



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA

Contribuição ao Conhecimento Químico de
Esponjas do Litoral Cearense:
Monanchora arbuscula

Julieta Rangel de Oliveira

FORTALEZA - CE
2008

JULIETA RANGEL DE OLIVEIRA

CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO
QUÍMICO DE ESPONJAS DO LITORAL
CEARENSE: *MONANCHORA ARBUSCULA*

Dissertação submetida à Coordenação do curso de Pós-Graduação em Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Otília Deusdênia Loila
Pessoa

FORTALEZA

2008

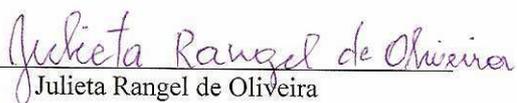
O47c Oliveira, Julieta Rangel de
Contribuição ao conhecimento químico de esponjas do litoral cearense:
Monanchora arbuscula / Julieta Rangel de Oliveira, 2008.
158f. ;il. color. enc.

Orientador: Prof. PhD. Edilberto Rocha Silveira
Co-Orientadora: Prof. Dra. Otília Deusdênia Loiola Pessoa
Área de concentração: Produtos Naturais
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de
Ciências. Depto. de Química Orgânica e Inorgânica, Fortaleza, 2008.

1. Produtos naturais marinhos 2. Alcalóides guanidínicos I . Silveira,
Edilberto Rocha (orient.) II. Pessoa, Otília Deusdênia Loiola (co-orient.) III.
Universidade Federal do Ceará – Curso de Pós-Graduação em Química
Orgânica IV. Título

CDD 547

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



Julieta Rangel de Oliveira

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 03/10/2008

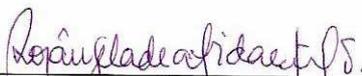
EXAMINADORES:



Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira
Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof. Dr. Francisco José Queiroz Monte
Universidade Federal do Ceará – UFC



Profª. Dra. Rosângela de Almeida Epifanio
Universidade Federal Fluminense – UFF

Trabalho realizado sob orientação do Prof^o. Dr. **Edilberto Rocha Silveira** e co-orientação da Prof^a. Dra. **Otília Deusdênia Loiola Pessoa**, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, da Universidade Federal do Ceará.

À Deus por fazer transformações em
minha vida.

Aos meus pais, M^a Marizete e Luiz e ao
meu irmão, Luzardo pelo amor
transmitido.

"Há duas fontes perenes de alegria
pura: o bem realizado e o dever
cumprido."

E. Girão

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, por direcionar o caminho que nela devo percorrer e pelas imensas oportunidades surgidas na minha jornada.

Aos meus pais, pela educação que me deram e por estarem sempre comigo, apoiando-me e transmitindo muito amor.

Ao meu irmão Luzardo, por sempre estar aconselhando-me, apoiando-me e transmitindo-me muita confiança.

Ao professor Edilberto Rocha Silveira, pela orientação, pelo esforço em querer passar algum de seu conhecimento científico e profissional.

À professora Otília Deusdênia Loiola Pessoa, por ter acreditado na minha capacidade, pela dedicação em co-orientar este trabalho, pela paciência, compreensão e por sempre mostrar-se amiga.

Ao Dr. Eduardo Hajdu (Museu Nacional de Poríferos, UFRJ) pela participação na coleta e identificação da espécie utilizada neste trabalho.

À professora Letícia Veras Costa Lotufo pelos ensaios farmacológicos e por permitir-me acompanhar alguns destes ensaios.

Ao professor Francisco Arnaldo Viana, pela dedicação em ensinar-me a trabalhar com o HPLC, e pela colaboração neste trabalho, como também a participação do professor, Jaécio Carlos Diniz, sempre na ausência do Prof. Arnaldo.

À professora Mary Anne Sousa Lima pelo conhecimento transmitido nos seminários de grupo, como também pela amizade e incentivo.

À professora Laila Salmen Espíndola pelas atividades leishmanicida e antifúngica.

Ao Elthon Ferreira, aluno de mestrado da Profa. Letícia Veras, pela realização das atividades farmacológicas, pela atenção e disposição em tirar-me algumas dúvidas sempre que precisava.

Aos alunos de iniciação científica do Laboratório de Cromatografia de Alta Eficiência da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN) pela ajuda quando desenvolvia parte deste trabalho no presente laboratório.

Aos operadores dos aparelhos de Infravermelho (Ricardo, Sammy, Luciana Bertini), Ressonância Magnética Nuclear (Daniel, Renata, Henrique, Edângelo, Glauber, Gisele, Luciana Lucas) pela obtenção dos espectros e ao Artur pelos espectros de massa.

Aos companheiros de laboratório, pela amizade, pelo compartilhamento de experiências, pelos vários momentos de descontrações.

As amigas que conquistei durante o período de mestrado, que passaram a fazer parte da minha vida sempre transmitindo energia positiva, oferecendo sempre um ombro amigo; Ceíça, Milena, Simone e Isabel.

A minha conterrânea amiga Janete que sempre esteve do meu lado apoiando-me desde a monitoria de Química Orgânica, por sempre me ouvir quando chegava em casa triste, aflita e “estressada”.

As minhas amigas sólidas conquistadas no período de graduação; Ângela, Joseane, Cesiane e Romel por estarem sempre do meu lado.

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

Aos órgãos financiadores CNPQ, CAPES, PRONEX E FUNCAP pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FLUXOGRAMAS.....	x
LISTA DE QUADROS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUÇÃO	1
PRODUTOS NATURAIS MARINHOS	1
OBJETIVOS	4
1 - GERAL	4
2 - ESPECÍFICOS	4
1. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	5
ESPONJAS	5
1.1. CONSIDERAÇÕES TAXONÔMICAS	7
1.1.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE FAMÍLIA CRAMBEIDAE.....	7
1.1.2. CONSIDERAÇÕES SOBRE GÊNERO <i>MONANCHORA</i>	7
1.1.3. CONSIDERAÇÕES SOBRE A <i>MONANCHORA ARBUSCULA</i>	7
1.2. CONSIDERAÇÕES FARMACOLÓGICAS	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE A OCORRÊNCIA DE ALCALÓIDES GUANIDÍNICOS EM ORGANISMOS MARINHOS	14
2.1. CONSTITUIÇÃO QUÍMICA E IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA	14
3. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE <i>MONANCHORA ARBUSCULA</i>	35
3.1. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE MAD-1.....	35
3.2. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE MAA-2.....	48
3.3. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE MAA-3.....	63

3.4. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE MADA-4 (MISTURA DE EPÍMEROS).....	75
3.5. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE MAM-5	89
4. PARTE EXPERIMENTAL	100
4.1. MATERIAL BIOLÓGICO	100
4.2. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	101
4.2.1. CROMATOGRAFIA DE ADSORÇÃO	101
4.2.2. CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO.....	101
4.2.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	101
4.3. MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS	102
4.3.1. ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	102
4.3.2. ESPECTROMETRIA DE MASSA (EM)	103
4.3.3. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DE ABSORÇÃO DO INFRAVERMELHO (IV).....	103
4.4. ROTAÇÃO ÓPTICA.....	103
4.5. ATIVIDADES LEISHMANICIDA E ANTIFÚNGICA: ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	103
4.6. ESTUDOS DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE <i>MONANCHORA ARBUSCULA</i>	104
4.6.1. INVESTIGAÇÃO BIOGUIADA PRELIMINAR DO EXTRATO DE <i>M. ARBUSCULA</i>	104
4.6.1.1. Preparação do extrato bruto.....	104
4.6.1.2. Atividade citotóxica <i>in vitro</i> em linhagens de células tumorais.....	104
4.6.1.3. Partição líquido-líquido do extrato bruto.....	105
4.6.2. ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE <i>M. ARBUSCULA</i>	108
4.6.2.1. Fracionamento cromatográfico da fração diclorometano (MAD).....	108
4.6.2.1.1. Fracionamento cromatográfico da fração diclorometano II (MAD-II)	110
4.6.2.1.1.1. Tratamento cromatográfico da fração MAD-II (5-14)	110
4.6.2.1.1.2. Tratamento cromatográfico da fração MAD(II) (5-14) (4-5) e isolamento de MAD-1 (Mirabilina B) (Fluxograma 4.3, pág. 114).....	111
4.6.2.1.2. Fracionamento cromatográfico da fração diclorometano I (MAD-I).....	112
4.6.2.2. Fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila (MAA).....	115
4.6.2.2.1. Tratamento cromatográfico da fração MAA (11-14): isolamento de MAA-3 e MAA-4.....	116
4.6.2.2.2. Neutralização das frações MAA-2 e MAA-3, provenientes do HPLC	117
4.6.2.3. Tratamento cromatográfico das frações diclorometano (MAD-I, MAD-II) e acetato de etila (MAA)	120

4.6.2.3.1. Tratamento cromatográfico da fração MADA e isolamento de MADA-4.....	120
4.6.2.4. Fracionamento cromatográfico da fração metanólica (MAM).....	123
4.6.2.4.1. Tratamento cromatográfico da fração MAM (8-11) e isolamento de MAM-5	123
5. CONCLUSÃO	126
6. CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROMÉTRICOS	128
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição de amostras com significativa citotoxicidade em um <i>screening</i> pré-clínico realizado pelo US-NCI. O número absoluto de amostras está apresentado ao lado de cada barra com seu respectivo n° de porcentagem quanto a substâncias citotóxicas.....	2
Figura 1.1 – Espículas de esponjas, demonstrando variações em forma e tamanho (megaescleras e microescleras).....	5
Figura 1.2 – Desenho esquemático do sistema aquífero leuconóide.....	6
Figura 1.3 – Foto ilustrativa de <i>M. arbuscula</i> em seu habitat, cedida por E. Hajdu.....	8
Figura 1.4 – A, subtilóstilo coanossomal; B, subtilóstilo ectossomal; C, isoquela ancorada; D, quela sigmóide reduzida; E, sigma; F, extremidade de um microrábdo.....	8
Figura 1.5 – Estruturas de arabinonucleosídeos (a,b) e seus protótipos (c,d,e).....	9
Figura 1.6 – Estrutura química da monoalida.....	11
Figura 1.7 – Estrutura química da discodermolida.....	11
Figura 1.8 – Estrutura química da jaspamida.....	12
Figura 1.9 – Estrutura química da leucetamida A.....	12
Figura 1.10 – Estrutura química da isoptilocaulina.....	13
Figura 3.1 – Espectro de absorção na região do infravermelho (NaCl, cm ⁻¹) de MAD-1.....	42
Figura 3.2 - Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de MAD-1.....	42
Figura 3.3 - Espectro de RMN ¹³ C-CPD (125 MHz, CDCl ₃) de MAD-1.....	43
Figura 3.4 - Espectro RMN ¹³ C-DEPT 135° (125 MHz, CDCl ₃) de MAD-1.....	43
Figura 3.5 - Espectro de RMN HSQC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de MAD-1.....	44
Figura 3.6 - Espectro de massa (IE, 70 eV) de MAD-1.....	44
Figura 3.7 - Espectro de RMN ¹ H, ¹ H – COSY (500 MHz, CDCl ₃) de MAD-1.....	45
Figura 3.8 - Espectro de RMN HMBC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de MAD-1.....	46
Figura 3.9 - Espectro de RMN HMBC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) – expansão (δ _H 0,5-3,0/δ _C 15-50) de MAD-1.....	46
Figura 3.10 - Espectro de RMN – NOESY (500 MHz, CDCl ₃) de MAD-1.....	47
Figura 3.11 - Espectro de absorção na região do infravermelho (NaCl, cm ⁻¹)	

de MAA-2.....	55
Figura 3.12 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de MAA-2.....	55
Figura 3.13 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) – expansão (0,85-3,84 ppm) de MAA-2.....	56
Figura 3.14 – Espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, CDCl_3) de MAA-2.....	56
Figura 3.15 – Espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, CDCl_3) – expansão (10-45 ppm) de MAA-2.....	57
Figura 3.16 - Espectro de RMN HSQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de MAA-2.....	57
Figura 3.17 - Espectro HSQC editado ($\text{CH} + \text{CH}_3$) (500 e 125 MHz, CDCl_3) de MAA-2.....	58
Figura 3.18 - Espectro de RMN HSQC editado (CH_2) (500 e 125 MHz, CDCl_3) - expansão ($\delta_{\text{H}}1,0-2,5/\delta_{\text{C}}20-35$) de MAA-2.....	58
Figura 3.19 - Espectro de massa (IE, 70 eV) de MAA-2.....	59
Figura 3.20 - Espectro de RMN HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de MAA-2.....	59
Figura 3.21 - Espectro de RMN HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) – expansão ($\delta_{\text{H}}0,7-2,5/\delta_{\text{C}}10-45$) de MAA-2.....	60
Figura 3.22 - Espectro de RMN HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) – expansão ($\delta_{\text{H}}3,3-3,8/\delta_{\text{C}}65-85$) de MAA-2.....	60
Figura 3.23 - Espectro de RMN HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) – expansão ($\delta_{\text{H}}\delta3,6-4,3/\delta_{\text{C}}120-130$) de MAA-2.....	61
Figura 3.24 - Espectro de RMN HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) – expansão ($\delta_{\text{H}}0,7-2,5/\delta_{\text{C}}50-80$) de MAA-2.....	61
Figura 3.25 - Espectro de RMN NOESY (500 e 500 MHz, CDCl_3) – expansão ($\delta_{\text{H}}3,4-4,4/\delta_{\text{C}}1,2-2,4$) de MAA-2.....	62
Figura 3.26 – Espectro na região de absorção do infravermelho (NaCl , cm^{-1}) de MAA-3.....	69
Figura 3.27 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de MAA-3.....	69
Figura 2.28 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) – expansão (0,84-2,53 ppm) de MAA-3.....	70
Figura 3.29 – Espectro de RMN ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) de MAA-3.....	70
Figura 3.30 – Espectro de RMN HSQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de MAA-3.....	71
Figura 3.31 – Espectro de RMN HSQC editado ($\text{CH} + \text{CH}_3$) (500 e 125 MHz, CDCl_3) de MAA-3.....	71

Figura 3.32 – Espectro de RMN HSQC editado (CH ₂) (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de MAA-3.....	72
Figura 3.33 - Espectro de massa (IE, 70 eV) de MAA-3.....	72
Figura 3.34 – Espectro de RMN HMBC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) de MAA-3.....	73
Figura 3.35 – Espectro de RMN HMBC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) – expansão (δ_H 10-20/ δ_C 120-130) de MAA-3.....	73
Figura 3.36 – Espectro de RMN HMBC (500 e 125 MHz, CDCl ₃) – expansão (δ_H 3,6-3,8/ δ_C 120-125) de MAA-3.....	74
Figura 3.37 – Espectro de absorção na região do infravermelho (NaCl, cm ⁻¹) de MADA-4.....	82
Figura 3.38 – Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, C ₅ D ₅ N) de MADA-4.....	83
Figura 3.39 - Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, C ₅ D ₅ N) – expansão (0,75-2,87 ppm) de MADA-4.....	83
Figura 3.40 – Espectro de RMN ¹³ C-CPD (125 MHz, C ₅ D ₅ N) de MADA-4.....	84
Figura 3.41 – Espectro de RMN ¹³ C-CPD (125 MHz, C ₅ D ₅ N) – expansão (10-45 ppm) de MADA-4.....	84
Figura 3.42 – Espectro de RMN ¹³ C-DEPT 135° (125 MHz, C ₅ D ₅ N) de MADA-4.....	85
Figura 3.43 – Espectro de massa (IE, 70 eV) de MADA-4.....	85
Figura 3.44 – Espectro de RMN HSQC (500 e 125 MHz, C ₅ D ₅ N) de MADA-4.....	86
Figura 3.45 – Espectro de RMN HSQC (500 e 125 MHz, C ₅ D ₅ N) – expansão (δ_H 1,3-3,0/ δ_C 35-45) de MADA-4.....	86
Figura 3.46 – Espectro de RMN HMBC (500 e 125 MHz, C ₅ D ₅ N) de MADA-4.....	87
Figura 3.47 – Espectro de RMN HMBC (500 e 125 MHz, C ₅ D ₅ N) – expansão (δ_H 0,7-3,0/ δ_C 15-45) de MADA-4.....	87
Figura 3.48 – Espectro de RMN NOESY (500 x 500 MHz, C ₅ D ₅ N) de MADA-4.....	88
Figura 3.49 - Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) de MAM-5.....	95
Figura 3.50 - Espectro de RMN ¹³ C-CPD (125 MHz, CD ₃ OD) de MAM-5.....	95
Figura 3.51 - Espectro de RMN HSQC (500 e 125 MHz, CD ₃ OD) de MAM-5.....	96
Figura 3.52 - Espectro de massa (IE, 70 eV) de MAM-5.....	96
Figura 3.53 - Espectro de RMN ¹ H, ¹ H – COSY (500 MHz, CD ₃ OD) de MAM-5.....	97
Figura 3.54 - Espectro de RMN HMBC (500 e 125 MHz, CD ₃ OD) de MAM-5.....	97
Figura 3.55 - Espectro de RMN HMBC (500 e 125 MHz, CD ₃ OD) – expansão	

(δ_H de 0,8 – 1,4 / δ_C 11-50) de MAM-5.....	98
Figura 3.56 - Espectro de RMN NOESY (500 x 500 MHz, CD ₃ OD) de MAM-5.....	99
Figura 4.1 – Localização da área de coleta.....	100
Figura 4.2 – Cromatograma de obtenção de MAA-2 em fase reversa C-8.....	118
Figura 4.3 – Cromatograma de obtenção de MAA-3 em fase reversa C-8.....	118
Figura 4.4 – Cromatograma de obtenção de MAM-5 em fase reversa C-8.....	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Ocorrência de alcalóides guanidínicos organismos em marinhos.....	16
Tabela 3.1 – Comparação de dados de RMN ¹³ C e ¹ H de MAD-1 com dados da literatura.....	40
Tabela 3.2 - Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C e ¹ H de MAD-1, em CDCl ₃	41
Tabela 3.3 – Comparação de dados de RMN ¹³ C e ¹ H de MAA-2 com dados da literatura.....	53
Tabela 3.4 - Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C e ¹ H de MAA-2, em CDCl ₃	54
Tabela 3.5 – Comparação de dados de RMN ¹³ C e ¹ H de MAA-3 com dados da literatura	67
Tabela 3.6 - Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C e ¹ H de MAA-3, em CDCl ₃	68
Tabela 3.7 – Comparação de dados de RMN ¹ H e ¹³ C de MADA-4(1) com dados da literatura	80
Tabela 3.8 – Comparação de dados de RMN ¹ H e ¹³ C de MADA-4 (2) com dados da literatura	81
Tabela 3.9 – Comparação de dados de RMN ¹ H e ¹³ C de MAM-5 com dados da literatura.....	94
Tabela 4.1 – Linhagens de células utilizadas no ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i>	104
Tabela 4.2 – Frações provenientes da partição do extrato de <i>M. arbuscula</i>	105
Tabela 4.3 – Atividade citotóxica IC ₅₀ (µg/mL) do extrato bruto de <i>M. arbuscula</i> e as frações provenientes da partição.....	108
Tabela 4.4 – Descrição das frações do tratamento cromatográfico da fração diclorometano MAD.....	109
Tabela 4.5 – Atividade citotóxica IC ₅₀ (µg/mL) das frações diclorometano (MAD-I, MAD-II e MAD-III).....	109
Tabela 4.6 – Descrição das frações do tratamento cromatográfico de MAD-II.....	110
Tabela 4.7 – Descrição do gradiente de eluição do tratamento cromatográfico de MAD-II (5-14).....	110
Tabela 4.8 – Descrição do rendimento do tratamento cromatográfico de MAD-II.....	111
Tabela 4.9 – Descrição do gradiente de eluição do tratamento cromatográfico de MAD-II (5-14) (4-5).....	111
Tabela 4.10 – Descrição do rendimento do tratamento cromatográfico	

de MAD-II (5-14) (4-5).....	112
Tabela 4.11 – Descrição do gradiente de eluição do tratamento cromatográfico da fração diclorometano (MAD-I).....	113
Tabela 4.12 – Descrição do rendimento do tratamento cromatográfico da fração diclorometano (MAD-I).....	113
Tabela 4.13 – Descrição do gradiente de eluição do tratamento cromatográfico da fração acetato de etila MAA.....	115
Tabela 4.14 - Descrição do rendimento do tratamento cromatográfico da fração acetato de etila MAA.....	115
Tabela 4.15 – Descrição do gradiente de eluição do tratamento cromatográfico da fração MAA (11-14).....	116
Tabela 4.16 – Descrição do rendimento do tratamento cromatográfico da fração MAA (11-14).....	116
Tabela 4.17 - Descrição do gradiente de eluição do tratamento cromatográfico da fração MADA.....	120
Tabela 4.18 – Descrição do rendimento do tratamento cromatográfico da fração MADA.....	120
Tabela 4.19 – Descrição das frações e rendimento do tratamento cromatográfico da fração metanólica MAM.....	123
Tabela 4.20 - Descrição das frações e rendimento do tratamento cromatográfico de MAM (8-11).....	124

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 4.1 - Método de preparação do extrato bruto de <i>M. arbuscula</i>	106
Fluxograma 4.2 - Método de preparação das frações de <i>M. arbuscula</i>	107
Fluxograma 4.3 - Rota esquemática do isolamento do constituinte químico MAD-1 obtido a partir da fração diclorometano (MAD) de <i>M. arbuscula</i>	114
Fluxograma 4.4 - Rota esquemática do isolamento dos constituintes químicos MAA-2 e MAA-3, obtido a partir da fração acetato de etila (MAA) de <i>M. arbuscula</i>	119
Fluxograma 4.5 – Rota esquemática do isolamento do constituinte químico MADA-4, a partir das frações diclorometano (MAD) e acetato de etila (MAA) de <i>M. arbuscula</i>	122
Fluxograma 4.6 – Rota esquemática do isolamento do constituinte químico MAM-5 a partir da fração metanólica (MAM) de <i>M. arbuscula</i>	125

LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1 – Proposta mecanística para a fragmentação que justifica alguns picos registrados no espectro de massa de MAD-1.....	39
Quadro 3.2 – Proposta mecanística para a fragmentação que justifica alguns picos registrados no espectro de massa de MAA-2.....	52
Quadro 3.3 – Proposta mecanística para a fragmentação que justifica alguns picos registrados no espectro de massa de MAA-3.....	66
Quadro 3.4 – Proposta mecanística para a fragmentação que justifica alguns picos registrados no espectro de massa de MADA-4.....	78
Quadro 3.5 – Proposta mecanística para a fragmentação que justifica alguns picos registrados no espectro de massa de MAM-5.....	90
Quadro 5.1 – Estruturas dos constituintes químicos isolados de <i>Monanchora arbuscula</i>	125

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<i>J</i>	Constante de acoplamento
δ	Deslocamento químico
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
EM	Espectrometria de Massa
IV	Infravermelho
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CPD	Desacoplamento com Pulso Composto
COSY	^1H , ^1H Correlation Spectroscopy – Espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear de deslocamento químico entre prótios
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation – Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear entre carbono-13 e prótio, com detecção no canal do prótio
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence – Espectro de RMN bidimensional de correlação heteronuclear entre prótio ligado diretamente ao carbono-13, com detecção no canal do prótio
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
RMN ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
ppm	Partes por milhão
Hz	Hertz
CI₅₀	Concentração Inibitória média
US-NCI	United States National Cancer Institute (Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos)
MNRJ	Museu Nacional do Rio de Janeiro
IE	Impacto eletrônico
Rf	Fator de Retenção

RESUMO

Monanchora arbuscula (DUCHASSAING & MICHELOTTI, 1864) (Crambeidae) é uma esponja incrustante, maciça ou ramificada com até 15 cm de altura. Cor, variando de salmão a vermelho vivo ou rosa claro, provida de canais esbranquiçados conspícuos. Estudos anteriores de *M. arbuscula* levaram a obtenção de alguns alcalóides guanidínicos policíclicos; ptilocaulina, 8b-hidroxiptilocaulina, dehidrobartzelladina C, crambescidina 800 e isoptilocaulina. Neste trabalho, o extrato hidroalcoólico da esponja *M. arbuscula*, coletada no Parque Estadual Marinho “Pedra da Risca do Meio”, na costa Fortalezaense, foi particionado com CH₂Cl₂/H₂O (3:1) fornecendo assim o extrato bruto, o qual foi submetido a uma partição líquido-líquido utilizando os solventes éter de petróleo, diclorometano, acetato de etila e metanol. Sucessivas cromatografias em gel de sílica, SEPHADEX LH-20 e/ou HPLC das frações diclorometano, acetato de etila e metanol levaram ao isolamento dos alcalóides guanidínicos mirabilina B, 8b-hidroxiptilocaulina, ptilocaulina, 1,8a;8b,3a-desidro-8β-hidroxiptilocaulina, 1,8a;8b,3a-desidro-8α-hidroxiptilocaulina, 3,3a;8b,8a-desidro-8-hidroxiptilocaulina. Mirabilina B, 1,8a;8b,3a-desidro-8β-hidroxiptilocaulina e 1,8a;8b,3a-desidro-8α-hidroxiptilocaulina estão sendo citados pela primeira vez para a espécie e 3,3a;8b,8a-desidro-8-hidroxiptilocaulina, no melhor do nosso conhecimento, é inédito na literatura. Ensaio para a avaliação da atividade citotóxica frente as linhagens de células tumorais cólon (HCT-8), melanona (MADMB-435), leucemia (HL-60) e glioblastoma (SF-295), indicaram atividade para o extrato bruto, frações e os compostos isolados ptilocaulina e 8b-hidroxiptilocaulina. O alcalóide 8b-hidroxiptilocaulina mostrou-se ativo aos fungos *Microsporum canis* e *Trichophyton rubrum*, enquanto ptilocaulina ao *Microsporum canis*. Mirabilina B mostrou atividade leishmanicida frente a *Leishmania chagasi* e *amazonensis*. As estruturas das substâncias isoladas foram elucidadas através de métodos espectroscópicos, principalmente RMN, incluindo seqüências de pulsos uni e bidimensionais e comparação com dados da literatura.

ABSTRACT

Monanchora arbuscula (DUCHASSAING & MICHELOTTI, 1864) (Crambeidae) is an incrustant sponge, massive or branched with 15 cm high. Its color ranges from salmon to bright red or light pink with white conspicuous channels. Previous studies of *M. arbuscula* led to the isolation of some polycyclic guanidine alkaloids; ptilocaulin, 8b-hydroxyptilocaulin, dehydrobatzelladine C, crambescidin 800 and isoptilocaulin. In this work, the hydroethanol extract from *M. arbuscula* collected at “Pedra da Risca do Meio” Marine State Park, in Fortaleza coast zone was partitioned with CH₂Cl₂/H₂O (3:1) affording the crude extract which was submitted to liquid-liquid partition using petroleum-ether, dichloromethane, ethyl acetate and methanol as the solvents. Successive chromatography over silica gel, SEPHADEX LH-20 and/or HPLC of all solvent fractions led to the isolation of the guanidine alkaloids: mirabilin B, 8b β -hydroxyptilocaulin, ptilocaulin, 1,8a;8b,3a-didehydro-8 β -hydroxyptilocaulin, 1,8a;8b,3a-didehydro-8 α -hydroxyptilocaulin, 3,3a;8b,8a-didehydro-8-hydroxyptilocaulin. Mirabilin B, 1,8a;8b,3a-didehydro-8 β -hydroxyptilocaulin, 1,8a;8b,3a-didehydro-8 α -hydroxyptilocaulin are reported for the first time for the species while 3,3a;8b,8a-didehydro-8-hydroxyptilocaulin has not being reported in the literature yet. Pharmacological assays revealed weak citotoxic activity against 4 cancer cell lines: HCT-8 (human colon carcinoma), MADMB-435 (melanoma), HL-60 (human leukemia) and SF-295 (glioblastoma). The assays indicated activity for the crude extract, several fractions and the isolated compounds ptilocaulin and 8b β -hydroxyptilocaulin. The alkaloid 8b-hydroxyptilocaulin indicated antifungal activity against *Microsporum canis* and *Trichophyton rubrum*, while ptilocaulin against *Microsporum canis*, Mirabilin B antiprotozoal activity against *Leishmania chagasi* and *amazonensis*. Structure elucidation of the isolated substances was performed through spectroscopic methods, mainly NMR, including uni and bidimensional pulses sequences, and comparison with data from literature.

INTRODUÇÃO

Produtos Naturais Marinhos

A natureza é reconhecida desde a antiguidade como uma inestimável fonte de compostos bioativos. A enorme diversidade química, distribuída em milhões de espécies de plantas, animais, fungos e demais microrganismos, quer seja de origem terrestre como marinha, reflete o impacto da evolução na seleção e preservação da vida (Faulkner, 2000).

Os oceanos, os quais cobrem cerca de 70% da superfície terrestre, são habitados por aproximadamente 200.000 espécies de plantas e invertebrados marinhos, além de milhões de espécies de microrganismos (Pinto *et al.*, 2002). O processo de evolução e sobrevivência destas espécies, tem resultado em organismos produtores de substâncias de estruturas únicas, com diversas funções biológicas. O estudo das substâncias químicas produzidas pelos organismos marinhos constitui também, uma ferramenta fundamental para a compreensão da evolução e manutenção das comunidades marinhas, nos diferentes oceanos (Hay & Fenical, 1997).

O Brasil é reconhecido como um país privilegiado pela natureza, por sua grandeza litorânea e sua flora, detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida, com a maior biodiversidade do planeta (Pinto *et al.*, 2002).

Segundo Pinto e colaboradores (2002), a química de produtos naturais marinhos é bastante antiga, entretanto, foi somente a partir de 1960, quando houve um grande interesse e investimento por parte das indústrias farmacêuticas na busca por substâncias bioativas, que os organismos marinhos passaram a ser intensivamente investigados. Como consequência dos incessantes estudos, muitos organismos marinhos, especialmente as esponjas, corais, moluscos e algas, têm sido selecionados como as fontes mais promissoras de compostos bioativos, por possuírem a peculiaridade de elaborarem metabólitos especiais de estruturas químicas incomuns.

Nos últimos 50 anos, cerca de 10.000 produtos naturais marinhos foram isolados, muitos dos quais com atividades biológicas, incluindo acetogeninas, policetídeos, terpenos, alcalóides, peptídeos e metabólitos de origem biossintética mista (Pinto *et al.*, 2002).

Além das atividades citotóxica e anti-câncer, os produtos naturais marinhos vêm ganhando espaço em outras áreas da farmacologia, particularmente como antiinflamatórios, analgésicos, imunossuppressores, antialérgicos, antiprotozoários, antibióticos e antivirais (Newman e Cragg, 2004).

Introdução

Algumas das atividades mais comumente atribuídas aos produtos naturais marinhos são as de mediação na reprodução, de defesa contra potenciais predadores, patógenos, bioincrustação ou competidores de substrato. Porém, a partir da década de 90, que estas funções ecológicas começaram a ser comprovadas experimentalmente, revelando papéis importantes na estruturação dos ecossistemas e dando origem a novas hipóteses (Pinto, *et al.*, 2002).

Entre o grupo de invertebrados marinhos, formados por tunicados, briozoários e esponjas, reconhecidos como produtores de metabólitos secundários bioativos, destacam-se as esponjas, como uma das mais promissoras fontes de compostos de importância terapêutica. O fato de serem animais sésseis e de corpo mole, e mesmo assim serem abundantes, sugere a presença de um efetivo mecanismo de defesa química para garantir a sobrevivência (Pawlik, 1993; Munro *et al.*, 1999). A citotoxicidade destaca-se como uma das atividades mais freqüentes em compostos de origem marinha (Jimenez, 2004).

Dados estatísticos fornecidos pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (US-NCI) revelam que os invertebrados marinhos são os responsáveis pelo maior número de substâncias citotóxicas, entre cinco os grandes grupos avaliados, conforme pode ser verificado na Figura 1, (Jimenez, 2004).

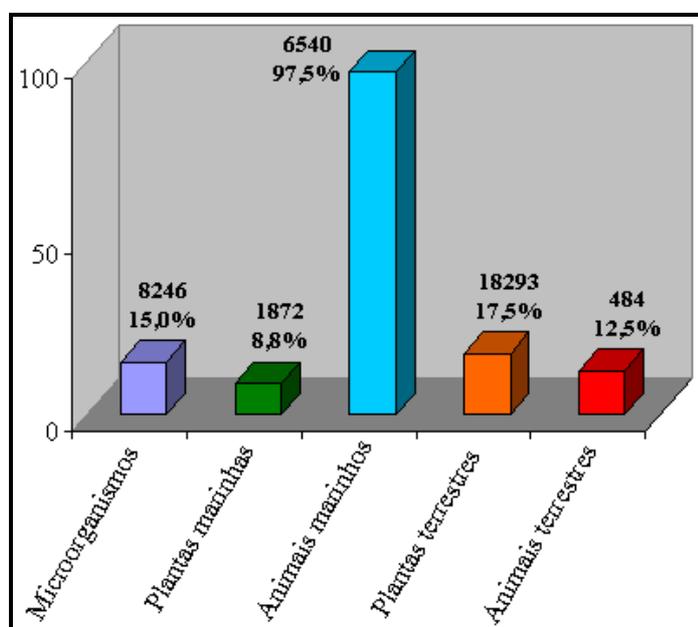


Figura 1 - Distribuição de amostras com significativa citotoxicidade em um *screening* pré-clínico realizado pelo US-NCI. O número absoluto de amostras está apresentado acima de cada barra com seu respectivo n° de porcentagem quanto a substâncias citotóxicas.

Introdução

Embora o litoral brasileiro, com cerca de 8000 km, seja o segundo mais extenso depois da Austrália, a química de produtos naturais marinhos no Brasil ainda é pouco explorada, apesar dos esforços despendidos por pesquisadores brasileiros na última década. Um apanhado dos estudos na área tem 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 3000 km de extensão, ocupar a maior parte do litoral tropical brasileiro, este permanece praticamente inexplorado pelos grupos brasileiros de pesquisas que estudam produtos naturais. A costa cearense, com 573 km de extensão e portadora de uma rica biodiversidade (Jimenez, 2004), completamente inexplorada do ponto de vista químico, é, portanto, uma fonte bastante atraente para estudos. Como consequência de uma estreita colaboração entre o grupo de produtos naturais desse programa de Pós-Graduação e professores pesquisadores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, na área de oncologia, em particular, a prof^ª. Letícia Veras Costa Lotufo iniciou-se o estudo interdisciplinar com a esponja *Monanchora arbuscula*, coletada no litoral cearense.

No presente trabalho, foi investigada a composição química do extrato bruto bioativo de *Monanchora arbuscula*, com vista ao isolamento e caracterização estrutural de seus metabólitos secundários, bem como avaliação do potencial anticâncer das substâncias obtidas.

Este trabalho é constituído por seis capítulos dispostos da seguinte forma: Capítulo 01 – Considerações Gerais; Capítulo 02 – Revisão Bibliográfica; Capítulo 03 – Determinação Estrutural; Capítulo 04 – Parte Experimental; Capítulo 05 – Conclusões; Capítulo 06 – Constantes Físicas e Dados Espectrométricos. No final deste trabalho foram citadas as referências bibliográficas utilizadas.

OBJETIVOS**1 - Geral**

Este trabalho, o primeiro em Química de Produtos Naturais Marinhos, desenvolvido no Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica da UFC, tem como finalidade investigar a constituição química de *Monanchora arbuscula* (Crambeidae), originária do litoral cearense, bem como avaliar o potencial antiproliferativo desta espécie frente a células tumorais humanas.

2 – Específicos

- Isolar os metabólitos especiais de *M. arbuscula* utilizando diversas técnicas cromatográficas;
- Elucidar as estruturas moleculares dos constituintes químicos isolados, empregando métodos espectroscópicos;
- Avaliar as propriedades citotóxicas dos constituintes químicos obtidos;
- Contribuir com a quimiotaxonomia do gênero *Monanchora*, através do conhecimento gerado;
- Contribuir com a implementação da linha de pesquisa em Química de Produtos Naturais Marinhos, no Curso de Pós-Graduação em Química Orgânica.

Capítulo 1

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Esponjas

As esponjas, as quais constituem o filo Porífero do reino Animalia, são organismos bastante primitivos. O registro fóssil data as esponjas desde a era Pré-Cambriana ou Neoproterozóico. Existem mais de 15.000 espécies de esponjas catalogadas que podem apresentar-se em diferentes formas, dimensões, cores e hábitos, e serem encontradas desde a superfície da água até mais de 8.000 metros de profundidade (www.acd.ufrj.br/labpor).

Segundo Ruppert e Barnes (1996), as esponjas estão entre os animais mais simples, com tecidos parcialmente diferenciados (parazoas), porém sem músculos, sem sistema nervoso, nem órgãos internos. Apesar de existirem diversas variações, a sustentação das esponjas é feita por um esqueleto mineral composto por espículas (Fig. 1.1), estruturas de sílica ou carbonato de cálcio cujo tamanho pode variar de poucos micrômetros a alguns centímetros e são classificadas de acordo com a complexidade do seu sistema aquífero (conjunto de canais e câmaras), cujo padrão de organização encontra-se do mais simples para o mais complexo, em asconóides, siconóides e leuconóides.

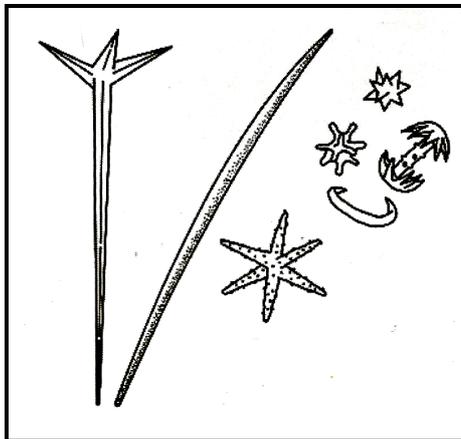


Figura 1.1 – Espículas de esponjas, demonstrando variações em forma e tamanho (megaescleras e microescleras). Fonte – (Ruppert e Barnes,1996).

A superfície destes animais é completamente perfurada por pequenos orifícios, os óstios, por isso, o nome Porífero (significa portador de poros). Estes animais utilizam células flageladas chamadas coanócitos para promover a circulação da água através de um sistema de canais exclusivo do filo, o sistema aquífero, ao redor do qual seu corpo é

Considerações Gerais – Capítulo 1

construído. Esta corrente de água traz partículas orgânicas que são filtradas e digeridas e circula pelo animal entrando pelos óstios, os quais se abrem formando o átrio (ou espongiocelo) e finalmente saindo através de uma abertura maior, o ósculo. Este sistema de canais é uma solução adaptativa desenvolvida por estes animais bentônicos para alimentação do tipo filtração (Wilke, 2005).

A sistemática divide, atualmente, o filo Porifera em quatro classes: Calcareae, Hexactinellida, Demospongiae e Sclerospongiae. A espécie em estudo, *Monanchora arbuscula*, pertence à classe Demospongiae a qual inclui 90% das espécies (Ruppert & Barnes, 1996) e é classificada como uma esponja do tipo leuconóide (Fig. 1.2).

Esponjas, do tipo leuconóides, possuem um sistema aquífero de alto grau de dobras, sendo o tipo mais complexo, apresentando canais flagelados que se transformam em câmaras flageladas (câmaras vibráteis), as quais se comunicam com o átrio através de finos canais; a cavidade atrial reduz-se a canais aquíferos, que se abrem no ósculo (www.acd.ufrj.br/labpor).

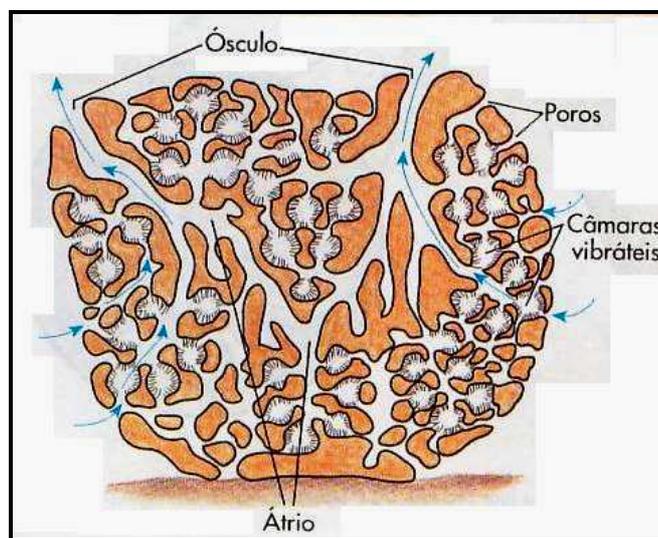


Figura 1.2 - Desenho esquemático do sistema aquífero leuconóide. Fonte: http://fossil.uc.pt/imags/esponja_esquema.jpg, acessado em 11/09/2007

As esponjas podem se reproduzir de forma sexuada ou assexuadamente. A maioria das esponjas são hermafroditas e o esperma sai de uma esponja para outra através das correntes do sistema aquífero. A reprodução assexuada se dá por regeneração, brotamento ou gemulação (Ruppert & Barnes, 1996).

1.1. Considerações Taxonômicas

1.1.1. Considerações sobre família Crambeidae

A família Crambeidae Lévi, reconhecida em 1963 é composta por quatro (4) gêneros representados por esponjas marinhas que predominam em águas rasas, as quais apresentam subtilóstilos como megacleras (espículas maiores que formam os elementos de sustentação principais no esqueleto) ectossomais e microcleras (são espículas menores) (Van Soest, 2002).

1.1.2. Considerações sobre gênero *Monanchora*

O gênero *Monanchora* é representado por nove (9) espécies, das quais apenas *Monanchora arbuscula* está amplamente distribuída em todo o Atlântico Ocidental, da Flórida até Santa Catarina. Entretanto, em coletas recentes, realizadas no litoral norte de São Paulo e na região dos canais da costa chilena, foram encontradas três possíveis novas espécies de *Monanchora*, material depositado e disponível para estudo na coleção MNRJ (www.acd.ufrj.br/labpor.)

É importante ressaltar, que em todo o Atlântico Ocidental, da Flórida até Santa Catarina apenas duas espécies de *Monanchora* Carter, 1883 são atualmente reconhecidas: *M. arbuscula* (Duchassaing & Michelotti, 1864) (sinônimos: *Echinostylinos unguiferus* De Laubenfels, 1953 e *M. barbadensis* Hechtel, 1969) e *M. aff. clathrata*, como também uma série de espécies não determinadas (Esteves, *et al.*, 2007).

1.1.3. Considerações sobre a *Monanchora arbuscula*

Segundo Esteves e colaboradores (2007), *Monanchora arbuscula* pertencente à família Crambeidae – Ordem/Poecilosclerida, é uma esponja incrustante, maciça ou ramificada com até 15 cm de altura. Cor varia de salmão a vermelho vivo ou rosa claro, provida de canais esbranquiçados conspícuos (Fig.1.3, pág.8). Esqueleto plumoreticulado em espécimes maciços a ramificados e plumoso a himedesmióide em espécimes incrustantes a incrustante-espessos. Com espécimes ramificados, maciços ou incrustante-espessos, normalmente apresentando um conjunto espicular formado unicamente por finos subtilóstilos ectossomais. Sigmas ou quelas sigmóides reduzidas são raras e microrábdo espinados encontram-se ausentes. Espécimes incrustantes apresentam duas categorias de

Oliveira, J. R.

Considerações Gerais – Capítulo 1

subtilóstilos, isoquelas ancoradas, sigmas ou quelas sigmóides reduzidas abundantes e, raramente, microrábdo. As microscleras normalmente ocorrem em diferentes combinações, como: subtilóstilos coanossomais (Fig. 1.4A), subtilóstilos ectossomais (Fig. 1.4B), isoquelas ancoradas (Fig. 1.4C), quelas sigmóides reduzidas (Fig. 1.4D), sigmas (Fig. 1.4E), microrábdo espinados (Fig. 1.4F).



Figura 1.3 - Foto ilustrativa de *M. arbuscula* em seu habitat natural, cedida por E. Hajdu.

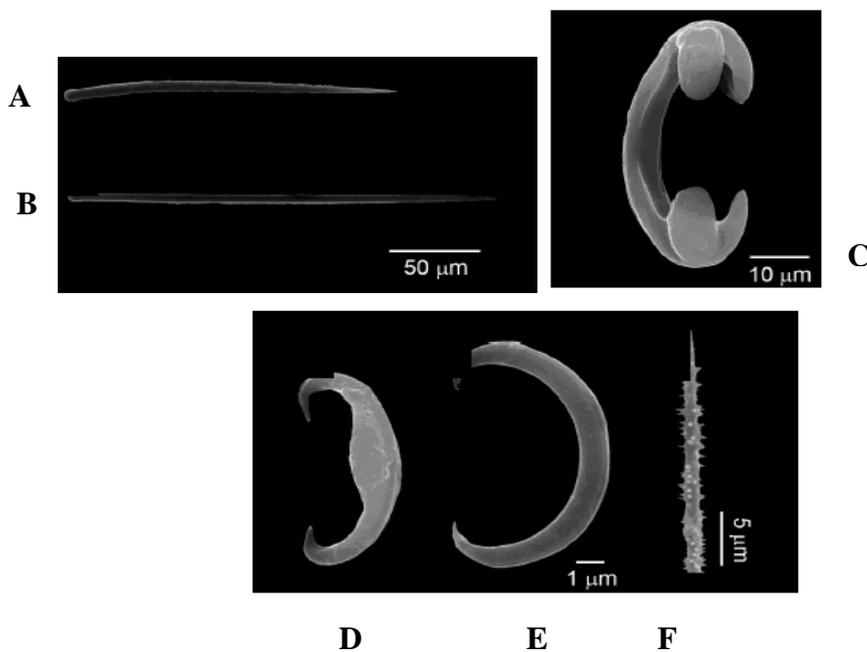


Figura 1.4 - A, subtilóstilo coanossomal; B, subtilóstilo ectossomal; C, isoquela ancorada; D, quela sigmóide reduzida; E, sigma; F, extremidade de um microrábdo. Fonte - (Esteves et al., 2007).

1.2. Considerações Farmacológicas

O interesse no potencial biomédico dos produtos naturais marinhos começou com o trabalho de Bergmann e Feeney, no início da década de 50, com o isolamento dos arabinonucleosídeos espongotimidina (ARA-T) (Fig. 1.5a) e espongouridina (ARA-U) (Fig. 1.5b) obtidos a partir da esponja caribenha *Cryptotethya crypta* (Tethyidae), (Pinto *et al.*, 2002). Tais nucleosídeos serviram de protótipo para o desenvolvimento de uma nova classe de análogos - Ara-A (Fig.1.5c) (Vidarabina, Vidarabin Thilo®) e Ara-C (Fig. 1.5d) (Citarabina, Alexan®, Udicil®). Atualmente, estes são os únicos derivados de produtos naturais marinhos utilizados em tratamentos clínicos de viroses e tumores (Wilke, 2005). Estes compostos, também, serviram de protótipo para sintetizar a azidotimidina (AZT) (Fig. 1.5e) utilizado em tratamento de pacientes portadores do retrovírus HIV (Wilke, 2005).

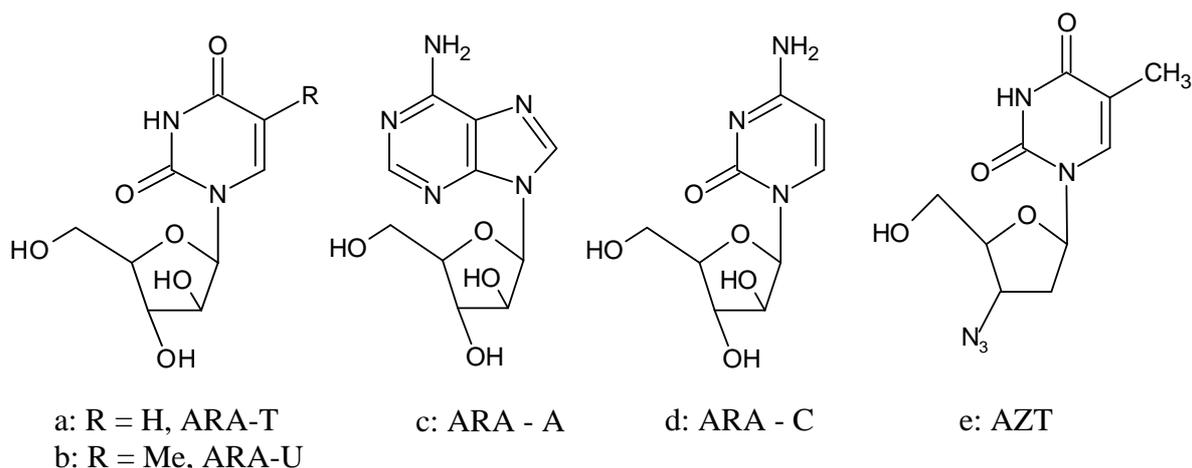


Figura 1.5 – Estruturas de arabinonucleosídeos (a e b) e seus protótipos (c, d, e).

Em relação a compostos de interesse farmacológico, as esponjas ocupam destacada posição. Estes organismos bentônicos ocupam um ambiente onde a competição por espaço é extremamente agressiva. Isto faz com que as esponjas produzam substâncias tóxicas, ou alelopáticas, que fornecem a vantagem competitiva necessária contra espécies concorrentes ou predadoras (Becerro *et al.*, 1997; Thacker *et al.*, 1998). Estes organismos possuem, reconhecidamente, um metabolismo secundário extremamente diversificado e também uma imensa variedade de microrganismos associados, com os quais desenvolvem relações

competitivas, favorecendo a formação de novos metabólitos especiais (www.acd.ufrj.br/labpor).

A toxicidade de extratos de esponjas já foi bem relatada a partir de vários programas de triagem de atividades biológicas, caracterizando suas atividades citotóxicas, ictiotóxicas, antibacterianas, antifúngicas, neurotóxicas, e tóxicas de uma forma geral (Almeida *et al.*, 1997). Em vista disso, as esponjas constituem um dos grupos mais promissores no que diz respeito à produção de novos compostos de interesse medicinal. As esponjas tem sido um dos organismos mais estudados do ponto de vista químico e biológico (Dumdei *et al.*, 1997). Como consequência, nos últimos 30 anos, centenas de compostos foram isoladas a partir de esponjas marinhas, muito destas substâncias foram identificadas e apresentam altos níveis de atividades biológicas e farmacológicas (Adaíla & Berlinck, 1997).

Diversos grupos de pesquisas, inclusive de interesse industrial, como a Hoffmann-La Roche (através de sua divisão na Austrália, o Roche Research Institute of Marine Pharmacology) e, mais recentemente, o Harbor Branch Oceanographic Institute, e as companhias SeaPharm e PharmaMar, têm dedicado crescentes esforços ao estudo químico de esponjas. Um exemplo claro desses esforços pode ser notado nas avaliações realizadas pelo NCI (National Cancer Institute, EUA), relativas à obtenção de extratos orgânicos de origem natural marinha. Dentre os diversos grupos de organismos pesquisados, as esponjas são os que apresentam o maior número de extratos com altas porcentagens de atividade anti-tumoral (Munro *et al.*, 1994).

Além da atividade anticâncer, os produtos naturais marinhos vêm sendo também investigados como potenciais imunossupressores. Por exemplo, a monoalida (Fig.1.6, pág.11) isolada da esponja *Luffariella variabilis* (Wilke, 2005).

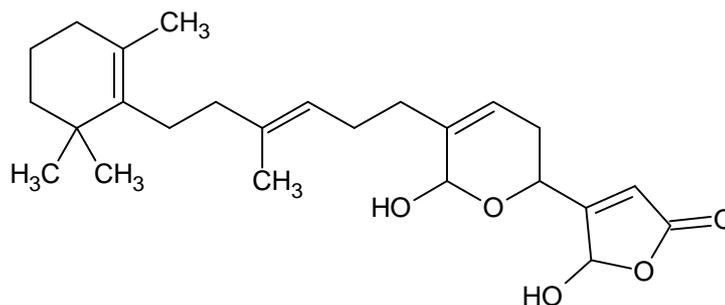


Figura 1.6 – Estrutura química da monoalida.

Muitos compostos derivados de esponjas têm se destacado como promissores no desenvolvimento de novas drogas, um bom exemplo é a discodermolida (Fig. 1.7), uma lactona poli-hidroxilada isolada da esponja caribenha *Discodermia dissoluta*, que exibiu uma potente atividade imunossupressora, sendo de 100 a 1000 vezes mais potente em ensaios *in vivo* que a ciclosporina, e igual ou superior ao FK506, dois importantes agentes imunossupressores em uso clínico (Wilke, 2005). Estudos posteriores mostraram também que a discodermolida possui forte citotoxicidade e é capaz de ligar-se aos microtúbulos mais fortemente que o taxol (Wilke, 2005).

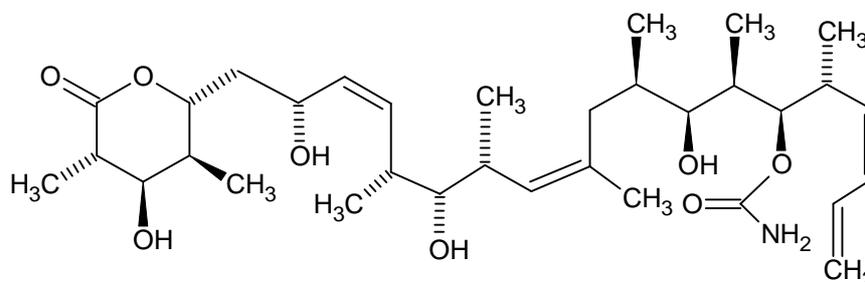


Figura 1.7 - Estrutura química da discodermolida.

Também, vêm tendo destaque estudos sobre o potencial anti-infeccioso das esponjas marinhas a partir da jaspamida (Fig. 1.8, pág.12) isolada da esponja *Jaspis* sp., a qual é um potente antifúngico tóxico contra *Cândida albicans* (Wilke, 2005).

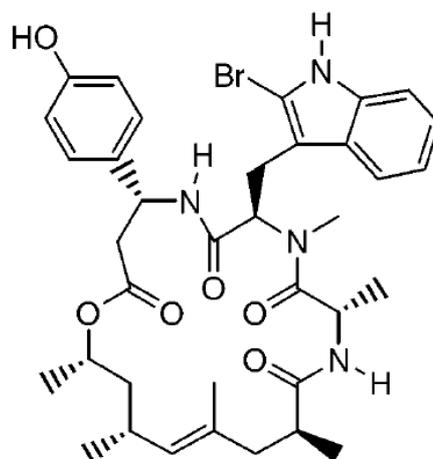


Figura 1.8 – Estrutura química da jaspamida.

Como agente antiinflamatório, antagonista dos receptores de leucotrieno B₄, destaca-se a leucetamina A (Fig. 1.9), isolada da esponja *Leucetta microraphis*, (Wilke, 2005).

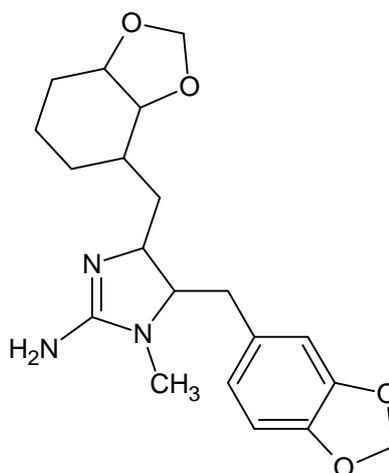


Figura 1.9 – Estrutura química da leucetamina A.

Em 2002, no Brasil foi apresentado o primeiro *screening* de 300 extratos brutos obtidos a partir de esponjas, ascídias, briozoários e octocorais marinhos contra células cancerígenas, como também, outros testes farmacológicos, onde os extratos das esponjas apresentaram resultados bastante satisfatórios (Berlinck *et al.*, 2004).

Considerações Gerais – Capítulo 1

Segundo a literatura, compostos químicos isolados a partir de espécies do gênero *Monanchora* apresentam fortes atividades, tanto citotóxicas, como também, antimicrobiana, anti-HIV, antituberculose, antifúngica, antiprotozoária e antimalária. Recentemente, foi relatado que o extrato metanólico da esponja *Monanchora arbuscula* apresentou potente atividade antibacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv e citotóxica (Kossuga et al., 2007). Vale destacar que do mesmo extrato foi isolado o alcalóide guanidínico, isoptilocalina, (Fig. 1.10) que mostrou ser um potente antibiótico contra linhagens resistentes de *Staphylococcus aureus*, causadoras das infecções hospitalares (Kossuga et al., 2007).

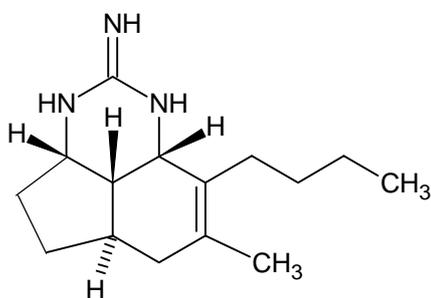


Figura 1.10 – Estrutura química da isoptilocalina

Capítulo 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE A OCORRÊNCIA DE ALCALÓIDES GUANIDÍNICOS EM ORGANISMOS MARINHOS

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE A OCORRÊNCIA DE ALCALÓIDES GUANIDÍNICOS EM ORGANISMOS MARINHOS

A prospecção química do extrato etanólico da esponja *Monanchora arbuscula*, coletada no Parque Estadual Marinho da “Pedra da Risca do Meio”, uma unidade de conservação marinha a 10 milhas náuticas do Porto do Mucuripe, Fortaleza, resultou no isolamento e caracterização de 6 alcalóides guanidínicos. De fato, Berlinck e Kossuga (2007) mostraram que estudos químicos anteriores, realizados com esponjas do gênero *Monanchora*, são uma rica fonte de alcalóides guanidínicos. Estes encontrados, aliado aos nossos resultados, motivaram a realização de um levantamento bibliográfico sobre a ocorrência de alcalóides guanidínicos a partir de fontes marinhas.

