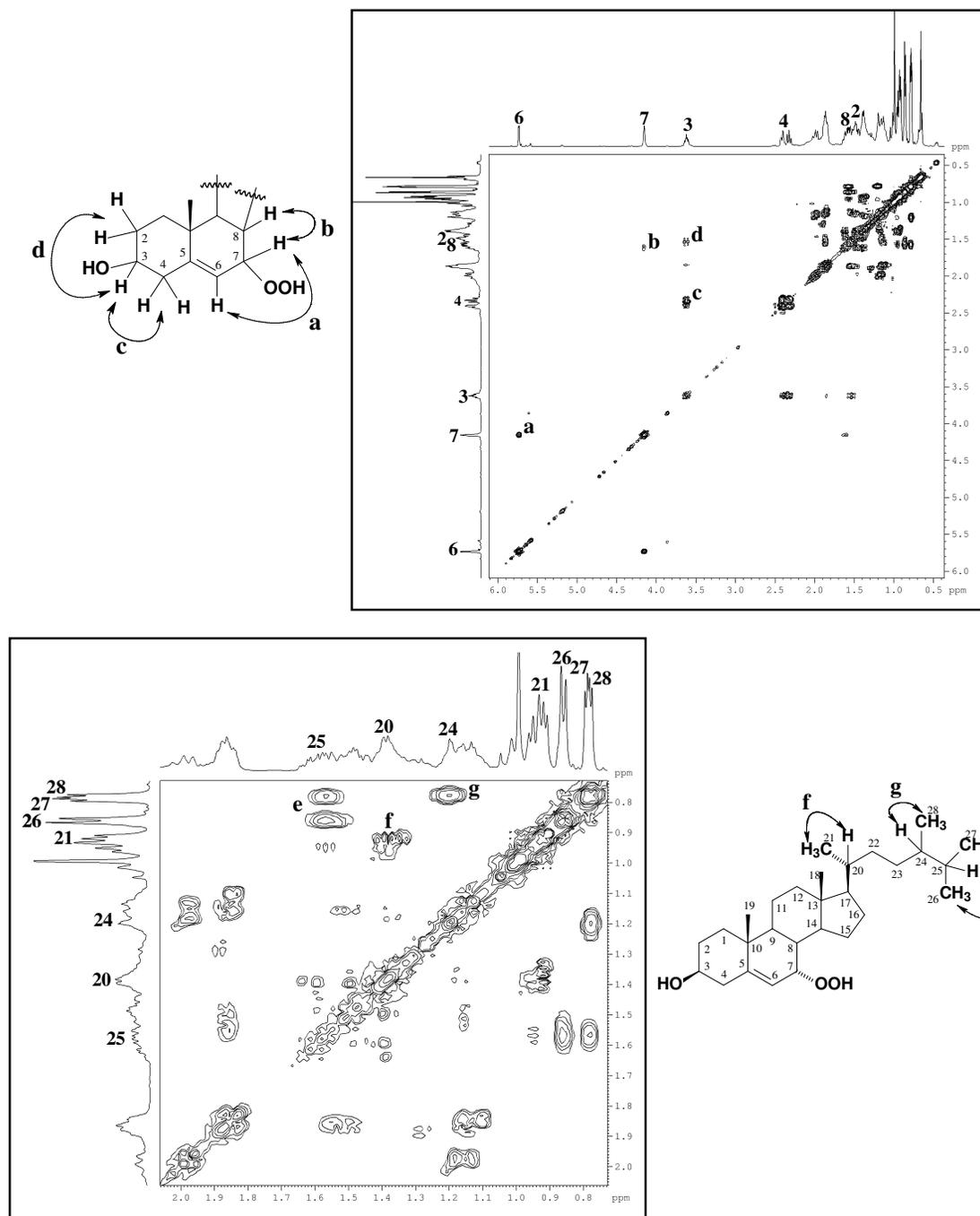


Figura 50: Espectros de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY (500 MHz, CDCl_3) de P-7

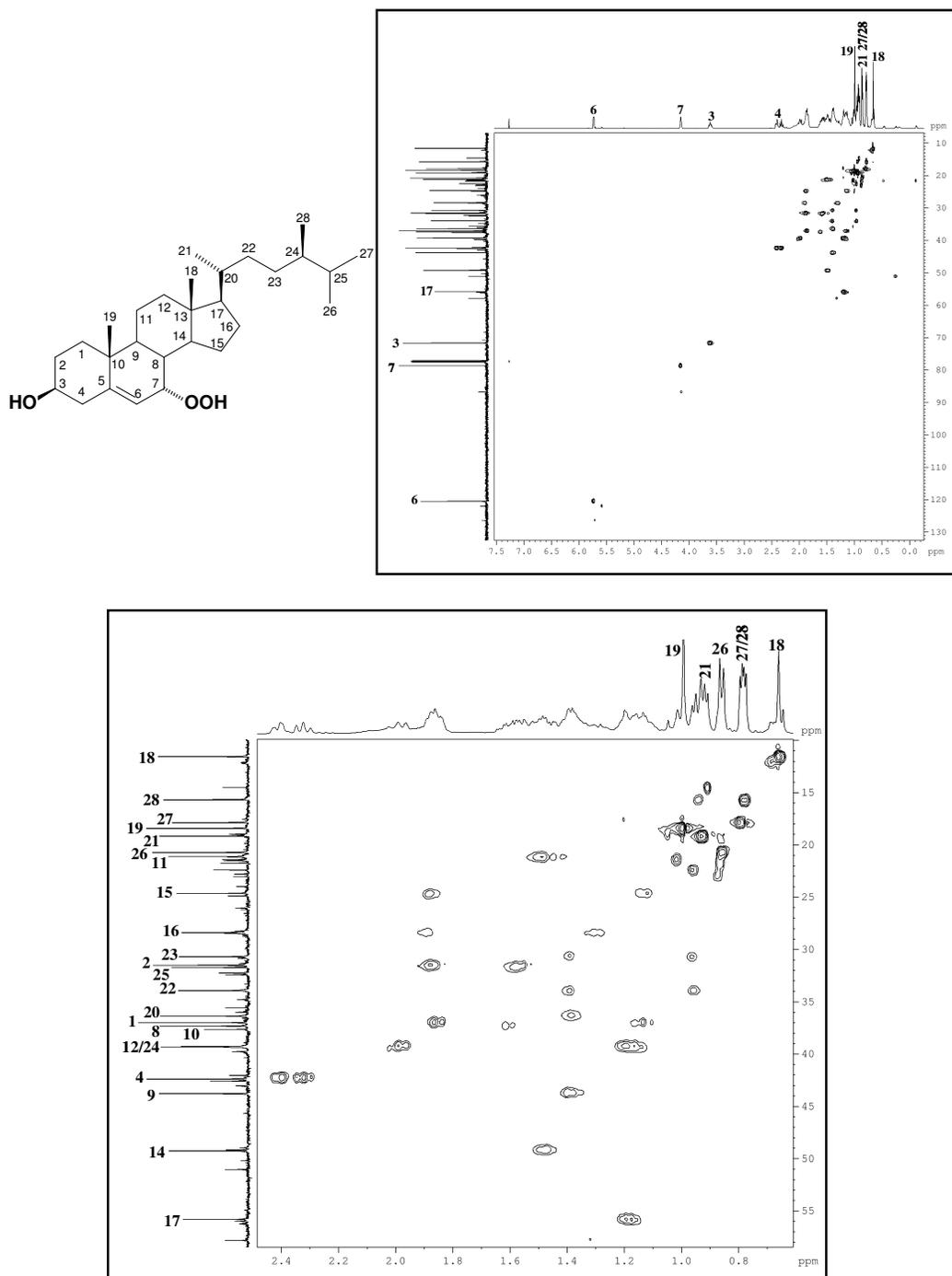


Figura 51: Espectros de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC (500, 125 MHz, CDCl_3) de P-7

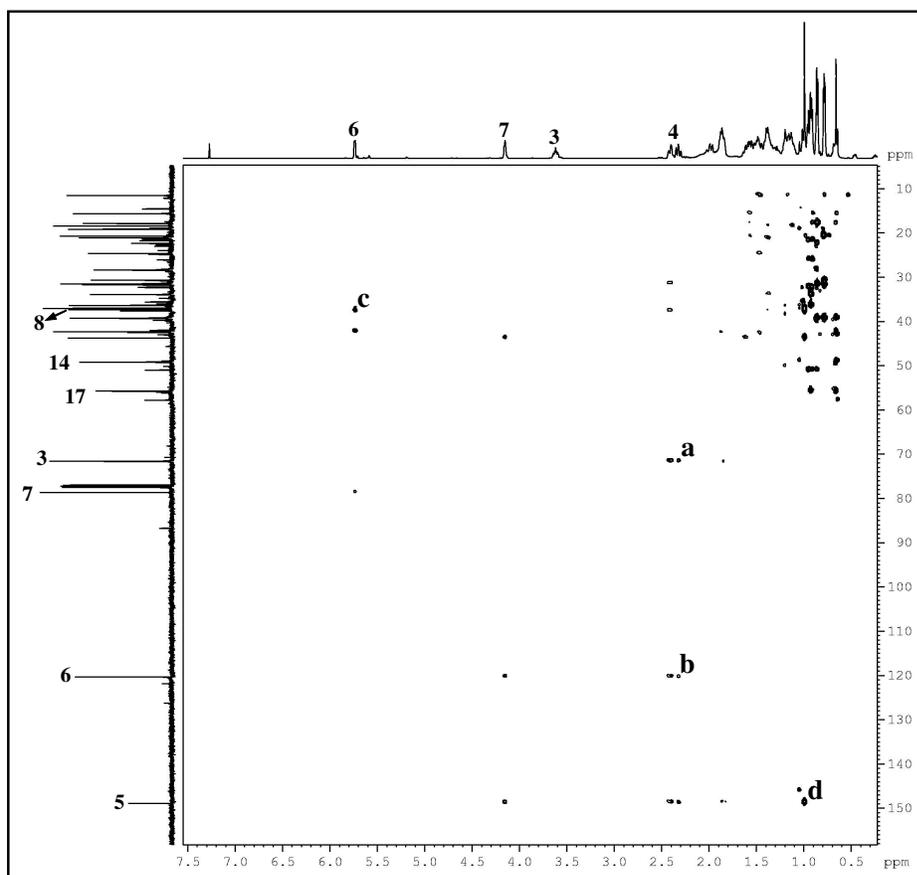
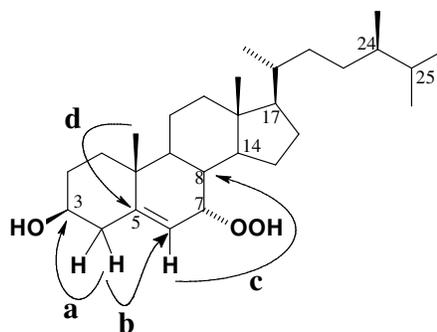


Figura 52: Espectros de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (500, 125 MHz, CDCl_3) de **P-7**



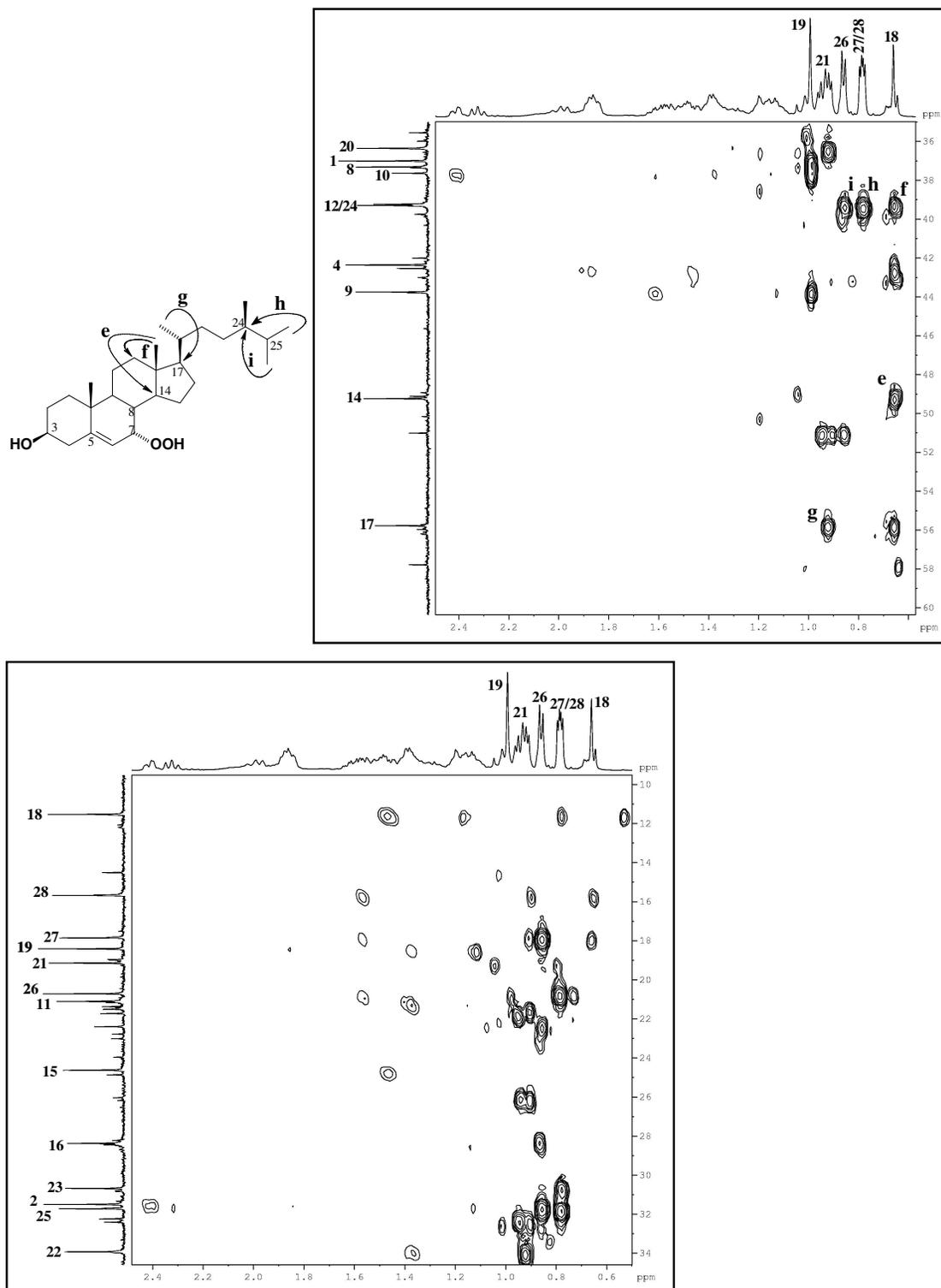


Figura 53: Expansões do espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (500, 125 MHz, CDCl_3) de **P-7**

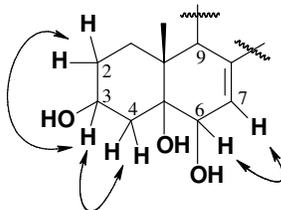
5.1.5 Determinação estrutural de P-10

O tratamento cromatográfico em gel de sílica da fração CH_2Cl_2 , obtido da partição líquido-líquido do extrato etanólico de *P. caribaeorum*, resultou em um sólido amorfo branco denominado de **P-10**, com faixa de fusão 247,0 - 248,4 °C.

O espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) (Fig. 57, pág. 96) apresentou uma banda larga em 3.428 cm^{-1} de estiramento de ligação O-H; absorções intensas em 2.957 e 2.873 cm^{-1} de $\nu_{\text{C-H}}$ de grupos CH_2 e CH_3 . Absorções em 1.468 cm^{-1} e 1.384 cm^{-1} de deformação angular simétrica no plano para CH_2 e CH_3 . Apresentou duas bandas em 1.664 e 966 cm^{-1} de estiramento C=C e deformação C-H de carbono sp^2 , respectivamente [SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000].

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, piridina- d_5) (Fig. 58, pág. 97) de **P-10**, mostrou-se semelhante aos espectros de **P-1**, **P-2**, **P-4** e **P-7**, exibiu sinais em δ_{H} 0,66 (s); 0,81 (d, 6,5 Hz); 0,82 (d, 6,5 Hz); 0,88 (d, 6,5 Hz); 0,98 (d, 6,5 Hz) e 1,55 (s) correspondentes a seis metilas e vários sinais sobrepostos entre δ_{H} 1,20 e 2,29 ppm, evidenciando uma estrutura esteroidal. Apresentou um singlete em δ_{H} 4,35 (H-6) e um multiplete em δ_{H} 4,85 (H-3), ambos com integração para um hidrogênio e compatível com hidrogênio ligado a carbono oxigenado, além de um sinal na região de hidrogênio ligado a carbono sp^2 em δ_{H} 5,76 (d, 5,0 Hz, H-7).

No espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H - COSY (Fig. 63, pág. 99), foram visualizados vários *cross-peaks* equidistantes, dos quais podemos destacar o acoplamento dos sinais de hidrogênios metilênicos em δ_{H} 2,53 e 3,05 (H-4a/b); 2,29 e 2,05 (H-2a/b) acoplando com o sinal em δ_{H} 4,85 (H-3) bem como acoplamento do hidrogênio ligado ao carbono sp^2 em δ_{H} 5,76 (H-7) com o hidrogênio em δ_{H} 4,35 (H-6) como indicado na Figura abaixo:



O espectro de RMN ^{13}C -CPD 125 MHz piridina- d_5 (Fig. 60, pág. 98) de **P-10** mostrou 28 linhas espectrais, entre os quais três sinais em δ_{C} 76,4; 74,5 e 67,9 ppm indicativos de carbonos sp^3 oxigenados e dois sinais em δ_{C} 141,9 e 120,8 ppm correspondentes a carbonos de ligação dupla (Csp^2). A comparação dos espectros de

RMN ^{13}C e DEPT 135° (Fig. 62, pág. 99) permitiu determinar o padrão de hidrogenação referente a cada carbono: seis carbonos metílicos, nove carbonos metilênicos, nove carbonos metínicos e quatro não-hidrogenados, como observado na Tabela a seguir.

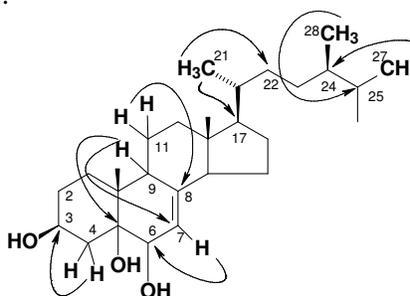
Tabela 14: Padrão de hidrogenação de **P-10**

C	CH	CH ₂	CH ₃	Fórmula Molecular
141,9	120,80	42,30	21,04	
76,4 (C-OH)	74,59 (C-OH)	40,35	19,57	
44,1	67,93 (C-OH)	34,26	19,15	
38,3	56,71	34,16	18,06	
	55,49	32,96	15,97	
	44,08	31,48	12,62	
	39,69	28,51		
	37,31	23,84		
	32,03	22,74		
4 C, 1 OH	9 CH, 2 OH	9 CH₂	6 CH₃	C₂₈H₄₈O₃, IDH 5

No espectro de RMN bidimensional ^1H , ^{13}C – HSQC (Fig. 66, pág. 101) foi possível observar, entre outras, as correlações do carbono em δ_{C} 74,5 (C-6) com o sinal do hidrogênio em δ_{H} 4,35 (H-6); a correlação do carbono em δ_{C} 120,8 (C-7) com o hidrogênio em δ_{H} 5,76 (H-7), além da correlação do carbono carbinólico em δ_{C} 67,9 (C-3) com o hidrogênio em δ_{H} 4,85 (H-3). A análise detalhada deste espectro permitiu a inequívoca correlação dos sinais espectrais dos carbonos aos seus respectivos sinais de hidrogênios, como mostrado na Tabela 16 (pág. 95).

Os dados observados no espectro ^1H , ^{13}C – HMBC (Fig. 67, pág. 102) apresentou os seguintes acoplamentos: δ_{H} 2,29 (H-2) com o carbono em δ_{C} 67,9 (C-3); 1,55 (H-19), 2,57 (H-9) e 5,76 (H-7) acoplado a três ligações com o sinal em δ_{C} 76,4 (C-5) e do sinal de hidrogênio em δ_{H} 1,70 (H-11) com o carbono em δ_{C} 141,9 (C-8). Neste espectro, foram observados correlações dos hidrogênios em δ_{H} 0,98 (H-21) com os carbonos em δ_{C} 56,7 (C-17) e 34,2 (C-22); δ_{H} 0,81 (H-27) com o carbono em δ_{C} 39,6 (C-24) e dos hidrogênios em 0,82 (H-28) com o carbono em δ_{C} 32,0 (C-25). Estas correlações confirmam a posição das hidroxilas e os grupos metilas na estrutura esteroidal, como ilustrado na Figura a seguir.

Figura 54: Principais correlações ^1H , ^{13}C – HMBC de **P-10**.



Conforme os espectros de RMN ^1H , ^{13}C (uni e bidimensional) e posterior comparação com dados descritos na literatura para esteróides (Tabela 15, pág. 94), podemos concluir que o composto **P-10** tratava-se do esteróide 24(*R*)-ergost-7-en-3 β ,5 α ,6 β -triol (Fig. 55), isolado por Madaio *et al.* 1989, a partir da esponja *Ircinia variabilis*, porém inédito no gênero *Palythoa*.

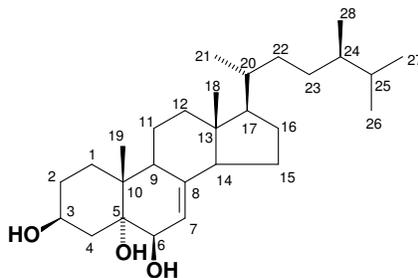


Figura 55: Estrutura do composto **P-10**

As posições 3 β , 5 α e 6 β das hidroxilas, foram definidas a partir dos dados de RMN ^1H disponíveis na literatura, em que o hidrogênio H-6 α encontra-se mais desprotegido, com deslocamento químico em δ_{H} 4,31 ppm (Figura 56), enquanto o hidrogênio H-6 β apresenta deslocamento químico em δ_{H} 3,81, o que comprova que o composto **P-10** apresenta hidroxilas nos carbonos C-5 e C-6 nas posições α e β , respectivamente [MADAIO *et al.*, 1989].

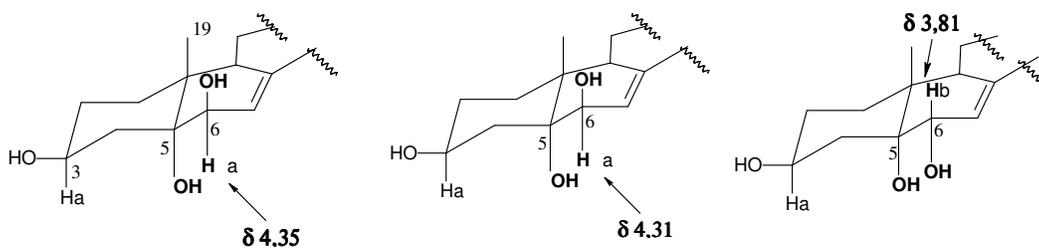


Figura 56: Estruturas parciais do composto **P-10** e dos esteróides 24(*R*)-ergost-7-en-3 β ,5 α ,6 β -triol e 3 β ,5 α ,6 α -triol com dados de RMN ^1H , Madaio *et al.*, 1989.

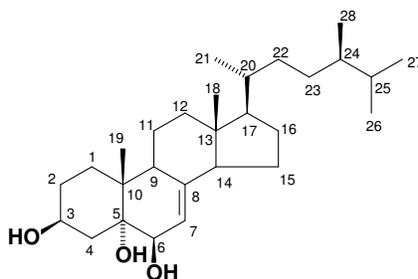


Tabela 15: Comparação entre os dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C -CPD de **P-10** (piridina- d_5 , 500 e 125 MHz) com os descritos na literatura para o esteróide 24(R)-ergost-7-en-3 β ,5 α ,6 β -triol (piridina- d_5 , 400 e 100 MHz) [MADAIO *et al.*, 1989]

P-10		Esteróide ergost-7-en-3 β ,5 α ,6 β -triol	P-10	Esteróide ergost-7-en-3 β ,5 α ,6 β -triol
#C	δC		δH	
1	34,1	32,6	2,18; 1,74	
2	32,9	33,8	2,29; 2,05	
3	67,9	67,3	4,85 (m)	4,83 (m)
4	42,3	42,0	3,05 (t, 13 Hz)	3,02 (dd, 12,2 e 12,2 Hz)
5	76,4	76,2	2,53	
6	74,5	74,3	-	-
7	120,8	120,5	4,35 (s, largo)	4,31 (d largo, 5,5 Hz)
8	141,9	141,6	5,76 (d, 5,0 Hz)	5,74 (d largo, 5,5 Hz)
9	44,0	43,8	-	-
10	38,3	38,1	2,55	
11	22,7	22,4	-	-
12	40,3	40,0	1,70	
13	44,1	43,8	2,10; 1,30	
14	55,4	55,2	-	-
15	23,8	23,5	1,90 (t)	
16	28,5	28,2	1,58	
17	56,7	56,4	1,83; 1,24	
18	12,6	12,2	1,23	
19	19,1	18,8	0,66 (s)	0,67 (s)
20	37,3	37,0	1,55 (s)	1,53 (s)
21	19,5	19,3	1,32 (m)	
22	34,2	34,9	0,98 (d, 6,5 Hz)	1,06 (d, 6,6 Hz)
23	31,4	31,2	1,44; 0,96	
24	39,6	39,4	1,43; 0,98	
25	32,0	31,7	1,20	
26	21,0	20,7	1,58	
27	18,0	17,7	0,88 (d, 6,5 Hz)	0,85 (d, 6,6 Hz)
28	15,9	15,7	0,81 (d, 6,5 Hz)	0,78 (d, 6,6 Hz)
			0,82 (d, 6,5 Hz)	0,77 (d, 6,6 Hz)

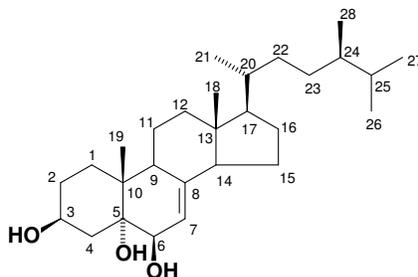


Tabela 16: Dados de RMN ^1H , ^{13}C e correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C (HSQC e HMBC) de **P-10**

C	HSQC		HMBC	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)(multip, $J_{\text{H,H}}$)	$^2J_{\text{C-H}}$	$^3J_{\text{C-H}}$
1	34,16	2,18; 1,74		3H-19
2	32,96	2,29; 2,05		2H-4
3	67,93	4,85 (m)	2H-4	
4	42,30	3,05 (t, 13 Hz) 2,53		
5	76,46	-	2H-4; H-6	3H-19; H-9; H-7
6	74,59	4,35 (s)	H-7	
7	120,80	5,76 (m)	H-6	H-9
8	141,93	-	H-9; H-14	H-6; H-11
9	44,08	2,55		3H-19; H-7
10	38,37	-		3H-19; H-4; H-6
11	22,74	1,70	H-9	
12	40,35	2,10; 1,30		3H-18
13	44,18	-	3H-18	
14	55,49	1,90 (t)		3H-18; H-7; H-16
15	23,84	1,58		
16	28,51	1,83; 1,24		
17	56,71	1,23		3H-18; 3H-21
18	12,62	0,66 (s)		H-12; H-14
19	19,15	1,55 (s)		H-9; 2H-1
20	37,31	1,32 (m)	3H-21	
21	19,57	0,98 (d, 6,5 Hz)		
22	34,26	1,44; 0,96		3H-21
23	31,48	1,43; 0,98		
24	39,69	1,20	3H-28	3H-26; 3H-27
25	32,03	1,58	3H-26; 3H-27	3H-28
26	21,04	0,88 (d, 6,5 Hz)	H-25	3H-27
27	18,06	0,81 (d, 6,5 Hz)	H-25	3H-26
28	15,97	0,82 (d, 6,5 Hz)		H-25

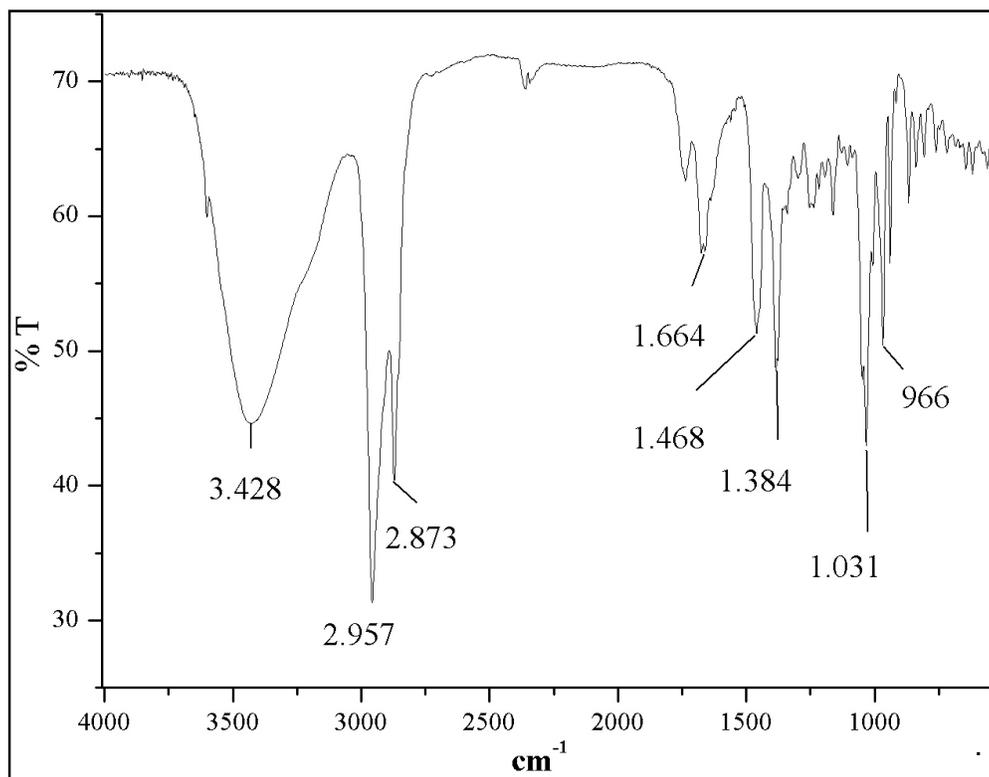
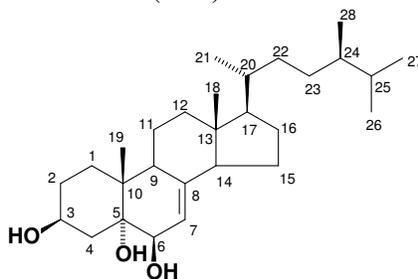


Figura 57: Espectro de infravermelho (KBr) de **P-10**



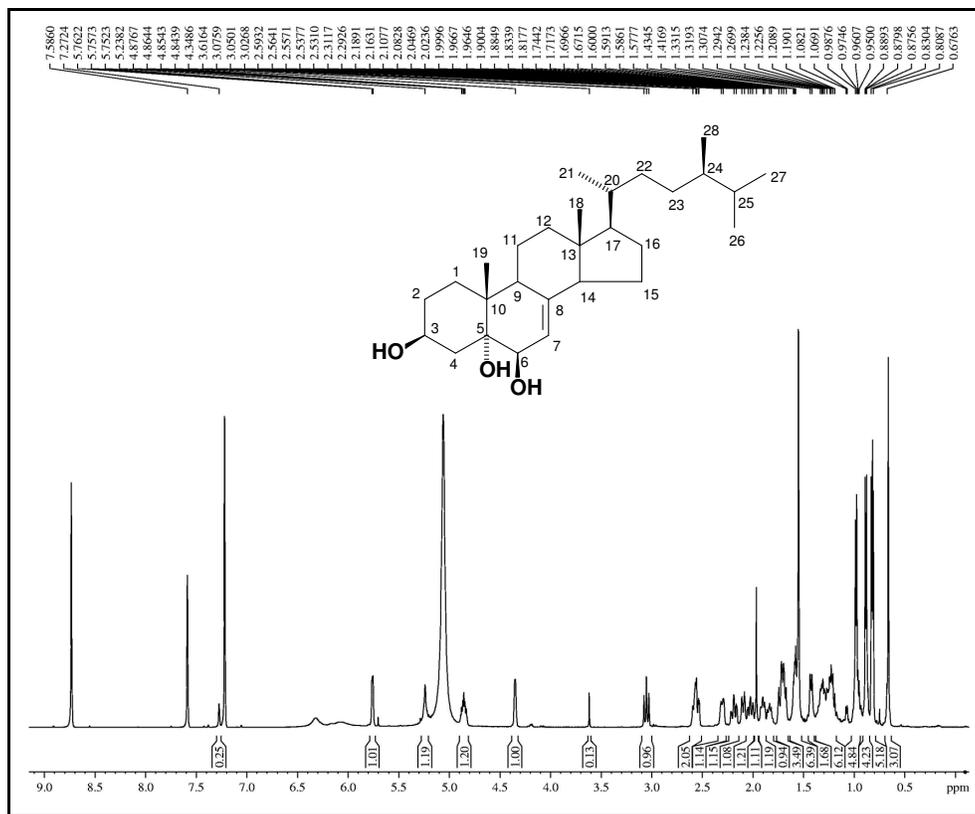


Figura 58: Espectro de RMN ^1H (500 MHz piridina- d_5) de P-10

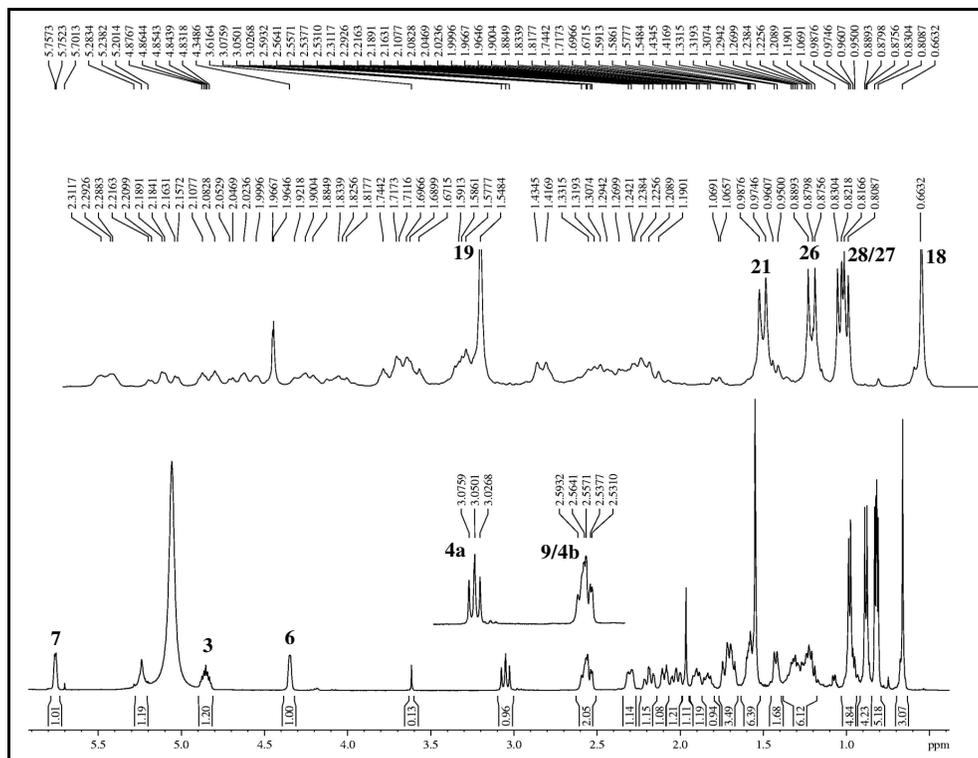


Figura 59: Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz piridina- d_5) de P-10

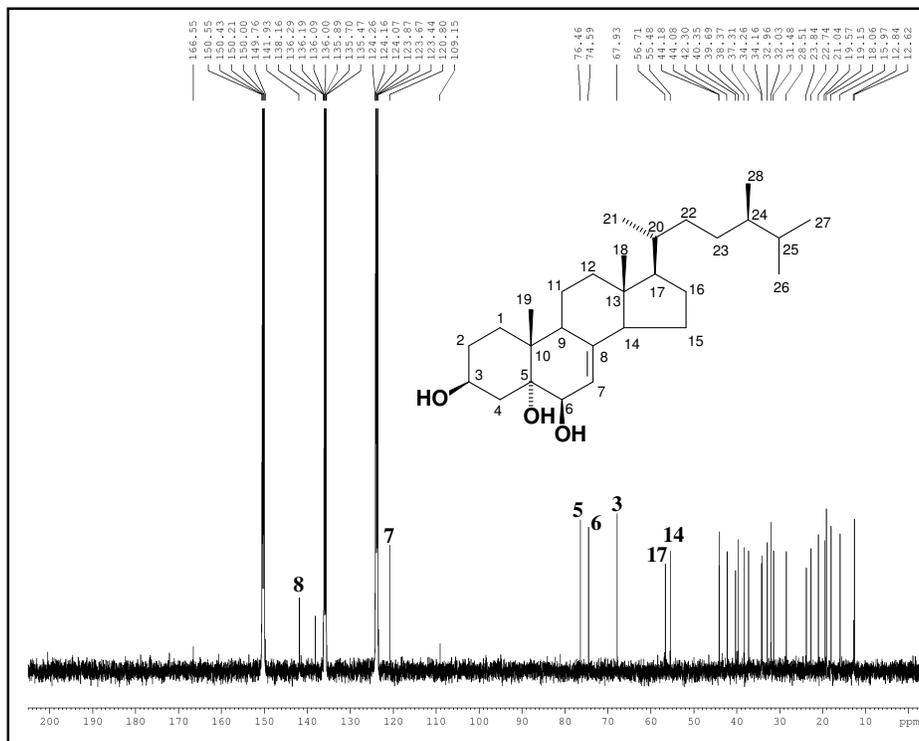


Figura 60: Espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz piridina- d_5) de P-10

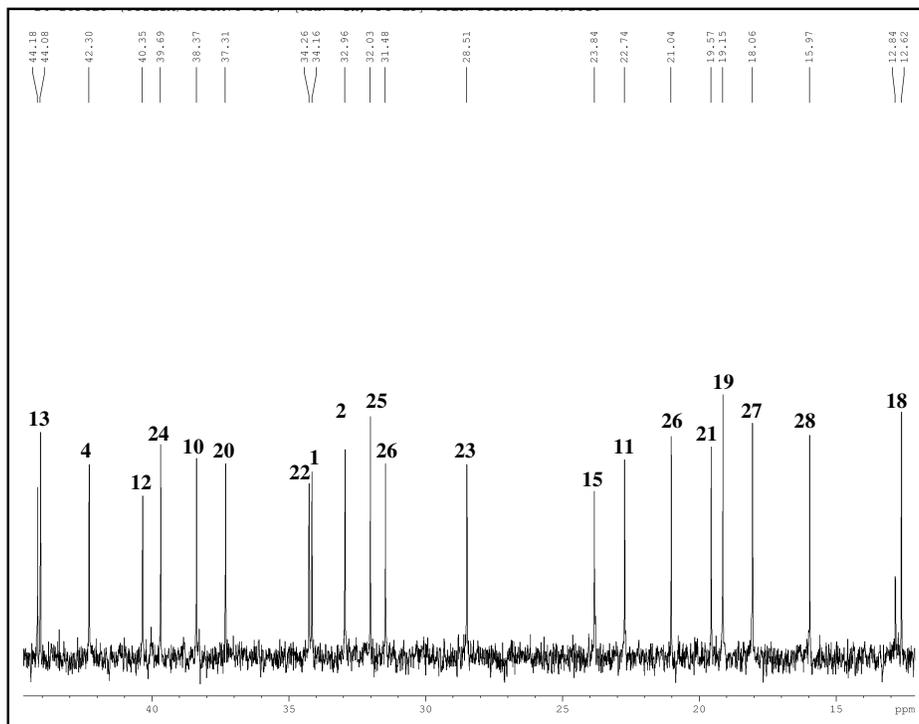


Figura 61: Expansão do espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz piridina- d_5) de P-10

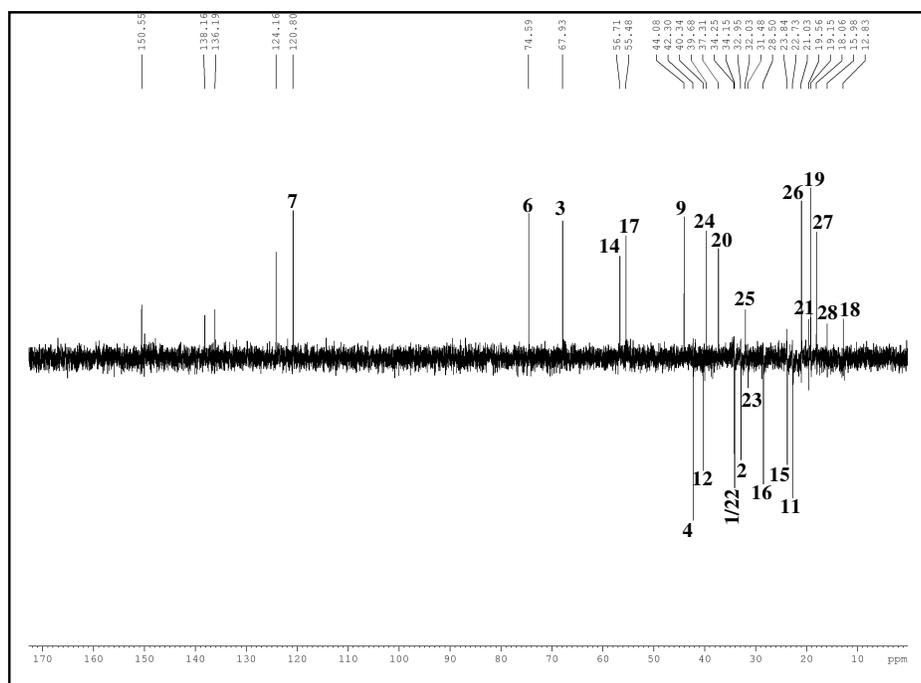


Figura 62: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz piridina- d_5) de **P-10**

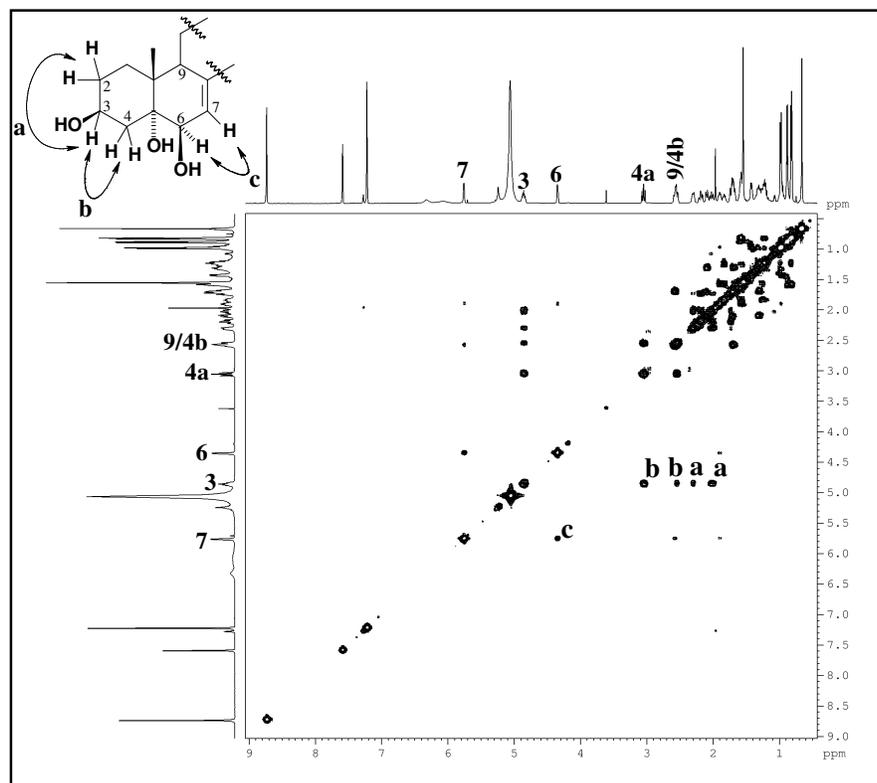


Figura 63: Espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY (500 MHz, piridina- d_5) de **P-10**

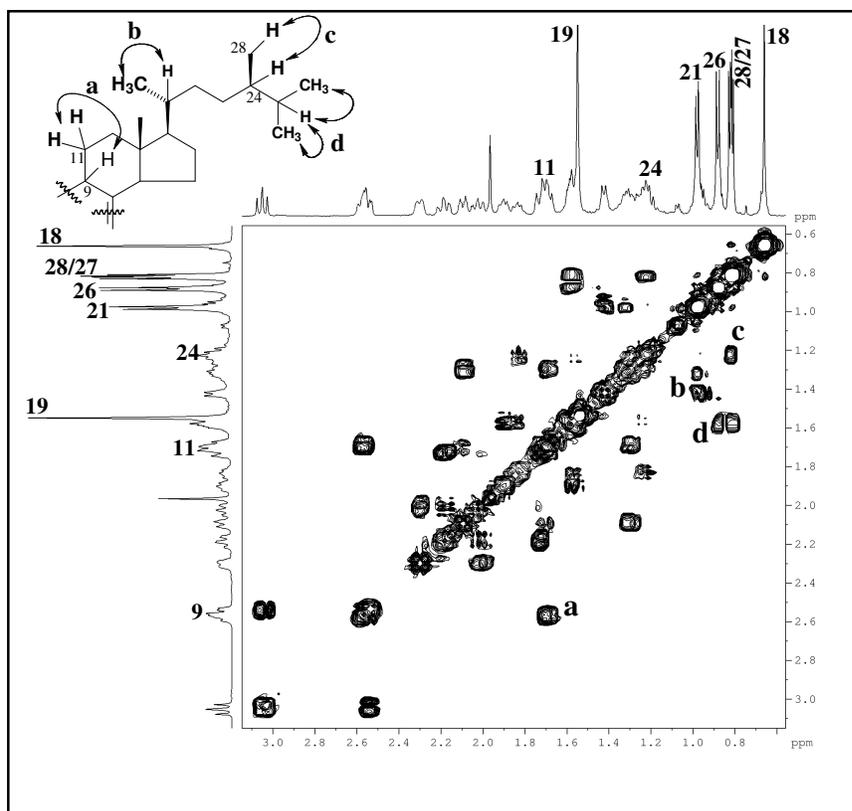


Figura 64: Expansão do espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY (500 MHz, piridina- d_5) de **P-10**

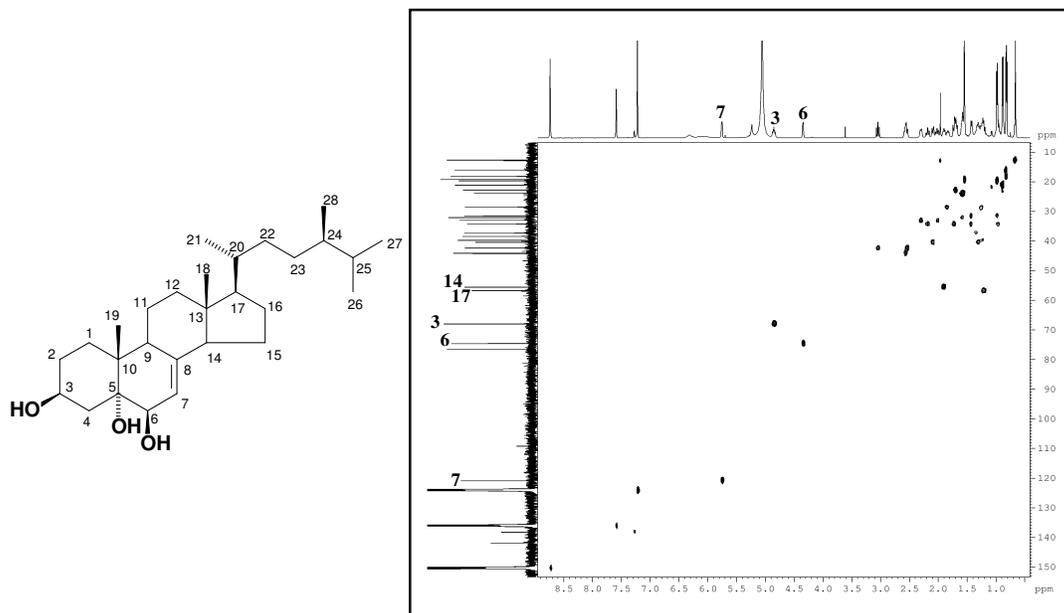


Figura 65: Espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC (500, 125 MHz, piridina- d_5) de **P-10**

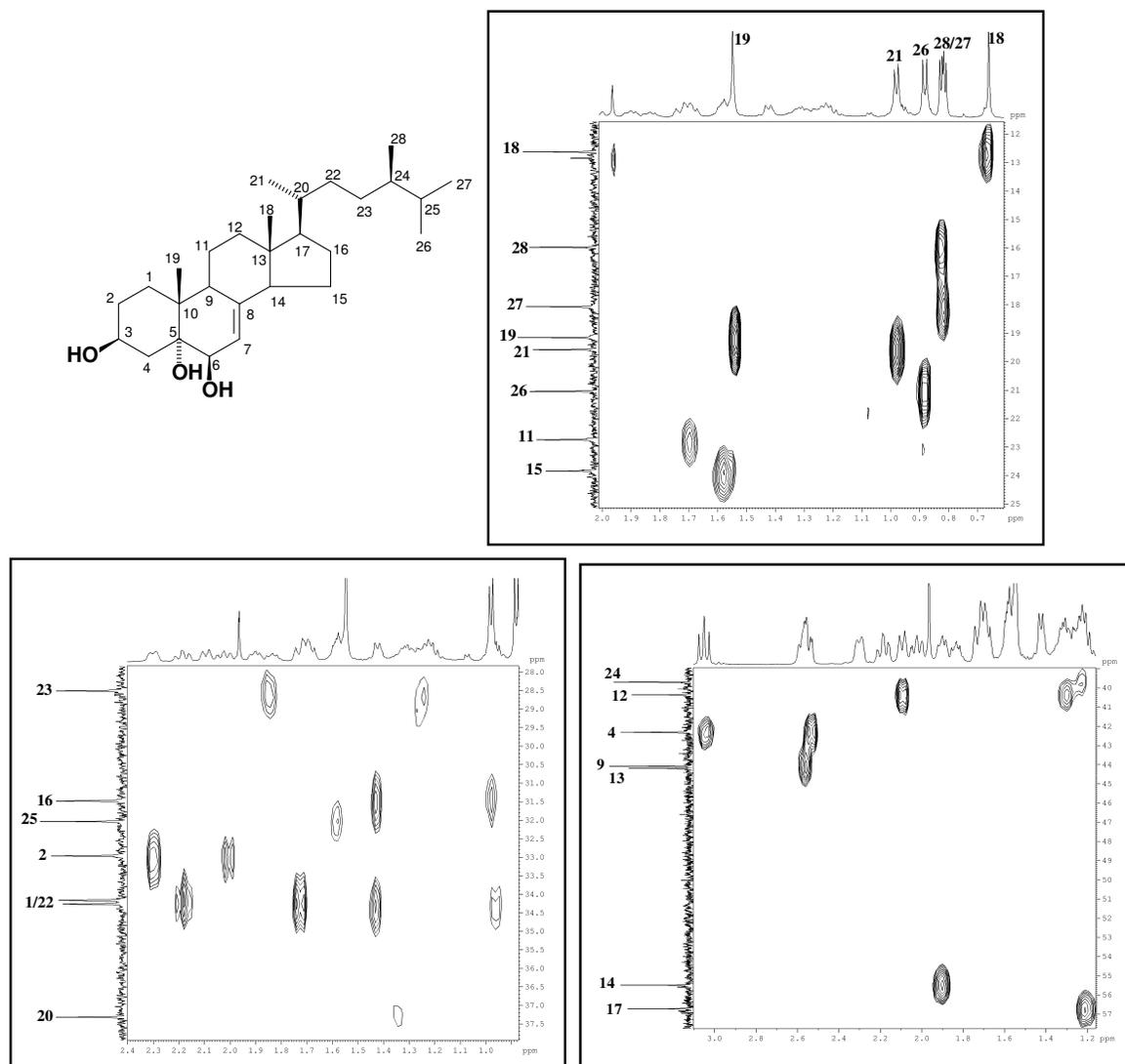


Figura 66: Expansões do espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC (500, 125 MHz, piridina- d_5) de **P-10**

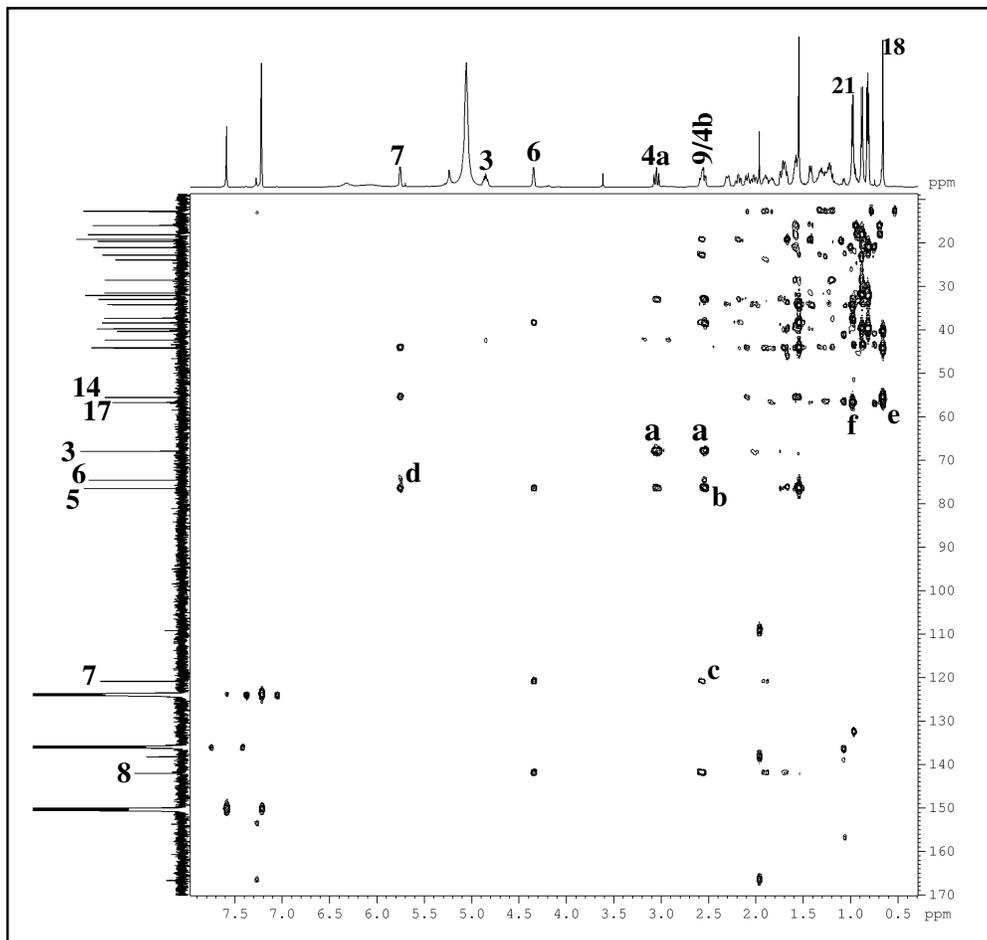
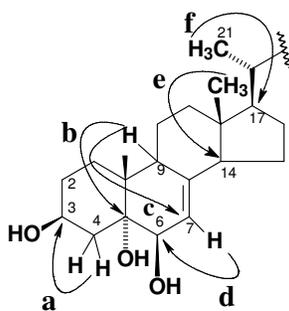


Figura 67: Espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (500, 125 MHz, piridina- d_5) de **P-10**



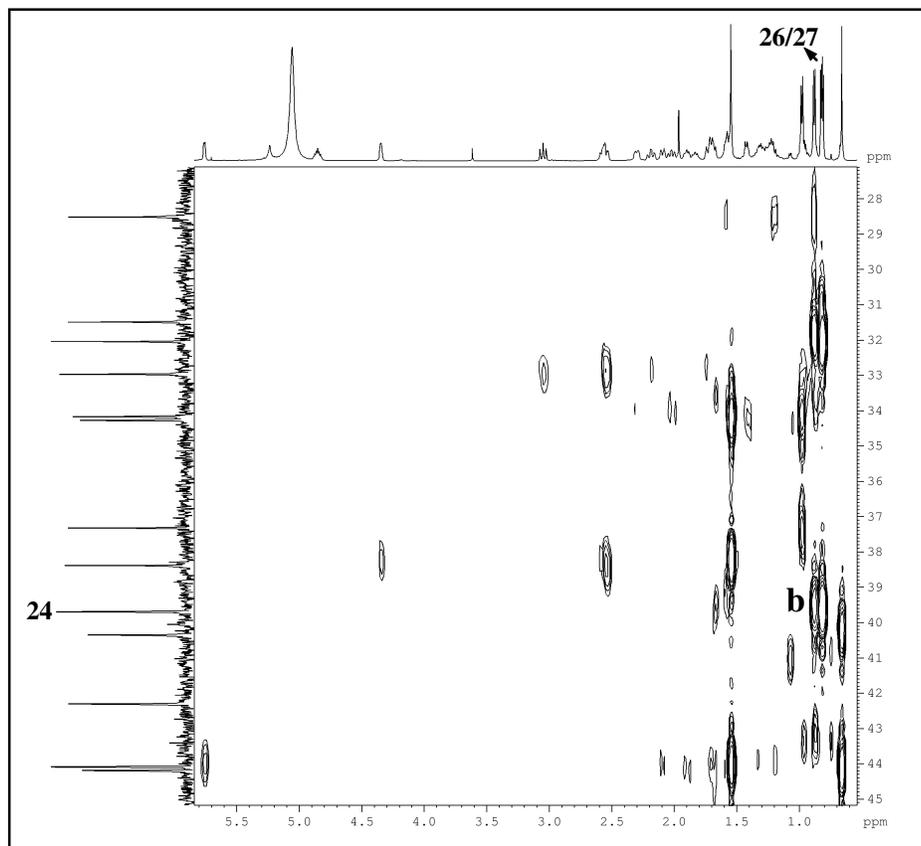
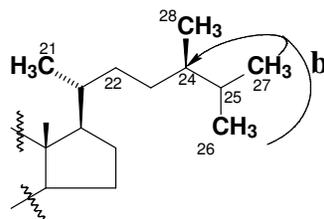


Figura 68: Expansão do espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (500, 125 MHz, piridina- d_5) de **P-10**



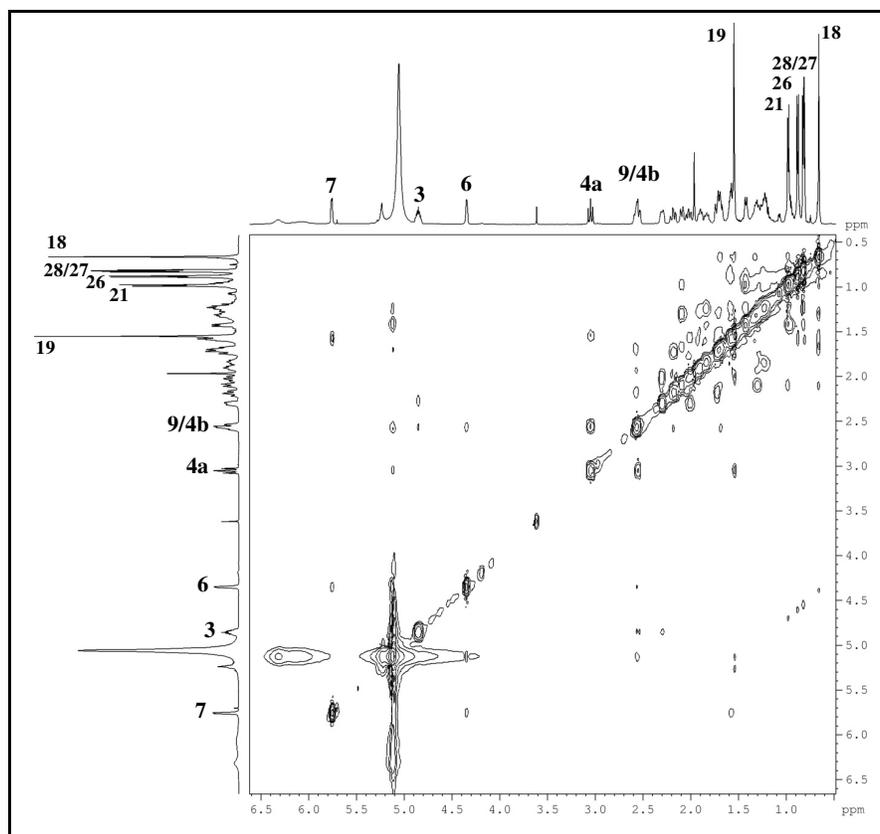


Figura 69: Espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H – NOESY (500 MHz, piridina- d_5) de **P-10**

5.1.6 Determinação estrutural de P-3

O composto denominado de **P-3** foi isolado após sucessivas colunas cromatográficas em gel de sílica a partir do extrato hexânico de *P. caribaeorum*. Este composto foi isolado como um sólido amorfo branco, com ponto de fusão de 62,5°C e rotação específica de $[\alpha]_D^{20} = +19$ ($c = 0,085$; CHCl_3), [p.f. = 65-67 °C, PETTIT, 1982].

O espectro de absorção no infravermelho (Fig. 73, pág.108) apresentou absorções em 3.408 e 3.325 cm^{-1} características de deformação axial de ligação O-H; duas absorções intensas em 2.917 e 2.849 cm^{-1} correspondentes a deformação axial assimétrica e simétrica de ligação C-H para grupos CH_2 e CH_3 , respectivamente, além de absorções na faixa de 1.133 a 1.052 cm^{-1} de ligação C-O [SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000].

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) (Fig. 74, pág. 109) apresentou um tripleto em δ_{H} 0,88 ppm para um grupo metila, sinais sobrepostos entre δ_{H} 1,25 e 1,31, indicativos de grupos metilênicos de hidrocarbonetos alifáticos, além de sinais em δ_{H} 3,44 (m, 2H), 3,64 (dd, 1H), 3,71 (dd, 1H), 3,52 (m, 2H) e 3,87 (m, 1H), característicos de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados.

O espectro de RMN ^{13}C – CPD 125 MHz, CDCl_3 (Fig. 75, pág. 109) apresentou vários sinais sobrepostos entre δ_{C} 29,5 e 29,8 ppm e mais oito linhas espectrais, sendo quatro sinais na região de carbonos sp^3 oxigenados (δ_{C} 64,4; 70,6; 72,0; e 72,6 ppm). A análise comparativa destes dados com aqueles observados no espectro de RMN ^{13}C -DEPT-135° (Fig. 76, pág. 110), permitiu determinar o padrão de hidrogenação de cada carbono, como mostrado na Tabela 17, pág. 106.

Através do espectro de RMN ^1H , ^1H – COSY (Fig 77, pág. 110) foi possível verificar uma sequência de acoplamentos envolvendo os sinais 3,64 (H-3), 3,87 (H-2) e 3,52 (H-1) (Figura 70). Esta informação com aquelas de IV, RMN ^1H e ^{13}C , nos permitiu sugerir para a estrutura de **P-3** um derivado do glicerol.

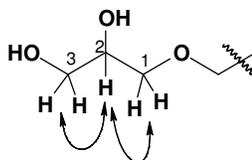


Figura 70: Principais acoplamentos de ^1H , ^1H – COSY de **P-3**

Tabela 17: Padrão de hidrogenação determinado através da comparação dos espectros de RMN ^{13}C -CPD e DEPT 135°

CH	CH ₂	CH ₃	Fórmula Molecular
70,6 (C-OH)	72,6 (C-O)* 72,0 (C-O)* 64,4 (C-OH) 32,1 29,9-29,5** 29,5 26,2 22,8	14,3	
1 CH, 1 OH	17 CH₂, 1 OH, 1 C-O	1 CH₃	C₁₉H₄₀O₃, IDH 0

* Ligados ao mesmo oxigênio

** Referente a dez carbonos metilênicos, confirmado através da análise do espectro de massa, Figura 72.

De acordo com os dados discutidos e em comparação com os dados da literatura (Tabela 18, pág. 107), é plausível sugerir para **P-3** a estrutura do 1-*O*-hexadecilglicerol.

O espectro de massa (Fig. 72, pág. 106) do referido composto, foi de fundamental importância para elucidação da cadeia alifática, em seu espectro de massa mostrou um pico correspondente ao íon molecular m/z 316 e padrão de fragmentação compatível com 1-*O*-hexadecilglicerol (Fig. 71), um composto já conhecido e isolado da espécie *Palythoa liscia*, por Pettit e Fujii, 1982.

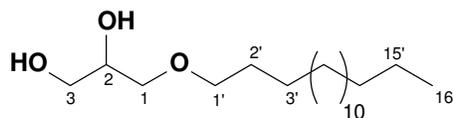


Figura 71: Estrutura de **P-3**

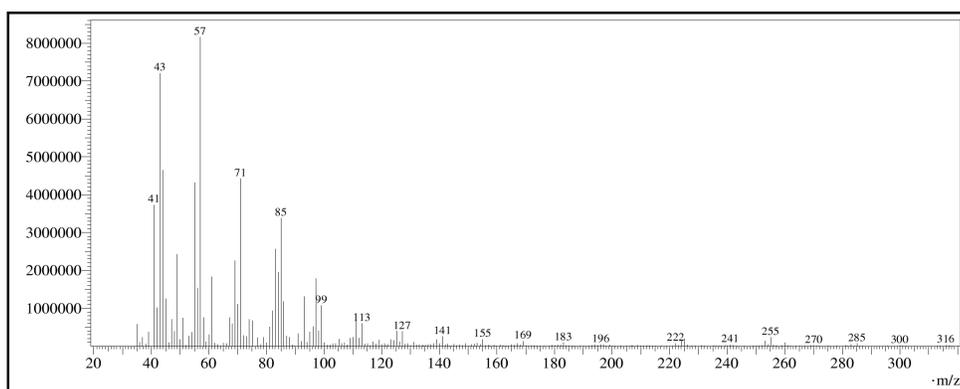


Figura 72: Espectro de massa do composto **P-3**

Fragmentações de massas:

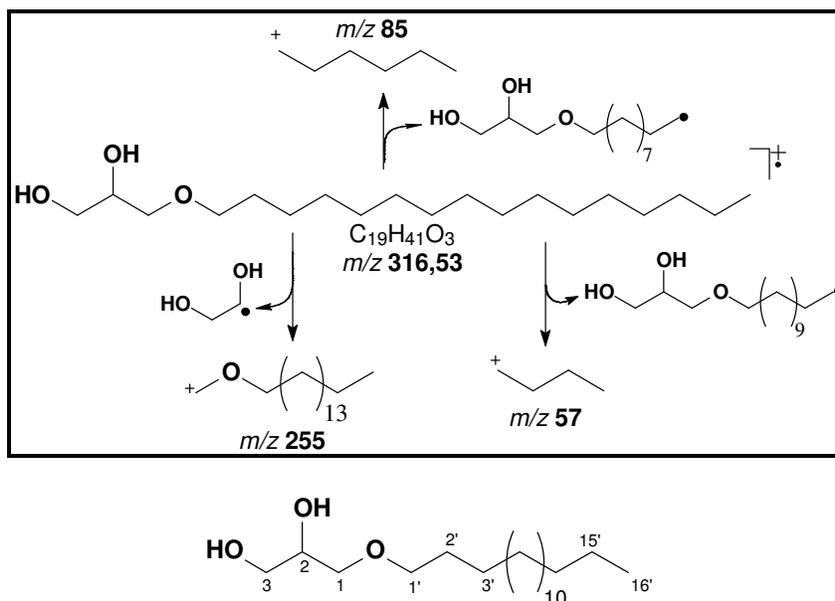


Tabela 18: Deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C de **P-3** (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) comparado com dados descritos na literatura para o derivado do glicerol (1-*O*-hexadecilglicerol) (CDCl_3 , 300 e 75 MHz) [QUIJANO *et al.*, 1994]

P-6		Derivado glicerol	P-6		Derivado glicerol
#C	δC (ppm)		δH (ppm)(multip, $J_{\text{H,H}}$)		
1	72,6	71,8	3,52 (m)		3,53 (m)
2	70,6	70,4	3,87 (m)		3,86 (m)
3	64,4	64,2	3,71 (dd, 11,5 e 4 Hz)		3,71 (dd, 11,7 e 3,9 Hz)
			3,64 (dd, 11,5 e 5,5 Hz)		3,63 (dd, 11,7 e 5,4 Hz)
1'	72,0	72,4	3,44 (m)		3,46 (m)
2'	29,5	29,5	1,57 (q, 7,0 Hz))		1,57 (q, 6,9 Hz)
3'	26,2	26,0	1,32		-
4'-13'	29,8-29,5	29,7-29,3	1,24		-
14'	32,1	31,9	1,25		1,26
15'	22,8	22,7	1,30		-
16'	14,3	14,1	0,87 (t, 7 Hz)		0,88 (t, 6,7 Hz)
OH			2,69		-

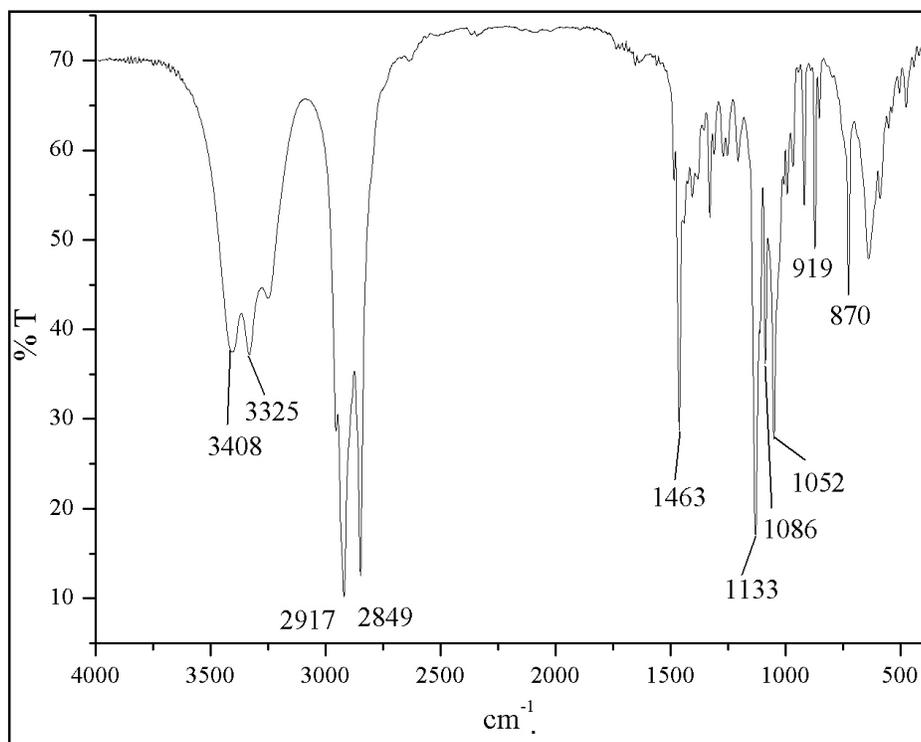
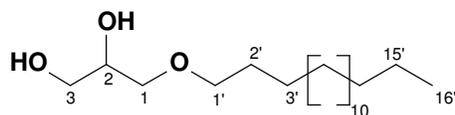


Figura 73: Espectro de infravermelho (KBr) de **P-3**



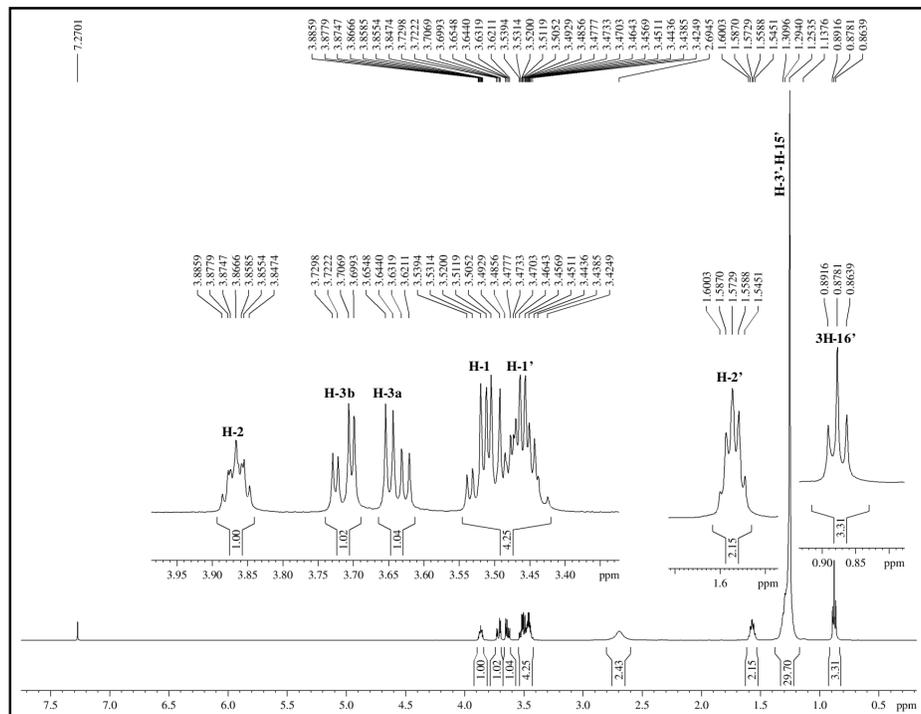


Figura 74: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **P-3**

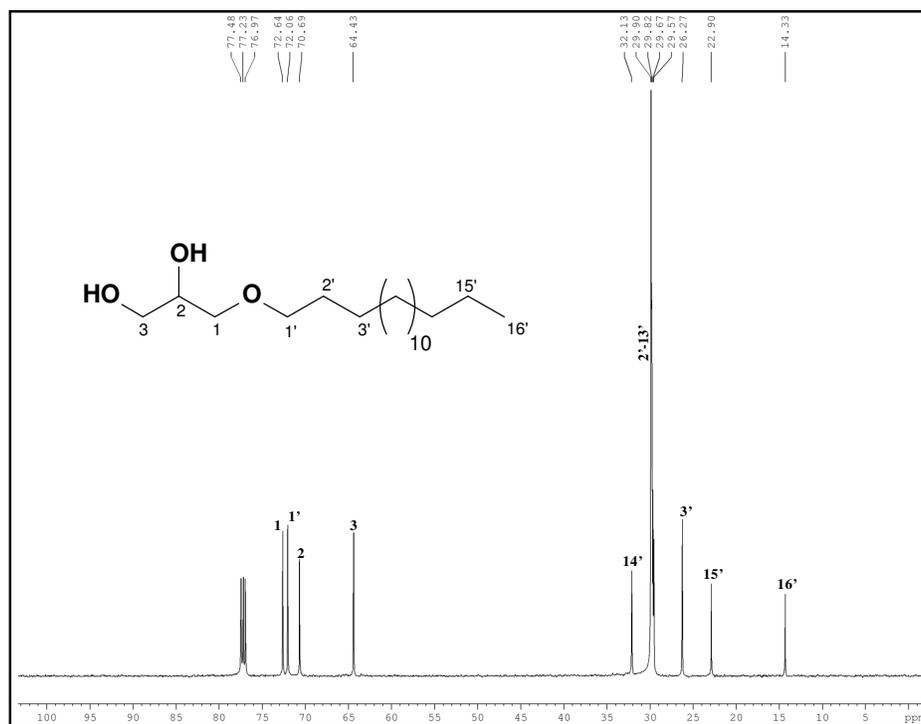


Figura 75: Espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, CDCl_3) de **P-3**

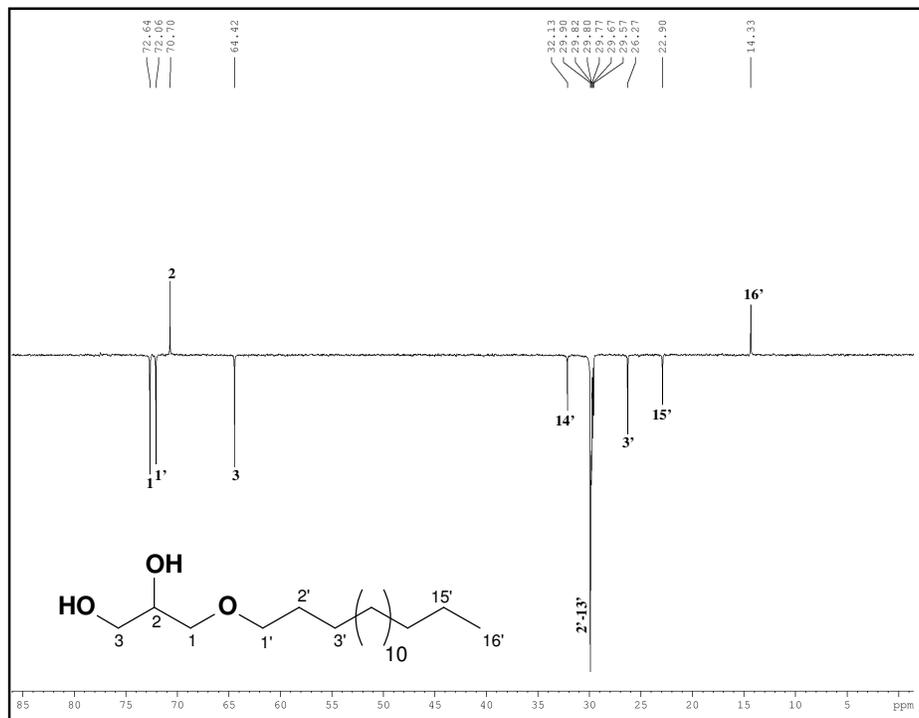


Figura 76: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de **P-3**

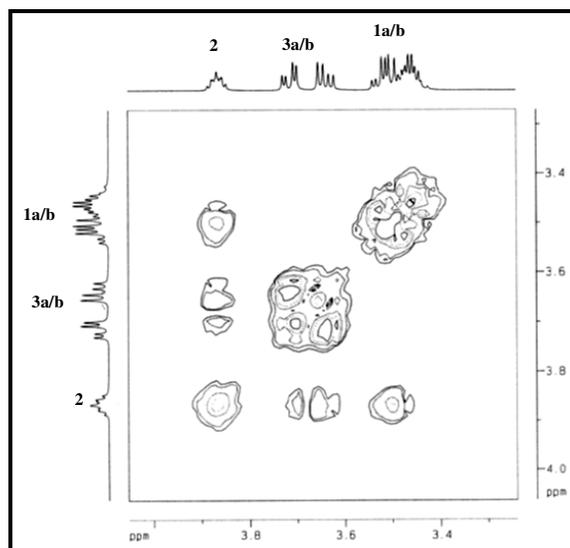


Figura 77: Espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY (500 MHz, CDCl_3) de **P-3**

Determinação estrutural de P-5 e P-6

Cromatografia em coluna sobre gel de sílica, da fração 36-45 gerada pela partição do extrato hexânico de *P. caribaeorum* possibilitou o isolamento de uma mistura de duas substâncias, que depois de submetida à CLAE resultou na separação de dois picos: pico 1 ($t_R = 8,2$ min. **P-5**) e pico 2 ($t_R = 9,1$ min. **P-6**) (item 6.4.1.7, pág. 190).

5.1.7 Determinação estrutural de P-5

Este composto foi obtido como um sólido amorfo branco, com ponto de fusão na faixa de 95,1-96,2 °C e rotação específica de $[\alpha]_D^{20} = +17$ ($c = 0,070$; CHCl_3), literatura: p.f. = 98 °C e $[\alpha]_D^{20} = +12$ ($c = 0,050$; CHCl_3) [MURALIDHAR *et al.*, 2005].

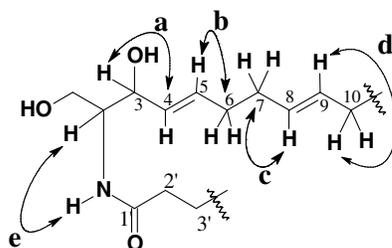
O espectro de absorção na região do infravermelho (KBr) (Fig. 82, pág. 117) apresentou uma absorção larga centrada em 3.280 cm^{-1} , característico de deformação axial de ligação O-H de hidroxila; absorções em 2.917 e 2.849 cm^{-1} correspondentes a deformação axial assimétrico e simétrico de ligação C-H de grupamentos CH_2 e CH_3 . Duas absorções uma em 1.643 cm^{-1} e outra em 1.544 cm^{-1} característico de função amida [INAGAKI *et al.*, 2004]. Absorções em 1.049 e 1.022 cm^{-1} condizentes com deformação axial C-O e uma absorção forte em 962 cm^{-1} referente à deformação axial de dupla ligação C=C [SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000].

O espectro de massa de alta resolução (EMAR) (Fig. 83, pág. 117), obtido com ionização por *electrospray* e no modo negativo, mostrou um pico em m/z 534,4884 $[\text{M} - \text{H}]^-$ enquanto que no modo positivo mostrou um pico correspondente ao aduto de sódio em m/z 558,4884 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, indicando as fórmulas moleculares $\text{C}_{34}\text{H}_{64}\text{NO}_3$ (calculado 534,4886) e $\text{C}_{34}\text{H}_{65}\text{NO}_3\text{Na}$ (calculado 558,4862), respectivamente.

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, piridina- d_5) (Fig. 84, pág. 118) de **P-5** apresentou um dubleto em δ_H 8,40 (NH, 8,5 Hz), referente a hidrogênio ligado a átomo de nitrogênio de função amida, além de sinais de hidrogênio ligado a carbono sp^2 em δ_H 6,07 (dd, $J = 15,4$ e $6,2$ Hz), 6,01 (dt, $J = 15,4$ e $6,2$ Hz), cuja constante de acoplamento indica uma estereoquímica *E*, e 5,50 (m, H-8 e H-9). Sinais em δ_H 4,86 (t, 6,2 Hz, H-3); 4,47 (dd, 11 e 5,3 Hz, H-1a) e 4,29 (dd, 11 e 5,3 Hz, H-1b) indicativos de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados. O espectro de RMN ^1H , mostrou também um multipletto em δ_H 4,76 (m, H-2) característico de hidrogênio ligado a carbono nitrogenado. Entre os sinais apresentados, observou-se um tripleto em δ_H 0,87 com integração para seis

hidrogênios para duas metilas e múltiplos sinais na faixa de δ_H 1,27 a 2,48 ppm que foram atribuídos a grupos metilênicos de uma cadeia alifática.

No espectro de correlação homonuclear 1H , 1H - COSY (500 MHz, piridina- d_5) (Fig. 87, pág. 120), foram visualizados os acoplamentos dos hidrogênios em δ_H 4,86 (H-3) com o sinal em δ_H 6,07 (H-4); δ_H 6,01 (H-5) acoplado com δ_H 2,18 (H-6), e dos hidrogênios em δ_H 5,50 (H-8 e H-9) com os hidrogênios 2,14 (H-7) e 2,02 (H-10), respectivamente. Estas correlações permitiram propor a localização das ligações duplas presente na estrutura, os quais encontram-se entre os carbonos C4-C5 e C8-C9. Notou-se também o acoplamento em δ_H 8,40 (N-H) com o hidrogênio em δ_H 4,76 (H-2) o que confirma a posição destes hidrogênios na estrutura parcial a seguir:



O espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, piridina- d_5) (Fig. 85, pág. 118) de **P-5** mostrou 15 linhas espectrais além de uma série de sinais sobrepostos na região de δ_C 29,8 a 30,3 ppm, corroborando com o espectro de RMN 1H , relativo a uma cadeia alifática. Na região de carbono sp^2 observou-se quatro linhas espectrais (δ_C 130,2; 131,4; 131,9 e 132,9 ppm), correspondentes a duas ligações duplas, além de sinais de hidrogênios metilênicos em δ_C 33,2 e 32,4 ppm, inferidos a carbonos alílicos. Com base na literatura, sinais de carbonos metilênicos ligados a dupla ligação podem aparecer na faixa de 26 a 27 ppm, se a dupla ligação for *cis* ou na faixa de 31-32 ppm, se a dupla for *trans* [HIROTA, *et al.*, 1990]. Além destes sinais, o espectro de RMN ^{13}C -CPD mostrou sinais em δ_C 73,6 (CH-3) e 62,4 (CH₂-1) ppm atribuídos a carbonos oxigenados, e um sinal em δ_C 57,2 (CH-2) característico de carbono ligado a nitrogênio, além de um sinal em δ_C 173,9 de carbonila de amida.

A comparação dos espectros de RMN ^{13}C -CPD e RMN ^{13}C -DEPT 135° (Fig. 86, pág. 119) permitiu determinar o padrão de hidrogenação referente aos carbonos do composto em discussão, sendo dois carbonos metílicos, sete carbonos metilênicos, incluindo vários em sobreposição, seis carbonos metínicos e um não-hidrogenado como mostrado na Tabela 19, pág. 113.

Tabela 19: Padrão de hidrogenação determinado através da comparação dos espectros de RMN ^{13}C -CPD e DEPT 135°.

C	CH	CH ₂	CH ₃	Fórmula molecular
174,02	132,9	62,4 (H ₂ C-OH)	14,6*	
	131,9	37,2		
	131,4	33,2		
	130,2	33,2		
	73,6 (HC-OH)	32,4		
	57,2 (HC-NH)	29,8-30,3		
		26,7		
		23,2		
1C=O	6CH, OH, NH	25CH₂, OH	2CH₃	C₃₄H₆₅NO₃** IDH 3

* Referente a duas metilas

** Determinada com base no espectro de massa de alta resolução

A análise do espectro ^1H , ^{13}C – HSQC (Fig. 88, pág. 121) permitiu a inequívoca correlação das linhas espectrais dos carbonos aos seus respectivos hidrogênios, como mostrado na Tabela 20 (pág. 116). Ressaltamos as principais correlações, a uma ligação (1J), do carbono em δ_{C} 57,2 (C-2) com o sinal do hidrogênio em δ_{H} 4,73 (H-2); a correlação dos carbonos oxigenados em δ_{C} 73,6 (C-3) com o hidrogênio em δ_{H} 4,86 (H-3) e 62,4 (C-1) com os hidrogênios em 4,47 (1a) e 4,30 (1b); os carbonos olefínicos em δ_{C} 132,9 (C-4); 131,9 (C-5); 131,4 (C-8) e 130,2 (C-9) correlacionando-se com os hidrogênios em 6,07 (H-4); 6,01 (H-5); 5,50 (H-8 e H-9), respectivamente.

O espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (Fig. 89, pág. 122) (Tabela 20, pág. 116), mostrou *cross-peaks* referente ao acoplamento dos hidrogênios em δ_{H} 4,47 / 4,30 (H-1a/b) e 6,01 (H-5) com o carbono oxigenado em δ_{C} 73,6 (C-3), o hidrogênio 2,18 (H-6) mostrou correlação com o carbono em 132,8 (C-4) e o hidrogênio em 2,15 (H-7) com os carbonos em 131,4 (C-8) e 130,2 (C-9), confirmando a localização das ligações duplas, previamente estabelecidas pelo espectro ^1H , ^1H – COSY. Observou-se ainda, correlações dos hidrogênios em δ_{H} 8,40 (N-H) e 4,76 (H-2) com o grupo carbonila em δ_{C} 173,9 (C=O), como mostrado na subestrutura a seguir:

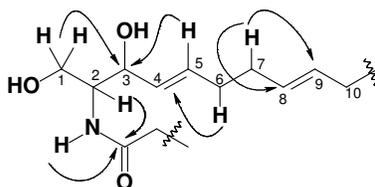


Figura 78: Principais correlações ^1H , ^{13}C – HMBC de **P-5**

A combinação dos dados apresentados de RMN ^{13}C com aqueles publicados na literatura (Tabela 21, pág. 116), permitiu deduzir a estrutura parcial de **P-5**, a qual trata-se de uma ceramida cuja porção esfingóide possui duas ligações duplas como mostrado na Figura 79, a seguir:

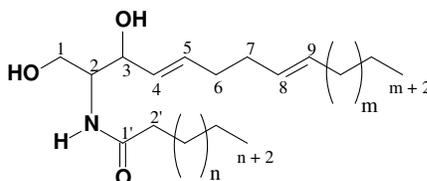
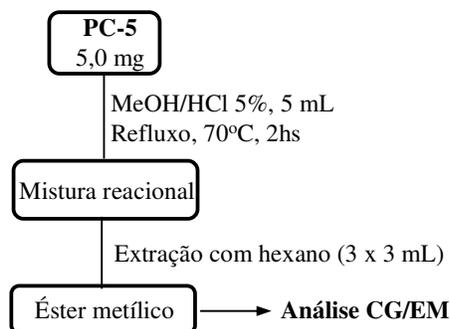


Figura 79: estrutura parcial do composto **P-5**

A determinação do número de átomos de carbono da cadeia alifática da porção amídica, foi determinada por CG/EM, através da análise do éster metílico obtido através de uma reação de metanólise de **P-5** [INAGAKI *et al.*, 2004].

Na reação de metanólise (Fluxograma 1) utilizou-se uma alíquota de 5 mg de **P-5**, o qual foi dissolvida em 5 mL de $\text{CH}_3\text{OH}/\text{HCl}$ 5% e mantida sob refluxo a 70°C por 2h. A mistura reacional foi extraída com hexano (3 x 3 mL) e após evaporação do solvente submetida a análise em CG/EM.



Fluxograma 1: Reação de metanólise de **P-5**

O cromatograma (Fig. 80, pág. 115) apresentou somente um sinal majoritário, cujo espectro de massa mostrou um pico em m/z 270 Daltons e padrão de fragmentação compatível com o hexadecanoato de metila.

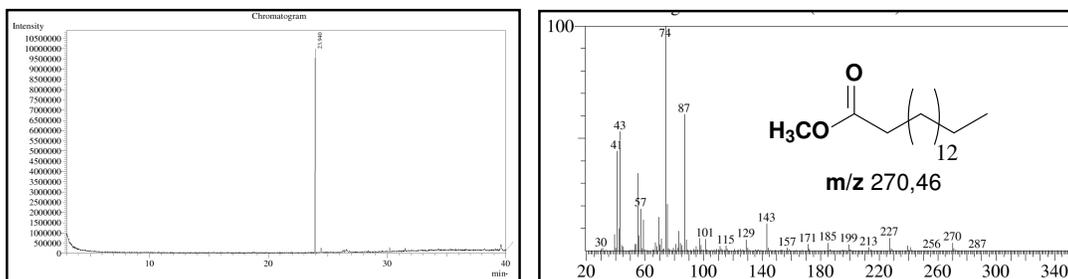


Figura 80: Cromatograma e espectro de massa do hexadecanoato de metila

Este resultado quando combinado com a informação obtida no espectro de massa de alta resolução (m/z 534,4884) permitiu determinar o tamanho da porção esfingosínica da ceramida em discussão, completando a estrutura de **P-5** (Fig. 81). O sinal positivo da rotação específica deste composto possibilitou estabelecer a estereoquímica dos carbonos C-2 (*S*) e C-3 (*R*), o qual foi comparado com o da literatura.

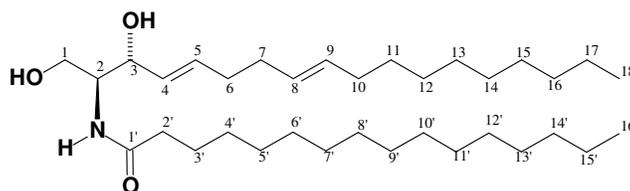


Figura 81: Estrutura do composto **P-5**

Este composto de nome sistemático *N*-(2*S*,3*R*,4*E*,8*E*,1,3-dihidroxi-4,8-octadecadieno)hexadecanamida, apesar de já ter sido registrado na literatura, está sendo relatado pela primeira vez no gênero *Palythoa*. Esfingolipídeos são relatados na literatura como compostos citotóxicos [MURALIDHAR *et al.*, 2003]. Este composto apresentou efeito citotóxico, Ed_{50} de 20 $\mu\text{g/mL}$, frente a células normais (células mononucleares do sangue periférico humano) [MURALIDHAR *et al.*, 2005].

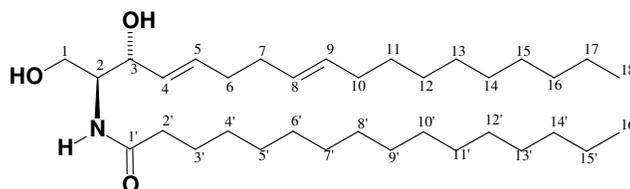


Tabela 20: Dados de RMN ^1H , ^{13}C e correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C (HSQC e HMBC) de **P-5**

#C	HSQC		HMBC	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)(multip, $J_{\text{H,H}}$)	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	62,4	4,47 (dd, 11 e 5,3 Hz) 4,30 (dd, 11 e 5,3 Hz)		H-3
2	57,2	4,76 (m)	N-H	
3	73,6	4,86 (t, 6,2 Hz)	H-4	H-1; H-5
4	132,9	6,07 (dd, 15,4 e 6,2 Hz)	H-5	H-6
5	131,9	6,01 (dt, 15,4 e 6,2 Hz)	H-4	H-3; H-7
6	33,2	2,18 (m)		H-4
7	32,4	2,14 (m)		H-5
8	131,4	5,50 (m)	H-7	H-6; H-10
9	130,2	5,50 (m)	H-10	H-7
10	33,2	2,02 (m)		
11-16	29,8-30,3	1,27 (m)		
17/15'	23,2	1,27 (m)	3H-18; 3H-16'	
18/16'	14,6	0,87 (t, 5,0 Hz)		
1'	173,9	-	N-H	H-2; H-3'
2'	37,2	2,48 (t, 7,7 Hz)		
3'	26,7	1,84 (m)		
4'-14'	29,8-30,3	1,27 (m)		
N-H	-	8,40 (d, 8,5 Hz)		

Tabela 21: Comparação entre os dados de RMN ^{13}C -CPD de **P-5** (piridina- d_5 , 125 MHz) com os descritos na literatura para ceramida *N*-(2*S*,3*R*,4*E*,8*E*,1,3-dihidroxi-4,8-octadecadieno)hexadecanamida (CDCl_3 , 75 MHz) [MURALIDHAR *et al.*, 2005].