Devido ao grande leque de atividades biológicas relatadas na literatura para esta classe de compostos, bem como, as atividades apresentadas pelos constituintes químicos isolados no presente trabalho, foram discutidos também, alguns aspectos farmacológicos desta classe de metabólitos secundários. Os dados apresentados nesta revisão foram coletados de artigos publicados até junho de 2008, levantados de pesquisas realizadas nos portais de pesquisas científicas *Scifinder* e [http:// www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

2.1. Constituição química e importância biológica

Com base na pesquisa bibliográfica realizada cento e vinte oito (126) alcalóides guanidínicos foram isolados de organismos marinhos e estão apresentados na Tabela 2.1, pág. 16. Conforme pode ser verificado, estes constituintes químicos foram isolados particularmente a partir de poríferos (esponjas), haja vista que das 45 espécies marinhas sumariadas na Tabela 2.1, quarenta e duas (42) são esponjas, uma (1) é ascídia e duas (2) são estrelas do mar.

Verificou-se que a classe de produtos naturais dominante nos poríferos é a dos alcalóides, tanto guanidínicos (Van Soest, *et al.*, 1996), como também, alcalóides pirroloquinolínicos (Van Soest, *et al.*, 1996) e alquilpiridínicos (Almeida, *et al.*, 1997). Dos guanidínicos, destacam-se os policíclicos, que segundo Hua *et al.*, (2004), constituem a classe de metabólitos secundários elaborados pelas esponjas, que apresentam maior número de atividades biológicas.

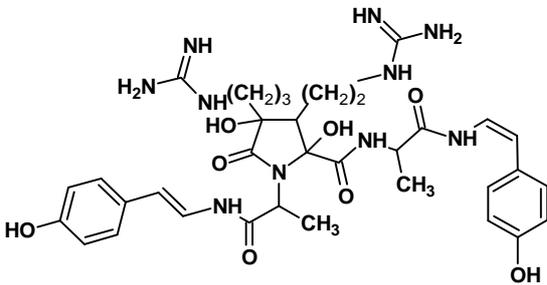
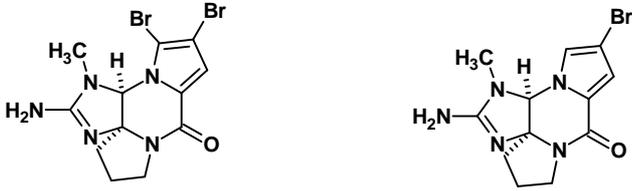
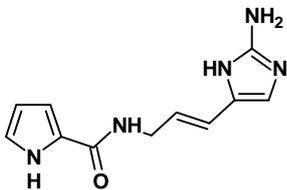
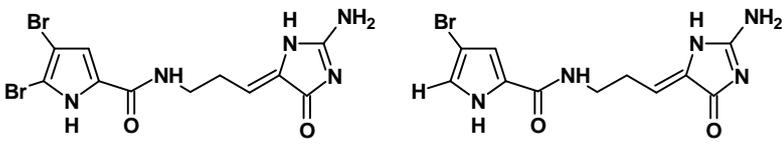
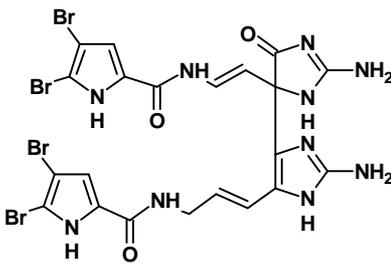
Entre os muitos alcalóides bioativos, destacam-se as ptilocaulinas (**32, 36, 37, 39**), crambescidinas (**35, 39, 62-67**), ptilomicalina A (**34**), e batzelladinas (**42, 79, 86-88**), as

Oliveira, J. R.

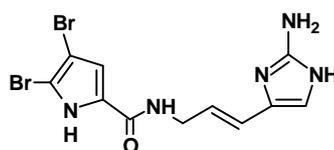
quais foram isoladas a partir de esponjas marinhas dos gêneros *Batzella*, *Monanchora*, *Crambe* e *Ptilocaulis* e ainda estrelas do mar *Fromia monilis* e *Celerina heffernani*. Esses metabólitos secundários apresentaram diversas atividades biológicas incluindo citotóxica, antifúngica e anti-viral, e ainda se mostraram importantes inibidores do vírus HIV, causador da AIDS (Hua et al., 2007). Esta última atividade com destaque para as batzelladinas A (**40**) e B (**41**) (Gallimore, Kelly e Scheuer, 2005).

A mirabilina B (**28**) isolada a partir de *Monanchora unguifera* exibiu atividade antifúngica e anti-protozoária. Já a mistura de epímeros, isolada da mesma espécie, 1,8a;8b,3a-desidro-8 β -hidroxiptilocaulina (**80**) e 1,8a;8b,3a-desidro-8 α -hidroxiptilocaulina (**81**) mostrou atividade anti-protozoária (Hua et al., 2004). As neofolitispates 1 (**95**), 2 (**96**) e 3 (**97**) mostraram atividade antifúngica (Venkateswarlu et al., 1999), as aplisillamidas A (**98**) e B (**99**) antimicrobiana (Honma et al., 1995), as netaminas C (**51**) e D (**52**) citotóxica (Sorek et al., 2006), as phloeodictinas (**100-108**) citotóxica e antibacteriana (Kourany Lefoll et al., 1994), enquanto os orthidinas (**12-16**) e tubastrina (**11**) revelaram atividade antiinflamatória (Pearce et al., 2008).

Tabela 2.1 - Ocorrência de alcalóides guanidínicos em organismos marinhos.

Espécie	Estrutura	Ref.
<i>Anchinoe tenacior</i>	 <p>Anchinopeptolida A (1)</p>	Casapullo et al., 1993
<i>Agelas</i> sp	 <p>(-)-7-N-Metildibromophakellina (2)</p> <p>(-)-7-N-Etilmonobromophakellina (3)</p>	Gautschi et al., 2004
<i>Agelas clathrodes</i>	 <p>Clathrodina (4)</p>	Morales e Rodriguez, 1991
<i>Agelas clathrodes, confifera, dispa e longissima</i>	 <p>Discapamida A (5)</p> <p>Discapamida B (6)</p>	Berlinck, 1999
<i>Agelas mauritiana</i>	 <p>Mauritiamina (7)</p>	Berlinck, 1999

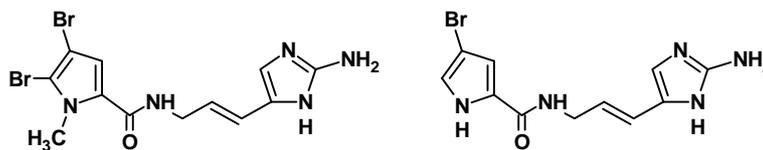
*Agelas
oroides*



Gautschi et al.,
2004

Oroidina (8)

*Agelas
sventres*

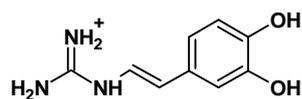


Assmann, Zea
e Köck, 2001

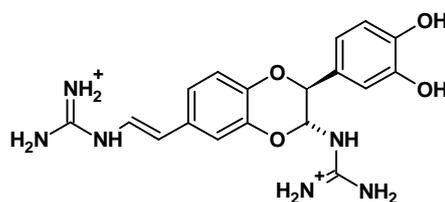
Sventrina (9)

Himenidina (10)

Oroidina (8)



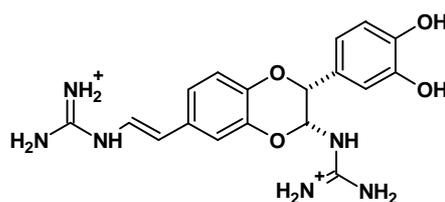
Tubastrina (11)



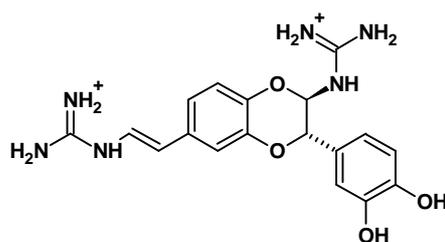
Orthidina A (12)

*Aplidium
orthium*

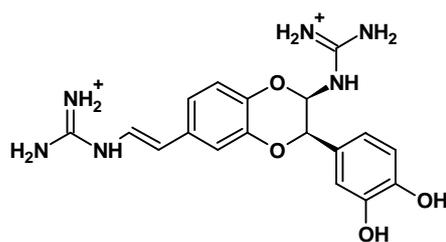
Pearce et al.,
2008



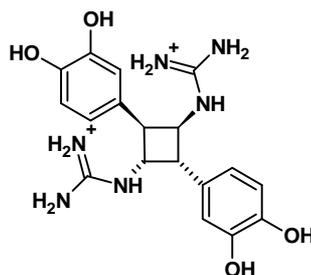
Orthidina B (13)



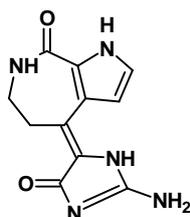
Orthidina C (14)



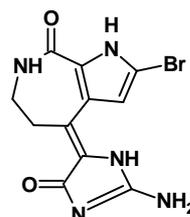
Orthidina D (15)

Aplidium orthium

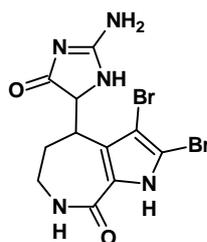
Orthidina E (16)

Pearce et al.,
2008

Debromohimentialdisina (17)

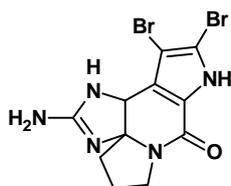


Himentialdisina (18)

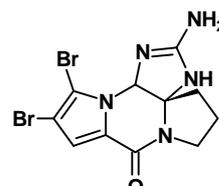
Axinella carteri

3-Bromohimentialdisina (19)

Supriyono et al., 1995

Axinella vacoleti

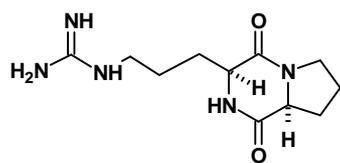
Dibromoisophakellina (20)



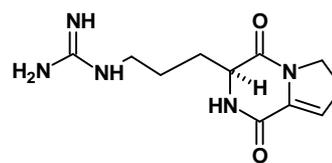
Dibromophakellina (21)

Gautschi et al.,
2004

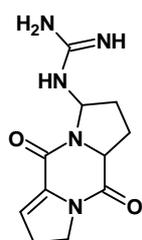
Himenidina (10)



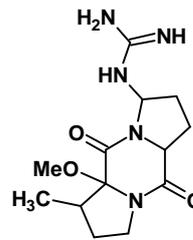
Verpacamida I (22)



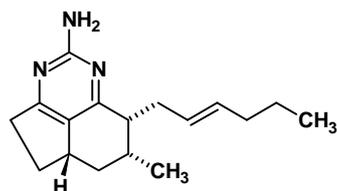
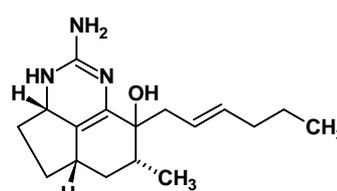
Verpacamida II (24)

Axinella vaceleti

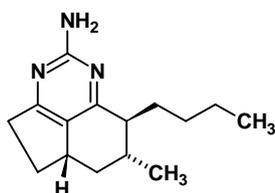
Verpacamida III (23)



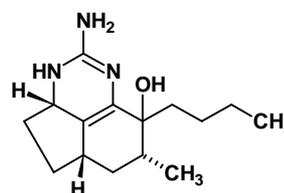
Verpacamida IV (25)

Vergne et al.,
2006Mirabilina A (26) e estereoisômero
C (27)

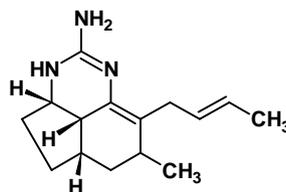
Mirabilina D (29)

Arenochalina mirabilis

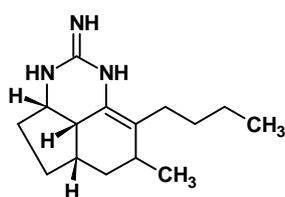
Mirabilina B (28)



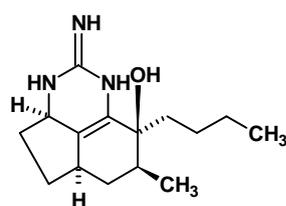
Mirabilina E (30)

Barrow et al.,
1996

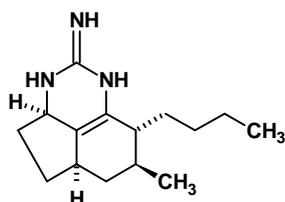
Mirabilina F (31)



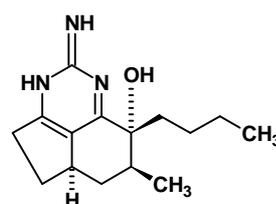
Ptilocalina (32)



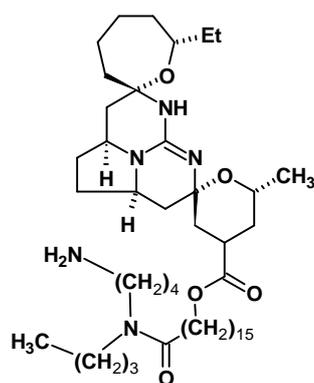
8a, 8b-Desidro-8-hidroxiptilocalina (36)

Patil et al.,
1997*Batzella* sp

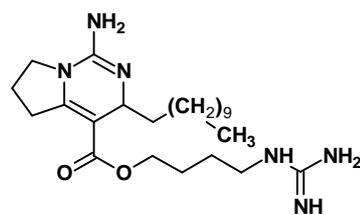
8a,8b-Desidroptilocalina (33)



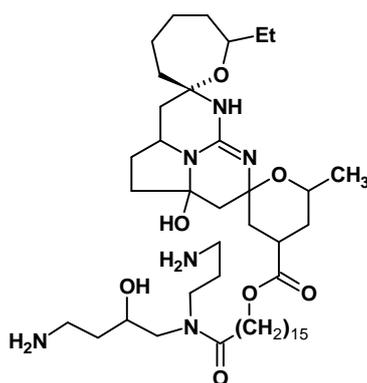
1, 8a; 8b, 3a-Desidro-8-hidroxiptilocalina (37)



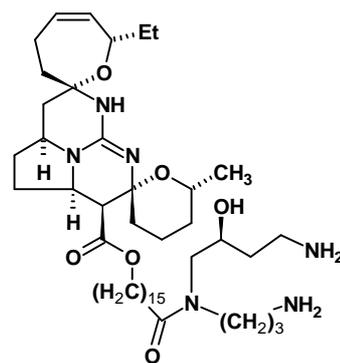
Ptilomicalina A (34)



Crambescina A (38)

Batzella sp

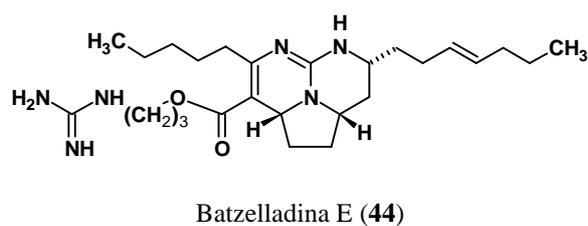
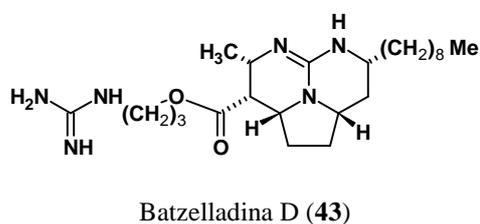
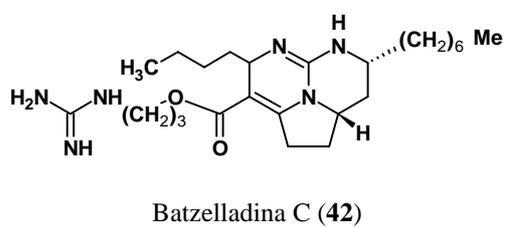
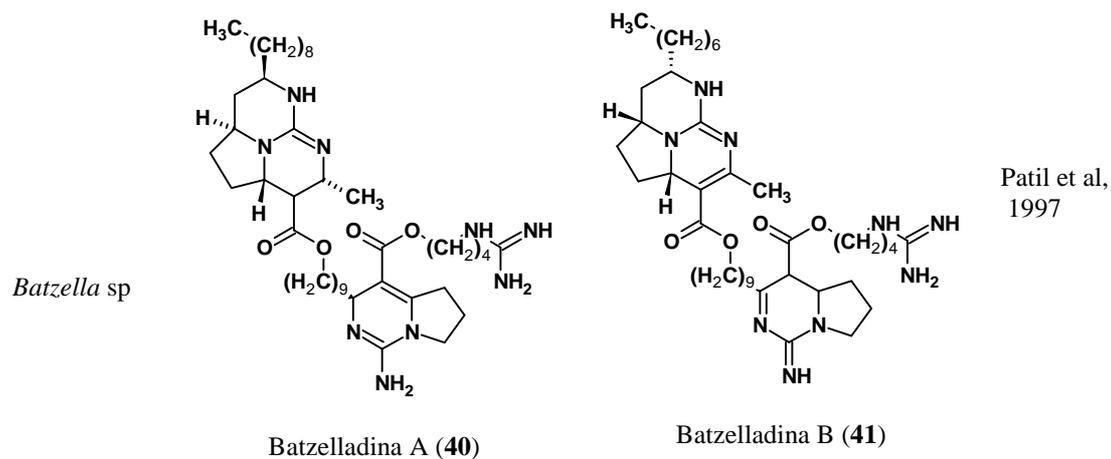
Crambescidina 816 (35)



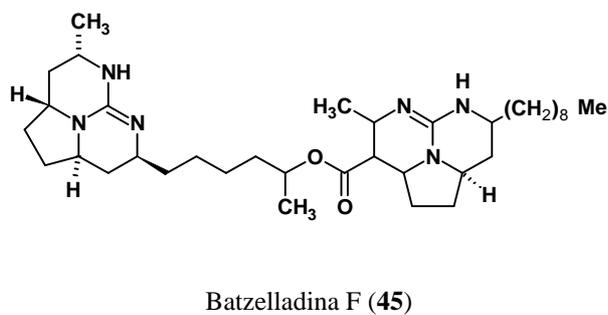
Crambescidina 800 (39)

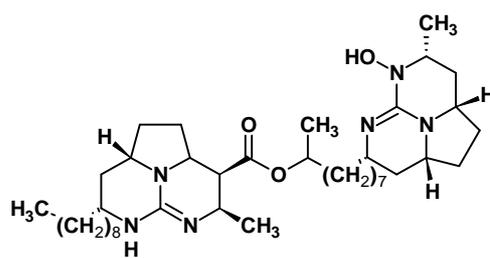
Patil et al.,
1997

Mirabilina B (28)

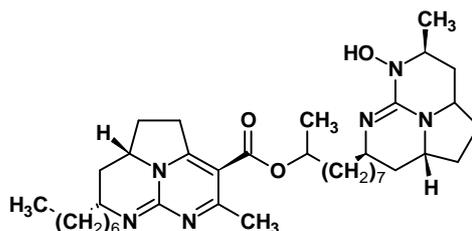


Batzella sp

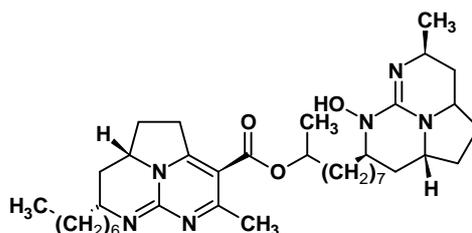




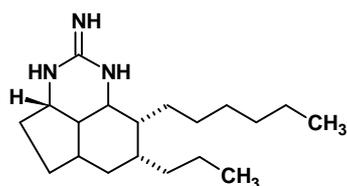
Batzelladina G (46)

Batzella sp

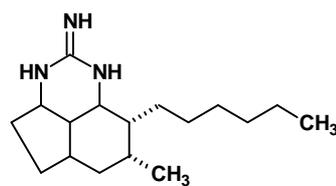
Batzelladina H (47)

Patil et al,
1997

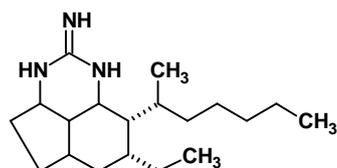
Batzelladina I (48)



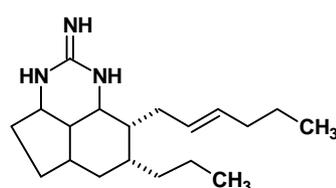
Netamina A (49)



Netamina C (51)

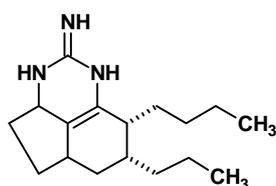
*Biemna
laboutei*Sorek et al.,
2006

Netamina B (50)

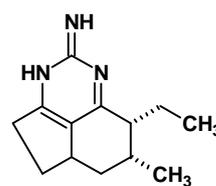


Netamina D (52)

*Bienna
laboutei*

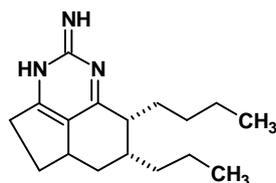


Netamina E (53)

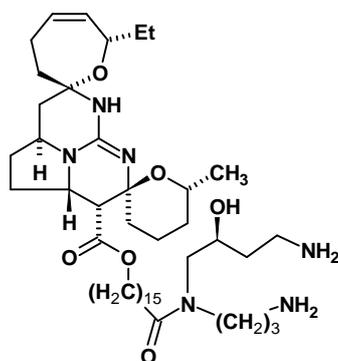


Netamina F (54)

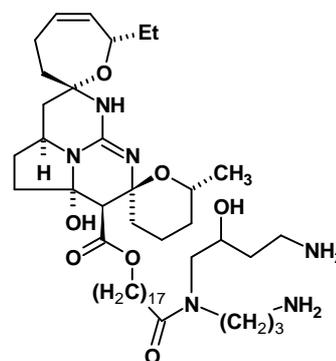
Sorek et al.,
2006



Netamina G (55)



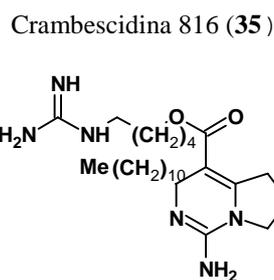
Isocrambescidina 800 (56)



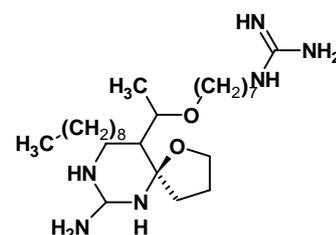
Crambescidina 840 (59)

Berlinck et al.,
1993

*Crambe
Crambe*

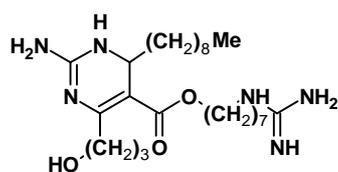


Crambina A (57)

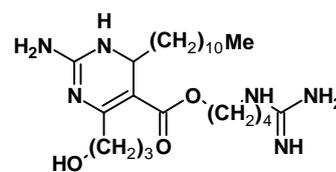


Crambina B (60)

Berlinck et al.,
1990



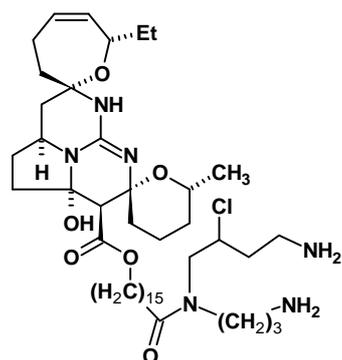
Crambina C1 (58)



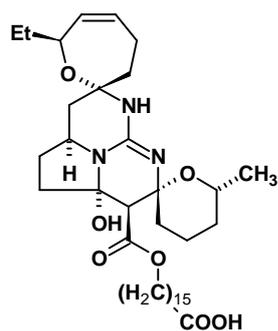
Crambina C2 (61)

Berlinck et al.,
1992

Crambe
Crambe

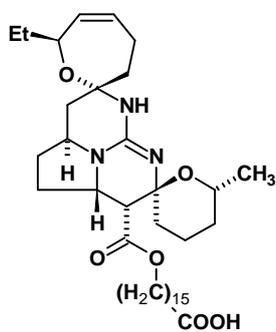


Crambescidina 834 (62)

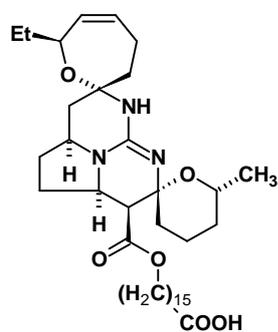


Crambescidina 673 (64)

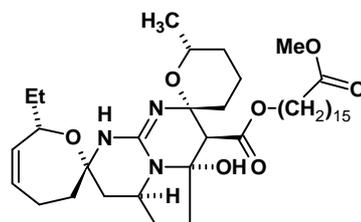
Shi, Furong e
Kenneth, 1998



13,14,15-Isocrambescidina 657
(63)



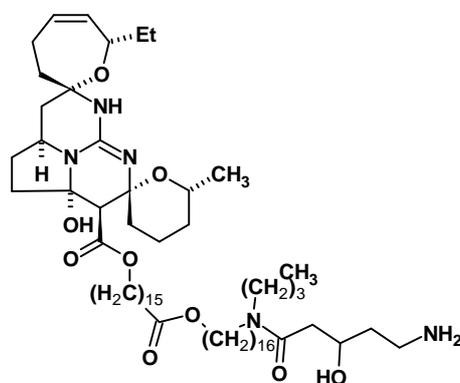
Crambescidina 657 (65)



Crambescidina 687 (66)

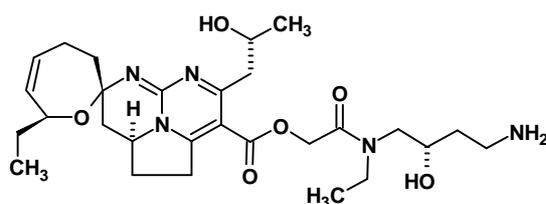
Jares-Erijman,
Sakai e
Rinehart, 1991

Crambe
Crambe



Crambescidina 830 (67)

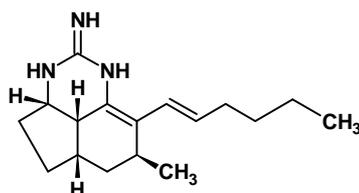
Crambe
Crambe



Jares-Erijman,
Sakai e
Rinehart, 1991

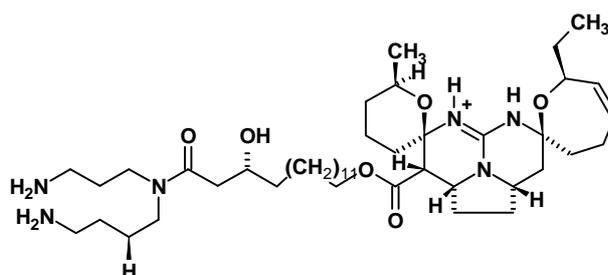
Crambidina (68)

Clathria sp.



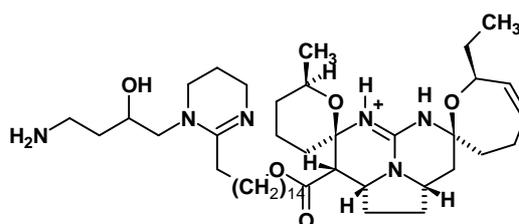
Capon, Miller
e Rooney,
2001

Mirabilina G (69)



Fromiamicalina (70)

Celerina
heffernani



Palagiano et
al., 1995

Celeromicalina (71)

Ptilomicalina A (34)

Crambescidina 800 (39)

Crambescidina 800 (39)

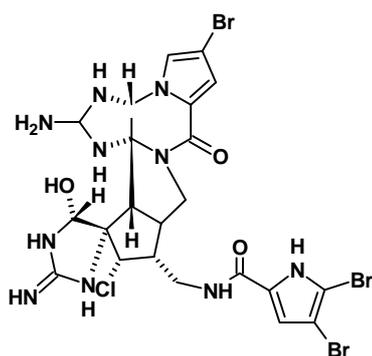
Fromia
monilis

Fromiamicalina (70)

Palagiano et
al., 1995

Celeromicalina (71)

Hymeniacidon
sp



Kobayashi,
Susuki e
Tsuda, 1997

Kondu' acidina A (72)

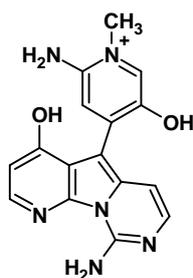
Himenidina (10)

Hemimycale sp

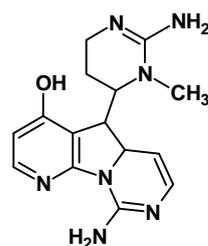
Ptilomicalina A (34)

Kashman et
al., 1989

Kirkpatrickia
variolosa

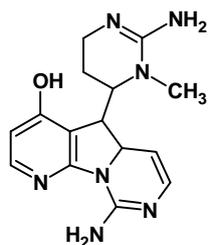


Variolina A (73)



N-3'-Metil-3',4',5',6'-tetrahydro
variolina (75)

Fresneda et al.,
2006

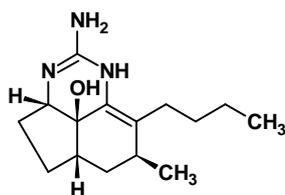


Variolina B (74)



Variolina D (76)

M. arbuscula



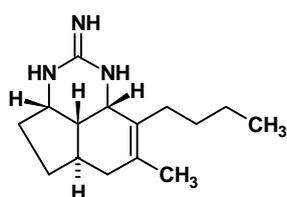
8b-Hidroxiptolocalina (77)

Ptilocalina (32)

Tavares et al.,
1995

Crambescidina 800 (39)

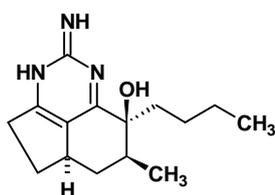
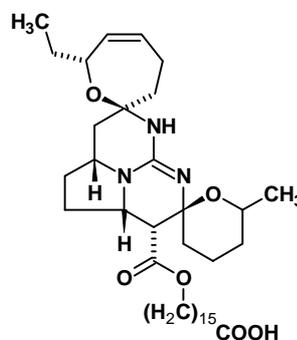
Tavares et al.,
1994

Kossuga et al.,
2007

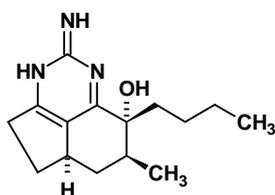
Isoptilocalina (78)

M. arbusculaBraekman et
al., 2000

Desidrobatzelladina C (79)

1,8a;8b,3a-Desidro-8β-
hidroxiptilocalina (80)

Ácido crambescidínico (83)

1,8a;8b,3a-Desidro-8α-
hidroxiptilocalina (81)

Mirabilina B (28)

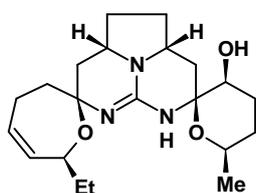
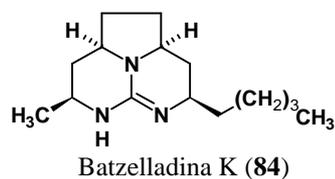
Ptilocalina (32)

Hua et al.,
2007

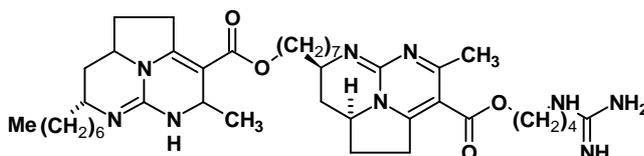
Ptilomicalina A (34)

Isoptilocalina A (78)

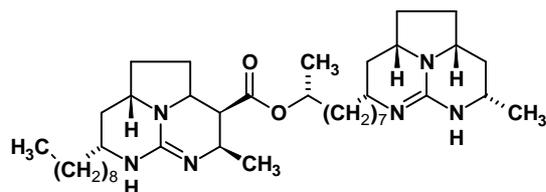
Desidrobatzelladina C (79)

16β-Hidroxicrambescidina 359
(82)

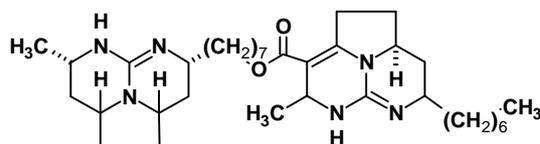
Batzelladina K (84)



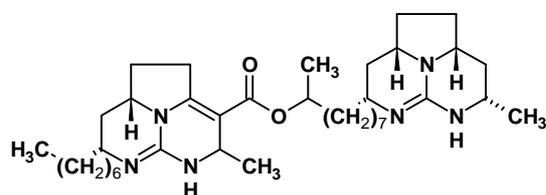
Batzelladina J (85)



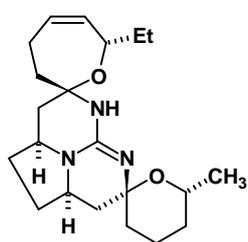
Batzelladina L (86)

M. unguifera

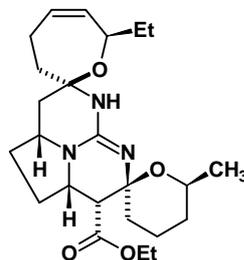
Batzelladina M (87)

Gallimore,
Kelle e
Scheher, 2005

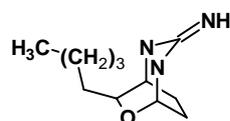
Batzelladina N (88)



Crambescidina 359 (89)



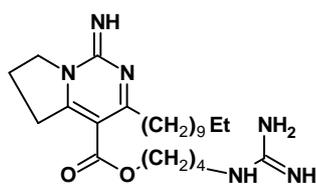
Crambescidina 431 (90)

Braekman
et al., 2000*M. unguiculata*

Monanchorina (91)

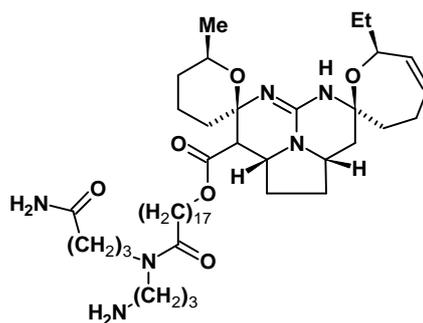
Meragelman,
McKee e
McMahon,
2004

Crambescidina 800 (39)

Suna et al.,
2007*M. sp*

Deidrocrambina A (92)

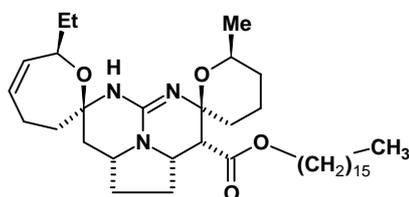
Chang et al.,
2003

M. spChang et al.,
2003

Crambescidina 826 (93)

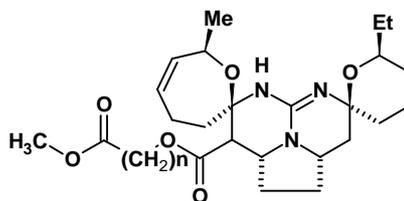
Fromiamicalina (70)

Crambescidina 800 (39)

M. dianchoraBensemhoun
et al., 2007

Ptilomicalina D (94)

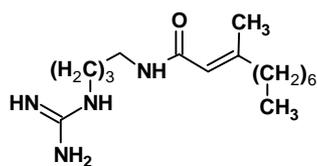
Ácido crambescidínico (83)

*Neofolitispa
dianchora*Venkateswarlu
et al., 1999

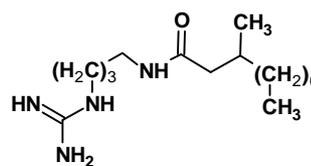
Neofolitispate 1 n=16 (95)

Neofolitispate 2 n=15 (96)

Neofolitispate 3 n=14 (97)

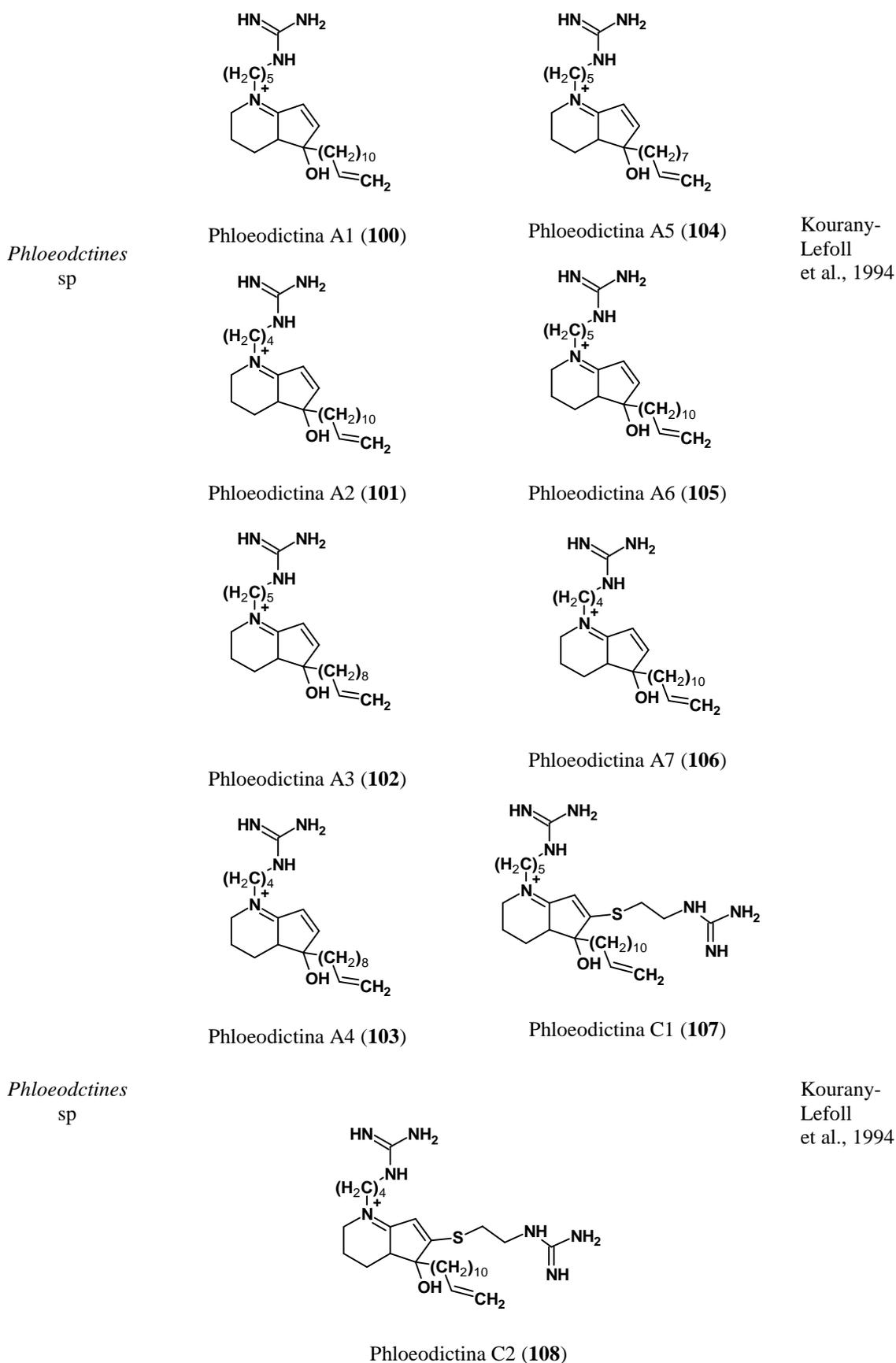
*Psammaphysilla
purea*

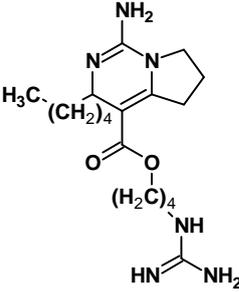
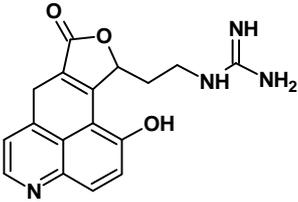
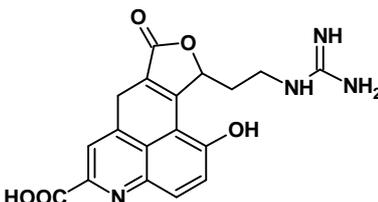
Aplsillamida A (98)

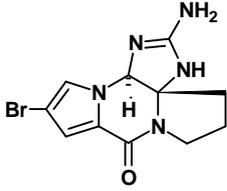
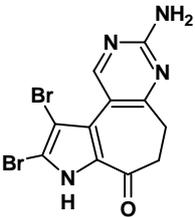
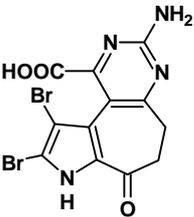
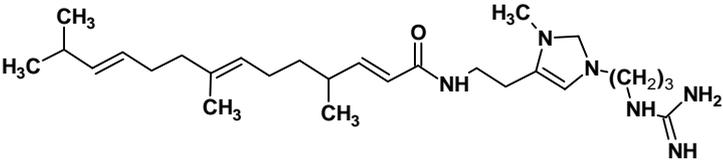


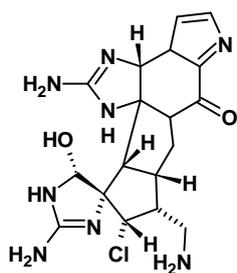
Aplsillamida B (99)

Honma
et al., 1995

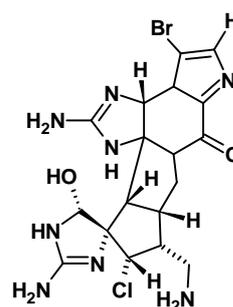


<i>Ptilocaulis spiculifer</i>		Yang et al., 2003	
	Sch 575948 (109)		
	Ptilomicalina A (34)	Kashman et al., 1989	
<i>Pseudaxinyssa cantharella</i>	<p>Oroidina (8)</p> <p>Debromohimentialdisina (17)</p> <p>Himentialdisina (18)</p> <p>Dibromoisophakellina (20)</p> <p>Dibromophakellina (21)</p>		De Nanteuil et al., 1985
	Odilina (110)		
<i>Ptilocaulis aff. P. spiculifer</i>	<p>Ptilocaulina (32)</p> <p>Isoptilocaulina (78)</p>	<p>Patil et al., 1997</p> <p>Harbour et al., 1981</p> <p>Ohtani et al., 1989</p>	
<i>Pseudodistoma aureum</i>		Pearce et al., 2003	
	Distomadina A (111)		
			
	Distomadina B (112)		
<i>Phacellia Fusca</i>	Dibromophakellina (21)	Xu et al., 2003	

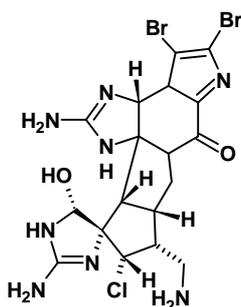
<i>Phakellia flabellata</i>		Xu et al., 2003
	Bromophakellina (113)	Sharma e Magdoff-Fairchild 1977
	Dibromophakellina (21)	
<i>Phakellia mauritiana</i>	Debromohimendialdisina (17)	Berlinck, 1999
	Dibromophakellina (21)	
<i>Stylissa carteri</i>		Linington et al., 2003
	Latonduina A (114)	
		
	Latonduina B (115)	
<i>Stylissa caribica</i>		Assmann, Van Soest e Köck, 2001
	(-)- <i>N</i> -Metildibroisophakellina (116)	
<i>Stelletta</i> sp		Tsukamoto et al., 1999
	Stelletazole A (117)	



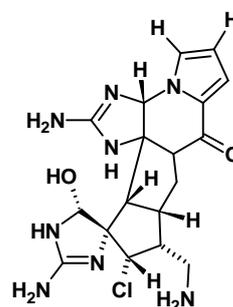
Stiloguanidina (118)



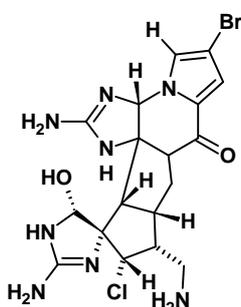
3-Bromostiloguanidina (121)

Kato et al.,
1995*Stelletta* sp

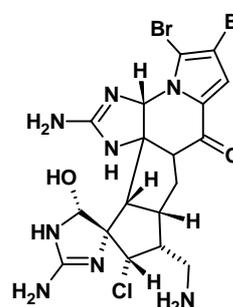
2,3-Dibromostiloguanidina (119)



Palau'amina (122)



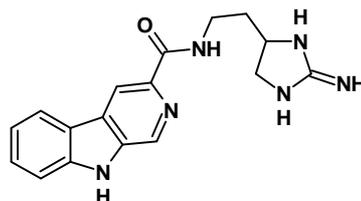
4-Bromopalau'amina (120)



4,5-Dibromopalau'amina (123)

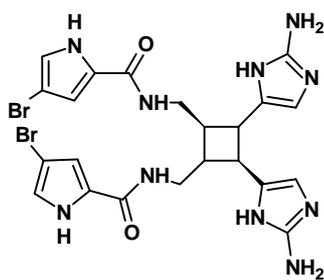
Kinnel et al.,
1998

Debromohimendaldisina (17)

Williams e
Faulkner, 1996*Synoicum*
macroGLOSSUM

Tiruchanduramina (124)

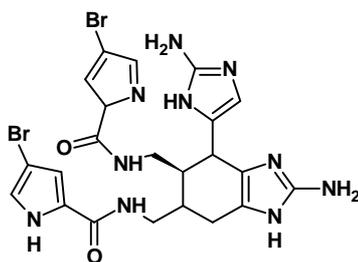
Ravinder et al.,
2005



Xestospongia
sp

Sceptrina (125)

Vassaas et al.,
1996



Ageliferina (126)

Capítulo 3

DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

3. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *MONANCHORA ARBUSCULA*

3.1 Determinação estrutural de MAD-1

A fração diclorometano, proveniente da partição líquido-líquido do extrato bruto de *M. arbuscula* (Item 4.6.1.3, pág. 105), após sucessivas cromatografias, de adsorção e exclusão, resultou no isolamento de um composto, o qual se apresentou como uma única mancha em CCD, após aspersão com Dragendorff, sugerindo tratar-se de um alcalóide. MAD-1 (26 mg) foi obtido na forma de uma resina amarela clara, com rotação óptica específica $[\alpha]_D^{20} = +60$ ($c = 0,085$; MeOH).

O espectro de absorção na região do infravermelho (NaCl, cm^{-1}) (Fig. 3.1, pág.42) mostrou bandas em 3.313 e 3.185 cm^{-1} compatíveis com estiramento =N-H (Philip e Marcel, 1998), bandas na faixa de 2955 a 2867 cm^{-1} de estiramento simétrico e assimétrico da ligação $\text{Csp}^3\text{-H}$, além de uma banda em 1.588 cm^{-1} , referente à estiramento de ligação C=C.

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) (Fig. 3.2, pág.42) apresentou sinais referentes a dois grupos metilas em δ_{H} 1,08 (d, $J = 6,6$ Hz, H_5') e 0,86 (t, $J = 7,25$ Hz, H_4'), além de uma série de multipletos na faixa de 2,91 a 0,90 ppm (Tabela 3.1, pág. 40).

No espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, CDCl_3) (Fig. 2.3, pág. 43), foram observados 15 linhas espectrais, entre as quais, quatro referentes a carbonos sp^2 (δ 174,9; 166,1; 163,2 e 126,2), sendo o sinal em δ 163,2, segundo a literatura, compatível com a presença de uma dupla ligação carbono-nitrogênio (C=N) de grupo guanidínico quando constituído de um sistema conjugado (Patil *et al.*, 1997 e Barrow *et al.*, 1996) (Tabela 3.1, pág. 40).

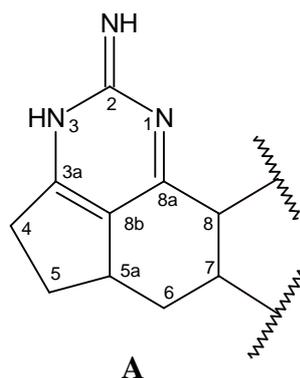
O padrão de hidrogenação correspondente a cada átomo de carbono foi determinado através do espectro DEPT 135° (Fig. 3.4, pág. 43), o qual mostrou sinais para seis carbonos metilênicos (sinais com amplitude negativa), três carbonos metínicos e dois metílicos (sinais com amplitude positiva). A subtração dos sinais presentes nos espectros de RMN ^{13}C -CPD e DEPT 135° revelou a presença de 4 carbonos não-hidrogenados.

Através do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ^1H , ^{13}C a uma ligação HSQC (Fig. 3.5, pág. 44) foi possível associar de forma inequívoca cada sinal de hidrogênio ao seu respectivo carbono, conforme sumariado na Tabela 3.2 (pág. 41). Com base neste experimento, também foi possível verificar a presença de cinco pares de

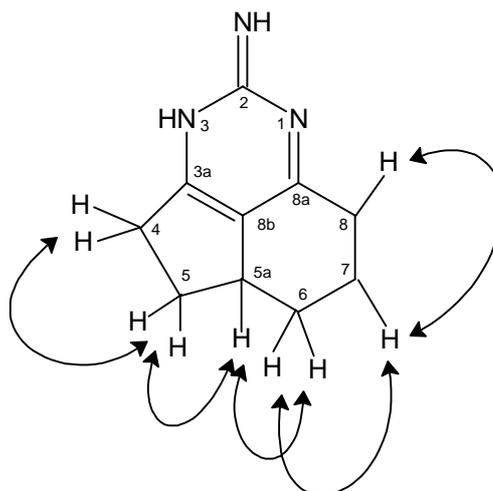
Determinação Estrutural – Capítulo 3

hidrogênio metilênicos diastereotópicos em δ_H [2,90 / 2,58 (H_a-4/H_b-4); 2,34 / 1,51 (H_a-5/H_b-5); 2,00 / 0,91 (H_a-6/H_b-6); 2,02 / 1,75 (H_a-1'/H_b-1') e 1,30 / 1,10 (H_a-2'/H_b-2')], os quais mostraram correlação com os carbonos em δ 33,8; 33,2; 39,9; 30,5 e 27,9; respectivamente.

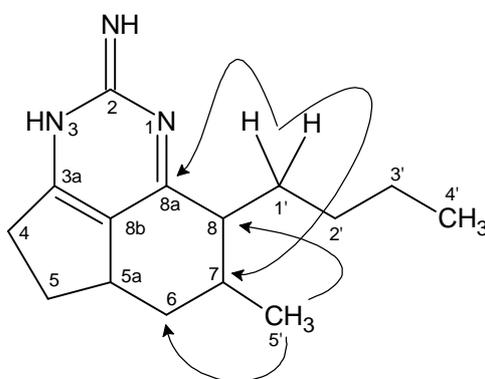
O espectro de massa (Fig.3.6, pág.44) mostrou o pico correspondente ao íon-molecular com razão massa/carga (m/z) igual a 245 Daltons, sugerindo a presença de um número ímpar de átomos de nitrogênios. Com base no conjunto de informações acima mencionadas, foi possível determinar a fórmula molecular C₁₅H₂₃N₃, a qual apresenta índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a 6. Determinado um grupo guanidínico, os três sinais restantes, referentes a carbono sp², foram atribuídos a duas ligações duplas, uma delas carbono-nitrogênio (C=N). Uma vez justificada apenas três das seis insaturações, as demais insaturações foram inferidas a três ciclos. Estas informações levaram a concluir que MAD-1 tratava-se de um alcalóide tricíclico de esqueleto guanidínico, comum no gênero *Monanchora*, inclusive na espécie (Braekman *et al.*, 2000). Esta dedução levou a construção da sub-estrutura **A**, cuja ligação dupla (C=C) posicionada entre C-3a e C-8b, atende a significativa desproteção, verificada para o carbono C-3a (δ 174,9), justificada por fazer parte de um sistema conjugado e ainda por ser um carbono nitrogenado. Estes dados estão de acordo da literatura (Patil *et al.*, 1997 e Sorek *et al.*, 2006).



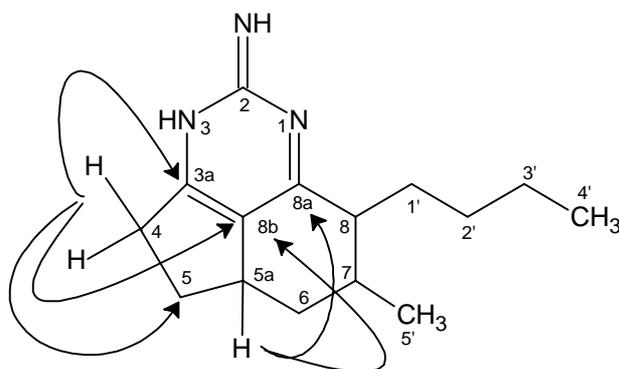
Através do espectro de RMN ¹H, ¹H - COSY (Fig. 3.7, pág.45) foi possível verificar uma seqüência de acoplamentos vicinais envolvendo os sinais δ_H [2,90 / 2,58 (H_a-4/H_b-4); 2,34 / 1,51 (H_a-5/H_b-5); 2,88 (H-5a); 2,00 / 0,91 (H_a-6/H_b-6); 1,85 (H-7) e 2,20 (H-8) (**B**), justificando a sub-estrutura **A**.

**B**

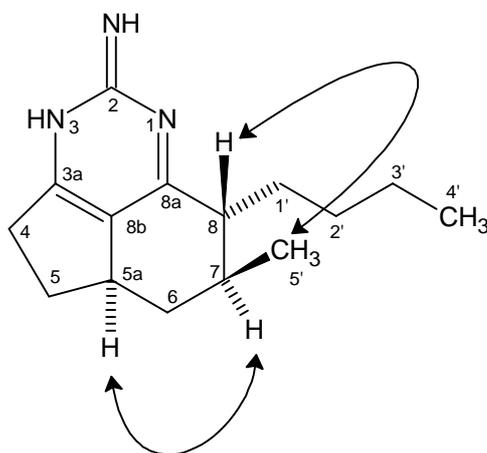
Conforme pode ser verificado, a estrutura parcial **A** é composta por 10 dos 15 átomos de carbonos apresentados pela fórmula molecular. Logo, os cinco átomos de carbonos restantes, representados por duas metilas δ_C/δ_H [21,1/ 1,08 (d, $J = 6,6$ Hz); 14,2/ 0,86 (t, $J = 7,2$ Hz)] e três carbonos metilênicos δ_C/δ_H [30,5 / 2,02 e 1,75; 27,9 / 1,30 e 1,10; 23,4 / 1,27; 14,2 / 0,86] foram atribuídos a dois grupos substituintes, constituídos de um grupo metila e um butila. A posição destes substituintes foi determinada através do espectro de correlação heteronuclear a mais de uma ligação (HMBC) (Figs. 3.8 e 3.9, pág. 46) (Tabela 3.2, pág. 41). As correlações observadas envolvendo os sinais de hidrogênio em δ 1,75 ($H_{a-1'}$) e 2,02 ($H_{b-1'}$) com os carbonos em δ 166,1 (C-8a) e 34,3 (C-7); assim como, o sinal em δ 1,08 ($H-5'$) com os carbonos em δ 47,1 (C-8) e 39,9 (C-6) permitiram localizar os grupos butila e metila nos carbonos 7 e 8, respectivamente (sub-estrutura **C**).