	P-5	Ceramida
#C	δ_{C} (ppm)	
1	62,4	62,2
2	57,1	54,6
3	73,5	74,1
4	132,8	133,3
5	131,9	129,1
6	33,2	32,3
7	33,2	32,1
8	131,4	131,2
9	130,2	129,0
1'	174,0	174,2
2'	37,1	36,8
m	29,8-30,3	-
n	29,8-30,3	-
m+1/n+1	23,2	22,6
m+2/n+2	14,5	14,1

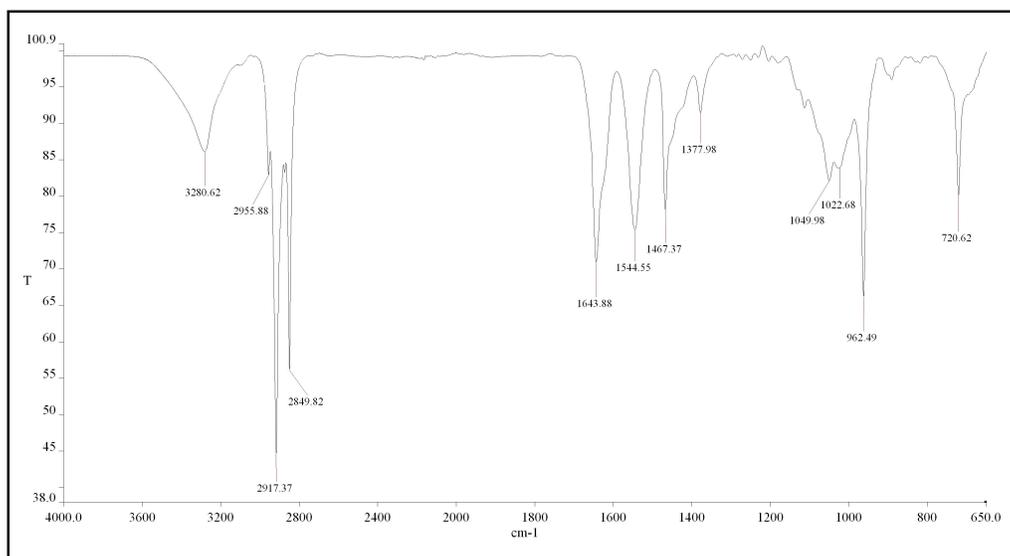


Figura 82: Espectro de infravermelho (KBr) de P-5

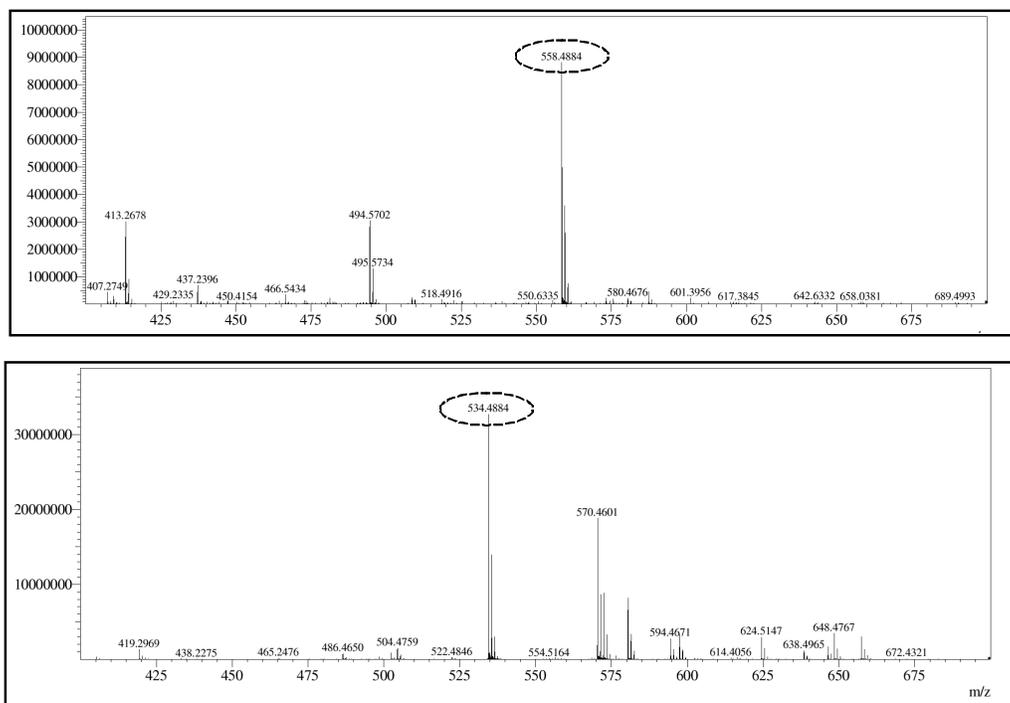


Figura 83: Espectros de massa de alta resolução $[M + Na]^+$ e $[M - H]^-$ de P-5

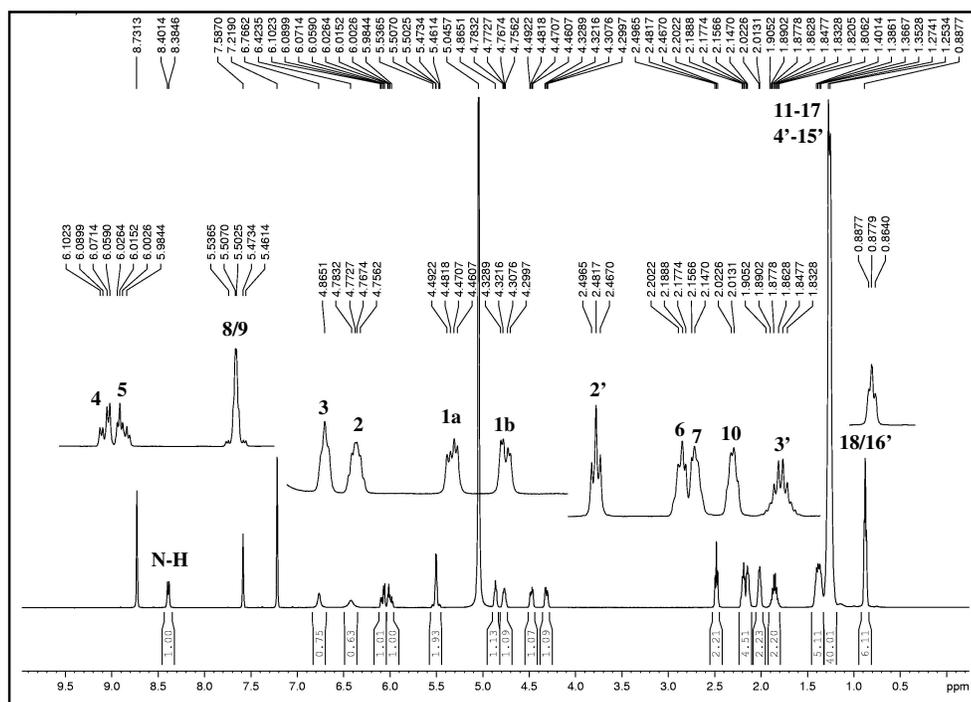


Figura 84: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, piridina- d_5) de P-5

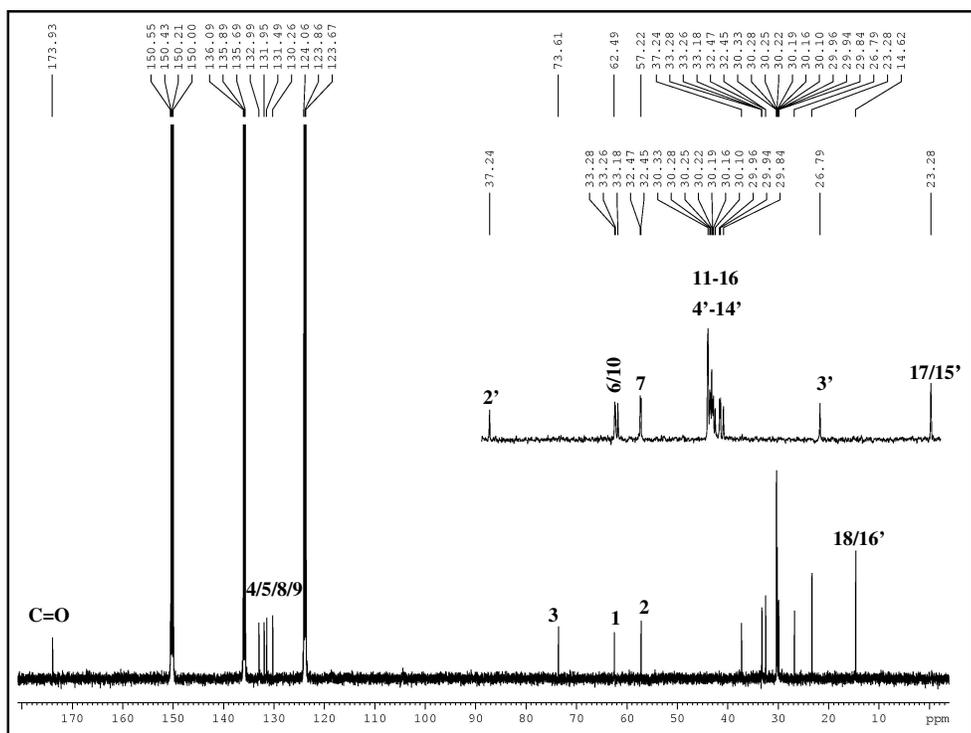


Figura 85: Espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, piridina- d_5) de P-5

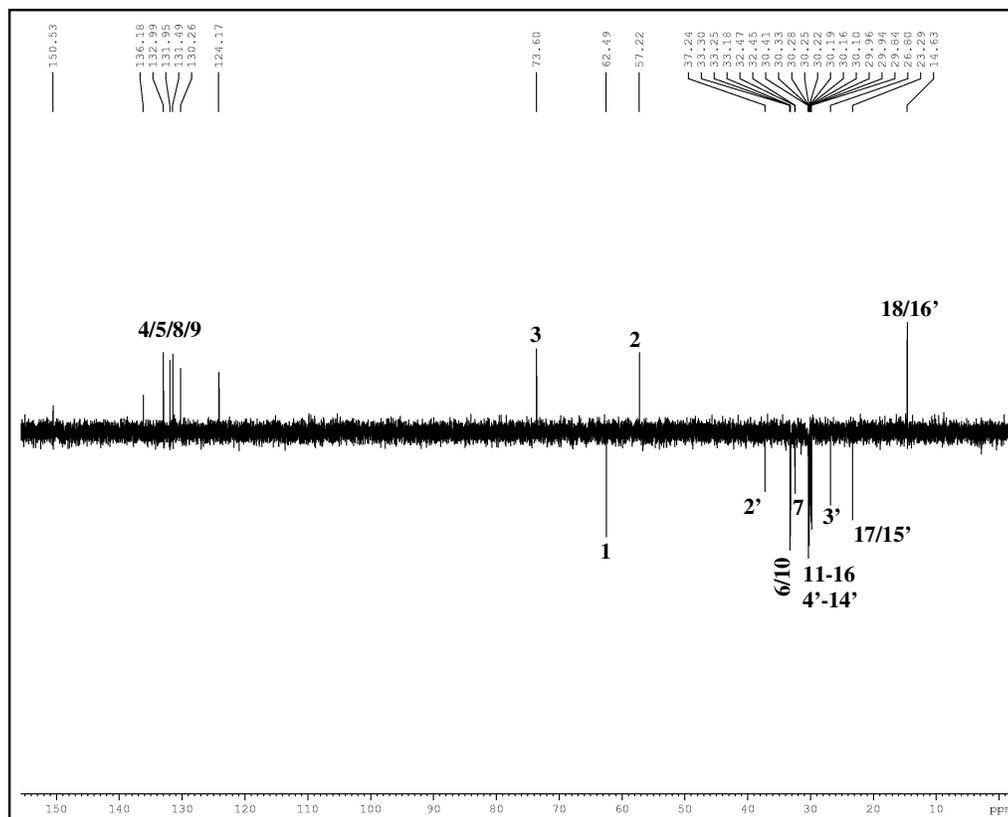
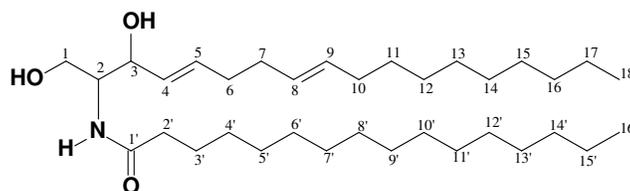


Figura 86: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz piridina- d_5) de P-5



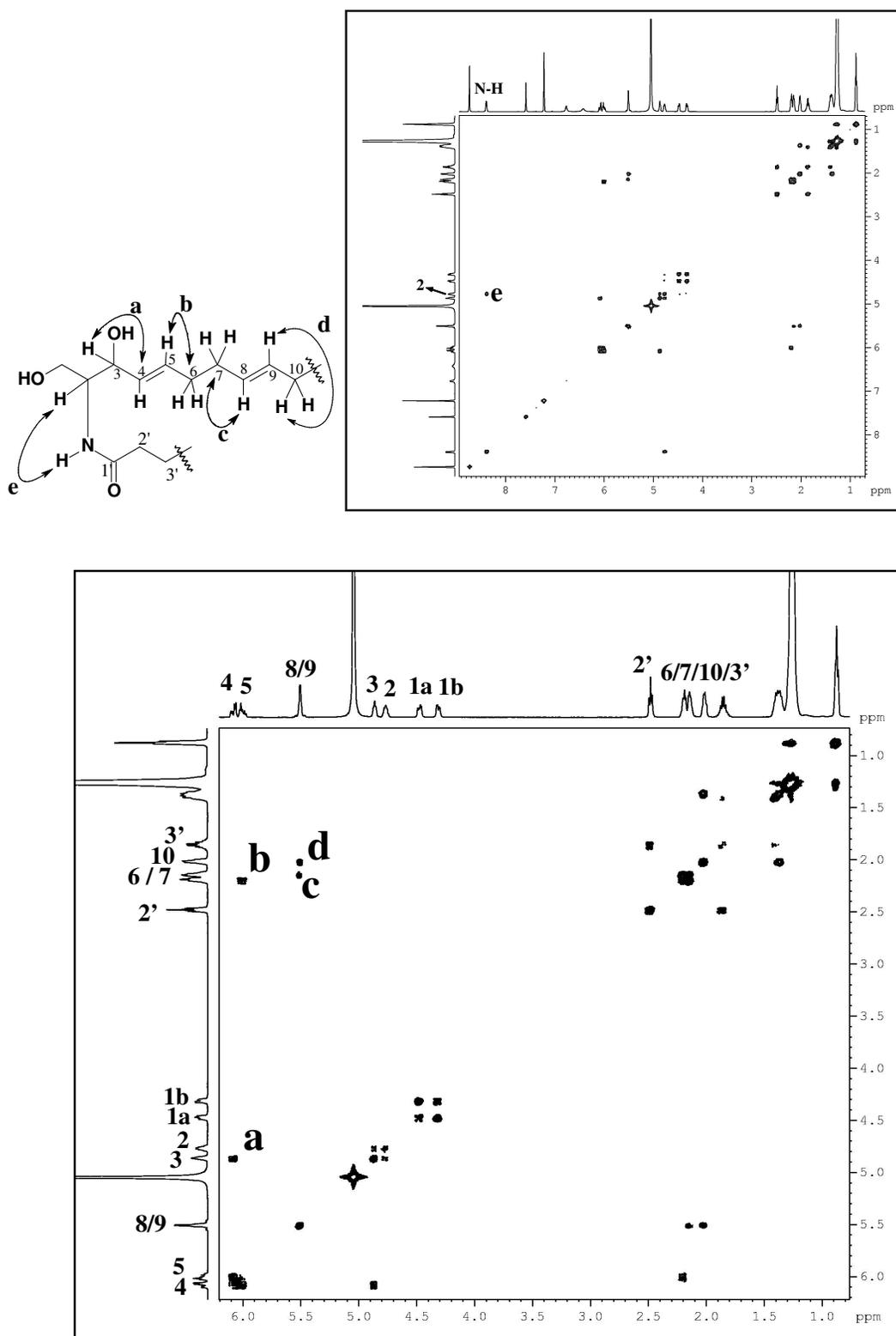


Figura 87: Espectros de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY (500 MHz, piridina- d_5) de P-5

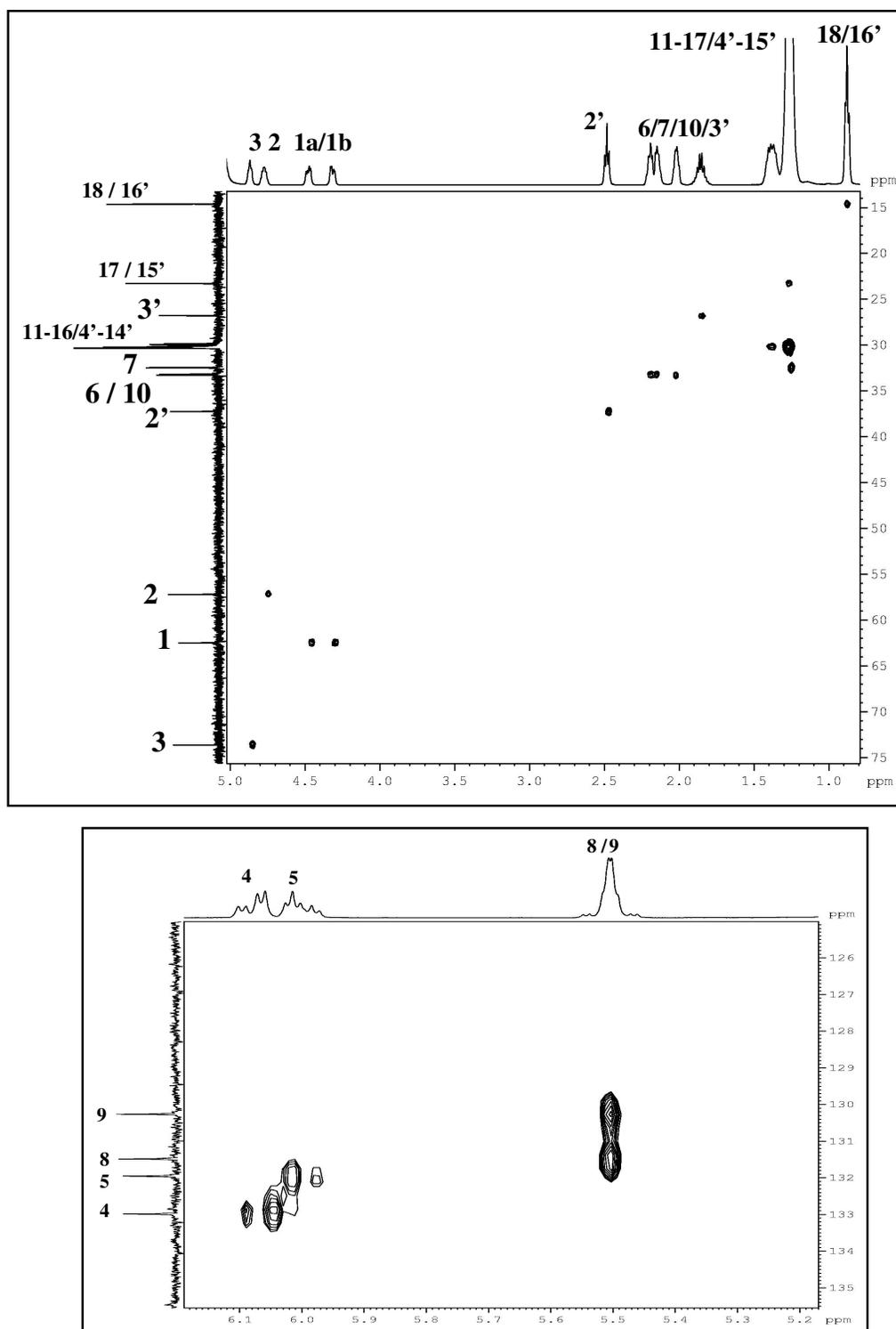


Figura 88: Espectros de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC (500, 125 MHz, piridina- d_5) de **P-5**

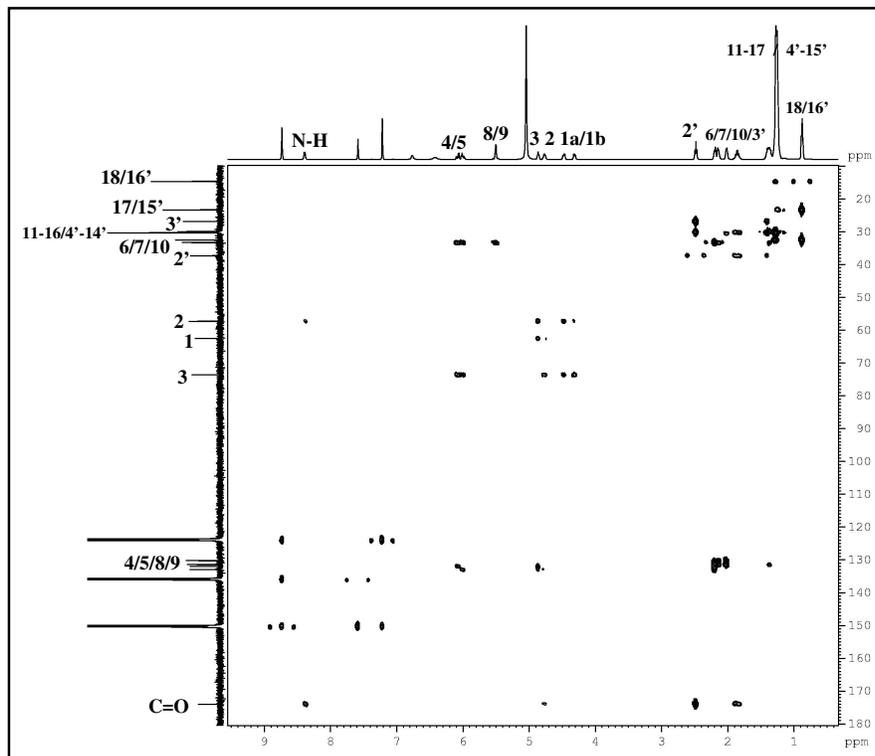
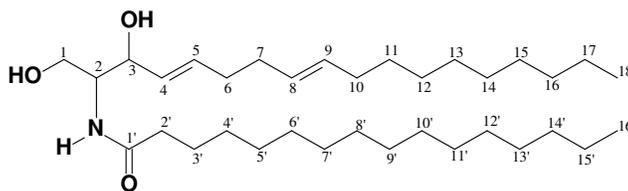


Figura 89: Espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (500, 125 MHz, piridina- d_5) de **P-5**



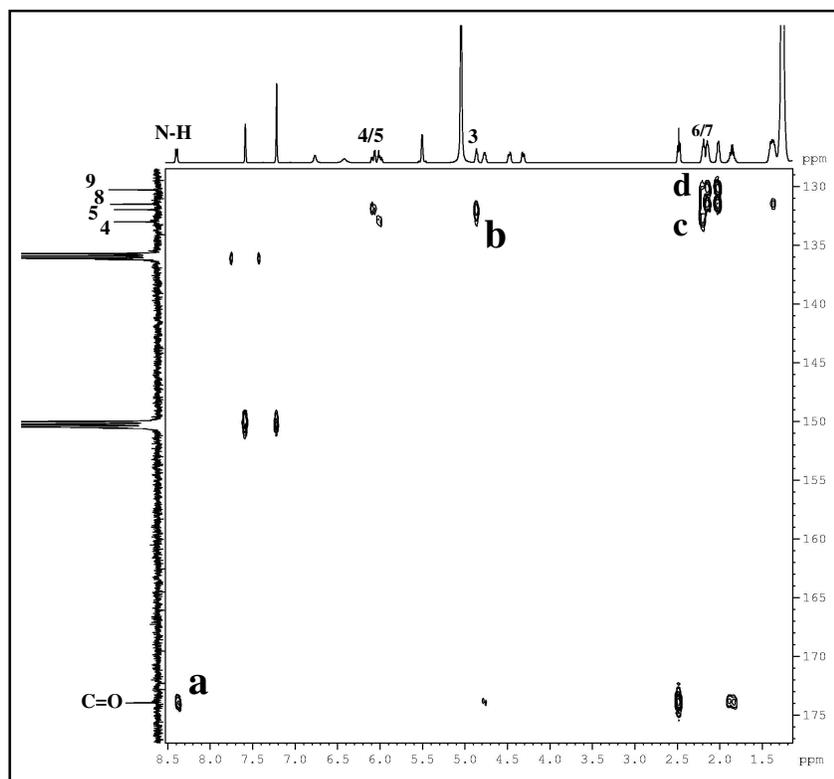
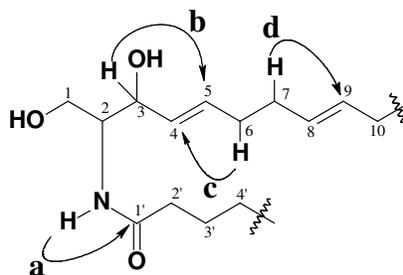


Figura 90: Expansão do espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (500, 125 MHz, piridina- d_5) de **P-5**



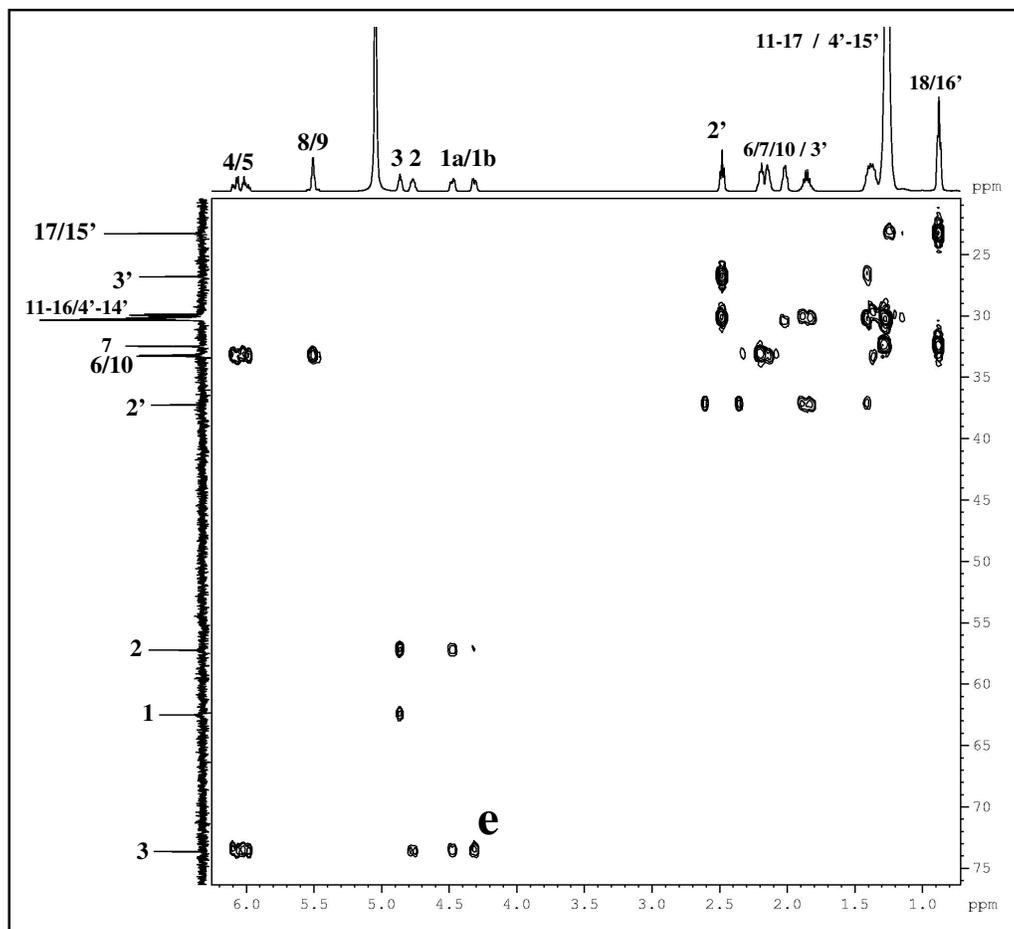
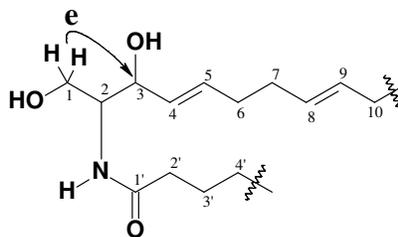


Figura 91: Expansão do espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (500, 125 MHz, piridina- d_5) de **P-5**



5.1.8 Determinação estrutural de P-6

P-6 apresentou ponto de fusão na faixa de 94,0-95,7 °C e rotação específica de $[\alpha]_D^{20} = + 16$ ($c = 0,070$; CHCl_3).

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 93, pág. 128) mostrou-se bastante semelhante ao exibido por **P-5**, apresentando uma absorção larga centrada em 3.307 cm^{-1} , de deformação axial de ligação O-H de hidroxila; absorções em 2.916 e 2.848 cm^{-1} correspondentes a deformação axial assimétrico e simétrico de ligação C-H de grupamentos CH_2 e CH_3 , duas absorções em 1.646 cm^{-1} de deformação axial de ligação C=O conjugada e outra em 1.548 cm^{-1} característico de função amida [INAGAKI *et al.*, 2004].

O espectro de massa de alta resolução (EMAR) (Fig. 94, pág. 128), obtido com ionização por *electrospray* e no modo negativo, mostrou pico em m/z 536,5039 $[\text{M} - \text{H}]^-$ e no modo positivo o aduto de sódio em m/z 560,5046 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, indicando a fórmula molecular $\text{C}_{34}\text{H}_{66}\text{NO}_3$ (calculado 536,5042) e $\text{C}_{34}\text{H}_{67}\text{NO}_3\text{Na}$ (calculado 560,5018), respectivamente. Portanto, com diferença de duas unidades de massa com relação a substância **P-5**.

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, piridina- d_5) (Fig. 95, pág. 129) de **P-6** apresentou um dubleto em δ_{H} 8,37 (NH, 8,5 Hz), referente a hidrogênio ligado a átomo de nitrogênio de função amida, e dois sinais de hidrogênio ligado a carbono sp^2 em δ_{H} 6,06 (dd, 15,4 e 6,2 Hz) e 5,96 (dt, 15,4 e 6,2 Hz), cuja constante de acoplamento indica uma estereoquímica *E*. Sinais em δ_{H} 4,86 (t, 6,2 Hz, H-3); 4,47 (dd, 11 e 5,3 Hz, H-1a) e 4,30 (dd, 11 e 5,3 Hz, H-1b) de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados.

A análise comparativa do espectro RMN ^{13}C -CPD (Fig. 96, pág. 129) demonstrou estreita semelhança estrutural entre **P-6** e **P-5**, revelando dois sinais em 132,7 e 132,6 ppm para uma ligação dupla (C=C). Além destes sinais, o espectro de RMN ^{13}C -CPD mostrou sinais em δ_{C} 73,6 (CH-3) e 62,5 (CH₂-1) ppm atribuídos a carbonos oxigenados, um sinal em δ_{C} 57,2 (CH-2) característico de carbono ligado a nitrogênio de um grupo amida o qual foi confirmado pelo sinal em δ_{C} 173,9 de carbonila de amida. Este espectro mostrou uma série de sinais na região de δ_{C} 37,2 a 23,9 ppm, compatíveis com uma cadeia alifática.

A comparação dos espectros de RMN ^{13}C -CPD e RMN ^{13}C -DEPT 135° (Fig. 97, pág. 130) permitiu determinar o padrão de hidrogenação referente aos carbonos do composto em discussão, sendo dois carbonos metílicos, sete carbonos metilênicos,

incluindo vários em sobreposição, quatro carbonos metínicos e um não-hidrogenado como mostrado na Tabela a seguir.

Tabela 22: Padrão de hidrogenação determinado através da comparação dos espectros de RMN ^{13}C -CPD e DEPT 135°.

C	CH	CH ₂	CH ₃	Fórmula molecular
173,9	132,7	62,5 (H ₂ C-OH)	14,6*	
	132,6	37,2		
	73,6 (HC-OH)	33,0		
	57,2 (HC-NH)	32,4		
		29,9-30,3		
		26,8		
		23,2		
1C=O	4CH, OH, NH	27CH₂, OH	2CH₃	C₃₄H₆₇NO₃** IDH 2

* Referente a duas metilas

** Determinada com base no espectro de massa de alta resolução

A análise do espectro ^1H , ^{13}C – HSQC, (Fig. 98, pág. 130) permitiu relacionar, de forma inequívoca, cada sinal de hidrogênio ao seu respectivo sinal de carbono.

O espectro de RMN bidimensional ^1H , ^{13}C – HMBC (Fig. 99, pág. 131), mostrou correlação do hidrogênio H-4 (δ_{H} 6,06 ppm) com o carbono em 57,2 (C-2) ppm, do hidrogênio em 5,96 (H-5) com o carbono em 73,6 (C-3), indicando o posicionamento da ligação dupla, como mostra a subestrutura a seguir.

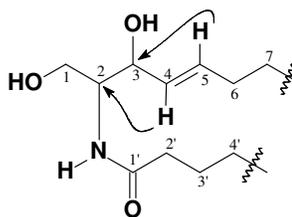


Figura 92: Principais correlações ^1H , ^{13}C – HMBC de **P-6**

A reunião dos dados discutidos até aqui e em comparação com os dados de RMN ^1H e ^{13}C obtidos para o composto **P-5** (Tabela 23), nos permitiu propor a estrutura de **P-6**, como sendo uma ceramida de estrutura bastante semelhante ao composto **P-5**, porém com apenas uma dupla entre os carbonos C-4 e C-5, de nome sistemático *N*-(2*S*,3*R*,4*E*,1,3-dihidroxi-4-octadeceno)hexadecanamida.

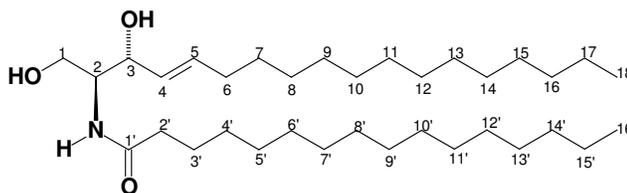


Tabela 23: Comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C de **P-5** e **P-6**

#C	P-5		P-6	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)(multip, $J_{\text{H,H}}$)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)(multip, $J_{\text{H,H}}$)
1	62,4	4,47 (dd, 11 e 5,3 Hz) 4,30 (dd, 11 e 5,3 Hz)	62,5	4,47 (dd, 11 e 5,0 Hz) 4,30 (dd, 11 e 5,0 Hz)
2	57,2	4,76 (m)	57,2	4,75 (m)
3	73,6	4,86 (t, 6,2 Hz)	73,6	4,86 (t, 6,0 Hz)
4	132,9	6,07 (dd, 15,4 e 6,2 Hz)	132,7	6,06 (dd, 15,4 e 6,3 Hz)
5	131,9	6,01 (dt, 15,4 e 6,2 Hz)	132,6	5,99 (dt, 15,4 e 6,3 Hz)
6	33,2	2,18 (m)	33,0	2,10 (m)
7	32,4	2,14 (m)	32,4	1,27
8	131,4	5,50 (m)	29,9-30,3	1,27
9	130,2	5,50 (m)	29,9-30,3	1,27
10	33,2	2,02 (m)	29,9-30,3	1,27
11-16	29,8-30,3	1,27 (m)	29,9-30,3	1,27
17/15'	23,2	1,27 (m)	23,2	1,27
18/16'	14,6	0,87 (t, 5,0 Hz)	14,6	0,88 (t, 5,8 Hz)
1'	173,9	-	173,9	-
2'	37,2	2,48 (t, 7,7 Hz)	37,2	2,47 (t, 7,3 Hz)
3'	26,7	1,84 (m)	26,7	1,84 (m)
4'-14'	29,8-30,3	1,27 (m)	29,9-30,3	1,27
N-H	-	8,40 (d, 8,5 Hz)	-	8,37 (d, 8,4 Hz)

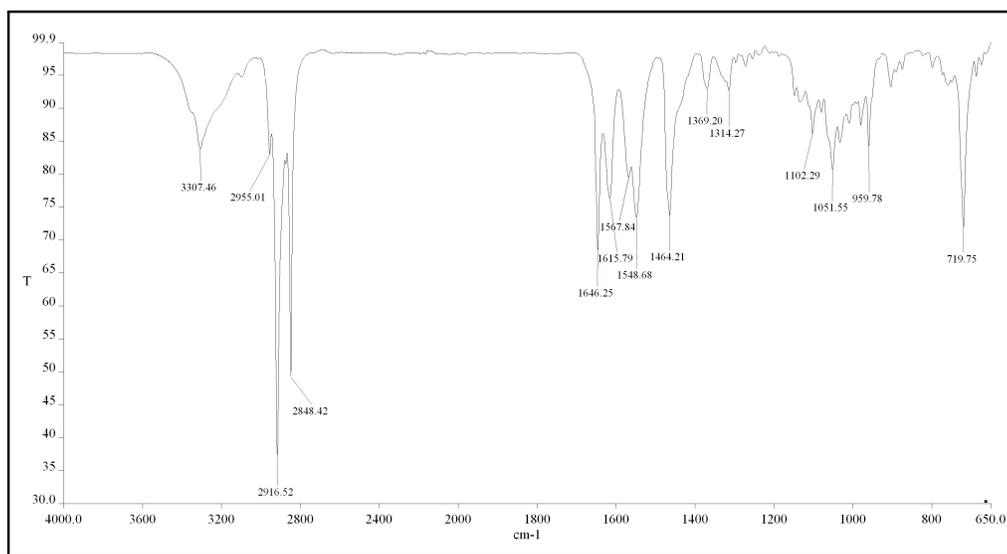


Figura 93: Espectro de infravermelho (KBr) de P-6

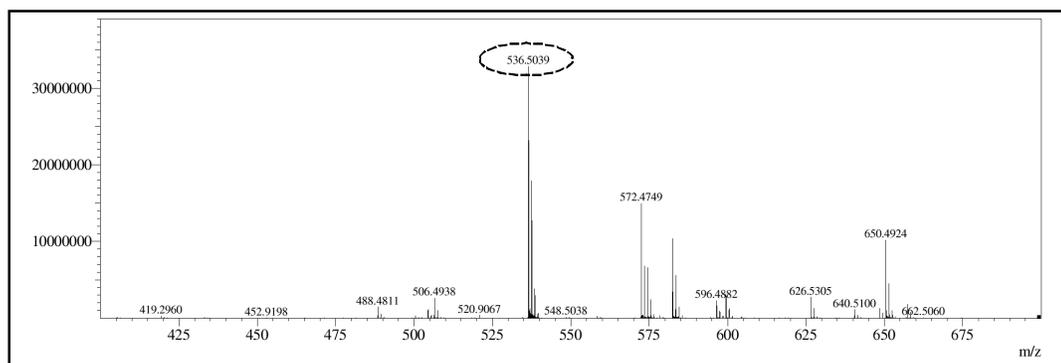
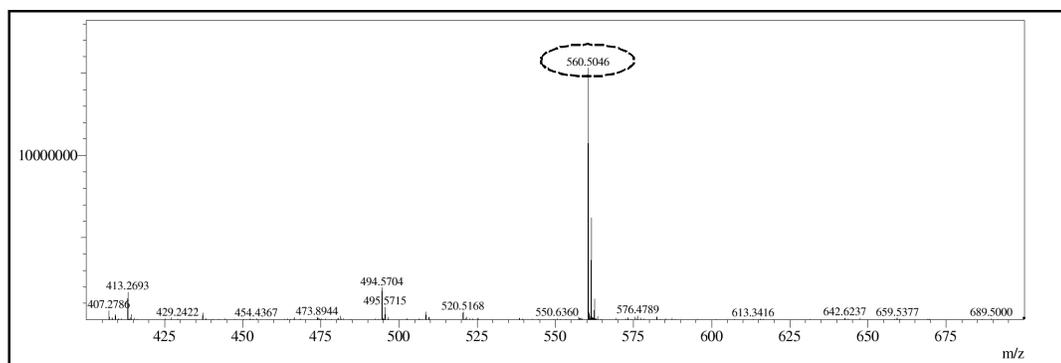


Figura 94: Espectros de massa de alta resolução $[M + Na]^+$ e $[M - H]^-$ de P-6

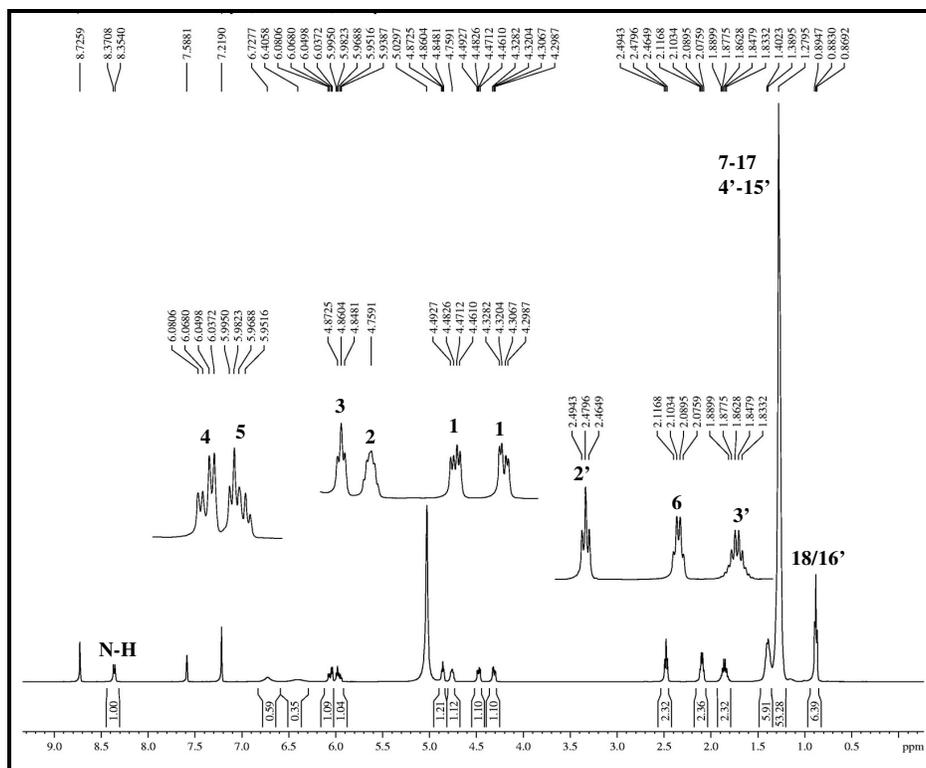


Figura 95: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, piridina- d_5) de P-6

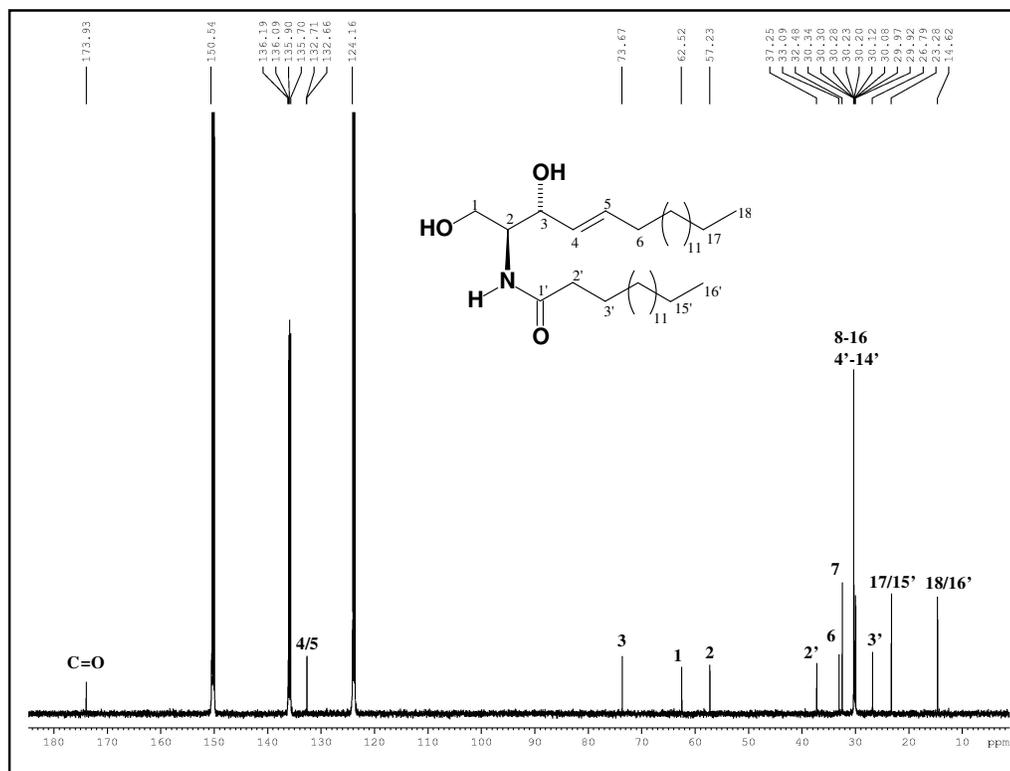


Figura 96: Espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, piridina- d_5) de P-6

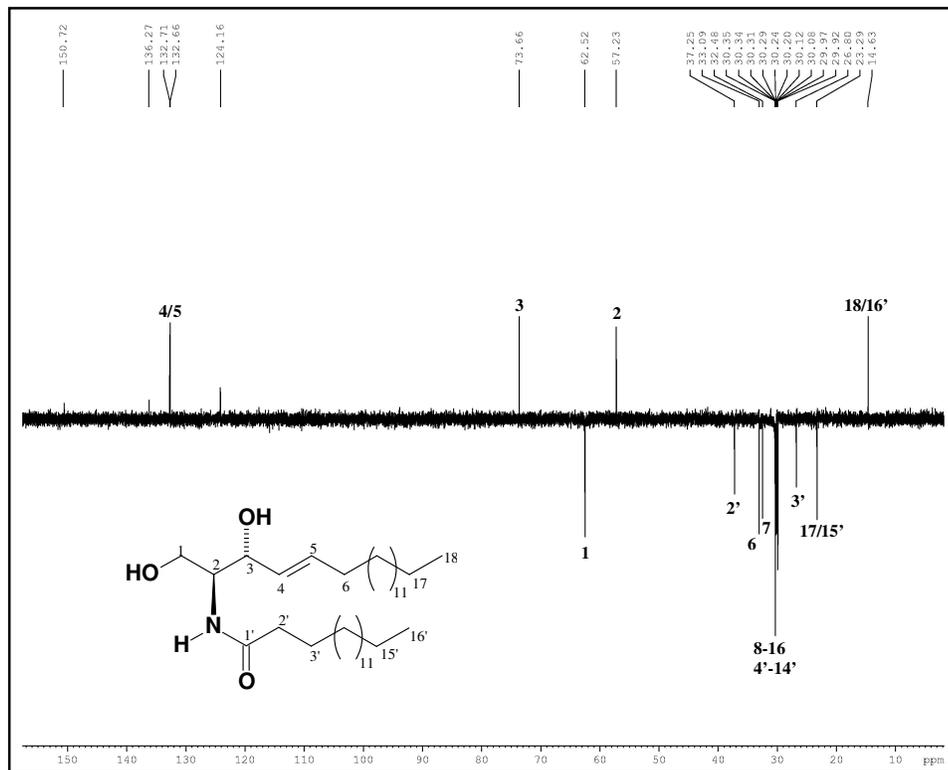


Figura 97: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, piridina- d_5) de P-6

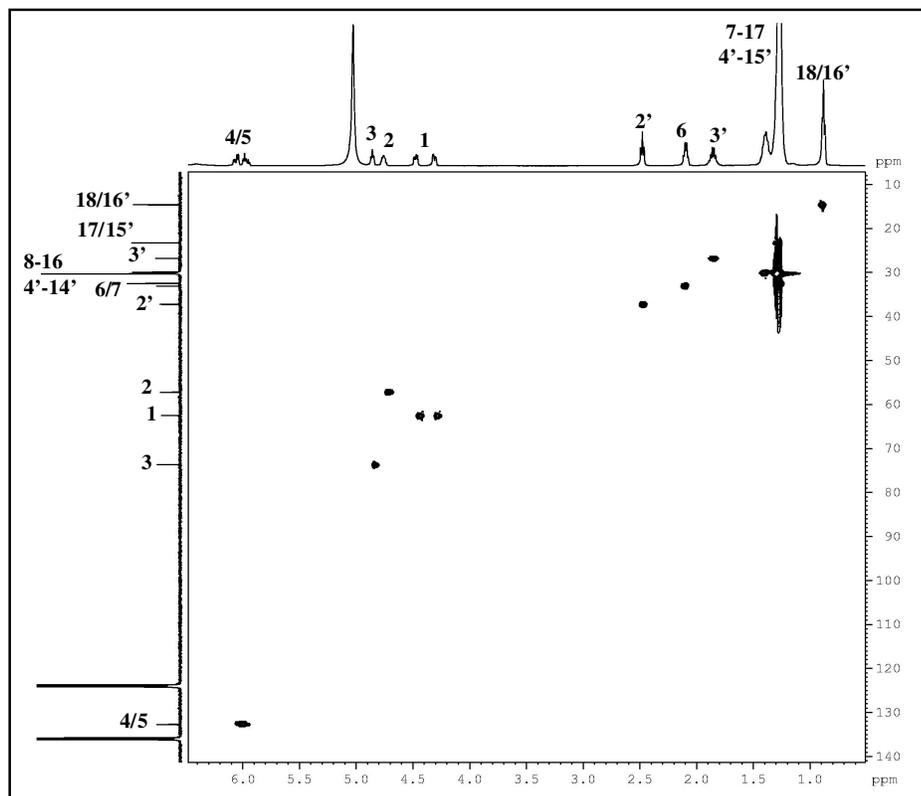


Figura 98: Espectro heteronuclear ^1H , ^{13}C - HSQC (500, 125 MHz, piridina- d_5) de P-6

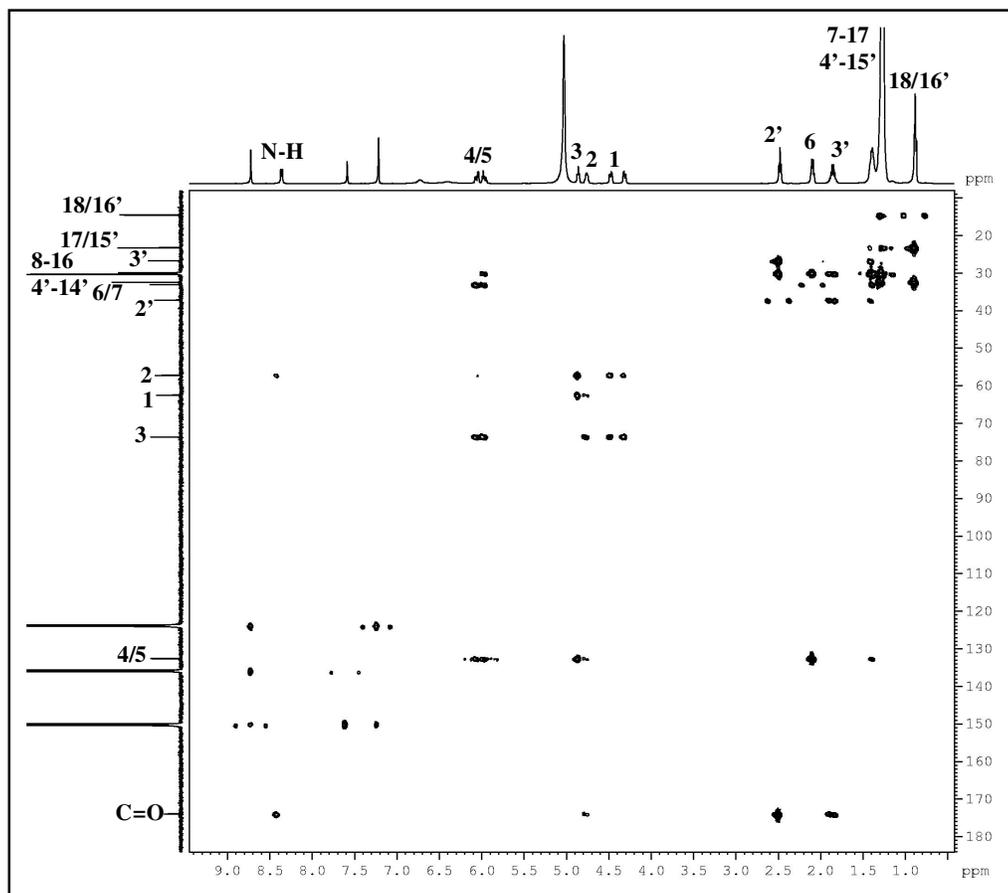
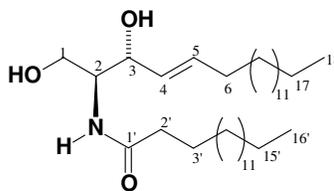


Figura 99: Espectro heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (500, 125 MHz, piridina- d_5) de **P-6**



Determinação estrutural de P-8 e P-9

A fração metanólica, obtida pela partição do extrato hexânico de *P. caribaeorum*, foi submetida à cromatografia em coluna sobre gel de sílica, resultando no isolamento da mistura de duas substâncias denominadas de **P-8** e **P-9** (item 5.4.1.9, pág. 192). Esta mistura foi submetida à CLAE resultando na separação de dois picos majoritários: pico 1 ($t_R = 8,0$ min. **P-8**) e pico 2 ($t_R = 9,0$ min. **P-9**) (Fig. 172, pág. 193).

5.1.9 Determinação estrutural de P-8

O composto denominado de **P-8** ($t_R = 8,0$ min.) mostrou-se como um sólido amorfo, com ponto de fusão de 153°C e rotação específica de $[\alpha]_D^{20} = +26$ ($c = 0,043$; $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 20%).

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 107, pág. 139) apresentou duas bandas de absorção em 3.492 e 3.381 cm^{-1} de deformação axial de O-H e N-H; absorções em 2.917 e 2.848 cm^{-1} correspondentes a deformação axial assimétrica e simétrica de ligação C-H de grupamentos CH_2 e CH_3 . Duas absorções intensas em 1.627 cm^{-1} de deformação axial de grupo carbonila e outra em 1.536 cm^{-1} característico de ligação C-N em função amida [INAGAKI *et al.*, 2004], além de absorções em 1.175 e 1.058 cm^{-1} condizentes com deformação axial de grupos O=S=O e C-O, respectivamente, e absorções intensas em 963 e 843 cm^{-1} referentes ao sistema C-O-S [SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000].

O espectro de massa de alta resolução, obtido com ionização por *electrospray* e no modo negativo (Fig. 108, pág. 140) mostrou um pico referente ao íon molecular m/z 655,5088 $[\text{M} - \text{H}]^-$ (calculado m/z 655,5084) e no modo positivo um pico em m/z 657,5390 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calculado m/z 657,5240), indicando a fórmula molecular $\text{C}_{37}\text{H}_{72}\text{N}_5\text{O}_5\text{S}$, correspondente a 5 graus de insaturação.

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) (Fig. 112, pág. 141) de **P-8**, mostrou algumas semelhanças com o do composto **P-5**. Apresentou dois sinais, um em δ_{H} 8,96 (sl) e outro em 7,23 (d, $J = 8,4$ Hz) correspondentes a hidrogênios ligados a nitrogênio; um sinal em δ_{H} 3,91 (sl, H-2) de hidrogênio metínico nitrogenado; um sinal em δ_{H} 3,10 (m, 2H-2''), com integração para dois hidrogênios, inferidos a hidrogênios metilênicos heterotópicos ligados a carbono nitrogenado, além de dois multipletos em δ_{H} 4,09 (H-1a) e 3,92 (H-1b), e um tripleto em δ_{H} 4,01 (H-3) relativos a hidrogênios

ligados a carbonos oxigenados. Na região de olefinas foram observados os sinais em δ_H 5,70 (m, H-5), 5,44 (dd, $J = 15,4$ e $7,1$ Hz, H-4) e 5,36 (m, H-8 e H-9). O valor da constante de acoplamento (15,4 e 7,1 Hz) do sinal em δ_H 5,44 ppm indica uma dupla ligação de configuração *trans*. Além destes sinais, verificou-se um multiplete em δ_H 2,01 (2H-1") e um sinal largo e intenso indicando grupos metilênicos (δ_H 1,26, m), assim como um singleto em δ_H 0,84 ppm, com integração para seis hidrogênios, referente a duas metilas.

O espectro de RMN ^{13}C -CPD e DEPT 135° 125 MHz (Fig. 113 e 114, pág. 141 e 142) mostrou uma série de sinais em sobreposição entre δ_C 29,3 e 29,8 ppm, corroborando a cadeia alifática, como observado no espectro de RMN 1H . Na região de carbonos sp^2 , observou-se quatro linhas espectrais correspondentes a carbonos monohidrogenados (δ_C 129,2; 129,4; 131,1 e 133,8 ppm), indicativos de duas ligações duplas, além de sinais em δ_C 32,6, 32,4 e 32,7 ppm, característicos de carbonos alílicos em configuração *trans* [HIROTA *et al.*, 1990]. Além destes sinais, o espectro de RMN ^{13}C -CPD mostrou sinais em δ_C 71,5 (CH) e 64,0 (CH₂) ppm de carbonos oxigenados, dois sinais em 45,3 (CH₂) e 54,3 (CH) ppm de carbonos ligados a nitrogênio e um sinal em δ_C 174,4 de carbonila de amida. Estes dados espectrais foram condizentes com a estrutura de uma ceramida com uma porção esfingosina, como mostrado na Figura abaixo.

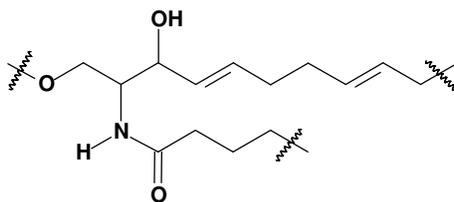


Figura 100: Estrutura parcial de **P-8**

A comparação dos espectros de RMN ^{13}C -CPD e RMN ^{13}C -DEPT 135° (Fig. 114, pág. 142) permitiu determinar o padrão de hidrogenação referente aos carbonos do composto em discussão, sendo dois carbonos metílicos, nove carbonos metilênicos, incluindo vários em sobreposição, seis carbonos metínicos e um não-hidrogenado como mostrado na Tabela 24 (pág. 134), e com o auxílio do espectro de massa de alta resolução chegar à fórmula molecular proposta.

Tabela 24: Padrão de hidrogenação determinado através da comparação dos espectros de RMN ^{13}C -CPD e DEPT 135°.

C	CH	CH ₂	CH ₃	Fórmula molecular
174,4	133,8	64,0 (CH ₂ -O ⁻)	14,1*	C₃₇H₇₂N₂O₅S** IDH 5
	131,1	45,3 (H ₂ C-N)	33,1 (H ₃ C-N)	
	129,4	36,6		
	129,2	32,0 (H ₂ C-SO ₂)		
	71,5 (HC-OH)	32,6		
	54,3 (HC-N)	32,4		
		32,7		
		29,8-29,3		
		26,0		
		22,7		
1 H-N- C=O	6 CH, 1 OH, 1 SO₂	27 CH₂, 1 OH	3 CH₃	

* Referente a duas metilas

** Determinada com base no espectro de massa de alta resolução

No espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H - COSY (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) (Fig. 115, pág. 142), foi visualizado o acoplamento do sinal de hidrogênio em δ_{H} 4,09 (H-1) com o sinal em δ_{H} 3,91 (H-2); do hidrogênio em δ_{H} 4,01 (H-3) com o hidrogênio em δ_{H} 5,44 (H-4) e dos hidrogênios olefínicos em δ_{H} 5,70 (H-5) e 5,36 (H-8) com os hidrogênios em δ_{H} 2,01 (H-6) e 2,01 (H-7), respectivamente. Este espectro mostrou também o acoplamento entre os hidrogênios em δ_{H} 3,10 (H-2'') e 2,01 (H-1''), corroborando com as subestruturas a seguir.

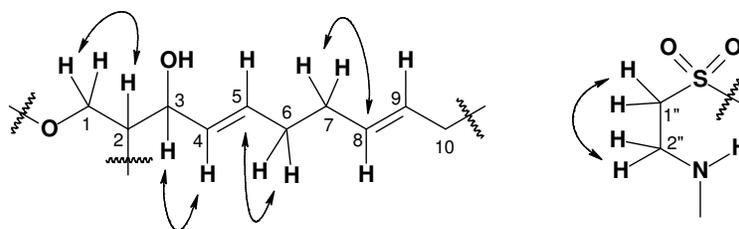


Figura 101: Principais correlações ^1H , ^{13}C - HMBC de **P-8**

No espectro de RMN bidimensional ^1H , ^{13}C - (HSQC) (Fig. 117, pág. 144) foi possível observar, entre outras, a correlação (1J) do carbono em δ_{C} 64,0 (C-1) com os sinais dos hidrogênios em δ_{H} 4,09 e 3,91 (H-1a/b); do carbono em δ_{C} 54,3 (C-3) com o hidrogênio em δ_{H} 4,01 (H-3), dos sinais de carbonos olefínicos em δ_{C} 133,8 e 129,4 (C-4 e C-5) com os hidrogênios em δ_{H} 5,44 (H-4) e 5,70 (H-5), respectivamente, assim como dos carbonos em δ_{C} 131,1 (C-8), 129,2 (C-9) com os hidrogênios em 5,36 (H-8 e 9). A análise detalhada deste espectro permitiu a inequívoca correlação dos sinais espectrais de carbono aos seus respectivos hidrogênios, como mostrado na Tabela 25

(pág. 138), inclusive do sinal em δ_H 2,01 com o sinal de carbono em δ_C 32,0 referente ao um grupo metilênico ligado ao enxofre.

Os dados observados no espectro 1H , ^{13}C – HMBC (Fig. 119, pág. 146) permitiu confirmar a localização dos grupos funcionais na estrutura. A análise deste espectro mostrou *cross-peaks* referente ao acoplamento dos hidrogênios em δ_H 4,01(H-3) com o carbono em δ_C 64,0 (C-1) e do δ_H 5,70 (H-5) com o carbono oxigenado em δ_C 71,4 (C-3). Observou-se ainda, acoplamentos dos hidrogênios em δ_H 2,01 (H-7) com os carbonos olefínicos em δ_C 133,8 (C-5) e 129,2 (C-9) e do hidrogênio em δ_H 5,44 (H-4) com o carbono em δ_C 32,6 (C-6) e do grupo metila, o qual se encontra ligado ao nitrogênio, com o carbono C-2'' (δ_C 45,3 ppm). Observou-se também o acoplamento do sinal em 7,23 (N-H), da porção esfingosina, com o grupo carbonila em 174,4 ppm como mostrado nas estruturas parciais a seguir:

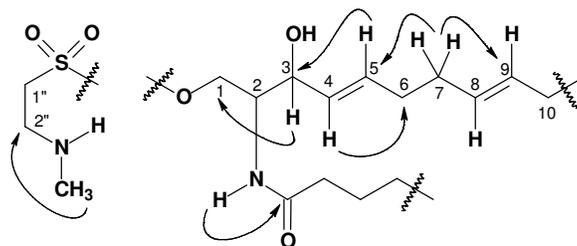


Figura 102: Principais correlações 1H , ^{13}C – HMBC de **P-8**

O espectro de correlação heteronuclear 1H , ^{15}N – HMBC (Fig 123, pág. 149), mostrou correlações dos sinais em δ_H 4,09 (H-1) e 2,13 (H-2') com o nitrogênio da porção esfingosina em δ_N 161,0 (N-1). Este espectro mostrou ainda a correlação dos sinais em δ_H 2,64 (-CH₃) e 2,01 (H-1'') com o nitrogênio em 170,1 (N-2). Estas correlações confirmaram a posição do grupo amina e amida na estrutura, como mostrado na Figura abaixo.

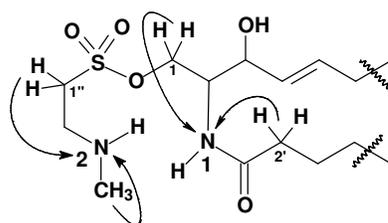
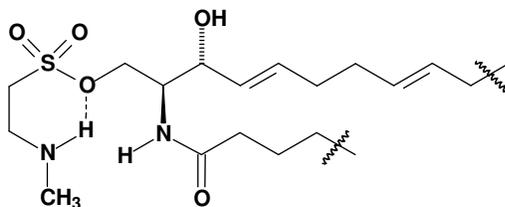


Figura 103: Principais correlações 1H , ^{15}N – HMBC de **P-8**

As informações acima discutidas aliadas a comparação com os dados de **P-5** (pág. 92), previamente determinado, nos permitiu deduzir que este composto se tratava

de uma ceramida de porção esfingosina monohidroxilada e sulfatada. Ceramidas sulfatadas foram isoladas por Nakao e colaboradores (2001), a partir de esponja marinha *Discodermia calyx*, o que nos dá um adicional suporte para a proposição estrutural.



A determinação do número de átomos de carbono da cadeia alifática da porção amídica, foi determinada por CG/EM, através da análise do éster metílico, seguindo o mesmo procedimento realizado para o composto **P-5** (pág. 114), o qual também mostrou somente um sinal em seu cromatograma (Fig. 104), cujo espectro de massa mostrou um pico em m/z 270 Daltons e padrão de fragmentação compatível com o hexadecanoato de metila.

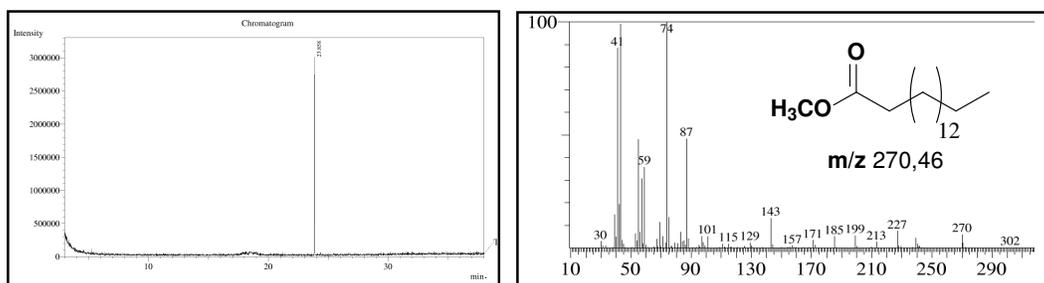


Figura 104: Cromatograma e espectro de massa do éster metílico (hexadecanoato de metila)

Os espectros de massas referentes as fragmentações dos íons moleculares m/z 655,5088 $[M - H]^-$ e m/z 657,5390 $[M + H]^+$ (Fig. 109 e 111, pág. 140), mostraram picos em m/z 417,2844 e 518,4936, respectivamente, condizente com os fragmentos apresentados na Figura 105, pág. 137.

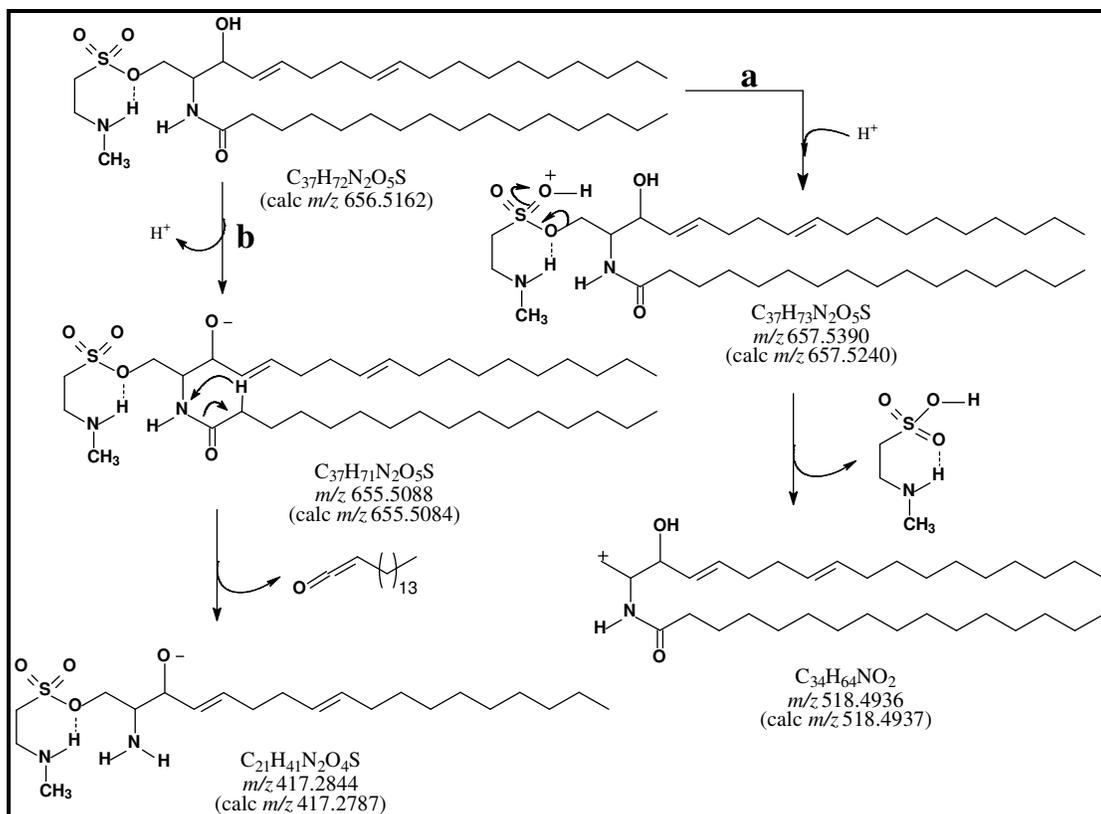


Figura 105: Estrutura dos fragmentos EM/EM obtidos dos espectros de massa de alta resolução de **P-8**, no modo positivo (a) e negativo (b).

Estes resultados permitiram determinar com segurança os tamanhos das porções amídicas e esfingóide, e elucidar a estrutura de **P-8**, uma ceramida sulfatada de nome sistemático *N*-[2*S*,3*R*,4*E*,8*E*,1-(2''-metilamino-etanosulfonila)-3-hidroxi-4,8-octadecadieno)]hexadecanamida a qual está sendo relatada pela primeira vez.

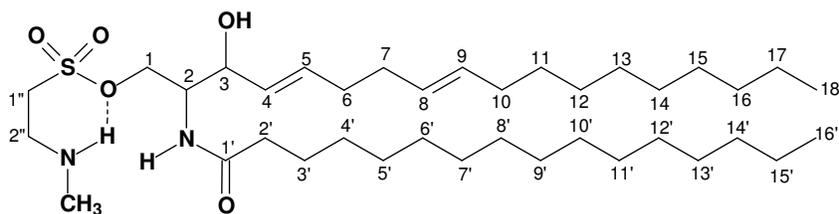


Figura 106: Estrutura do composto **P-8**

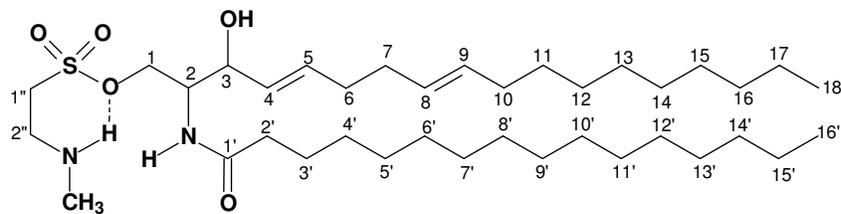


Tabela 25: Dados de RMN ^1H , ^{13}C e correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C (HSQC e HMBC, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de **P-8**

#C	HSQC		HMBC	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)(multip, $J_{\text{H,H}}$)	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	64,0	4,09 (m) / 3,92 (m)		H-3
2	54,3	3,91 (sl)	H-3	
3	71,4	4,01 (t, 7,1 Hz)	H-4	H-5
4	129,4	5,44 (dd, 15,4 e 7,1 Hz)	H-3	H-6
5	133,8	5,70 (m)	H-6	H-3; H-7
6	32,6	2,01 (m)		H-4
7	32,4	2,01 (m)		
8	131,1	5,36 (m)		H-10
9	129,2	5,36 (m)	H-10	H-7
10	32,7	1,91 (m)		
11-16	29,8-29,3	1,26 / 1,21 (m)		
17/15'	22,7	1,26 (m)		
18/16'	14,1	0,84 (t, 6,6 Hz)		
1'	174,4	-	2H-2'	2H-H-3'
2'	36,6	2,13 (t, 7,4 Hz)	2H-3'	
3'	26,0	1,53 (m)	2H-2'	
4'-14'	29,8-29,3	1,21 (m)		
1''	32,0	2,01 (m)		
2''	45,3	3,10 (sl)	2H-2''	N-CH ₃
N-CH ₃	33,1	2,64 (s)		
N-H	-	7,23 (d, 8,4 Hz)		
N-H	-	8,96 (sl)		

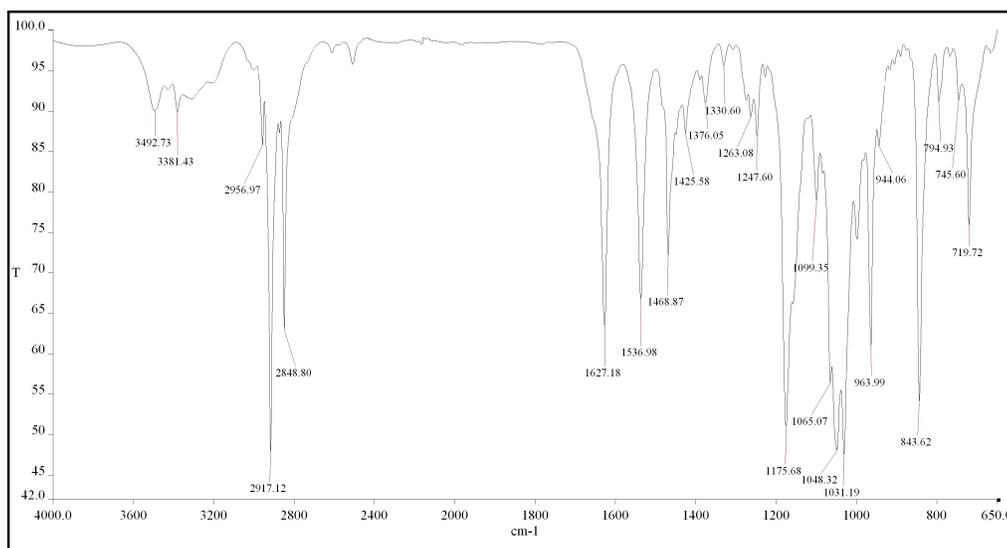


Figura 107: Espectro de infravermelho (KBr) de **P-8**

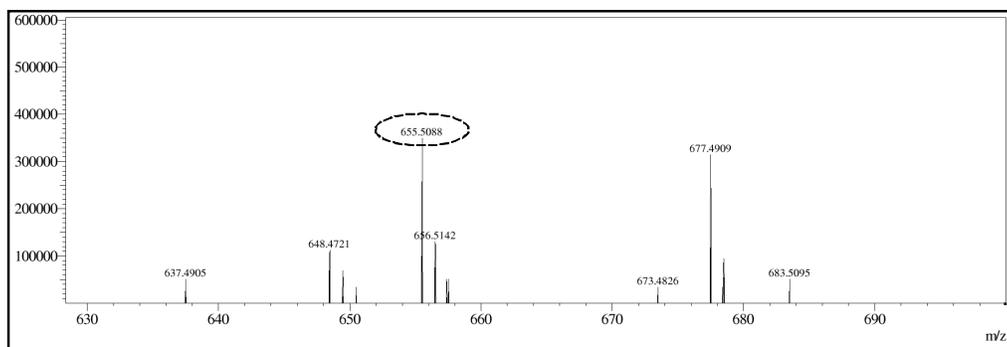


Figura 108: Espectro de massa de alta resolução [M - H]⁻ de **P-8**

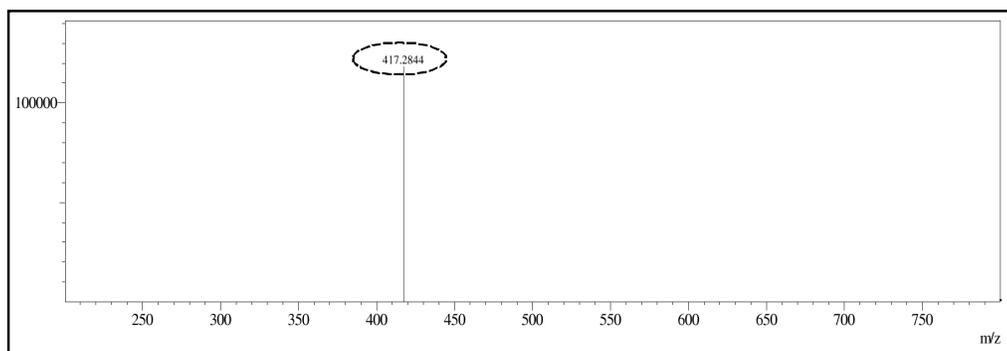


Figura 109: Espectro de massa precursor do íon [M - H]⁻ m/z 655 de **P-8**

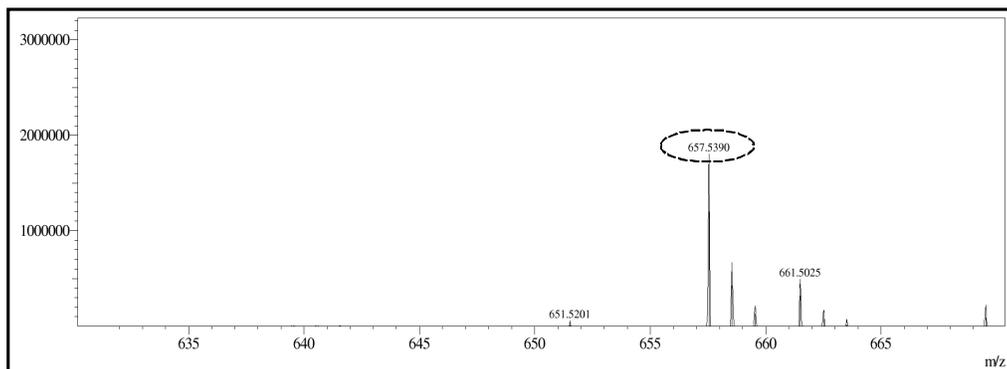


Figura 110: Espectro de massa de alta resolução [M + H]⁺ de **P-8**

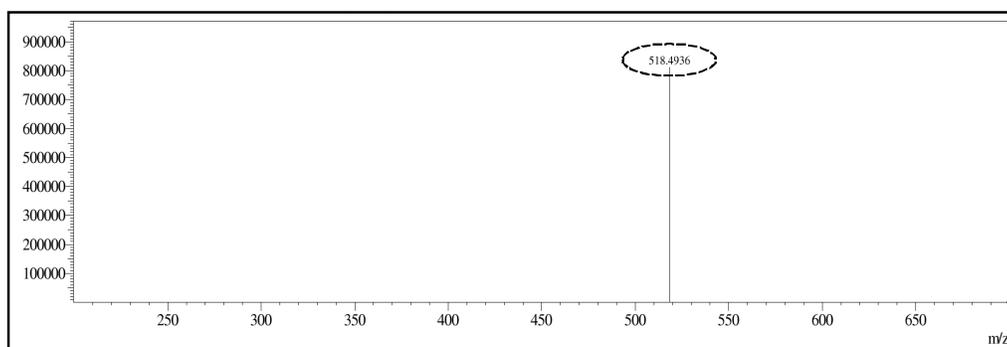


Figura 111: Espectro de massa precursor do íon [M + H]⁺ m/z 657 de **P-8**

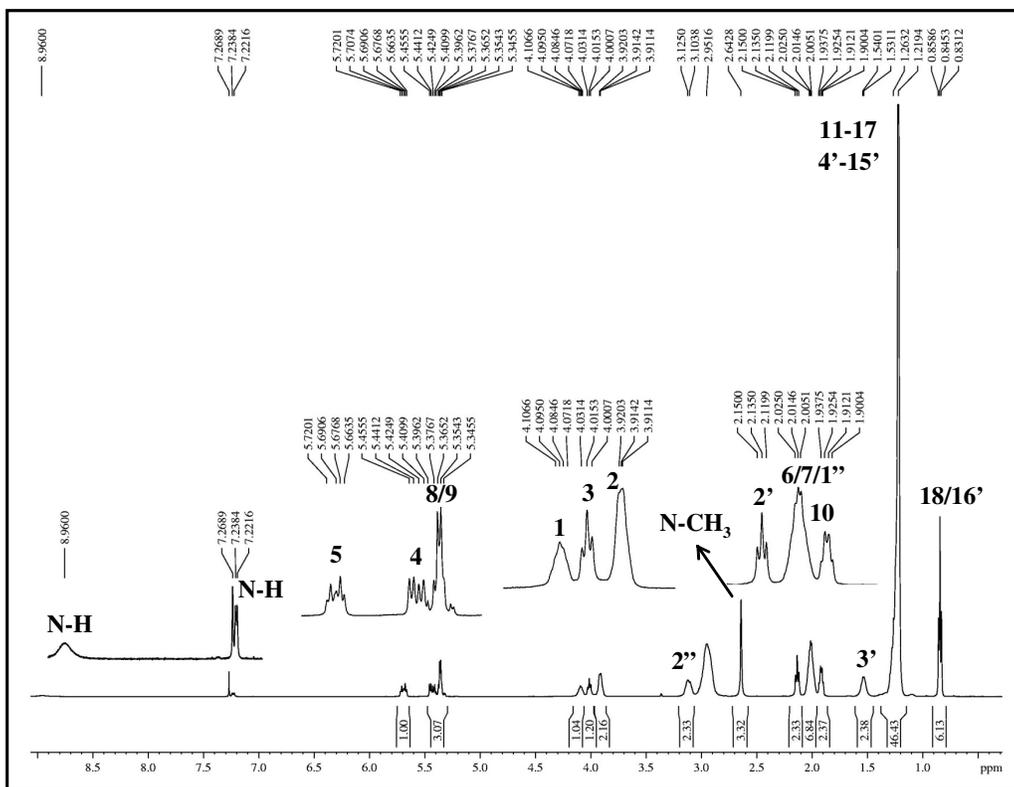


Figura 112: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de P-8

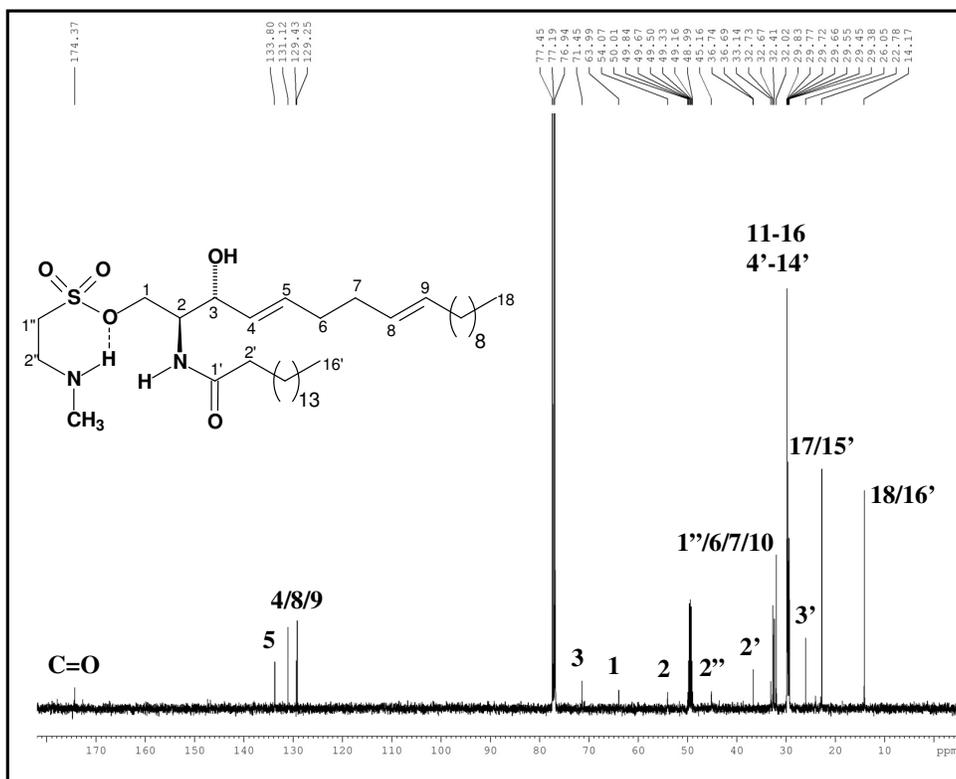


Figura 113: Espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de P-8

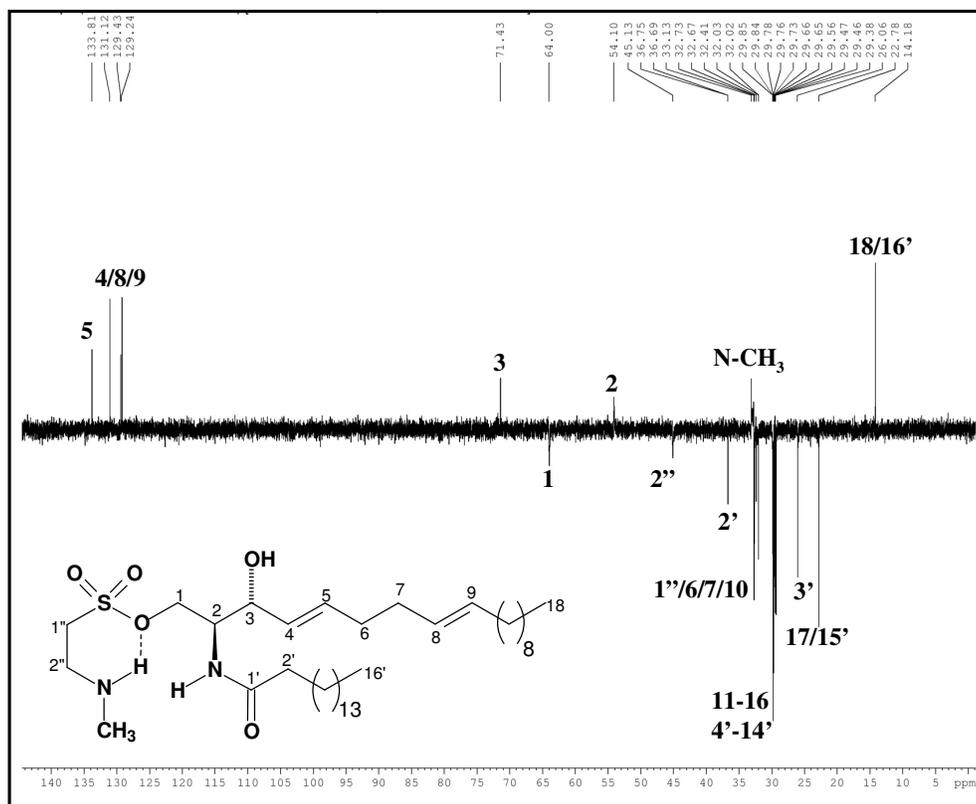


Figura 114: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de **P-8**

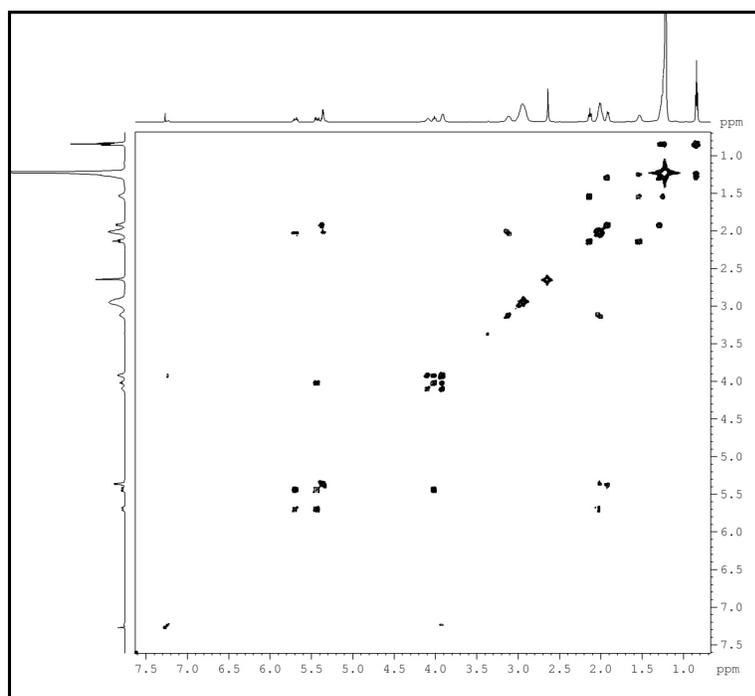


Figura 115: Espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de **P-8**

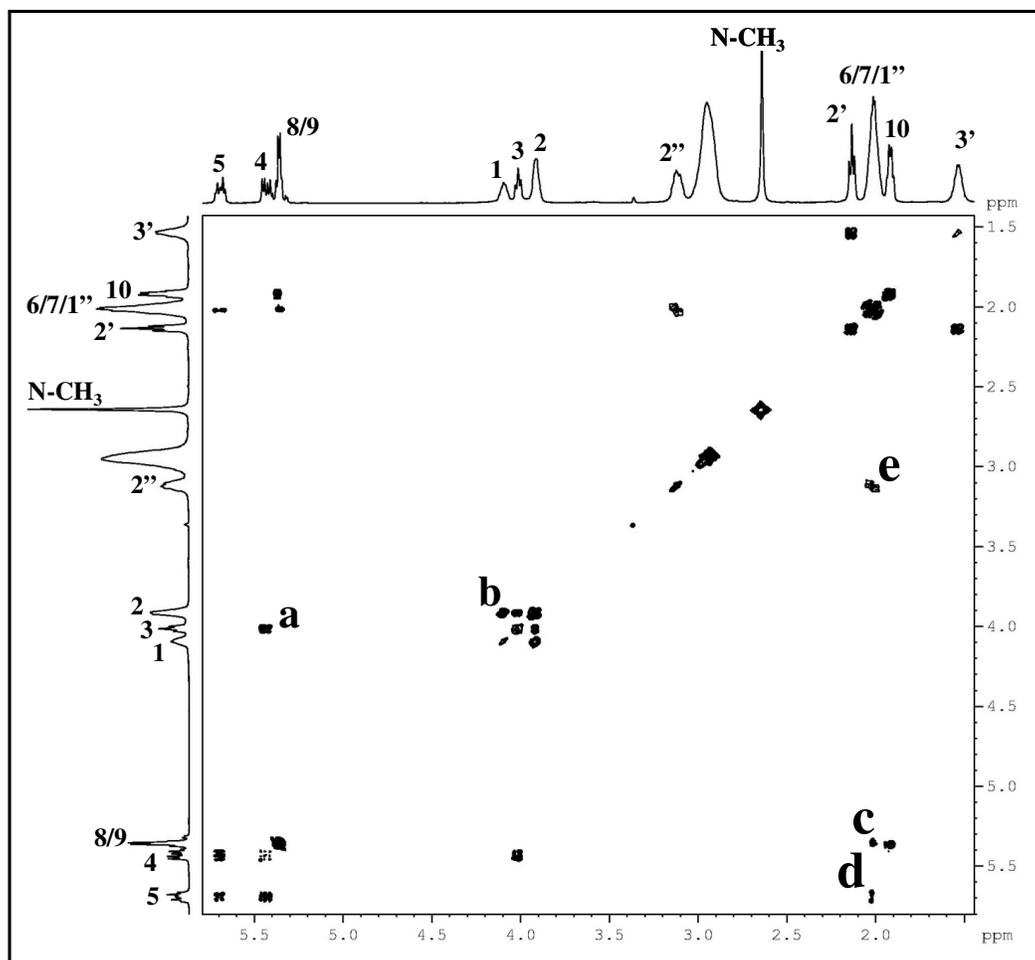
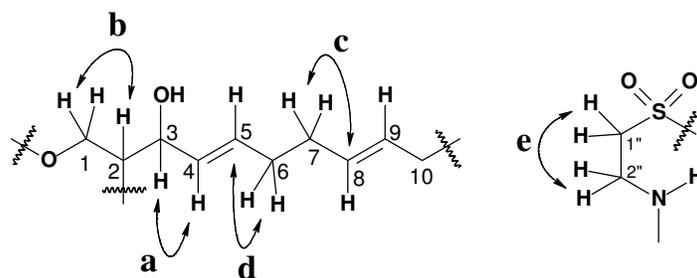


Figura 116: Expansão do espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de **P-8**



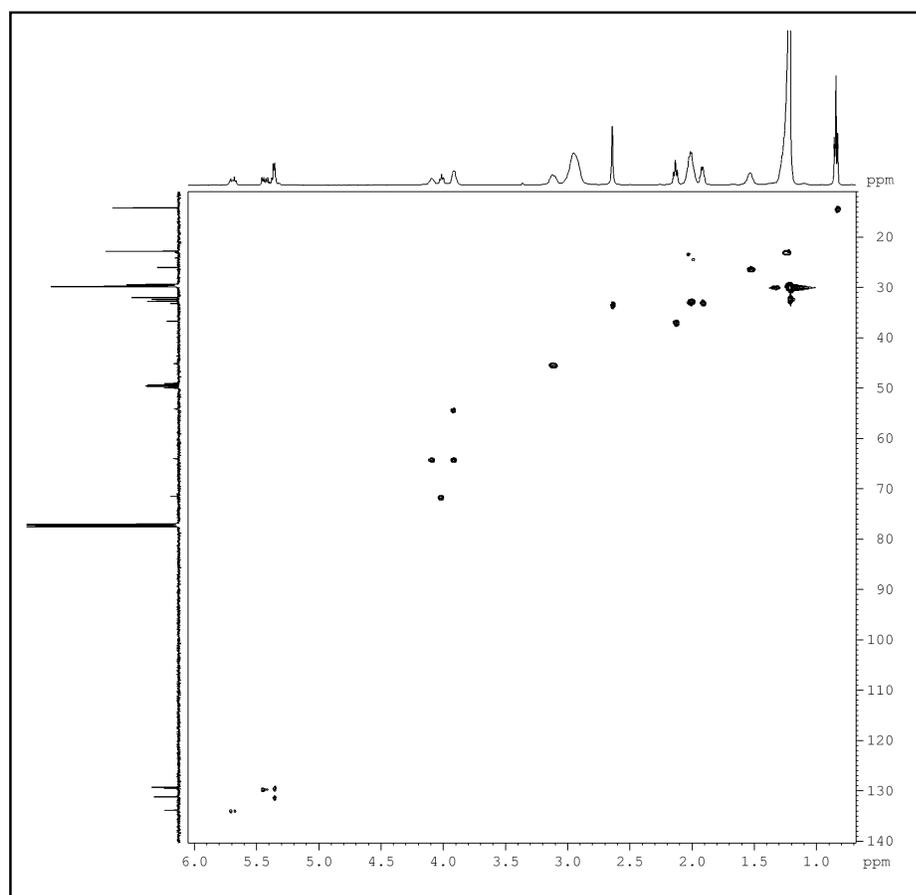
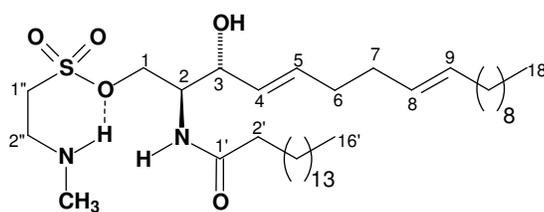


Figura 117: Espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de **P-8**



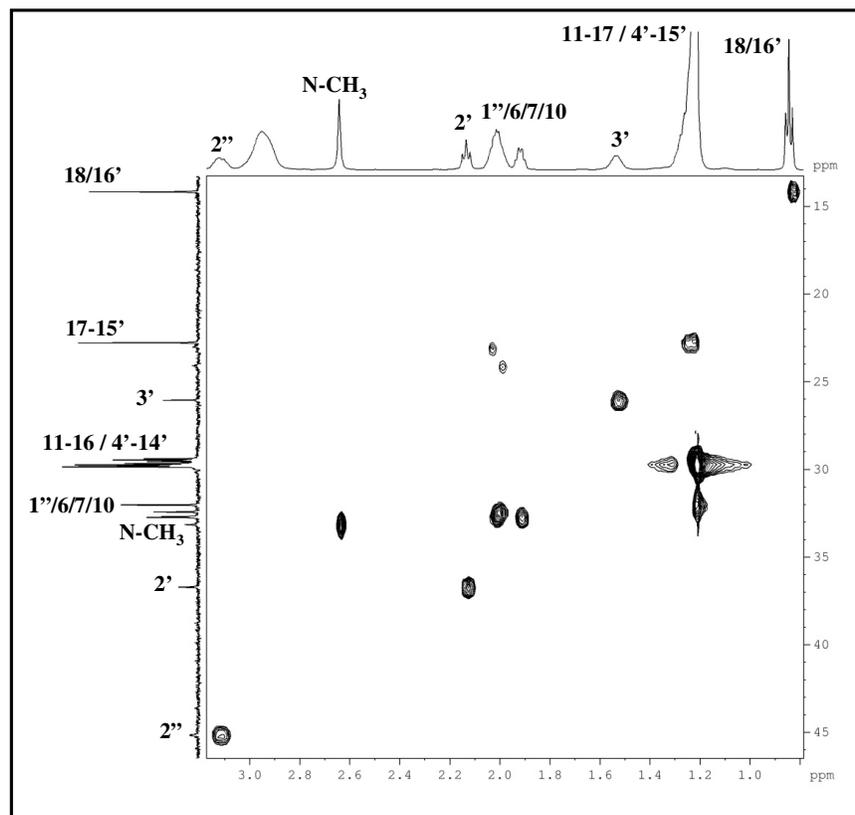
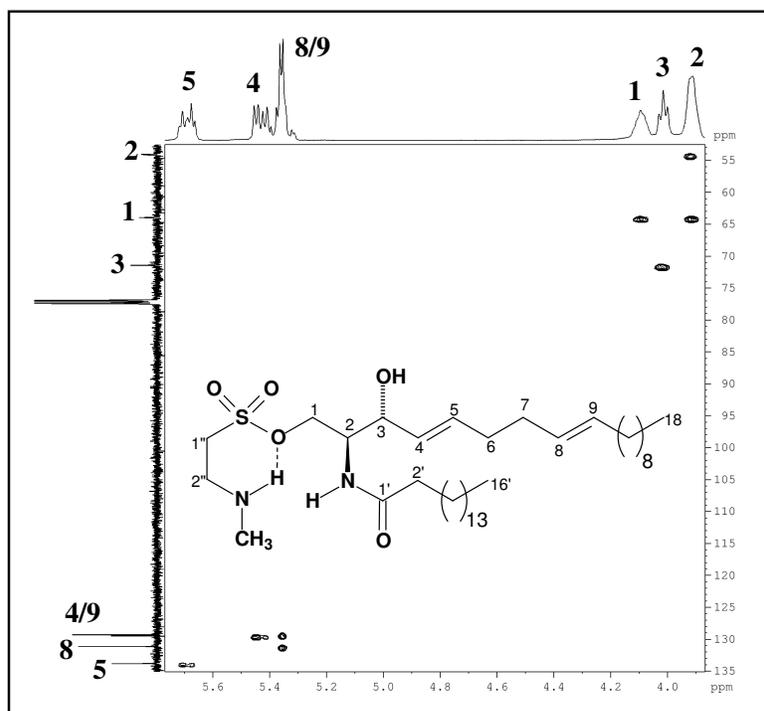


Figura 118: Expansões do espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de **P-8**

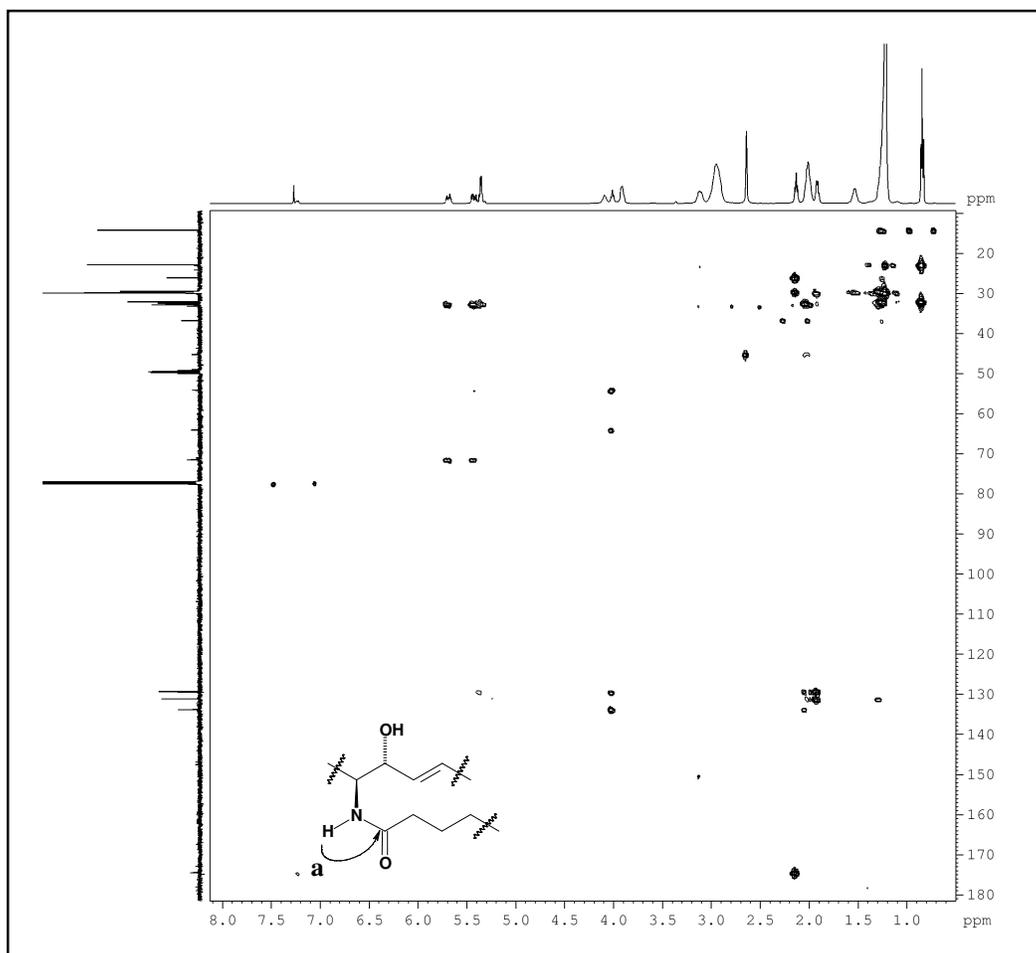
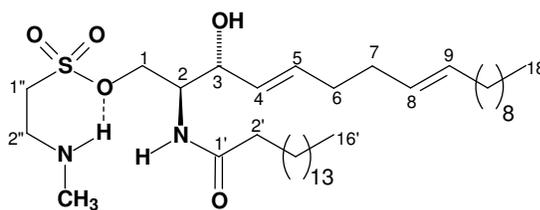


Figura 119: Espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de **P-8**



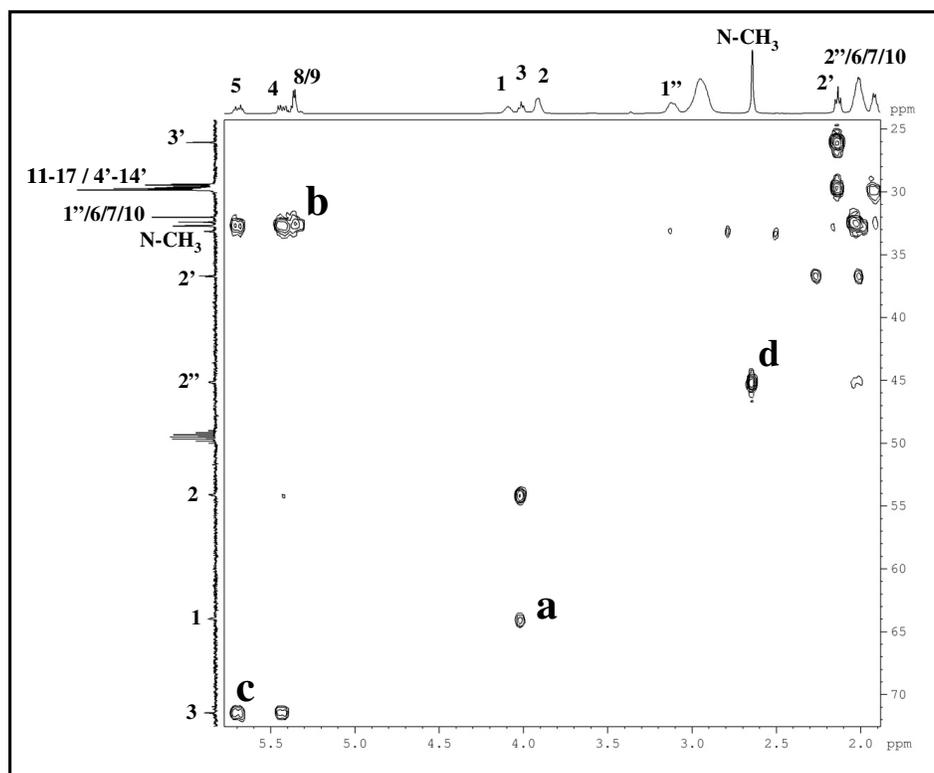
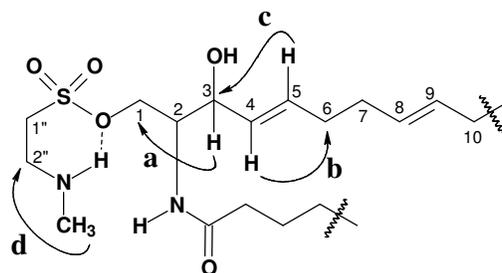