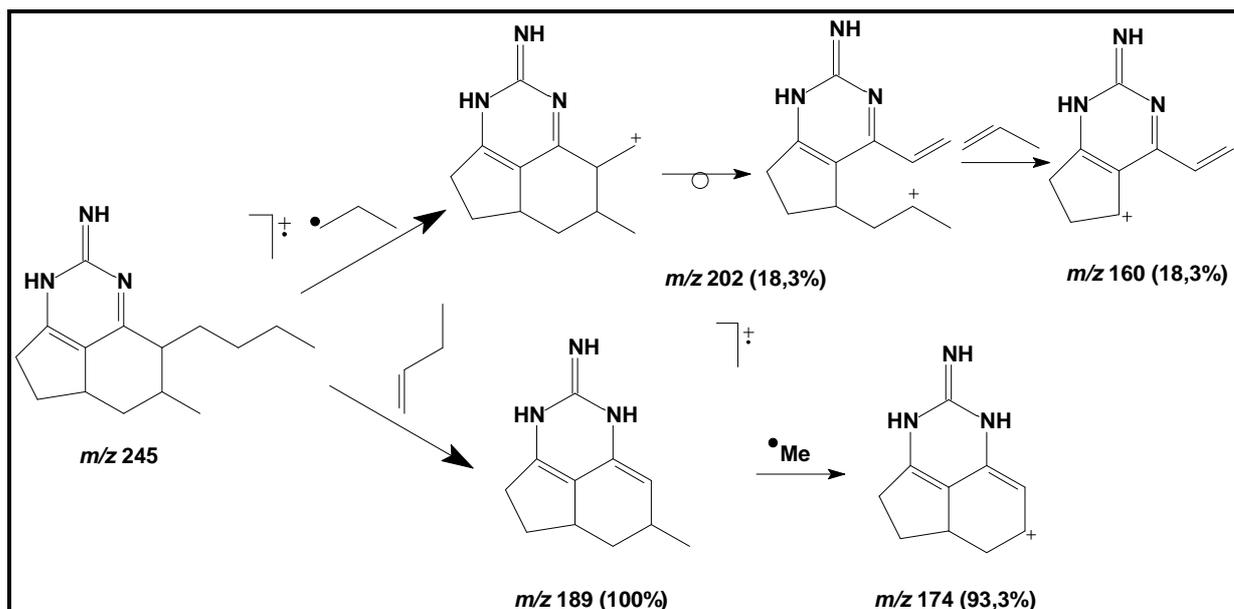
**C**

Ainda no espectro HMBC foram observadas as correlações dos hidrogênios em δ 2,90 / 2,58 (H_a-4/H_b-4) com os carbonos em δ 174,9 (C-3a), 126,2 (C-8b) e 33,2 (C-5), bem como, do hidrogênio em δ 2,88 (H-5a) com os carbonos em δ 166,1 (C-8a) e 126,2 (C-8b) (**D**), reforçando a estrutura proposta.

**D**

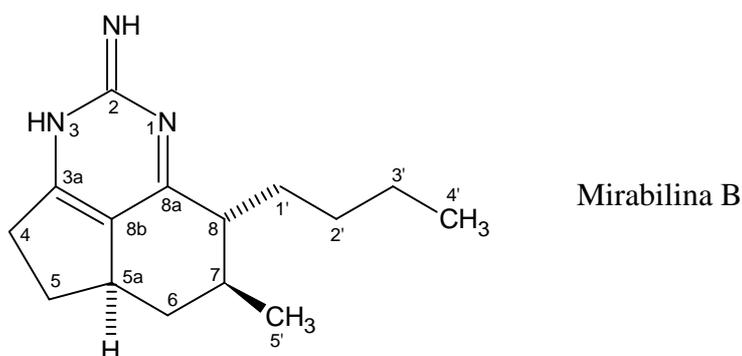
Através do espectro bidimensional ¹H, ¹H – NOESY (Fig. 3.10, pág. 47) determinou-se a estereoquímica relativa de MAD-1 pela interação do hidrogênio em δ_H 2,88 (H-5a) com 1,85 (H-7) e 1,08 (3H-5') com δ_H 2,20 (H-8) (**E**).

**E**



Quadro 3.1 – Proposta mecânica para a fragmentação que justifica alguns picos registrados no espectro de massa de MAD-1

Com base nos dados discutidos, incluindo comparação com dados descritos na literatura (Patil *et al.*, 1997) chegou-se a conclusão que MAD-1 tratava-se do alcalóide guanidínico, denominado mirabilina B, cuja proposta de fragmentação de massa encontra-se resumida no quadro acima.



Com base em levantamento bibliográfico verificou-se que este metabólito secundário já havia sido isolado das esponjas *Monanchora unguifera*, *Batzella sp.* e *Arenochalina mirabilis*, porém está sendo registrado pela primeira vez para a espécie em estudo. Este composto, apesar de ter sido isolado de uma fração ativa, não mostrou toxicidade frente às células tumorais testadas (Tabela 4.1, pág. 104), porém mostrou atividade antiprotozoária contra *Leishmania chagasi* e *amazonensis*. Segundo registro da literatura, já foi comprovada atividade antifúngica contra *Cryptococcus neoformans* e antiprotozoária contra *Leishmania donavani* (Hua *et al.*, 2004).

Tabela 3.1 – Comparação de dados de RMN ^{13}C e ^1H de MAD-1 com dados da literatura (Patil, et al., 1997).

# C	RMN ^1H		RMN ^{13}C	
	MAD-1 ^a	Lit. ^b	MAD-1 ^a	Lit. ^b
2	-	-	163,2	164,6
3a	-	-	174,9	176,2
4	2,90 (1H, m), 2,58 (1H, dd, $J = 8,4$ e $16,7$ Hz)	2,90 (1H, m), 2,54 (1H, m)	33,8	34,3
5	2,34 (1H, m), 1,51 (1H, m)	2,36(1H, m), 1,51 (1H, m)	33,2	34,1
5a	2,88 (1H, m)	2,91 (1H, m)	37,9	39,0
6	2,00 (1H, m), 0,91 (1H, m)	2,03 (1H, m), 0,90 (1H, m)	39,9	40,8
7	1,85 (1H, m)	1,88 (1H, m)	34,3	35,2
8	2,20 (1H, m)	2,19 (1H, ddt, $J = 1,7; 9,4; 4,5$ Hz)	47,1	48,2
8a	-	-	166,1	167,3
8b	-	-	126,2	126,8
1'	2,02 (1H, m), 1,75 (1H, m)	2,08 (1H, m), 1,78 (1H, m)	30,5	31,1
2'	1,30 (1H, m), 1,10 (1H, m),	1,32 (1H, m), 1,05 (1H, m)	27,9	28,6
3'	1,27 (2H, m)	1,28 (1H, m)	23,4	24,4
4'	0,86 (3H, t, $J = 7,2$ Hz)	0,87 (3H, t, $J = 7,2$ Hz)	14,2	14,4
5'	1,08 (3H, d, $J = 6,6$ Hz)	1,09 (3H, d, $J = 6,7$ Hz)	21,1	21,3

Deslocamentos químicos (δ) em ppm.

^a CDCl_3 ; 500 MHz (^1H) e 125 MHz (^{13}C)

^b CD_3OD ; 400 MHz

Tabela 3.2 - Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C e ^1H de MAD-1, em CDCl_3 .

#C	HSQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
2	163,2	-	-	-
3a	174,9	-	2H-4	2H-5
4	33,8	2,90 (1H, m); 2,58 (1H, dd, $J = 8,4$ e $16,7$ Hz)	2H-5	-
5	33,2	2,34 (1H, m); 1,51 (1H, m)	1H-5a, 2H-4	-
5a	37,9	2,88 (1H, m)	2H-6, 2H-5	1H-7, 1H _b -4
6	39,9	2,00 (1H, m); 0,91 (1H, m)	1H-5 _a , 1H-7	3H-5', 1H _b -5
7	34,3	1,85 (1H, m)	2H-5', 1H-8, 2H-6	2H-1'
8	47,1	2,20 (1H, m)	1H-7	2H-6
8a	166,1	-	1H-8	2H-1', 1H-5a
8b	126,2	-	1H-5a	2H-4, 1H-8, 2H-6
1'	30,5	2,02 (1H, m); 1,75 (1H, m)	1H-8, 2H-2'	2H-3'
2'	27,9	1,30 (1H, m); 1,10 (1H, m)	2H-1', 2H-3'	1H-8, 2H-4'
3'	23,4	1,27 (2H, m)	2H-4', 2H-2'	2H-1'
4'	14,2	0,86 (3H, t, $J = 7,2$)	2H-3'	2H-2'
5'	21,1	1,08 (3H, d, $J = 6,6$)	-	3H-6, 3H-8

Deslocamentos químicos (δ) em ppm. Constante de acoplamento (J) em Hertz

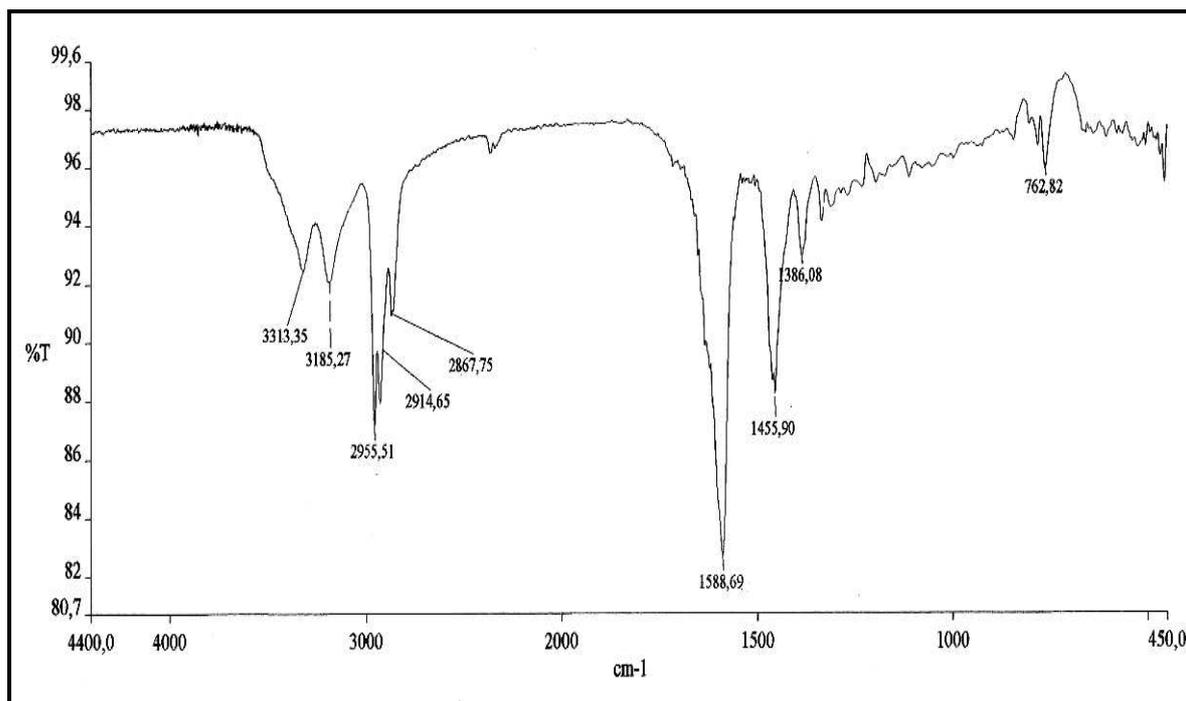


Figura 3.1 - Espectro de absorção na região do infravermelho (NaCl, cm⁻¹) de MAD-1

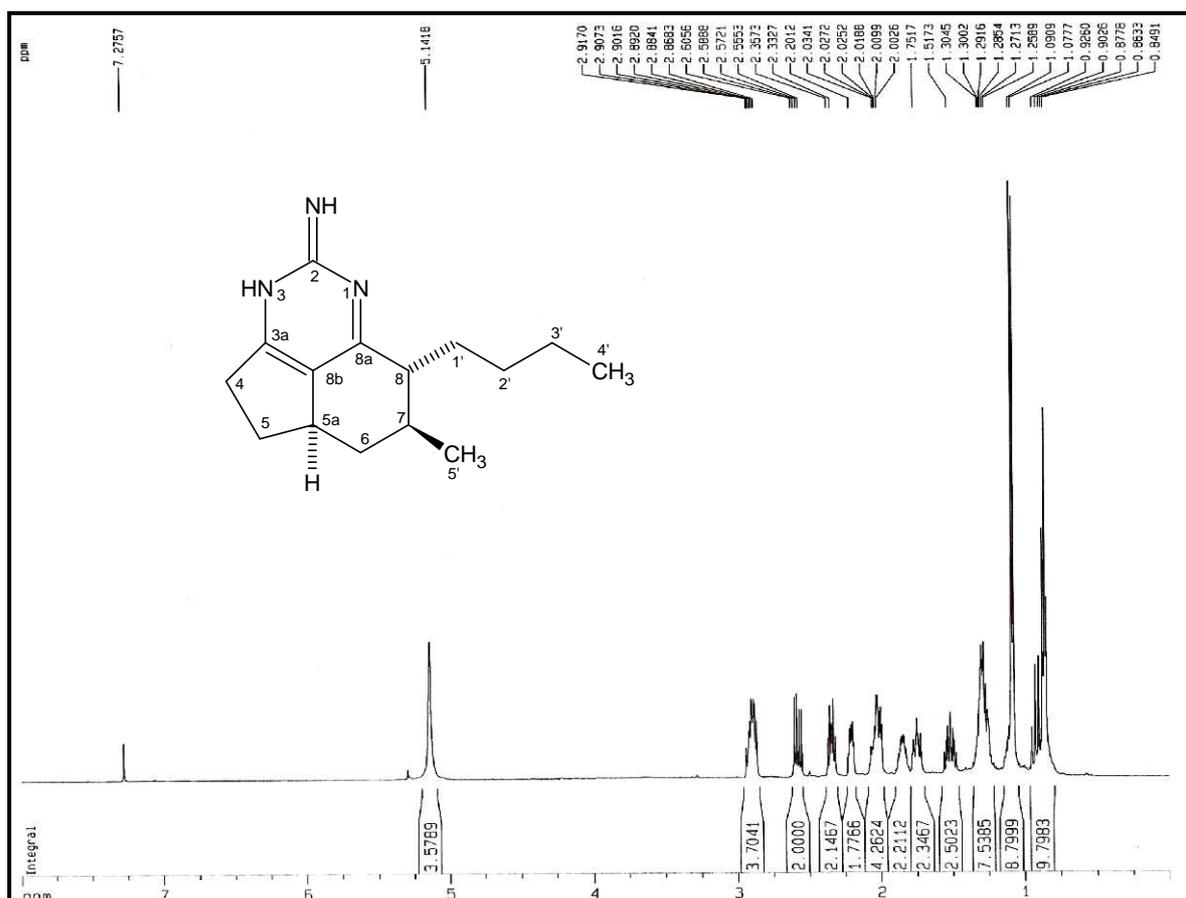


Figura 3.2 - Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de MAD-1

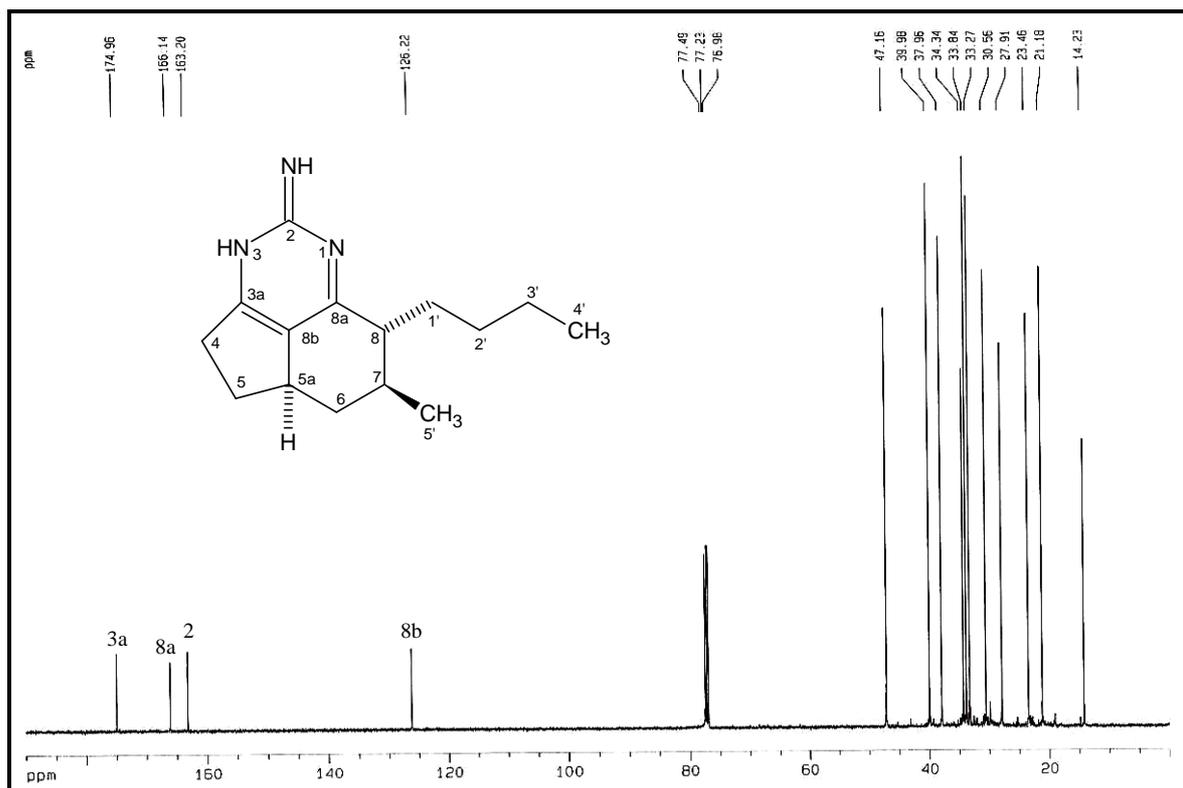


Figura 3.3 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, CDCl_3) de MAD-1

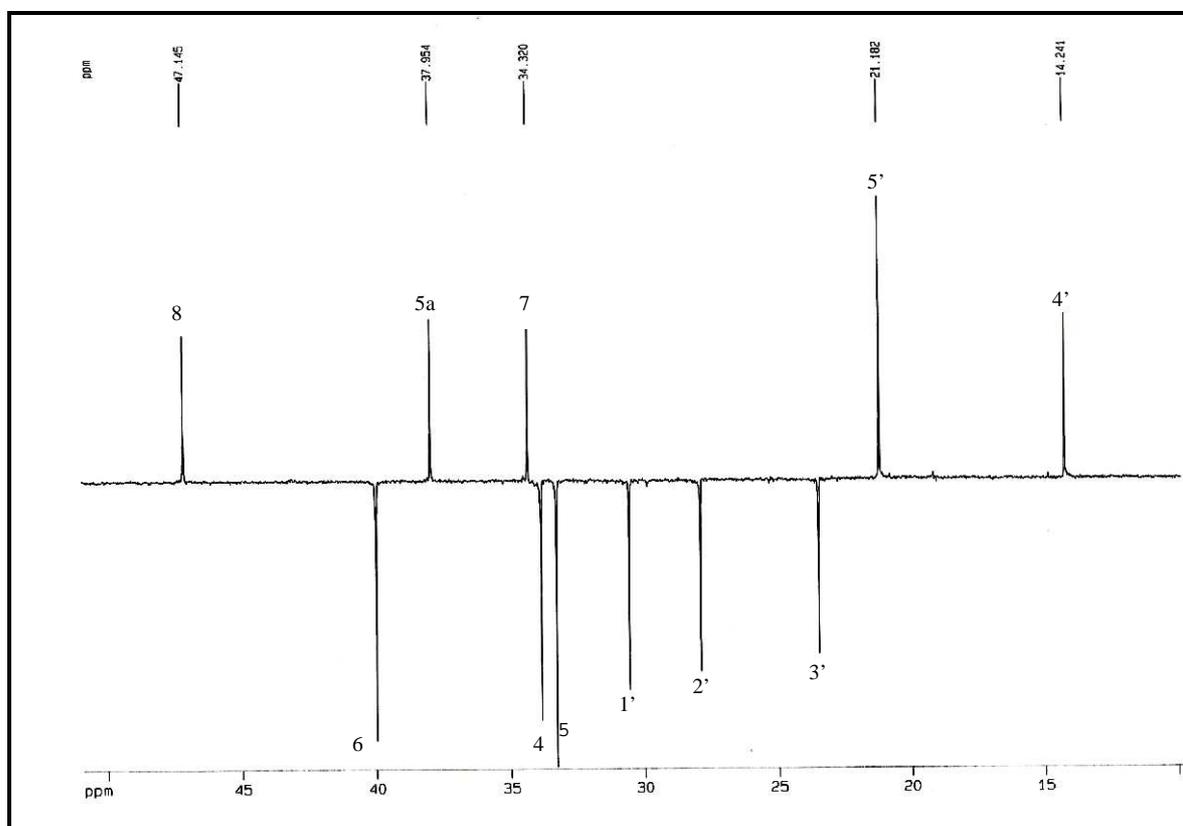


Figura 3.4 - Espectro RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, CDCl_3) de MAD-1

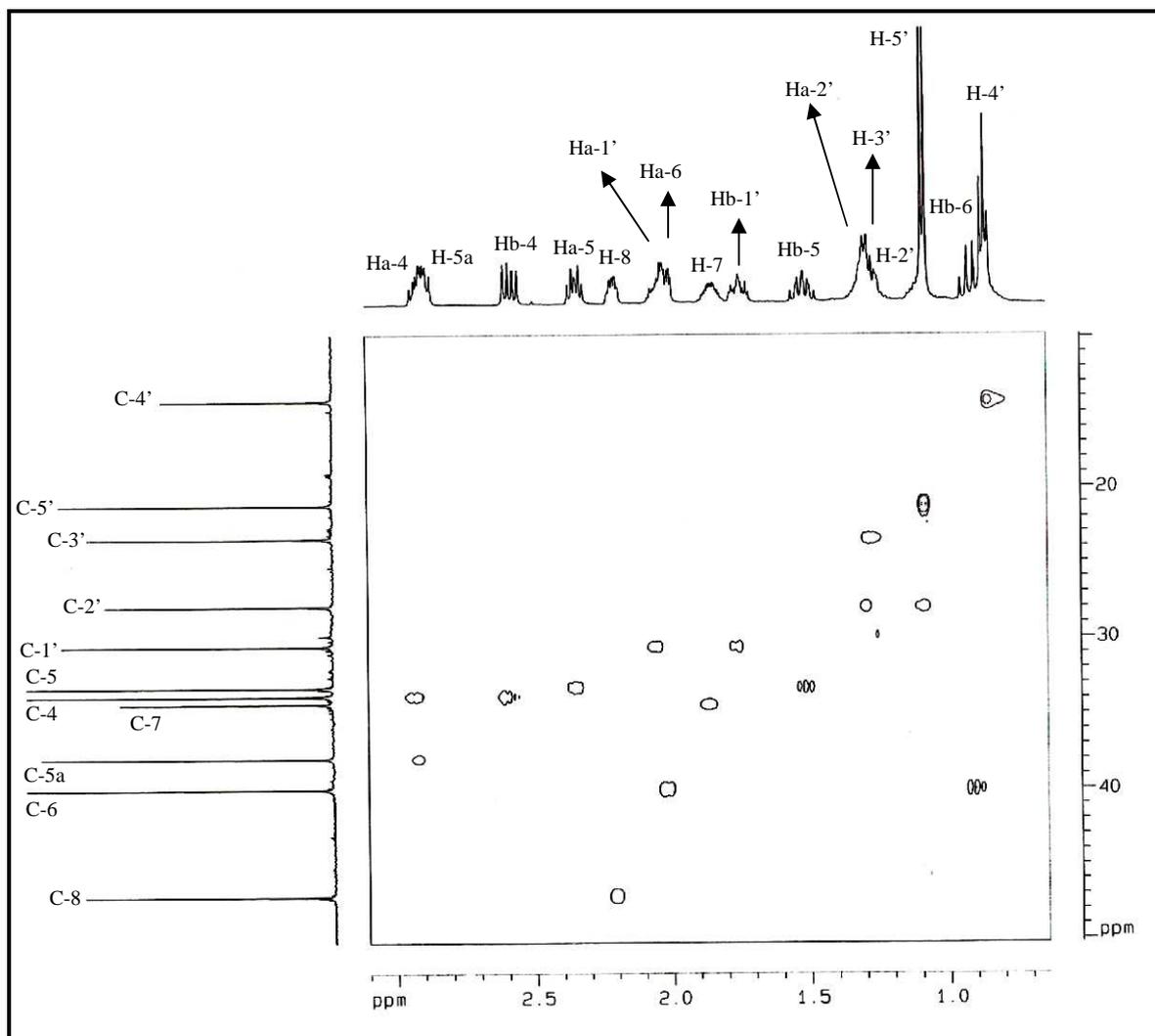


Figura 3.5 - Espectro de RMN HSQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de MAD-1

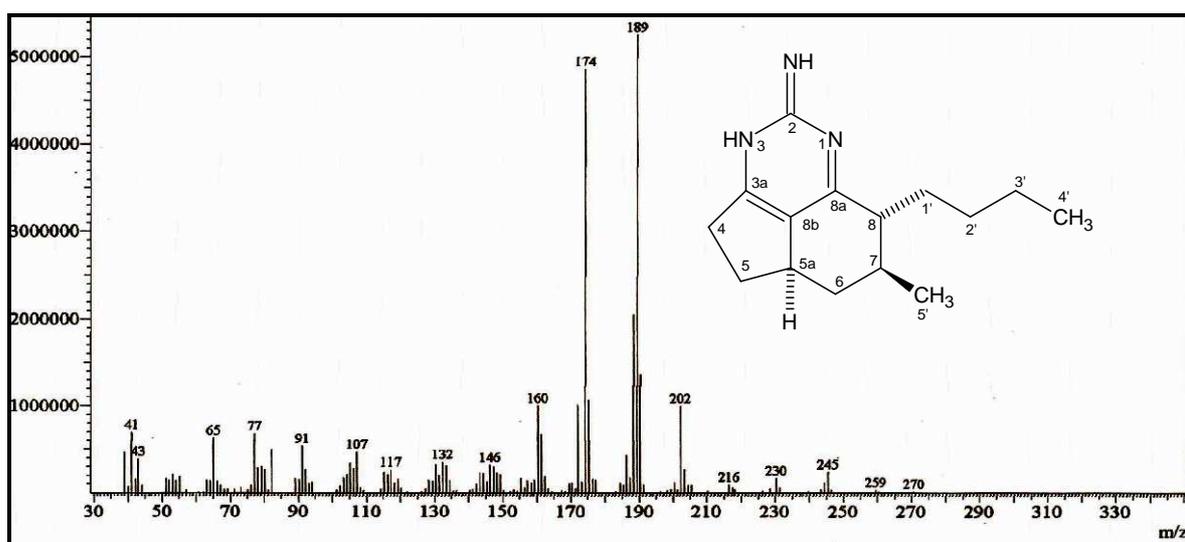


Figura 3.6 - Espectro de massa (IE, 70 eV) de MAD-1

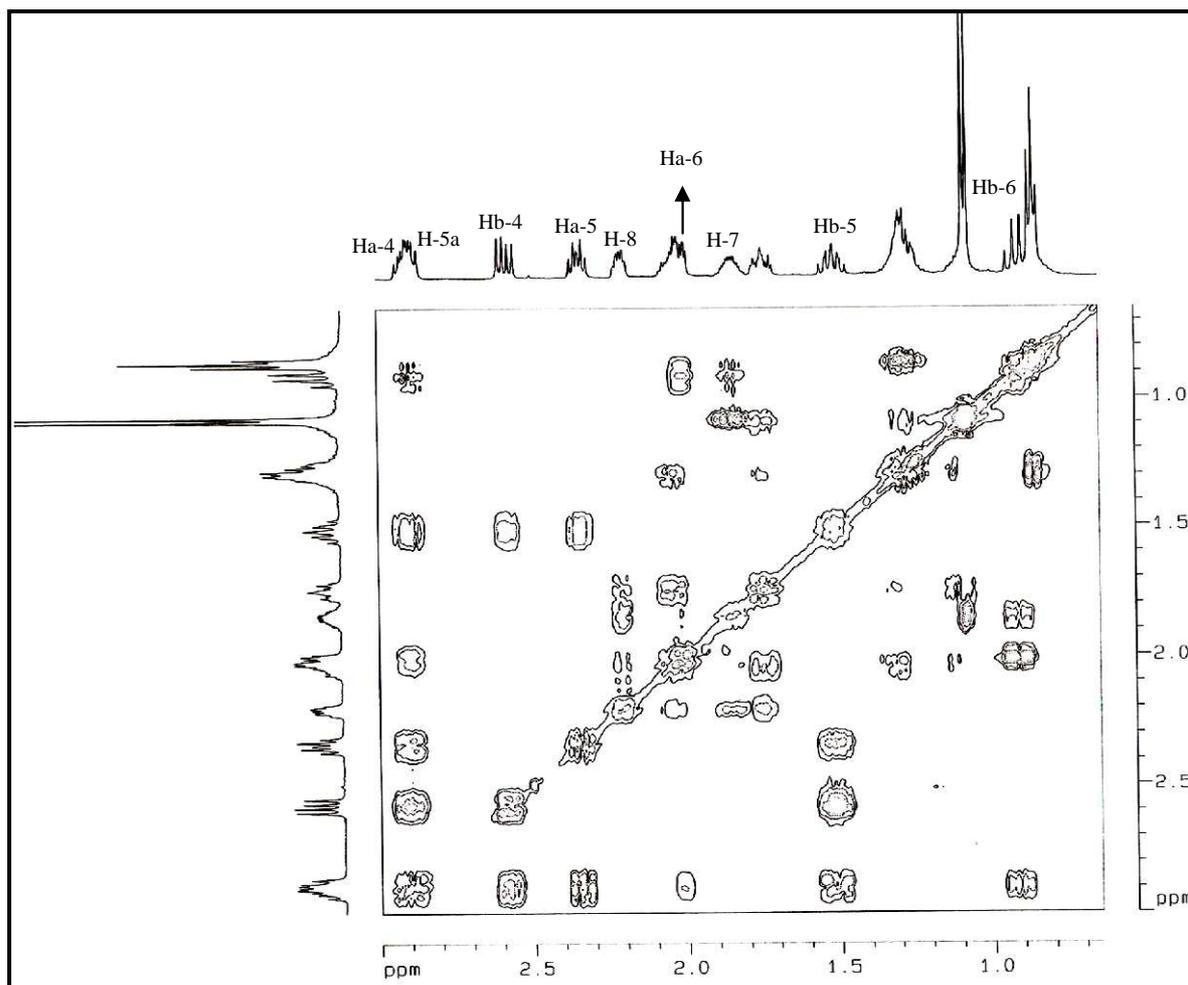
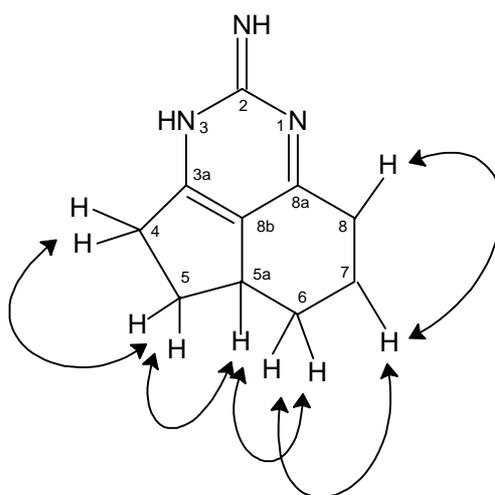


Figura 3.7 - Espectro de RMN ^1H , ^1H – COSY (500 MHz, CDCl_3) de MAD-1



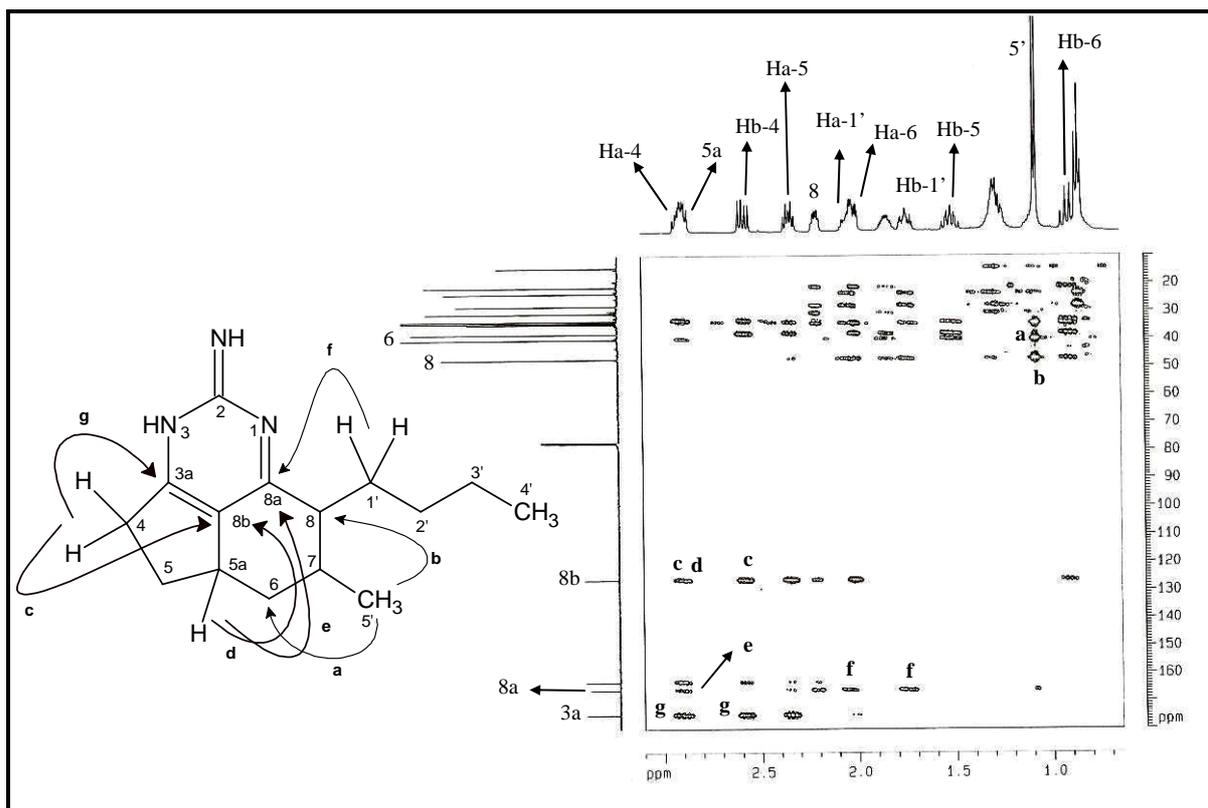


Figura 3.8 - Espectro de RMN HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de MAD-1

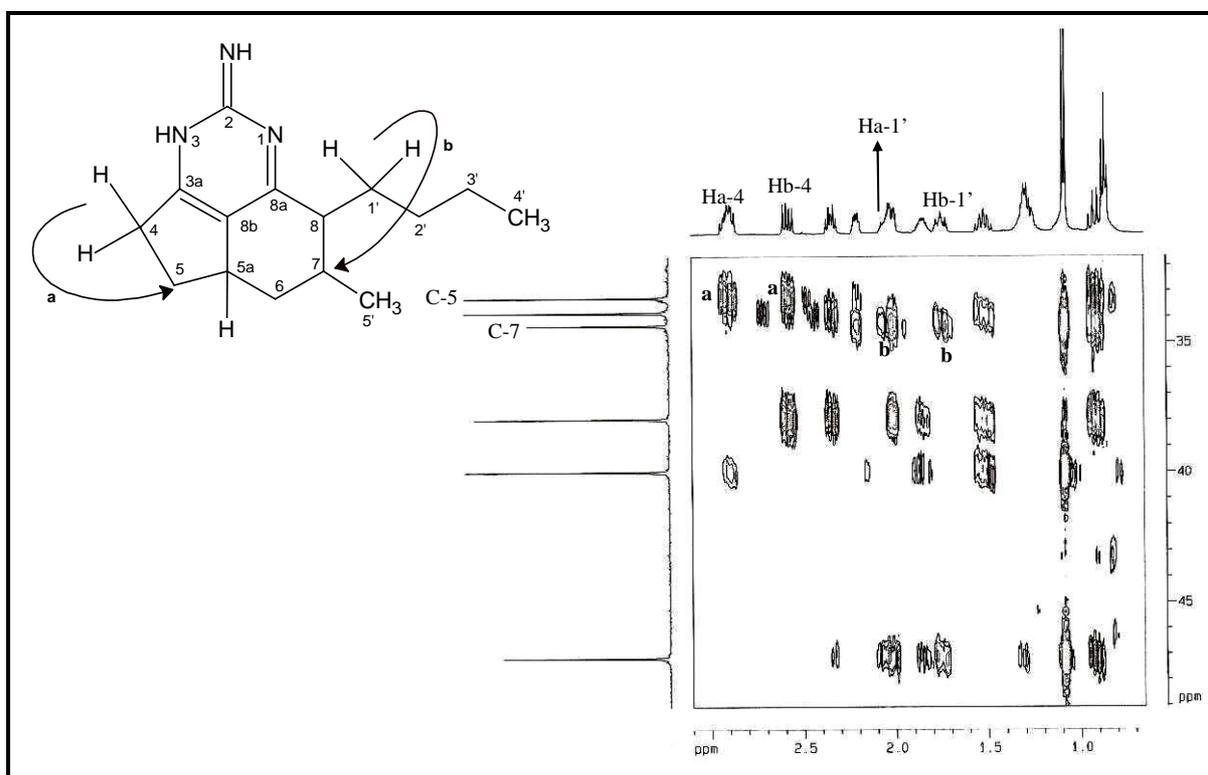


Figura 3.9 – Espectro de RMN HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3)- expansão (δ_{H} 0,5-3,0 / δ_{C} 32-50) de MAD-1

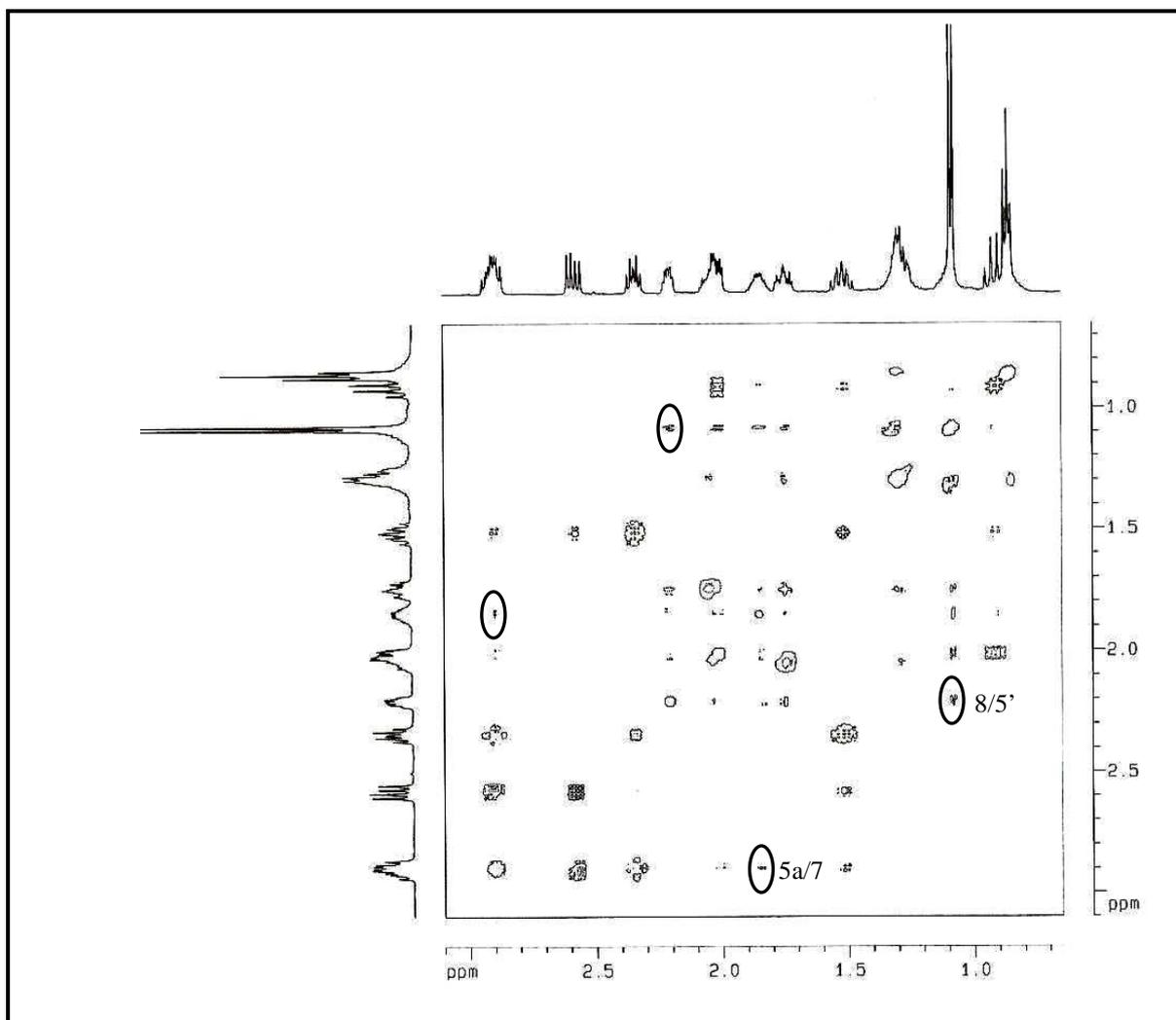
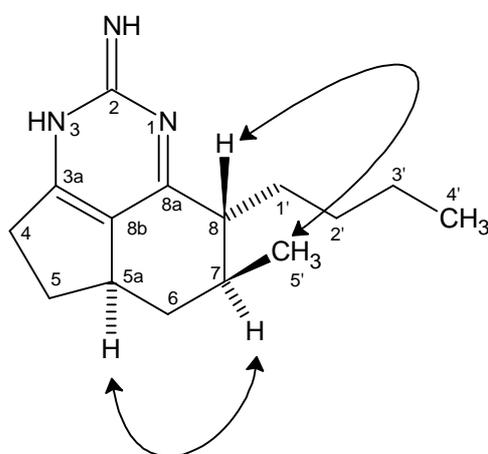


Figura 3.10 - Espectro de RMN NOESY (500 MHz, CDCl_3) de MAD-1



3.2 - Determinação estrutural de MAA-2

A fração acetato de etila, oriunda da partição do extrato bruto de *M. arbuscula*, após sucessivas cromatografias, incluindo HPLC (Item 4.6.2.2.1, pág. 116), forneceu uma resina amarelada que se apresentou como uma única mancha em CCD, pela pulverização com Dragendorff, indicando tratar-se de um alcalóide, denominado MAA-2 (34 mg), com rotação óptica específica $[\alpha]_D^{20} = +69,3$ ($c = 0,865$; MeOH), porém pela análise espectrais observou-se a presença de impureza, possivelmente de um outro alcalóide guanidínico.

O espectro de absorção na região do infravermelho (NaCl, cm^{-1}) (Fig. 3.11, pág. 55) mostrou absorções em 3.289 e 3.222 cm^{-1} características de estiramento de ligações O-H e =N-H. As bandas em 1.676 e 1.603 cm^{-1} foram referentes ao estiramento de ligação C=N e C=C, respectivamente, e uma banda em 1.115 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação C-O de alcoóis ou de éteres, como também, para C-N de aminas; além, dos sinais de estiramento simétrico e assimétrico da ligação Csp³-H em 2.957 e 2867 cm^{-1} .

O espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) (Fig. 3.12, pág. 55) apresentou quatro singletos, três dos quais referentes à hidrogênios ligados a átomos de nitrogênios δ_{H} (9,46; 9,02 e 7,36) (Tavares *et al.*, 1995). O sinal em δ_{H} 8,52, que segundo a teoria do deslocamento químico (Pretsch, *et al.*, 2000), é compatível com hidrogênio ácido, logo atribuído ao hidrogênio do ácido fórmico utilizado no processo de isolamento de MAA-2.

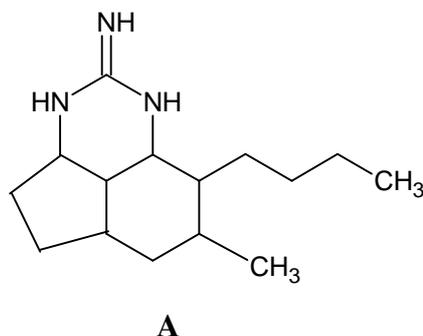
No espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) (Fig.3.13, pág. 56), semelhantemente a MAD-1, foram observados sinais referentes a dois grupos metilas em δ_{H} 1,18 (d, $J = 7,35$ Hz, H_{5'}) e 0,88 (t, $J = 7,05$ Hz, H_{4'}), além de uma série de multipletos na faixa de 3,66 a 0,96 ppm (Tabela 3.3, pág. 52), indicativo de hidrogênios ligados a carbonos sp³.

O espectro de RMN ¹³C-CPD (125 MHz, CDCl₃), (Figs. 3.14 e 3.15, págs. 56 e 57), revelou 16 linhas espectrais majoritárias, sendo 15 referentes ao esqueleto estrutural guanidínico, como descrito para MAD-1. Entre os 15 sinais, três referentes a carbonos sp² (δ 151,9; 129,0 e 122,9). O sinal em δ 151,9 (C₂) foi atribuído ao carbono guanidínico (Tavares, *et al.*, 1995), enquanto, o sinal em δ 69,8 (C_{8b}) evidenciou a presença de carbono sp³ hidroxilado. O sinal adicional (δ 169,6) foi relacionado ao carbono do ácido fórmico, utilizado no processo de isolamento de MAA-2. Confirmando o hidrogênio do ácido fórmico observado no RMN ¹H.

Através dos espectros de HSQC (Fig. 3.16, pág. 57), HSQC editado (CH + CH₃) (Fig. 3.17, pág. 58) e HSQC editado (CH₂) (Fig. 3.18, pág. 58) foi possível determinar o

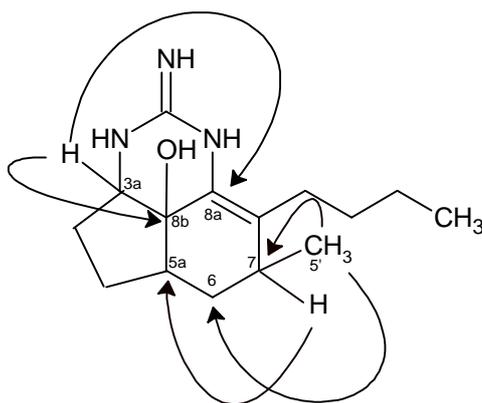
padrão de hidrogenação correspondente a cada átomo de carbono e associar de forma inequívoca cada hidrogênio ao seu respectivo carbono (Tabela 3.4, pág. 54). Foi observado no espectro de HSQC editado (CH + CH₃) a presença de três carbonos metínicos e dois carbonos metílicos e pelo espectro de HSQC editado (CH₂), seis carbonos metilênicos.

Após comparação entre os espectros de RMN ¹³C-CPD, HSQC editado (CH + CH₃) e HSQC editado (CH₂) determinou-se a presença de quatro carbonos não-hidrogenados. Assim, foi proposto para MAA-2 a fórmula molecular C₁₅H₂₅N₃O, a qual está de acordo com o pico correspondente ao íon-molecular com razão massa/carga (*m/z*) igual a 263 Daltons observado no espectro de massa (Fig. 3.19, pág. 59) com índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a 5. Com base nos dados discutidos, foi proposto a sub-estrutura **A**, a qual trata-se de um alcalóide guanidínico tricíclico e justifica 4 das cinco insaturações presentes para a fórmula molecular.

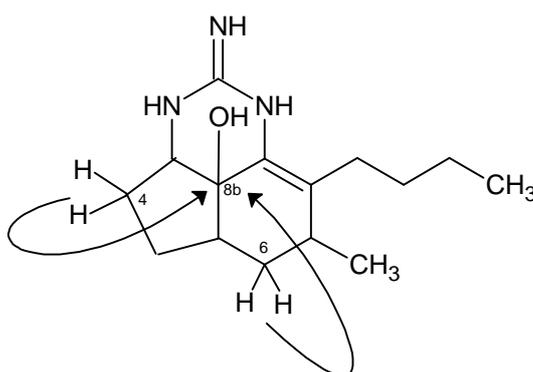


Considerando a fórmula molecular, o n^o de insaturações e a teoria do deslocamento químico de carbonos, resta apenas inserir na sub-estrutura **A**, uma dupla ligação e um grupo hidroxila.

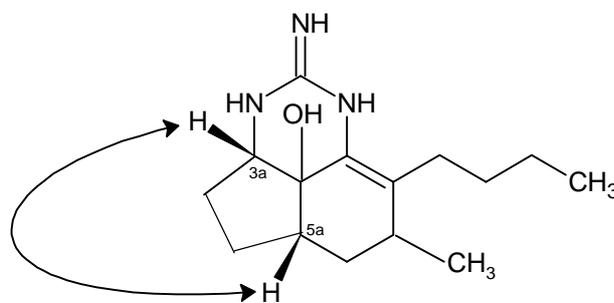
O espectro HMBC (Figs. 3.20 e 3.21, págs. 59 e 60) (Tabela 3.4, pág. 54) revelou as correlações dos hidrogênios H_{5'} (δ 1,18) com os carbonos em δ 30,8 (C₇) e 29,1 (C₆) e o hidrogênio H₇ (δ 2,43) com o carbono em δ 21,8 (C_{5'}) confirmando a posição do grupo metila no carbono C₇. A posição da hidroxila foi confirmada através da correlação do hidrogênio em δ 3,66 (H_{3a}) com o carbono em δ 69,8 (C_{8b}, ²J) pela expansão do espectro de HMBC (Fig. 3.22, pág. 59), reforçando esta posição pela correlação do hidrogênio H₇ (δ 2,43) com o carbono C_{5a} observado na figura 3.21. A análise pela expansão do espectro HMBC (Fig. 3.23, pág. 61) foi decisivo na atribuição inequívoca do deslocamento químico para C_{8a} e C₈, os quais se encontram trocados na literatura (Tavares *et al.*, 1995), devido à correlação do hidrogênio em δ 3,66 (H_{3a}) com o carbono em δ 122,9 (C_{8a}, ³J) (**B**).

**B**

Ainda pelo espectro HMBC (Fig. 3.24, pág. 61), observou-se a correlação dos hidrogênios H₄ (δ 1,94) e H₆ (δ 2,16 / 1,50) com o carbono C_{8b}, $^3J(\text{C})$.

**C**

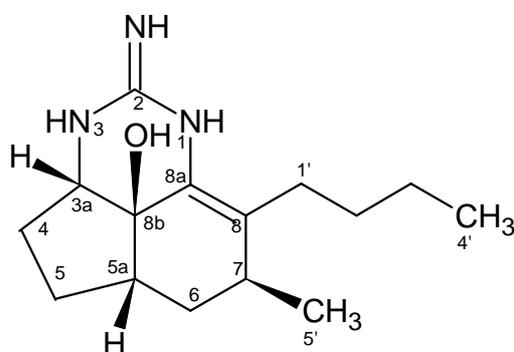
A configuração inferida para os estereocentros C-3a e C-5a, foi determinada através do espectro bidimensional ^1H , ^1H – NOESY (Fig. 3.25, pág. 62) o qual revelou interações espaciais entre o hidrogênio em δ_{H} 3,66 (H-3a) com o hidrogênio em δ_{H} 2,28 (H-5a) (**D**)

**D**

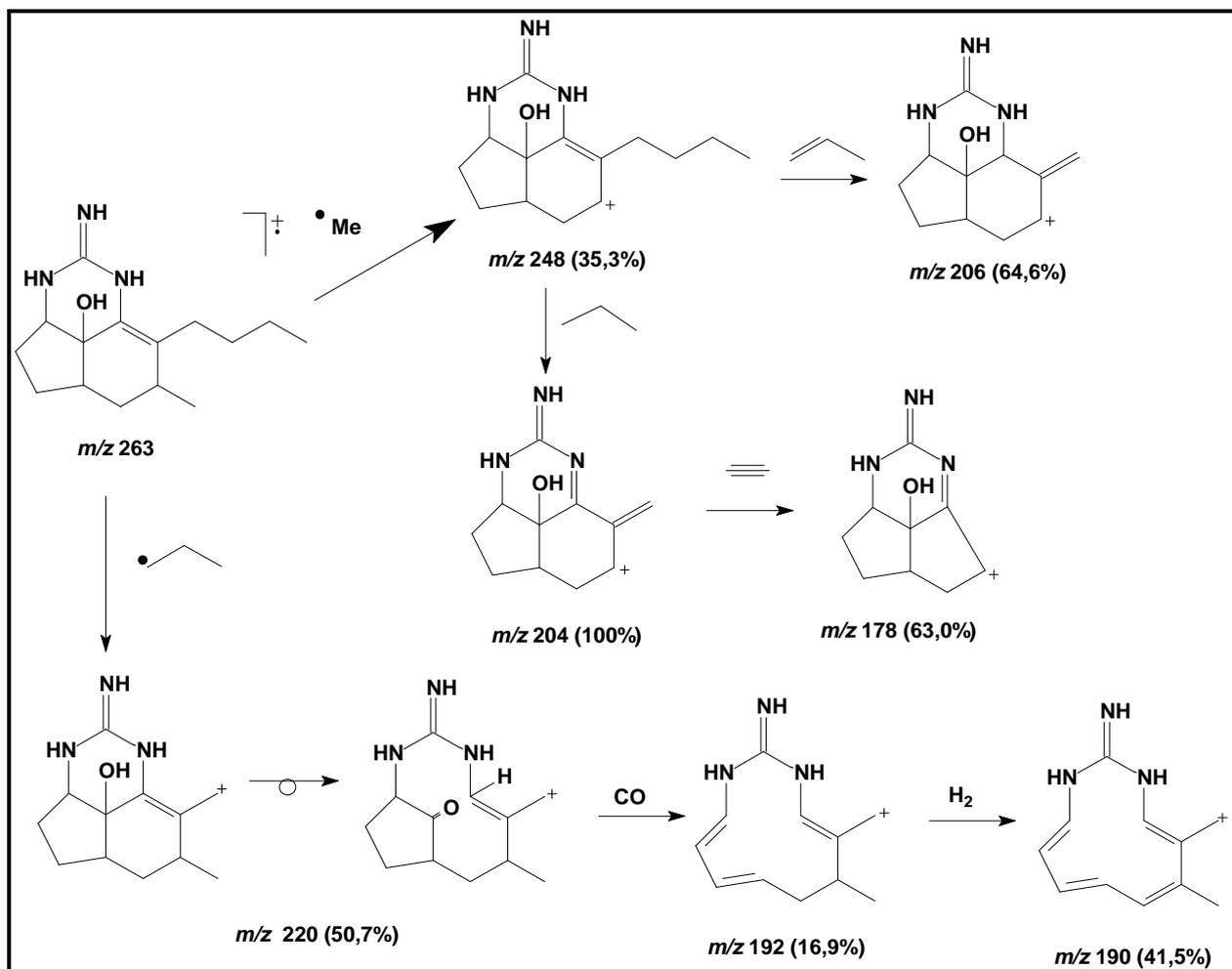
Determinação Estrutural – Capítulo 3

O conjunto dos dados discutidos, além de comparação com dados da literatura (Tabela 3.3, pág.53), e o padrão de fragmentação [(*m/z*) 248, 220, 206, 204, 192, 190, 178] (Quadro 3.2, pág. 52) permitiu identificar MAA-2 como o alcalóide guanidínico 8b-hidroxiptilocaulina, previamente isolado de *M. arbuscula* (Tavares, *et al.*, 1995).

Este metabólito mostrou-se bastante ativo frente ao painel de células tumorais (Tabela 4.1, pág.104), principalmente, frente às células leucêmicas (HL-60; IC₅₀ 1,8 µg/mL) e melanoma (MADMB-435; IC₅₀ 3,5 µg/mL). Apresentou atividade antifúngica contra *Microsporum canis* e *Trichophyton rubrum* com MIC 1,95 mcg/mL e 7,81 mcg/mL, respectivamente.



8b-Hidroxiptilocaulina



Quadro 3.2 – Proposta mecanística para a fragmentação que justifica alguns picos registrados no espectro de massa de MAA-2

Tabela 3.3 - Comparação de dados de RMN ^{13}C e ^1H de MAA-2 com dados da literatura (Tavares, et al., 1995)

# C	RMN ^1H		RMN ^{13}C	
	MAA-2 ^a	Lit. ^{b*}	MAA-2 ^a	Lit. ^{b*}
2	-	-	151.9	151,5
3a	3,66 (1H, m)	3,77 (1H, m)	59.0	57,5
4	1,90 (2H, m)	2,08 (1H, m); 1,22 (1H, m)	29.8	29,6
5	1,83 (1H, m); 1,54 (1H, m)	1,70 (1H, m); 1,35 (1H, m)	23.5	20,2
5a	2,28 (1H, m)	2,27 (1H, m)	40.3	39,6
6	2,16 (1H, m); 1,50 (1H, m)	1,68 (2H, m)	29.1	29,4
7	2,43 (1H, m)	2,36 (1H, m)	30.8	27,2
8	-	-	129.0	122,2
8a	-	-	122.9	129,8
8b	-	2,48 (1H, dd, $J = 6,6$ Hz)	69.8	70,1
1'	2,07 (2H, m)	2,43 (1H, m), 2,03(1H, m)	28.7	26,9
2'	1,29 (2H, m)	1,41(1H, m), 1,27(1H, m)	30.3	29,4
3'	1,35 (2H, m)	1,27 (2H, m)	23.1	22,3
4'	0,88 (3H, t, $J = 7,05$ Hz)	0,89 (3H, t, $J = 7,0$ Hz)	14.1	14,0
5'	1,18 (3H, d, $J = 7,35$ Hz)	1,10 (3H, d, $J = 7,0$ Hz)	21.8	19,3
HN-1	9,46 s	9,25 s	-	-
HN-3	9,02 s	8,20 s	-	-
H ₂ N ⁺	7,36 s	7,20 s	-	-
HO	-	5,30 s	-	-
HCOO ⁻	8,52 s	-	169,7	

Deslocamentos químicos (δ) em ppm.