Figura 120: Expansão do espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de **P-8**



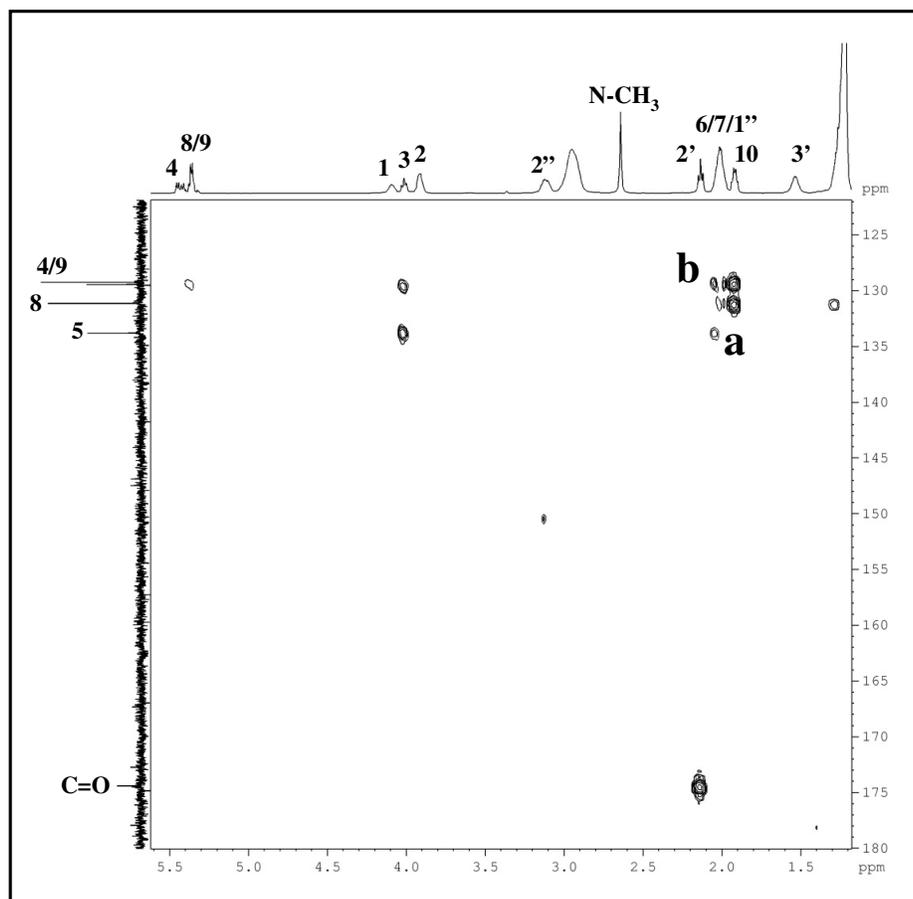
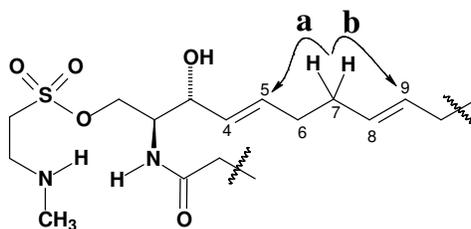


Figura 121: Expansão do espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de **P-8**



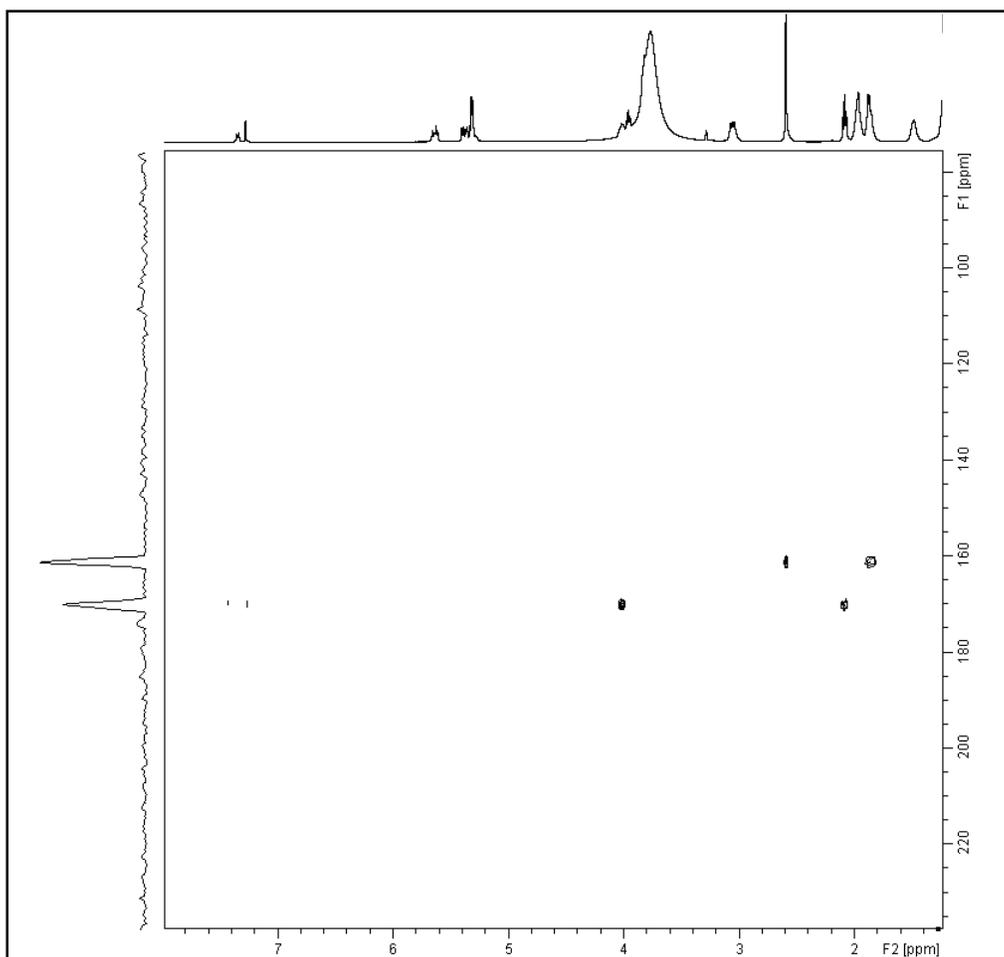


Figura 122: Espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{15}N – HMBC ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de **P-8**

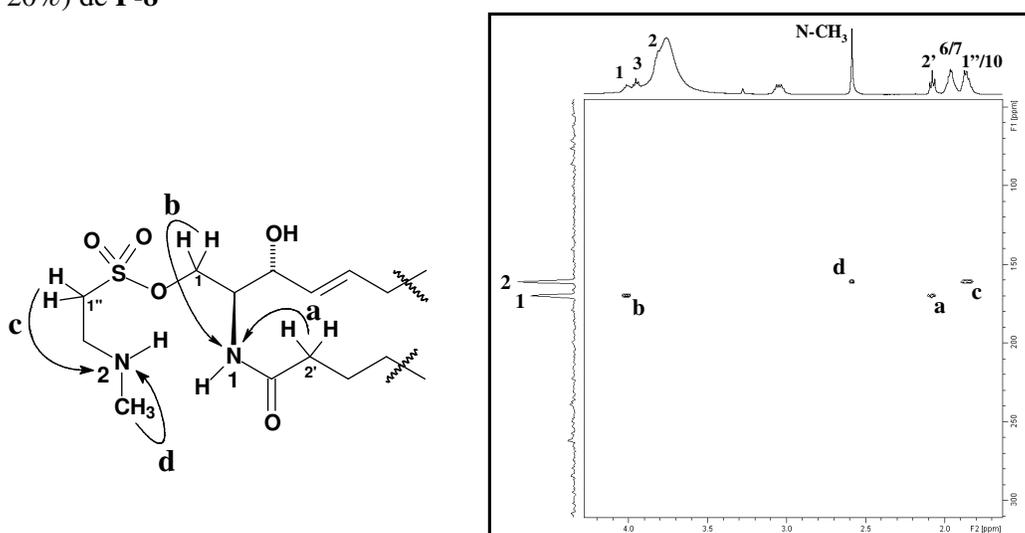


Figura 123: Expansão do espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{15}N – HMBC ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de **P-8**

5.1.10 Determinação estrutural de P-9

O composto denominado de **P-9** purificado por CLAE ($t_R = 9,0$ min.) (item 6.4.1.9, pág. 192), mostrou-se como um sólido amorfo branco, com ponto de fusão na faixa de 147-148 °C e rotação específica de $[\alpha]_D^{20} = + 18$ ($c = 0,038$; CHCl_3).

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 127, pág. 154) apresentou duas bandas de absorção em 3.495 e 3.382 cm^{-1} de deformação N-H; absorções em 2.916 e 2.847 cm^{-1} correspondentes a deformação axial assimétrica e simétrica de ligação C-H de grupamentos CH_2 e CH_3 . Absorções intensas em 1.627 cm^{-1} de deformação axial de grupo carbonila e outra em 1.535 cm^{-1} característico de ligação C-N de grupo amida. Além de absorções intensas em 1.175 e 1.054 cm^{-1} condizentes de deformação axial de ligação O=S=O e C-O, respectivamente, e absorções intensas em 1.019 e 843 cm^{-1} referente ao estiramento C-O-S [SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000].

O espectro de massa de alta resolução, obtido com ionização por *eletrospray* (Fig. 128, pág. 155), mostrou picos em m/z 657,5264 $[\text{M} - \text{H}]^-$ e 659,5524 $[\text{M} + \text{H}]^+$, indicando a fórmula molecular $\text{C}_{37}\text{H}_{74}\text{N}_5\text{O}_5\text{S}$ (calculado m/z 657,5240 e 659,5397).

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) (Fig. 132, pág. 156) de **P-9** mostrou-se bastante semelhante ao de **P-8**, exibindo dois sinais em δ_{H} 8,72 (sl) e 7,32 (d, 8,4 Hz) característicos de hidrogênios ligados a nitrogênio, um sinal em δ_{H} 2,51 ppm com integração para três hidrogênios que foi associado a um grupo metila ligado a nitrogênio (s, $\text{CH}_3\text{-N}$), além de múltiplos sinais em δ_{H} 5,54 (m, H-5) e 5,26 (dd, 16 e 7,1 Hz, H-4) de hidrogênios ligados a carbono sp^2 . Sinais em δ_{H} 3,97 (m, H-1a) e 3,73 (m, H-1b) indicativos de hidrogênios heterotópicos ligado a carbono oxigenado, bem como em δ_{H} 1,73 (m, H-1'') e 3,74 (s, H-2) relativos a hidrogênios ligados a enxofre e nitrogênio, respectivamente. Observou-se ainda um tripleto em δ_{H} 0,70 ppm com integração para seis hidrogênios referente a duas metilas, além de um singlete largo e intenso em 1,08 ppm, o qual foi atribuído a grupos metilênicos de uma cadeia alifática.

O espectro de RMN ^{13}C -CPD 125 MHz (Fig. 133, pág. 156) de **P-9** apresentou uma série de sinais em sobreposição entre δ_{C} 29,1 e 29,5 ppm, compatíveis com uma cadeia alifática. Na região de carbonos sp^2 observou-se duas linhas espectrais em δ_{C} 128,9 e 134,3 ppm para uma ligação dupla, sinais em δ_{C} 71,1 e 63,4 ppm relativos a carbonos oxigenados, sinais em 45,3 e 53,9 ppm de carbonos ligados a nitrogênio, e um sinal em δ_{C} 174,4 de carbonila de amida. A comparação destes dados de RMN ^1H e ^{13}C com os dados obtidos para o composto **P-8** (Tabela 26, pág. 151), nos permitiu propor a

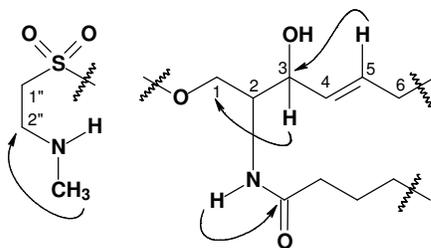
estrutura de **P-9**, como sendo uma ceramida sulfatada de estrutura bastante semelhante ao do composto **P-8**, porém com apenas uma dupla entre os carbonos C-4 e C-5.

A análise do espectro ^1H , ^{13}C - (HSQC) (Fig. 135, pág. 158) permitiu a inequívoca correlação dos sinais espectrais de carbono aos seus respectivos hidrogênios (Tabela 26).

Tabela 26: Comparação entre os dados de RMN ^1H e ^{13}C de **P-9** e **P-8**.

#C	P-9		P-8	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)(multip, $J_{\text{H,H}}$)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)(multip, $J_{\text{H,H}}$)
1	63,4	3,97; 3,73 (m)	64,0	4,09 / 3,91
2	53,9	3,74 (m)	54,3	3,91
3	71,1	3,88 (t, 7,1 Hz)	71,4	4,01 (t, 7,1 Hz)
4	128,9	5,26 (dd, 15,4 Hz e 7,1 Hz)	129,4	5,44 (dd, 15,4 e 7,1 Hz)
5	134,3	5,54 (m)	133,8	5,70 (m)
6	32,3	1,83 (m)	32,6	2,01
7	31,8	1,08 (sl)	32,4	2,01
8	29,5-29,1	1,08 (sl)	131,1	5,36 (m)
9	29,5-2,1	1,08 (sl)	129,2	5,36 (m)
10	29,5-29,1	1,08 (sl)	32,7	1,91
11-16	29,5-29,1	1,08 (sl)	29,8-29,3	1,26; 1,21 (m)
17/15'	22,5	1,08 (sl)	22,7	1,26 (m)
18/16'	13,8	0,70 (t, 6,6 Hz)	14,1	0,84 (t, 6,6 Hz)
1''	174,4	-	174,4	-
2'	36,4	2,01 (t, 7,4 Hz)	36,6	2,13 (t, 7,4 Hz)
3'	25,8	1,41 (sl)	26,0	1,53 (m)
4'-14'	29,5-29,1	1,08 (sl)	29,8-29,3	1,21 (m)
1''	32,3	1,73 (m)	32,0	2,01
2''	45,3	2,96 ((m)	45,3	3,10
N-CH ₃	32,7	2,51 (s)	33,1	2,64 (s)
N-H	-	7,32 (d, 8,4 Hz)	-	7,23 (d, 8,4 Hz)
N-H	-	8,72 (sl)	-	8,96 (s, largo)

Os dados observados no espectro ^1H , ^{13}C - HMBC (Fig. 136, pág. 159) permitiu confirmar a localização dos grupos funcionais na estrutura. A análise deste espectro mostrou *cross-peaks* referente ao acoplamento dos hidrogênios em δ_{H} 3,88 (H-3) com o carbono em δ_{C} 63,4 (C-1) e δ_{H} 5,54 (H-5) com o carbono oxigenado em δ_{C} 71,1 (C-3) confirmando a posição da dupla ligação presente na porção esfingosina. Observou-se também o acoplamento dos hidrogênios do grupo metila, o qual se encontra ligado ao nitrogênio, com o carbono em δ_{C} 45,3 ppm (C-2'') e do sinal em 7,35 (N-H) da porção esfingosina, com o grupo carbonila em 174,4 ppm como mostrado nas estruturas parciais a seguir:



O espectro ^1H , ^{15}N – HMBC (Fig. 138, pág. 161), apresentou *cross-peaks* referente as correlações dos sinais em δ_{H} 3,88 (H-3) e 2,01 (H-2') com o nitrogênio da porção esfingosina em δ_{N} 161,9 (N-1), bem como a correlação do sinal em δ_{H} 2,51 (-CH₃) com o nitrogênio em δ_{N} 171,1 (N-2). Estas correlações permitiram definir a posição do grupo amina e amida na estrutura, idêntica de **P-8**, como mostrado na Figura a seguir.

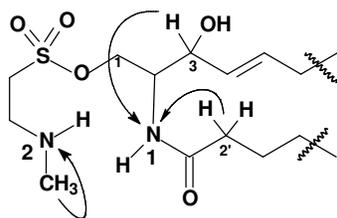


Figura 124: Principais correlações ^1H , ^{15}N – HMBC de **P-9**

A determinação do número de átomos de carbono da cadeia alifática da porção amídica, foi determinada por CG/EM, através da análise do éster metílico, seguindo o mesmo procedimento realizado para o composto **P-5**, página 114.

As fragmentações dos íons moleculares m/z 657,5264 [$\text{M} - \text{H}$]⁻ e m/z 659,5524 [$\text{M} + \text{H}$]⁺ (Fig. 129 e 131, pág. 155), mostraram picos em m/z 419,2984 e 520,5093, respectivamente, condizente com os fragmentos apresentados na Figura 125, pág. 153.

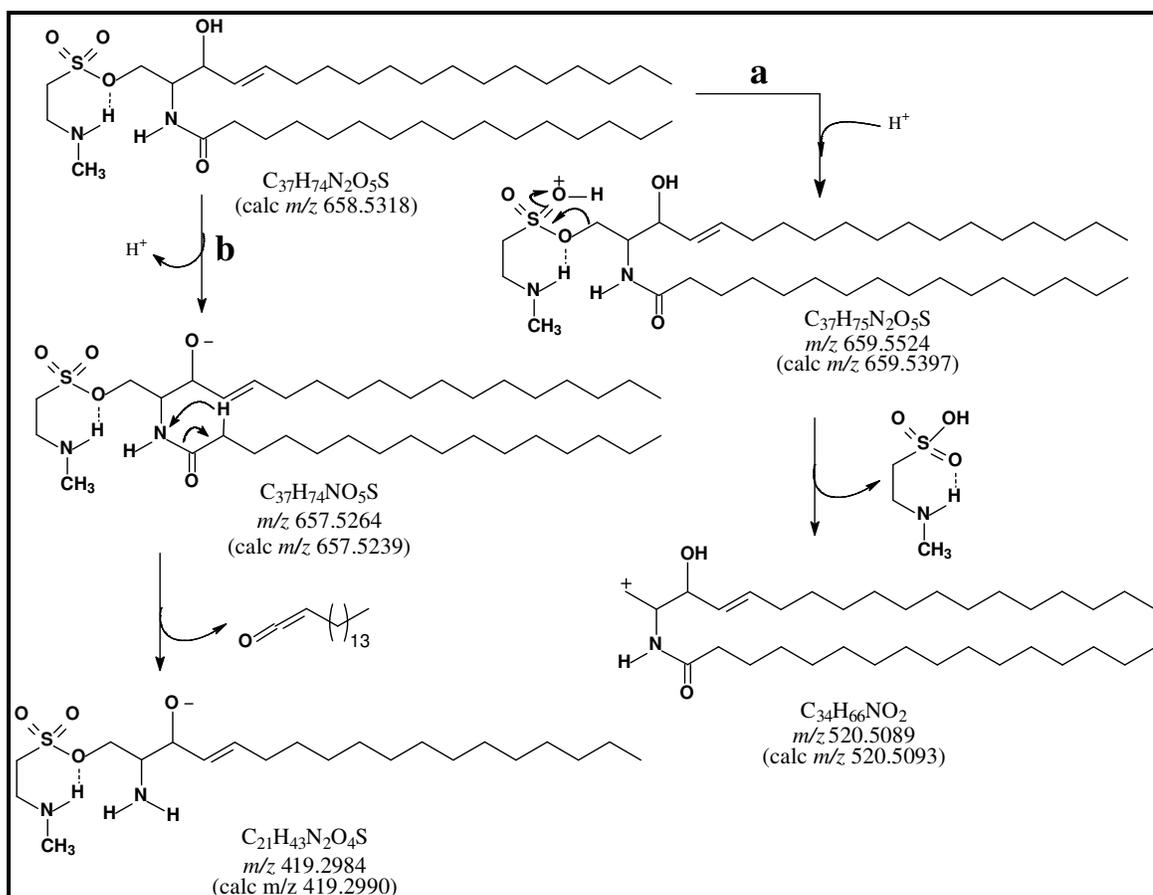


Figura 125: Fragmentações observadas nos espectros de massas EM/EM no modo positivo (a) e negativo (b).

Este resultado quando combinado com as informações obtidas nos espectros de massa de alta resolução, nos permitiu determinar a porção esfingóide, e propor a seguinte estrutura para o composto em discussão (**P-9**) de nome sistemático *N*-[2*S*,3*R*,4*E*,1-(2''-metilamino-etanosulfonila)-3-hidroxi-4-octadecaeno)]hexadecanamida o qual está sendo relatado pela primeira vez na literatura.

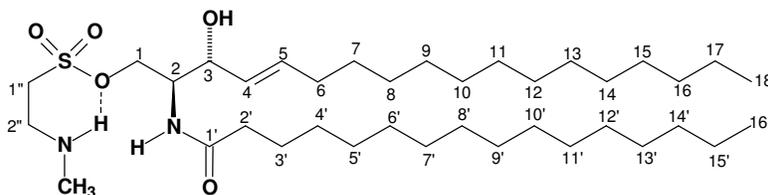


Figura 126: Estrutura do composto **P-9**

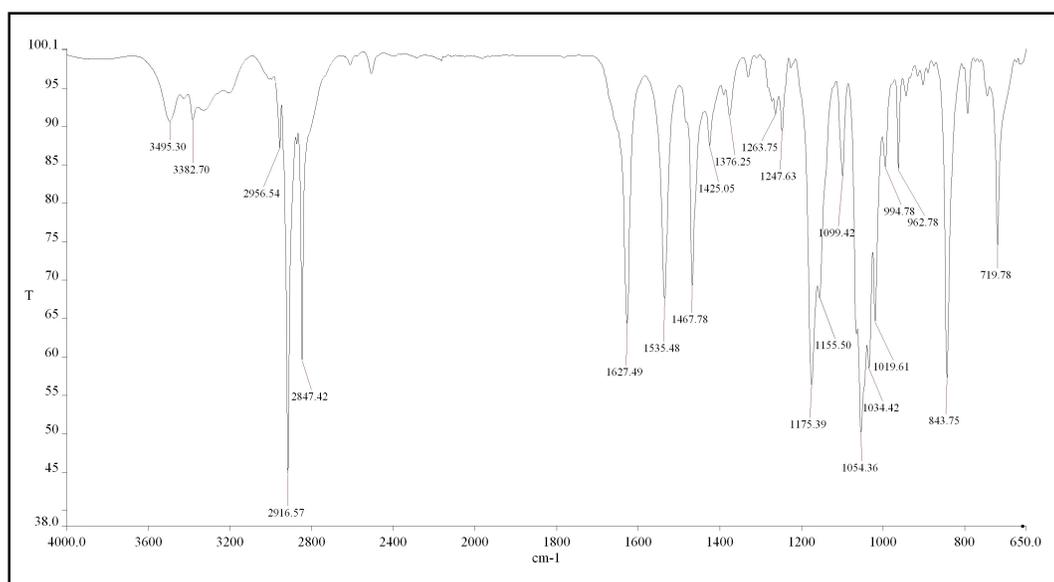


Figura 127: Espectro de infravermelho (KBr) de P-9

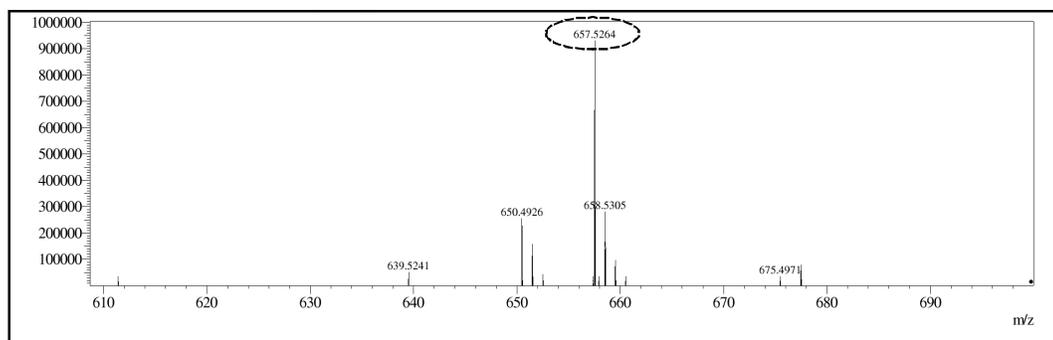


Figura 128: Espectro de massa de alta resolução $[M - H]^-$ de P-9

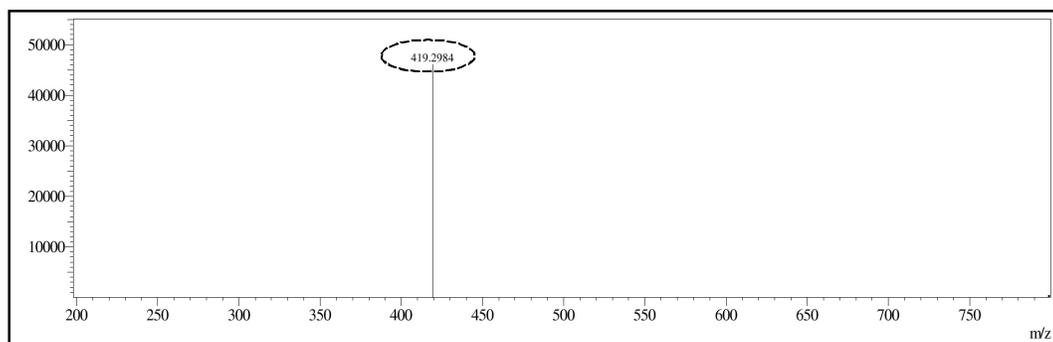


Figura 129: Espectro de massa precursor do íon $[M - H]^-$ m/z 657 de P-9

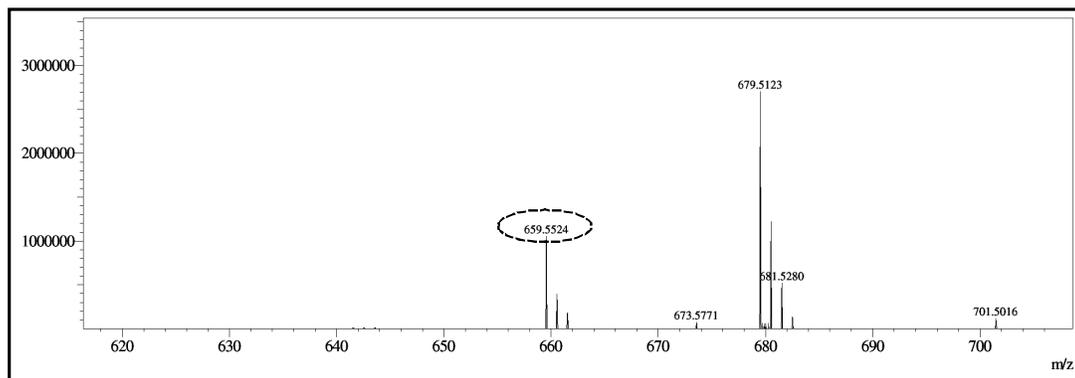


Figura 130: Espectro de massa de alta resolução $[M + H]^+$ de P-9

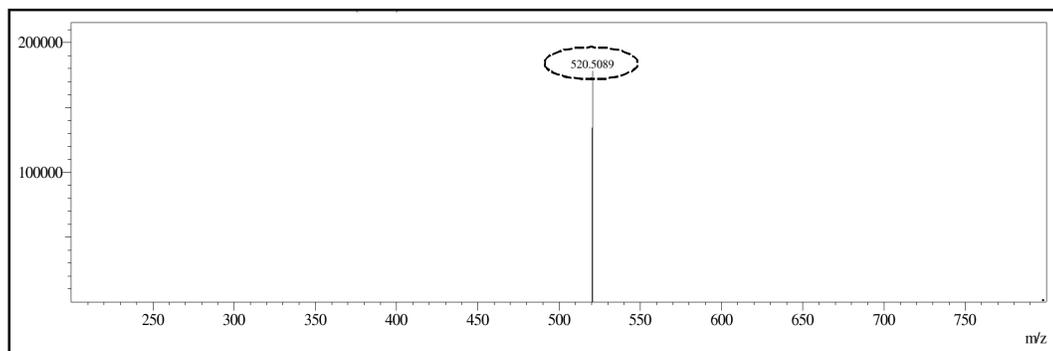


Figura 131: Espectro de massa precursor do íon $[M + H]^+$ m/z 659 de P-9

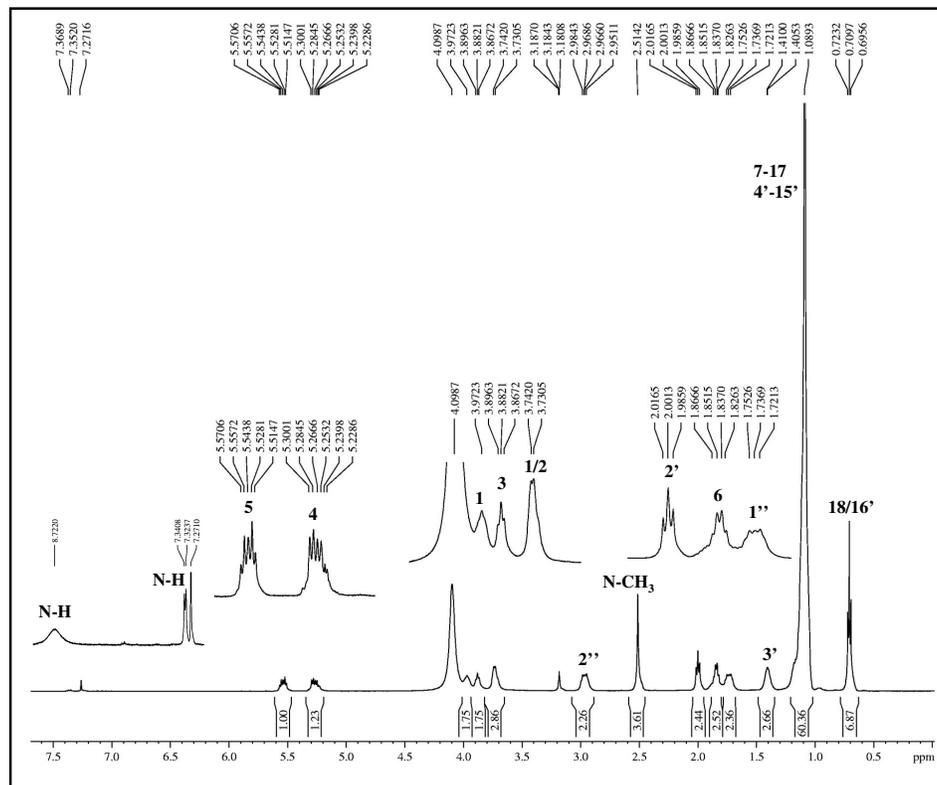


Figura 132: Espectro de RMN ^1H ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de P-9

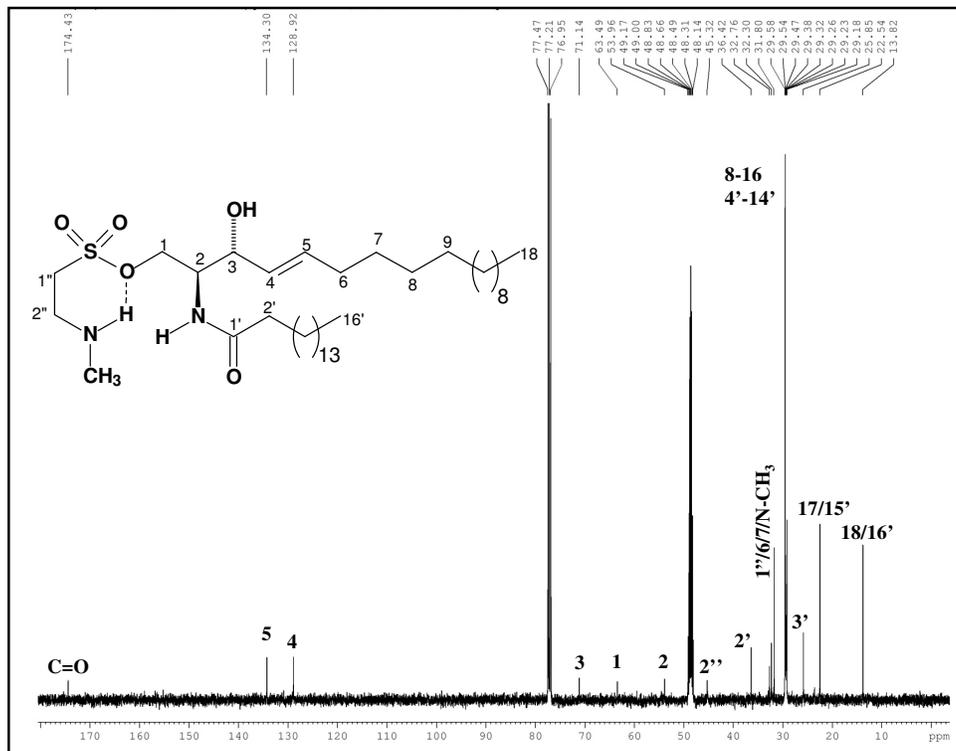


Figura 133: Espectro de RMN ^{13}C -CPD ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de P-9

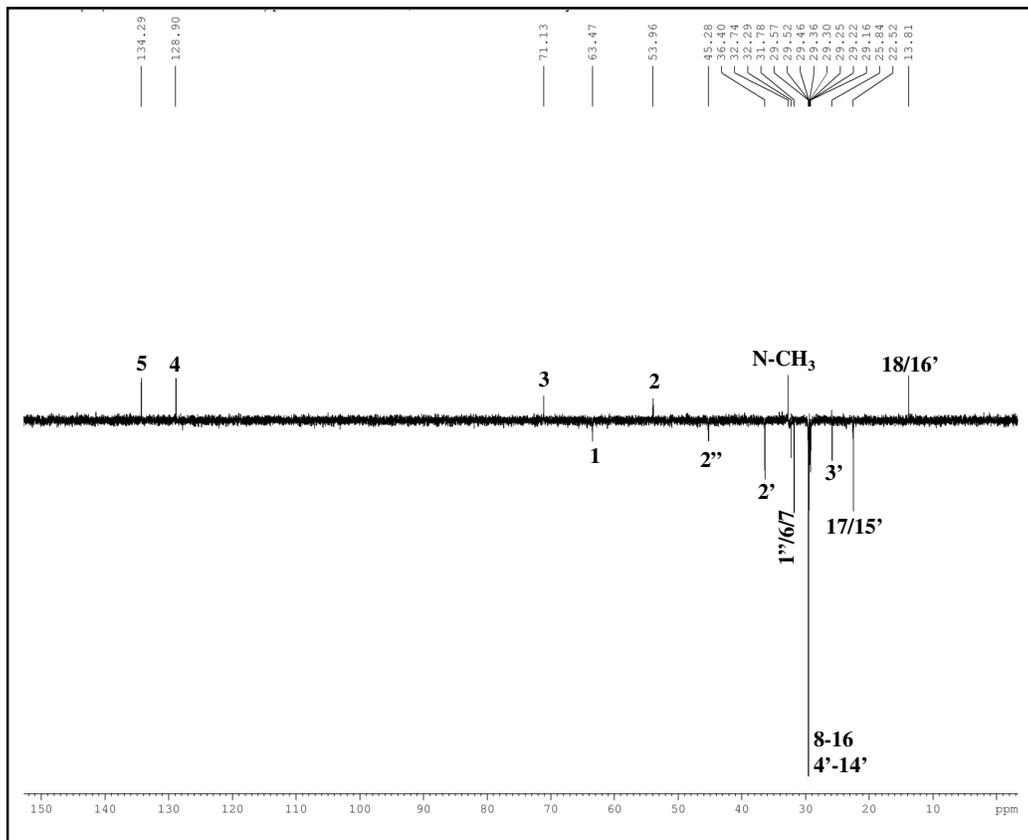
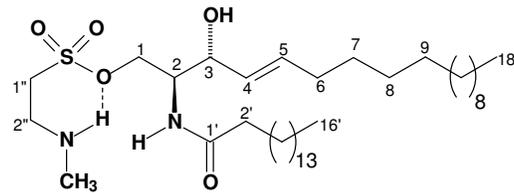


Figura 134: Espectro de RMN ¹³C-DEPT 135° (CDCl₃/CD₃OD 20%) de P-9



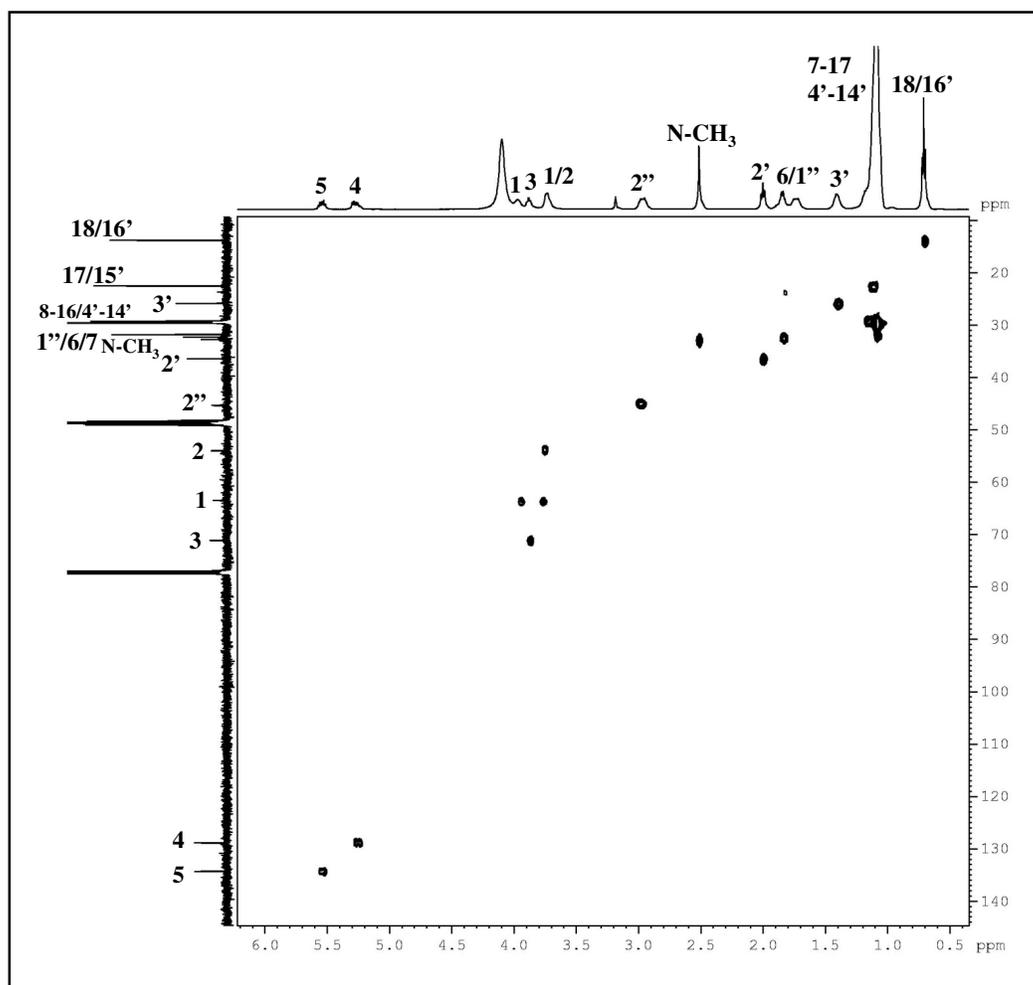
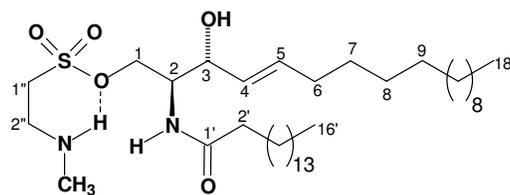


Figura 135: Espectro heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de **P-9**



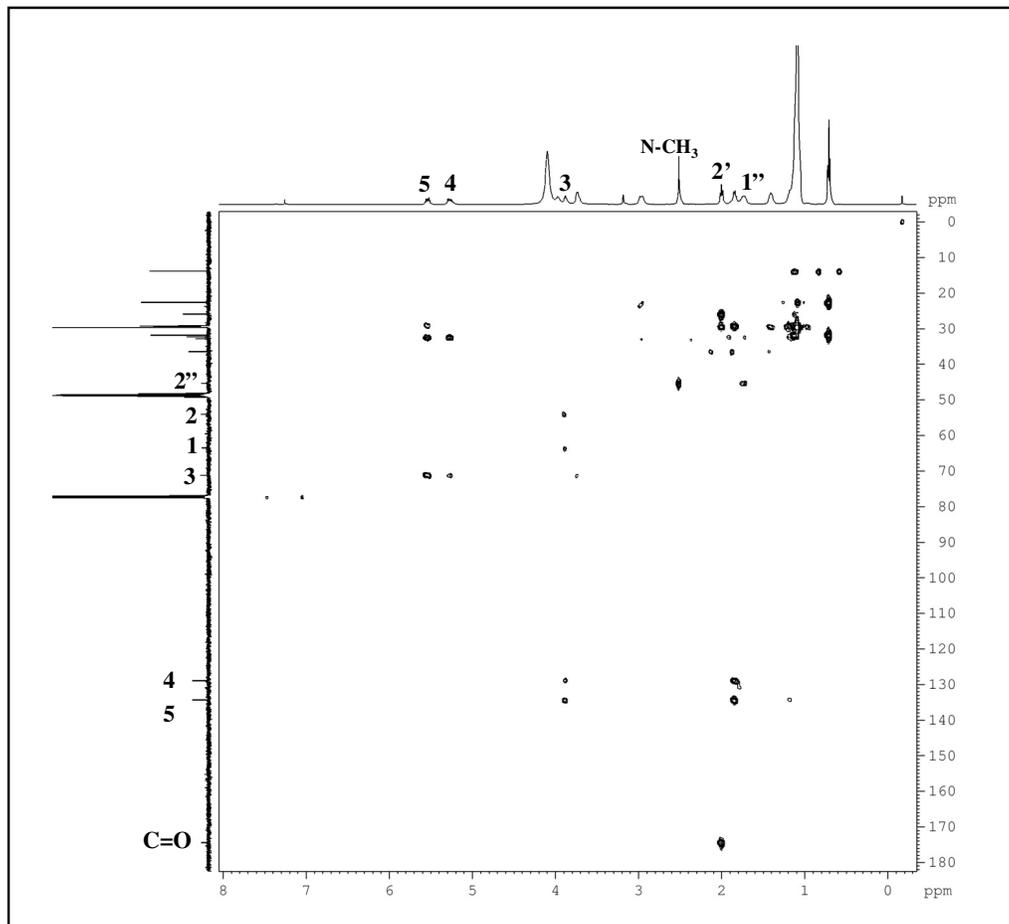
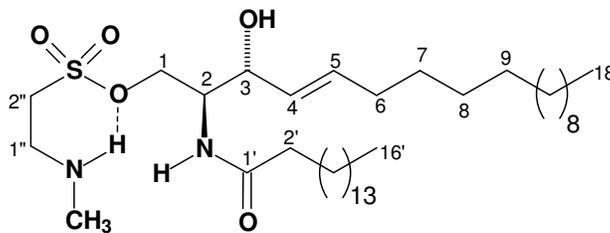


Figura 136: Espectro heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de **P-9**



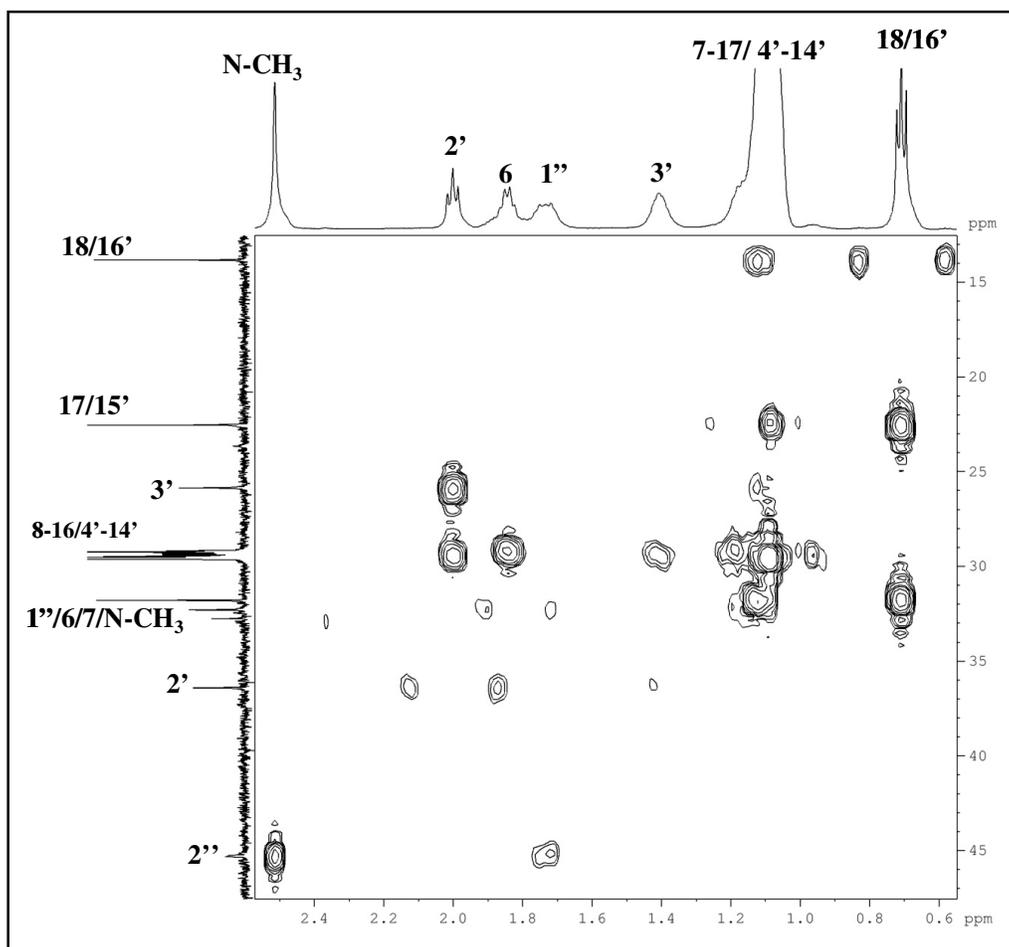
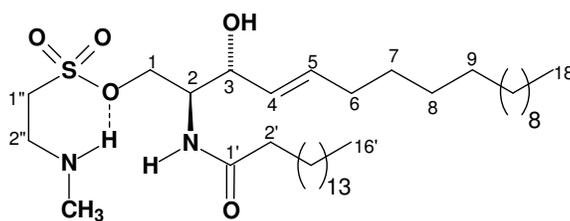


Figura 137: Expansão do espectro heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de P-9



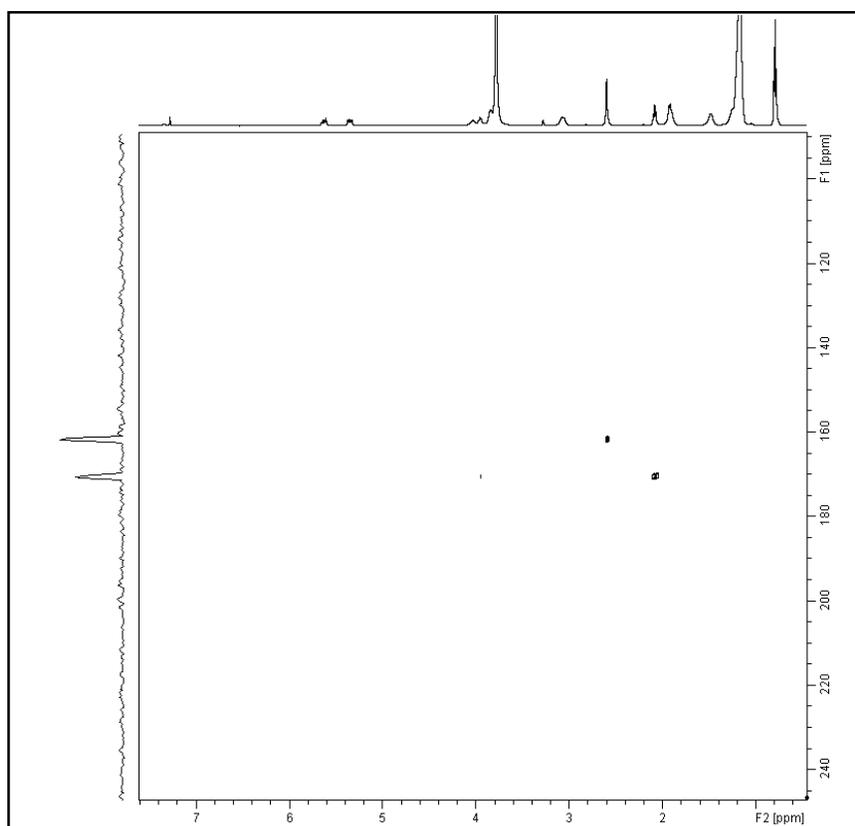


Figura 138: Espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{15}N – HMBC ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de **P-9**

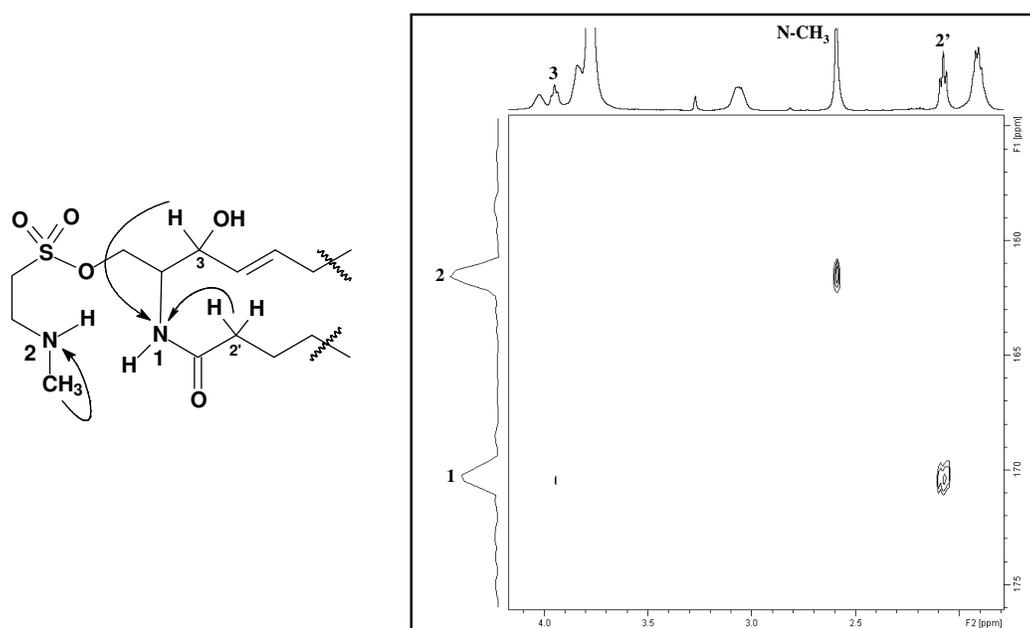


Figura 139: Expansão do espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{15}N – HMBC ($\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ 20%) de **P-9**

5.1.11 Determinação estrutural de P-11

A substância denominada **P-11** (8,5 mg) foi isolada a partir da cromatografia em gel de sílica da fração AcOEt, resultante da partição líquido-líquido do extrato etanólico (item 6.4.2.3, pág. 195). Este composto apresentou-se em forma de cristais e com ponto de fusão de 244 °C. Os espectros de massa de alta resolução (EMAR) (Fig. 142, pág. 144) no modo positivo mostrou um pico em m/z 127,0522 $[M + H]^+$ (calc. m/z 127,0507) e no modo negativo o pico em m/z 125,0359 $[M - H]^-$ (calc. 125,0351), indicando a fórmula molecular $C_5H_6N_2O_2$.