^a CDCl₃; 500 MHz (^1H) e 125 MHz (^{13}C)

^b CD₃OD; 600 MHz (^1H) e 150 MHz (^{13}C). * Dados de RMN de Hidrocloreto de 8b – hidroxiptilocalina (HCl)

Tabela 3.4 - Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C e ^1H de MAA-2 em CDCl_3 .

#C	HSQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
2	151,9	-	-	1H-3a
3a	59,0	3,66 (1H, m)	2H-4	1H-2, 1H _b -6, 1H _b -5
4	29,8	1,94 (2H, m)	-	1H-5a
5	23,5	1,83 (1H, m); 1,54 (1H, m)	-	1H _a -6
5a	40,3	2,28 (1H, m)	2H-6	1H-7, 2H-4
6	29,1	2,16 (1H, m); 1,50 (1H, m)	1H-5a, 1H-7	3H-5'
7	30,8	2,43 (1H, m)	3H-5', 1H _a -6	-
8	129,0	-	-	-
8a	122,9	-	-	1H-3a
8b	69,8	-	-	2H-6, 1H-4
1'	28,7	2,07 (2H, m)	-	-
2'	30,3	1,29 (2H, m)	2H - 3'	3H-4'
3'	23,1	1,35 (2H, m)	2H - 2', 3H - 4'	2H-1'
4'	14,1	0,88 (3H, t, $J = 7.05$)	2H - 3'	2H-2'
5'	21,8	1,18 (3H, d, $J = 7.35$)	1H - 7	1H _a -6

Deslocamentos químicos (δ) em ppm. Constante de acoplamento (J) em Hertz

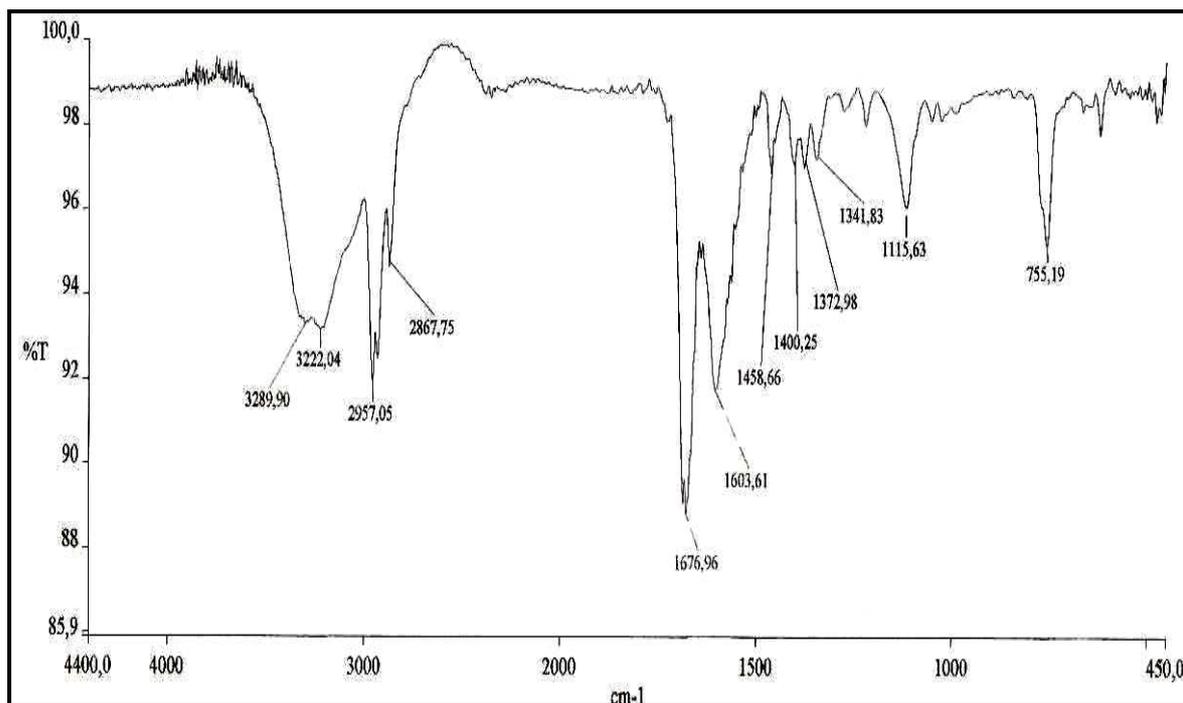


Figura 3.11 - Espectro de absorção na região do infravermelho (NaCl, cm^{-1}) de MAA-2

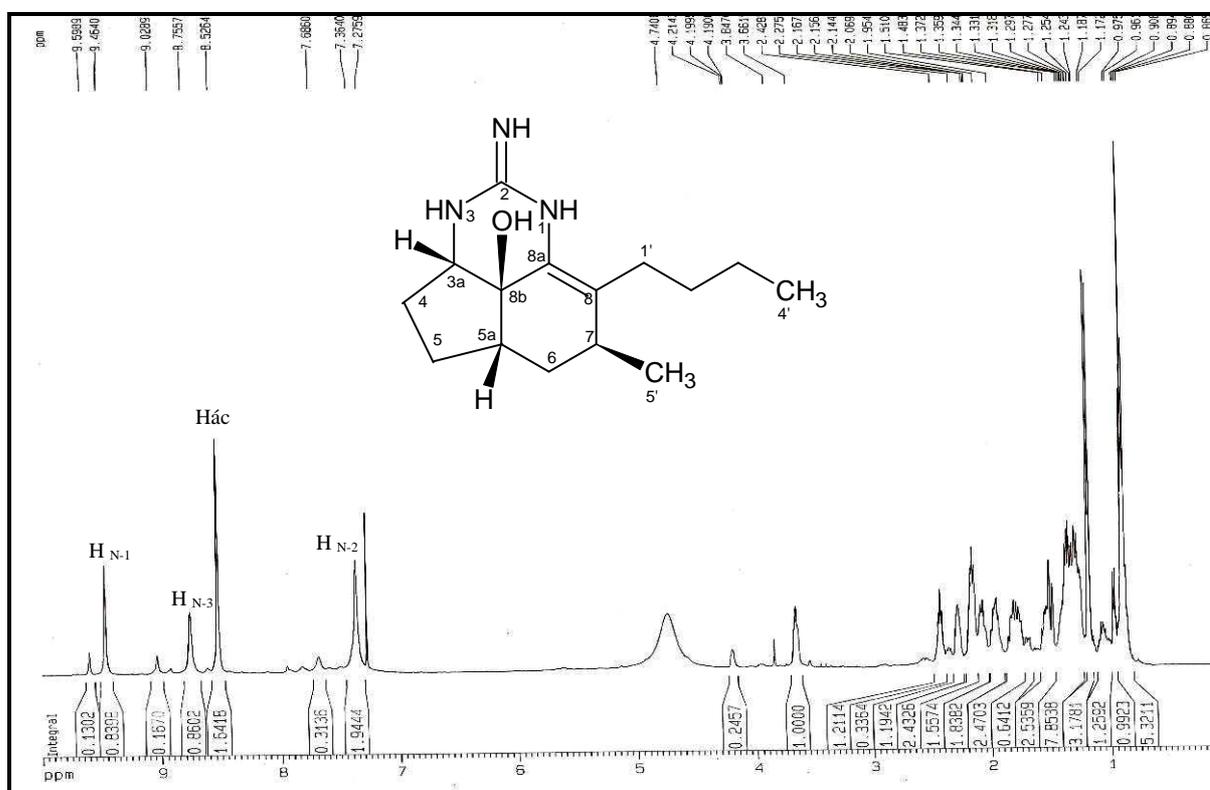


Figura 3.12 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de MAA-2.

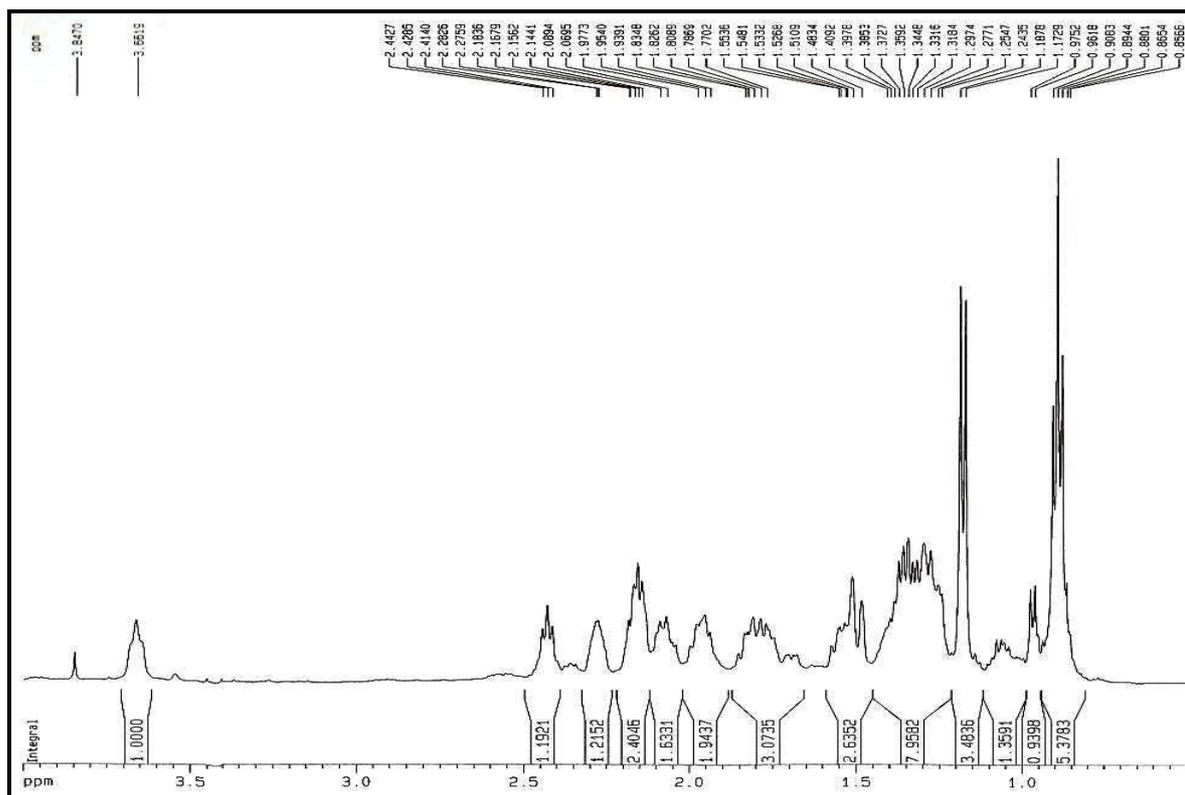


Figura 3.13 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) – expansão (0,85-3,84 ppm) de MAA-2.

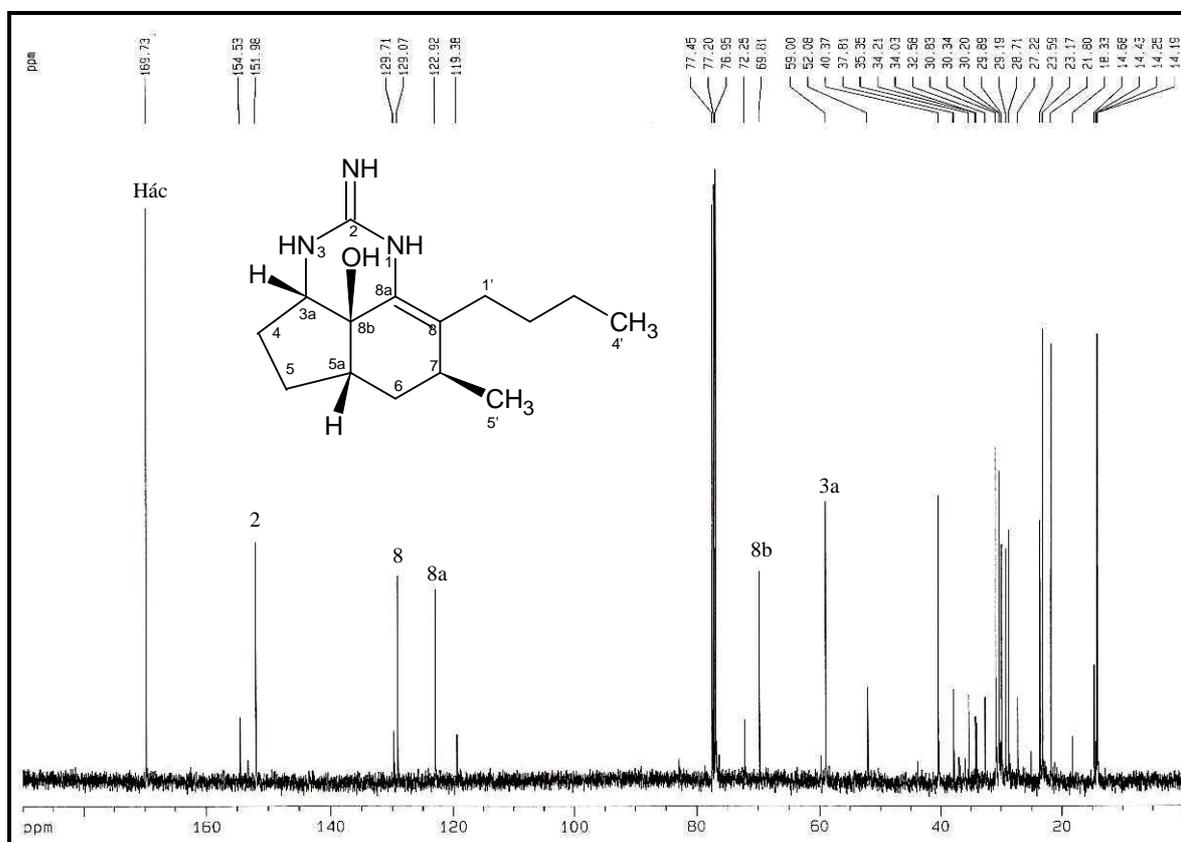


Figura 3.14 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, CDCl_3) de MAA-2

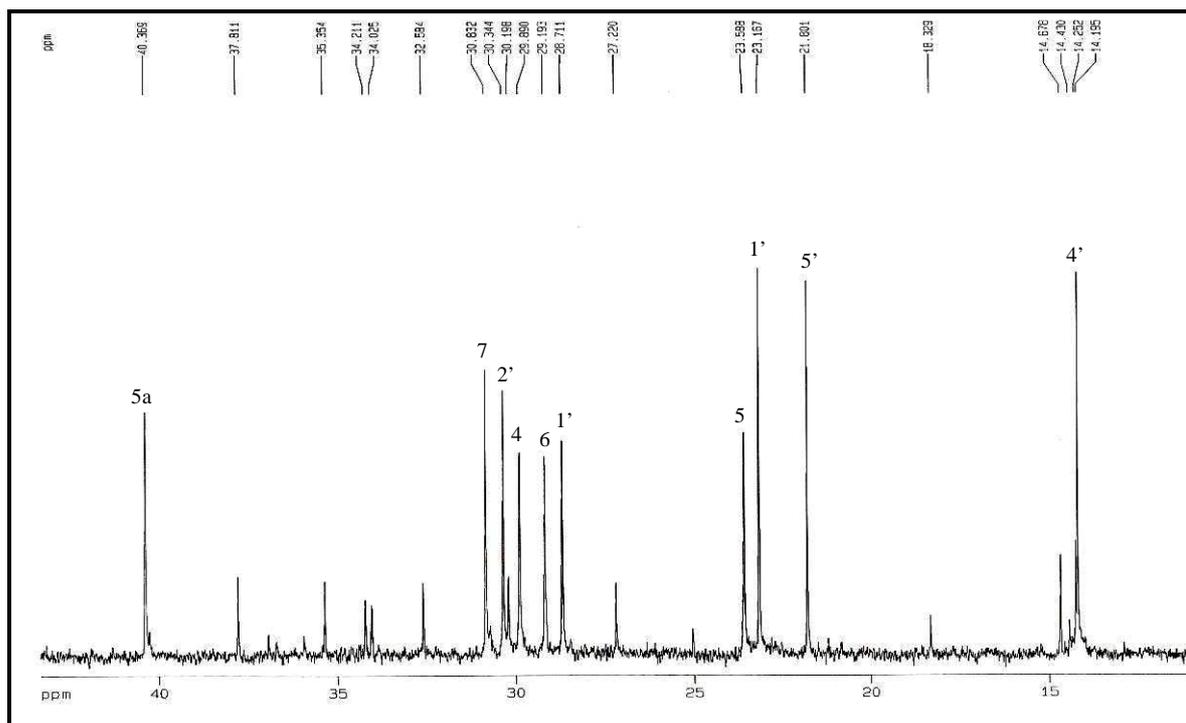


Figura 3.15 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, CDCl_3) - expansão (10-45 ppm) de MAA-2

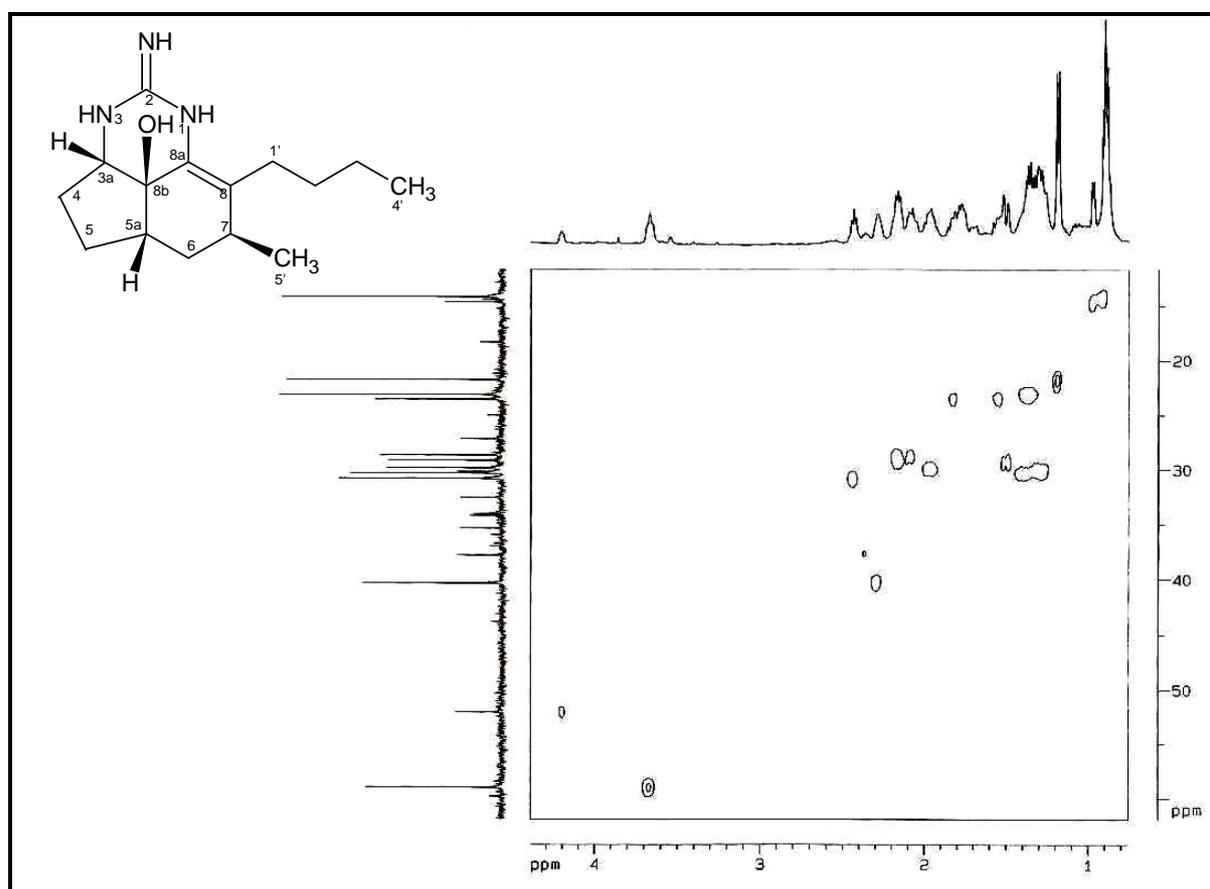


Figura 3.16 - Espectro de RMN HSQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de MAA-2

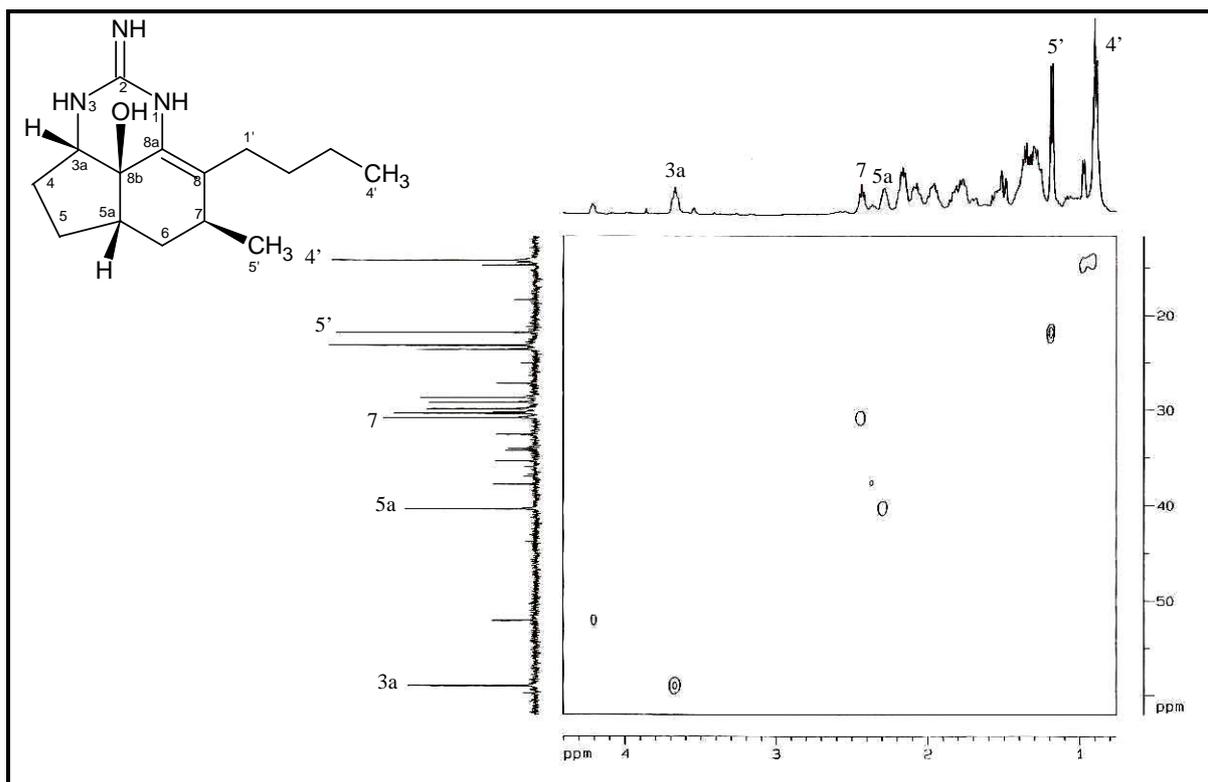


Figura 3.17 - Espectro HSQC editado (CH + CH₃) (500 e 125 MHz, CDCl₃) de MAA-2

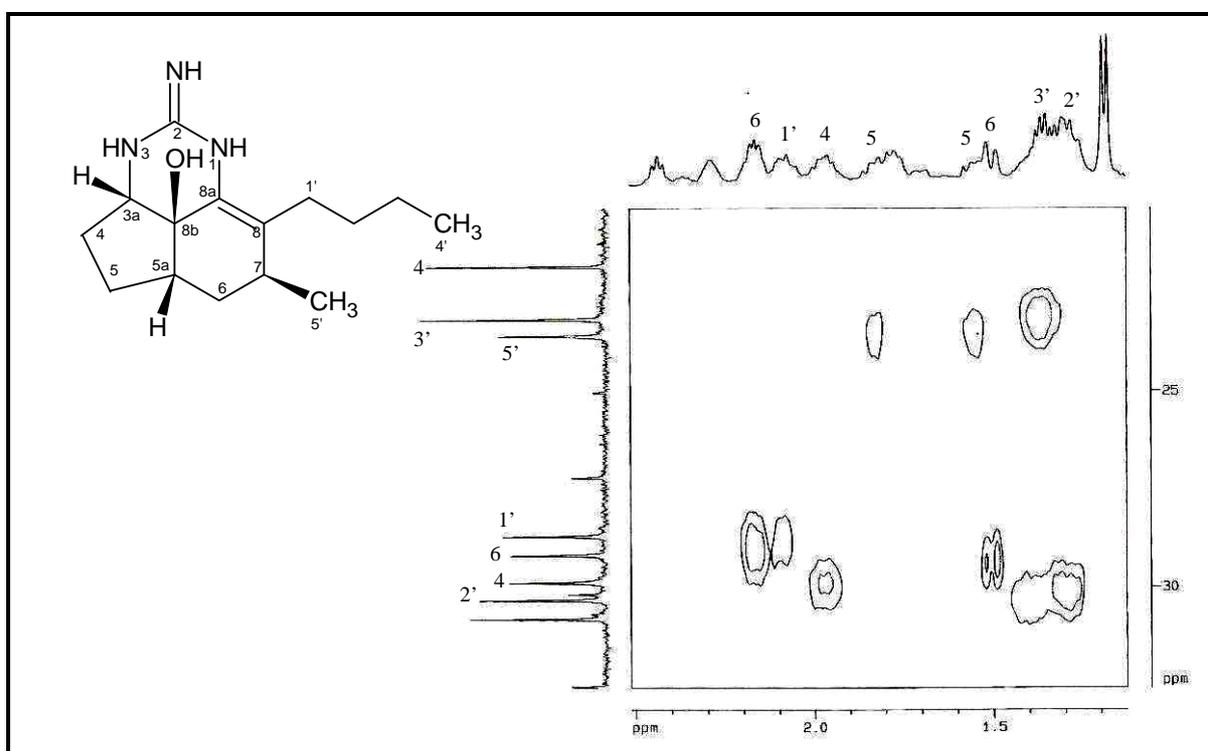


Figura 3.18 - Espectro de RMN HSQC editado (CH₂) (500 e 125 MHz, CDCl₃) – expansão (δ_H 1,0-2,5 / δ_C 20-35) de MAA-2

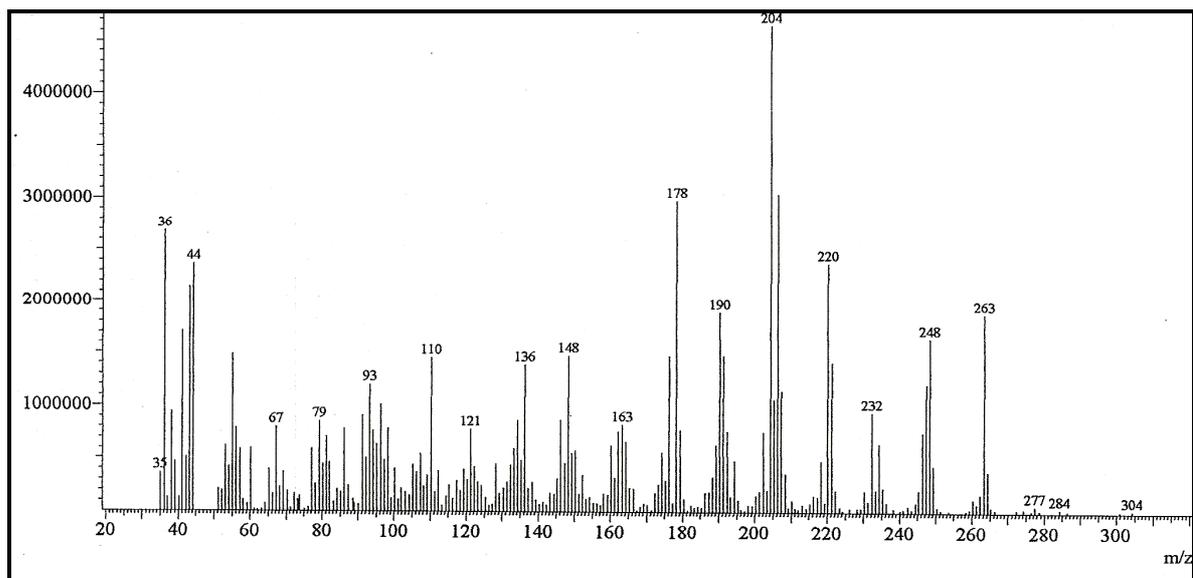


Figura 3.19 - Espectro de massa (IE, 70 eV) de MAA-2.

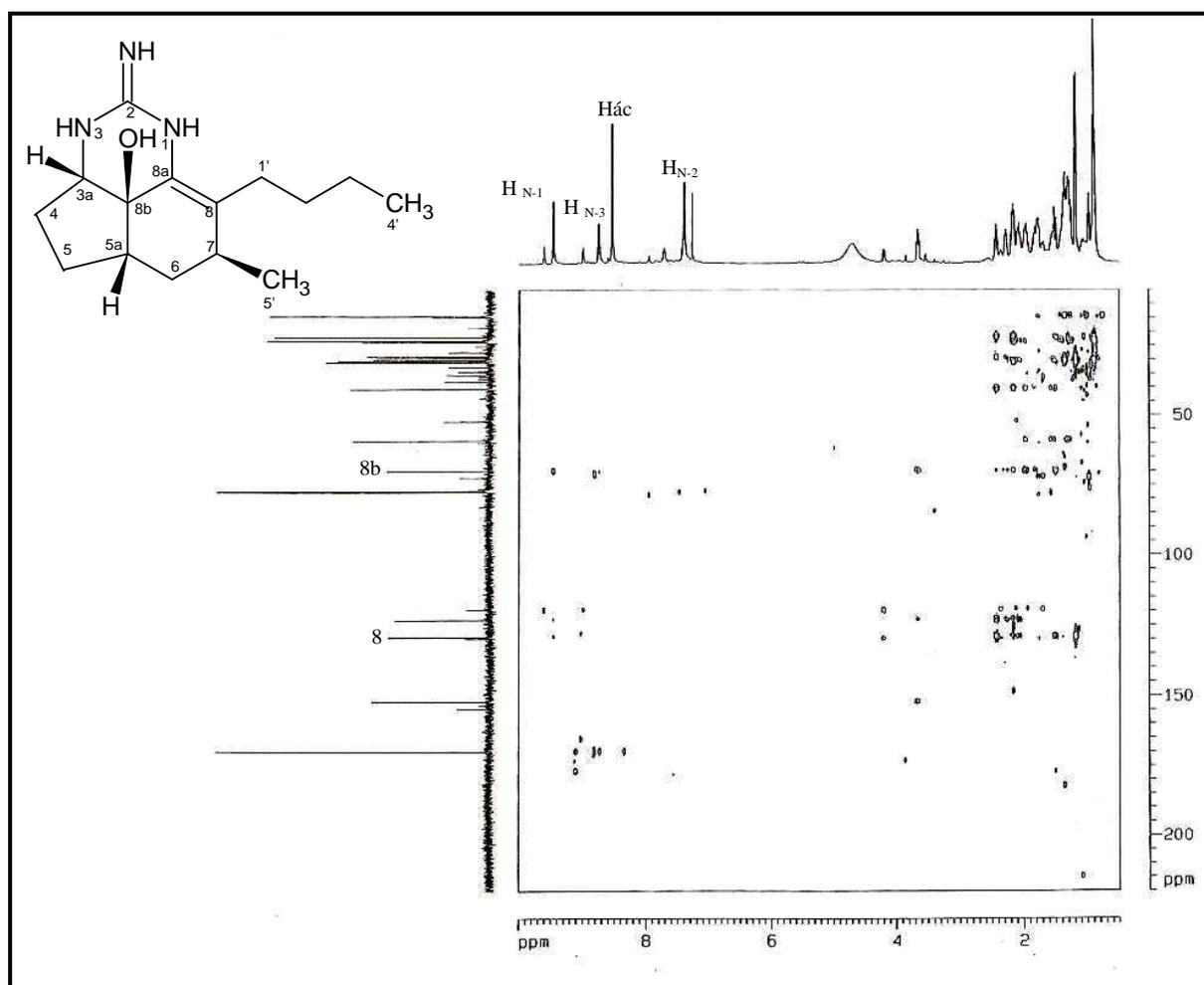


Figura 3.20 - Espectro de RMN HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de MAA-2.

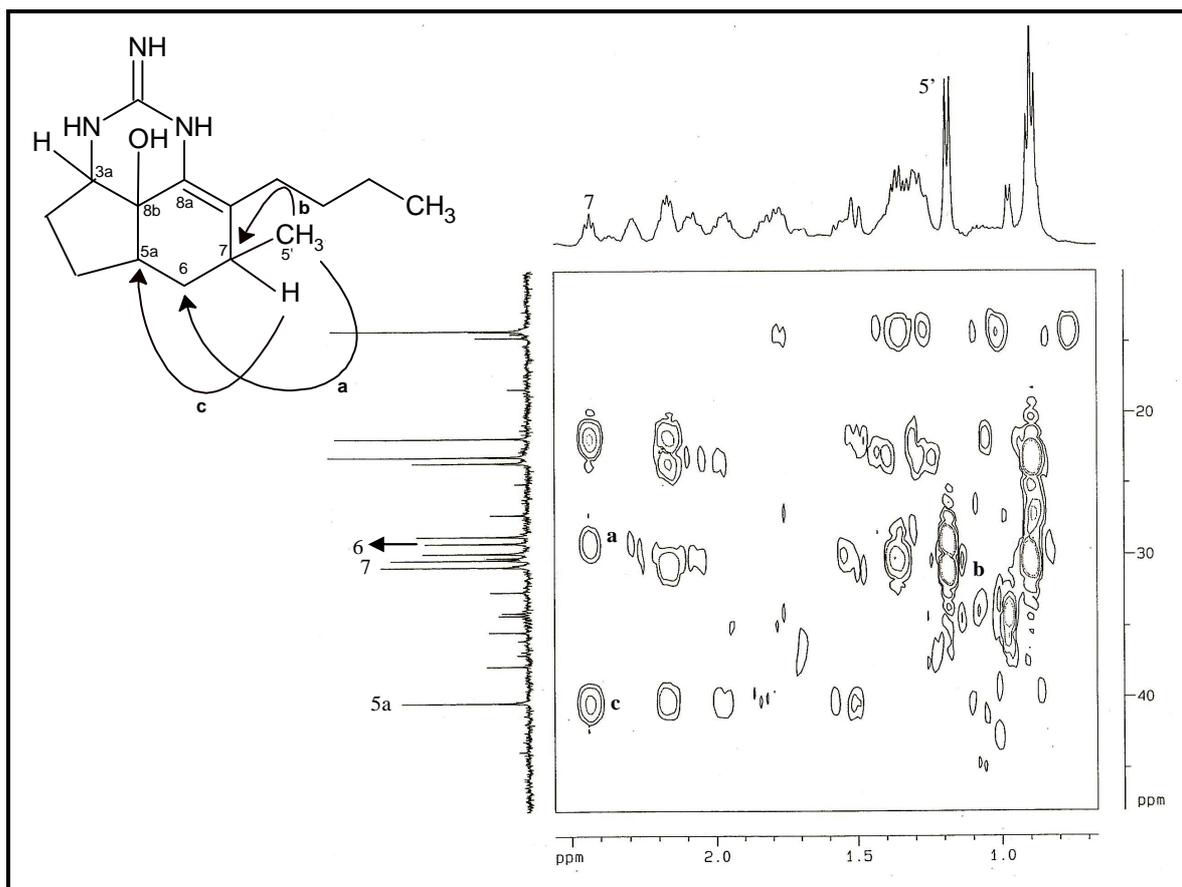


Figura 3.21 - Espectro de RMN HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) – expansão (δ_{H} 0,7-2,5 / δ_{C} 10-45) de MAA-2

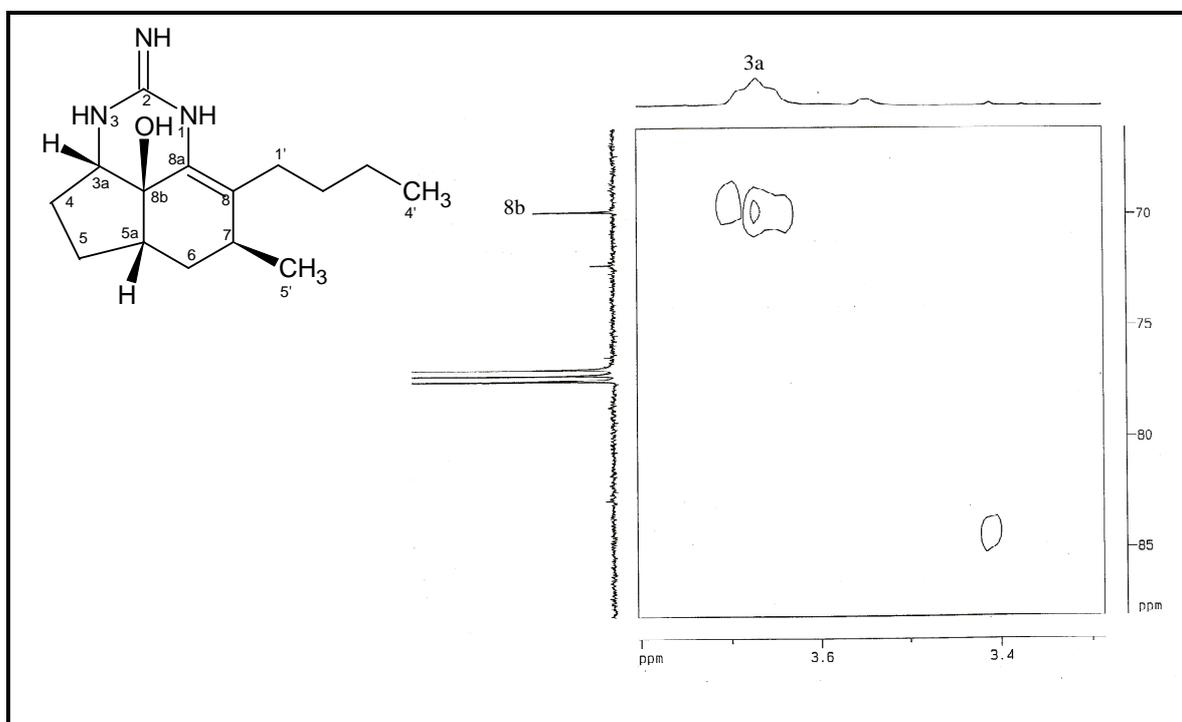


Figura 3.22 - Espectro de RMN HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) – expansão (δ_{H} 3,3-3,8 / δ_{C} 65-85) de MAA-2.

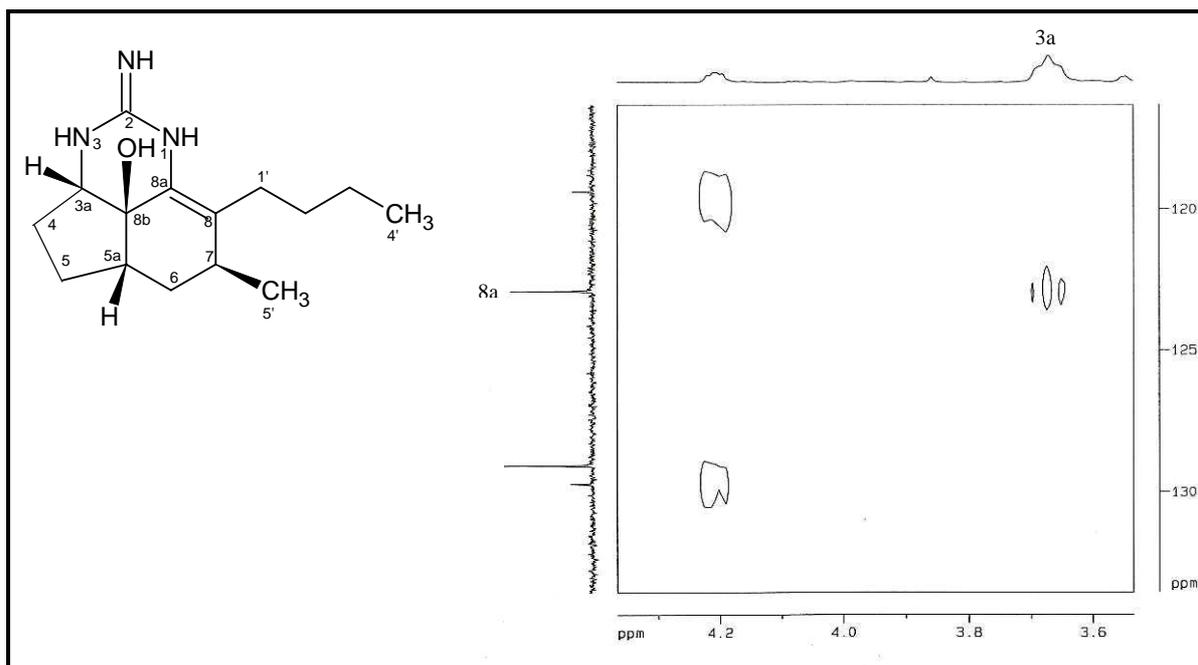


Figura 3.23 - Espectro de RMN HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) – expansão (δ_H 3,6-4,3 / δ_C 120-130) de MAA-2

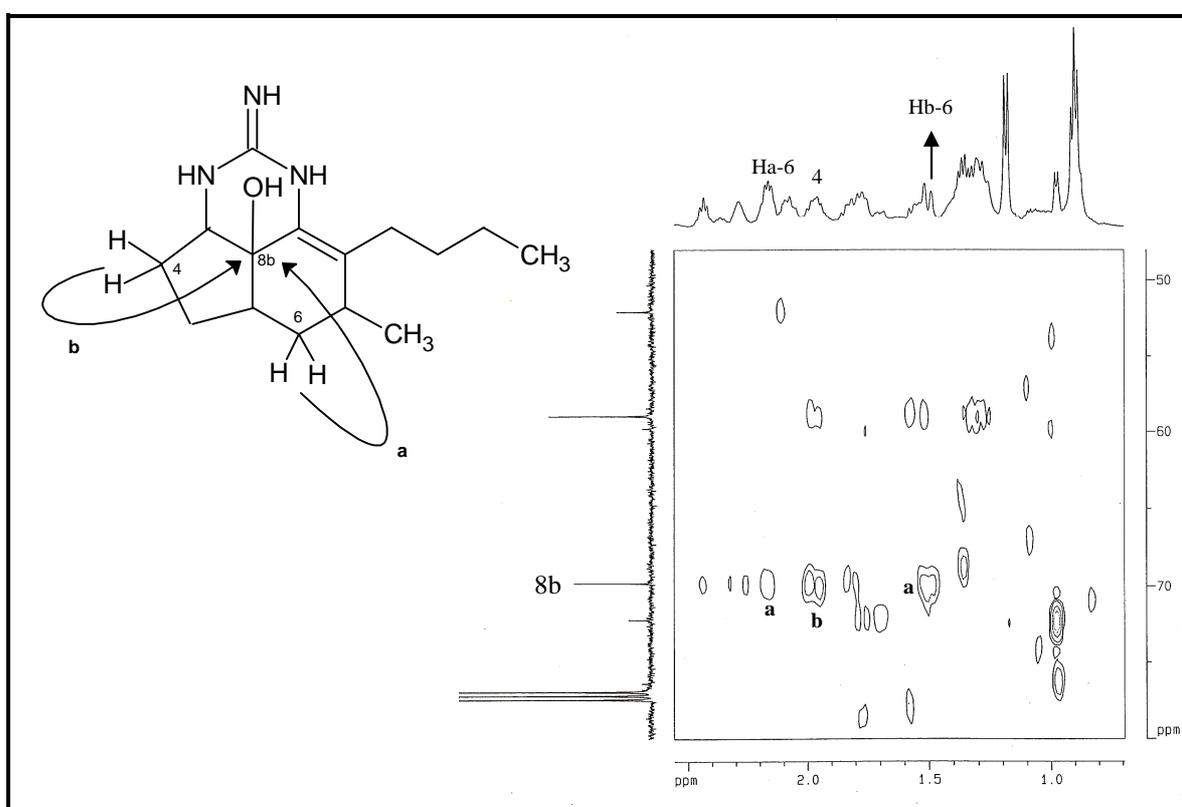


Figura 3.24 - Espectro de RMN HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) – expansão (δ_H 0,7-2,5 / δ_C 50-80) de MAA-2.

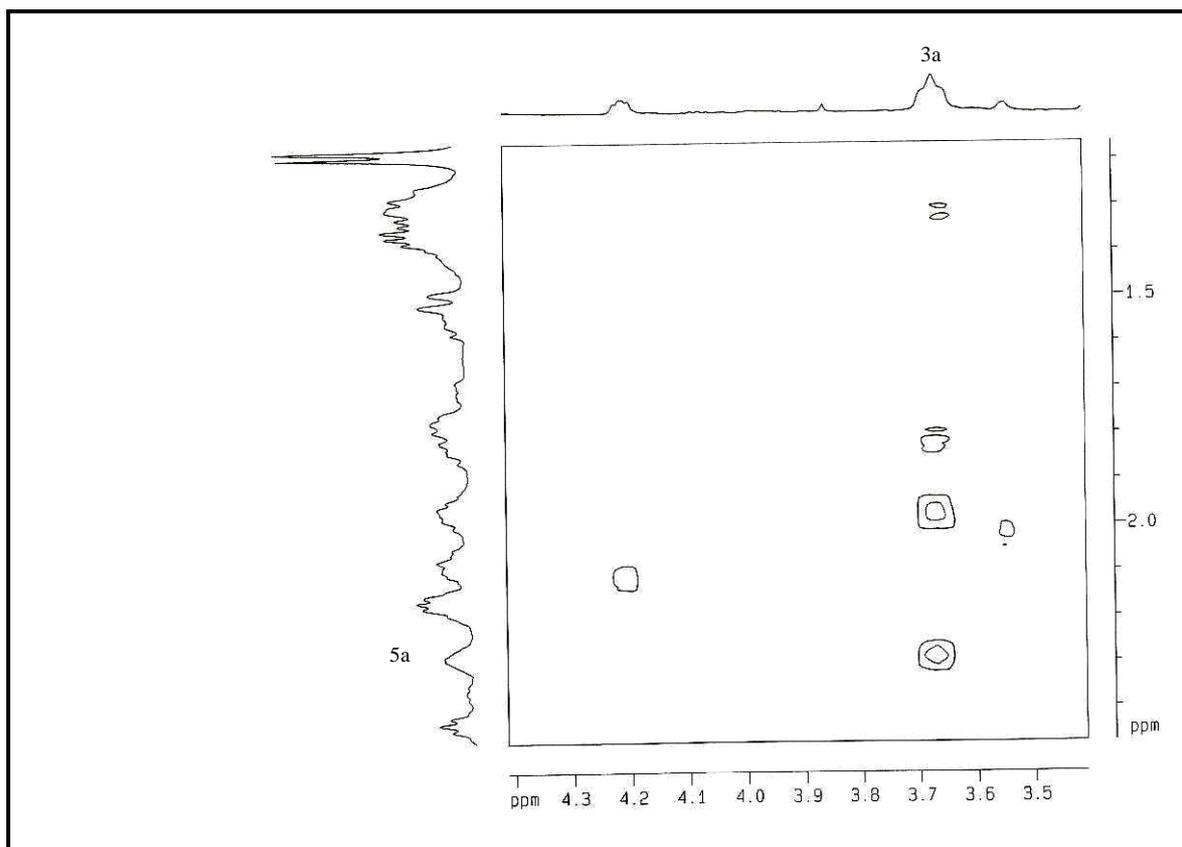
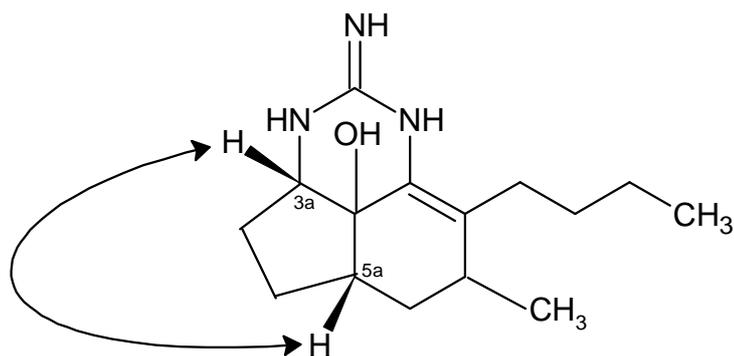


Figura 3.25 - Espectro de RMN NOESY (500 MHz, CDCl_3) – expansão (δ_{H} 3,4-4,4 / δ_{H} 1,2-2,4) de MAA-2.



3.3 - Determinação estrutural de MAA-3

A fração acetato de etila, proveniente da partição líquido-líquido do extrato bruto de *M. arbuscula*, após sucessivas cromatografias, incluindo HPLC (item 4.6.2.2.1, pág. 116), resultou no isolamento de um composto que se apresentou como uma mancha amarela com R_f diferente de MAA-2 em CCD, e que pela aspensão com reagente de Dragendorff parecia tratar-se também de um alcalóide. MAA-3 (24,5 mg) foi obtido na forma de uma resina amarelada, com rotação óptica específica $[\alpha]_D^{20} = +177$ ($c = 0,055$; MeOH).

A análise do espectro de absorção na região do infravermelho (NaCl, cm⁻¹) (Fig. 3.26, pág. 69) revelou a presença de uma banda em 3.203 cm⁻¹ correspondente ao estiramento de ligação =N-H, bandas em 2.955 e 2.867 cm⁻¹ de estiramento simétrico e assimétrico da ligação C-H de grupamentos metila e metileno, além de bandas em 1.686 e 1.672 cm⁻¹, compatíveis com os estiramentos de ligações C=N e C=C, e uma banda em 1.111 cm⁻¹ condizente ao estiramento de ligação C-N.

O espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) (Fig. 3.27, pág. 69) apresentou quatro singletos, três dos quais referentes à hidrogênios ligados a átomos de nitrogênios δ_H (9,53; 8,94 e 7,53) (Tavares *et al.*, 1995). O sinal em δ_H 8,62 foi atribuído ao hidrogênio do ácido fórmico (Pretsch, *et al.*, 2000) utilizado no processo de isolamento de MAA-3, como observado para o composto MAA-2.

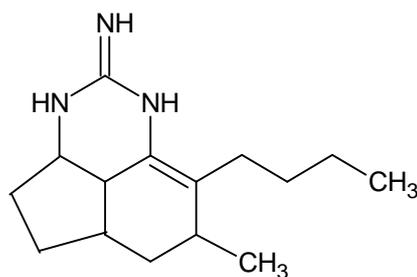
A exemplo dos outros compostos isolados de *M. arbuscula*, o espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) (Fig. 3.28, pág. 70) também revelou sinais referentes a dois grupos metilas em δ_H 1,13 (d, $J = 7,15$ Hz, H_{5'}) e 0,88 (t, $J = 6,0$ Hz, H_{4'}), além de uma série de multipletos na faixa de 3,70 a 1,31 ppm (Tabela 3.5, pág. 67).

No espectro de RMN ¹³C-CPD (125 MHz, CDCl₃) (Fig. 3.29, pág. 70), foram observados 16 linhas espectrais, 15 delas referentes ao esqueleto estrutural guanidínico. O sinal adicional em δ 169,6 foi atribuído ao carbono do ácido fórmico como observado para o composto MAA-2. O sinal em δ 152,5 foi relacionado a dupla ligação (C=N) de grupo guanidínico (Tavares *et al.*, 1995), enquanto os sinais em δ 126,7 e 121,3 foram atribuídos a carbonos olefínicos (Tabela 3.5, pág.67).

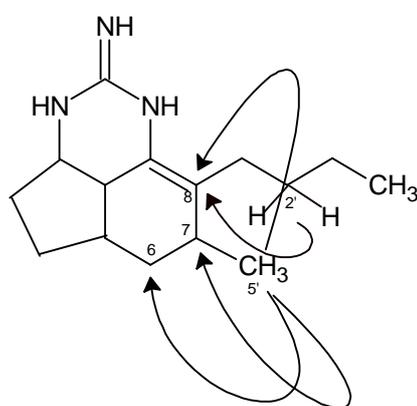
Através do espectro HSQC (Fig. 3.30, pág. 71) (Tabela 3.6, pág. 68) cada sinal de carbono foi correlacionado aos seus respectivos sinais de hidrogênios.

Pelos espectros HSQC editado (CH + CH₃) (Fig. 3.31, pág. 71) e HSQC editado (CH₂) (Fig. 3.32, pág. 72) foi possível determinar o padrão de hidrogenação correspondente a cada átomo de carbono, isto é, quatros carbonos metínicos, dois carbonos metílicos e seis carbonos metilênicos.

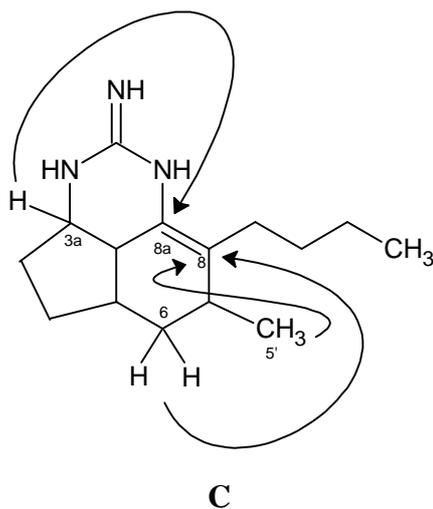
Através da comparação entre os espectros de RMN ¹³C-CPD, HSQC editado (CH + CH₃) e HSQC editado (CH₂) foi possível determinar a presença de três carbonos não-hidrogenados, permitindo, assim, propor para MAA-3 a fórmula molecular C₁₅H₂₅N₃, em acordo com o pico do íon-molecular com razão massa/carga (*m/z*) igual 247 Daltons observado no espectro de massa (Fig. 3.33, pág. 72). O índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a 5, calculado para a fórmula molecular, assim como os fragmentos (232, 204, 190, 176) (Quadro3.3, pág. 66), confirma para MAA-3 uma estrutura semelhante aos demais compostos isolados, ou seja, um alcalóide guanidínico tricíclico, o qual apresenta uma ligação dupla carbono-carbono, **A**.

**A**

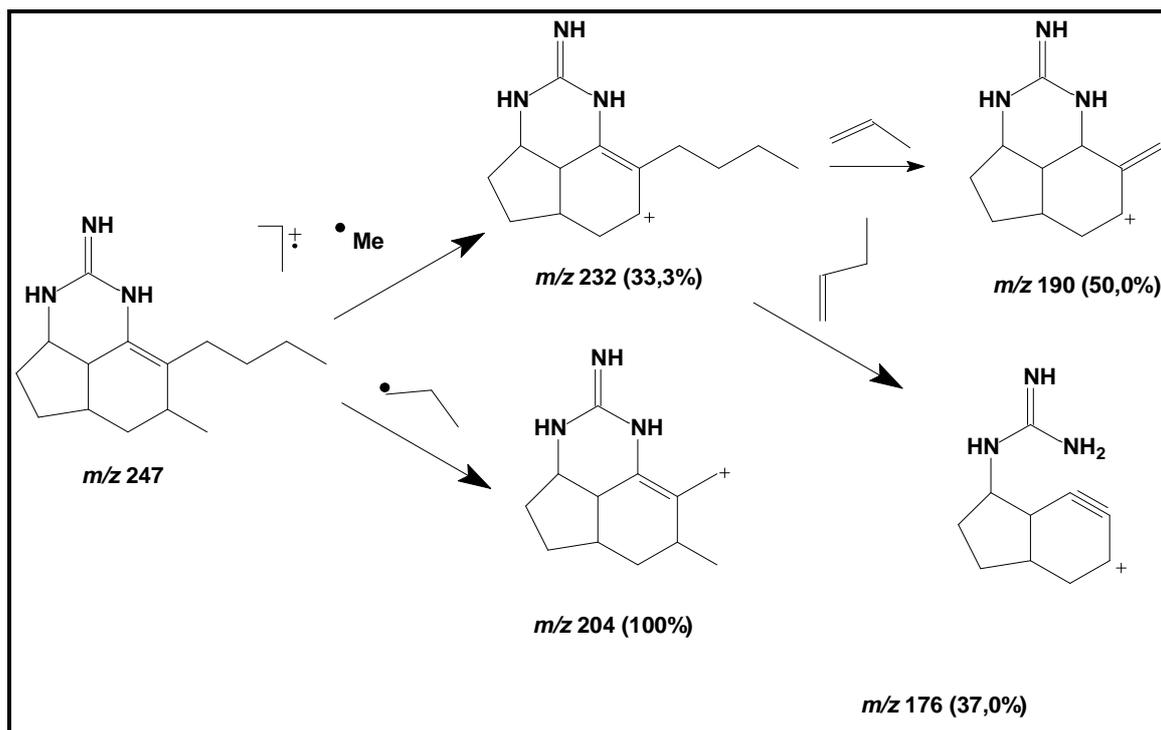
O espectro de RMN HMBC (Fig. 3.34, pág. 73) (Tabela 3.6, pág. 68) mostrou correlações do sinal em δ 1,13 (3H_{5'}) com os carbonos em δ 126,7 (C₈), 34,5 (C₆) e 30,4 (C₇) e dos hidrogênios em δ 1,34 (H₂) com o carbono C₈ (δ 126,7), permitindo confirmar a presença dos grupos metila e butila nos carbonos 7 e 8, respectivamente.

**B**

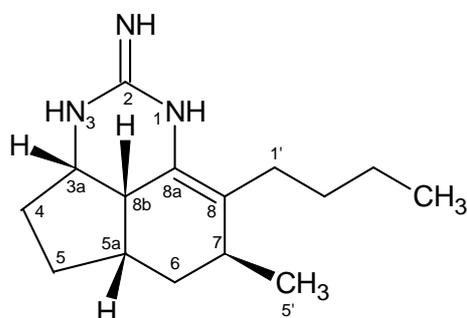
Os espectros HMBC (Figs. 3.35 e 3.36, págs. 73 e 74) foram de extrema importância na atribuição inequívoca dos deslocamentos químicos correspondente aos carbonos C_8 e C_{8a} , os quais se encontram trocados na literatura, devido a correlação 3J do hidrogênio H_{3a} (δ 3,70) com o carbono em δ 121,3 (C_{8a}) e a correlação 3J dos hidrogênios H_6 (δ 1,92 / 1,31) e δ 1,13 ($3H_{5'}$) com o carbono C_8 , podendo assim, também justificar a posição da dupla ligação.



A reunião de todos os dados apresentados levou a dedução da estrutura de MAA-3 como sendo o alcalóide guanidínico ptilocaulina, previamente isolado na espécie (Tavares, *et al.*, 1995), como também, a partir da espécie *Ptilocaulis spiculifer* e *Monanchora unguifera* Gallimora (Kelly e Scheuer, 2005). Este alcalóide mostrou-se ativo frente ao painel de células tumorais (Tabela 4.1, pág. 104), principalmente para as células leucêmicas (HL-60; IC_{50} 1,1 $\mu\text{g/mL}$) e melanona (MADMB-435; IC_{50} 1,8 $\mu\text{g/mL}$). Segundo dados da literatura, relata-se para ptilocaulina a atividade citotóxica contra células leucêmicas, assim como atividade antimicrobiana contra *Streptococcus pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia* (Harbour *et al.*, 1981). Quanto atividade anti-fúngica, ptilocaulina mostrou-se ativa contra o fungo *Microsporium canis* com MIC 7,81 mcg/mL.



Quadro 3.3 – Proposta mecanística para a fragmentação que justifica alguns picos registrados no espectro de massa de MAA-3



Ptilocaulina

Tabela 3.5 - Comparação de dados de RMN ^{13}C e ^1H de MAA-3 com dados da literatura (Tavares, et al., 1995).

# C	RMN ^1H		RMN ^{13}C	
	MAA-3 ^a	Lit. ^{b*}	MAA-3 ^a	Lit. ^{b*}
2	-	-	152,5	151,7
3a	3,70 (1H, m)	3,77 (1H, m)	53,7	53,2
4	1,95 (1H, m), 1,47 (1H, m)	2,05 (1H, m), 1,40 (1H, m)	32,1	32,3
5	1,69 (1H, m), 1,57 (1H, m)	1,67(1H, m), 1,43 (1H, m)	27,5	24,6
5a	2,44 (1H, m)	2,40 (1H, m)	34,3	33,9
6	1,92 (1H, m), 1,31 (1H, m)	1,70 (1H, m), 1,47 (1H, m)	34,5	33,0
7	2,29 (1H, m)	2,37 (1H, m)	30,4	27,7
8	-	-	126,7	121,0
8a	-	-	121,3	127,0
8b	2,52 (1H, m)	2,48 (1H, dd, $J = 6,6$ Hz)	35,8	36,5
1'	2,27 (1H, m), 2,11 (1H, m)	2,33 (1H, m), 2,02 (1H, m)	27,8	26,7
2'	1,34 (2H, m)	1,40 (1H, m), 1,29 (1H, m)	30,9	29,6
3'	1,37 (2H, m)	1,25 (1H, m)	22,9	22,4
4'	0,88 (3H, t, $J = 6,05$ Hz)	0,85 (3H, t, $J = 7$ Hz)	14,3	13,9
5'	1,13 (3H, d, $J = 7,15$ Hz)	1,05 (3H, d, $J = 7$ Hz)	20,8	19,5
HN-1	9,53 s	8,90 s	-	-
HN-3	8,94 s	8,36 s	-	-
H ₂ N ⁺	7,53 s	7,45 s	-	-
HCOO ⁻	8,62 s	-	169,6	-

Deslocamentos químicos (δ) em ppm.

^a CDCl₃; (500 e 125 MHz)

^b CDCl₃; (600 e 150 MHz). * Dados de RMN de Nitrato de Ptilocaulina (HNO₃)

Tabela 3.6 - Deslocamentos químicos de RMN ^{13}C e ^1H de MAA-3 em CDCl_3 .

#C	HSQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
2	152,5	-	-	-
3a	53,7	3,70 (1H, m)	1H-8b, 1H _b -4	1H _b -5
4	32,1	1,95 (1H, m); 1,47 (1H, m)	-	1H-8b
5	27,5	1,69 (1H, m); 1,57 (1H, m)	1H _a -4	1H-8b, 1H _a -6
5a	34,3	2,44 (1H, m)	-	1H _a -4'
6	34,5	1,92(1H, m); 1,31 (1H, m)	-	1H-5'
7	30,4	2,29 (1H, m)	1H _a -6, 1H-5', 1H _b -6	
8	126,7	-		1H-5', 1H-6 1H-2'
8a	121,3	-	1H-8b	1H-3a
8b	35,8	2,52 (1H, m)		1H-8
1'	27,8	2,11 (1H, m)	1H-2'	
2'	30,9	1,34 (2H, m)	-	1H-4'
3'	22,9	1,37 (2H, m)	1H _b -4'	
4'	14,3	0,88 (3H, t, $J = 6.05$)		
5'	20,8	1,13(3H, d, $J = 7.15$)	-	2H-6

Deslocamentos químicos (δ) em ppm. Constante de acoplamento (J) em Hertz

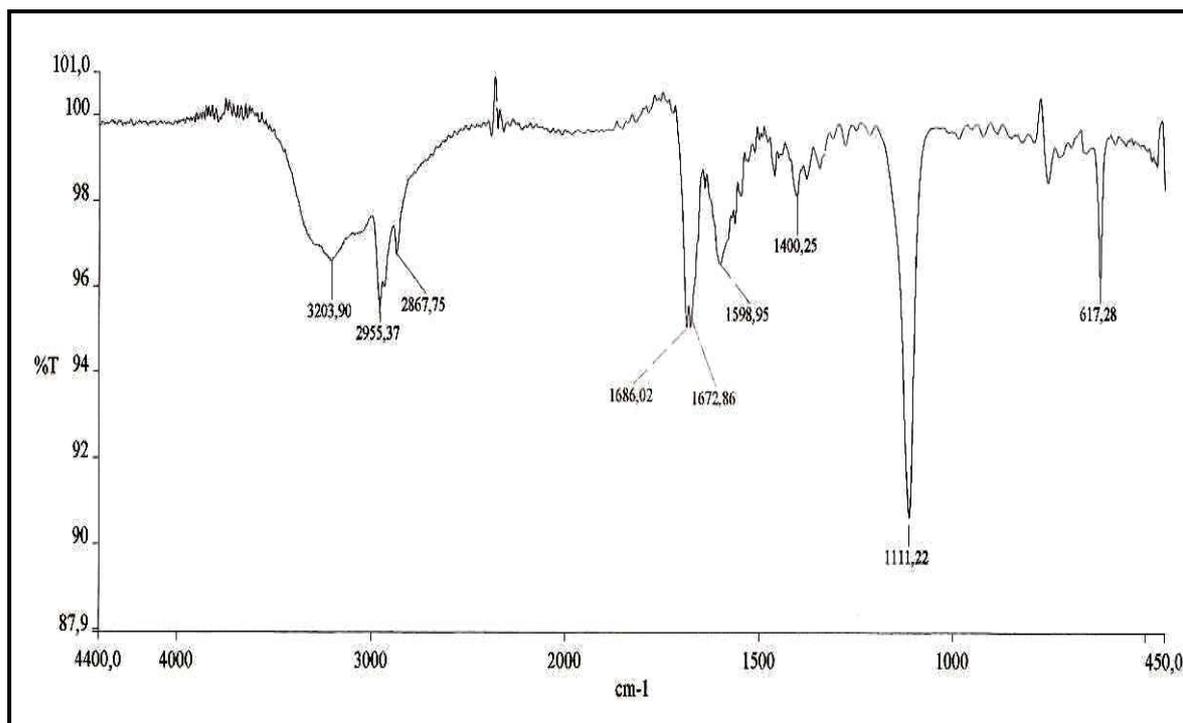


Figura 3.26 - Espectro na região de absorção do infravermelho (NaCl, cm⁻¹) de MAA-3

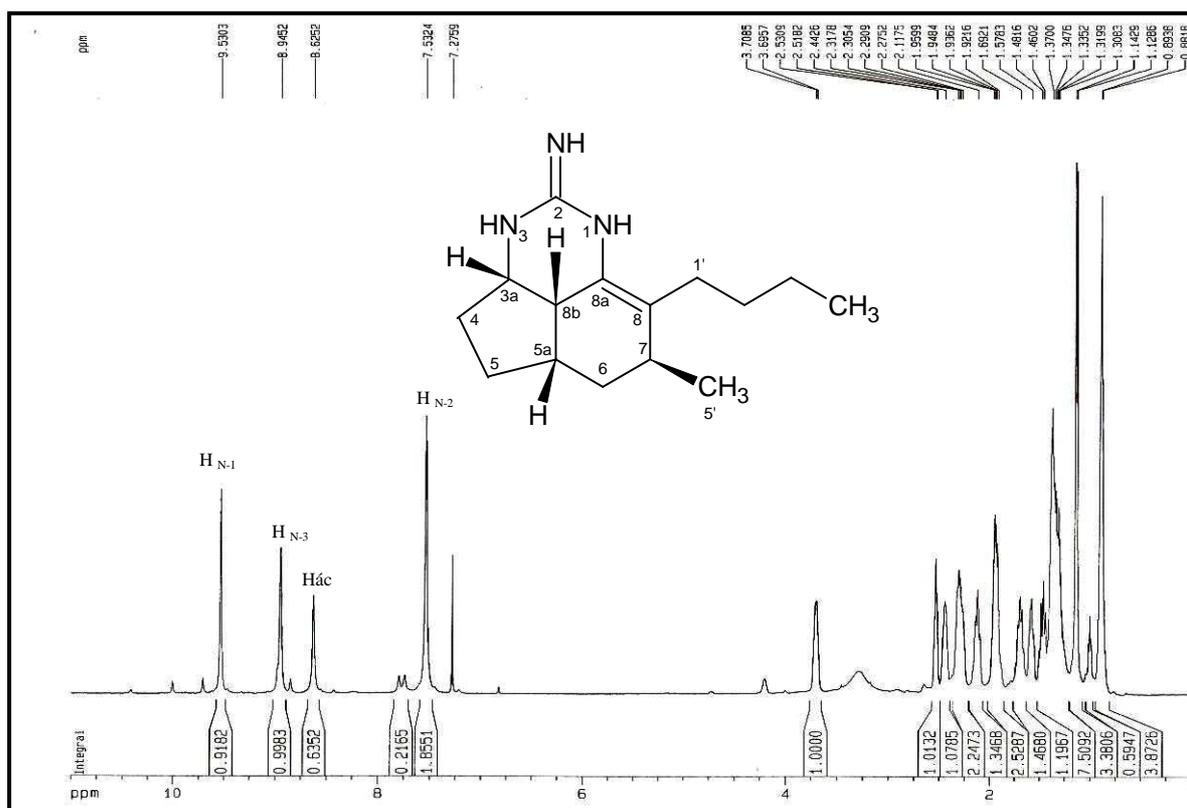


Figura 3.27 - Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) de MAA-3

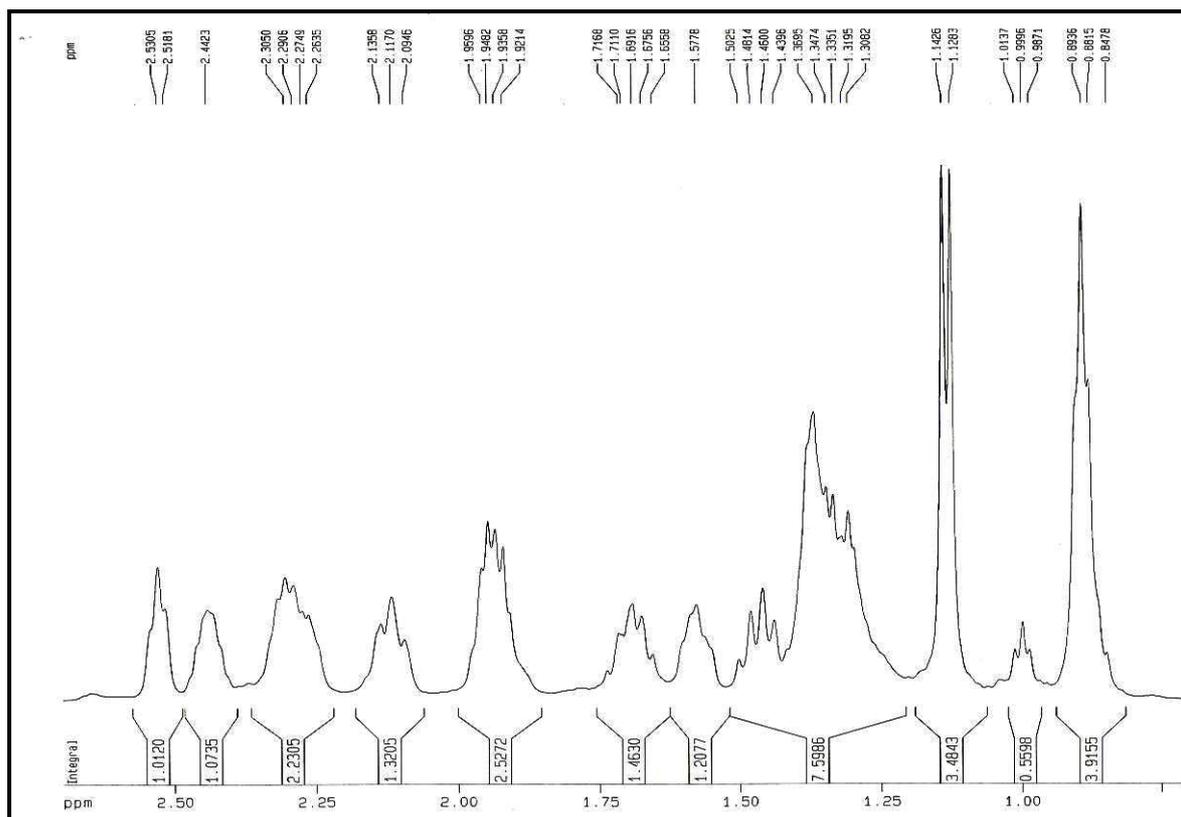


Figura 3.28 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) - expansão (0,84-2,53 ppm) de MAA-3.

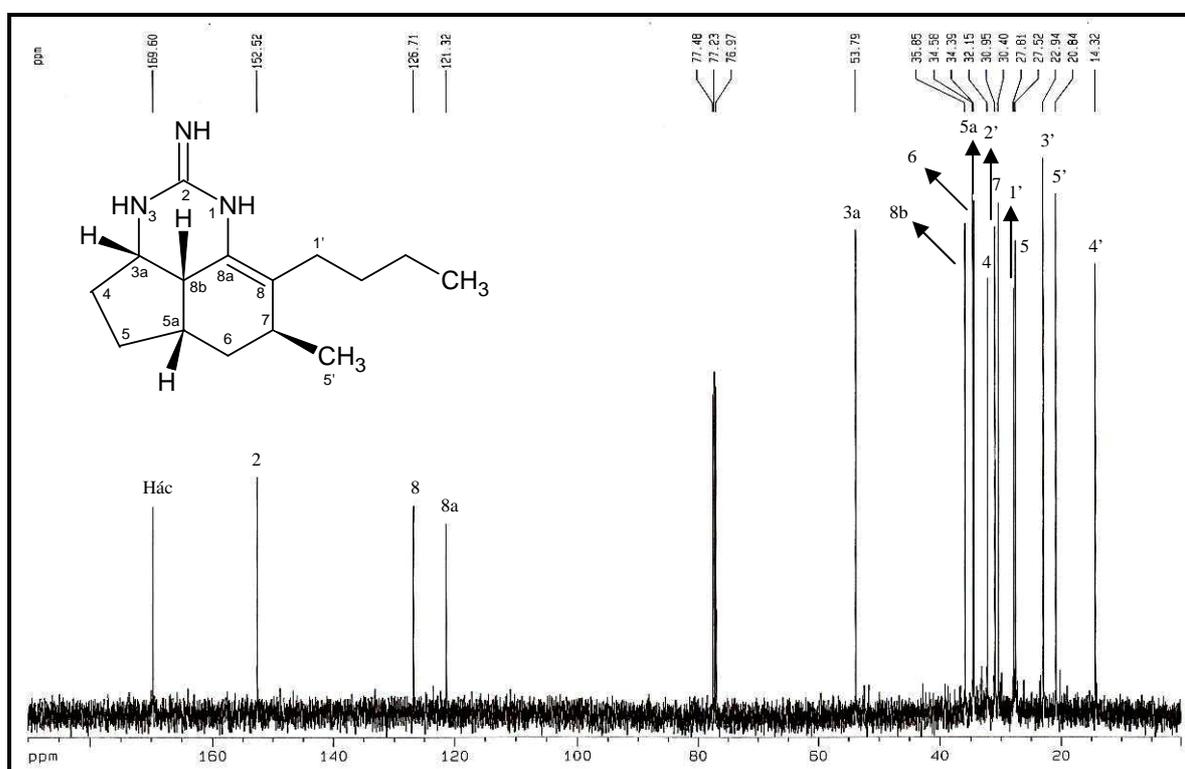


Figura 3.29 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de MAA-3.

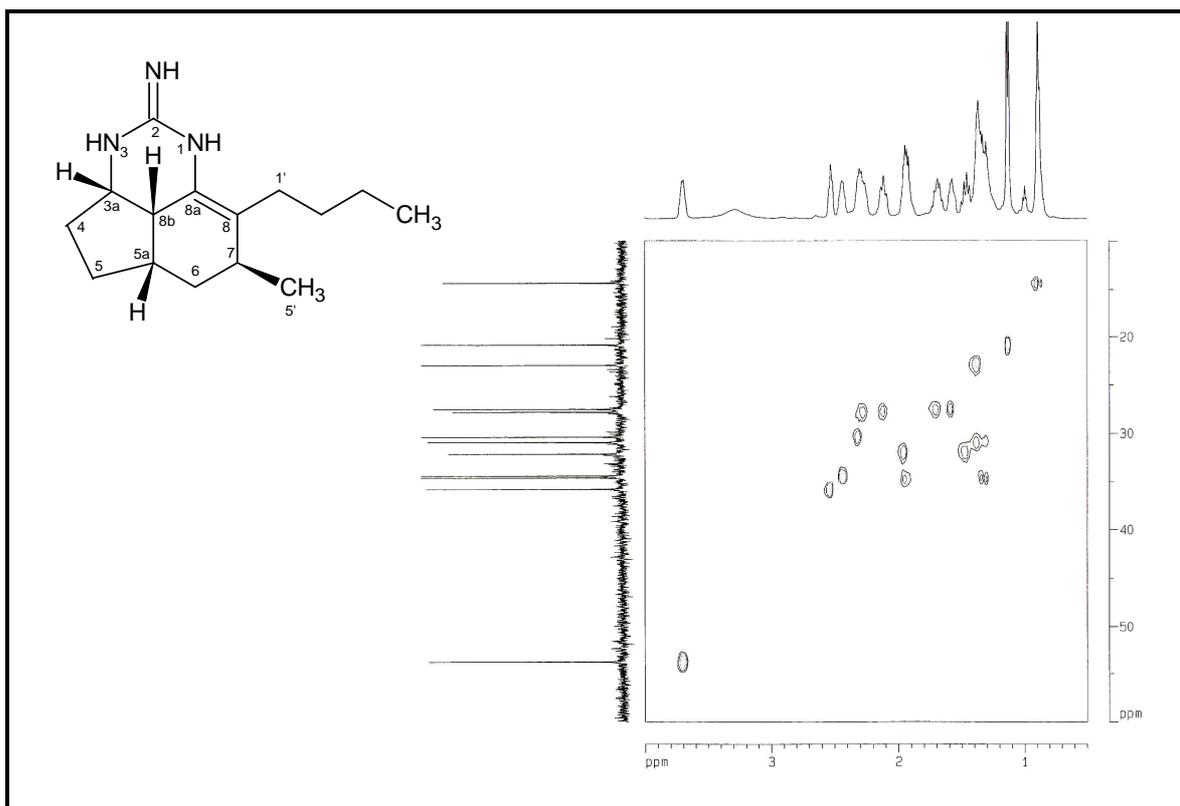


Figura 3.30 - Espectro de RMN HSQC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de MAA-3.

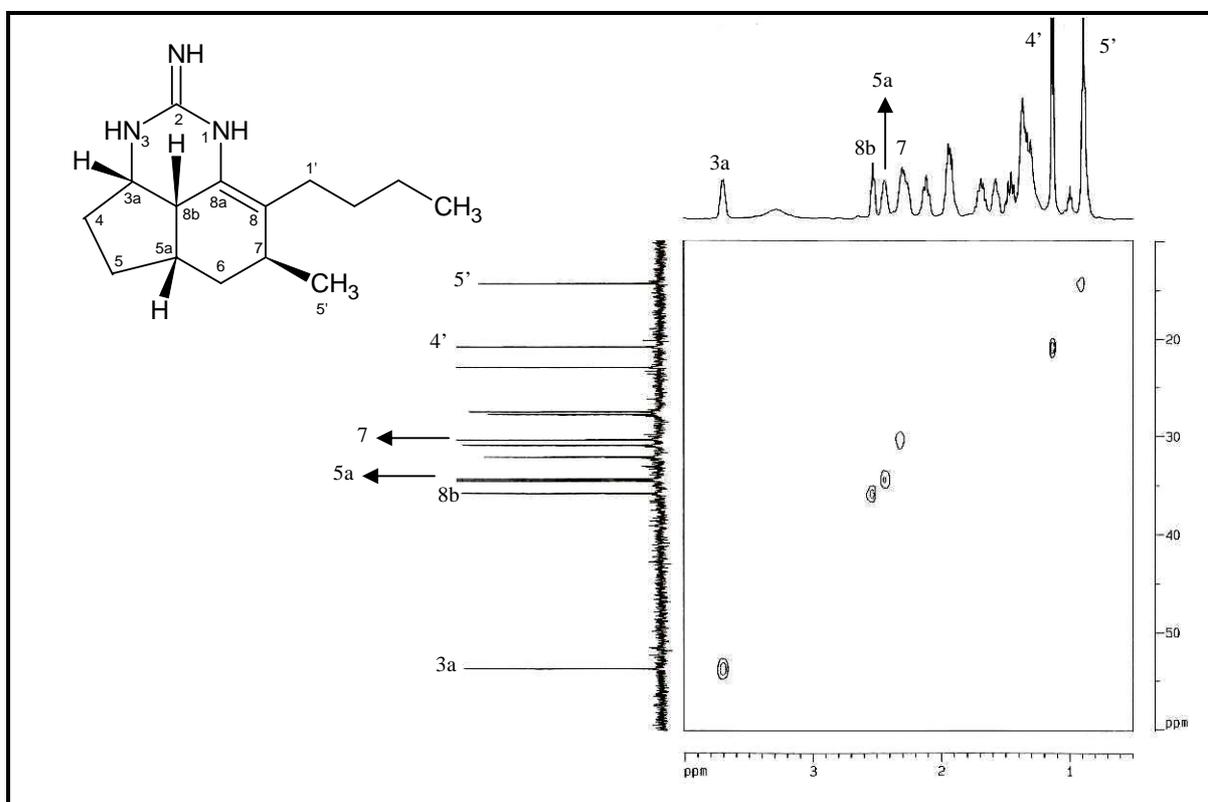


Figura 3.31 - Espectro de RMN HSQC editado ($\text{CH} + \text{CH}_3$) (500 e 125 MHz, CDCl_3) de MAA-3.

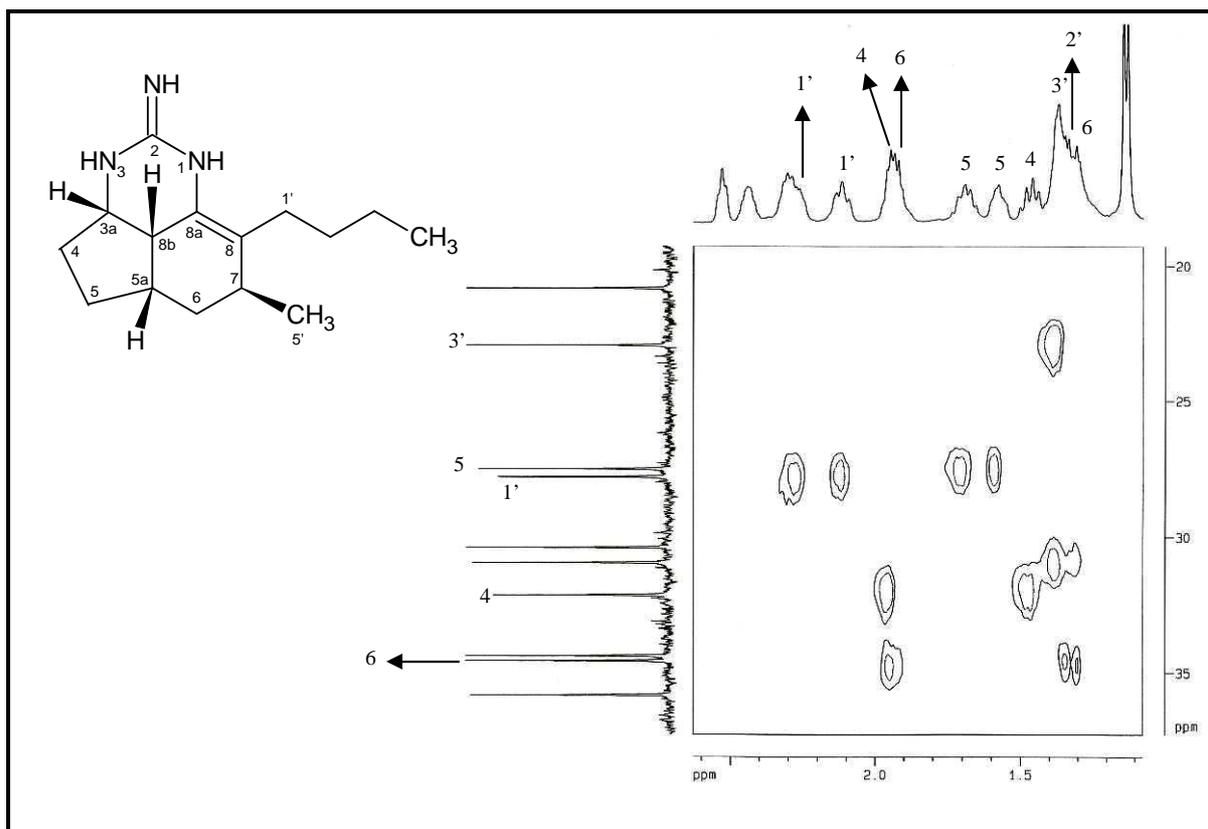


Figura 3.32 - Espectro de RMN HSQC editado (CH_2) (500 e 125 MHz, CDCl_3) – expansão (δ_{H} 1,1-2,5/ δ_{C} 20-35) de MAA-3

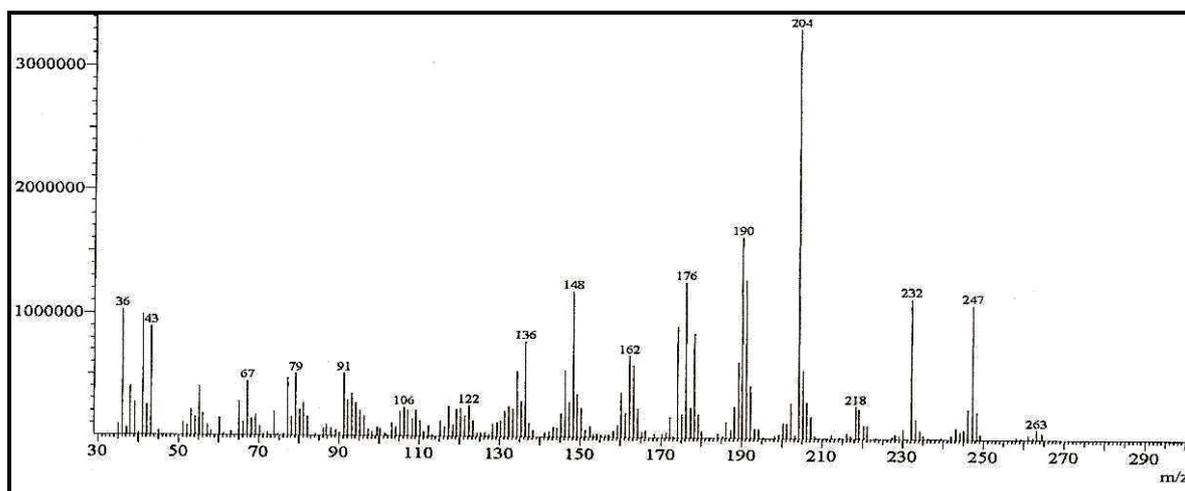


Figura 3.33 - Espectro de massa de MAA-3

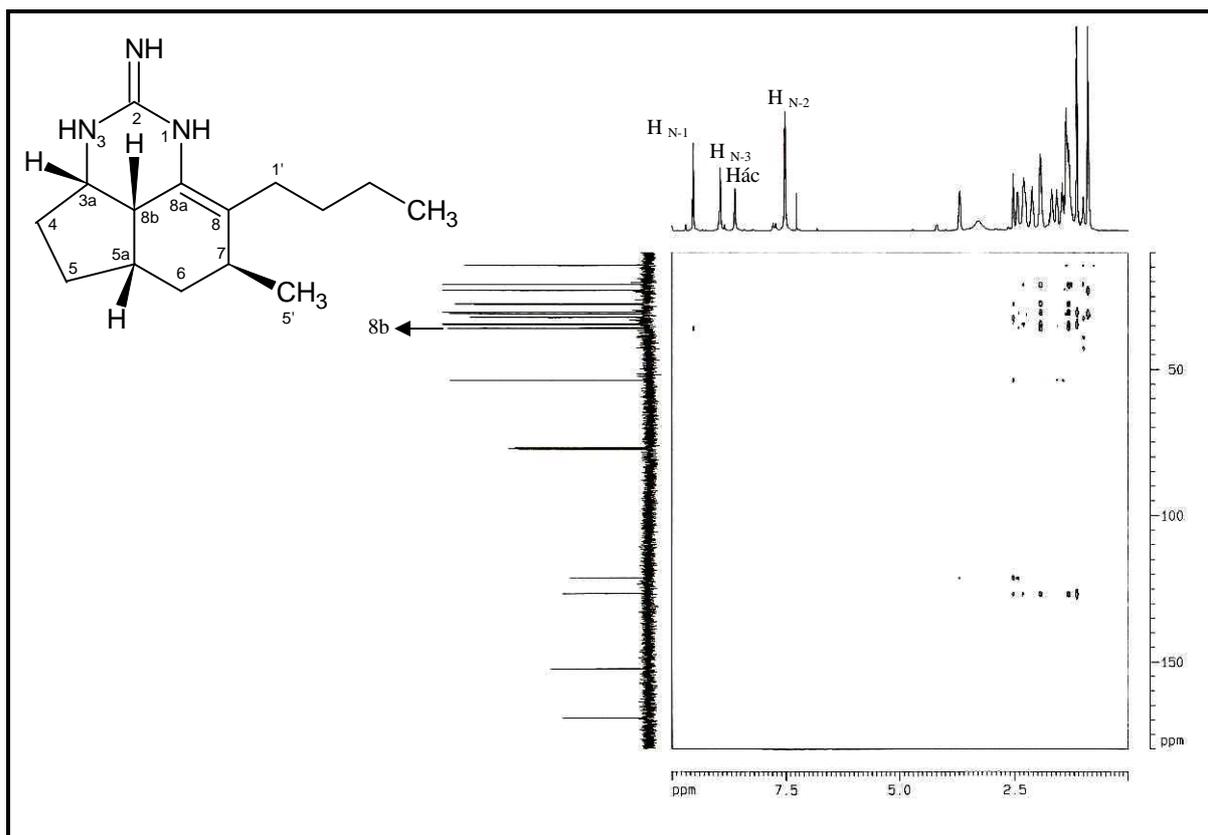


Figura 3.34 - Espectro de RMN HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) de MAA-3

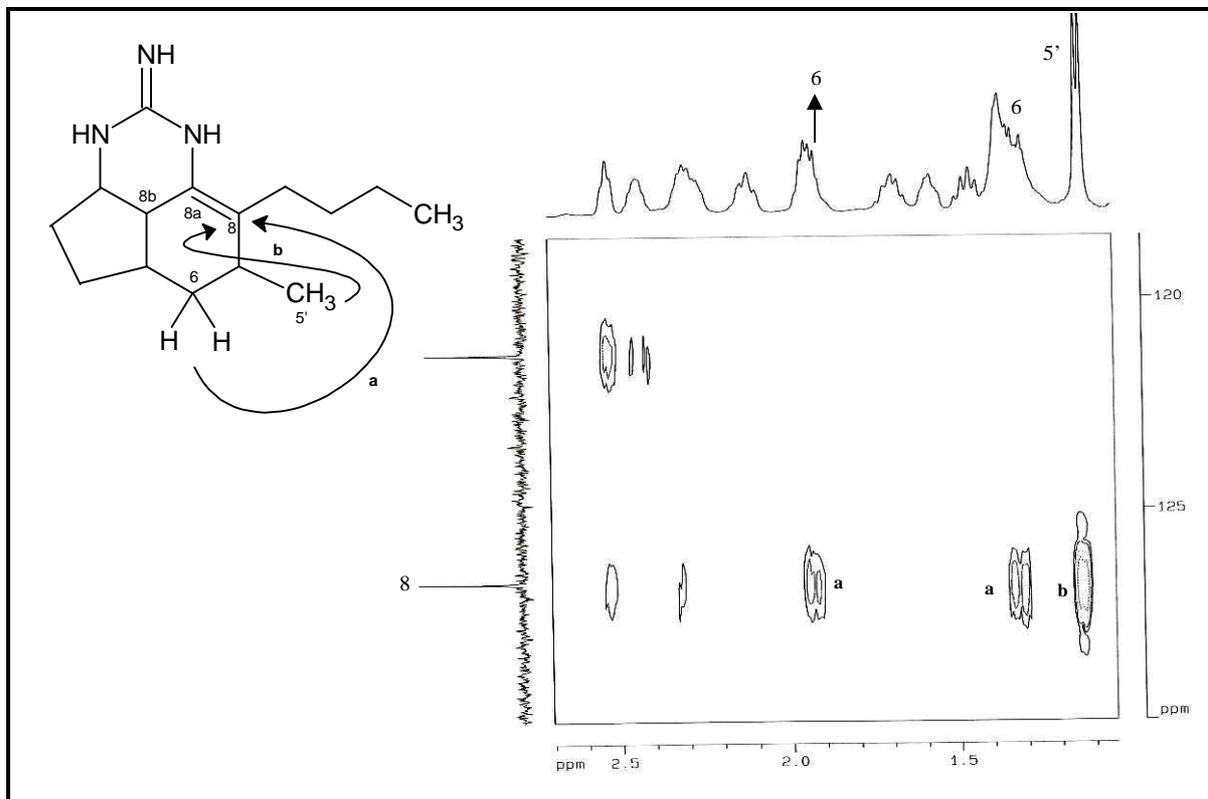


Figura 3.35 - Espectro de RMN HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) – expansão (δ_{H} 1,0-2,6 / δ_{C} 120-130) de MAA-3

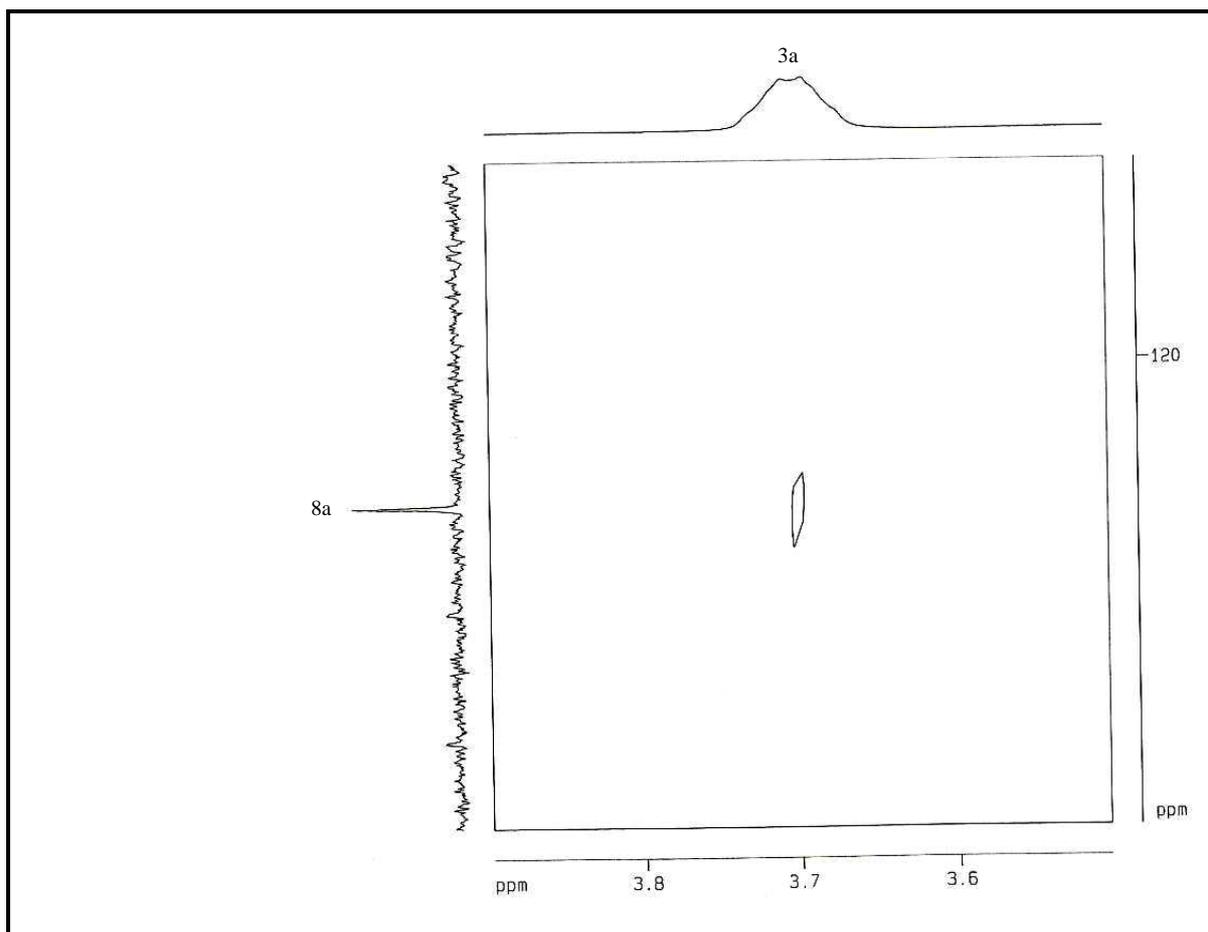
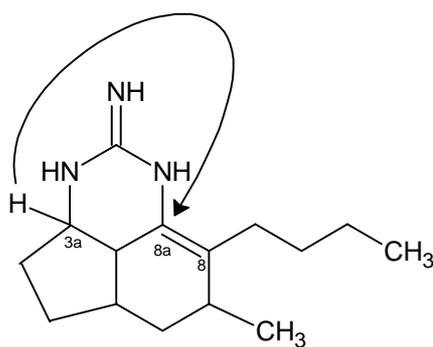


Figura 3.36 - Espectro de RMN HMBC (500 e 125 MHz, CDCl_3) – expansão (δ_H 3,6-3,8 / δ_C 120-125) de MAA-3



3.4 - Determinação estrutural de MADA-4 (mistura de epímeros)

As frações diclorometano e acetato de etila, oriundas da partição líquido-líquido do extrato bruto de *M. arbuscula*, após sucessivas cromatografias, forneceram as frações **a**, **b**, **c**, **d** (Fluxograma 4.3, pág. 114) e **e** (Fluxograma 3.4 pág. 119), que após análise por CCD foram reunidas originando a fração MADA (Fluxograma 4.5, pág. 122), a qual foi recromatografada chegando ao composto MADA-4 que se apresentou como um sólido amorfo amarelado, com rotação óptica específica $[\alpha]_D^{20} = +25$ ($c = 0,125$; MeOH).

No espectro de absorção de infravermelho (NaCl, cm^{-1}) (Fig. 3.37, pág. 82) foram observadas bandas em 3330 e 3196 cm^{-1} compatíveis com estiramento =N-H, O-H; bandas na faixa de 2953 a 2859 cm^{-1} de estiramento simétrico e assimétrico da ligação C-H de metila e metileno; banda em 1606 cm^{-1} de estiramento C=C de carbono sp^2 , banda em 1692 cm^{-1} condizente ao estiramento de ligação C=N, além de bandas na faixa de 1330 a 1143 cm^{-1} de estiramento C-O para alcoóis e C-N para aminas.

No espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) (Figs. 3.38 e 3.39, pág. 83) foi observado dois tripletos em δ_{H} 0,77 (3H, $J = 7,25$ Hz) e 0,83 (3H, $J = 7,0$) e um dubleto bastante intenso em δ_{H} 1,32 (3H, $J = 7,05$ Hz), provavelmente correspondente a dois grupos metilas. Como também, uma série de multipletos na faixa de 2,86 a 1,33 ppm (Tabelas 3.7 e 3.8, págs. 80 e 81).

No espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) (Figs. 3.40 e 3.41 pág. 84) foi possível observar 30 linhas espectrais, distribuídas em 15 pares de linhas espectrais com deslocamentos químicos muito próximos, compatíveis com uma mistura de duas substâncias de estruturas semelhantes e em uma proporção de aproximadamente 1:1. Entre os sinais observados, quatro correspondem a carbonos sp^2 , na faixa de δ 175,8 a 125,0. Os sinais em δ 165,8 e 165,7 foram inferidos aos carbonos de dupla ligação (C=N) do grupo guanidínico (Hua *et al.*, 2004). O par de sinais em δ 75,7 e 74,0 foi característico de carbonos hidroxilados.

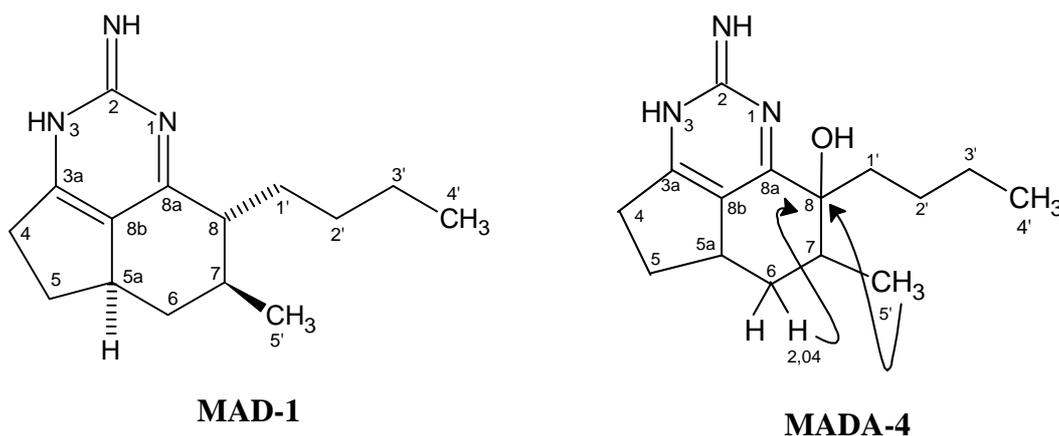
Através do espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (Fig. 3.42, pág. 85) foram observados dois pares de carbonos metílicos, seis de carbonos metilênicos e dois de carbonos metínicos. A comparação deste espectro com o espectro de RMN ^{13}C -CPD levou a dedução de cinco pares de carbonos não-hidrogenados. O espectro de massa (Fig. 3.43, pág. 85) mostrou o pico do íon-molecular com razão massa/carga (m/z) igual a 261 Daltons. Esta informação aliada a duplicidade de sinais apresentado pelo espectro de RMN

^{13}C -DEPT 135° levou a dedução da fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}$, a qual apresenta índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a 6.

A partir da reunião destes dados, inclusive comparação com dados da literatura (Hua, *et al.*, 2004) e espectrometria de massa (fragmentos 205, 204, 190, 174) (Quadro 3.4, pág. 78) chegou-se a conclusão que MADA-4 tratava-se de uma mistura de epímeros de esqueleto estrutural análogo às das demais estruturas anteriormente descritas. Os deslocamentos químicos referentes aos carbonos 3a, 8b, 8a, carbonos sp^2 (176,4; 165,9; 125,0 MADA-4(1) e 175,8; 165,9; 125,2 MADA-4(2), respectivamente) mostraram-se bastante próximos aos carbonos 3a, 8b e 8a de MAD-1 (174,9; 166,1; 126,2, respectivamente), podendo, assim, deduzir que as insaturações de MADA-4 ocupavam as mesmas posições das insaturações de MAD-1. Desta forma, sendo plausível posicionar uma hidroxila no carbono oito (C_8).

O espectro HSQC (Figs. 3.44 e 3.45, pág. 86) permitiu associar seguramente os sinais de cada hidrogênio ao seu respectivo carbono (Tabela 3.7 pág. 80) para cada epímero.

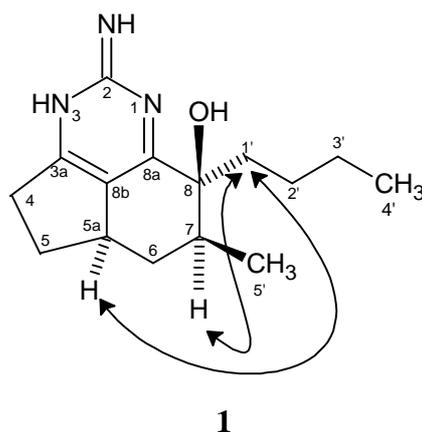
Através do espectro HMBC (Fig. 3.46, pág. 87) foi possível observar a correlação (3J) dos hidrogênios em δ 1,32 (H_5), com os carbonos em δ 75,7 e δ 75,4; ambos correspondentes ao carbono C_8 , dos dois isômeros, bem como a correlação (3J) do hidrogênio em δ 2,04 (H_6) com estes mesmos carbonos, confirmando assim, a posição da hidroxila em C_8 .



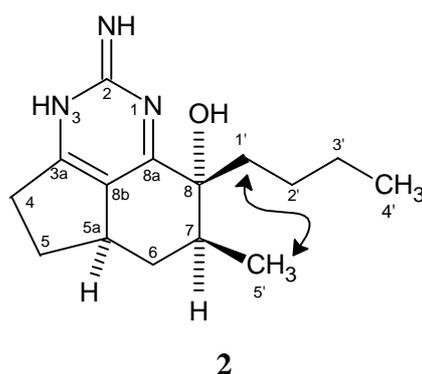
Também, pelo espectro HMBC (Fig. 3.47, pág. 87) observou-se a correlação (2J) dos hidrogênios em δ 1,32 (H_5), tanto para o carbono em δ 43,7, como para o carbono em δ 37,9; deslocamentos químicos diferentes, porém correspondente ao carbono C_7 de cada estrutura.

Determinação Estrutural – Capítulo 3

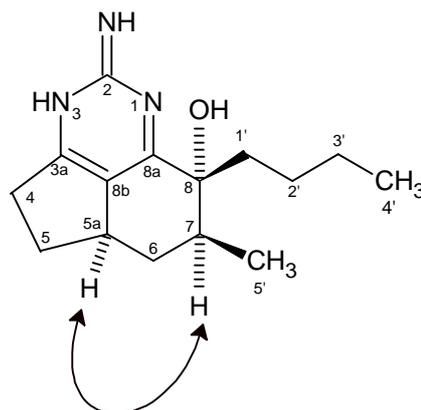
A configuração dos estereocentros C₇ e C₈ foi determinada através do espectro bidimensional ¹H, ¹H – NOESY (Fig. 3.48, pág. 88) o qual revelou interações espaciais entre o hidrogênio em δ_H 2,85 (H_{5a}) com o hidrogênio em δ_H 1,83 (H_{a-1'}) (**1**) e este com o hidrogênio em δ_H 2,43 (H₇), indicando uma relação *cis* entre o grupo hidroxila situada no carbono C₈ e o grupo metila, no carbono C₇. Estes dados permitiram determinar estereoquímica de um dos epímeros (**1**).



Ainda pelo espectro NOESY observou-se a interação espacial entre o hidrogênio em δ_H 2,12 (H_{a-1'}) com os hidrogênios em δ_H 1,32 (H_{5'}) permitindo concluir a estereoquímica para o segundo epímero, onde o grupo hidroxila, mantém uma relação *trans* com o grupo metila, correspondendo a estrutura **2**.

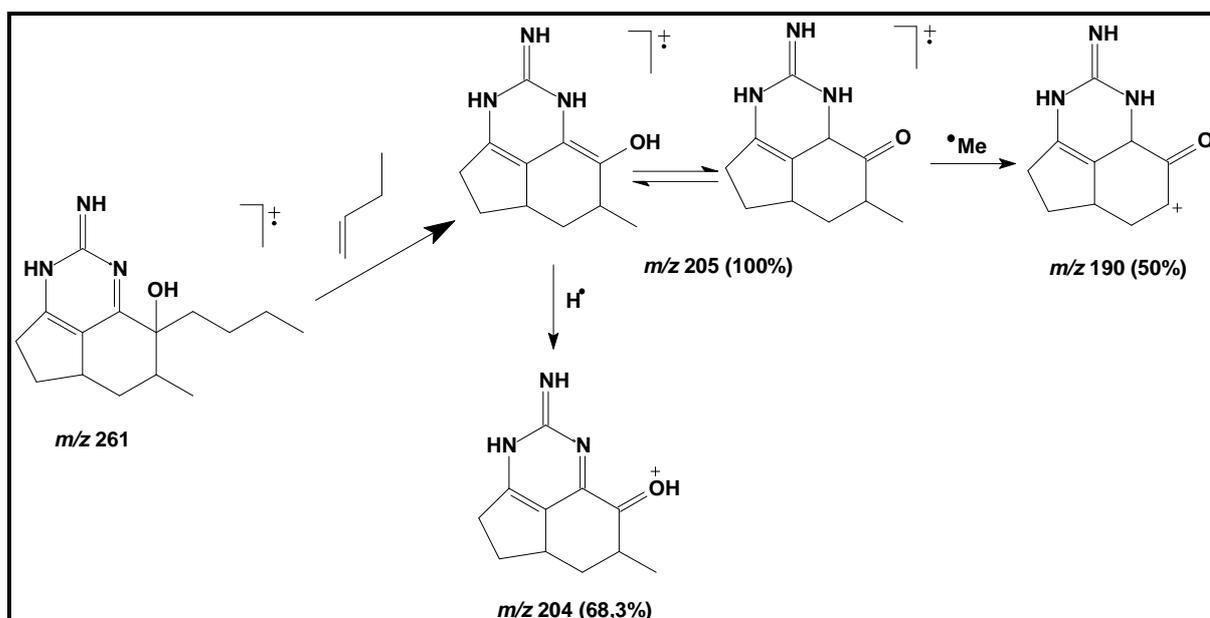


Também pelo espectro NOESY é possível observar a correlação entre o hidrogênio em δ_H 2,85 (H_{5a}) com o hidrogênio em δ_H 2,43 (H₇) podendo, assim confirmar a epimerização no C₈.

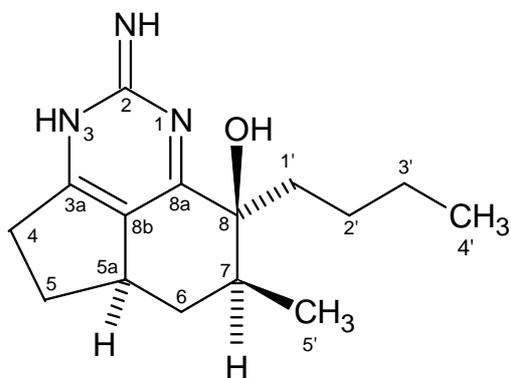


Todos os dados discutidos, além de comparação com a literatura, permitiram propor para MADA-4 as estruturas dos alcalóides guanidínicos, obtidos na forma de mistura de epímeros, 1, 8a; 8b, 3a-desidro-8 β -hidroxiptilocaulina (**1**) e 1, 8a; 8b, 3a-desidro-8 α -hidroxiptilocaulina (**2**), em uma proporção de aproximadamente (55,7%:44,3%), descritos previamente a partir das esponjas *M. unguifera* (Hua et al., 2004) e *Batzella* sp (Patil et al., 1997) (esta última o composto **2** foi isolado na sua forma pura). A mistura de epímeros não se mostrou ativa frente às células tumorais (Tabela 4.1, pág. 104).

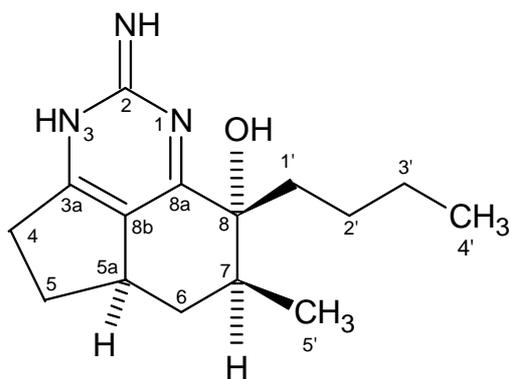
Na literatura, relata-se, para a mistura de epímeros, atividade malária contra o parasito *Plasmodium falciparum* (Hua, et al., 2004).



Quadro 3.4 – Proposta mecanística para a fragmentação que justifica alguns picos registrados no espectro de massa da mistura de epímeros MADA-4



(1)

1, 8a; 8b, 3a-Desidro-8 β -hidroxiptilocaulina

(2)

1, 8a; 8b, 3a-Desidro-8 α -hidroxiptilocaulina

Tabela 3.7 - Comparação de dados de RMN ^1H e ^{13}C de MADA-4(1) com dados da literatura (Hua, et al., 2004).

# C	RMN ^1H		RMN ^{13}C	
	MADA-4 ^a	Lit. ^b	MADA-4 ^a	Lit. ^b
2	-	-	165,7	163,5
3a	-	-	176,4	176,4
4	2,83 (1H, m); 2,51 (1H, m)	2,98 (1H, m) 2,64 (1H, dd, $J = 16,8$ e $8,2$ Hz)	34,4	34,1
5	2,12 (1H, m); 1,40 (1H, m)	2,34(1H, m); 1,55 (1H, m)	33,8	33,4
5a	2,83 (1H, m)	2,91 (1H, m)	39,0	38,3
6	1,73 (1H, m); 1,51 (1H, m)	1,91 (1H, m); 1,20 (1H, m)	35,8	35,2
7	2,04 (1H, td, $J = 12,9$ e $3,7$ Hz)	2,01 (1H, m)	37,9	36,8
8	-	-	74,0	75,4
8a	-	-	165,9	164,6
8b	-	-	125,0	125,4
1'	2,12 (1H, m); 1,83 (1H, m)	2,12 (1H, td, $J = 12,4$ e $4,4$ Hz); 1,85 (1H, td, $J = 12,4$ e $3,6$ Hz)	36,9	37,0
2'	1,20 (1H, m); 1,51 (1H, m)	1,20 (1H, m); 0,91 (1H, m)	28,0	27,1
3'	1,32 (2H, m)	1,25 (2H, m)	24,1	23,5
4'	0,83 (3H, t, $J = 7,0$ Hz)	0,83 (3H, t, $J = 7,2$ Hz)	14,6	14,0
5'	1,32 (3H, d, $J = 7,0$ Hz)	1,07 (3H, d, $J = 6,8$ Hz)	16,0	15,1

Deslocamentos químicos (δ) em ppm.