O espectro de RMN 1H (Fig. 141, pág. 163) mostrou somente dois singletos um em δ_H 7,27 e outro em 1,95 ppm, atribuídos a um hidrogênio de dupla ligação e um grupo metila, respectivamente.

O espectro de RMN ^{13}C -CPD (Fig. 143, pág.164) exibiu cinco sinais, sendo dois atribuídos a carbonos sp^2 (δ_C 109,1 e 138,1 ppm), dois de carbonilas de amida conjugadas (δ_C 166,5 e 153,5 ppm) e o sinal em δ_C 12,8 referente a um grupo metila.

A análise comparativa do espectro de RMN ^{13}C com o de RMN ^{13}C - DEPT 135° (Fig. 144, pág. 164) indicou apenas sinais para dois carbonos hidrogenados, um em δ_C 138,1 (CH) e outro em 12,8 (CH_3).

O espectro bidimensional 1H , ^{13}C - (HMBC) (Fig. 145, pág. 165) mostrou correlações a três ligações (3J) do hidrogênio em 7,27 ppm com os carbonos de carbonilas em 166,5 (C-1) e 153,5 (C-5) e ainda a correlação dos hidrogênios do grupo metila C-6 (δ_H 1,95) com o carbono sp^2 monohidrogenado em 138,1 (C-3) e o grupo carbonila (C-1) em 166,5, o qual nos permitiu propor a estrutura a seguir, confirmada pela comparação dos dados de RMN ^{13}C (Tabela 27), de nomenclatura 2-metil-timidina, um composto já citado na literatura.

Tabela 27: Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C de **P-11** (piridina- d_5) comparado com dados descritos na literatura para 2-metil-timidina (metanol- d_4) [PRETSCH *et al.*, 2000]

	P-11	2-metil-timidina
#C	δ_C (ppm)	
1	166,5	165,0
2	109,1	107,8
3	138,1	137,8
5	153,5	151,6
6	12,8	11,9

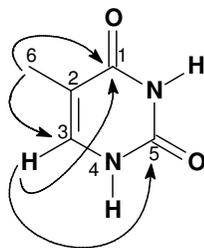


Figura 140: Estrutura e correlações 1H , ^{13}C - HMBC de **PC-11**

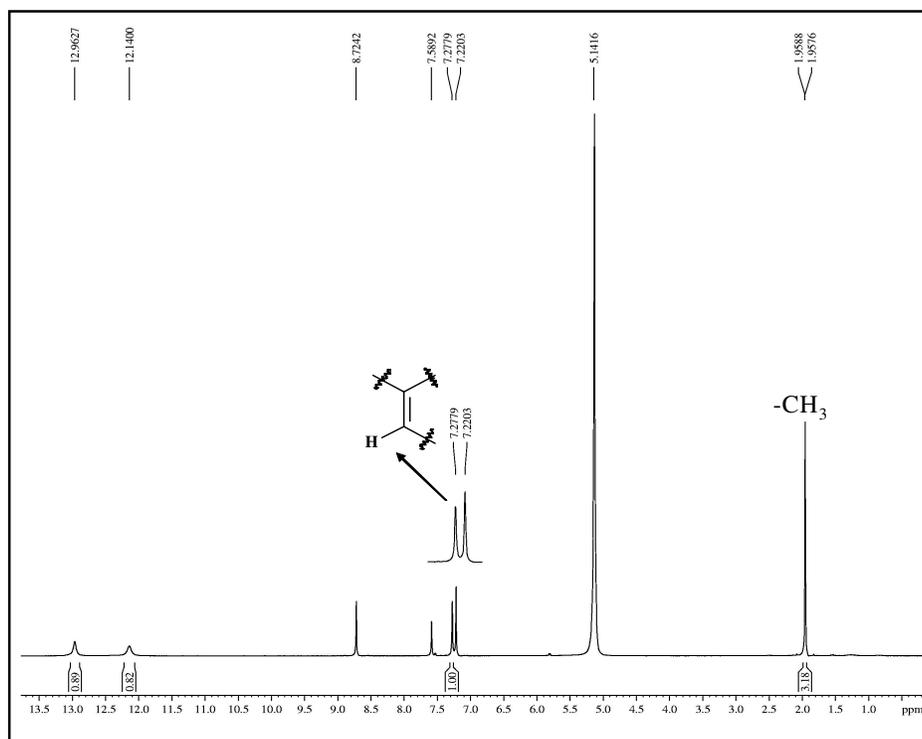


Figura 141: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, piridina- d_5) de **P-11**

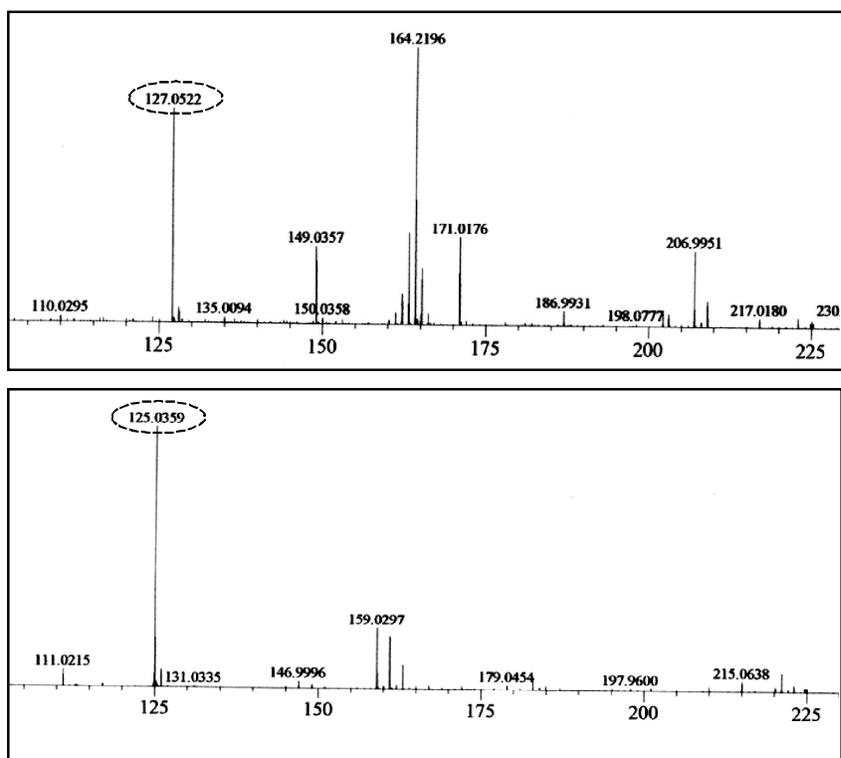


Figura 142: Espectros de massa $[\text{M} + \text{H}]^+$ e $[\text{M} - \text{H}]^-$ de **P-11**

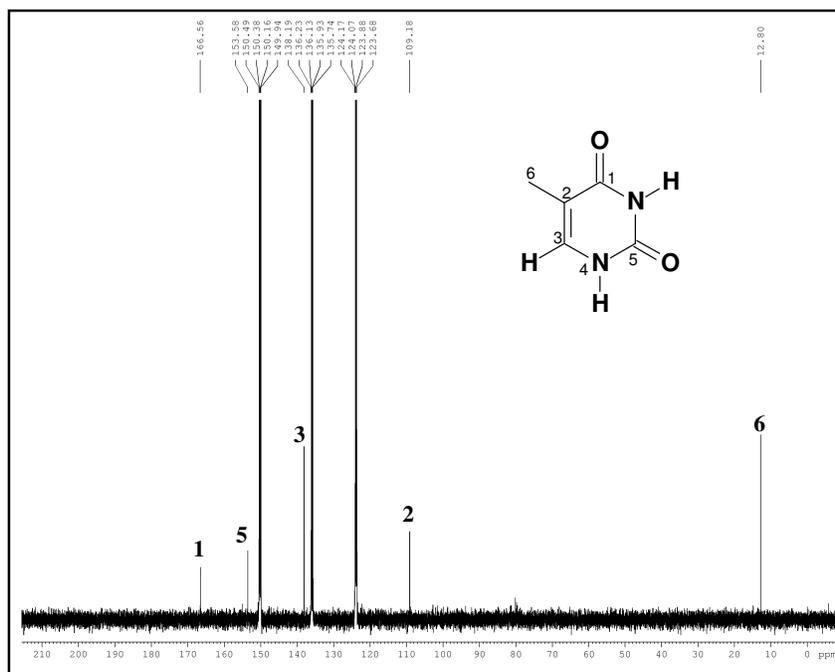


Figura 143: Espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, piridina- d_5) de P-11

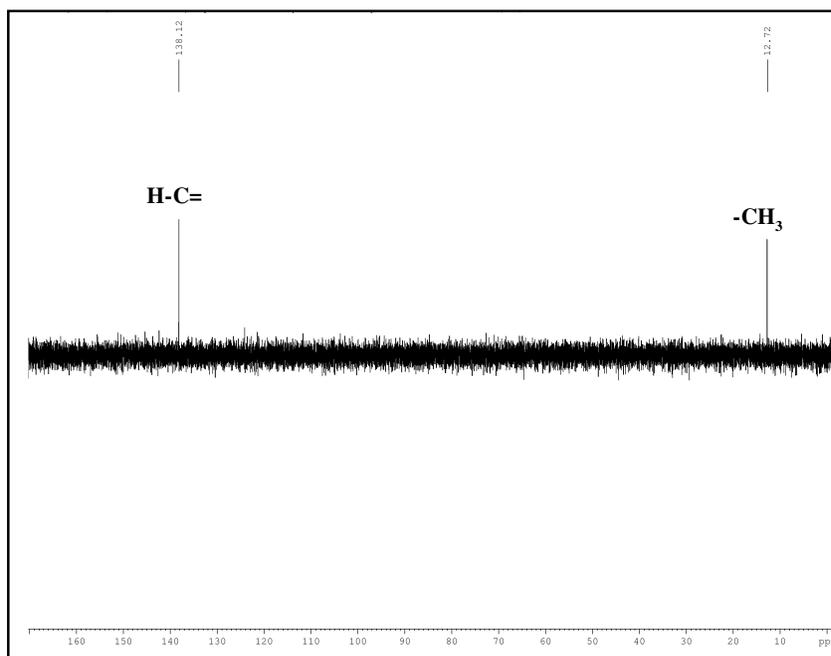


Figura 144: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, piridina- d_5) de P-11

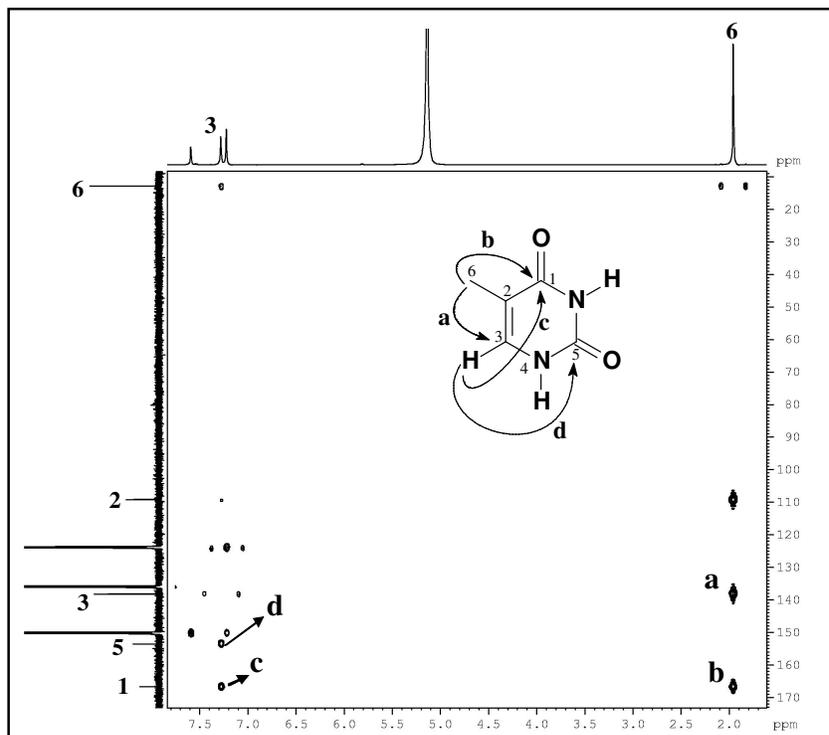


Figura 145: Espectro heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (500, 125 MHz, piridina- d_5) de **P-11**

5.2 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS DE *Protopalythoa variabilis*

5.2.1 Determinação estrutural de P-12

O fracionamento cromatográfico sobre gel de sílica do extrato hexânico de *P. variabilis* (item 6.5.1.3, pág. 199), possibilitou o isolamento de 373 mg de um sólido amorfo, denominado de **P-12**, com ponto de fusão 61,3 °C.

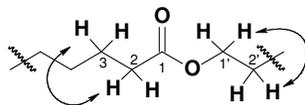
O espectro de IV (Fig. 149, pág. 168) mostrou absorções intensas em 2.916 e 2.848 cm^{-1} correspondentes a deformação axial assimétrica e simétrica de ligação C-H de grupamentos CH_2 e CH_3 , respectivamente, e uma absorção intensa em 1.732 cm^{-1} evidenciando a presença de carbonila, além destas, exibiu bandas em 1.220, 1.198 e 1.181 cm^{-1} de deformações axiais de ligações O-C-C, típicos de ésteres de ácidos graxos [SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000].

O espectro de massa de alta resolução (Fig. 148, pág. 167), apresentou um pico em m/z 383,3638 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calc. m/z 383,3889), indicando a seguinte fórmula molecular $\text{C}_{25}\text{H}_{50}\text{O}_2$.

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) (Fig. 150, pág. 168) mostrou um triplete em 4,05 (2H-1', 6,7 Hz) de hidrogênios ligados a carbono oxigenado, dois multipletos em 2,30 (2H-2) e 1,60 (4H-2' e 3), além destes, este espectro apresentou um sinal intenso e largo em 1,26 correspondentes a hidrogênios de uma cadeia alifática e um triplete em 0,88 ppm com integração para seis hidrogênios referente a dois grupos metilas.

O espectro de RMN ^{13}C (Fig. 151, pág. 169) exibiu um sinal em δ_{C} 174,2 ppm relativo a um grupo carbonila, enquanto, o sinal em δ_{C} 64,6 evidenciou a presença de um Csp^3 hidroxilado, além destes, observou-se sinais entre 34,6 e 22,9 ppm, que em comparação com o espectro de RMN DEPT 135° (Fig. 152, pág. 169), foram atribuídos a vários carbonos metilênicos de uma cadeia alifática.

No espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H - COSY (500 MHz, CDCl_3) (Fig. 153, pág. 170) foram visualizados os acoplamentos dos hidrogênios em δ_{H} 4,05 (H-1') e 2,30 (H-2) com os hidrogênios em δ_{H} 1,60 (H-2' e 3), como mostrado na subestrutura a seguir:



A determinação do número de átomos de carbono da cadeia alifática, foi determinada por CG/EM, através da análise do éster metílico obtido pela reação de transesterificação, em que 5 mg de **P-12** foram dissolvidos em 5 mL de CH₃OH/HCl 5% e mantido sob refluxo a 70 °C por 2h. A mistura reacional foi extraída com hexano (3 x 3 mL) e após evaporação do solvente submetida a análise em CG/EM. O cromatograma (Fig. 146) apresentou somente um sinal majoritário, cujo espectro de massa mostrou um pico em m/z 270 Daltons e padrão de fragmentação compatível com o hexadecanoato de metila.

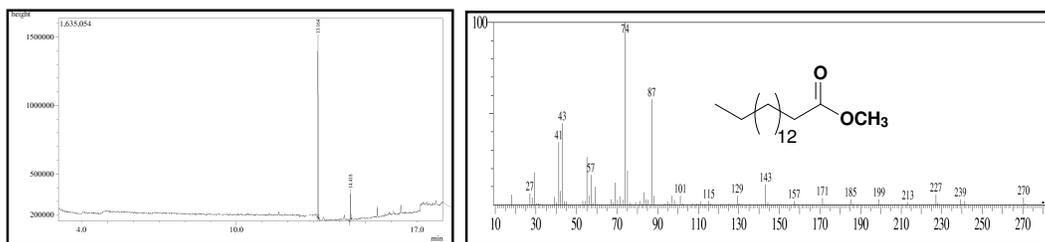


Figura 146: Cromatograma e espectro de massa do éster metílico de **P-12**

Este resultado quando combinado com a informação obtida no espectro de massa de alta resolução (m/z 383,3638, Fig. 148) permitiu determinar o tamanho da cadeia alifática deste composto em discussão, completando a estrutura de **P-12**, o qual trata-se do hexadecanoato de nonila (Fig. 147). Este composto apesar de já conhecido na literatura está sendo relatado pela primeira vez no gênero *Protopalythoa*. Não há relatos deste composto em espécies de zoantídeos, entretanto, Rahman e colaboradores (1999) mostram o isolamento do hexadecanoato de hexadecila, um composto bastante semelhante, no Zoantídeo *Spatoglossum variabile*

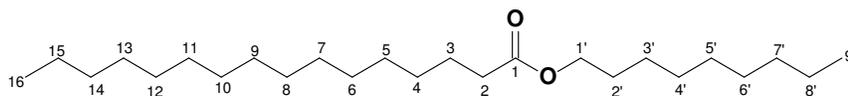


Figura 147: Estrutura de **P-12**

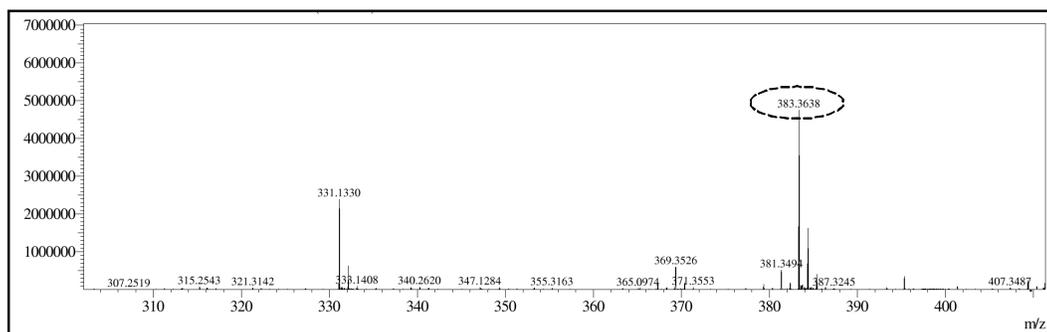


Figura 148: Espectro de massa de alta resolução $[M + H]^+$ de **P-12**

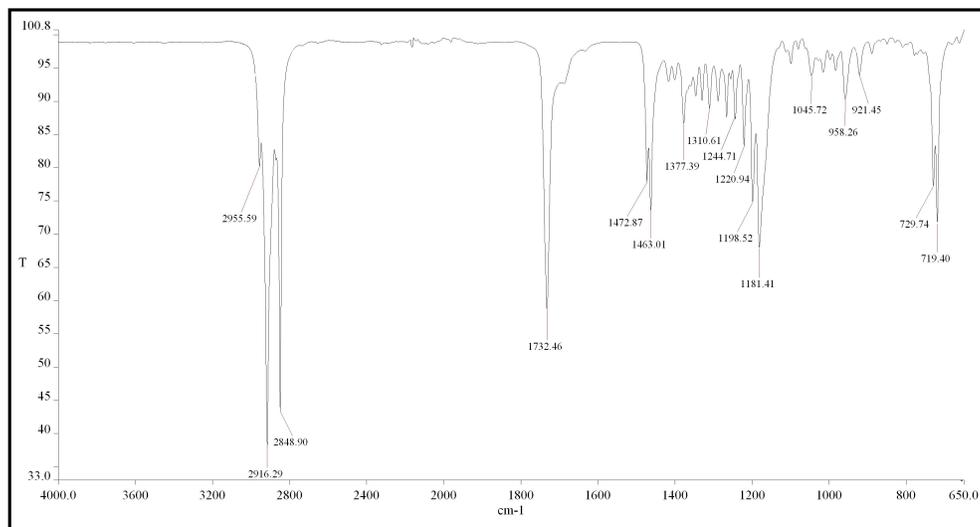


Figura 149: Espectro de infravermelho de P-12

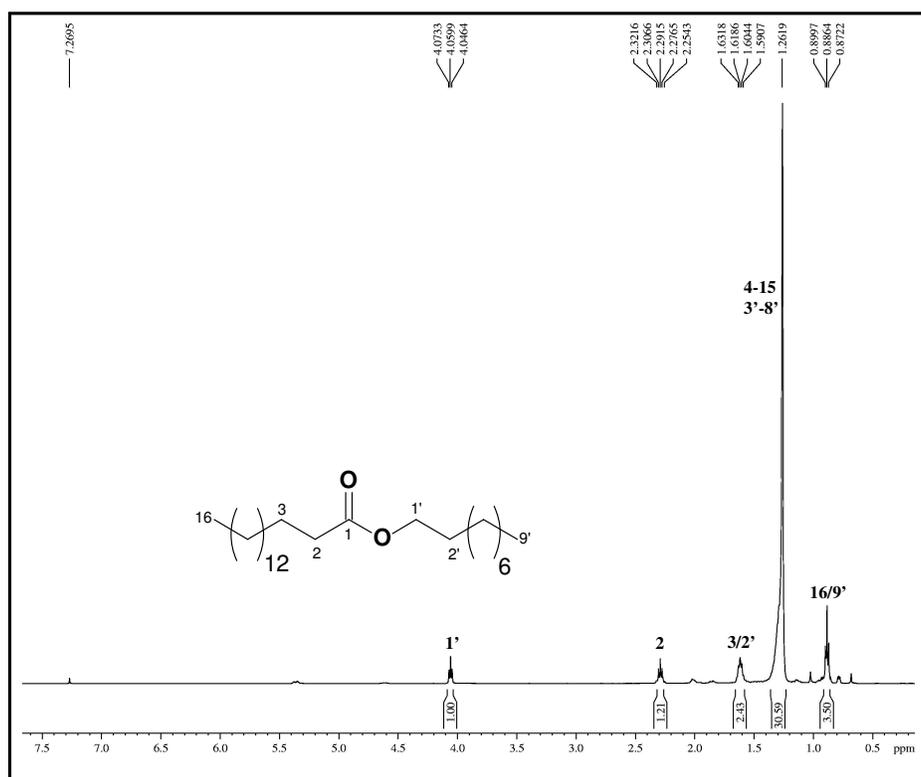


Figura 150: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de PC-12

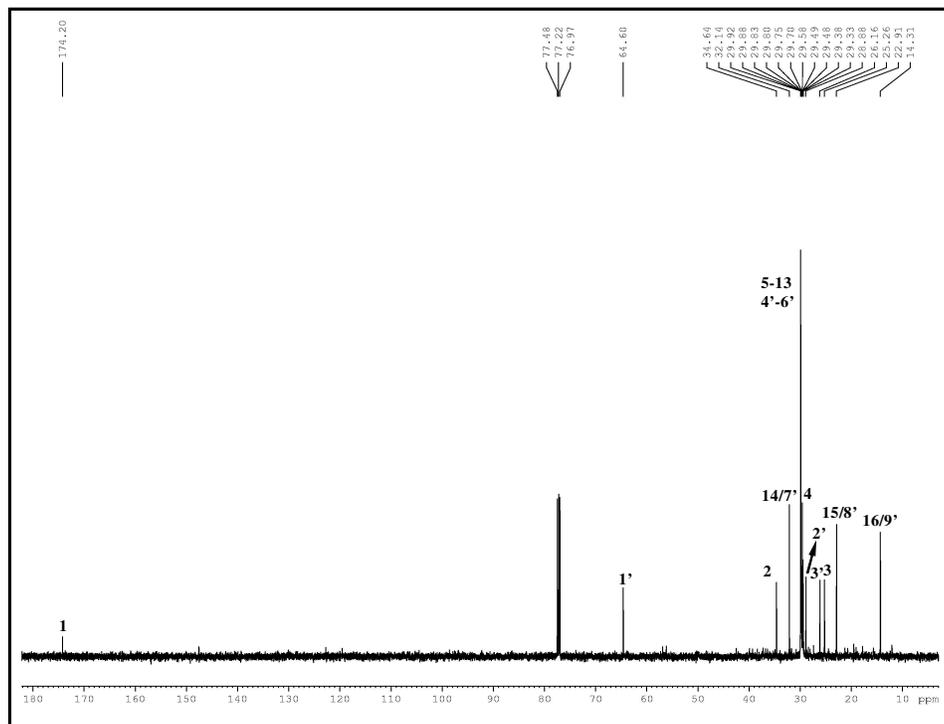


Figura 151: Espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, CDCl_3) de PC-12

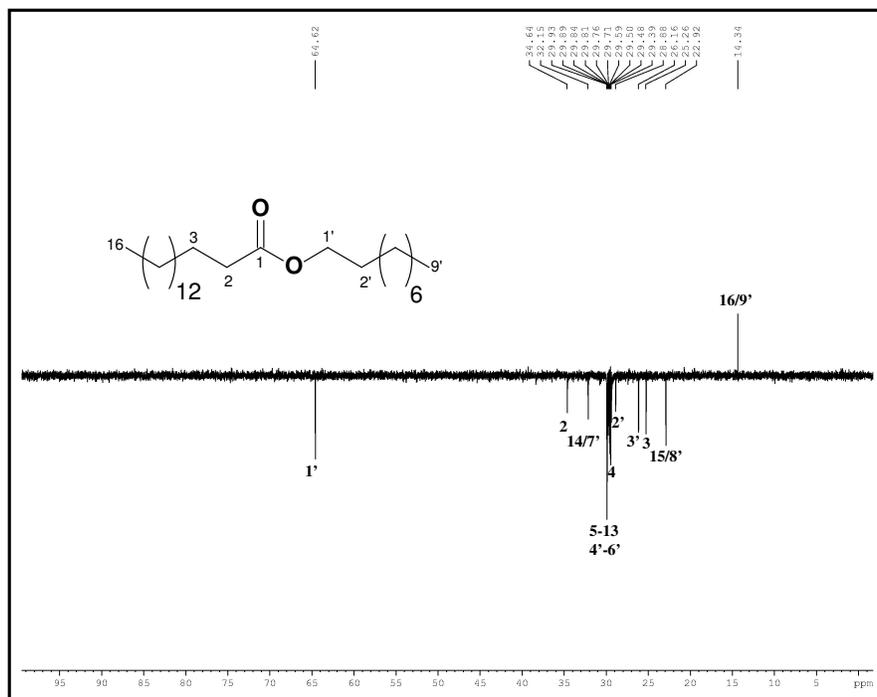


Figura 152: Espectro de RMN ^{13}C -DEP-135° (125 MHz, CDCl_3) de PC-12

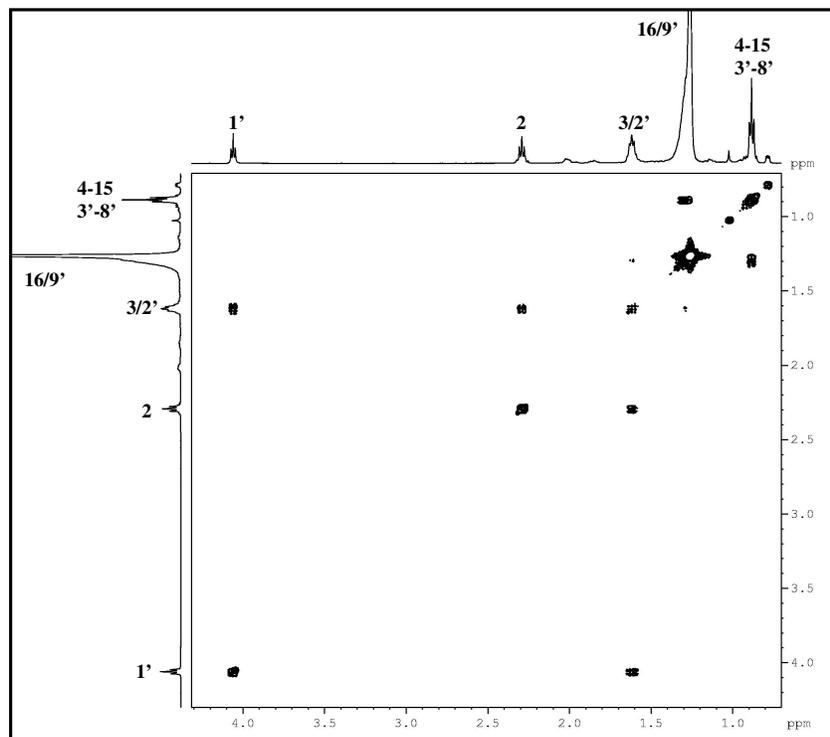


Figura 153: Espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY (500 MHz, CDCl_3) de **P-12**

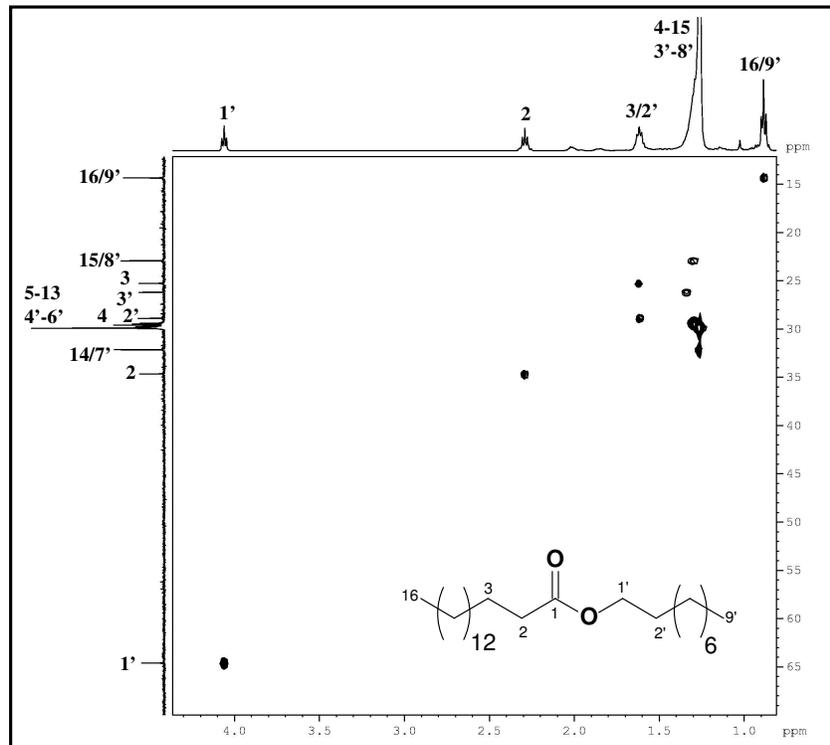


Figura 154: Espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC (500, 125 MHz, CDCl_3) de **P-12**

5.2.2 Determinação estrutural de P-13

Sucessivas cromatografias sobre gel de sílica da fração CH₂Cl₂/AcOEt 1:1 obtida do extrato hexânico de *P. variabilis* (item 6.5.1.8, pág. 202), resultou no isolamento de um sólido branco amorfo (**P-13**, 28,3 mg), com faixa de fusão 182-183°C e $[\alpha]_D^{20} = + 28$ (c = 0,056; CHCl₃).

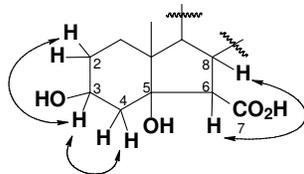
O espectro de IV (KBr) (Fig. 159, pág. 176) mostrou absorção em 3.492 cm⁻¹ de estiramento de ligação O-H. Bandas em 2.948 e 2.928 cm⁻¹ correspondentes a deformação axial assimétrica e simétrica de ligação C-H de grupos CH₂ e CH₃, absorção intensa em 1.711 cm⁻¹ de deformação axial C=O de ácido carboxílico e absorções em 1.152 e 1.081 cm⁻¹ de deformação axial C-O [SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000].

O espectro de massa de alta resolução (EMAR) (Fig. 160, pág. 176) operando no modo negativo exibiu um pico em m/z 447,3498 [M - H]⁻, condizente com a fórmula molecular C₂₈H₄₈O₄ (calculado m/z 447,3474).

A análise do espectro de RMN ¹H (Fig. 161, pág. 177) exibiu sinais referente a seis grupos metilas, sendo dois singletos em δ_H 0,69 e 0,96 e quatro dubletos com $J = 6,7$ Hz (0,77; 0,78; 0,84 e 0,92 ppm) evidenciando um esqueleto esteroidal, além destes, o espectro mostrou vários sinais sobrepostos entre 1,11 e 2,16, um dubleto em 2,27 ($J = 10$ Hz) e um singlete em 4,06 ppm de hidrogênio ligado a carbono carbinólico.

O espectro de RMN ¹³C (Fig. 162, pág. 177) mostrou 28 linhas espectrais. Entre estas, pôde-se destacar um sinal em δ_C 178,2 (C-7) confirmando a presença de um grupo carbonila de ácido carboxílico, previamente observado no IV, dois sinais em δ_C 82,9 (C-5) e 67,3 (CH-3), correspondentes a carbonos sp³ oxigenados, entre outros sinais na região de 58,7 a 12,7 ppm referente ao esqueleto esteroidal. A comparação dos espectros de RMN ¹³C e DEPT 135° (Fig. 163, pág. 178) permitiu determinar o padrão de hidrogenação referente a cada carbono: seis carbonos metílicos, nove carbonos metilênicos e metínicos e quatro não-hidrogenados, como observado na Tabela 28, página 172.

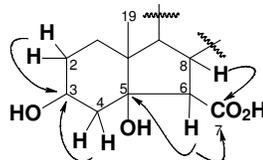
No espectro de correlação ¹H, ¹H - COSY (Fig. 164, pág. 178) foram visualizados os acoplamentos do hidrogênio em δ_H 4,06 (H-3) com os sinais em δ_H 1,62 (2H-2) e 2,13 (2H-4), assim como o acoplamento do hidrogênio em δ_H 2,27 (H-6) com o sinal em δ_H 2,09 (H-8). Estas informações com as de RMN ¹H, ¹³C e DEPT 135°, nos permitiu propor a subestrutura a seguir (Fig. 155, pág. 172), o qual mostra um anel de cinco membros no ciclo B no esqueleto esteroidal.

**Figura 155:** Subestrutura de **P-13****Tabela 28:** Padrão de hidrogenação de **P-13**

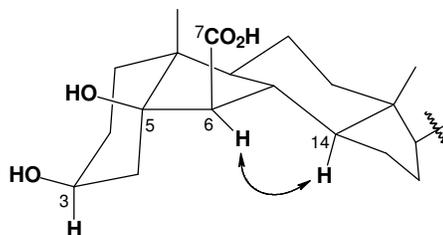
C	CH	CH ₂	CH ₃	Fórmula Molecular
178,2 (HO-C=O)	67,3 (C-OH)	43,7	20,7	
82,9 (C-OH)	58,7	39,8	19,3	
45,5	56,4	33,9	17,7	
44,8	55,6	30,7	17,7	
	51,4	28,5	15,6	
	42,7	28,4	12,7	
	39,2	28,2		
	36,2	24,2		
	31,6	21,6		
4 C, 2 OH, 1 O	9 CH, 1 OH	9 CH₂	6 CH₃	C₂₈H₄₈O₄, IDH 5

A análise do espectro ^1H , ^{13}C – HSQC, (Fig. 166, pág. 179) permitiu relacionar, de forma inequívoca, cada sinal de hidrogênio ao seu respectivo sinal de carbono.

Os dados observados no espectro ^1H , ^{13}C - HMBC (Fig. 168, pág. 180) apresentou várias correlações, os quais podemos destacar, a correlação dos hidrogênios em δ_{H} 2,27 e 2,09 (H-6 e 8) com a carbonila carboxílica em δ_{C} 178,2 (C-7), confirmando o ciclo B de cinco carbonos, os hidrogênios δ_{H} 1,62 e 2,13 (H-2 e 4) com o carbono em δ_{C} 67,3 (C-3), e ainda, o hidrogênio δ_{H} 2,27 (H-6) como o carbono hidroxilado em δ_{C} 82,9 (C-5) corroborando com a posição dos grupos hidroxila e carboxílico no esqueleto esteroidal, como mostrado na subestrutura a seguir.



O experimento NOESY (Fig. 165, pág. 179) revelou importante informação para determinação da estereoquímica do carbono C-6, através da interação dos hidrogênios H-14 e H-6, conferindo a posição β do carbono carboxílico na estrutura esteroidal, como mostrado na Figura ao lado.



A análise dos dados de IV, RMN (1D, 2D) e EMAR de **P-13** e em comparação com os dados da literatura com um esteróide de estrutura semelhante sintetizado por Scheinost e colaboradores (2009) (Fig. 156, pág. 173, Tabela 29, pág. 174), nos permitiu sugerir para **P-13** como sendo um esteróide de esqueleto ergostano constituído de um anel de cinco membros no ciclo B, de nome sistemático ácido 24(*R*)-B-norergostan-3 β -5 β -diol-6 β -carboxílico (Fig. 156), o qual está sendo relatado pela primeira vez na literatura. Apesar da formação destes esteróides com anéis de 6-5-6-5 carbonos, designados na literatura de B-noresteróides, serem incomuns na natureza, em 1998, Lin e colaboradores isolaram quatro esteróides (Fig. 158) deste tipo da espécie vegetal *Taiwania cryptomerioides*, os quais foram chamados de taiwaniasterols A-D. Estudos com espécies marinhas também retratam o isolamento de B-noresteróides, como por exemplo, os compostos nomeados de orostanal, obtido da esponja marinha *Stelletta hiwasaensis* [MIYAMOTO *et al.*, 2001] e o parguesterol A e parguesterol B (Fig. 157) ambos isolados da esponja marinha *Svenzea zeai* [WEI *et al.*, 2007].

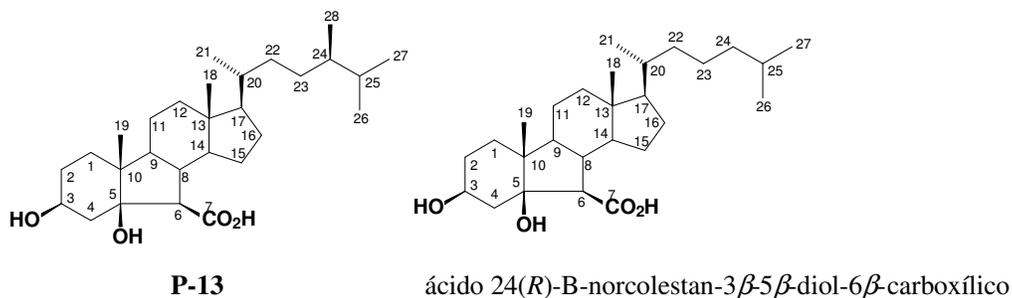


Figura 156: Estrutura de **P-13** e do esteróide semelhante isolado por Scheinost, 2009.

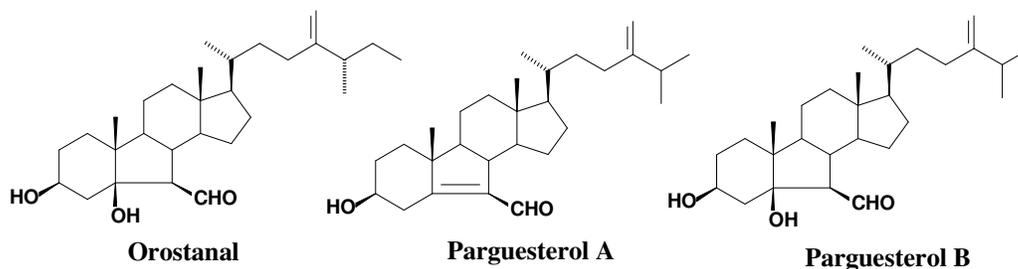


Figura 157: Esteróides isolados por MIYAMOTO *et al.*, 2001 e WEI *et al.*, 2007.

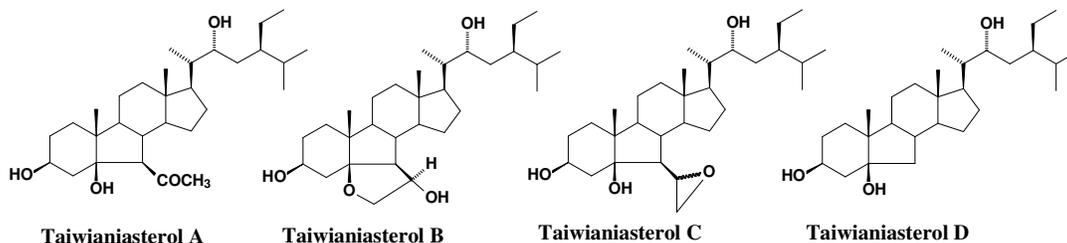


Figura 158: Esteróides isolados por Lin, 1998.