^a $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$; 500 MHz (^1H) e 125 MHz (^{13}C)

^b CDCl_3 ; 400 e 500 MHz

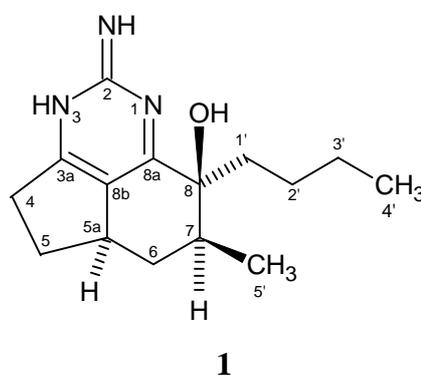
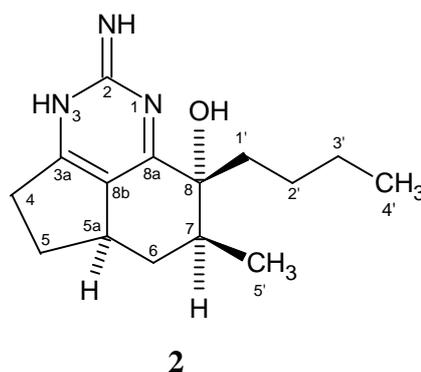


Tabela 3.8 - Comparação de dados de RMN ^1H e ^{13}C de MADA-4 (**2**) com dados da literatura (Hua, et al., 2004).

# C	RMN ^1H		RMN ^{13}C	
	MADA-4 ^a	Lit. ^b	MADA-4 ^a	Lit. ^b
2	-	-	165,7	163,2
3a	-	-	175,8	175,7
4	2,82 (1H, m); 2,62(1H, m)	2,98 (1H, m) 2,60 (1H, dd, $J = 16,8$ e $8,2$ Hz)	34,7	33,9
5	2,12 (1H, m); 1,40 (1H, m)	2,34(1H, m); 1,55 (1H, m)	34,1	33,2
5a	2,85 (1H, m)	2,88 (1H, m)	39,2	38,0
6	2,36 (1H, m); 2,04 (1H, m)	1,76 (1H, td, $J = 12,4$ e $4,58$ Hz) 1,38 (1H, td, $J = 12,4$ e $11,2$ Hz)	38,0	37,4
7	2,45 (1H, m)	2,19 (1H, m)	43,7	42,0
8	-	-	75,7	74,2
8a	-	-	165,9	163,7
8b	-	-	125,2	125,4
1'	1,83 (1H, m); 1,40 (1H, m)	1,92 (1H, m); 1,85 (1H, td, $12,4$ e $3,6$ Hz)	37,8	36,9
2'	1,20 (1H, m); 1,51 (1H, m)	1,11 (1H, m); 0,72 (1H, m)	27,9	27,1
3'	1,20 (2H, m)	1,14 (2H, m)	24,4	23,5
4'	0,77 (3H, t, $J = 7,2$ Hz)	0,78 (3H, t, $J = 7,2$ Hz)	14,4	13,8
5'	1,32 (3H, d, $J = 7,0$ Hz)	1,16 (3H, d, $J = 7,2$ Hz)	16,6	15,7

Deslocamentos químicos (δ) em ppm.^a $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$; 500 MHz (^1H) e 125 MHz (^{13}C)^b CDCl_3 ; 400 e 500 MHz

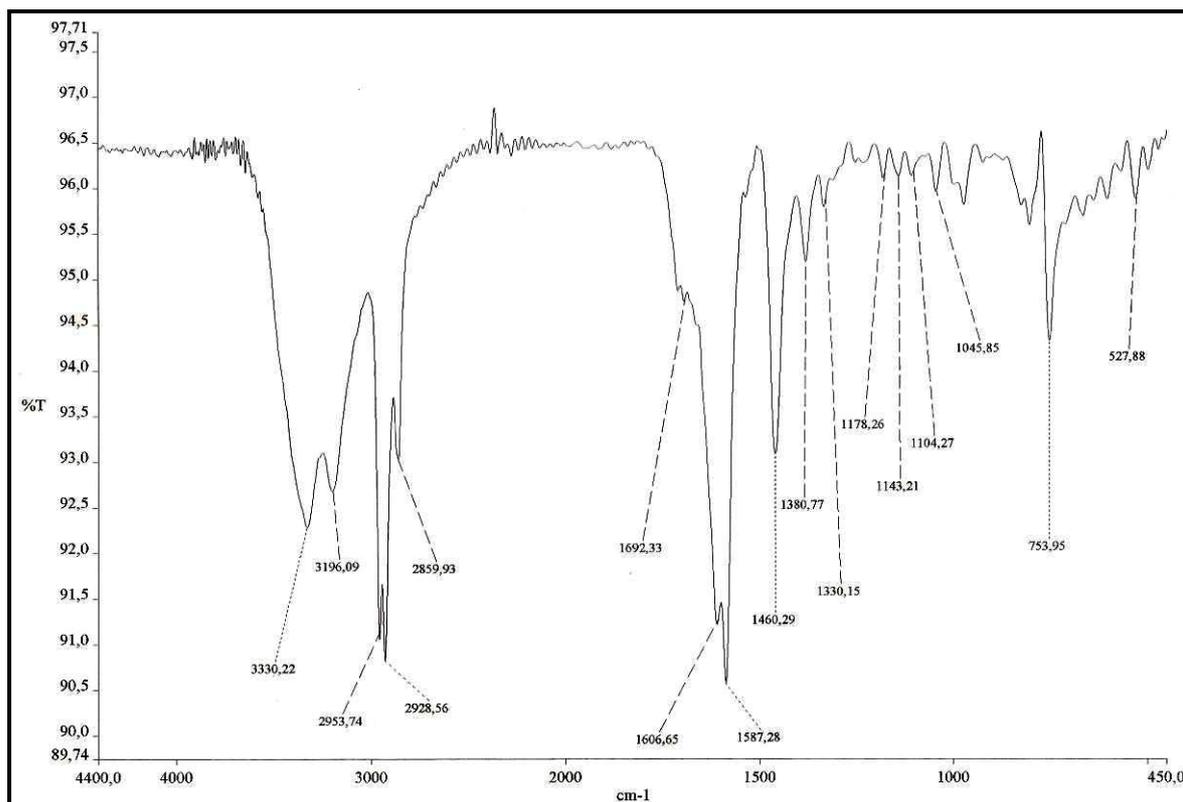
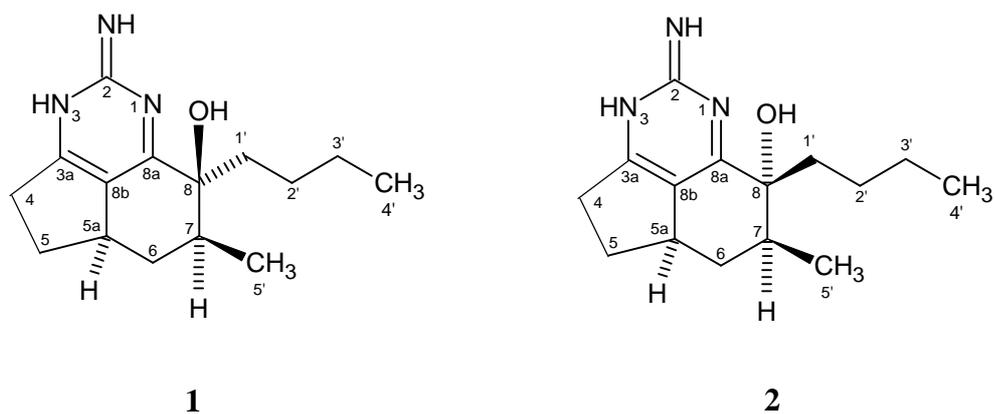


Figura 3.37 - Espectro de absorção na região do infravermelho (NaCl , cm^{-1}) da mistura de epímeros MADA-4



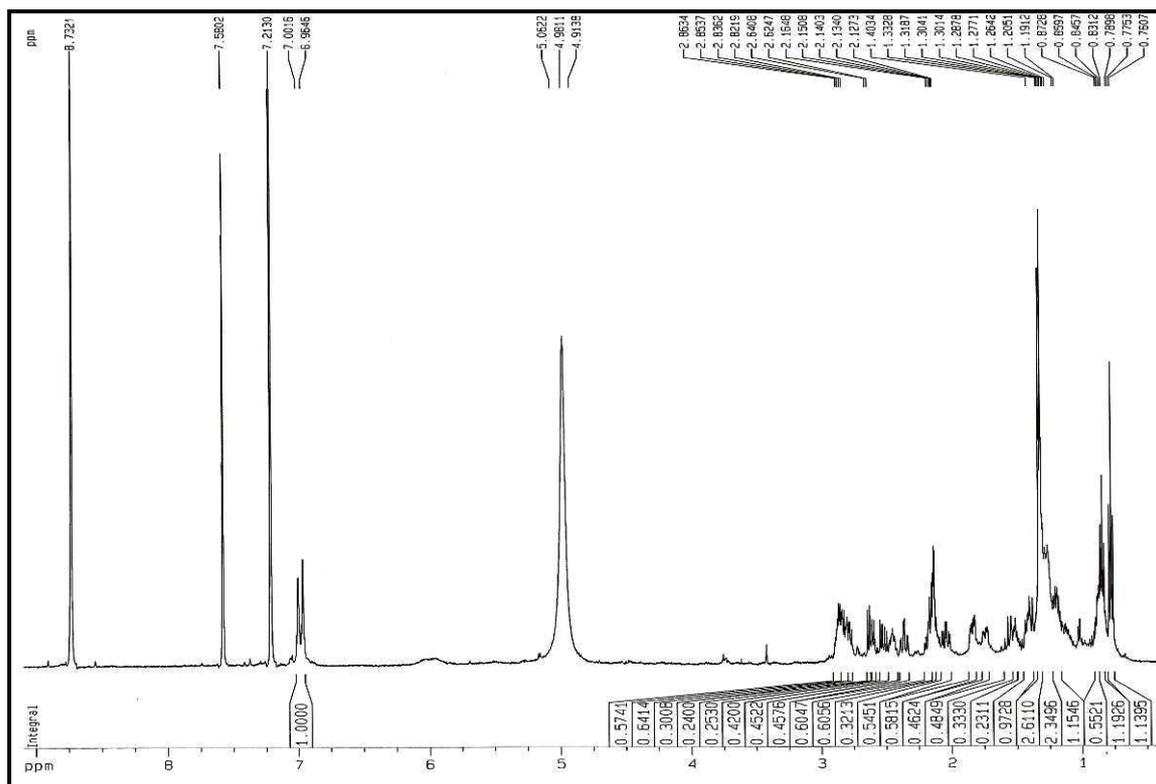


Figura 3.38 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da mistura de epímeros MADA-4

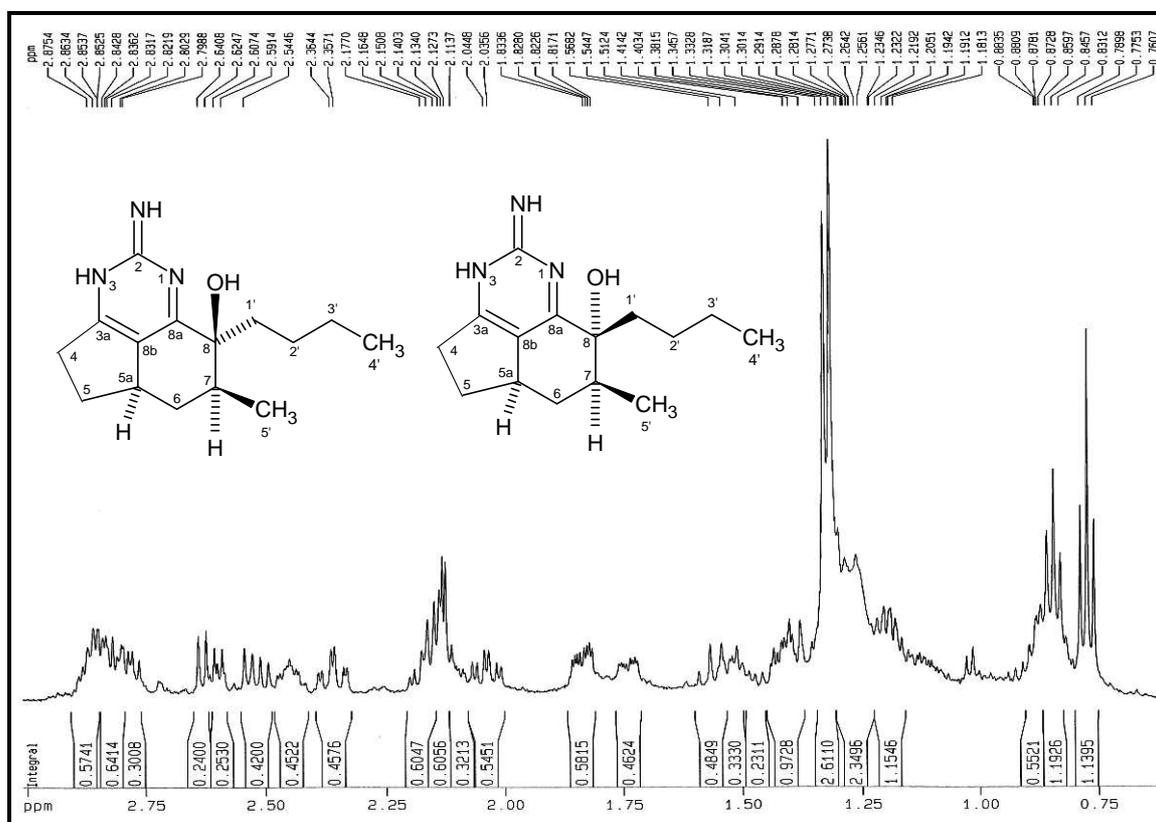


Figura 3.39 - Espectro de RMN ^1H – expansão (0,75-2,87 ppm) da mistura de epímeros MADA-4.

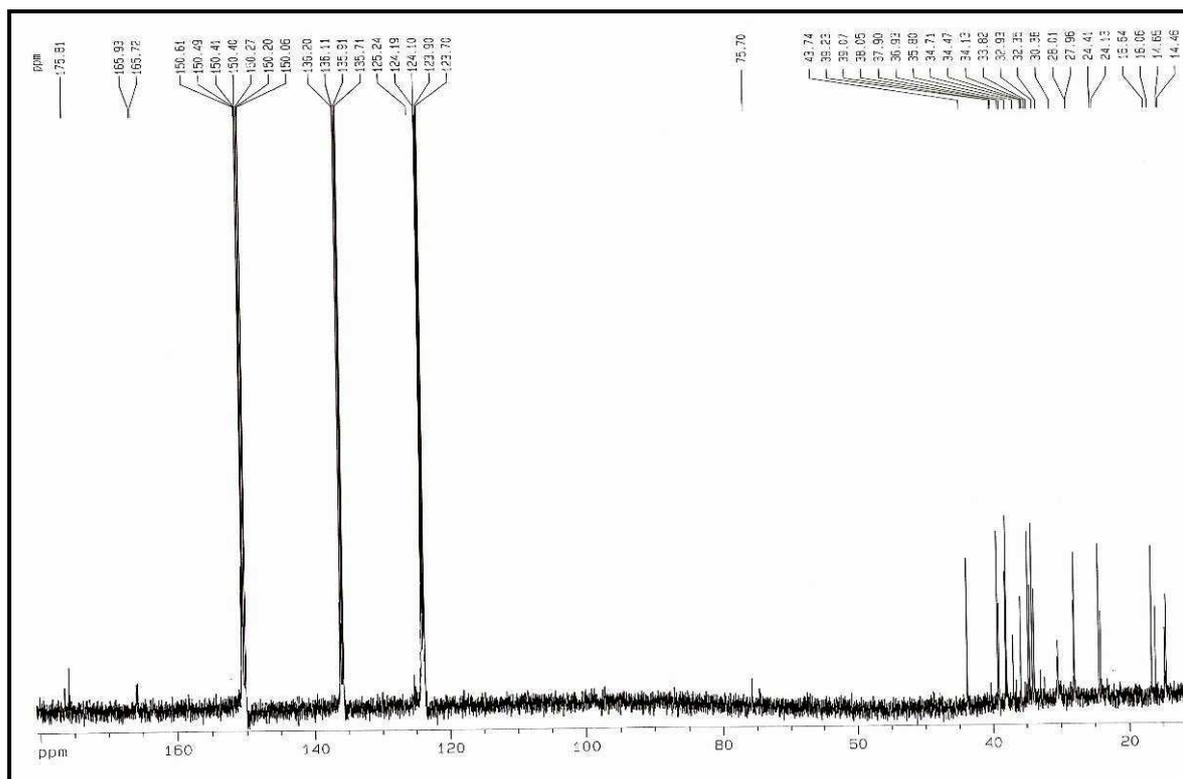


Figura 3.40 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da mistura de epímeros MADA-4.

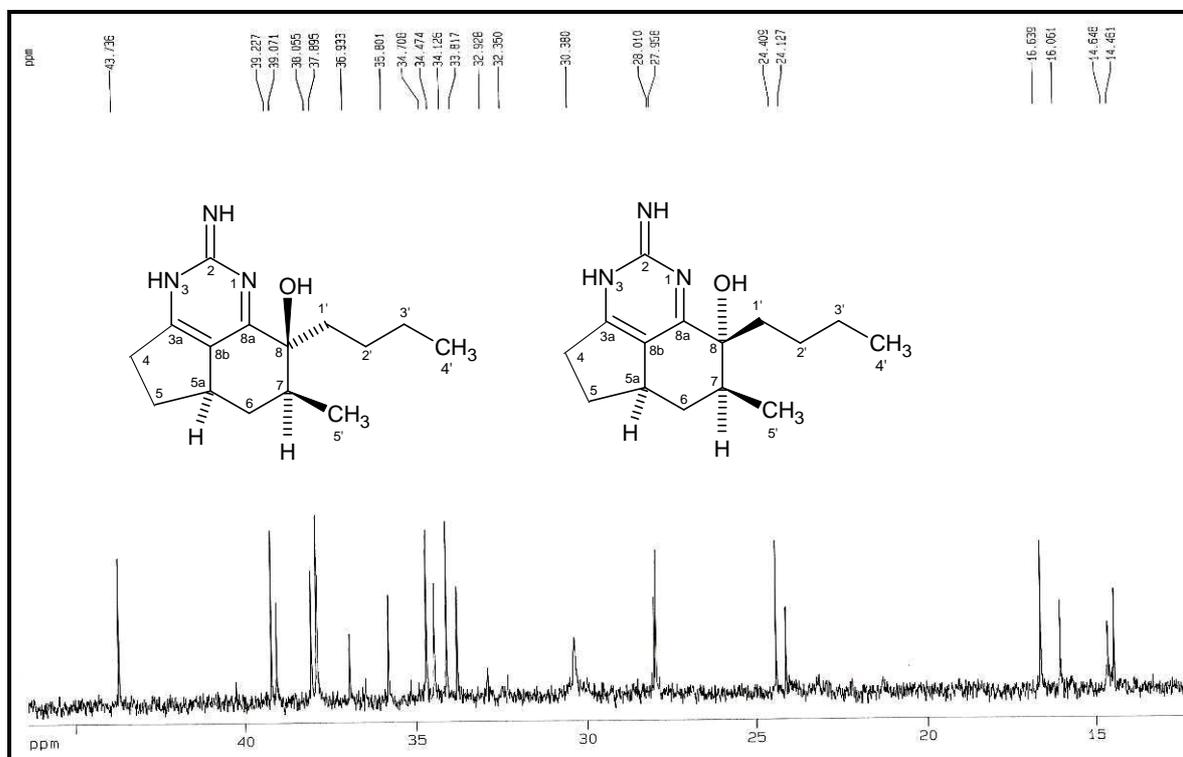


Figura 3.41 - Espectro de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) – expansão (10-45 ppm) da mistura de epímeros MADA-4.

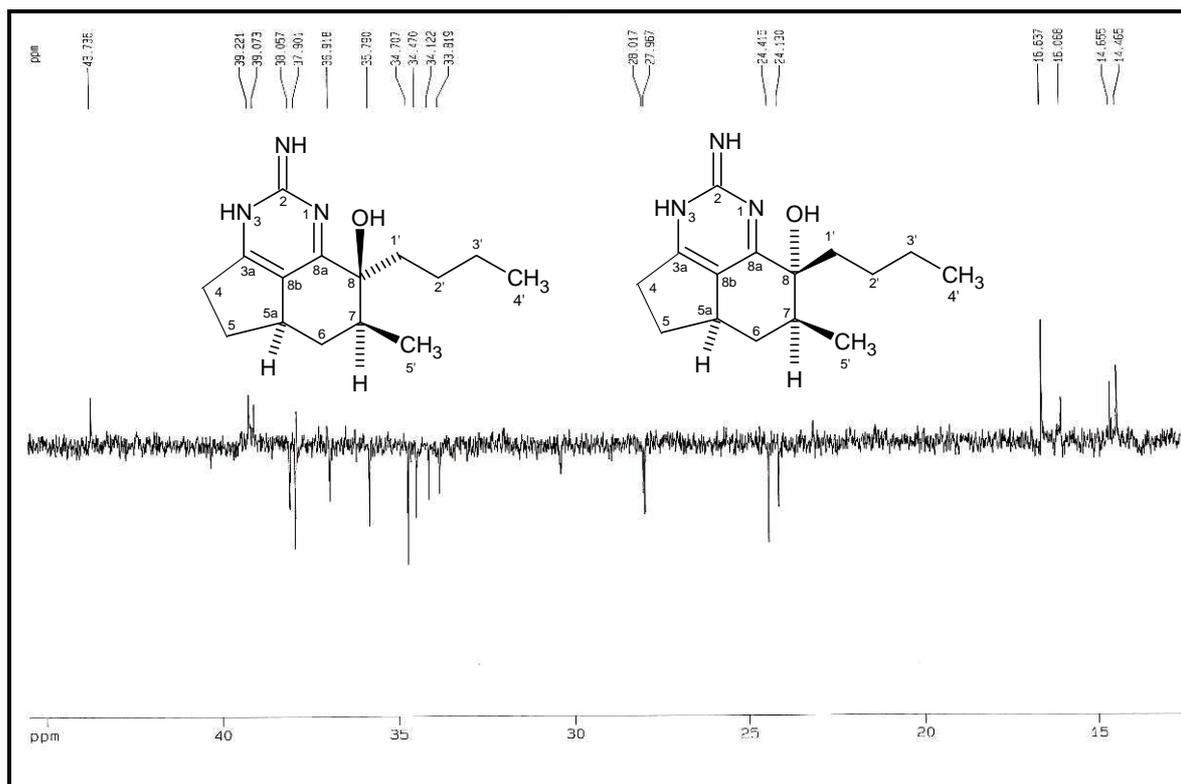


Figura 3.42 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da mistura de epímeros MADA-4

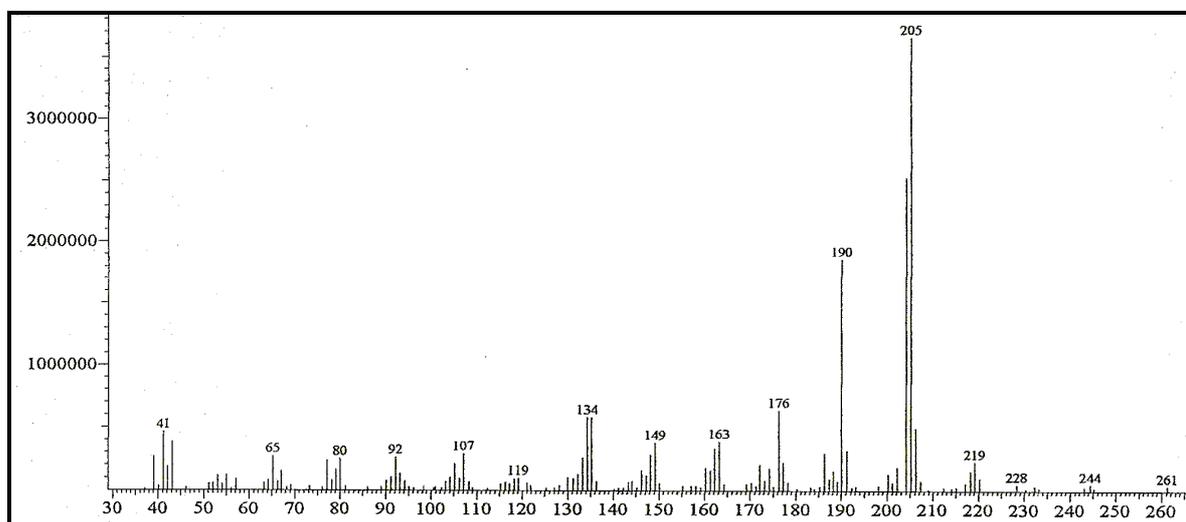


Figura 3.43 – Espectro de massa (IE, 70 eV) da mistura de epímeros MADA-4

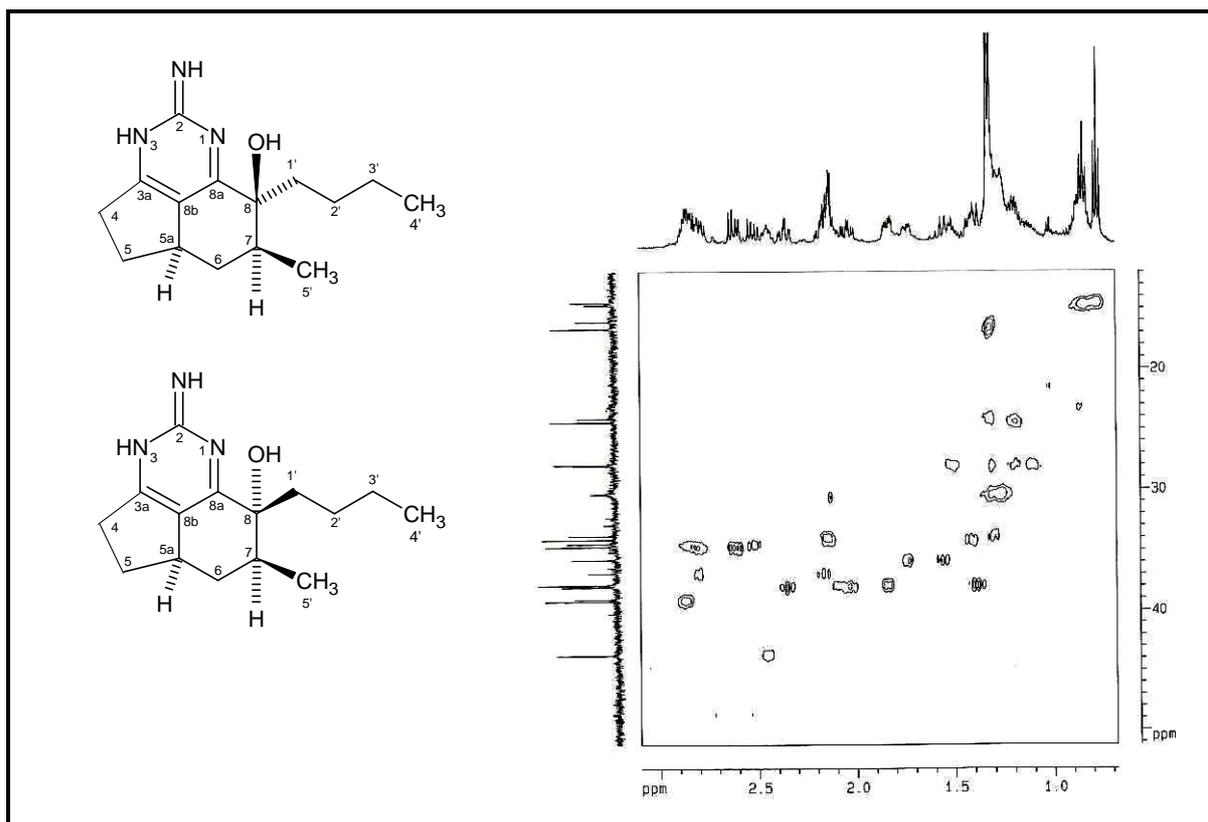


Figura 3.44 - Espectro de RMN HSQC (500 e 125 MHz, C_5D_5N) da mistura de epímeros MADA-4.

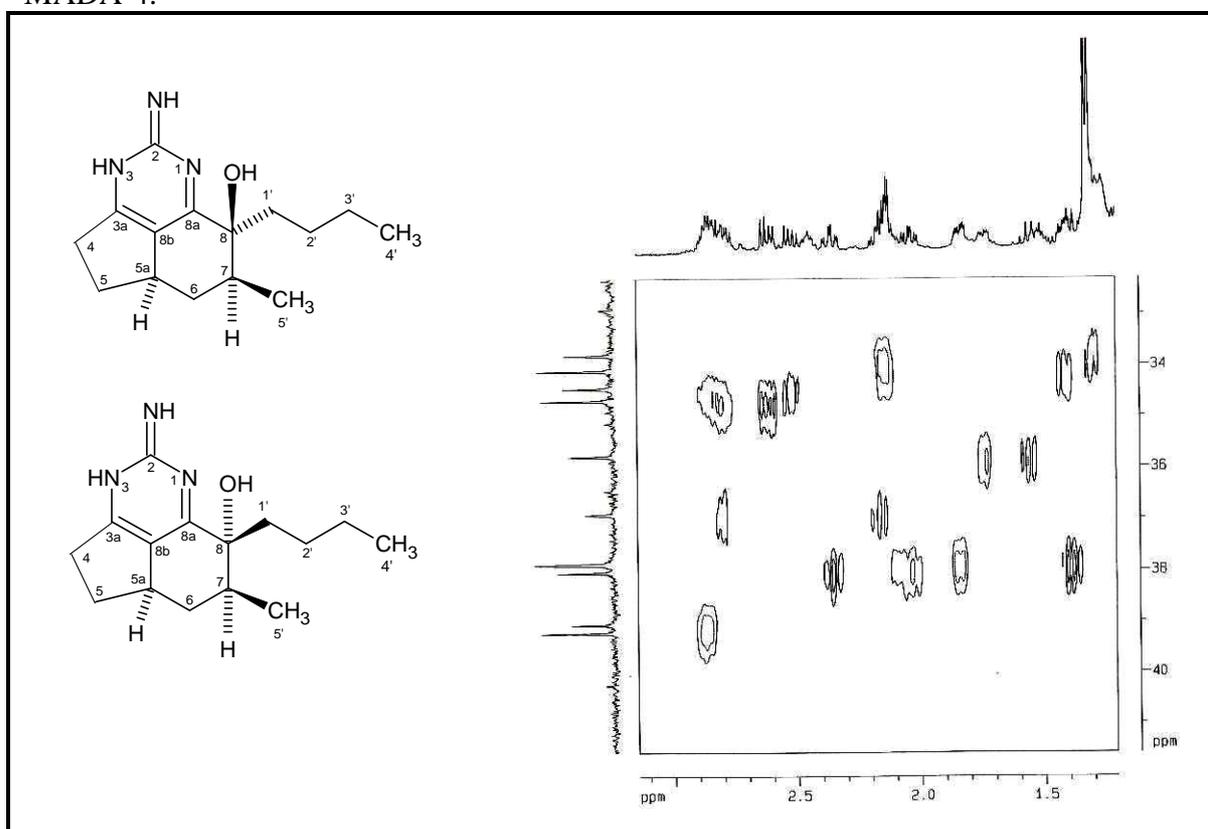


Figura 3.45 - Espectro de RMN HSQC (500 e 125 MHz, C_5D_5N) - expansão (δ_H 1,3-3,0 / δ_C 35-45) da mistura de epímeros MADA-4

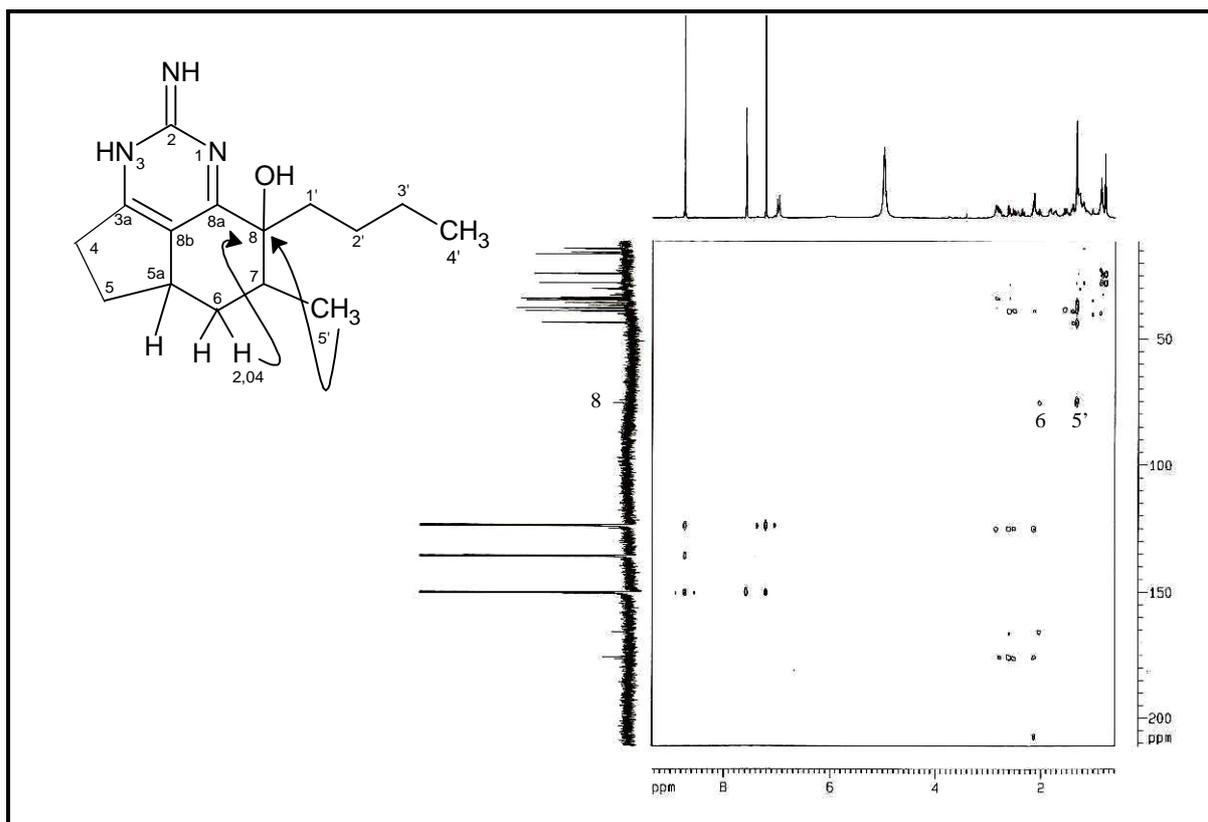


Figura 3.46 - Espectro de RMN HMBC (500 e 125 MHz, C_5D_5N) da mistura de epímeros MADA-4

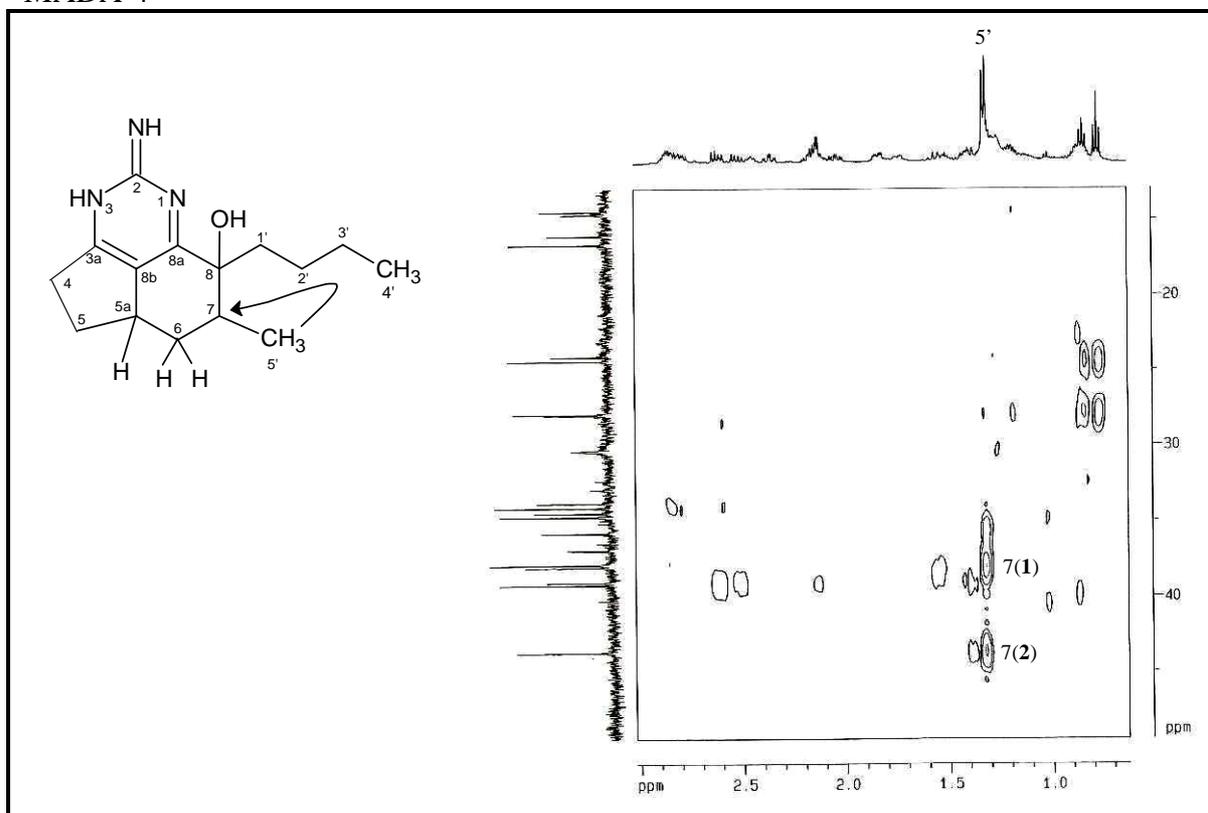


Figura 3.47 - Espectro de RMN HMBC (500 e 125 MHz, C_5D_5N) - expansão (δ_H 0,7-3,0 / δ_C 15-45) da mistura de epímeros MADA-4

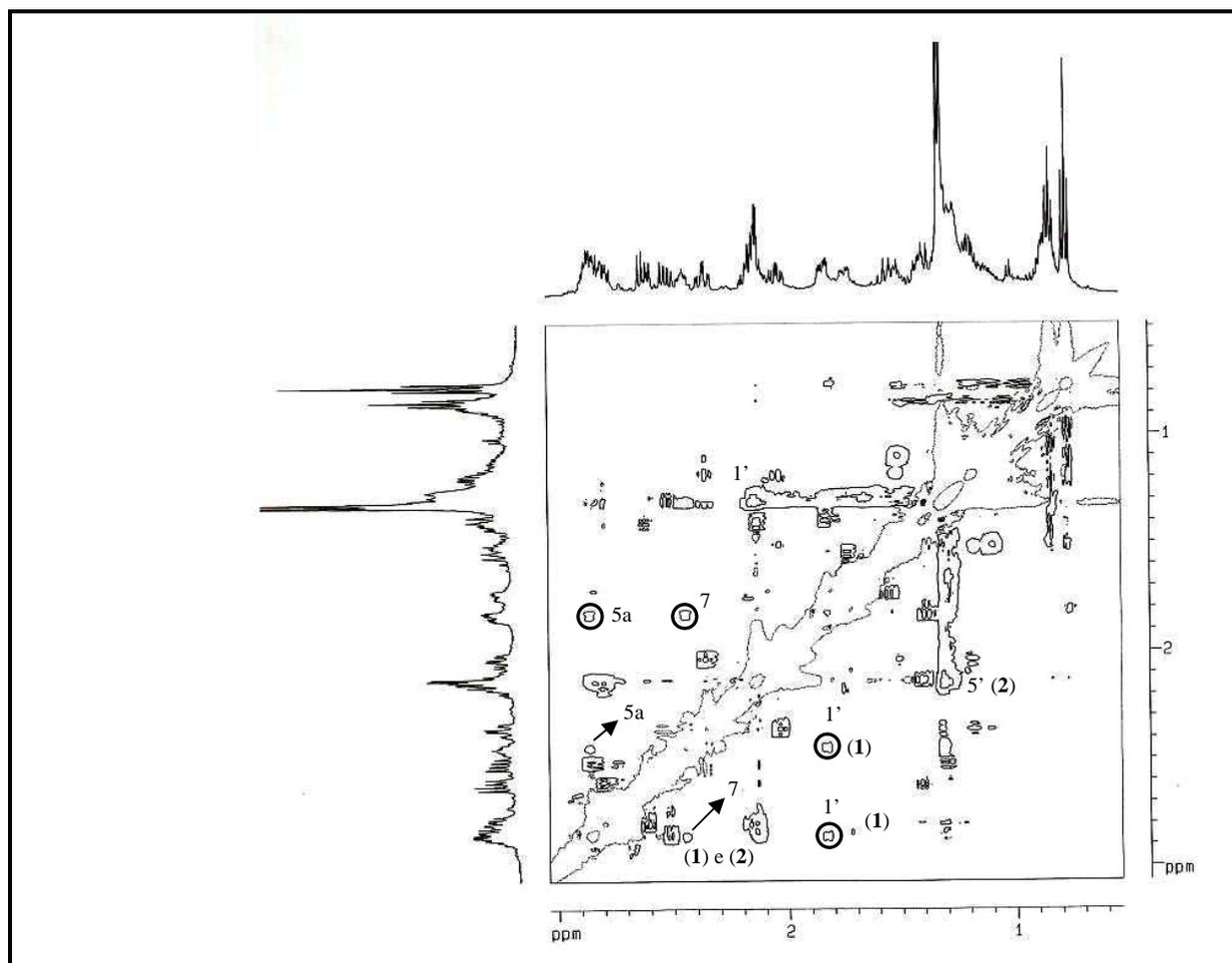
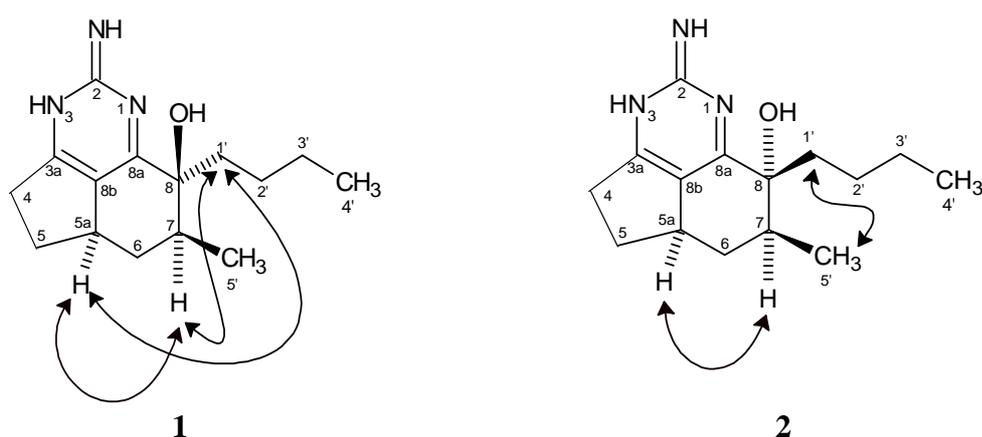


Figura 3.48 - Espectro de RMN NOESY (500 x 500 MHz, C_5D_5N) da mistura de epímeros MADA-4.



3.5 – Determinação estrutural de MAM-5

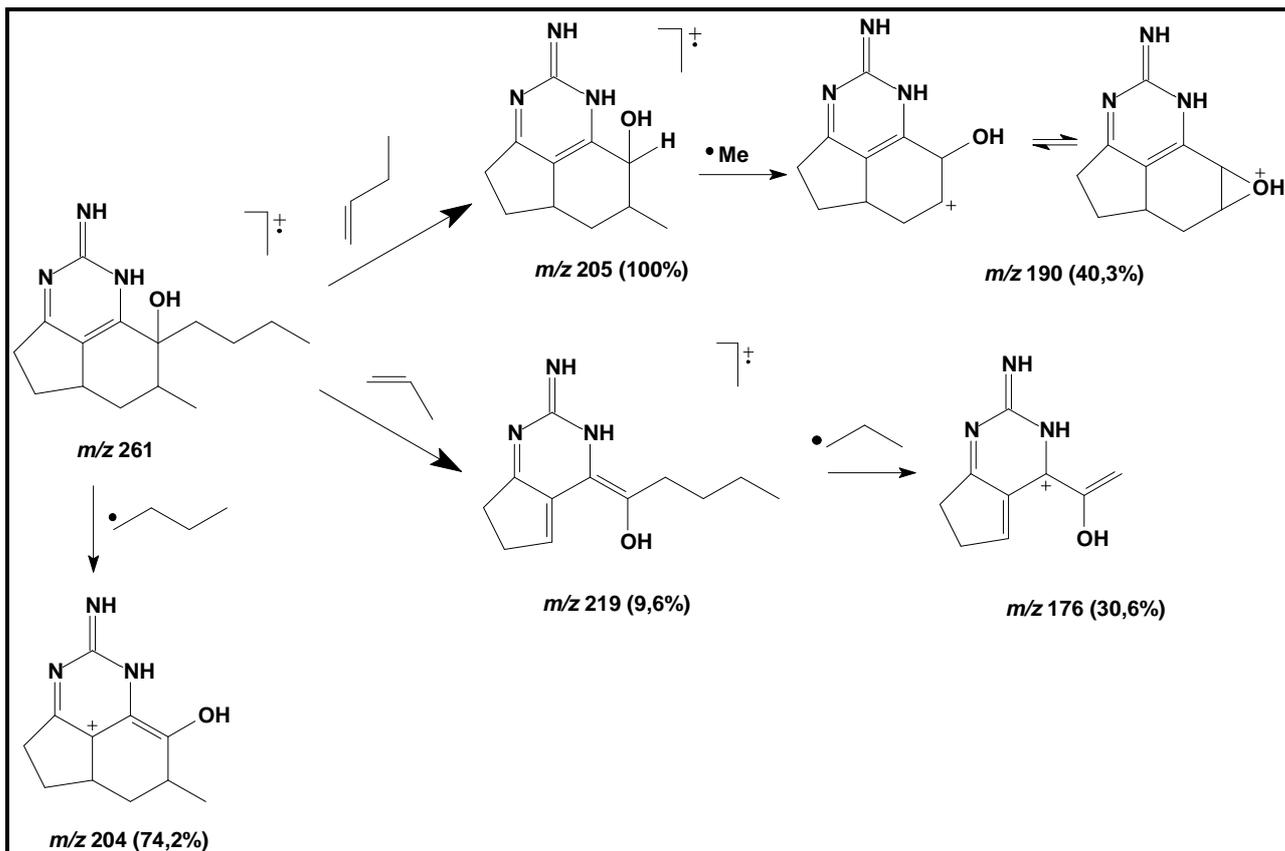
A fração metanólica após diversos procedimentos cromatográficos, incluindo HPLC (Item 4.6.2.4.1, pág. 123), forneceu uma resina amarelada, que em CCD apresentou-se como uma mancha uniforme, pela pulverização com Dragendorff, indicando, também tratar-se de um alcalóide, sendo denominada MAM-5 (5,46 mg), com rotação óptica específica $[\alpha]_D^{20} = +23$ ($c = 0,130$; MeOH).

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) (Fig. 3.49. pág. 92), semelhantemente aos das outras substâncias, exibiu sinais referentes a dois grupos metilas, um em $\delta_{\text{H}} 1,06$ (d, $J = 7,00$ Hz, H_5) e outro em $0,90$ (t, $J = 7,40$ Hz, H_4), além de uma série de multipletos na faixa de 1,20-3,13 ppm.

Através dos espectros de RMN ^{13}C -CPD (125 MHz, CDCl_3), (Fig. 3.50, pág. 95) e HMBC (fig. 3.54 pág. 97) foi possível observar 13 linhas espectrais, entre as quais, duas referentes a carbono sp^2 (δ 127,9; 185,7), e outra correspondente a carbono sp^3 oxigenado (δ 74,1), evidenciando o caráter oxigenado de MAM-5.

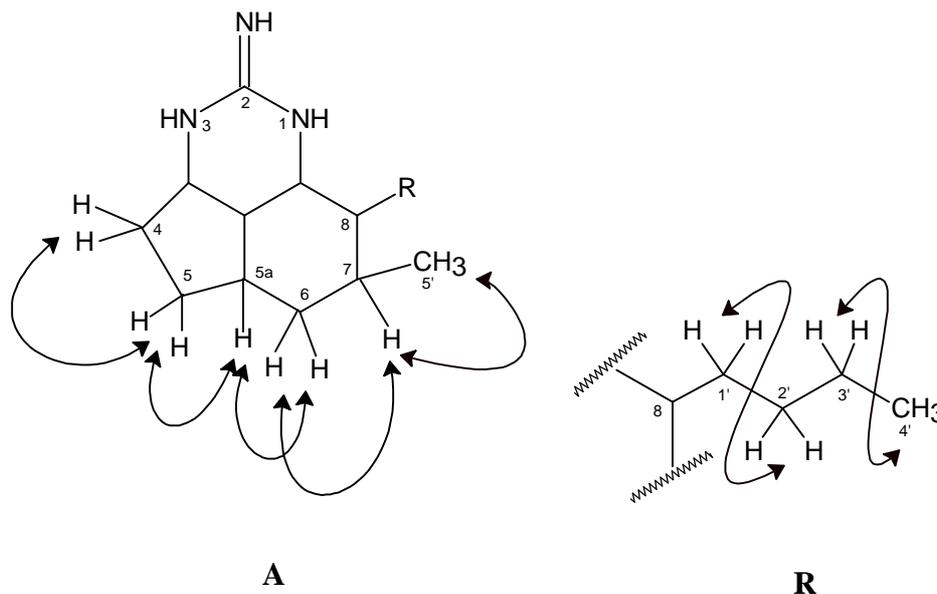
Através do espectro HSQC (Fig. 3.51, pág. 96), foi possível identificar a presença de 10 carbonos hidrogenados e correlacioná-los aos seus respectivos sinais de hidrogênio, conforme sumarizado na Tabela 3.9, pág. 94.

O espectro de massa (Fig. 3.52, pág. 96) do composto em discussão mostrou o pico correspondente ao íon-molecular com razão massa/carga (m/z) igual a 261 Daltons, e padrão de fragmentação [m/z 205, 204, 190, 176] semelhante ao do espectro de massa referente à mistura de epímeros (MADA-4), previamente isolado (Figura 3.43, pág. 85). Com base nas informações acima mencionadas, foi proposta para MAM-5, a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}$, a qual apresenta seis insaturações. Considerando os dados de RMN e comparação com dados da literatura (Hua et al., 2004; Patil et al., 1997), e ainda de espectrometria de massa (fragmentos 205, 204, 190 e 176) (Quadro 3.5, pág. 90) chegou-se a conclusão que MAM-5 tratava-se de um alcalóide guanidínico semelhante aos anteriores e a exemplo dos epímeros (pág. 92), provavelmente contendo uma hidroxila em C-8.

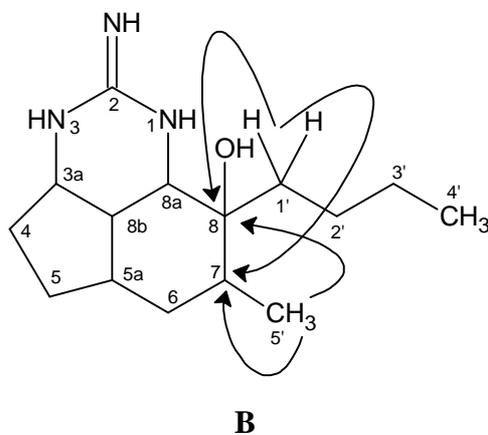


Quadro 3.5 – Proposta mecanística para a fragmentação que justifica alguns picos registrados no espectro de massa de MAM-5

Através do espectro ^1H , ^1H – COSY (Fig. 3.53, pág. 97), foi possível verificar a seqüência de acoplamentos vicinais envolvendo os sinais δ 3,12 / 2,78 (Ha-4/Hb-4) com 2,51 / 1,67 (Ha-5/Hb-5), dos últimos com 3,00 (H-5a), deste com o hidrogênio metilênico em δ 1,22 (Hb-6), assim como, do sinal em δ 2,09 (H-7) com hidrogênios metilênicos (2H-6) e metílico (3H-5'). Adicionalmente, observou-se os acoplamentos vicinais entre δ [2,01 (H-1'); 1,22 / 0,97 (H-2'); 1,34 (H-3'); 0,90 (H-4')], justificando a cadeia lateral de quatro carbonos ligada ao C-8, da sub-estrutura **A** (pág. 91).



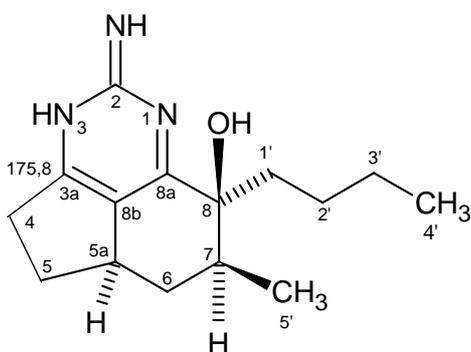
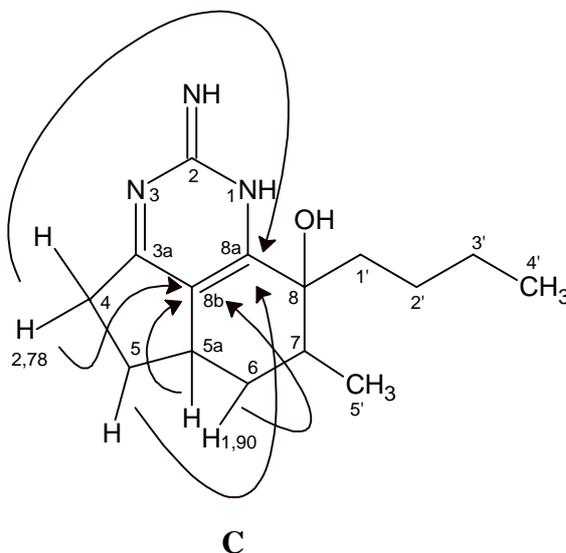
O espectro HMBC (Figs. 3.54 e 3.55 págs. 97 e 98), mostrou as correlações envolvendo os sinais de hidrogênio em δ 2,01 (H-1') e 1,06 (H-5') com os carbonos em δ 74,1 (C-8) e 38,4 (C-7), permitindo confirmar a posição dos grupos butila e metila nos carbonos 8 e 7, respectivamente (B).



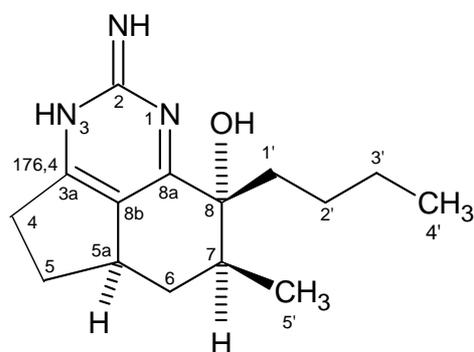
Através do espectro HMBC (Fig. 3.54, pág. 97) também foram observadas as correlações dos hidrogênios em δ 3,00 (H-5a), 2,78 (H_b-4) e 1,90 (H_a-6) com o carbono em δ 127,9 (C_{8b}), assim como as correlações dos hidrogênios em δ 3,12/ 2,78 (H-4a/H-4b) e 2,51 (H_a-5) com o carbono em δ 185,7. Para os alcalóides mirabilina B (MAD-1, Tabela 3.1, pág. 40), e epímeros 1,8a;8b,3a-desidro-8 β -hidroxiptilocaulina e 1,8a;8b,3a-desidro-8 α -hidroxiptilocaulina (MADA-4, Tabelas 3.7 e 3.8, págs. 80 e 81) e ainda dados da literatura (Patil et al., 1997) para o composto, 1,8a;8b,3a-desidro-8-hidroxiptilocaulina, C-3a pode aparecer entre 174 e 178 ppm (Tabela 3.9, pág. 94). Para atender ao valor de 185,7

Determinação Estrutural – Capítulo 3

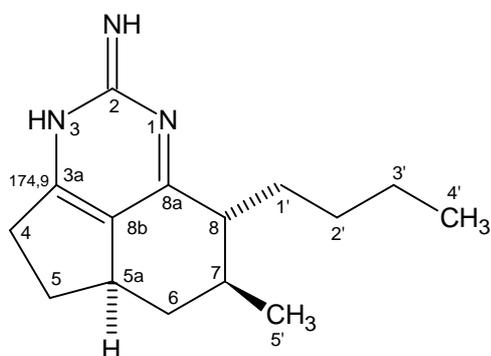
ppm, as posições das duplas ligações envolvendo os carbonos C-8a, C-8b e C-3a, foram invertidas em relação aos compostos acima mencionados. Conforme pode ser observado, além de C-8a ser um carbono ligado a nitrogênio e fazer parte de um sistema conjugado, este sofre a desproteção adicional de um grupo hidroxila em posição β , justificando, assim, o valor 185,7 ppm atribuído a este carbono (C).



1,8a;8b,3a-Desidro-8 β -hidroxiptilocaulina



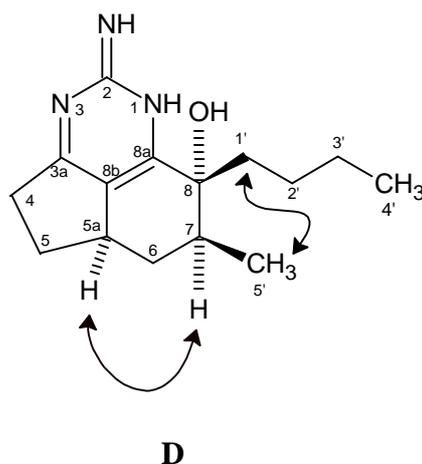
1,8a;8b,3a-Desidro-8 α -hidroxiptilocaulina



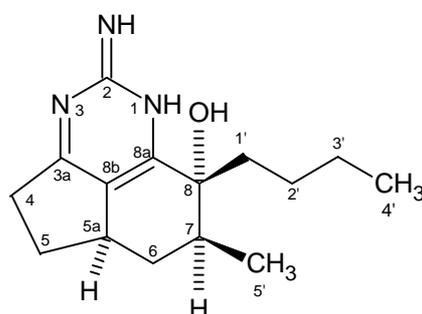
Mirabilina B

Determinação Estrutural – Capítulo 3

A configuração dos estereocentros C₇ e C₈ foi determinada através do espectro NOESY (Fig. 3.56, pág. 99), o qual revelou interação espacial entre o hidrogênio em δ 2,01 (H-1') com o hidrogênio em δ 1,06 (H-5'), indicando uma relação *trans* entre o grupo hidroxila situado no C₈ e o grupo metila, no carbono C₇ (**D**). Verificou-se, também uma interação espacial entre o hidrogênio δ 3,00 (H-5a) com o hidrogênio em δ 2,09 (H-7), confirmando, assim, a configuração do estereocentro C_{5a}.



A reunião de todos os dados levou a dedução da estrutura de MAM-5 como sendo o alcalóide guanidínico 3,3a;8b;8a-desidro-8-hidroxiptilocaulina, diferindo da estrutura 1,8a;8b,3a-desidro-8-hidroxiptilocaulina, apenas quanto a posição das duplas ligações dos carbonos C-8a, C-8b e C-3a. Este metabólito não se mostrou ativo frente às células tumorais (Tabela 4.1, pág. 104)



3,3a;8b;8a-Desidro-8-hidroxiptilocaulina

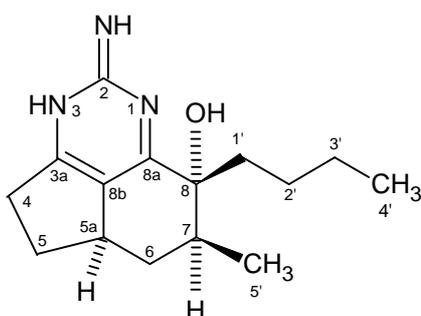
Tabela 3.9 – Comparação de dados de RMN ^1H e ^{13}C de MAM-5 com dados da literatura (Patil et al., 1997).

# C	RMN ^1H		RMN ^{13}C	
	MAM-5 ^a	Lit. ^b	MAM-5 ^a	*Lit. ^b
2	-	-	-	165,2
3a	-	-	-	177,4
4	3,12 (1H, m) 2,78 (1H, dd, $J = 17,9; 8,0$ Hz)	2,92 (1H, m); 2,56 (1H, m)	35,6	34,4
5	2,51 (1H, m); 1,67 (1H, m)	2,36(1H, m); 1,55 (1H, m)	33,7	34,2
5a	3,00 (1H, m)	2,89 (1H, m)	38,6	39,5
6	1,90 (1H, m); 1,22 (1H, m)	1,78 (1H, ddd, $J = 2,6, 5,2,12,4$ Hz); 1,24 (1H, ddd, $J = 11,3, 12,0, 12,4$ Hz)	35,2	35,8
7	2,09 (1H, m)	2,03 (1H, m)	38,4	38,2
8	-	-	74,0	75,3
8a	-	-	185,7	165,8
8b	-	-	127,9	126,5
1'	2,01(2H, m)	2,21 (1H,m); 1,87 (1H, m)	37,1	36,6
2'	1,16 (1H, m); 0,89 (1H, m)	1,16 (1H, m); 0,89 (1H, m)	28,0	28,3
3'	1,34 (2H, m)	1,28 (2H, m)	24,2	24,3
4'	0,90 (3H, t, $J = 7,4$ Hz)	0,86 (3H, t, $J = 7,2$ Hz)	14,3	14,3
5'	1,06 (3H, d, $J = 7,0$ Hz)	1,05 (3H, d, $J = 7,0$ Hz)	15,0	15,4

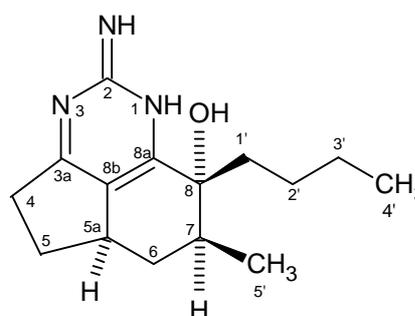
Deslocamentos químicos (δ) em ppm.

^a CD_3OD ; (500 e 125 MHz); ^b CD_3OD ; (400 MHz)

*Dados de RMN de 1,8a;8b,3a-desidro-8-hidroxiptilocalina, diferenciando de MAM-5, apenas na posição das insaturações dos carbonos C-8a, C-8b e C-3a.



1,8a;8b,3a-Desidro-8-hidroxiptilocalina



MAM-5

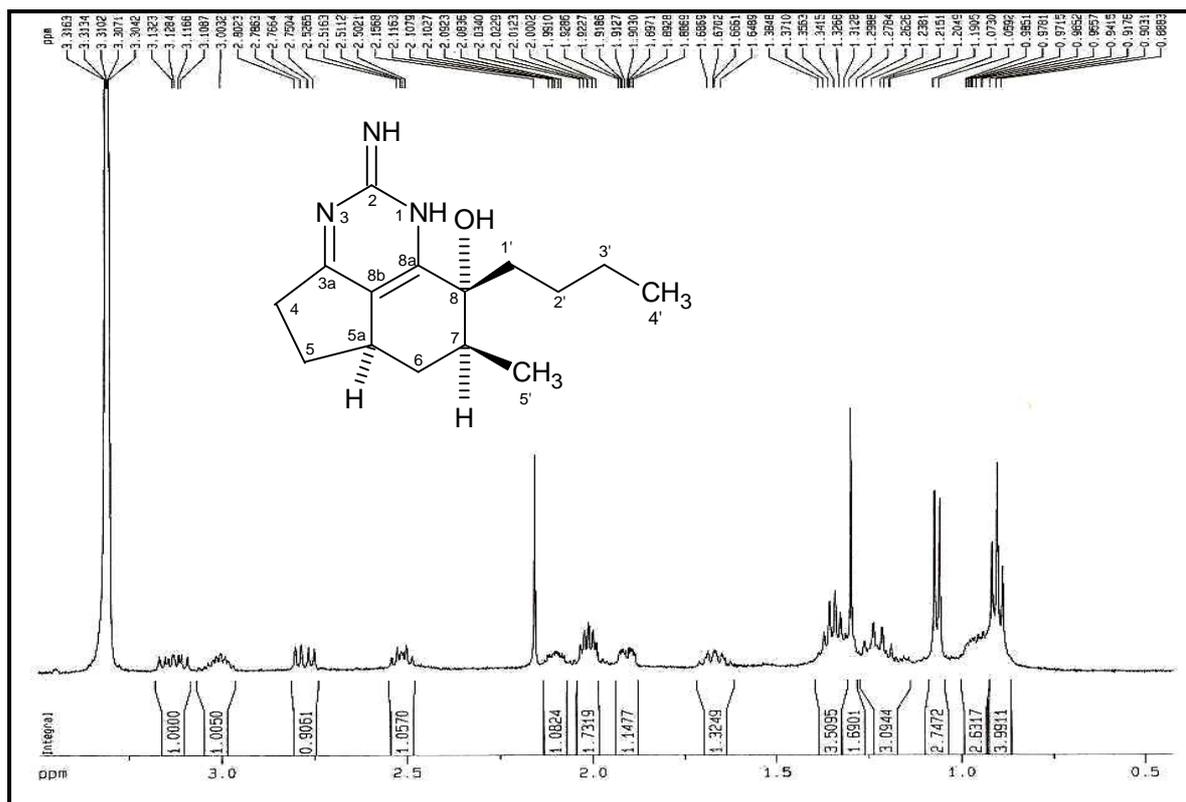


Figura 3.49 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de MAM-5

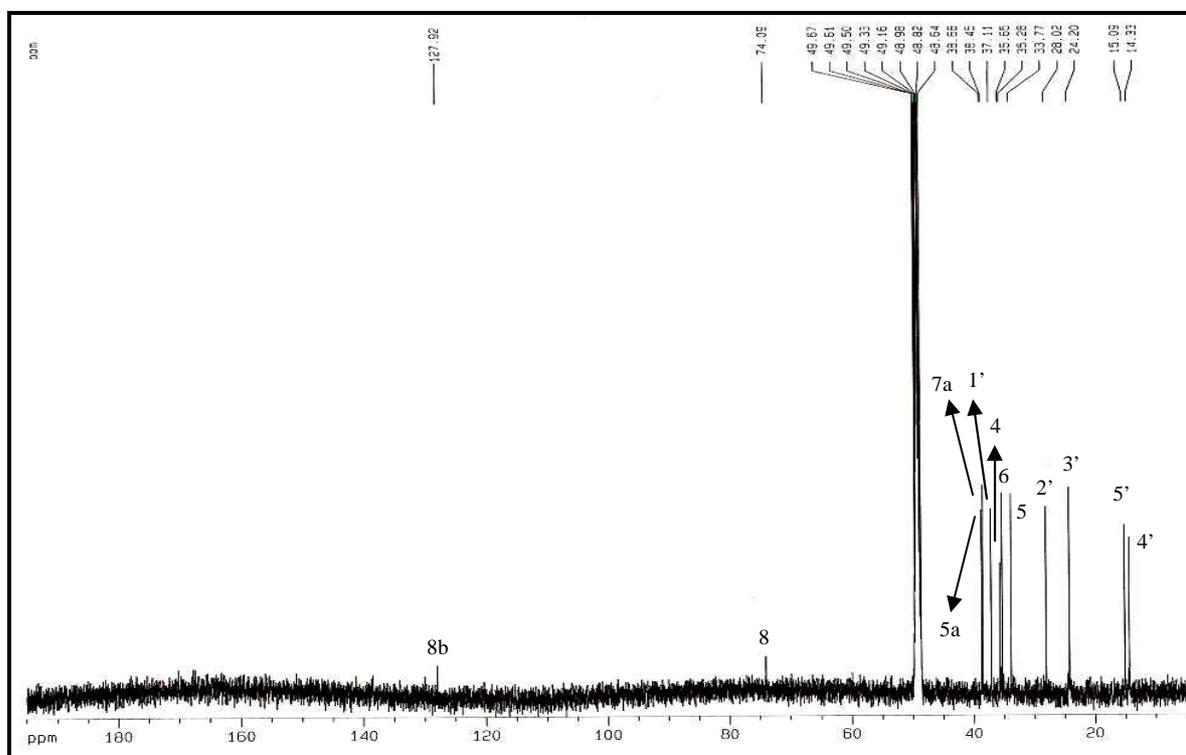


Figura 3.50 – Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de MAM-5

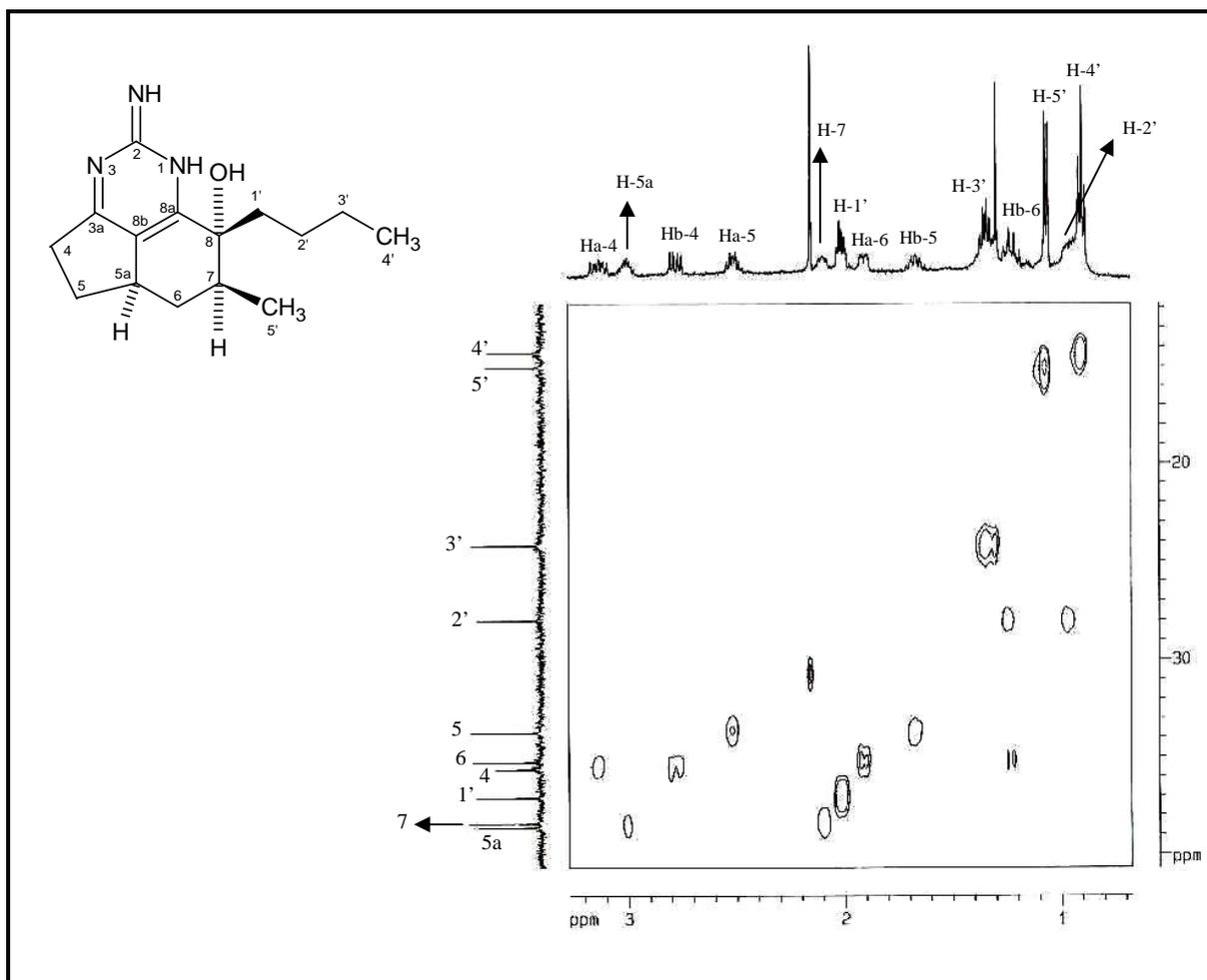


Figura 3.51 – Espectro de RMN HSQC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de MAM-5

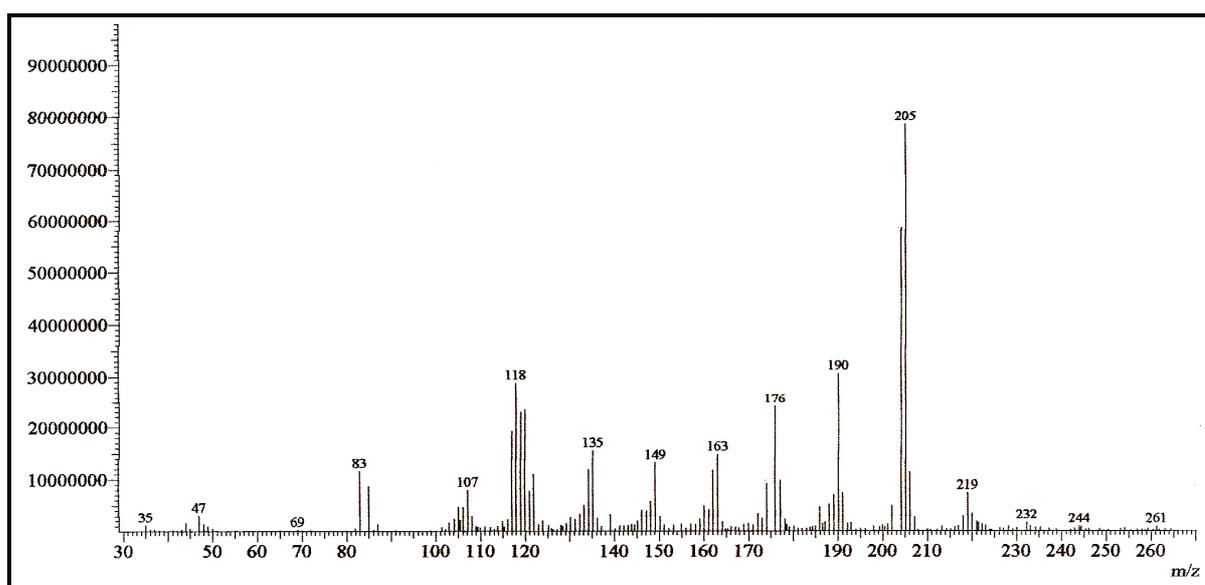


Figura 3.52 – Espectro de massa (IE, 70 eV) de MAM-5

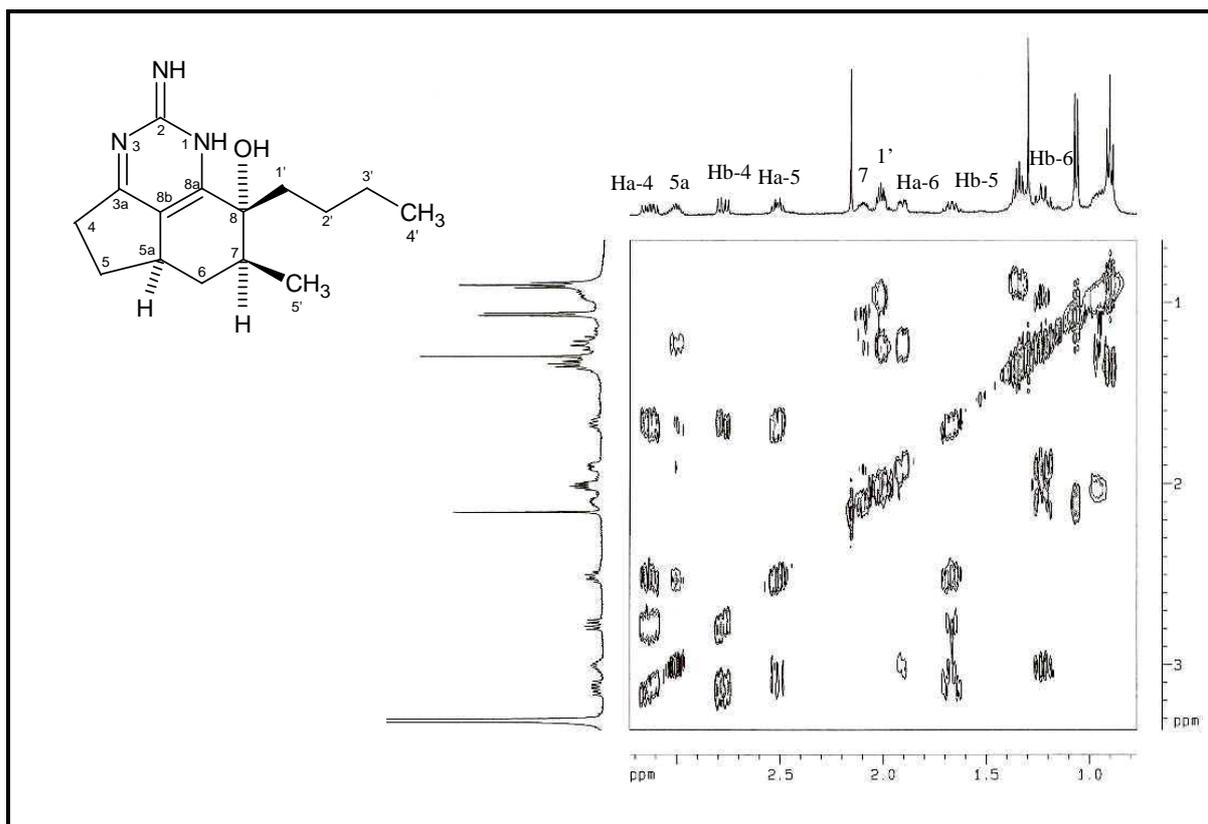


Figura 3.53 – Espectro de RMN ^1H , ^1H – COSY (500 MHz, CD_3OD) de MAM-5

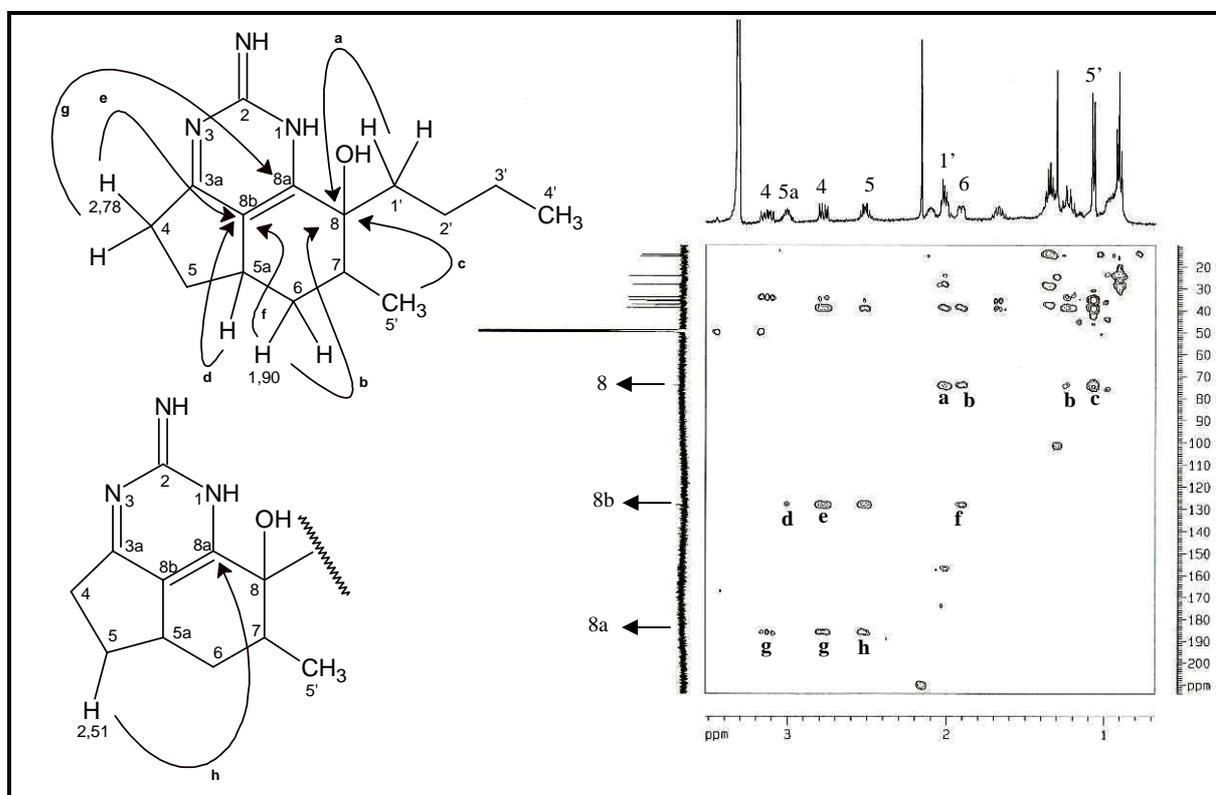


Figura 3.54 – Espectro de RMN HMBC (500 e 125 MHz, CD_3OD) de MAM-5

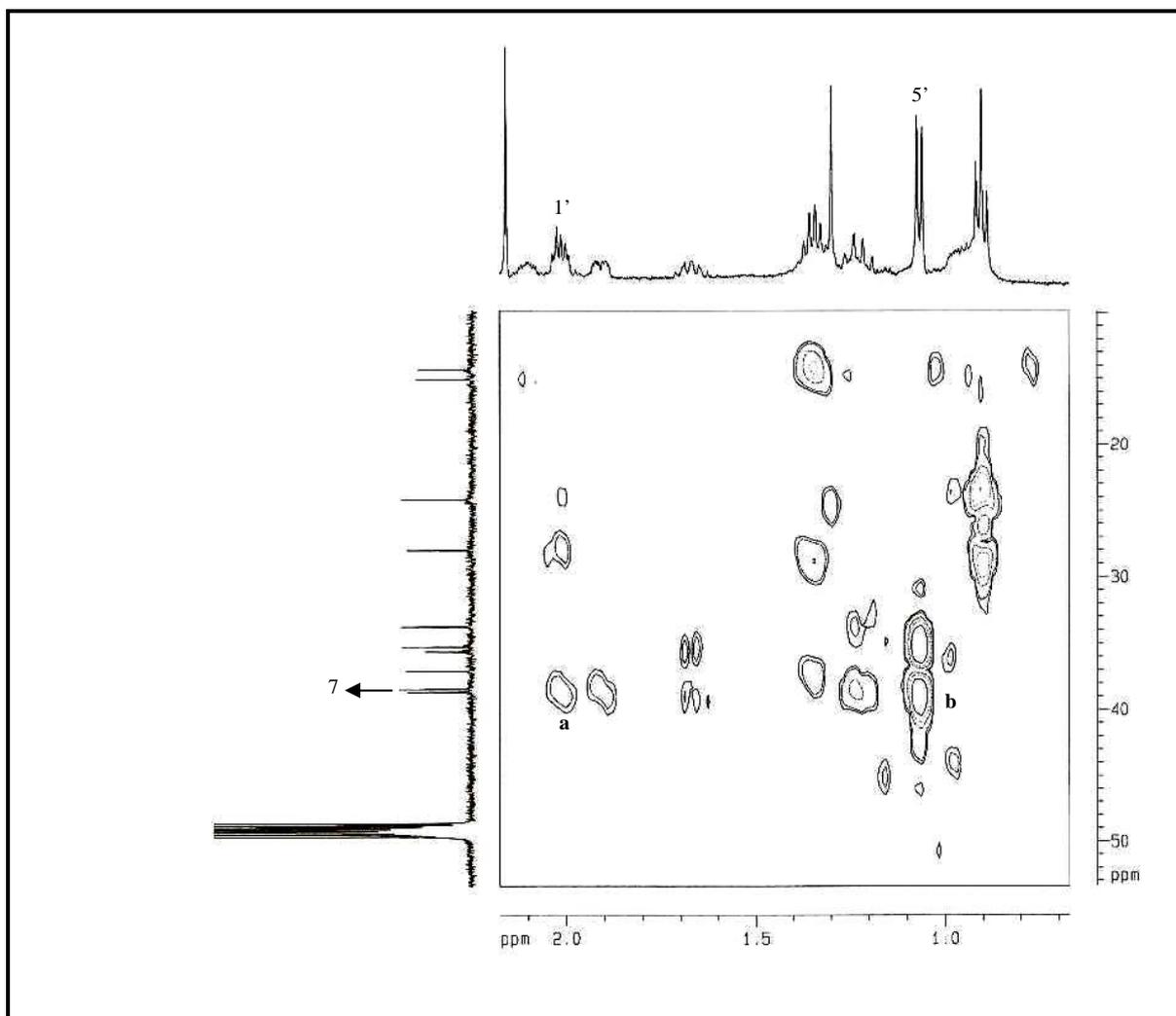
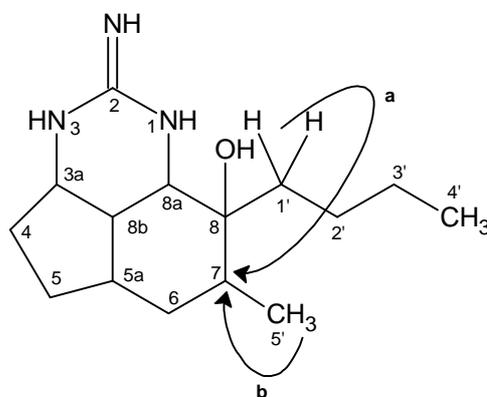


Figura 3.55 – Espectro de RMN HMBC (500 e 125 MHz, CD_3OD) – expansão (δ_{H} de 0,8-1,4/ δ_{C} 11-50) de MAM-5



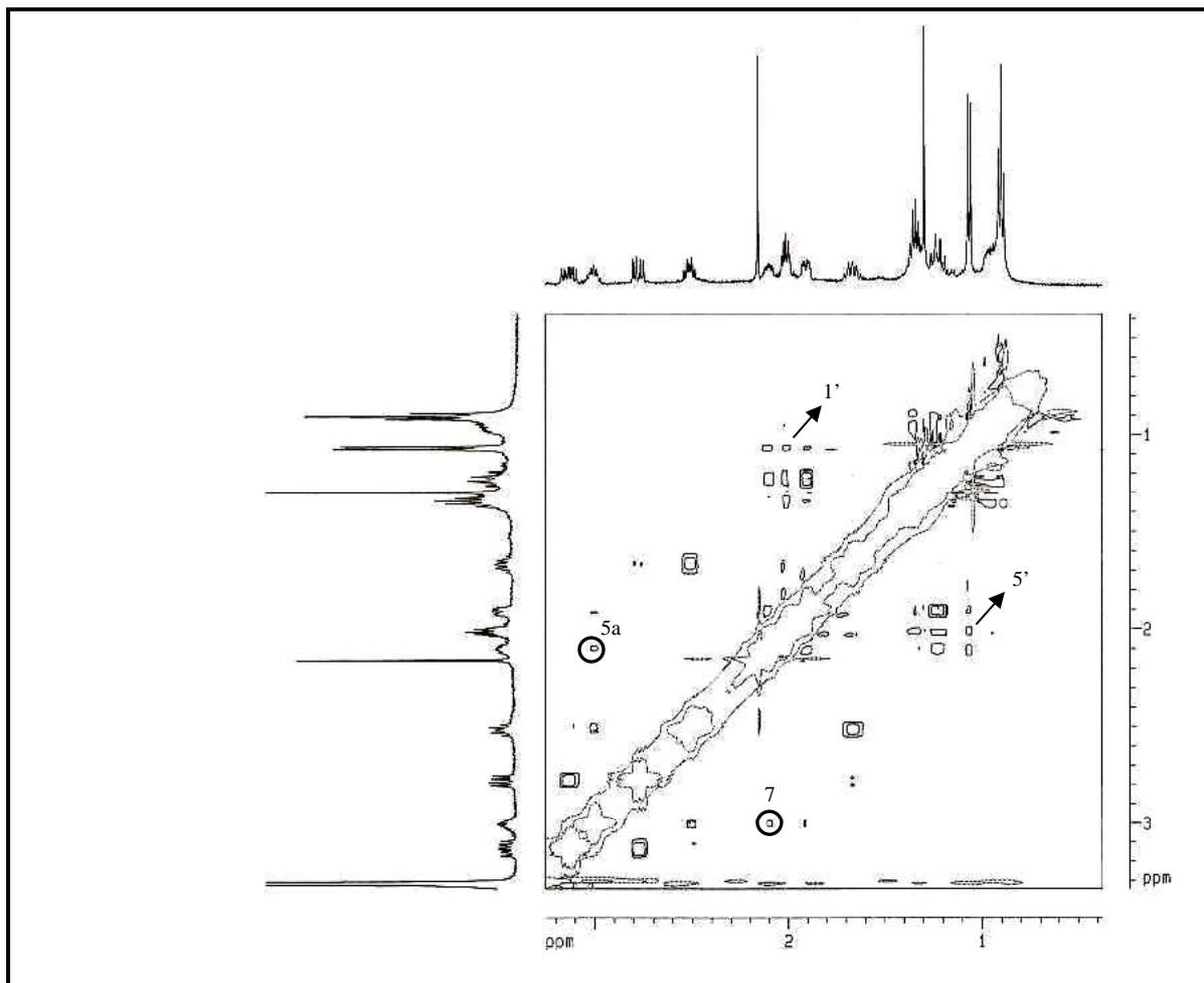
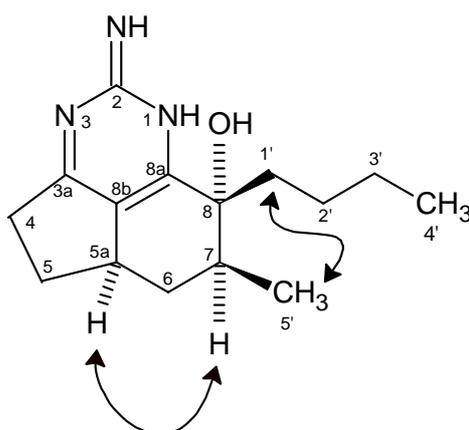


Figura 3.56 – Espectro de RMN NOESY (500 MHz, CD₃OD) de MAM-5



Capítulo 4

PARTE EXPERIMENTAL

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Material biológico

Os espécimes de *Monanchora arbuscula* foram coletados no Parque Estadual Marinho “Pedra da Risca do Meio”, na costa Fortalezaense, Ceará, distante a 10 milhas náuticas (aproximadamente 18,5 Km) do Porto do Mucuripe, a uma profundidade de aproximadamente 18 m, na direção 60° NE em 15/07/2004. O Parque Estadual Marinho “Pedra da Risca do Meio”, criado através da Lei Estadual N° 12.717 de 05 de setembro de 1997, é a única Unidade de Conservação Marinha do Estado do Ceará, com uma área de 33,20 km². O mesmo está delimitado pelas seguintes coordenadas geográficas: A 3° 33’ 800”e 38° 26’000”W, B: 3° 36’000”S e 38° 26’000”W, C: 3° 36’000”S e 38° 21’600”W e D: 3° 33’800”S e 38° 21’600” W (Fig. 4.1) (Bezerra e Coelho, 2006).

A coleta, realizada por mergulho autônomo, e a identificação do organismo marinho foi realizada pelo Dr. Eduardo Hajdu do Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Uma amostra de dois espécimes representando a coleta encontra-se depositada no Museu Nacional, UFRJ, sob os números 8670 e 8674.



Figura 4.1 - Localização da área de coleta, ao largo da cidade de Fortaleza.

4.2. Métodos Cromatográficos

4.2.1. Cromatografia de adsorção

As cromatografias de adsorção foram realizadas sobre coluna de gel de sílica 60 da VETEC (Φ μ m 63-200 mm). O comprimento e o diâmetro das colunas variaram de acordo com a quantidade e complexidade das amostras a serem cromatografadas. Para cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizados cromatofolhas de alumínio de gel de sílica 60 F₂₅₄ da MERCK com espessura de 0,20 mm contendo indicador de fluorescência e/ou em placa de vidro cobertas com gel de sílica 60 G VETEC cód. 1094 preparadas no Laboratório de Pós-Graduação em Química Orgânica (Laboratório Fitoquímico de Plantas Medicinais). Os eluentes utilizados foram: éter de petróleo, diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou combinados para produzir soluções de polaridade crescentes.

As revelações das substâncias nas cromatoplasmas foram realizadas através da exposição desta à luz ultravioleta em dois comprimentos de onda (254 e 365 nm), emitidos por lâmpadas modelo 25CN-15LM da Vilber Lourmat seguida por aspersão com solução de vanilina (C₈H₈O₃) (5,0 g) e ácido perclórico (HClO₄) (0,75M) em etanol (C₂H₆O) (100 mL / 100 mL), de aquecimento em chapa aquecedora 110° C por aproximadamente 5 minutos e/ou reagente Dragendorff (solução de iodeto de potássio e subnitrito de bismuto).

4.2.2. Cromatografia de exclusão

Os fracionamentos por cromatografia de exclusão foram efetuados em gel de dextrana SephadexTM LH-20 da GE Healthcare Bio-Sciences AB, utilizando-se metanol puro como fase móvel.

4.2.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As separações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram realizadas no laboratório de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência da Universidade Estadual do Rio Grande do Norte-Mossoró (UERN), sob coordenação do Prof^o Dr.

Francisco Arnaldo Viana, em aparelho da marca SHIMADZU, constituído de duas bombas de alta pressão, modelo LC – 10 Atvp, detector com arranjo de diodo e um forno termostático para acomodação da coluna. Para as análises semi-preparativas utilizou-se coluna Symmetry PrepTM C₈ (7,8 x 150 mm, 7 µm) da Waters. Como fase móvel utilizou-se água deionizada milli-Q, ácido fórmico, ácido trifluoroacético e metanol grau HPLC, que foram filtrados em membranas de nylon PTFE com poros de 0,45 µm e desgaseificados a vácuo em aparelho sonicador. As amostras foram dissolvidas em metanol com grau HPLC e filtradas num sistema manual de membranas de teflon Whatman com 0,45 µm de diâmetro.

4.3. Métodos Espectrométricos

4.3.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de prótio (RMN ¹H) e de carbono-13 (RMN ¹³C), 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^o. Edilberto Rocha Silveira, em espectrômetros do tipo Bruker modelos Avance DPX300 ou DRX500, operando na frequência de hidrogênio a 300 e 500 MHz e na frequência do carbono a 75 e 125 MHz, respectivamente.

Os solventes deuterados utilizados na dissolução das substâncias foram clorofórmio (CDCl₃), metanol (MeOD) e piridina (C₅D₅N). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em parte por milhão (ppm) e referenciados para RMN ¹H pelos picos dos hidrogênios pertencentes às moléculas residuais não-deuteradas dos solventes deuterados utilizados: clorofórmio (7,27 δ); metanol (4,87 δ) e piridina (7,21; 7,58 e 8,73). Para RMN ¹³C, o padrão foi o sinal do carbono-13 dos solventes: clorofórmio (77,23 δ), metanol (49,15 δ) e piridina (124,2; 136,2 e 150,6). As multiplicidades dos sinais de hidrogênio nos espectros de RMN ¹H foram indicadas segundo a convenção: d (dubleto), t (tripleto), e m (multiplete).

O padrão de hidrogenação dos carbonos foi determinado através da utilização da técnica DEPT 135° e segundo o padrão de substituição ou de hidrogenação dos carbonos foi designado: C (carbono não-hidrogenado), CH (carbono metínico), CH₂ (carbono

metilênico) e CH₃ (carbono metílico). Os carbonos não-hidrogenados foram caracterizados pela subtração do espectro DEPT 135° do espectro de RMN ¹³C-CPD.

4.3.2. Espectrometria de Massa (EM)

Os espectros de massa foram obtidos em espectrômetro de massa da marca SHIMADZU, modelo QP5050 com impacto eletrônico a 70 eV no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, da Universidade Federal do Ceará.

4.3.3. Espectroscopia na região de absorção do Infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetro Perkin-Elmer, modelo FT-IR SPECTRUM 1000 no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, da Universidade Federal do Ceará. As amostras foram solubilizadas em CHCl₃ e aplicadas sobre superfície do disco de cloreto de sódio (NaCl) na forma de filme.

4.4. Rotação Óptica

As rotações ópticas das substâncias sólidas foram obtidas no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, da Universidade Federal do Ceará, em polarímetro digital da PERKIN-ELMER, modelo 341.

4.5. Atividades Leishmanicida e Antifúngica: ensaios *in vitro*

Atividades realizadas no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências da Saúde na Universidade de Brasília, sob a coordenação da Prof^ª. Dra. Laila Salmen Espíndola.

4.6. Estudos dos constituintes químicos de *Monanchora arbuscula*

4.6.1. Investigação bioguiada preliminar do extrato de *M. arbuscula*

4.6.1.1. Preparação do extrato bruto

O material marinho (1,5 Kg), após coletado, foi estocado em etanol 100%. O etanol foi filtrado e evaporado sob pressão reduzida em evaporador rotativo, originando o extrato hidroalcoólico que foi particionado com CH₂Cl₂/H₂O 3:1, obtendo a fase orgânica que após secagem com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e destilação do solvente, sobre pressão reduzida, forneceu 9,14 g de material orgânico.

O resíduo do material marinho foi triturado, extraído com CH₂Cl₂/EtOH (1:1) (3 x 1,5 L) e o solvente foi concentrado sob pressão reduzida. A fase orgânica do extrato hidroalcoólico e o respectivo extrato orgânico do resíduo marinho, depois de análise por CCD foram reunidos, obtendo o extrato bruto (17,89 g) (Fluxograma 4.1, pág.106).

4.6.1.2. Atividade citotóxica *in vitro* em linhagens de células tumorais

O extrato bruto de *M. arbuscula* foi avaliado quanto a sua atividade citotóxica utilizando um painel de quatro células tumorais (Tabela 4.1), no Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, sob a coordenação da Prof^a. Dra. Letícia Veras Costa-Lotufo.

Tabela 4.1 - Linhagens de células utilizadas no ensaio de citotoxicidade *in vitro*.

Linhagem	Tipo de neoplasia	<i>Origem</i>
HCT8	Carcinoma de cólon	Humana
MDA-MB-435	Melanoma	Humana
HL60	Leucemia	Humana
SF295	Glioblastoma	Humana

O extrato bruto apresentou potencial citotóxico (Tabela 4.3, pág. 108) frente às linhagens de células tumorais apresentadas na Tabela 4.1, pág.106. Partindo deste resultado positivo, deu-se continuidade ao estudo químico da espécie *M. arbuscula*.

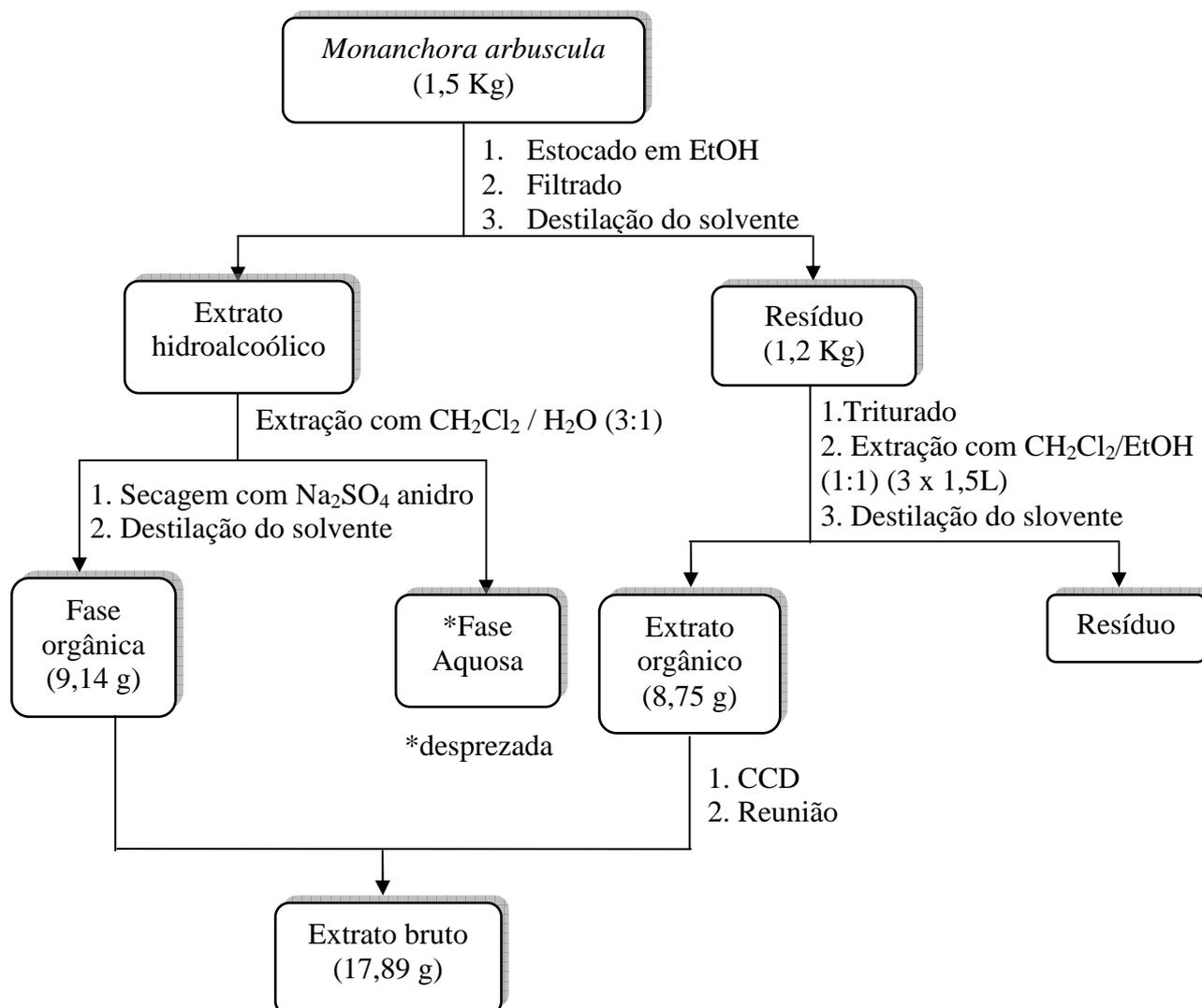
4.6.1.3. Partição líquido-líquido do extrato bruto

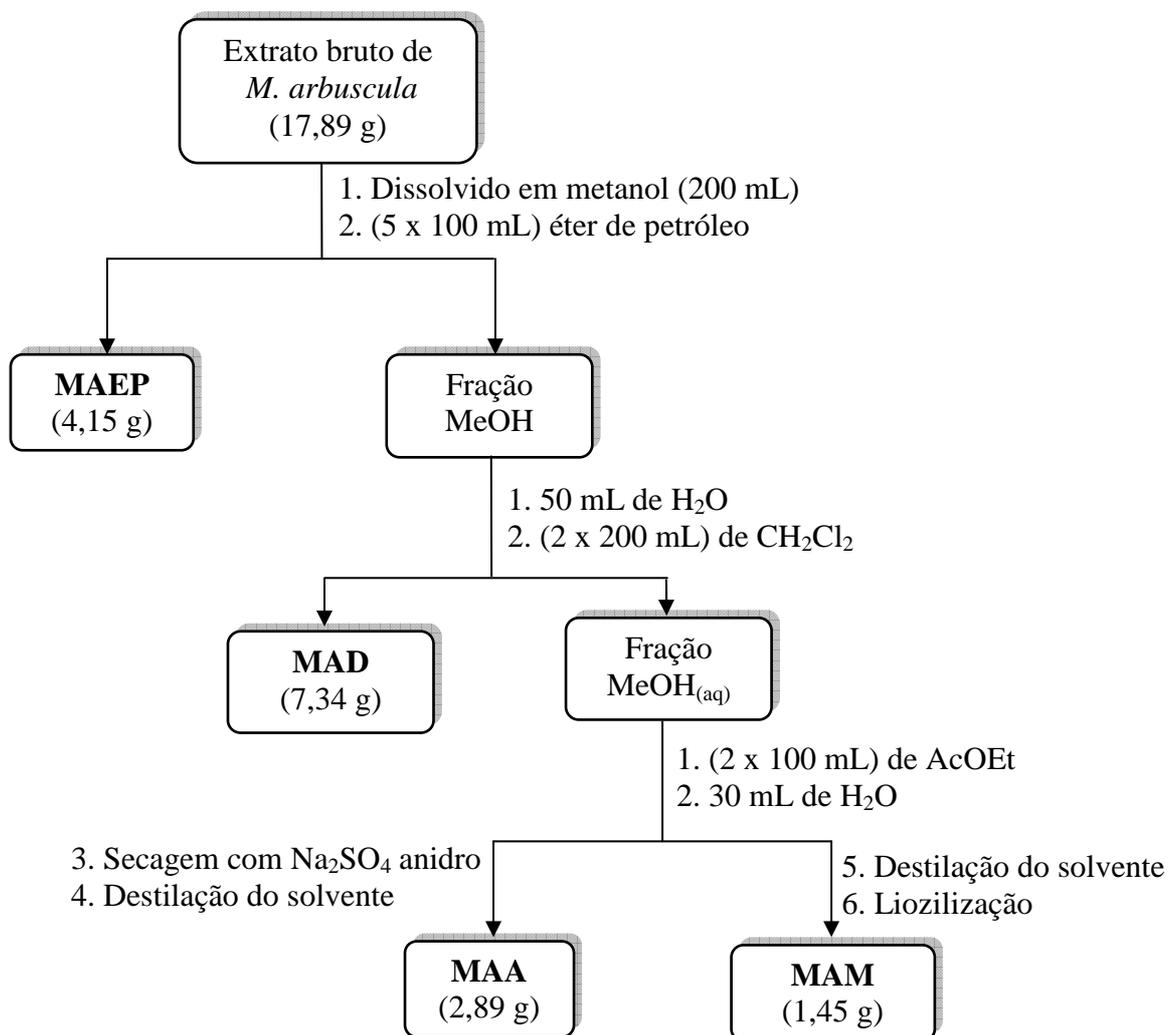
O extrato bruto (17,89 g) foi dissolvido em metanol (200 mL) e extraído com éter de petróleo (5 x 100 mL). À fase metanólica adicionou-se 100 mL DCM e pequenas porções de água até quebrarem-se as fases. Separadas a fração hidrometanólica foi uma vez mais extraída com 100 mL DCM. À fração hidrometanólica adicionou-se 100 mL de AcOEt, e mais uma vez adicionou-se pequenas porções de água até a separação das fases. Uma segunda extração com AcOEt foi realizado. Depois de reunidas e secas com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) as misturas de todas as alíquotas do mesmo solvente e a fração hidrometanólica residual, a qual foi concentrada e liofilizada, foram concentradas fornecendo as massas mostradas na Tabela 4.2, a seguir. (Fluxograma 4.2, pág. 107).

Tabela 4.2 - Frações provenientes da partição do extrato de *M. arbuscula*.

Solvente	Fração	Peso (g)
Éter de petróleo	MAEP	4,15
DCM	MAD	7,34
AcOEt	MAA	2,89
MeOH/H ₂ O*	MAM	1,45
Total		15,83

*Fração liofilizada

Fluxograma 4.1 - Método de preparação do extrato bruto de *M. arbuscula*

Fluxograma 4.2 - Método de preparação das frações de *M. arbuscula*

As frações, provenientes da partição líquido-líquido, apresentaram resultados positivos quanto a sua citotoxicidade, sendo que as frações mais polares diclorometano, acetato de etila e metanólica (MAD, MAA e MAM), respectivamente, mostraram-se serem as mais ativas (Tabela 4.3, pág. 108).

Desta forma, iniciou-se o estudo da prospecção química de *M. arbuscula* com a fração diclorometano (MAD).

Tabela 4.3 - Atividade citotóxica IC₅₀ (µg/mL) do extrato bruto de *M. arbuscula* e as frações provenientes da partição.

Linhagens celulares	Extrato	MAEP	MAD	MAA	MAM
	bruto IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)
HL-60	2,178	7,715	1,445	1,314	2,498
	1,848-2,567	6,094-9,768	1,210-1,725	1,193-1,447	2,065-3,021
HCT-8	5,417	>25	2,310	1,869	2,865
	3,716-7,897		2,039-2,616	1,678-2,083	1,972-4,162
MAD-MB-435	1,740	15,64	1,166	1,128	4,216
	1,513-2,000	14,43-16,95	0,959-1,418	0,956-1,331	3,509-5,066
SF295	7,550	>25	3,051	2,085	7,044
	6,415-8,886		2,274-4,094	1,937-2,244	5,353-9,269

A tabela está apresentando os valores de IC₅₀ e o intervalo de confiança de 95 % de pelos menos dois experimentos independentes realizados em duplicatas, para as células (HL-60), (HCT-8), (MDA-MB-435) e (SF295) obtidas pela regressão não-linear através do programa GraphPad Prism.

4.6.2. Isolamento dos constituintes químicos de *M. arbuscula*

4.6.2.1. Fracionamento cromatográfico da fração diclorometano (MAD)

Uma alíquota de 5,73 g de MAD foi dividida em três partes (1 g, 2,51 g e 2,22 g) e cromatografadas separadamente em coluna ($\emptyset = 3,5$ cm) em Sephadex LH-20 (45 g) para a primeira cromatografia, (60 g) para as demais, utilizando-se metanol como solvente. As frações coletadas (4 mL) foram submetidas a análise comparativa por CCD e posteriormente reunidas de acordo com suas semelhanças para a obtenção de 3 grupos (Tabela 4.4, pág. 109) (Fluxograma 4.3, pág. 114).

Tabela 4.4 - Descrição das frações do tratamento cromatográfico da fração diclorometano (MAD)

Eluente	Fração	Determinação	Peso (mg)
Metanol	F ₁₋₈	MAD-I	898,2
Metanol	F ₉₋₁₅	MAD-II	1.940,0
Metanol	F ₁₆₋₂₅	MAD-III	164,7

Através de análise por CCD e espectrométrica de RMN ¹H, observou-se a similaridade entre MAD-I e MAD-II quanto sua composição química majoritária. Com relação aos testes farmacológicos, apenas MAD-I e MAD-II apresentaram resultados promissores (Tabela 4.5). Em virtude da maior quantidade, resolveu-se iniciar o fracionamento de MAD-II.

Tabela 4.5 – Atividade citotóxica IC₅₀ (µg/mL) das frações diclorometano (MAD-I, MAD-II e MAD-III)

Linhagens celulares	MAD-I IC₅₀ (µg/mL)	MAD-II IC₅₀ (µg/mL)	MAD-III IC₅₀ (µg/mL)
HL-60	6,74 5,441 – 8,350	3,35 2,503 – 4,489	> 25
HCT-8	20,40 18,07 – 23,03	15,10 12,71 – 17,94	> 25
MAD-MB-435	8,08 7,242 – 9,028	5,24 4,607 – 5,949	23,59 11,20 – 49,67
SF-295	> 25	20,56 18,88 – 22,38	> 25

4.6.2.1.1. Fracionamento cromatográfico da fração diclorometano II (MAD-II)

A fração MAD-II (1,94 g) foi cromatografada em coluna ($\emptyset = 3,5$ cm) em Sephadex LH-20 (60 g) utilizando-se metanol puro como solvente. As 17 frações coletadas (4 mL) foram submetidas à análise comparativa por CCD e posteriormente reunidas de acordo com suas semelhanças para a obtenção de 4 grupos (Tabela 4.6).

Tabela 4.6 - Descrição das frações do tratamento cromatográfico de MAD-II

Eluente	Fração	Determinação	Peso (mg)
Metanol	F ₁₋₄	MAD-II (1-4)	3,8
Metanol	F ₅₋₁₄	MAD-II (5-14)	1450,0
Metanol	F ₁₅₋₁₆	MAD-II (15-16)	25,5
Metanol	F ₁₇	MAD-II (17)	8,5
		Total	1487,8 mg
		Rendimento	76,7 %

4.6.2.1.1.1. Tratamento cromatográfico da fração MAD-II (5-14)

A fração MAD-II (5-14) (1,45 g) foi adsorvida em 2,8 g de gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre 6,5 g de gel de sílica em coluna ($\emptyset = 2$ cm). A eluição foi realizada com os solventes DCM, AcOEt e MeOH puros ou misturados. As frações foram coletadas em volume de 25 mL, e concentradas sob pressão reduzida (Tabela 4.7). Após análise comparativa por CCD das frações obtidas e reunião das semelhantes obtiveram-se 8 grupos (Tabela 4.8, pág. 111).

Tabela 4.7 - Descrição do gradiente de eluição do tratamento cromatográfico de MAD-II (5-14)

Eluente	Fração	Eluente	Fração
DCM/AcOEt 10%	F ₁₋₂	AcOEt/ MeOH 10%	F ₁₄₋₁₅
DCM/AcOEt 20%	F ₃	AcOEt/ MeOH 15%	F ₁₆
DCM/AcOEt 50%	F ₄₋₈	AcOEt/ MeOH 50%	F ₁₇
AcOEt	F ₉₋₁₀	MeOH	F ₁₈
AcOEt/ MeOH 0,5%	F ₁₁₋₁₃		

Tabela 4.8 - Descrição do rendimento do tratamento cromatográfico de MAD-II (5-14)

Fração	Aspecto	Peso (mg)
F ₁	Sólido amarelo	78,4
F ₂	Graxa amarela	27,9
F ₃	Graxa amarela	54
F ₄₋₅	Graxa amarela	51,8
F ₆₋₁₀ *	Graxa marron	48,8
F ₁₁₋₁₆ **	Graxa marron avermelhada	861,9
F ₁₇	Graxa marron	83,5
F ₁₈	Graxa marron	18,7
* Originou fração b	Total	1,225 mg
** Originou fração c e d	Rendimento	84,48 %

(Fluxograma 4.3, pág. 114)

4.6.2.1.1.2. Tratamento cromatográfico da fração MAD(II) (5-14) (4-5) e isolamento de MAD-1 (Mirabilina B) (Fluxograma 4.3, pág. 114)

A fração MAD(II) (5-14) (4-5) (51,8 mg) foi adsorvida em 60 mg de gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre 2,26 g de gel de sílica em coluna (\emptyset = 1,8 cm). O gradiente de eluição utilizado é mostrado na tabela 4.9. As frações foram coletadas em volume de 4 mL. Após análise comparativa por CCD das frações obtidas e reunião das semelhantes, obtiveram-se 7 grupos (Tabela 4.10, pág.112).