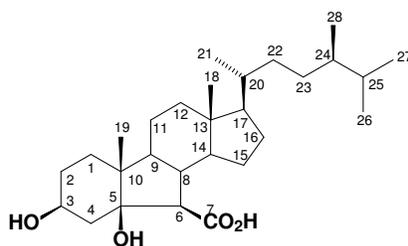


Tabela 29: Comparação entre os dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C -CPD de **P-13** (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) com os descritos na literatura para o esteróide ácido 24(*R*)-B-norcolestan-3 β -5 β -diol-6 β -carboxílico (CDCl_3 , 500 e 125 MHz) [SCHEINOST, *et al.*, 2009]

P-13		ácido 24(<i>R</i>)-B-norcolestan-3 β -5 β -diol-6 β -carboxílico	P-13	ácido 24(<i>R</i>)-B-norcolestan-3 β -5 β -diol-6 β -carboxílico
#C	δC		δH	
1	28,5	28,6	1,28; 1,85 (m)	
2	28,2	28,2	1,62; 1,64 (m)	
3	67,3	67,4	4,06 (s)	4,05 (m)
4	43,7	44,8	2,13-2,16; 1,68-1,71 (m)	
5	82,9	82,9	-	
6	58,7	58,4	2,27-2,29 (d, 10 Hz)	
7	178,2	178,0	-	
8	42,7	42,8	2,09-2,11 (m)	
9	51,4	51,5	1,16 (m)	
10	45,5	45,5	-	
11	21,6	21,7	1,68; 1,71 (m)	
12	39,8	39,8	1,11-1,13; 2,03-2,05 (m)	
13	44,8	44,8	-	
14	56,4	56,6	1,16 (m)	
15	24,2	24,3	1,51-1,53; 1,16-1,18 (m)	
16	28,4	28,4	1,36; 1,40 (m)	
17	55,6	55,9	1,11-1,13 (m)	
18	12,7	12,7	0,69 (s)	
19	19,3	18,9	0,96 (s)	
20	36,2	36,4	1,36 (m)	
21	17,7	17,7	0,92 (d, 6,7 Hz)	
22	33,9	35,8	1,38; 0,95 (m)	
23	30,7	24,9	1,36; 0,95 (m)	
24	39,2	39,7	1,18 (m)	
25	31,6	24,0	1,55 (m)	
26	20,7	22,7	0,84 (d, 6,7 Hz)	
27	17,7	23,0	0,78 (d, 6,7 Hz)	
28	15,6	-	0,77 (d, 6,7 Hz)	

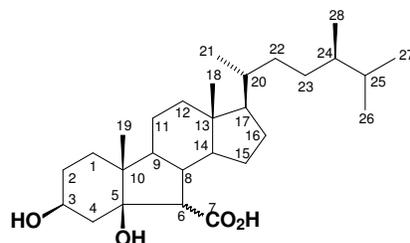


Tabela 30: Dados de RMN ^1H , ^{13}C e correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C (HSQC e HMBC, CDCl_3) de **P-13**

#C	HSQC		HMBC	
	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm)(multip, $J_{\text{H,H}}$)	#C	δ_{C} (ppm)
1	28,5	1,28; 1,85 (m)		0,96
2	28,2	1,62; 1,64 (m)		2,13-2,16
3	67,3	4,06 (s)		
4	43,7	2,13-2,16; 1,68-1,71 (m)		2,27-2,29
5	82,9	-	2,27-2,29	0,96
6	58,7	2,27-2,29 (d, 9,7 Hz)		
7	178,2	-	2,27-2,29	2,09-2,11
8	42,7	2,09-2,11 (m)		
9	51,4	1,16 (m)		0,96
10	45,5	-	2,16-2,13	
11	21,6	1,68; 1,71 (m)		
12	39,8	1,11-1,13; 2,03-2,05 (m)		0,69
13	44,8	-	0,68	
14	56,4	1,16 (m)		2,27-2,29; 0,69
15	24,2	1,51-1,53; 1,16-1,18 (m)		1,11-1,13
16	28,4	1,36; 1,40 (m)		
17	55,6	1,11-1,13 (m)		0,69; 0,92
18	12,7	0,69 (s)		
19	19,3	0,96 (s)		
20	36,2	1,36 (m)	0,92	
21	17,7	0,92 (d, 6,7 Hz)		
22	33,9	1,38; 0,95 (m)		0,92
23	30,7	1,36; 0,95 (m)		
24	39,2	1,18 (m)	0,84	0,78
25	31,6	1,55 (m)	0,77	0,84
26	20,7	0,84 (d, 6,7 Hz)		
27	17,7	0,78 (d, 6,7 Hz)		
28	15,6	0,77 (d, 6,7 Hz)		

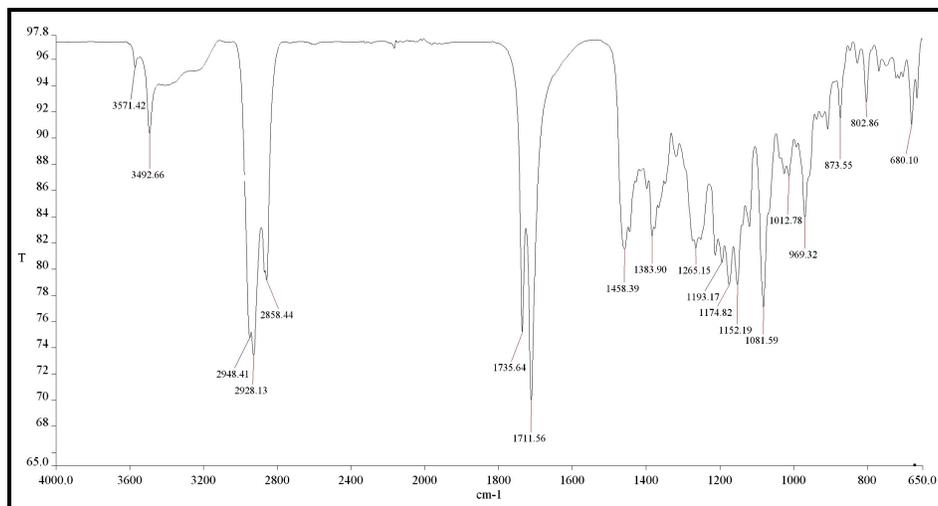


Figura 159: Espectro de infravermelho de **P-13**

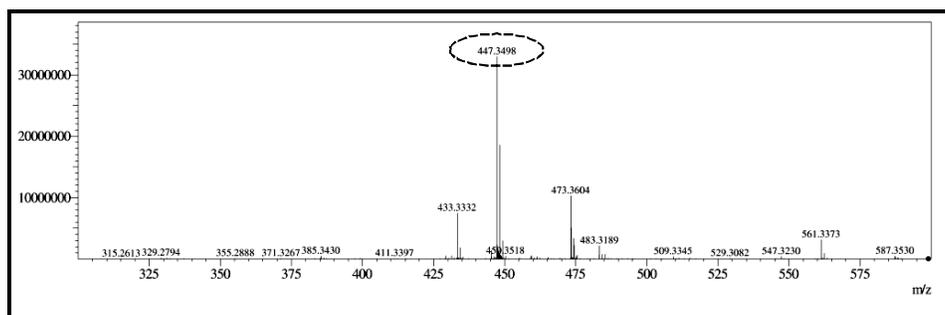


Figura 160: Espectro de massa de alta resolução [M – H]⁻ de **P-13**

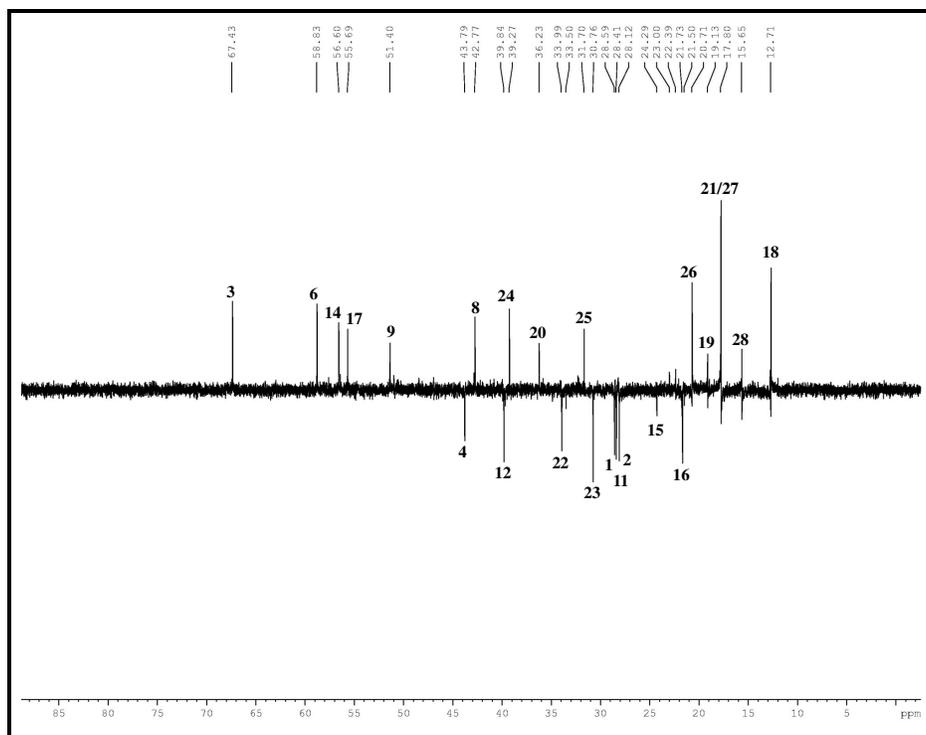


Figura 163: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de P-13

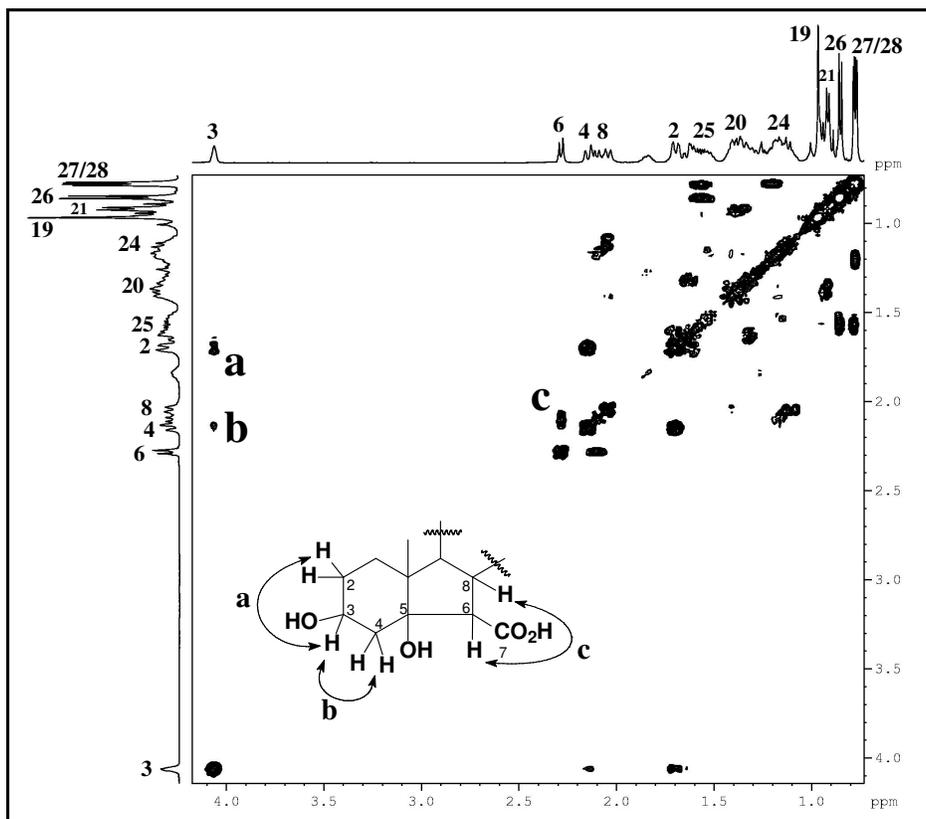


Figura 164: Espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H – COSY (500 MHz, CDCl_3) de P-13

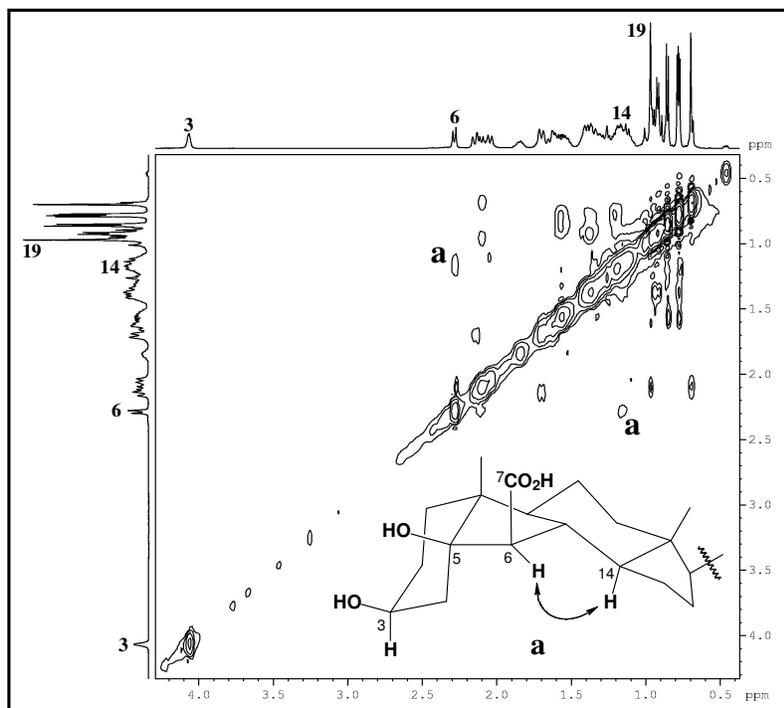


Figura 165: Espectro de correlação homonuclear ^1H , ^1H – NOESY (500 MHz, CDCl_3) de **P-13**

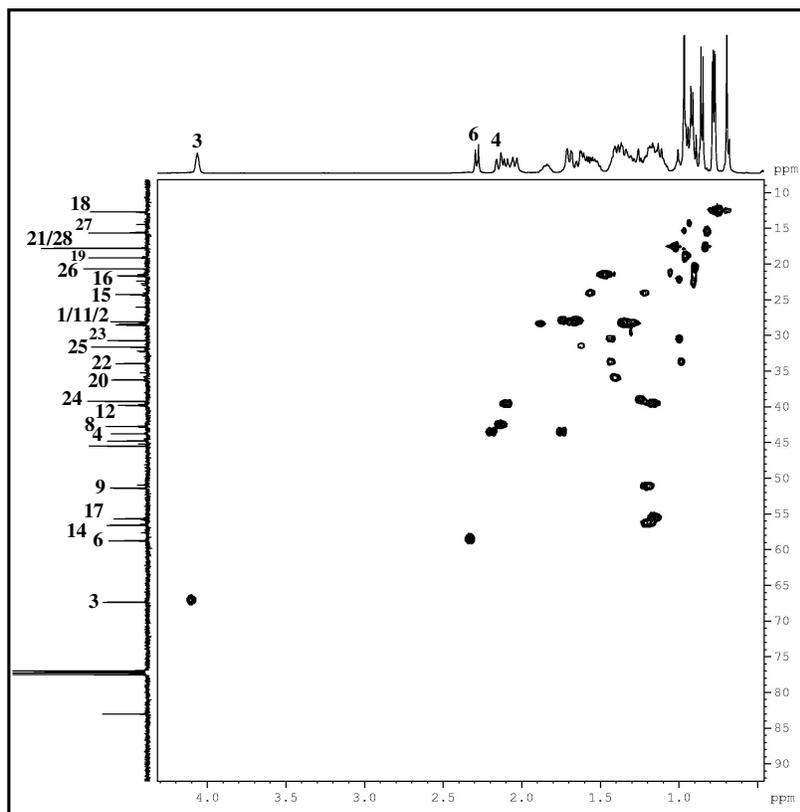


Figura 166: Espectro de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC (500, 125 MHz, CDCl_3) de **P-13**

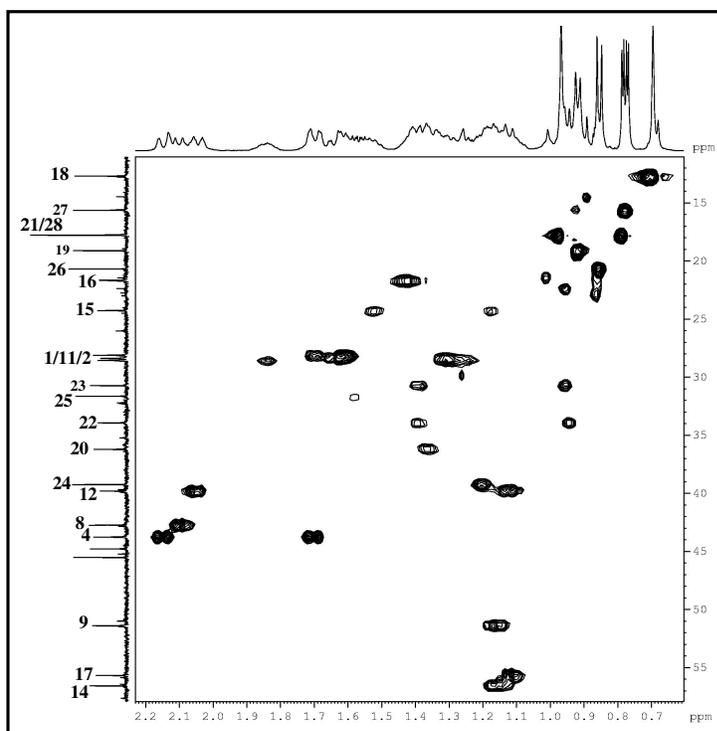


Figura 167: Expansão do espectro de correlação Heteronuclear ^1H , ^{13}C – HSQC (500, 125 MHz, CDCl_3) de **P-13**

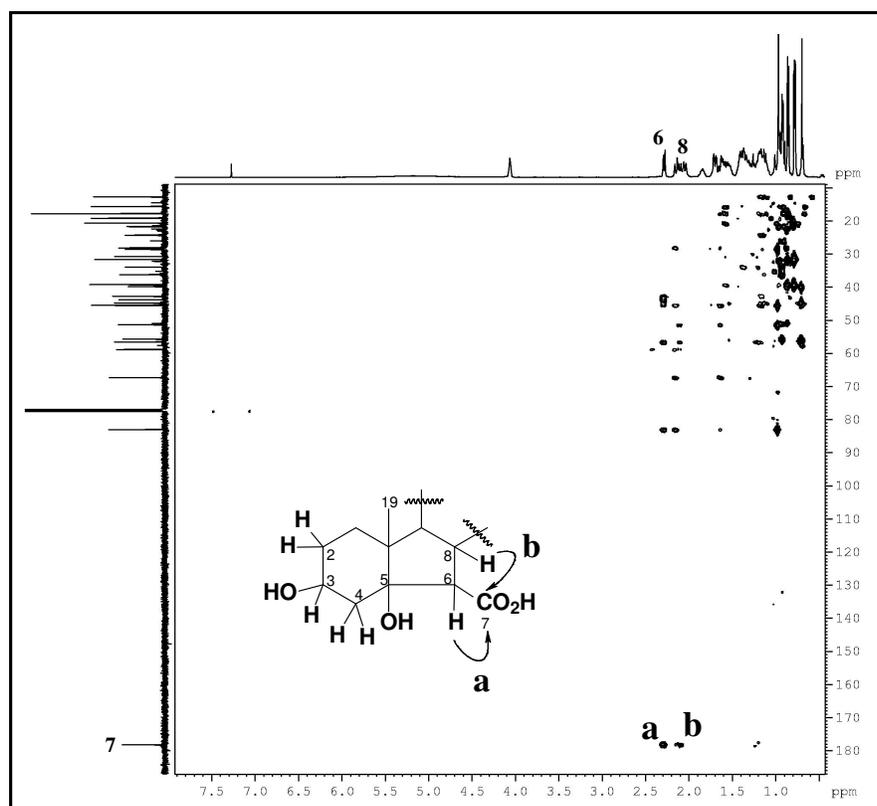


Figura 168: Espectro de correlação Heteronuclear ^1H , ^{13}C – HMBC (500, 125 MHz, CDCl_3) de **P-13**

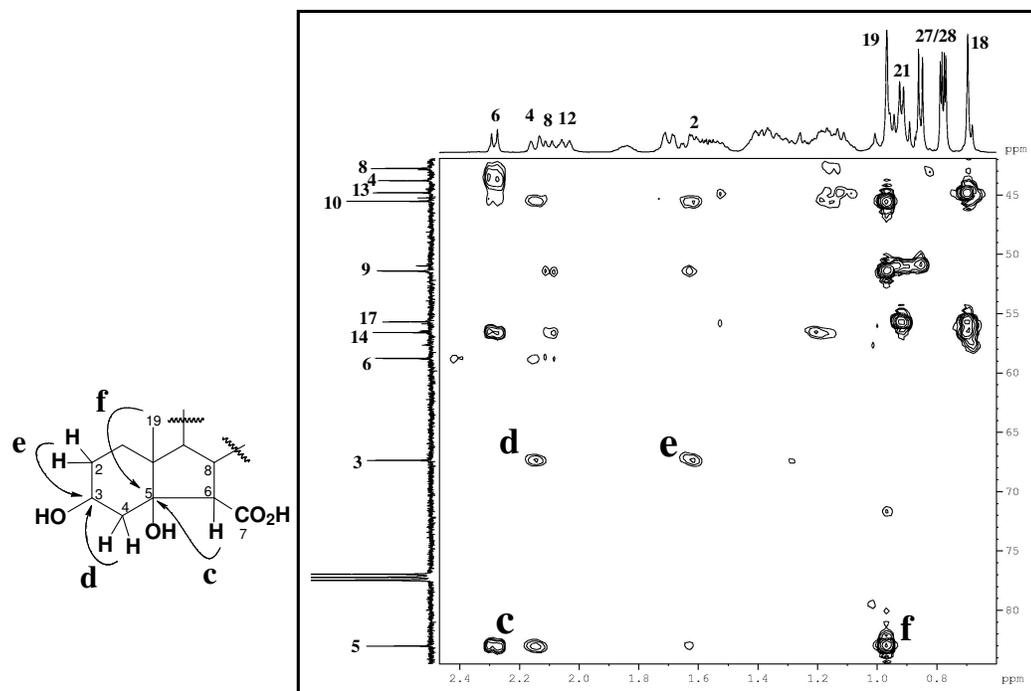


Figura 169: Expansão do espectro de correlação Heteronuclear ¹H, ¹³C – HMBC (500, 125 MHz, CDCl₃) de **P-13**

PARTE EXPERIMENTAL

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1 Métodos Cromatográficos

Os métodos cromatográficos se caracterizam pela passagem de uma fase móvel (solvente orgânico) sobre uma fase estacionária (SiO_2). As cromatografias de adsorção foram realizadas sobre coluna de gel de sílica 60 (Φ μm 63-200) e para cromatografia “flash” (Φ μm 40-63). A escolha do diâmetro da coluna foi feito em função da quantidade do extrato ou fração e da proporção dos componentes nela presentes. Os eluentes utilizados foram: hexano, diclometano, acetato de etila e metanol, puros ou combinados para formar soluções de polaridade crescente. Para cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizados gel de sílica 60 (Φ μm 2-25) aderido em cromatofolhas de alumínio com espessura de 0,20 mm. A revelação das substâncias em CCD foi obtida por aspersão com solução de vanilina ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$) e ácido perclórico (HClO_4) em etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), seguida de aquecimento em chapa aquecedora a 100°C por aproximadamente 3 minutos.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada em aparelho Shimadzu UFLC equipado com um detector UV-Vis com arranjo de diodos modelo SPD-M20A. As separações foram feitas usando uma coluna de fase reversa phenomenex[®] (4,6 x 250 mm, 5 μm), utilizando solvente grau HPLC (CH_3OH -MERCK) e adequadamente filtrado através de membranas de nylon com poros de 0,45 μm . As amostras foram dissolvidas nas fases móveis empregadas em cada análise e filtradas através de membranas de teflon com poros de 0,45 μm . As amostras foram eluídas com CH_3OH , adotando-se fluxos de 1mL/min (coluna analítica) e 4,72 mL/min (coluna semi-preparativa).

6.2 Métodos Físicos de Análise

6.2.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de próton (RMN ^1H) e de carbono 13 (RMN ^{13}C), uni e bidimensionais, foram obtidos no Centro Nordeste de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN), da Universidade Federal do Ceará, sob coordenação do Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira, em espectrômetros de marca Bruker modelo Avance DRX500, operando na frequência de hidrogênio a 500 MHz e na frequência do carbono 125 MHz.

Os solventes deuterados utilizados na dissolução das substâncias foram clorofórmio (CDCl_3), metanol (CD_3OD) e piridina ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) comercializados pelas

companhias ACROS, Cambridge Isotope Laboratories, Merck ou Aldrich. Os deslocamentos químicos (δ) expressos em ppm e referenciados para RMN ^1H pelos picos dos hidrogênios pertencentes às moléculas residuais não-deuteradas dos solventes utilizados: clorofórmio (7,27 ppm), metanol (3,31 ppm) e piridina (7,22; 7,58 e 8,73 ppm). Nos espectros de carbono-13, os deslocamentos químicos foram referenciados pelos picos centrais dos carbonos-13 dos solventes: clorofórmio (δ 77,23), metanol (δ 49,17) e piridina (δ 150,35; 135,91; 123,87).

Nos experimentos unidimensionais de ^1H e de ^{13}C foram estabelecidos os seguintes valores para os parâmetros de aquisição, respectivamente: larguras espectrais de 24 e 260 ppm, intervalo para relaxação de 1 s e largura de pulso de 90° de 9,60 μs (0 dB) e 10,90 μs (-3 dB) para ^1H e ^{13}C , respectivamente. Para todos os experimentos unidimensionais foram utilizados 65356 pontos para a aquisição e 32768 para o processamento, enquanto para os experimentos bidimensionais foram utilizados 2048 x 256 pontos para a matriz de dados de aquisição e 2048 x 1024 pontos para o processamento.

O padrão de hidrogenação dos carbonos foi determinado através da utilização da técnica RMN ^{13}C -DEPT 135° (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) e designados segundo a convenção: C (carbono não-hidrogenado), CH (carbono metínico), CH_2 (carbono metilênico) e CH_3 (carbono metílico). Os carbonos não-hidrogenados foram caracterizados pela subtração do espectro DEPT 135° com espectro de RMN ^{13}C -CPD.

6.2.2 Espectrometria de Massa (EM)

Os espectros de massa foram obtidos em espectrometria de massa Shimadzu, modelo QP-5050 A, acoplado a cromatógrafo de gás líquido, modelo GC-17^a, serie II (CG/EM), provido de coluna capilar apolar DB-1 (30,0m x 0,25mm x 0,25 μm), utilizando um gradiente de aumento de temperatura de 4,0 $^\circ\text{C}/\text{min}$. de 40 a 180 $^\circ\text{C}$ e 20 $^\circ\text{C}/\text{min}$. de 180 a 280 $^\circ\text{C}$, sendo a temperatura do injetor de 250 $^\circ\text{C}$ e a do detector de 280 $^\circ\text{C}$. Este equipamento encontra-se no Laboratório de Massa do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, sob coordenação da profa. Telma Leda Gomes de Lemos.

6.2.3 Espectrometria de Massa de Alta Resolução (EMAR)

Os espectros de massa de alta resolução foram obtidos no Laboratório de Espectrometria de Massa do Nordeste (LEMANOR) da Universidade Federal do Ceará sob coordenação da profa Otilia Deusdênia Loiola Pessoa. Todos os espectros foram adquiridos usando um espectrômetro de massa modelo LCMS-IT-TOF (*Liquid Chromatograph – Mass Spectrometry – Ion Trap - Time Of Flight*) (225-07100-34) - SHIMADZU, equipado com fonte de ionização por *electrospray*.

6.2.4 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetro Perkin-Elmer, modelo Spectrum 1000. Para a obtenção dos espectros das substâncias isoladas utilizou-se pastilhas de brometo de potássio (KBr). Este equipamento encontra-se no Laboratório de Infravermelho do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, sob coordenação da profa. Telma Leda Gomes de Lemos.

6.2.5 Rotação óptica

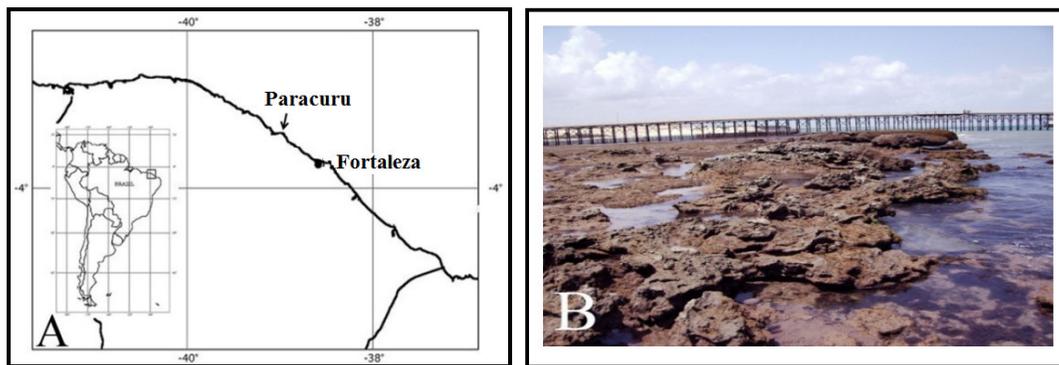
A determinação da rotação óptica foi realizada em um Polarímetro 341 da Perkin-Elmer, à temperatura de 25°C, o qual encontra-se disponível no Laboratório de Infravermelho do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, sob coordenação da profa. Telma Leda Gomes de Lemos.

6.2.6 Ponto de Fusão

O ponto de fusão foi determinado em aparelho digital, modelo MQAPF-302, da Microquímica[®]. A determinação da faixa de fusão foi realizada a uma taxa de aquecimento de 2°C/min.

6.3 Material Marinho

Os espécimes de *Palythoa caribaeorum* e *Protopalythoa variabilis* foram coletados manualmente durante a maré baixa na praia de Paracuru, litoral do Estado do Ceará, a 93 Km de Fortaleza (Fig. 170). O material foi inicialmente lavado em água do mar para redução de contaminantes e as colônias foram ensacadas e transportadas, sob resfriamento em gelo. Parte do material coletado foi imerso em etanol P.A e enviado para o Departamento de Zoologia da Universidade de São Paulo para identificação pelo Dr. Antonio Carlos Marques. O *voucher* do espécime (n^o 000975) encontra-se depositado no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MUZUSP).



Diego V. Wilke

Figura 170: Local de coleta, A – mapa indicando a posição do ponto de coleta, a praia de Paracuru relativa à capital Fortaleza e B, fotografia do local de coleta durante a maré baixa.

6.4 Isolamento dos constituintes químicos de *P. caribaeorum*

6.4.1 Preparação do extrato hexânico

Após coleta do material marinho, o mesmo foi cortado em pequenos pedaços ($\approx 1 \text{ cm}^3$), lavado com água destilada e seco ao sol e em seguida triturados mecanicamente resultando em 4,7 kg que foram submetidos à extração com hexano (6 L). A solução resultante foi filtrada e em seguida destilada a pressão reduzida em evaporador rotativo (*Buchi*[®], *Rotavapor II*), fornecendo 21,15 g de extrato hexânico (Fluxograma 2, pág. 197).

6.4.1.1 Fracionamento cromatográfico do extrato hexânico e isolamento do composto P-1

21,15 g de extrato hexano foram adsorvidos em 51,2 g de sílica, pulverizados em gral de porcelana e acondicionados sobre 108,8 g de gel de sílica em coluna de $\Phi = 7,0$ cm. O Fracionamento cromatográfico por eluições sucessivas com hexano, acetato de etila (AcOEt) e metanol (CH_3OH), resultou nas frações constantes na Tabela a seguir.

Tabela 31: Dados resultantes do fracionamento cromatográfico do extrato hexano

Eluente	Frações (50 mL cada)	Frações reunidas	Massa (g)
hexano	1-6	1-13	10,8
hexano/AcOEt 20%	7-16	14-23	3,68
hexano/AcOEt 40%	17-24	24-28	0,96
hexano/AcOEt 60%	25-27	29-36	1,14
hexano/AcOEt 80%	28-31	37-39	0,91
AcOEt	32-37	40	0,23
CH_3OH	38-40		

Nas frações 14 a 23 (Tabela 31) nota-se formação de precipitado branco, que através de análise por CCD e revelado com vanilina, mostrou somente uma mancha característica de composto puro. A estrutura deste composto foi elucidada através de análise dos dados espectrométricos e de comparação com os já descritos na literatura, o qual trata-se do esteróide campesterol.

6.4.1.2 Fracionamento cromatográfico da fração 24-28

A fração 24-28 (0,96 g) (Tabela 31) foi adsorvida em 3,13 g de sílica, pulverizada em gral de porcelana e submetida a cromatografia com 18,6 g de gel de sílica em coluna de $\Phi = 3$ cm. A eluição foi realizada com os solventes hexano, AcOEt e metanol, puros ou em misturas binárias com escala crescente de polaridade. Foram

coletadas 45 frações. Estas frações, após comparação em CCD, foram reunidas conforme descrito na Tabela 32 a seguir.

Tabela 32: Dados resultantes da cromatografia em coluna da fração 24-28

Eluente	Frações (10 mL cada)	Frações reunidas	Massa (mg)
hexano / AcOEt 30%	1-16	1-7	168,3
hexano / AcOEt 40%	17-31	8-13	230,8
hexano / AcOEt 50%	32-36	14-21	276,1
AcOEt	37-39	22-27	42,9
CH ₃ OH	40-45	28-45	182,0

6.4.1.3 Fracionamento cromatográfico da fração 8-13 e isolamento da substância P-2

A análise por CCD da fração 8-13 mostrou predominância de uma mancha de coloração azul, e foram submetidas à cromatografia tipo “flash”. 230,8 mg desta fração foi adsorvida em 710 mg de sílica tipo “flash”, pulverizados em gral de porcelana e cromatografados em 23,6 g em gel de sílica “flash” em coluna de $\Phi = 2,0$ cm, utilizando-se como eluente isocrático a mistura binária de CH₂Cl₂/AcOEt 30%. Foram coletadas 32 frações, e reunidas conforme análise CCD (Tabela 33). Nas frações 4 e 5, nota-se a formação de precipitado branco que apresentou uma única mancha em CCD mostrando-se puro e denominado de **P-2**.

Tabela 33: Dados resultantes da cromatografia “flash” da fração 8-13

Eluente	Frações (10 mL cada)	Frações reunidas	Massa (mg)
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt 30%	1-32	1-3	12,0
		4-5	15,9
		6-7	63,1
		8-32	107,1

6.4.1.4 Fracionamento cromatográfico da fração 29-36

A fração 29-36 (1,14 g, Tabela 31, pág. 187), foi pulverizada em gral sendo adsorvida em 3,58 g de sílica, e em seguida acondicionada sobre uma camada de 21,62 g de sílica gel, utilizada como fase estacionária em coluna cromatográfica ($\Phi = 3,5$ cm). Utilizou-se como eluentes: hexano e acetato de etila puros ou em misturas binárias e finalmente metanol. As frações foram eluídas variando-se a proporção entre os eluentes de maneira a obter resultado satisfatório. Foram coletadas 39 frações e analisadas em

cromatografia em camada delgada (CCD). As frações foram reunidas de acordo com a semelhança dos R_f (Tabela 34).

Tabela 34: Frações resultantes do tratamento cromatográfico da fração 29-36, Tabela 31, pág. 187.

Eluente	Frações (10 mL cada)	Frações reunidas	Massa (mg)
hexano/AcOEt 50%	1-12	1-10	237,7
hexano/AcOEt 60%	13-16	11-20	676,9
hexano/AcOEt 70%	17-22	21-39	115,1
hexano/AcOEt 80%	23-27		
hexano/AcOEt 90%	28-32		
AcOEt	33-38		
CH ₃ OH	39		

6.4.1.5 Tratamento cromatográfico da fração 11-20 e isolamento das substâncias P-4

A fração 11-20 com 676,9 mg, Tabela 34, foi adsorvida a 2,16 g de sílica, pulverizada em gral de porcelana e submetida a cromatografia com 22,21 g de gel de sílica em coluna de $\Phi = 3$ cm. A eluição foi realizada com os solventes hexano, AcOEt e metanol, puros ou em misturas binárias com escala crescente de polaridade. Foram coletadas 55 frações de 10 mL cada. Estas frações, após comparação em CCD, foram reunidas conforme descrito na Tabela 35 a seguir. Nas frações 18-23 foi observado um precipitado impuro com massa de 190,3 mg, este precipitado foi recromatografado em coluna tipo “flash” (item 6.4.1.6 pág. 190) levando ao isolamento do composto denominado de **P-3**. Nas frações 24 e 25 observa-se formação de sólido branco amorfo que após análise por CCD revelado em solução de vanilina, nota-se a presença de um único “spot” mostrando-se puro o qual foi denominado de **P-4**.

Tabela 35: Dados do tratamento cromatográfico da fração 11-20

Eluente	Frações (10 mL cada)	Frações reunidas	Massa (mg)
hexano/AcOEt 20%	1-8	1-17	6,3
hexano/AcOEt 30%	9-19	18-23	190,3
hexano/AcOEt 40%	20-37	24-25	39,1
hexano/AcOEt 50%	38-44	26-35	125,5
hexano/AcOEt 60%	45-49	36-45	146,7
AcOEt	50-53	46-55	107,5
CH ₃ OH	54-55		

6.4.1.6 Isolamento do composto P-3

190,3 mg da fração 18-23 (Tabela 35, pág. 189) foram adsorvidos a 724 mg de sílica “flash”, pulverizados em gral de porcelana e cromatografados em 25,02 g em gel de sílica “flash” acondicionados em coluna de $\Phi = 2,5$ cm, utilizando-se como eluente a mistura binária de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ 30%. Foram coletadas 41 frações, como mostrado na Tabela 36 a seguir.

Tabela 36: Dados resultantes da cromatografia “flash” da fração 18-23, Tabela 35.

Eluente	Frações Obtidas (10 mL cada)	Frações reunidas	Massa (mg)
$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ 30%.	1-41	1-14	8,5
		15-32	116,9
		33-41	28,8

As frações 15 a 32 após evaporação do solvente à temperatura ambiente mostraram-se como sólido branco amorfo. A análise em CCD revelada com solução de vanilina revelou uma mancha de mesmo R_f e característico de composto puro, em seguida foram reunidas e denominadas de **P-3**. Este composto apresentou ponto de fusão de $62,5$ °C e comparando seus dados espectroscópicos com os já descritos na literatura, foi identificado como sendo o 1-*O*-hexadecilglicerol.

6.4.1.7 Fracionamento cromatográfico da fração 36-45 e isolamento do composto P-5 e P-6

A fração 36-45 (146,7 mg, Tabela 35, pág. 189) apresentou-se como sólido amorfo esbranquiçado que foi recristalizado em metanol resultando em 112,0 mg. A análise por CCD revelou apenas uma mancha de coloração azul indicativo de um composto puro. Entretanto, o espectro de massa de alta resolução (EMAR), obtido com ionização por *eletrorspray* e no modo negativo, mostrou dois picos intensos com duas unidades de massas de diferença indicando para esta fração uma mistura de dois compostos, o qual foi submetido à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

1,0 mg da fração 36-45 (Tabela 35) foi dissolvida em 1,0 ml de metanol, filtrado num sistema manual com filtros de $0,45$ μm e analisada em CLAE, em coluna analítica (Phenomenex[®] C-18) operando no modo reverso, utilizando fase estacionária de octadecilsilano de sílica ($\Phi = 1,0$ cm) e loop de 20 μl . A análise preliminar sugeriu um método com resolução para separação cromatográfica, utilizando eluição isocrática

com metanol num fluxo de 1 mL/min e temperatura 40 °C. Este método analítico foi reproduzido em coluna semi-preparativa (Phenomenex[®]) operando no modo reverso com fase estacionária de octadecilsilano (C₁₈) ($\Phi = 4,5$ cm), provida de um loop de 200 μ l e temperatura 40 °C.

Desta forma, uma alíquota de 80 mg (F: 36-45, Tabela 35) da amostra foi diluída em 16 mL de metanol, filtrada num sistema manual com filtros de 0,45 μ m e a solução injetada na coluna em alíquotas de 200 μ L sob fluxo de 4,72 mL de metanol por minuto, revelando dois picos com tempos de retenção de 8,2 e 9,1 min. numa faixa de comprimento de onda de 215 a 400 nm, referente aos dois compostos. Após injeção de todo material o solvente foi evaporado sob pressão reduzida, fornecendo 37,1 e 17,8 mg de dois compostos nomeados de **P-5** e **P-6** (Fig. 171).

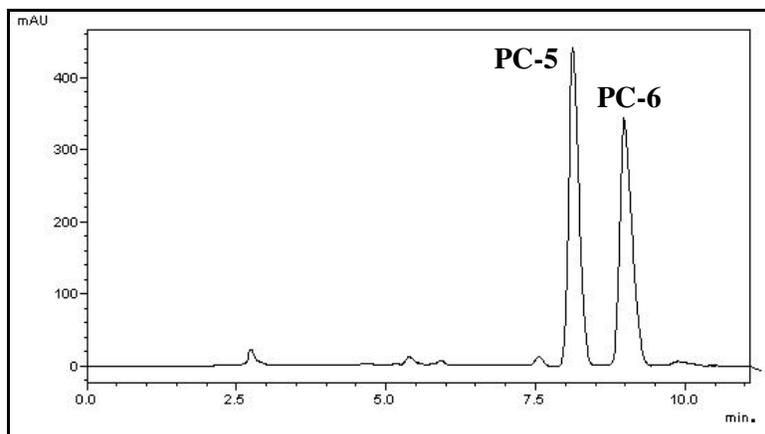


Figura 171: Cromatograma da fração 36-45, Tabela 35.

6.4.1.8 isolamento do composto P-7

107,5 mg da fração 46-55 (Tabela 35, pág. 189), observou-se a formação de precipitado branco amorfo, insolúvel em AcEOt, que após sucessivas adições deste solvente seguida de filtração, foi possível obter 31,5 mg do referido composto que após análise em CCD pulverizado com solução vanilina, mostrou-se puro o qual foi denominado de **P-7**.

6.4.1.9 Tratamento cromatográfico da fração 40 e isolamento das substâncias P-8 e P-9

A fração 40 (230,2 mg) (Tabela 31, pág. 187) foi misturada a 760 mg de sílica, pulverizada em gral de porcelana e submetida a cromatografia com 15,2 g de gel de sílica em coluna de $\Phi = 3$ cm. A eluição foi realizada com os solventes CH_2Cl_2 e metanol, puros ou em misturas binárias com escala crescente de polaridade. Foram coletadas 38 frações. Estas frações, após comparação em CCD, foram reunidas conforme descrito na Tabela 37 a seguir.

Tabela 37: Dados resultantes da cromatografia em coluna da fração 40

Eluente	Frações (10 mL cada)	Frações reunidas	Massa (mg)
CH_2Cl_2	1-4	1-9	4,1
$\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{CH}_3\text{OH}$ 10%	5-13	10-14	36,2
$\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{CH}_3\text{OH}$ 20%	14-19	15-17	14,6
$\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{CH}_3\text{OH}$ 30%	20-25	18-28	17,9
$\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{CH}_3\text{OH}$ 40%	26-29	29-38	137,2
$\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{CH}_3\text{OH}$ 50%	30-37		
CH_3OH	38		

Nas frações 29 a 38 (137,2 mg, Tabela 37) observa-se formação de sólido branco amorfo que após análise por CCD revelado em solução de vanilina, nota-se a presença de um único “spot” característico de composto puro. Este sólido foi submetido a análise de massa de alta resolução (EMAR), operando com ionização por *electrospray* no modo negativo, o resultado mostrou dois picos intensos com duas unidades de massas de diferença indicando para esta fração uma mistura de dois compostos, o qual foi submetido à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando o mesmo método descrito no item 6.4.1.7, pág. 190.

Este método analítico foi reproduzido em coluna semi-preparativa (Phenomenex[®]) operando no modo reverso com fase estacionária de octadecilsilano (C_{18}) ($\Phi = 4,5$ cm), provida de um loop de 200 μl e temperatura 40 °C.

Uma alíquota de 95 mg (F: 29-38, Tabela 37) da amostra foram diluídas em 20 mL de metanol, filtrado num sistema manual com filtros de 0,45 μm e a solução injetada na coluna em alíquotas de 200 μL sob fluxo de 4,72 mL de metanol por minuto e temperatura de 40°C, revelando dois picos com tempos de retenção de 8,0 e 9,0 min. (comprimento de onda 215-400 nm) referente aos dois compostos. Após injeção de todo

material o solvente foi evaporado sob pressão reduzida, fornecendo 35,6 e 28,3 mg, nomeados de **P-8** e **P-9** (Fig. 172).

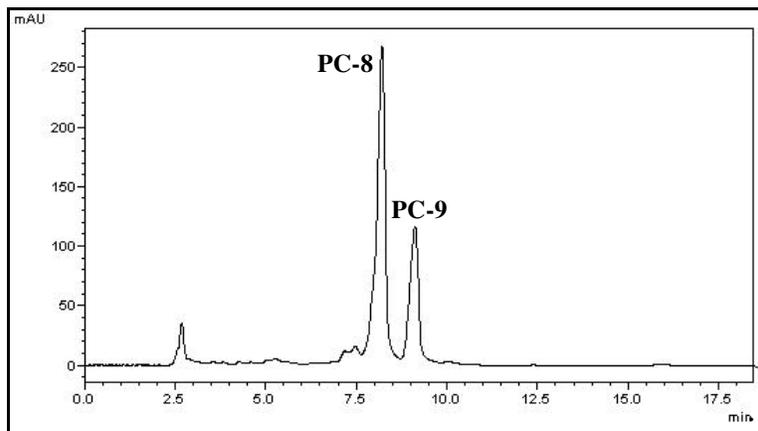


Figura 172: Cromatograma da fração 29-38, Tabela 37, pág. 173.

6.4.2 Preparação do extrato etanólico

Após extração com hexano, do material marinho (4,7 kg) (item 6.4.1, pág. 187), foi submetido à extração com etanol. A solução resultante foi filtrada e em seguida destilada a pressão reduzida, fornecendo 61,73 g de extrato etanólico (Fluxograma 2, pág. 197).

6.4.2.1 Cromatografia de partição do extrato etanólico

61,73 g deste extrato foram dissolvidos em 180 mL de metanol e 50 mL de água destilada, em seguida iniciou-se a partição com o solvente CH_2Cl_2 e AcOEt, resultando nas frações constantes na Tabela 38.

Tabela 38: Dados resultantes da cromatografia de partição do extrato etanólico.

Eluente (250 mL cada)	Massa (g)
CH_2Cl_2	11,59
Acetato de etila	3,63
hidroalcoólico	~40,0

11,59 g da fração CH_2Cl_2 (Tabela 38) foram misturados a 28,77 g de sílica, pulverizados em gral de porcelana e cromatografados sobre 82,01 g de gel de sílica em coluna de $\Phi = 7,0$ cm. A eluição foi realizada com os solventes hexano, hexano/AcOEt 25%, hexano/AcOEt 50%, hexano/AcOEt 75%, AcOEt e metanol. Os dados encontram-se distribuídos na Tabela 32 a seguir.

Tabela 39: Dados resultantes do fracionamento cromatográfico da fração CH_2Cl_2

Eluente (~ 350 mL cada)	Massa (g)
hexano	0,033
hexano / AcOEt 25%	0,139
hexano / AcOEt 50%	1,254
hexano /AcOEt 75%	1,734
AcOEt	0,30
metanol	6,89

6.4.2.2 Tratamento cromatográfico da fração AcOEt e isolamento de P-10

A fração AcOEt (0,30 g) (Tabela 39) foi misturada a 962 mg de sílica, pulverizada em gral de porcelana e submetida a cromatografia com 7,72 g de gel de sílica em coluna de $\Phi = 2$ cm. A eluição foi realizada com a mistura dos solventes hexano e AcOEt com escala crescente de polaridade. Foram coletadas 39 frações. Estas

frações, após comparação em CCD, foram reunidas conforme descrito na Tabela 40 a seguir.

Tabela 40: Dados do fracionamento cromatográfico da fração AcOEt, Tabela 32:

Eluente	Frações (10 mL cada)	Frações reunidas	Massa (mg)
hexano / AcOEt 10%	1	1-8	68,0
hexano / AcOEt 20%	2-4	9-14	15,9
hexano / AcOEt 30%	5-9	15-19	33,8
hexano / AcOEt 40%	10-12	20-32	88,1
hexano / AcOEt 50%	13-17	33-39	102,4
hexano / AcOEt 60%	18-23		
hexano / AcOEt 70%	24-28		
hexano / AcOEt 80%	29-32		
AcOEt	33-39		

88,1 mg da fração 20-32 (Tabela 40), observou-se a formação de precipitado branco amorfo, insolúvel em AcEOt, que após sucessivas adições deste solvente seguida de filtração, foi possível obter 29,9 mg do referido composto que após análise em CCD pulverizado com solução vanilina, mostrou-se puro o qual foi denominado de **P-10**.

6.4.2.3 Fracionamento cromatográfico da fração AcOEt e isolamento de P-11

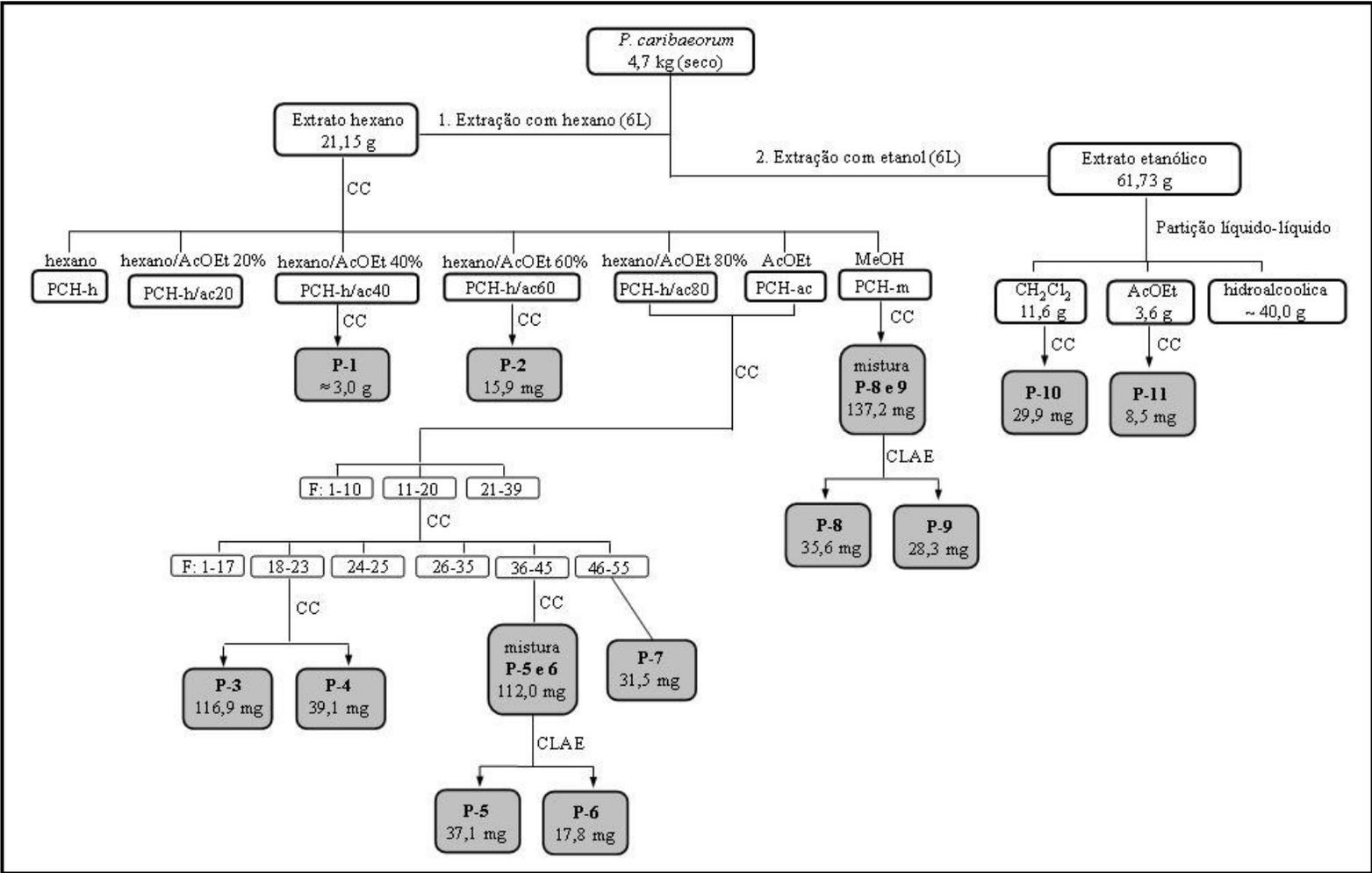
2,0 g da fração AcOEt (Tabela 38, pág. 194), resultante da partição do extrato etanólico, foi misturada a 6,6 g de sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada em 29,0 g de gel de sílica em coluna ($\Phi = 5$ cm). A eluição foi realizada com os solventes hexano, AcOEt e metanol puros ou em mistura binária com escala crescente de polaridade. As frações foram coletadas em volume de 30 mL cada e, após análise comparativa por CCD, reunida conforme descrito na Tabela 41 a seguir.

Tabela 41: Dados resultantes do fracionamento cromatográfico da fração AcOEt, Tabela 38 da página 194:

Eluente	Frações (30 mL cada)	Frações reunidas	Massa (mg)
hexano / AcOEt 50%	1-4		
hexano / AcOEt 75%	5-9	1-2	108,3
AcOEt	10-16	3-7	124,3
AcOEt / CH ₃ OH 5%	17-19	8-13	136,4
AcOEt / CH ₃ OH 10%	20-23	14-22	94,5
AcOEt / CH ₃ OH 50%	24-28	23-26	98,7
CH ₃ OH	29-33	27-33	1.312

Nas frações 23-26 (98,7 mg) apresentou um precipitado branco que, após ser lavado com CH₃OH, forneceu cristais branco (8,5 mg), homogêneo em CCD. Este composto não apresentou solubilidade com os solventes hexano, CH₂Cl₂, AcOEt e metanol, sendo solúvel em piridina.

Fluxograma 2: Síntese do procedimento para o isolamento dos compostos **P-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e P-11** de *P. caribaeorum*



6.5 Isolamento dos constituintes químicos de *P. variabilis*

6.5.1 Preparação do extrato hexânico

Após coleta do material marinho, o mesmo foi cortado em pequenos pedaços ($\approx 1 \text{ cm}^3$), lavado com água destilada e seco ao sol e em seguida triturados mecanicamente resultando em 3,4 kg e submetidos à extração com hexano (6 L). A solução resultante foi filtrada e em seguida destilada a pressão reduzida em evaporador rotativo (*Buchi*[®], *Rotavapor II*), fornecendo 19,8 g de extrato hexânico (Fluxograma 03, pág. 207).

6.5.1.1 Fracionamento cromatográfico do extrato e isolamento do composto PV-1

19,8 g de extrato hexano foram adsorvidos em 51,2 g de sílica, pulverizados em gral de porcelana e acondicionados sobre 87,5 g de gel de sílica em coluna de $\Phi = 5,0$ cm. O fracionamento cromatográfico por eluições sucessivas com hexano, diclorometano (CH_2Cl_2), acetato de etila (AcOEt) e metanol (CH_3OH), puros ou em mistura binária, o qual resultou nas frações constantes na tabela a seguir.

Tabela 42: Dados resultantes do fracionamento cromatográfico do extrato hexano

Eluente	Frações (50 mL cada)	Massa (g)
hexano	1-5	3,2
hexano/ CH_2Cl_2 50%	6-15	4,3
CH_2Cl_2	16-24	6,2
CH_2Cl_2 /AcOEt 50%	25-31	3,2
AcOEt	32-36	0,7
CH_3OH	37-41	1,4

Na fração CH_2Cl_2 (F: 16-24, Tabela 42) nota-se formação de grande quantidade de precipitado branco, que através de análise por CCD e revelado com vanilina, mostrou uma mancha de coloração azul, e quando comparado com o composto **P-1** apresentou mesmo R_f . A comparação dos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C de **PV-1** e **P-1** mostrou mesmo deslocamentos químicos, confirmando a estrutura deste composto, como sendo o esteróide de nome usual campesterol, previamente isolado da espécie *P. caribaeorum* em estudo.

6.5.1.2 Fracionamento cromatográfico da fração hexano

A fração hexano 3,2 g (F: 1-5, Tabela 42, pág. 198) foi submetida à cromatografia com gel de sílica em coluna cromatográfica ($m_{\text{sílica}} = 11,4$ g, $\Phi = 5$ cm), utilizando os solventes descritos na Tabela 43. As frações obtidas foram reunidas, após análise por CCD, resultando em quatro novas frações.

Tabela 43: Dados resultantes do fracionamento cromatográfico da fração hexano, Tabela 42.

Eluente	Frações (30 mL cada)	Frações reunidas	Massa (g)
hexano	1-17	1-7	0,116
hexano/AcOEt 10%	18-36	8-24	1,30
hexano/AcOEt 20%	37-42	25-42	1,62
AcOEt	43-49	43-49	0,105

6.5.1.3 Fracionamento cromatográfico da fração 8-24 e isolamento da substância P-12

1,30 g da fração 8-24 (Tabela 43) foi misturado a 2,47 g de sílica e pulverizado em gral de porcelana. A mistura foi condicionada em coluna empacotada com gel de sílica ($m_{\text{sílica}} = 37,5$, $\Phi = 3,5$ cm). O fracionamento cromatográfico foi realizado com os solventes hexano e acetato de etila puros e em mistura, onde foram coletados frações de 10 mL cada, como disposto na Tabela 44.

Tabela 44: Dados resultantes do fracionamento cromatográfico da fração 8-24

Eluente	Frações (30 mL cada)	Frações reunidas	Massa (g)
hexano/AcOEt 5%	1-17	1-7	16,4
hexano/AcOEt 10%	18-22	8-15	106,9
hexano/AcOEt 20%	23-25	16-17	292,3
AcOEt	26-33	18-19	373,2
		20-25	29,5
		26-33	100,3

Nas frações 16-17 nota-se a formação de precipitado branco de aspecto amorfo, solúvel em clorofórmio, que apresentou um único spot em CCD mostrando-se puro, o qual foi denominado de **P-12**, cuja determinação estrutural encontra-se no item 5.2.1, pág. 166.

6.5.1.4 Tratamento cromatográfico da fração CH₂Cl₂/AcOEt 50%

A fração CH₂Cl₂/AcOEt 50% com 3,2 g (Tabela 42, pág. 198) foi misturada a 15,5 g de sílica, pulverizada em gral de porcelana e submetida a cromatografia com 68,6 g de gel de sílica em coluna de $\Phi = 5,5$ cm. A eluição foi realizada com os solventes hexano, AcOEt e metanol, puros ou em misturas binárias com escala crescente de polaridade. Após análise comparativa por CCD das frações obtidas e reunião das semelhantes obtiveram-se 6 grupos de frações (Tabela 45).

Tabela 45: Dados resultantes do fracionamento cromatográfico da fração CH₂Cl₂/AcOEt 50%.

Eluente	Frações (10 mL cada)	Frações reunidas	Massa (mg)
hexano/AcOEt 30%	1-10	1-29	795,3
hexano/AcOEt 40%	11-34	30-46	723,6
hexano/AcOEt 50%	35-43	47-59	537,0
hexano/AcOEt 60%	44-52	60-80	500,3
hexano/AcOEt 70%	53-60	81	88,7
hexano/AcOEt 80%	61-72	82	278,7
hexano/AcOEt 90%	73-80		
AcOEt	81*		
CH ₃ OH	82*		

* volume utilizado: 150 mL

6.5.1.5 Tratamento cromatográfico das frações 60-80

A fração 60-80 (500,3 mg, Tabela 45) foi adsorvida em 2,27 g de gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre 24,3 g de gel de sílica em coluna ($\Phi = 3,0$ cm). O gradiente utilizado é mostrado na Tabela 46 a seguir. As frações foram reunidas conforme semelhança em CCD.

Tabela 46: Dados obtidos do tratamento cromatográfico da fração 60-80.

Eluente	Frações (10 mL cada)	Frações reunidas	Massa (mg)
hexano/AcOEt 30%	1-6	1-8	9,8
hexano/AcOEt 40%	7-28	9-13	77,5
hexano/AcOEt 50%	29-45	14-26	197,2
hexano/AcOEt 60%	46-51	27-38	73,1
hexano/AcOEt 70%	52-56	39-61	58,0
hexano/AcOEt 80%	57-61	62	13,1
AcOEt	62	63	33,6
CH ₃ OH	63		

6.5.1.6 Fracionamento cromatográfico das frações 9-13 e isolamento de PV-2

77,5 mg da fração 9-13 (Tabela 46, pág. 200) foi misturado a 184,2 mg de sílica e pulverizado em gral de porcelana. A mistura foi condicionada em coluna empacotada com gel de sílica ($m_{\text{sílica}} = 6,62 \text{ g}$, $\Phi = 2 \text{ cm}$). O fracionamento cromatográfico foi realizado com os solventes hexano, CH_2Cl_2 e acetato de etila puros e em mistura, onde foram coletados frações de 10 mL cada, como mostrado na Tabela 47.

Tabela 47: Dados obtidos do tratamento cromatográfico da fração 9-13.

Eluente	Frações (10 mL cada)	Frações reunidas	Massa (mg)
hexano/ CH_2Cl_2 50%	1-4	1-31	7,7
hexano/ CH_2Cl_2 60%	5-10	32-34	15,1
hexano/ CH_2Cl_2 70%	11-19	35-41	21,3
hexano/ CH_2Cl_2 80%	20-31	42-47	18,6
CH_2Cl_2	32-38	48-52	12,3
AcOEt	39-43		

Nas frações 35-41 nota-se a formação de precipitado branco de aspecto amorfo, solúvel em clorofórmio, apresentou um único spot em CCD mostrando-se puro, o qual foi denominado de **PV-2**. A comparação dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C deste composto com os espectros de **P-2**, apresentou mesmo deslocamentos químicos, o que nos permitiu concluir para **PV-2** como sendo o esteróide $5\alpha,8\alpha$ -epidioxi-24(*R*)-ergost-6-en-3 β -ol (**P-2**), previamente isolado da espécie em estudo *P. caribaeorum*, cuja determinação estrutural encontra-se no item 5.1.2, pág. 52.

6.5.1.7 Tratamento cromatográfico das frações 81, Tabela 45

Os 88,7 mg da fração 81 (Tabela 45, pág. 200) foram adsorvidos em 320 mg de sílica, pulverizados em gral de porcelana e acondicionados sobre 12,9 g de gel de sílica em coluna de $\Phi = 2,0 \text{ cm}$. O fracionamento cromatográfico por eluições sucessivas com diclorometano (CH_2Cl_2) e metanol (CH_3OH), puros ou em mistura binária com escala crescente de polaridade, resultou nas frações constantes na Tabela 48, a seguir.

Tabela 48: Dados referentes ao tratamento cromatográfico da fração 81, Tabela 45.

Eluente	Frações (10 mL cada)	Frações reunidas	Massa (mg)
CH ₂ Cl ₂	1-4	1-9	2,1
CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH 5%	5-13	10-15	57,4
CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH 10%	14-18	16-29	11,6
CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH 20%	19-23		
CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH 30%	24-28		
CH ₃ OH	29		

Na fração 10-15 (Tabela 48), após evaporação do solvente a temperatura ambiente, observou-se a formação de precipitado branco amorfo. A análise em CCD revelado com solução de vanilina apresentou somente dois “spots” com valores de R_f muito próximos. A comparação dos espectros de RMN ¹H e ¹³C com os espectros das substâncias **P-3** e **P-4**, mostrou valores iguais de deslocamentos químicos, nos permitindo concluir para esta fração como sendo composta pela mistura das substâncias 1-*O*-hexadecilglicerol (**P-3**) e o esteróide 24(*R*)-ergost-5-en-3 β ,7 α -diol (**P-4**), isolados da espécie em estudo *P. caribaeorum*.

6.5.1.8 Tratamento cromatográfico da fração 14-26, Tabela 46, pág. 181.

Visando dar continuidade ao tratamento cromatográfico das frações obtidas no item 5.5.1.5. (pág. 181), a fração 14-26 ($m = 197,2$ mg), o qual apresentou um “spot” majoritário após CCD revelado com solução de vanilina, foi misturada a 832 mg de sílica e pulverizada em gral de porcelana. A mistura foi acondicionada sobre camada de gel de sílica para cromatografia “flash” ($m_{\text{sílica}} = 31,7$ g, $\Phi = 2$ cm). No fracionamento cromatográfico utilizou-se como eluente isocrático a mistura hexano/AcOEt 70%. Foram coletadas 52 frações e reunidas conforme análise CCD (Tabela 49). Na fração 18-24, nota-se a formação de precipitado branco que apresentou um único “spot” em CCD mostrando-se puro e denominado de **P-13** e sua determinação estrutural encontra-se no item 5.2.2, pág. 171.

Tabela 49: Dados obtidos do tratamento cromatográfico da fração 14-26.

Eluente	Frações (10 mL cada)	Frações reunidas	Massa (mg)
Hexano/AcOEt 70%	1-52	1-13	41,3
		14-17	22,1
		18-24	28,3
		25-52	78,6

6.5.1.9 Tratamento cromatográfico da fração metanol

A fração metanol 1,4 g (Tabela 42, pág. 198) foi submetida à cromatografia com gel de sílica em coluna cromatográfica ($m_{\text{sílica}} = 41,8$ g, $\Phi = 3,5$ cm), utilizando os solventes descritos na Tabela 50. As frações obtidas foram reunidas, após análise por CCD, resultando em seis novas frações.

Tabela 50: Dados do fracionamento cromatográfico da fração metanol

Eluente	Frações (10 mL cada)	Frações reunidas	Massa (mg)
CH ₂ Cl ₂	1-6	1-15	zero
CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH 5%	7-16	16-27	95,1
CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH 10%	17-39	28-47	651,7
CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH 20%	40-44	48-63	108,2
CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH 30%	45-57	64-70	182,3
CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH 40%	58-64	71-77	235,4
CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH 50%	65-71		
CH ₃ OH	71-77		

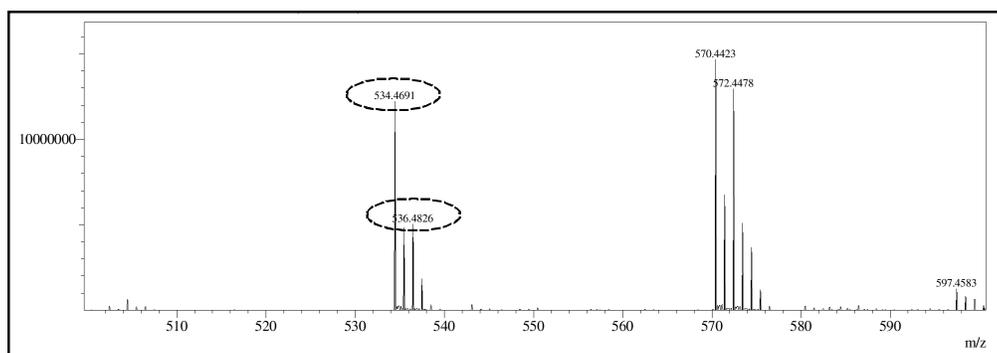
6.5.1.10 Fracionamento cromatográfico da fração 28-47

Os 651,7 mg da fração 28-47 (Tabela 50) foram adsorvidos em 2,9 g de sílica e cromatografada em coluna ($m_{\text{sílica}} = 27,2$ g, $\Phi = 4,0$ cm) utilizando os solventes CH₂Cl₂ e metanol puros ou em mistura. Neste procedimento foram obtidas 67 frações, que após análise comparativa por CCD foram reunidas em seis frações, conforme Tabela 51, pág. 204.

Tabela 51: Dados do fracionamento cromatográfico da fração 28-47, pág. 203.

Eluente	Frações (10 mL cada)	Frações reunidas	Massa (mg)
CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH 5%	1-11	1-8	149,9
CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH 10%	12-25	9-12	41,1
CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH 15%	26-31	13-34	83,7
CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH 20%	32-42	35-57	105,3
CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH 25%	43-47	58-62	113,0
CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH 30%	48-52	63-67	139,5
CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH 40%	53-57		
CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH 50%	59-62		
CH ₃ OH	63-67		

As frações 9-12 e 13-34 (Tabela 51) apresentou-se como sólido amorfo esbranquiçado que foi recristalizado em metanol resultando em 91,0 mg. A análise por CCD revelou apenas uma mancha característico de um composto puro. Entretanto, o espectro de massa de alta resolução (EMAR) (Fig. 173), obtido com ionização por *eletrospray* e no modo negativo, mostrou picos com valores de m/z referente às ceramidas **P-5** (calculado $[M - H]^-$ m/z 534,4886) e **P-6** (calculado $[M - H]^-$ m/z 536,5042), indicando para estas frações a mistura destas ceramidas, isolados da espécie em estudo *P. caribaeorum*.

**Figura 173:** Espectro de massa de alta resolução das frações 9-12 e 13-34, Tabela 51.

6.5.2 Preparação do extrato etanólico

Após extração com hexano, do material marinho (3,4 kg) (item 6.5.1, pág. 198), foi submetido à extração com etanol. A solução resultante foi filtrada e em seguida destilada a pressão reduzida, fornecendo 23,4 g de extrato etanólico (Fluxograma 03, pág. 207).

6.5.2.1 Cromatografia de partição do extrato etanólico

Os 23,4 g deste extrato foram dissolvidos em 140 mL de metanol e 35 mL de água destilada, em seguida iniciou-se a partição com o solvente CH_2Cl_2 e AcOEt, resultando nas frações dispostas na Tabela 52.

Tabela 52: Dados da cromatografia de partição do extrato etanólico.

Eluente - volume	Massa (g)
CH_2Cl_2 (275 mL)	9,6
Acetato de etila (250 mL)	1,2
hidroalcoólico	~7,2

6.5.2.2 Fracionamento cromatográfico da fração CH_2Cl_2

A fração CH_2Cl_2 com massa de 9,6 g (Tabela 52) foi misturada a 88,6 g de sílica, pulverizados em gral de porcelana e cromatografados sobre 112,8 g de gel de sílica em coluna de $\Phi = 7,0$ cm. A eluição foi realizada com os solventes hexano, CH_2Cl_2 , AcOEt e metanol conforme mostrado na Tabela 53.

Tabela 53: Dados resultantes do fracionamento cromatográfico da fração CH_2Cl_2

Eluente - volume	Massa (mg)
hexano / AcOEt 25% (250 mL)	922,2
hexano / AcOEt 50% (320 mL)	195,7
hexano /AcOEt 75% (250 mL)	258,0
AcOEt (250 mL)	205,9
$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 10% (350 mL)	690,0
$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 20% (350 mL)	853,2
$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 30% (450 mL)	1.915
$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 50% (450 mL)	2.780
CH_3OH (180 mL)	1.263

6.5.2.3 Tratamento cromatográfico da fração CH₂Cl₂/CH₃OH 50%

A fração CH₂Cl₂/CH₃OH 50% com aproximadamente 2,8 g, Tabela 53, foi misturada a 10,2 g de sílica, pulverizada em gral de porcelana e submetida a cromatografia com 71,2 g de gel de sílica em coluna de $\Phi = 5,5$ cm. A eluição foi realizada com os solventes CH₂Cl₂ e metanol, puros ou em misturas binárias com escala crescente de polaridade. Foram coletadas 21 frações conforme disposto na Tabela 54. Nas frações 8-10 observa-se a formação de um sólido branco amorfo que após análise por CCD e revelado em solução de vanilina, nota-se a presença de um único “spot” mostrando-se puro. A análise do espectro de massa de alta resolução no modo negativo (Fig. 174) deste precipitado, mostrou picos de m/z com valores idênticos aos obtidos para as ceramidas **P-8** (calculado $[M - H]^- m/z$ 655,5084) e **P-9** (calculado $[M - H]^- m/z$ 657,5240), indicando para este precipitado como sendo a mistura destes compostos, previamente isolados da espécie em estudo *P. caribaeorum*.

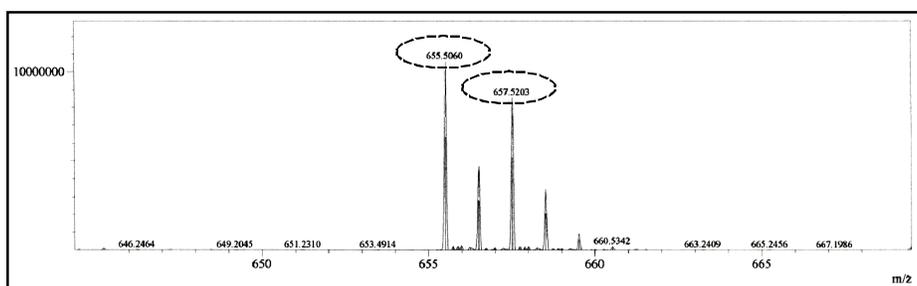
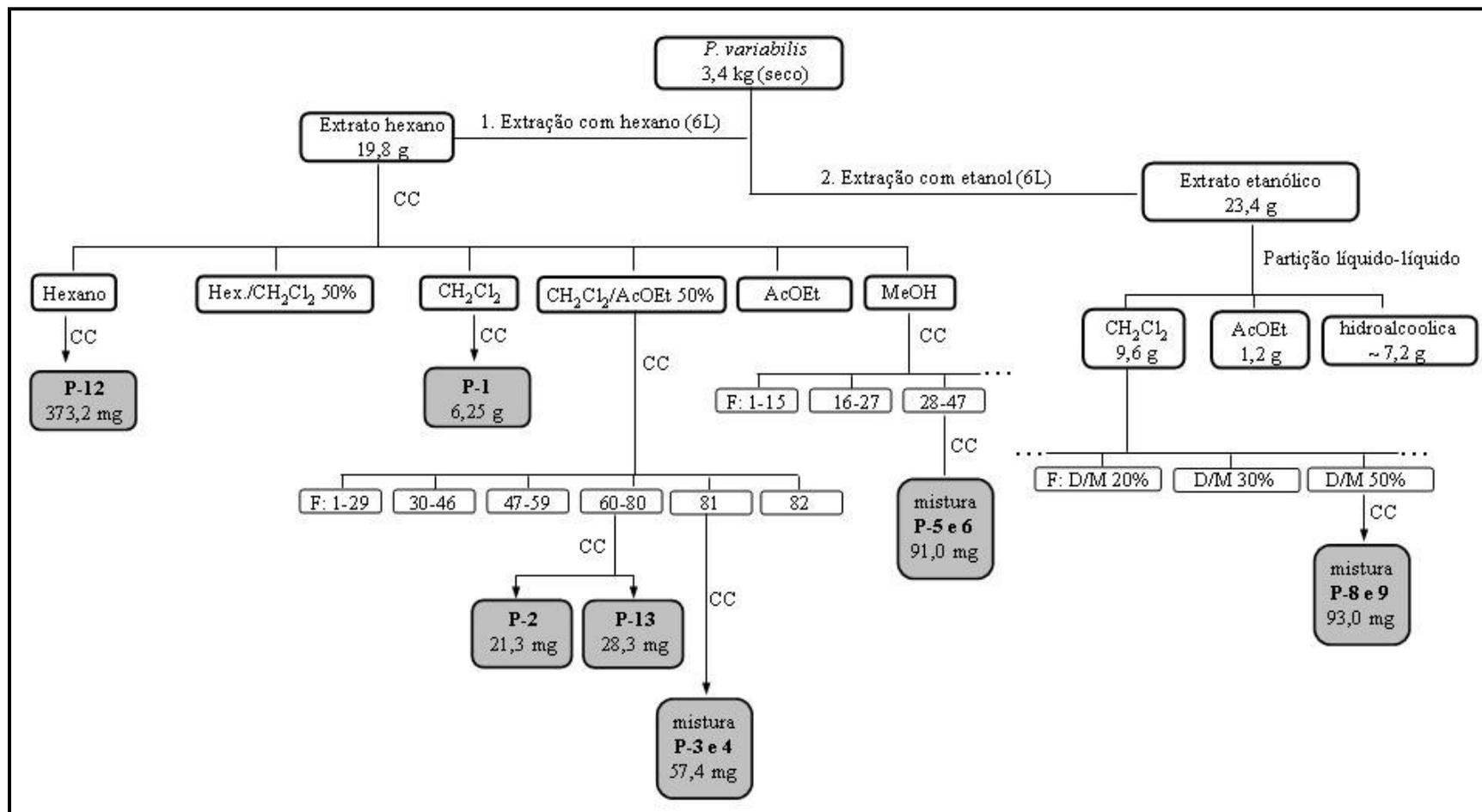


Figura 174: Espectro de massa de alta resolução da fração 8-10, Tabela 47

Tabela 54: Dados obtidos do tratamento cromatográfico da fração CH₂Cl₂/CH₃OH 50%

Eluente - volume	Frações	Frações reunidas	Massa (mg)
CH ₂ Cl ₂ (120 mL)	1-2	1-4	195
CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH 10% (160 mL)	3-4	5	411
CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH 20% (340 mL)	5-12	6-7	960
CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH 30% (100 mL)	13-14	8-10	461
CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH 40% (50 mL)	15	11-12	107
CH ₂ Cl ₂ /CH ₃ OH 50% (100 mL)	16-17	14-17	86
CH ₃ OH (180 mL)	18-21	18-21	294

Fluxograma 3: Síntese do procedimento para o isolamento dos compostos **P-1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 12 e P-13** de *P. variabilis*

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Este trabalho mostrou a investigação química dos constituintes micromoleculares das espécies marinhas *Palythoa caribaeorum* e *Protopalythoa variabilis*. Como consequência deste estudo foram isolados seis esteróides de esqueleto ergostano, incluindo um do tipo B-norergostano, metabólito secundário raro tanto em espécies vegetais como marinhas. Além destes, foi isolado um nucleosídeo, um derivado do glicerol, um éster alifático e quatro ceramidas, duas das quais sulfatadas.

De *P. caribaeorum* foram isolados os seguintes compostos: 24(R)-ergost-5-en-3 β -ol (**P-1**), 5 α ,8 α -epidioxi-24(R)-ergost-6-en-3 β -ol (**P-2**), 1-O-hexadecilglicerol (**P-3**), 24(R)-ergost-5-en-3 β ,7 α -diol (**P-4**), N-(2S,3R,4E,8E,1,3-dihidroxi-4,8-octadecadieno)-hexadecanamida (**P-5**), N-(2S,3R,4E,1,3-dihidroxi-4-octadeceno)-hexadecanamida (**P-6**), 24(R)-7 α -hidroperoxi-ergost-5-en-3 β -ol (**P-7**), N-[2S,3R,4E,8E,1-(2''-metilamino-etanosulfonila)-3-hidroxi-4,8-octadecadieno]]hexadecanamida (**P-8**), N-[2S,3R,4E,1-(2''-metilaminoetano-sulfonila)-3-hidroxi-4-octadeceno]]hexadecanamida (**P-9**), 24(R)-ergost-7-en-3 β ,5 α ,6 β -triol (**P-10**) e 2-metil-timidina (**P-11**) (Quadro 01, pág. 211). Do estudo químico de *P. variabilis*, além dos compostos **P-1** a **P-6**, **P-8** e **P-9**, foram isolados o éster graxo hexadecanoato de nonila (**P-12**) e o esteróide ácido 24(R)-B-norergostan-3 β -5 β -diol-6 β -carboxílico (**P-13**) (Quadro 02, pág. 212).

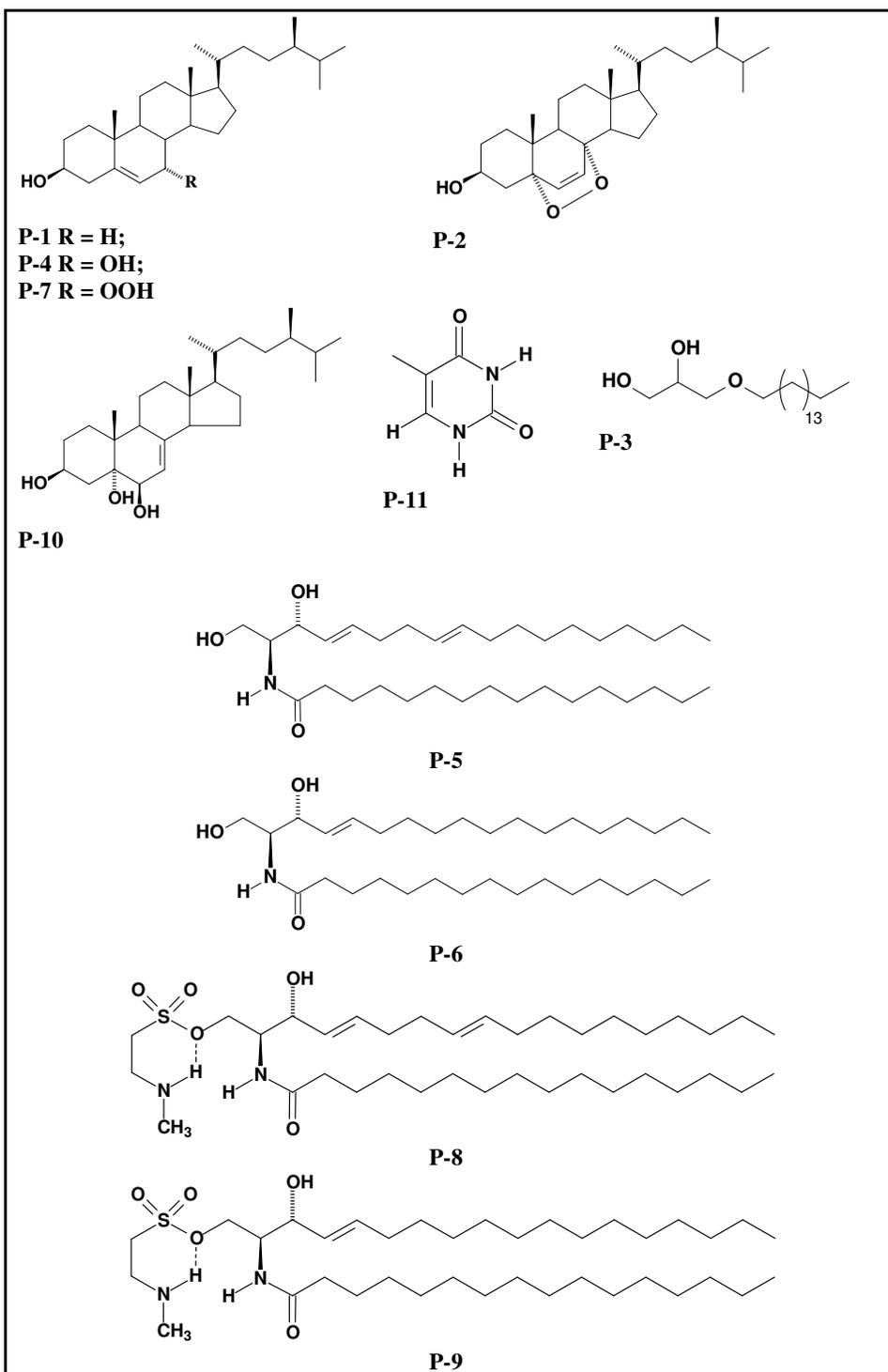
Dos compostos obtidos, os esteróides designados de **P-7** e **P-13** e as ceramidas sulfatadas **P-8** e **P-9** estão sendo descritas pela primeira vez.

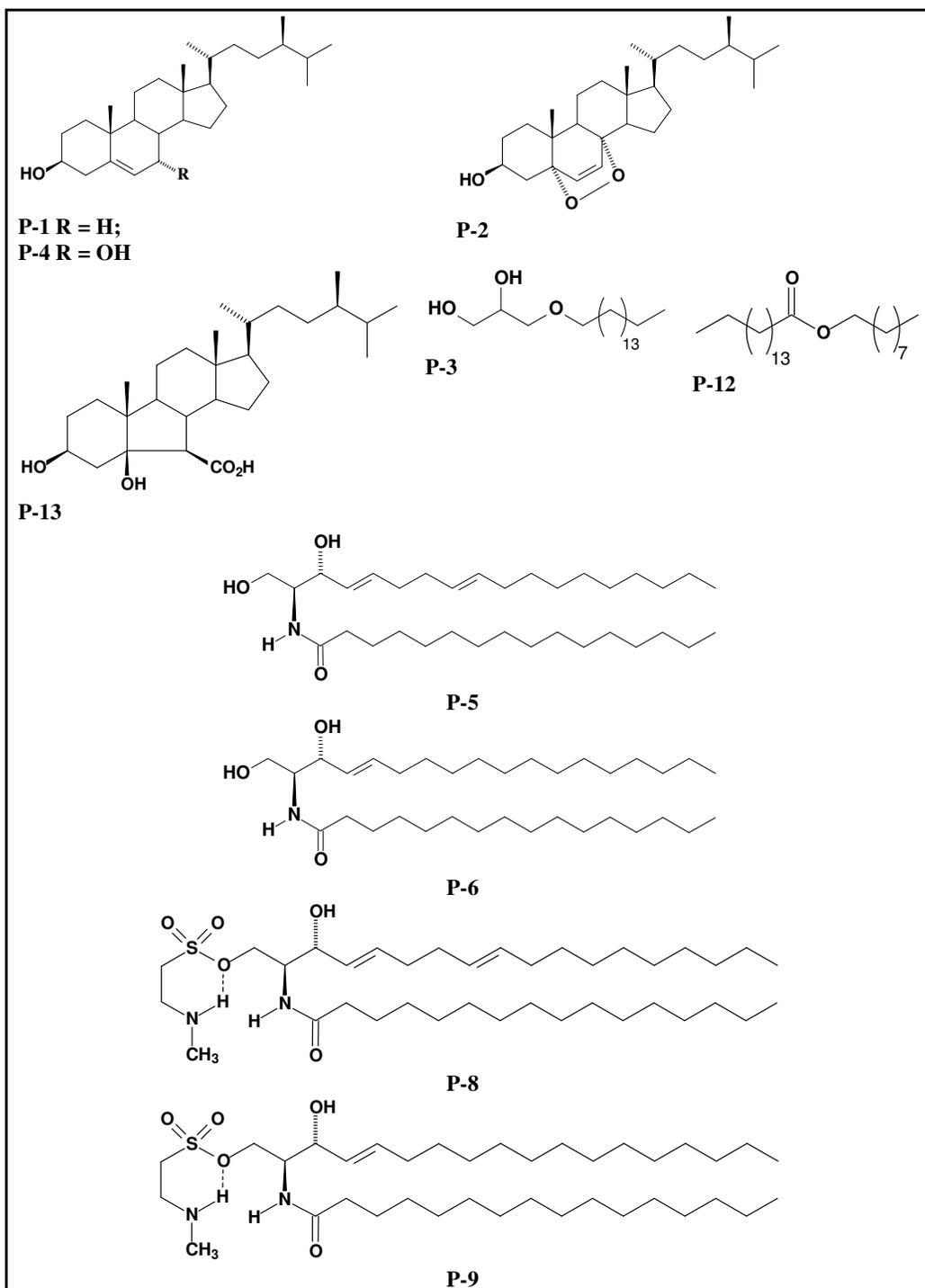
Como foi mencionado neste trabalho, Wilke e colaboradores isolaram dois α -aminoácidos alifáticos com propriedade citotóxica a partir de *P. variabilis*, estimulando a realização de ensaios citotóxicos com as ceramidas obtidas (**P-5**, **P-6**, **P-8** e **P-9**). Entretanto, nenhuma das ceramidas mostrou resultado positivo frente às linhagens celulares tumorais HL-60 (leucemia promielocítica), HCT-8 (câncer de cólon), SF-295 (sistema nervoso central) e MDA MB-435 (melanoma). Estas ceramidas também foram inativas (CIM acima de 512 μ g/mL) quando testadas frente aos microrganismos *Candida Albicans* (ATCC 10231), *Candida Parapasilopsis* (ATCC 22019), *Trichophyton rubrum* (LMGO 06) e *Trichophyton mentagrophytes* (LMGO 09).

De acordo com pesquisas bibliográficas (*Sci Finder*[®] *School*TM e *Web of Science*), compostos de natureza esteroideal são comuns no gênero *Palythoa*, entretanto,

não foi encontrado nenhum relato sobre ceramidas neste gênero, a segunda principal classe de compostos isolados neste trabalho. Como este trata do primeiro estudo químico de uma espécie de *Protopalythoa* é ainda bastante insipiente chegarmos a uma conclusão sobre os constituintes de importância quimiotaxonomica produzidos pelas espécies do gênero, no entanto, com base nos nossos resultados acreditamos que *Palythoa* e *Protopalythoa* apresentam composição química semelhante.

Os resultados alcançados neste trabalho estimulam a continuidade da investigação estendendo-se a espécies afins. Este estudo, o segundo trabalho de conclusão envolvendo química de produtos naturais marinhos no curso de Pós-Graduação em Química da UFC, foi importante para demonstrar o potencial da diversidade química dos produtos naturais marinhos do litoral nordestino e ainda fortalecer a linha de pesquisas nesta área.

Quadro 01: Estruturas dos compostos isolados de *P. caribaeorum*

Quadro 02: Estruturas dos compostos isolados de *P. variabilis*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATTAWAY, D. H.; CIERESZKO, L. S. Isolation and partial characterization of Caribbean palytoxin. **Proceedings of the International Symposium on Coral Reefs**, v.1, p. 497–504, 1974.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos, 1ª ed., Ed. Artmed, Porto Alegre, 2001. 243 p.
- BERESS, L.; ZWICK, J.; KOLKENBROCK, H. J.; KAUL, P. N.; WASSERMANN, O. A method for the isolation of the Caribbean palytoxin (C-PTX) from the coelenterate (zooanthid) *Palythoa caribaeorum*. **Toxicon**, v. 21, p. 285–290, 1983.
- BERLINCK, R. G. S.; HAJDU, E.; ROCHA, R. M.; OLIVEIRA, J. H. H. L.; HERNÁNDEZ, I. L. C.; SELEGHIM, M. H. R.; GRANATO, A. C. G.; DE ALMEIDA, E. V. R.; NUÑEZ, C. V. N.; MURICY, G.; PEIXINHO, S.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; CAVALCANTI, B. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; THIEMANN, O.; SILVA, M.; SOUZA, A. O.; SILVA C. L.; MINARINI, P. R. R., Challenges and rewards of research in marine natural products chemistry in Brazil, **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 03, p. 510-522, 2004.
- BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R., Marine Natural Products, **Natural Products Reports**, v. 1. p. 20, 2003.
- BRUSCA, R. C. & BRUSCA, G. J., Invertebrados, 2ª Ed., Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2007. 968 p.
- CARBALLEIRA, N. M.; REYES, M., Identification of a new 6-bromo-5,9-eicosadienoic acid from the anemone *Condylactis gigantea* and the Zoanthid *Palythoa caribaeorum*, **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 11, p. 1689-1694, 1995.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J., Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources, **Cancer Investigation**, v. 17(2), p. 153-163, 1999.
- DEWICK, P. M., Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, John Wiley & Sons Ltd, 3ª ed., 2009. 539p.
- DIOP, M.; LEUNG-TACK, D.; BRAEKMAN, J. C.; KORNPROBST, J. M., Sterol composition of four Zoanthidae members of the genus *Palythoa* from the Cape Verde Peninsula. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 14, n. 2, p. 151-154, 1986.
- DONIA, M.; HAMANN, M. T., Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents, **Lancet Infectious Diseases**, v. 6, p. 338-348, 2003
- DUERDEN, J. E., Report on the actinians of Porto Rico investigations of the aquatic resources and fisheries of Porto Rico by the U.S. Fish Commission Steamer Fish Hawk in 1899). **Bulletin United States Fish Commission.**, v. 20, p. 323-374, 1902.
-

EMA, European Medicine Agency, <http://www.ema.europa.eu/ema>, acessado em 02/05/2010.

ERBA, E.; BERGAMASHI, D.; BASSANO, L.; DAMIA, G.; RONZONI, S.; FAIRCLOTH, G. T.; D'INCALCI, M., Ecteinascidin-743 (ET-743), a natural marine compound, with a unique mechanism of action. **European Journal Cancer**, v. 37, p. 97-105, 2001.

FEDOROV, S. N.; STONIK, V. A.; ELYAKOV, G. B., Identification of ecdysteroids of hexacorals, *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*, v. 4, p. 603-604, 1988.

FRELIN, C.; RENTERGHEM, V. C., Palytoxin. Recent electrophysiological and pharmacological evidence for several mechanisms of action. **General Pharmacology**, v. 26, p. 33-37, 1995.

GAO, J. M.; DONG, Z. J.; LIU, J. K., A new ceramide from basidiomycetes *Russula cyanoxantha*, **Lipids**, v. 36, n. 02, p. 175-181, 2001.

GRÄFE, U., Drug discovery from Nature, p. 117-124, 2001.

GUPTA, K. C.; SCHEUER, P. J., Zoanthid sterols, **Steroids**, v. 13, n. 03, p. 343-356, 1969.

HAEFNER, B., Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. **Drug Discovery Today**, v. 8, p. 536-544, 2003.

HABERMANN, E.; AHNERT-HILGER, G.; CHHATWAL, G. S.; BERESS, L., Delayed haemolytic action of palytoxin general characteristics. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 649, p. 481-486, 1981.

HAN, C.; QI, J.; SHI, X.; SAGAKAMI, Y.; SHIBATA, T.; UCHIDA, K.; OJIKI, M., Prostaglandins from a Zoanthid: Paclitaxel-Like Neurite-Degenerating and Microtubule-Stabilizing Activities, **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 70, n. 03, p. 706-711, 2006.

HUANG, X. Z.; YIN, Y.; DAI, J. H. & LIANG, H., Two new ceramides from the stems of *Piper betle* L. **Chinese Chemical Letters**, v. 21, n. 04, p. 433-436, 2010.

HIROTA, S.; FUSEYANI, N.; YASUMURO, K.; MATSUNAGA, S., Haliclamines A and B, cytotoxic macrocyclic alkaloids from a sponge of the genus *Haliclona*, **Tetrahedron Letters**, v. 30 n. 49, p. 6891-6894, 1990.

JHA, R. K.; ZI-RONG, X., Biomedical compounds from marine organisms, **Marine Drugs**, v. 2, p.123-146, 2004.

KELECOM, A., Marine natural products in Brazil. **Ciência e Cultura**, v. 49, n. 05, p. 321-330, 1997.

KANAZAWA, A.; TESHIMA, S. I.; ANDO, T., Sterol of coelenterates, **Comparative Biochemistry and Physiology – Part B**, v. 57, n. 02, p. 317-323, 1977.

KOBAYASHI, M.; KRISHNA M. M.; HARIBABUB, B. B.; ANJANEYULU, V., Marine sterols 25. Isolation of 23-dimethylgorgost-7-ene-3- β ,5- α ,6- β -triol and (24s)-ergostane-3- β ,5- α ,6- β ,7- β ,15- β -pentol from soft corals of the andaman and nicobar coasts, **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 41, n. 1, 87-89, 1993.

IOANNOUA, E.; ABDEL-RAZIKA, A. F.; ZERVOUC, M.; CHRISTFIDISA, D.; ALEXI, X.; VAGIASA, C.; ALEXIS, M. N. & ROUSSIS, V., 5 α , 8 α - Epidioxysterols from the gorgonian *Eunicella cavolini* and the ascidian *Trididemnum inarmatum*: Isolation and evaluation of their antiproliferative activity, **Steroids**, v. 74, p. 73-80, 2009.

INAGAKI, M.; OYAMA, A.; ARAO, K. & HIGUCHI, R., Constituents of Crinoidea, 4. Isolation and Structure of Ceramides and Glucocerebrosides from the Feather Star *Comanthus japonica*, **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, n. 11, p. 1307-1311, 2004.

LIN, W.-H.; FANG, J.-M.; CHENG, Y.-S., Diterpenoids and steroids from *Taiwania Cryptomerioides*, **Phytochemistry**, v. 48, n. 08, p. 1392-1397, 1998.

MARQUES, A. C. & COLLINS, A. G., Cladistic analysis of Medusozoa and cnidarian evolution, **Invertebrate Biology**, v. 123, n. 01, p. 23-42. 2004.

MADAIIO, A.; PICCIALLI, V.; SICA, D., New Polyhydrozosterols from the Dityoceratid Sponges *Hippospongia Communis*, *Spongia officinalis*, *Ircinia Variabilis*, and *Spongionella gracilis*, **Journal of Natural Products**, v. 52, n. 05, p. 952-961, 1989.

MOORE, R. E.; SCHEUER, P. J., Palytoxin, a new marine toxin from a coelenterate. **Science**, v. 172, n. 3982, p. 495-498, 1971.

MIYAMOTO, T.; KODAMA, K.; ARAMAKI, Y.; HIGUCHI, R.; SOEST, R. W. M. V., Orostanal, a novel abeo-sterol inducing apoptosis in leukemia cell from a marine sponge, *Stelletta hiwasaensis*, **Tetrahedron Letters**, v. 42, p. 6349-6351, 2001.

MIRALLES, J.; DIOP, M.; FERRER, A. & KORNPROBST, J. M, Sterol composition of the ahermatypic zoantharia – *Palythoa senegambiensis* carter and its commensal, the decapoda diogenes-ovatus miers - inadequacy of sterol content for chemotaxonomy of Palythoa genus, **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, v. 89B, n. 2, p. 209-212, 1988.

MUIRHEAD, A. & RYLAND, J. S., A review of the genus *Isaurus* Gray, 1828 (Zoanthidea), **Journal Natural Histology**, v. 19, p. 323-335, 1985.

MURALIDHAR, P.; RADHIKA, P.; KRISHNA, N.; VENKATA, R. D.; BHEEMASANKARA, R. C., Sphingolipids from Marine Organisms: A Review, **Natural Products Sciences**, v. 9, n. 3, p. 117-142, 2003.

MURALIDHAR, P.; KUMAR, M. M.; KRISHNA, N.; RAO, C. B. & RAO, D. V., New sphingolipids and a sterol from a Lobophytum species of the Indian Ocean **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 2, p. 168-171, 2005.

NAKAO, Y.; TAKADA, K.; MATSUNAGA, S.; FUSETANI, N., Calyceramides A-C: neuraminidase inhibitory sulfated ceramides from the marine sponge Discodermia calyx, **Tetrahedron**, v. 57, p. 3013-3017, 2001.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M., Natural products from marine invertebrates and microbes as modulators of antitumor targets. **Curr. Drug Targets**, v.7, p. 279-304, 2006.

OKU, N.; SATA, N. U.; MATSUNAGA, S.; UCHIDA, H.; FUSETANI, N., Identification of palytoxin as a principle which causes morphological changes in rat 3Y1 cells in the zoanthid *Palythoa aff. Margaritae*, **Toxicon**, v.43, p. 21-25, 2004.

PETTIT, G. R.; FUJJI, Y., Antineoplastic Agents. 81. The Glycerol Ethers of *Palythoa liscia*, **Journal of Natural Products**, v. 45, n. 5, p. 640-643, 1982.

PHILLIPSON, G. W.; ANDERSON, A. C.; Ethnopharmacology and western medicine, **Journal Ethnopharmacology**, v. 25, p. 61, 1998

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P. & EPIFANIO, R. A., Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas, **Química Nova**, v. 25, n. 01, p. 45-61, 2002.

PRETSCH, E.; BUHLMANN, P.; AFFOLTER, C., Structure determination of organic compounds – Tables and Spectral Data, Springer – Verlag Berlin Heidelberg New York, p. 154. 2000.

QUIJANO, L.; CRUZ, F.; NAVARRETE, I.; GÓMEZ, P. & RIOS, T., Alkyl glycerol monoethers in the marine sponge *Desmapsamma anchorata*, **Lipids**, v. 29, n. 10, p. 731-734, 1994.

QUINN, R. J.; KASHIWAGI, M.; MOORE, R. E.; NORTON, T. R., Anticancer activity of zoanthids and the associated toxin palytoxin against Ehrlich Ascites tumor and P-388 lymphocytic leukemia in mice, **Journal Pharmacology Science**, v. 63, 257–260, 1974.

RABELO, E. F., Distribuição espacial e interações competitivas em zoantídeos em um ambiente de recifes de arenito no noredeste do Brasil, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

RADIN, N. S., Killing tumours by ceramide-induced apoptosis : a critique of available drugs, **Biochemical Journal**, p. 243-256, 2003.

RAHMAN, A. U.; SHABBIR, M.; KHAN, A. M.; HAYAT, S.; NASREEN, A.; MALIK, S.; CHOUDHARY, M., Chemical constituents from marine organisms, **Natural Product Letters**, v. 13, n. 4, P. 255-261, 1999.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D., Invertebrate Zoology: a functional evolutionary approach, Thomson-Books/Cole USA, 7a ed., 963 p., 2004.

RYLAND, J. S.; LANCASTER, J. E., Revision of methods for separating species of protopalyma (Hexacorallia: Zoanthidea) in the tropical west pacific, **Invertebrate Systematics**, v. 17, p. 407-428, 2003.

SCHEINOST, J. C.; WITTER, D. P.; Grant E. BOLDT, G. E.; OFFER, J.; WENTWORTH, J. P., Cholesterol seco-sterol adduction inhibits the misfolding of a mutant prion protein fragment that induces neurodegeneration, **Angewandte Chemie International Edition**, v. 48, p. 9469-9472, 2009.

SHIGEMORI, H.; SATO, Y.; KAGATA, T.; KOBAYASHI, J., Palythoalones A and B, New Ecdysteroids from the Marine Zoanthid *Palythoa australiae*, **Journal of Natural Products**, v. 62, n.2, p. 372-374, 1999.

SHEU, J-H.; LIAW, C-C.; DUH, C-Y., Oxygenated Clerosterols Isolated from the Marine Alga *Codium arabicum*, **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 10, p. 1521-1526, 1995.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X., Identificação espectrométrica de compostos orgânicos, 6ª ed. Rio de Janeiro, LTC, 2000.

SINNIGER, F.; MONTOYA-BURGOS, J. I.; Chevaldone, P.; Pawlowski, J., Phylogeny of the order Zoantharia (Anthozoa, Hexacorallia) based on the mitochondrial ribosomal genes. **Marine Biology**, n. 147, p. 1121-1128, 2005.

SOARES, C. L. S.; PEREZ, C. D.; MAIA, M. B. S.; SILVA, R. S. e MELO R. S. A, Avaliação da atividade anti-inflamatória e analgésica do extrato bruto hidroalcoólico do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860), **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16(4), p. 463-468, 2006.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V., Farmacognosia: da planta ao medicamento, 5ª edição, Porto Alegre, Editora UFSC, 2004.

TAKANO, S.; UEMURA, D.; HIRATA, Y., Isolation and structure of a new amino acid, palythine, from the zoanthid *Palythoa tuberculosa*, **Tetrahedron Letters**, v. 26, p. 2299-300, 1978a.

TAKANO, S.; UEMURA, D.; HIRATA, Y., Isolation and structure of two new amino acids, palythanol and palythene, from the zoanthid *Palythoa tuberculosa*, **Tetrahedron Letters**, v. 49, p. 4909-4912, 1978b.

TOSTESON, M. T.; HALPERIN, J. A.; KISHI, Y.; TOSTESON, D. C, Palytoxin induces increase in the cation conductance of red cells, **Journal of General Physiology**, v. 98, p. 969-985, 1991.

UEDA, K.; UEMURA, D.; HIRATA, Y.; TAKANO, S., Studies on palytoxin and other constituents from *Palythoa tuberculosa*. **Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu**, 21st, p. 245-252, 1978.

UEMURA, D.; HIRATA, Y.; IWASHITA, T.; NAOKI, H., Studies on palytoxins, **Tetrahedron**, v. 41, p. 1007–1017, 1985.

UEMURA, D.; TOYA, Y.; WATANABE, I.; HIRATA, Y., Isolation and structures of two new pyrazines, palythazine and isopalythazine from *Palythoa tuberculosa*, **The Chemical Society of Japan**, p. 1481–1482, 1979.

WEI, X.; RODRIGUEZ, A. D.; WANG, Y.; FRANZBLAU, S. G., Novel ring B abeo-sterols as growth inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from a Caribbean Sea sponge, *Svenzea zeai*, **Tetrahedron Letters**, v. 48, p. 8851-8854, 2007.

WILES, J. S.; VICK, J. A.; CHRISTENSEN, M. K., Toxicological evaluation of palytoxin in several animal species, **Toxicon**, v. 12, p. 427-433, 1974.

WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; ARAÚJO, R. M.; SILVA, W. M. B.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L.; BRAZ-FILHO, R.; LOPES, N. P.; COSTA-LOTUFO, L. V., Cytotoxic Lipidic α -amino Acids from the Zoanthid *Protospalythoa variabilis* from the Northeastern Coast of Brazil, **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 08, p. 1455-1459, 2009.

WINK, M., Physiology of secondary product formation in plants. **Proceedings of the Phytochemical Society of Europe**, 30, (Second. Prod. Plant Tissue Cult.), p. 23-41, 1990.

ZEWAIL-FOOTE, M.; LI, V. S.; KOHN, H.; BEARSS, D.; GUZMAN, M.; HURLEY, L. H., The inefficiency of incisions of ecteinascidin 743-DNA adducts by the UvrABC nuclease and the unique structural feature of the DNA adducts can be used to explain the repair-dependent toxicities of this antitumor agent. **Chemistry & Biology**, v. 8, p. 1033-1049, 2001.

ZHANG, X.; CAMBRAI, A.; MIESCH, M.; ROUSSI, S.; RAUL, F.; MARCHIONI, E., Separation of Delta5- and Delta7-phytosterols by adsorption chromatography and semipreparative reversed phase high-performance liquid chromatography for quantitative analysis of phytosterols in foods, **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 54, n. 4, 1196-1202, 2006.

<http://www.biologia.blogger.com.br/> acessado em 18/05/2010.