Tabela 4.9 - Descrição do gradiente de eluição do tratamento cromatográfico de MAD-II (5-14) (4-5)

Eluente	Fração
DCM/AcOEt 0,5 %	F ₁₋₇
DCM/AcOEt 10 %	F ₈₋₁₄
DCM/AcOEt 20 %	F ₁₅₋₁₉
DCM/AcOEt 50 %	F ₂₀₋₂₂
MeOH	F ₂₃₋₂₅

Tabela 4.10 - Descrição do rendimento do tratamento cromatográfico de MAD-II (5-14) (4-5)

Fração	Peso (mg)	Fração	Peso (mg)
F ₁₋₇	1,2	F ₂₃	7,1
F ₈₋₁₅	1,2	F ₂₄	6,3
F ₁₆₋₁₇	1,9	F ₂₅	5,6
F ₁₈₋₂₂	26,0		
		Total	49,3 mg
		Rendimento	95,2 %

A fração (18-22) (26,0 mg) (0,017 %) apresentou-se como uma resina amarela denominada de MAD-1, identificado como um alcalóide guanidínico, mirabilina B, após comparação com dados espectrométricos de RMN ¹H e ¹³C registrados na literatura (Patil, et al., 1997).

Obs.: Os rendimentos correspondentes aos compostos isolados foram calculados a partir da massa do extrato bruto de *M. arbuscula* (17,89 g) (Fluxograma 4.1, pág. 106)

4.6.2.1.2. Fracionamento cromatográfico da fração diclorometano (MAD-I)

A fração MAD-I (898,2 mg) foi adsorvida em 2,44 g de gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre 6,23 g de gel de sílica submetida à coluna cromatográfica ($\emptyset = 3,0$ cm). A eluição foi realizada com o solvente diclorometano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias em escala crescente de polaridade. As frações foram coletadas em volume de 25 mL e concentradas a pressão reduzida. As frações estão reunidas conforme o eluente aplicado (Tabela 4.11, pág. 113).

Parte Experimental – Capítulo 4

Tabela 4.11 – Descrição do gradiente de eluição do tratamento cromatográfico da fração diclorometano (MAD-I)

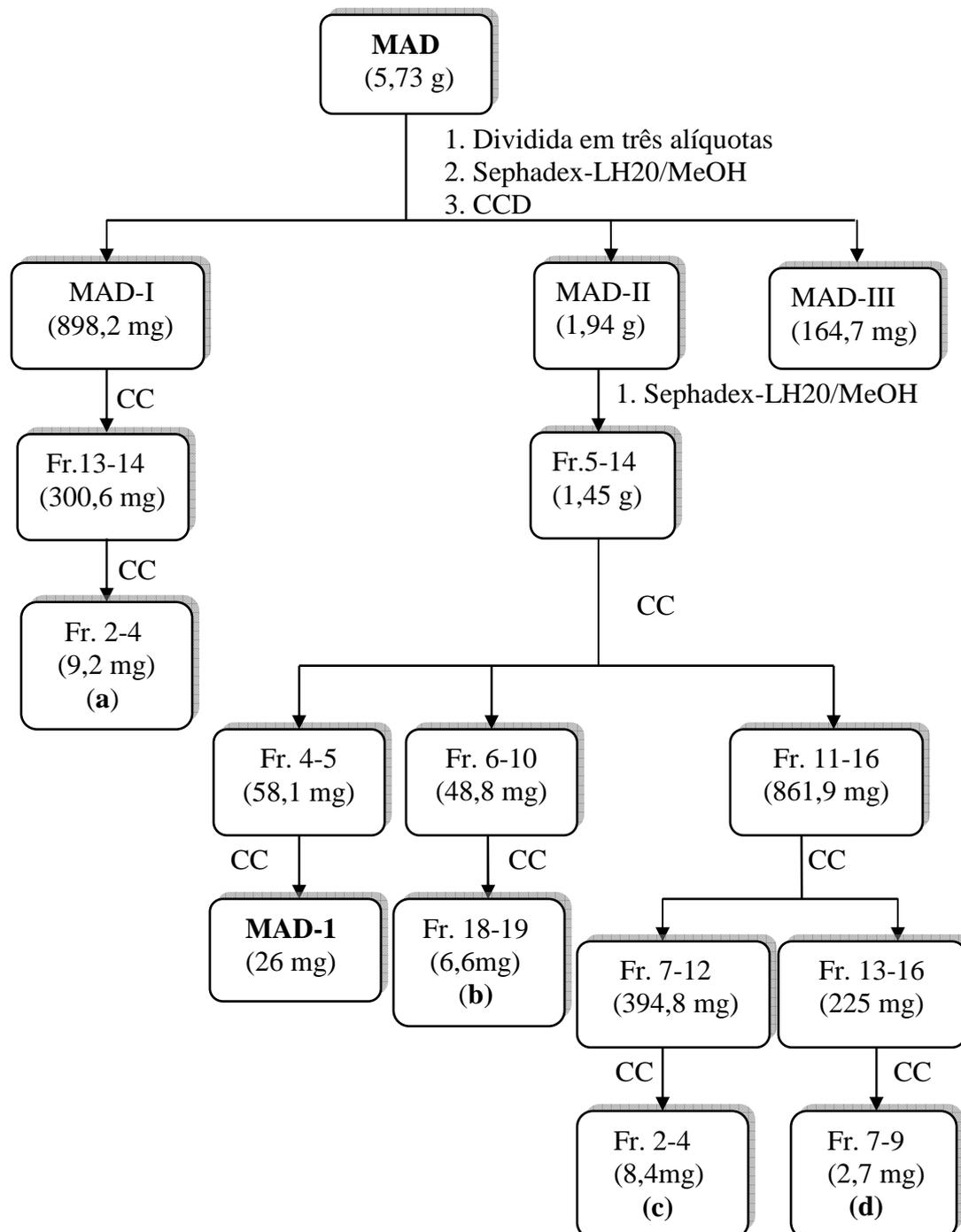
Eluente	Fração
DCM/AcOEt 10%	F ₁₋₂
DCM/AcOEt 20%	F ₃₋₄
DCM/AcOEt 50%	F ₅₋₆
AcOEt	F ₇₋₈
AcOEt/ MeOH 2%	F ₉₋₁₀
AcOEt/ MeOH 5%	F ₁₁₋₁₂
AcOEt/ MeOH 10%	F ₁₃₋₁₄
AcOEt/ MeOH 20%	F ₁₅₋₁₆
AcOEt/ MeOH 50%	F ₁₇
MeOH	F ₁₈₋₂₀

Após análise comparativa por CCD das frações obtidas e reunião das semelhantes obtiveram-se 11 grupos (Tabela 4.12).

Tabela 4.12 – Descrição do rendimento do tratamento cromatográfico da fração diclorometano (MAD-I)

Fração	Peso (mg)	Fração	Peso (mg)
F ₁	45,8	F ₉₋₁₂	55,3
F ₂	17,4	F ₁₃₋₁₄ *	300,6
F ₃	10,6	F ₁₅₋₁₆	223,0
F ₄	16,4	F ₁₇	17,2
F ₅	53,4	F ₁₈	18,8
F ₆₋₈	20,4	F ₁₉	22,6
*Originou a fração a		Total	801,5 mg
(Fluxograma 4.3, pág. 114)		Rendimento	90,57 %

Fluxograma 4.3 - Rota esquemática do isolamento do constituinte químico MAD-1 obtido a partir da fração diclorometano (MAD) de *M. arbuscula*



4.6.2.2. Fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila (MAA)

A fração MAA (2,56 g) foi adsorvida em 5,26 g de gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre 14,5 g de gel de sílica em coluna ($\emptyset = 3,5$ cm). A eluição foi realizada com os solventes DCM, AcOEt e MeOH. As frações foram coletadas em volume de 30 mL, concentradas a pressão reduzida e estão expostas conforme o eluente aplicado na tabela 4.13. Após análise comparativa por CCD das frações obtidas e reunião das semelhantes obtiveram-se 15 grupos (Tabela 4.14).

Tabela 4.13 - Descrição do gradiente de eluição do tratamento cromatográfico da fração acetato de etila (MAA).

Eluente	Fração
DCM/AcOEt 50%	F ₁₋₃
AcOEt	F ₄₋₇
AcOEt/MeOH 0,5%	F ₈₋₁₀
AcOEt/MeOH 10%	F ₁₁₋₁₃
AcOEt/MeOH 15%	F ₁₄₋₁₆
AcOEt/MeOH 20%	F ₁₇₋₁₉
AcOEt/MeOH 50%	F ₂₀₋₂₁
MeOH	F ₂₂

Tabela 4.14 - Descrição do rendimento do tratamento cromatográfico da fração acetato de etila (MAA)

Fração	Peso (mg)	Fração	Peso (mg)
F ₁	2,5	F ₁₁₋₁₄	1450,0
F ₂	64,6	F ₁₅₋₁₆	187,1
F ₃	30,4	F ₁₇	60,0
F ₄	27	F ₁₈	34,4
F ₅	38,8	F ₁₉	21,4
F ₆₋₇	10,2	F ₂₀	177,5
F ₈₋₉	47,5	F ₂₁	156,4
F ₁₀	57,5	F ₂₂	81,8
		Total	2447,1 mg
		Rendimento	95,59 %

4.6.2.2.1. Tratamento cromatográfico da fração MAA (11-14): isolamento de MAA-3 e MAA-4

A fração MAA (11-14) (1449,9 mg) foi adsorvida em 5,0 g de gel de sílica, pulverizada em gral de porcelana e acondicionada sobre 12,0 g de gel de sílica, em coluna ($\emptyset = 3,5$ cm). A eluição foi realizada com os solventes, AcOEt e MeOH. As frações foram coletadas em volume de 30 mL, concentradas a pressão reduzida e apresentam-se expostas conforme o eluente aplicado na Tabela 4.15. As frações semelhantes foram reunidas após análise por CCD (Tabela 4.16).

Tabela 4.15 - Descrição do gradiente de eluição do tratamento cromatográfico da fração MAA (11-14)

Eluente	Fração
AcOEt	F ₁₋₃
AcOEt/MeOH 0,5%	F ₄₋₆
AcOEt/MeOH 10%	F ₇₋₉
AcOEt/MeOH 15%	F ₁₀₋₁₂
AcOEt/MeOH 20%	F ₁₃₋₁₅
AcOEt/MeOH 50%	F ₁₆₋₁₇
MeOH	F ₁₈

Tabela 4.16 - Descrição do rendimento do tratamento cromatográfico da fração MAA (11-14)

Fração	Peso (mg)	Fração	Peso (mg)
F ₁	14,4	F ₁₂	62
F ₂₋₄ (e)	24,3	F ₁₃	13,6
F ₅	8,6	F ₁₄	19,7
F ₆	7,6	F ₁₅	12,2
F ₇	293,4	F ₁₆	21,2
F ₈	338,7	F ₁₇	13
F ₉₋₁₀	332,9*	F ₁₈	14,2
F ₁₁	125,8		
*Fração trabalhada no HPLC		Total	1301,6 mg
		Rendimento	89,77 %

A fração MAA (11-14) (9-10) (332,9 mg) foi submetida à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A fração MAA (11-14)(9-10) (332,9 mg) foi inicialmente solubilizada em 9 mL de metanol grau HPLC e filtrado num sistema manual com filtros de 0,45 μm . O melhor método foi verificado através da utilização de uma coluna semi-preparativa Symmetry PrepTM C₈ (7,8 x 150 mm, 7 μm) e como eluente uma mistura de H₂O/MeOH (62:38 v/v) a 0,1% de ácido fórmico (CH₂O₂) num fluxo de 2 mL/min, usando um “loop” de 100 μm . Após injeção de todo material, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida, fornecendo 52,9 e 72,8 mg, nomeados como MAA-2 e MAA-3 (Figs. 4.2 e 4.3, pág. 118) (Fluxograma 4.4, pág. 119).

Nas frações MAA-2 e MAA-3 depois de análise por RMN ¹H e ¹³C observou-se a presença de ácido fórmico, o qual fez parte do processo de isolamento, porém não influenciou no processo de elucidação das estruturas, que após análise dos espectros uni e bidimensionais e dados da literatura foi possível concluir que se tratavam dos alcalóides guanidínicos, o 8b-hidroxiptilocalina e a ptilocalina, respectivamente.

Obs.: As frações MAA-2 e MAA-3 foram submetidas ao tratamento do ácido fórmico, para serem avaliadas quanto ao potencial citotóxico.

4.6.2.2.2. Neutralização das frações MAA-2 e MAA-3, provenientes do HPLC

Às frações MAA-2 e MAA-3, separadamente, foi adicionado 1 mL da solução de hidróxido de amônio (NH₄OH) com água (1:5 v/v). Foram extraídas três vezes com acetato de etila. A fase orgânica foi retirada com o auxílio de uma pipeta Pasteur e após secagem com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) forneceu 34 e 24,5 mg, respectivamente.

As frações MAA-2 (34 mg) (0,022 %) e MAA-3 (24,5 mg) (0,016 %) apresentaram-se como uma resina amarelada.

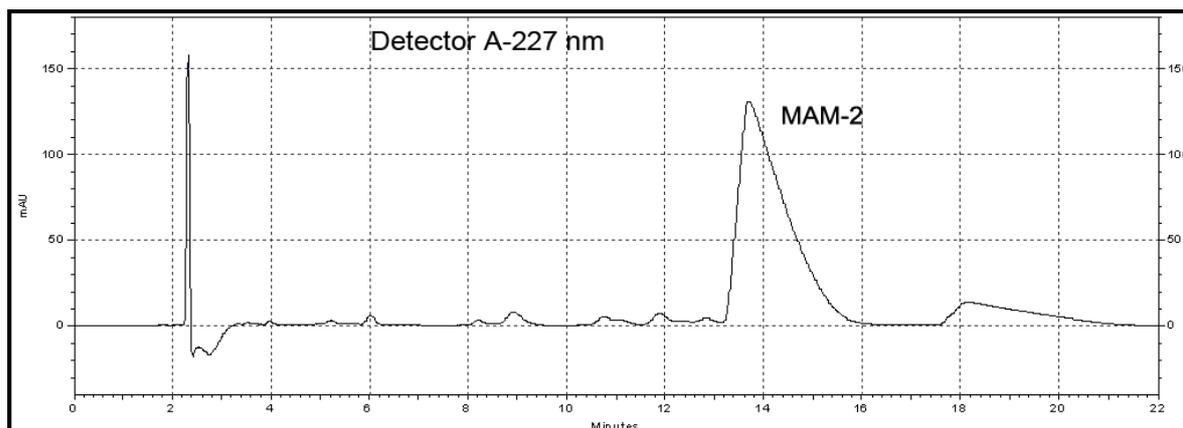


Figura 4.2 - Cromatograma de obtenção de MAA-2 em fase reversa C₈

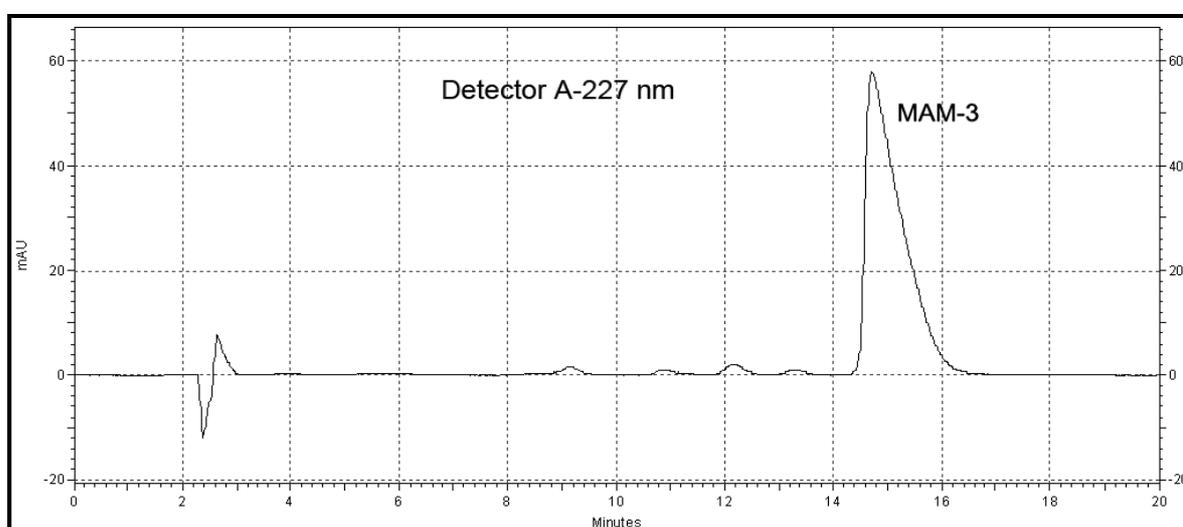


Figura 4.3 - Cromatograma de obtenção de MAA-3 em fase reversa C₈

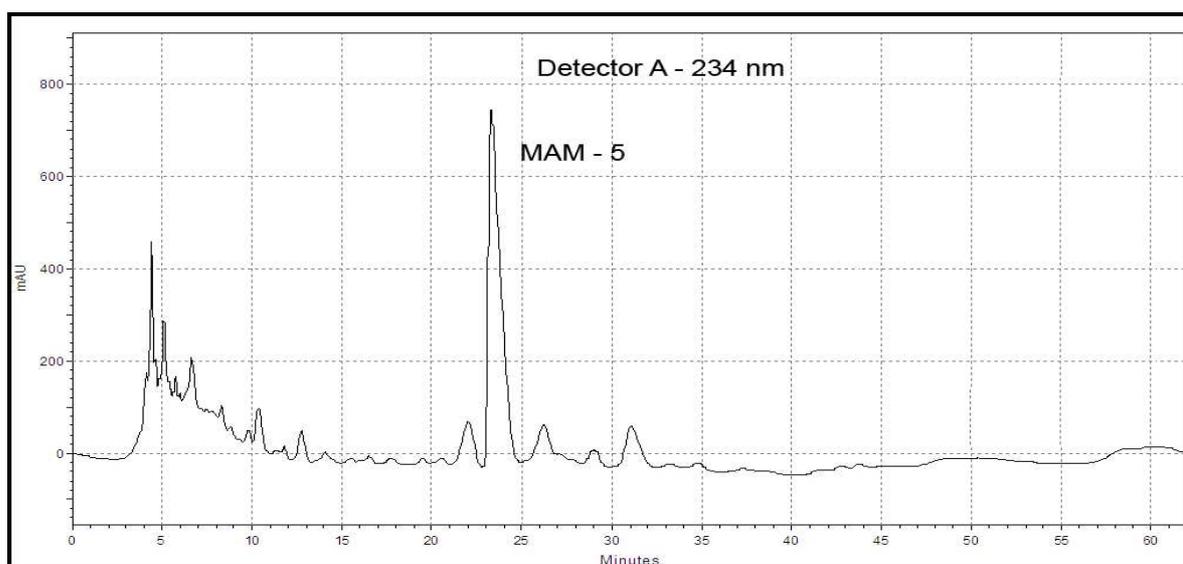
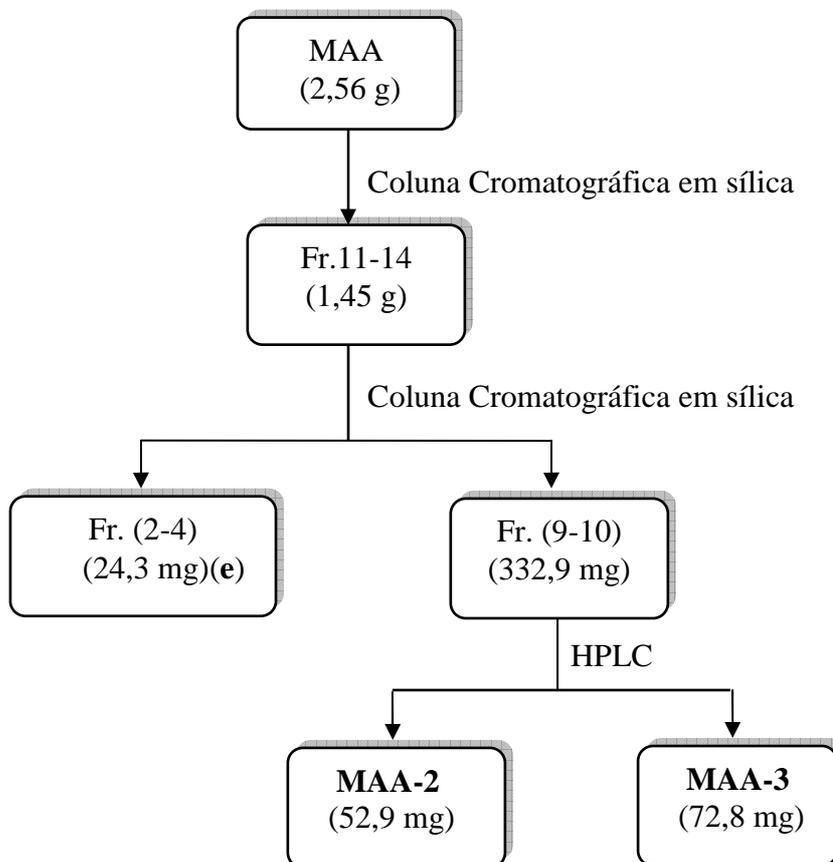


Figura 4.4 – Cromatograma de obtenção de MAM-5 em fase reversa C₈

Fluxograma 4.4 - Rota esquemática do isolamento dos constituintes químicos MAA-2 e MAA-3, obtido a partir da fração acetato de etila (MAA) de *M. arbuscula*



4.6.2.3. Tratamento cromatográfico das frações diclorometano (MAD-I, MAD-II) e acetato de etila (MAA)

Depois de sucessivas cromatografias tanto de MAD-I e MAD-II, como de MAA, após análise comparativa por CCD as frações semelhantes, [(2-4) de MAD-I; (18-19); (2-4); (7-9) de MAD-II e (2-4) de MAA], foram reunidas fornecendo a fração MADA (51,2 mg) (Fluxograma 4.5, pág.122).

4.6.2.3.1. Tratamento cromatográfico da fração MADA e isolamento de MADA-4

Os 51,2 mg da fração MADA não foram totalmente solúveis na mistura de solventes (AcOEt/CH₂Cl₂ 30%), que seria utilizada para iniciar eluição da coluna. O material sobrenadante foi filtrado e o material solúvel, depois de evaporado, (44,5 mg) foi adsorvido em 370 mg de gel de sílica, pulverizado em gral de porcelana e acondicionado sobre 960 mg de gel de sílica em coluna (\emptyset = 1,3 cm). A eluição foi realizada com os solventes DCM, AcOEt e MeOH seguido um gradiente de acordo com a tabela 4.17 em volume de 4 mL. A similaridade das frações obtidas, após análise em CCD permitiu a reunião das mesmas em 8 grupos (Tabela 4.18).

Tabela 4.17 - Descrição do gradiente de eluição do tratamento cromatográfico da fração MADA

Eluente	Fração
AcOEt/DCM 30%	F ₁₋₁₁
AcOEt	F ₁₂₋₂₁
MeOH	F ₂₂

Tabela 4.18 - Descrição do rendimento do tratamento cromatográfico da fração MADA

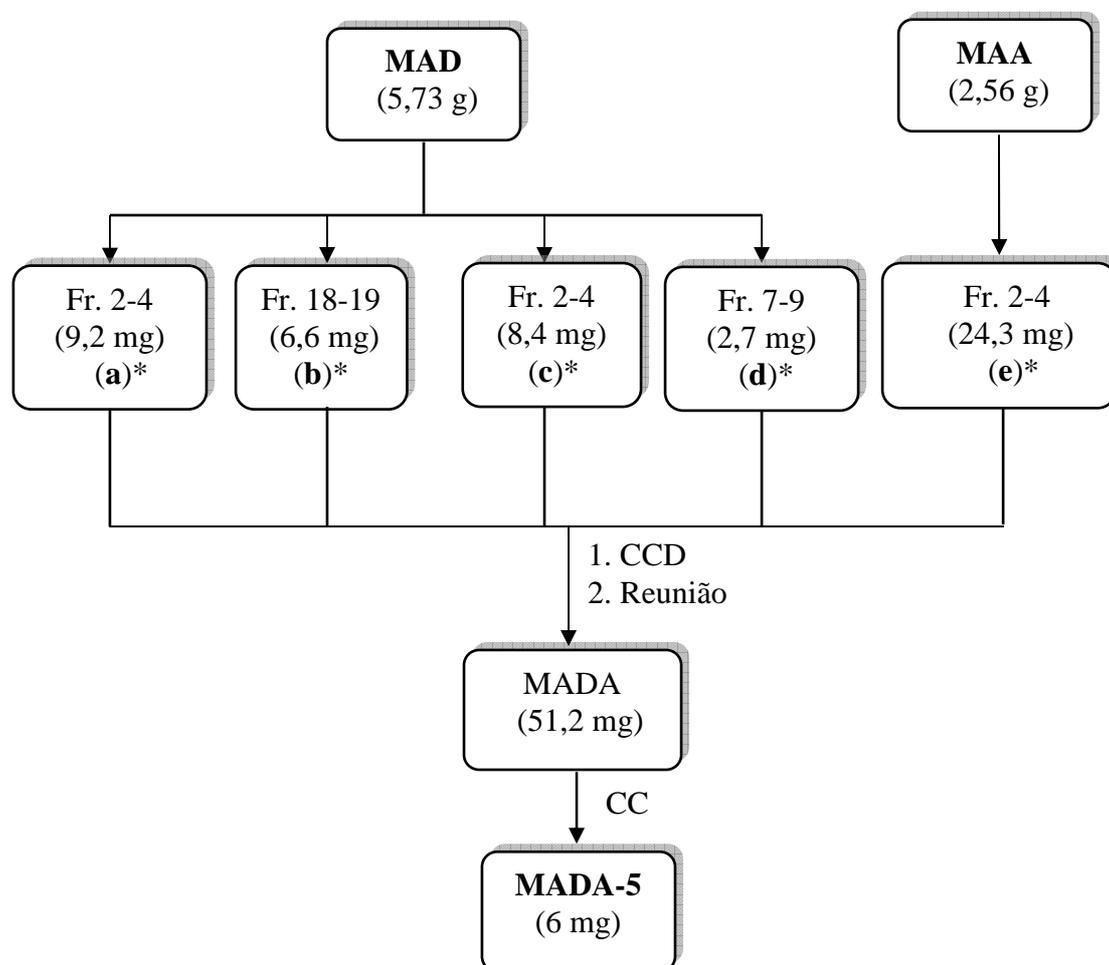
Fração	Peso (mg)	Fração	Peso (mg)
F ₁	4,4	F ₈₋₁₁	6,0
F ₂	3,5	F ₁₃₋₂₁	3,9
F ₃₋₄	4,0	F ₂₂	10,4
F ₅₋₇	1,8	F ₈₋₁₁	6,0
		Total	34,0 mg
		Rendimento	76,40 %

Parte Experimental – Capítulo 4

A fração (8-12) (6 mg) (0,004 %) apresentou-se como um sólido amorfo amarelo, codificado por MADA-4 e identificado como uma mistura de epímero de alcalóides guanidínicos, após comparação com dados espectrométricos de RMN ^1H e ^{13}C registrados na literatura (Hua, *et al.*, 2004).

Ao material insolúvel foi adicionado metanol grau HPLC e o líquido sobrenadante foi filtrado. O material insolúvel (7 mg) depois de análise por CCD, foi submetido a análise espectrométrica de RMN ^1H e ^{13}C chegando-se a conclusão de tratar-se da mesma mistura de epímero MADA-4 .

Fluxograma 4.5 - Rota esquemática do isolamento do constituinte químico MADA-4, a partir da fração diclorometano MAD (Fluxograma 4.3, pág. 114) e acetato de etila MAA (Fluxograma 4.4, pág. 119) de *M. arbuscula*.



*A obtenção das frações **a**, **b**, **c**, **d** podem ser observadas no Fluxograma 4.3, pág. 114, enquanto a fração **e** foi obtida como expõem o fluxograma 4.4, pág. 119.

4.6.2.4. Fracionamento cromatográfico da fração metanólica (MAM)

A fração MAM (1,10 g) foi cromatografada em coluna ($\varnothing = 3,5$ cm) em Sephadex LH-20 (60 g) utilizando-se metanol puro como solvente. As frações coletadas (5 mL) foram submetidas à análise comparativa por CCD e posteriormente reunidas de acordo com suas semelhanças para a obtenção de 11 grupos (Tabela 4.19).

Tabela 4.19 – Descrição das frações e rendimento do tratamento cromatográfico da fração metanólica (MAM)

Eluente	Fração	Peso (mg)	Eluente	Fração	Peso (mg)
Metanol	F ₁	33,1	Metanol	F ₆₋₇	36,1
Metanol	F ₂	8,7	Metanol	F ₈₋₁₁	432,0
Metanol	F ₃	6,6	Metanol	F ₁₂₋₁₃	179,0
Metanol	F ₄	6,7	Metanol	F ₁₄₋₁₅	129,0
Metanol	F ₅	7,3	Metanol	F ₁₆	125,8
			Metanol	F ₁₇	22,2
			Total		986,5 mg
			Rendimento		89,68 %

4.6.2.4.1. Tratamento cromatográfico da fração MAM (8-11) e isolamento de MAM-5

A fração MAM (8-11) (432,0 mg) foi cromatografada em um cartucho C₁₈ em um sistema ternário de solvente, água a 0,1% de TFA (Ácido Trifluoroacético) e metanol. O seu gradiente de eluição está de acordo com a tabela 4.20, pág. 124. As frações coletadas (50 mL) foram concentradas sob pressão reduzida e analisadas por CCD.

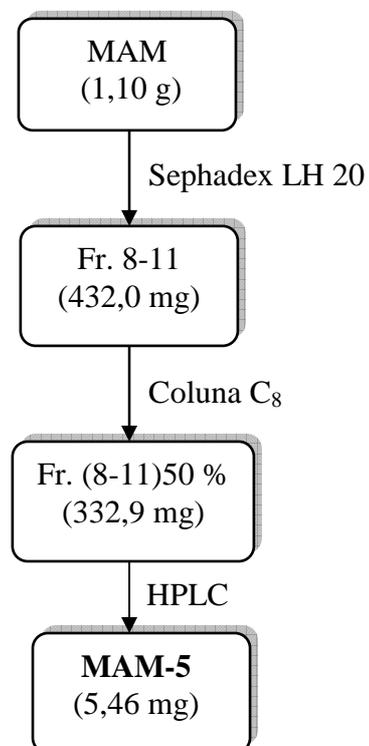
Tabela 4.20 - Descrição das frações e rendimento do tratamento cromatográfico de MAM (8-11)

Eluente	Fração	Peso (mg)
Água/0,1T FA/10%MeOH	F10%	64,7
Água/0,1T FA/20%MeOH	F20%	21,1
Água/0,1T FA/20%MeOH	F30%	16,6
Água/0,1T FA/40%MeOH	F40%	90,5
Água/0,1T FA/50%MeOH	F50%*	152,0
Água/0,1T FA/60%MeOH	F60%	19,9
Água/0,1T FA/100%MeOH	F100%	62,3
*Fração trabalhada no HPLC	Total	427,1 mg
	Rendimento	98,87 %

A fração MAM (8-11) (50 %) (152,0 mg) foi submetida à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A fração MAM (8-11)(50%) (152,0 mg) foi inicialmente solubilizada em 5 mL de metanol grau HPLC e filtrado num sistema manual com filtros de 0,45 µm. O melhor método foi verificado através da utilização de uma coluna semi-preparativa Symmetry Prep™ C₈ (7,8 x 150 mm, 7 µm) e como eluente uma mistura de H₂O/MeOH (55:45 v/v) a 0,1% de ácido Trifluoroacético (TFA) num fluxo de 3,5 mL/min, usando um “loop” de 50 µm. Após injeção de todo material, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida, fornecendo 5,46 mg e codificada por MAM-5 (Fig. 4.4, pág.118) (Fluxograma 4.6, pág. 125).

A fração MAM-5 (5,46 mg) (0,003 %) apresentou-se como uma resina amarela, identificado como um alcalóide guanidínico, após análise dos espectros uni e bidimensionais.

Fluxograma 4.6 – Rota esquemática do isolamento do constituinte químico MAM-5 a partir da fração metanólica (MAM) de *M. arbuscula*.



Capítulo 5

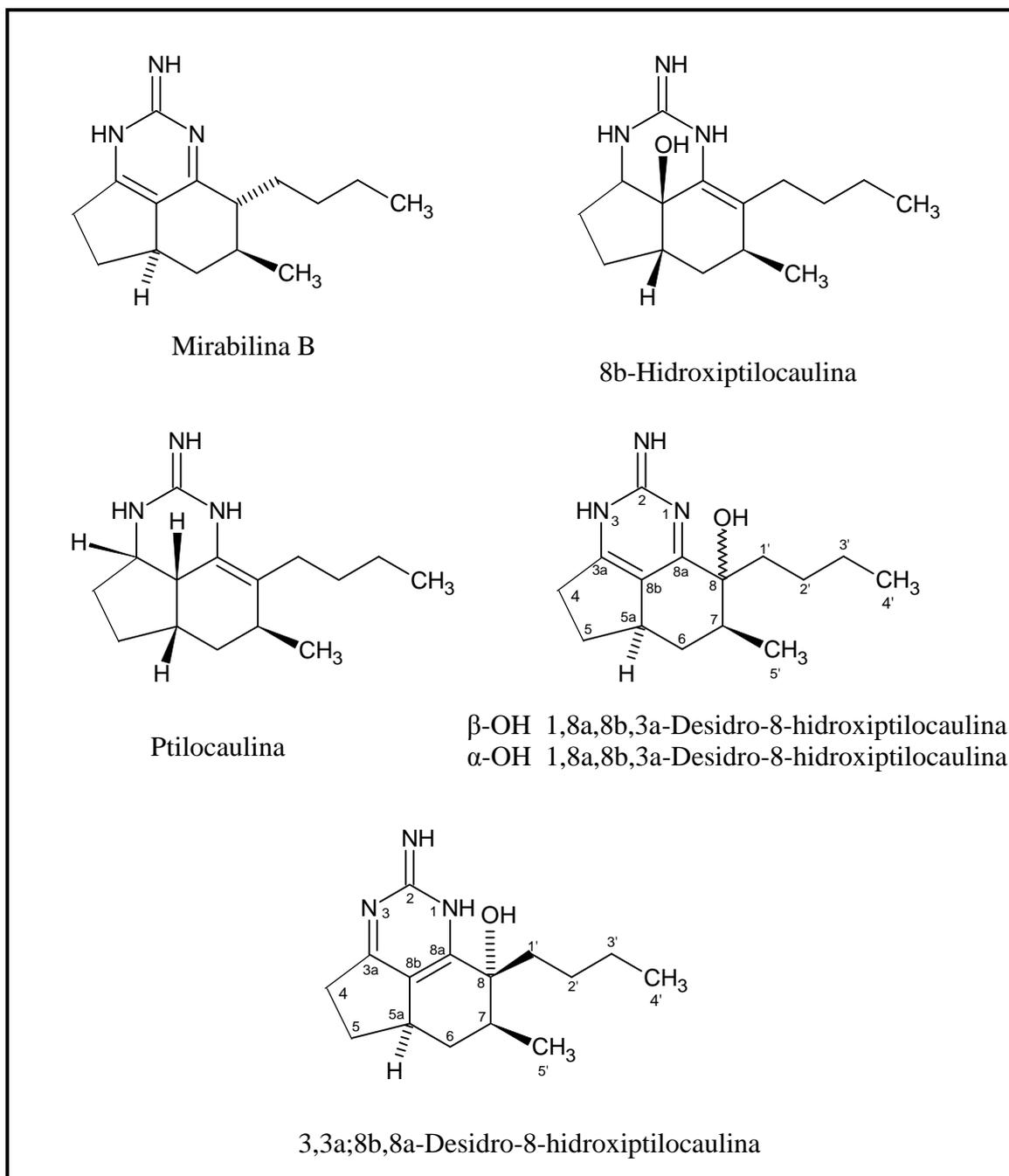
CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi apresentado o resultado da prospecção química do extrato hidroalcoólico de espécimes da esponja *Monanchora arbuscula*, coletados no Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio, situado no litoral cearense. Como conseqüências deste estudo, foram isolados seis alcalóides guanidínicos tricíclicos (Quadro 5.1, pág. 127): mirabilina B, 8b-hidroxiptilocalina, ptilocalina, 1,8a;8b,3a-desidro-8 β -hidroxiptilocalina, 1,8a;8b,3a-desidro-8 α -hidroxiptilocalina, estes isolados na forma de mistura, em uma proporção de aproximadamente (55,7% / 44,3%), e 3,3a;8b,8a-desidro-8-hidroxiptilocalina. Entre os alcalóides isolados apenas 8b-hidroxiptilocalina e ptilocalina haviam sido previamente isolados de *M. arbuscula* e 3a;8b,8a-desidro-8-hidroxiptilocalina está sendo registrado pela primeira vez na literatura.

Concomitante ao estudo químico foi avaliado o potencial anticâncer do extrato bruto, frações e metabólitos especiais isolados, frente a um painel constituído de quatro linhagens de células tumorais humanas: cólon (HCT 8), melanoma (MDA-M-435), leucemia (HL 60) e glioblastoma (SF 295). A 8b-hidroxiptilocalina e ptilocalina foram especialmente ativos contra as células tumorais, melanoma (IC₅₀ 3,5 μ g/ml; 1,8 μ g/ml) e leucemia (IC₅₀ 1,8 μ g/ml; 1,1 μ g/ml), respectivamente. Quanto à atividade leishmanicida, apenas mirabilina foi ativo, e antifúngica, 8b-hidroxiptilocalina e ptilocalina.

Os resultados alcançados neste trabalho, o primeiro em Química de Produtos Naturais Marinhos no curso de Pós-Graduação em Química Orgânica da UFC, foram bastante satisfatórios e estimulantes, e desafiam a continuidade de pesquisas nesta área.



Quadro 5.1 - Estruturas dos constituintes químicos isolados de *Monanchora arbuscula*.

Capítulo 6

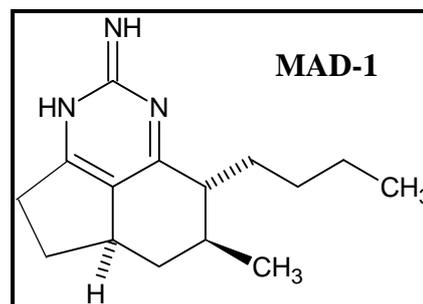
*CONSTANTES FÍSICAS E
DADOS
ESPECTROMÉTRICOS*

6. CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROMÉTRICOS

Fórmula Molecular: C₁₅H₂₃N₃

Peso Molecular: 245 daltons

Aspecto: resina amarela clara



Rotação Óptica Específica: $[\alpha]_D^{20} = +60$ ($c = 0,085$; MeOH)

Espectrometria de Infravermelho (IV) (NaCl, cm⁻¹): 3.313; 3.185; 2.955; 2.914; 2.867; 1.588; 1.455; 1.386; 762

Espectrometria de Massa (IE, 70 eV): 245; 230; 216; 202; 189; 174; 160; 146; 132; 117; 107; 91; 77; 65; 43; 41

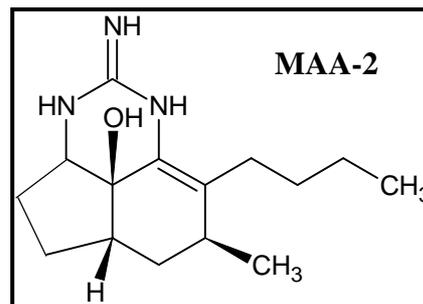
Espectrometria de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ (integração, multiplicidade, constante de acoplamento) : δ 2,90 (1H, m); δ 2,88 (1H, m); δ 2,58 (1H, dd, $J = 8,4$ e $16,7$ Hz); δ 2,34 (1H, m); δ 2,20 (1H, m); δ 2,02 (1H, m); δ 2,00 (1H, m); δ 1,85 (1H, m); δ 1,75 (1H, m); δ 1,51 (1H, m); δ 1,30 (1H, m); δ 1,27 (2H, m); δ 1,10 (1H, m); δ 1,08 (3H, d, $J = 6,6$ Hz); δ 0,91 (1H, m) e δ 0,86 (3H, t, $J = 7,2$ Hz)

Espectrometria de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ (padrão de hidrogenação): 174,9 (C); 166,1 (C); 163,2 (C); 126,2 (C); 47,1 (CH); 39,9 (CH₂); 37,9 (CH); 34,3 (CH); 33,8 (CH₂); 33,2 (CH₂); 30,5 (CH₂); 27,9 (CH₂); 23,4 (CH₂); 21,1 (CH₃); 14,2 (CH₃)

Fórmula Molecular: C₁₅H₂₅N₃O

Peso Molecular: 263 daltons

Aspecto: resina amarelada



Rotação Óptica Específica: $[\alpha]_D^{20} = +69,3$ ($c = 0,865$; MeOH)

Espectrometria de Infravermelho (IV) (NaCl, cm⁻¹): 3.289; 3.222; 2.957; 2.867; 1.676; 1.603; 1.458; 1.400; 1.372; 1.341; 1.115; 755

Espectrometria de Massa (IE, 70 eV): 263; 248; 232; 220; 204; 190; 178; 163; 148; 136; 121; 110; 93; 79; 67; 44; 36; 35

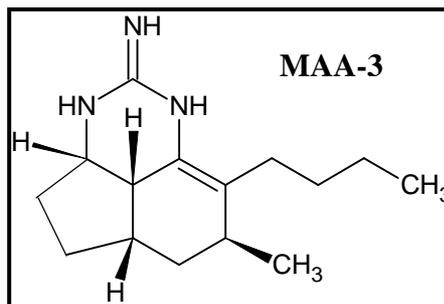
Espectrometria de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ (integração, multiplicidade, constante de acoplamento) : δ 3,66 (1H, m); δ 2,43 (1H, m); δ 2,28 (1H, m); δ 2,16 (1H, m); δ 2,07 (2H, m); δ 1,90 (2H, m); δ 1,83 (1H, m); δ 1,54 (1H, m); δ 1,50 (1H, m); δ 1,35 (2H, m); δ 1,29 (2H, m); δ 1,18 (3H, d, $J = 7,35$ Hz); δ 0,88 (3H, t, $J = 7,05$ Hz)

Espectrometria de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ (padrão de hidrogenação): 151,9 (C); 129,0 (C); 122,9 (C); 69,8 (C); 59,0 (CH); 40,3 (CH); 30,8 (CH); 30,3 (CH₂); 29,8 (CH₂); 29,1 (CH₂); 28,7 (CH₂); 23,5 (CH₂); 23,1 (CH₂); 21,8 (CH₃); 14,1 (CH₃)

Fórmula Molecular: C₁₅H₂₅N₃

Peso Molecular: 247 daltons

Aspecto: resina amarelada



Rotação Óptica Específica: $[\alpha]_D^{20} = +177$ ($c = 0,055$; MeOH)

Espectrometria de Infravermelho (IV) (NaCl, cm⁻¹): 3.203; 2.955; 2.867; 1.686; 1.672; 1.598; 1.400; 1.111; 617

Espectrometria de Massa (IE, 70 eV): 263; 247; 232; 218; 204; 190; 176; 162; 148; 136; 136; 122; 106; 91; 79; 67; 43; 36

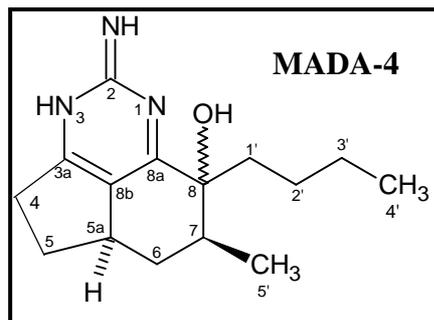
Espectrometria de RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃): δ (integração, multiplicidade, constante de acoplamento) : δ 3,70 (1H, m); δ 2,52 (1H, m); δ 2,44 (1H, m); δ 2,29 (1H, m); δ 2,27 (1H, m); δ 1,95 (1H, m); δ 1,92 (1H, m); δ 1,69 (1H, m); δ 1,57 (1H, m); δ 1,47 (1H, m); δ 1,37 (2H, m); δ 1,34 (2H, m); δ 1,31 (1H, m); δ 1,13 (3H, d, $J = 7,15$ Hz); δ 0,88 (3H, t, $J = 6,05$ Hz)

Espectrometria de RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃): δ (padrão de hidrogenação): 152,5 (C); 126,7 (C); 121,3 (C); 53,7 (CH); 35,8 (CH); 34,5 (CH₂); 34,3 (CH); 32,1 (CH₂); 30,9 (CH₂); 30,4 (CH); 27,8 (CH₂); 27,5 (CH₂); 22,9 (CH₂); 20,8 (CH₃); 14,3 (CH₃)

Fórmula Molecular: C₁₅H₂₃N₃O

Peso Molecular: 261 daltons

Aspecto: sólido amorfo amarelado



Rotação Óptica Específica: $[\alpha]_D^{20} = +25$ ($c = 0,125$; MeOH)

Espectrometria de Infravermelho (IV) (NaCl, cm⁻¹): 3.330; 3.196; 2.953; 2.928; 2.859; 1.692; 1.606; 1.587; 1.460; 1.380; 1.330; 1.178; 1.143; 1.104; 1.045; 753; 527

Espectrometria de Massa (IE, 70 eV): 261; 244; 228; 219; 205; 190; 176; 163; 149; 134; 119; 107; 92; 80; 62; 41

Espectrometria de RMN ¹H (500 MHz, C₅D₅N): δ (integração, multiplicidade, constante de acoplamento)(1) : δ 2,83 (1H, m); 2,51 (1H, m); δ 2,12 (1H, m); δ 2,04 (1H, td, $J = 12,9$ e $3,7$ Hz); δ 1,83 (1H, m); δ 1,73 (1H, m); δ 1,51 (1H, m); δ 1,40 (1H, m); δ 1,32 (2H, m); δ 1,32 (3H, d, $J = 7,0$ Hz); δ 1,20 (1H, m); δ 0,83 (3H, t, $J = 7,0$ Hz)

Espectrometria de RMN ¹³C (125 MHz, C₅D₅N): δ (padrão de hidrogenação)(1): 176,4 (C); 165,9 (C); 165,7 (C); 125,0 (C); 74,0 (C); 39,0 (CH); 37,9 (CH); 36,9 (CH₂); 35,8 (CH₂); 34,4 (CH₂); 33,8 (CH₂); 28,0 (CH₂); 24,1 (CH₂); 16,0 (CH₃); 14,6 (CH₃)

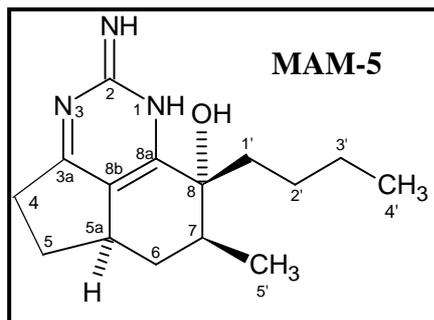
Espectrometria de RMN ¹H (500 MHz, C₅D₅N): δ (integração, multiplicidade, constante de acoplamento)(2) : δ 2,85 (1H, m); δ 2,82 (1H, m); δ 2,62 (1H, m); δ 2,45 (1H, m); δ 2,36 (1H, m); δ 2,12 (1H, m); δ 2,04 (1H, m); δ 1,83 (1H, m); δ 1,51 (1H, m); δ 1,40 (1H, m); δ 1,32 (3H, d, $J = 7,0$ Hz); δ 1,20 (1H, m); δ 0,77 (3H, t, $J = 7,2$ Hz)

Espectrometria de RMN ¹³C (125 MHz, C₅D₅N): δ (padrão de hidrogenação)(2): 175,8 (C); 165,9 (C); 165,7 (C); 125,2 (C); 75,7 (C); 43,7 (CH); 39,2 (CH); 38,0 (CH₂); 37,8 (CH₂); 34,7 (CH₂); 34,1 (CH₂); 27,9 (CH₂); 24,4 (CH₂); 16,6 (CH₃); 14,4 (CH₃)

Fórmula Molecular: C₁₅H₂₃N₃O

Peso Molecular: 261 daltons

Aspecto: resina amarelada



Rotação Óptica Específica: $[\alpha]_D^{20} = +23$ ($c = 0,130$; MeOH).

Espectrometria de Massa (IE, 70 eV): 261; 244; 228; 219; 205; 190; 176; 163; 149; 135; 118; 107; 69; 47; 35

Espectrometria de RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD): δ (integração, multiplicidade, constante de acoplamento): δ 3,00 (1H, m); δ 3,12 (1H, m); δ 2,51 (1H, m); δ 2,78 (1H, m); δ 2,51 (1H, m); δ 2,09 (1H, m); δ 2,01 (2H, m); δ 1,90 (1H, m); δ 1,67 (1H, m); δ 1,34 (2H, m); δ 1,22 (1H, m); δ 1,16 (1H, m); δ 1,06 (3H, d, $J = 7,0$ Hz); δ 0,90 (3H, t, $J = 7,4$ Hz); δ 0,89 (1H, m)

Espectrometria de RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD): δ (padrão de hidrogenação: 185,7 (C); 127,9 (C); 74,0 (C); 38,6 (CH); 38,4 (CH); 37,1 (CH₂); 35,6 (CH₂); 35,2 (CH₂); 33,7 (CH₂); 28,0 (CH₂); 24,2 (CH₂); 15,0 (CH₃); 14,3 (CH₃)

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. M. P.; BERLINCK, R. G. S.; HAJDU, E.; Alcalóides alquilpiridínicos de esponjas marinhas, **Química Nova**, v. 20, n. 2, p. 170, 1997.

ASSMANN, M.; VAN SOEST, R. W. M.; KOCK, M.; New Antifeedant Bromopyrrole Alkaloid from the Caribbean Sponge *Stylissa caribica*, **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1345-1347, 2001.

ASSMANN, M.; ZEA, S.; KOCK, M.; Sventrin, a New Bromopyrrole Alkaloid from the Caribbean Sponge *Agelas sventres*, **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1593-1595, 2001.

BARROW, R. A.; MURRAY, L. M.; LIM, T. K.; CAPON, R. J.; Mirabilins (A-F): new alkaloids from a Southern Australian marine sponge, *Arenoichalina mirabilis*, **Australian Journal of Chemistry**, v. 49, p. 767-773, 1996

BECERRO, M. K.; TURON, X.; URIZ, M. J.; Multiple functions for secondary metabolites in incrusting marine invertebrates. **Journal Chemistry Ecology**, v. 23, n. 6, p. 1527, 1997.

BENSEMHOUN, L.; BOMBARDA, I.; AKNIN, M.; VACELET, J.; GAYDOU, E. M.; Ptilomycalin D, a Polycyclic guanidine Alkaloid from the Marine Sponge *Monanchora dianchora*, **Journal of Natural Products**, v.70, p. 2033-2035, 2007

BERLINCK, R. G. S.; HAJDU, E.; DA ROCHA, R. M.; DE OLIVEIRA, J. H. H. L.; HERNANDEZ, I.L.C.; SELEGHIM, M H. R.; GRANATO, A. C.; DE ALMEIDA, E. V. R.; NUNEZ, C. V.; 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, p. 510, 2004.

BERLINCK, R. G. S.; Natural guanidine derivatives, **Natural Product Reports.**, v. 16, p. 339-365, 1999.

BERLINCK, R. G. S.; BRAEKMAN, J. C.; DALOZE, D.; BRUNO, I.; RICCIO, R.; FERRI, S.; SPAMPINATO, S.; SPERONI, E.; Polycyclic guanidine alkaloids from the marine sponge *Cranbe crambe* and calcium channel blocker activity of crambescidin 816, **Journal of Natural Products**, v. 56, p. 1007-1015, 1993.

Referências Bibliográficas

- BERLINCK, R. G. S.; BRAEKMAN, J. C.; DALOZE, D.; BRUNO, I.; RICCIO, R.; ROGEAU, D.; AMADE, P.; Crambines C1 and C2: two further ichthyotoxic guanidine alkaloids from the sponge *Crambe crambe*, **Journal of Natural Products**, v. 55, p. 528-532, 1992.
- BERLINCK, R. G. S.; BRAEKMAN, J. C.; DALOZE, D.; HALLENGA, K.; OTTINGER, R.; BRUNO, I.; RICCIO, R.; Two new guanidine alkaloids from the Mediterranean sponge *Crambe crambe*, **Tetrahedron Letters**, v. 31, p. 6531-6541, 1990.
- BEZERRA, L. E. A.; COELHO, P. A.; Crustáceos decápodos associados a esponjas no litoral do estado do Ceará, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, n. 3, 2006.
- BRAEKMAN, J. C.; DALOZE, D.; TAVARES, R.; HAJDU, E.; VAN SOEST, W. M.; Novel polycyclic Guanidine from two Marine Sponges of the Genus *Monanchora*, **Journal of Natural Products**, v. 63, p.193-196, 2000.
- CASAPULLO, A.; FINAMORE, E.; MINALE, L.; ZOLLO, F.; A dimeric peptide alkaloid of a completely new type, anchinopeptolide A, from the marine sponge *Anchinoe tenacior*. **Tetrahedron Letters**, v. 34, p. 6297-6300, 1993.
- CHANG, L.; WHITTAKER, N. F.; BEWLEY, C. A.; Crambescidin 826 and Dehydrocrambine A: new Polycyclic Guanidine Alkaloids from the Marine Sponge *Monanchora* sp. That Inhibit HIV-1 Fusion, **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1490-1494, 2003.
- CAPON, R. J.; MILLER, M.; ROONEY, F.; Mirabilin G: A New Alkaloid from a Southern Australian Marine Sponge, *Clathria Species*, **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 643-644, 2004.
- DE NANTEUIL, G.; AHOND, A.; GUILHEM, J.; POUPAT, C.; TRAN HUU DAU, E.; POTIER, P.; PUSSET, M.; PUSSET, J.; LABOUE, P.; Marine invertebrates from the New Caledonian lagoon. V. Isolation and identification of metabolites of a new species of sponge, *Pseudaxinyssa cantharella*, **Tetrahedron**, v. 41, p. 6019-6033, 1985.
- DRESCH, R. R.; HAESER, A. S.; MOTHE, B.; VOZARI-HAMPE, M. M.; HENRIQUES, A. T.; Detecção de atividade lectínia e atividade hemolítica em extratos de esponjas (Poríferos) nativas da costa atlântica do Brasil, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 16, 2005.
- DUMDEI, E. J.; BLUNT, J. W.; MUNRO, M. H. G.; BATTERSHILL, C. N.; PAGE, M. J., The whys and whats of sponge chemistry: Why chemists extract sponges and what problems does it cause? *In: Sponge Sciences*. Springer Verlag, p. 353, 1997.

Referências Bibliográficas

ESTEVES, E. L.; SANTOS, V. P.; MACHADO, L. F. dos S.; HAJDU, E.; In: Redescricao de *Monanchora arbuscula* (Duchassaing & Michelotti, 1864) na costa brasileira, **XII CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS DO MAR**, Florianópolis, 2007.

FRESNEDA, P. M.; DELGADO, S.; FRANCESCH, A.; MANZANARES, I.; CUEVAS, C.; MOLINA, P.; Synthesis and Cytotoxic Evaluation of New Derivatives of the Marine Alkaloid Variolin B, **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 1217-1221, 2006.

GALLIMORE, W. A.; KELLY, M.; SCHEUER, P. J.; Alkaloids from the sponge *Monanchora unguifera*, **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 9, p. 1420, 2005.

GAUTSCHI, J. T.; WHITMAN, S.; HOLMAN, T. R.; CREWS, P.; An Analysis of Phakellin and oroidin Structures stimulated by further study of an *Agelas* Sponge, **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1265-1261, 2004.

HARBOUR, G. C.; TYMIAK, A. A.; RINEHART, K. L.; SHAW, P. D.; HUGHES, R. G.; MIZSAK, S. A.; COASTS, J. H.; ZURENKO, G. E.; LI, L. H.; KUENTZEL, S. L.; Ptilocaulin and isoptilocaulin, antimicrobial and cytotoxic cyclic guanidines from the Caribbean sponge *Ptilocaulis* aff. *P.spiculifer* (Lamarck, 1814), **Journal of the American Chemical Society**, v.103, p. 5604-5606, 1981.

HONMA, K.; TSUDA, M.; MIKAMI, Y.; KOBAYASHI, J.; Aplysillamides A and B, New Antimicrobial Guanidine Alkaloids from the Okinawan Marine Sponge *Psammophysilla pura*, **Tetrahedron**, v.51, p. 3745-3748, 1995.

HUA, H.; PENG, J.; FRONCZEK, F. R.; KELLY, M.; HAMANN, M. T.; Crystallographic and NMR studies of antiinfective tricyclic guanidine alkaloids from the sponge *Monanchora unguifera*, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 6461, 2004.

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

JARES-ERIJMAN, E. A.; SAKAI, R.; RINEHART, K. L.; Crambescidins : new antiviral and cytotoxic compounds from the sponge *Crambe crambe*, **Journal of Organic Chemistry**, v.56, p.5712-5715, 1991.

JIMENEZ, P. C.; **Bioprospeção de substâncias com potencial antitumoral em ascídias do litoral cearense: estudos com *Eudistoma vannamei* Millar, 1977 (Uruchodata,**

Ascidiacea). 2004. 93 f.. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2004.

KASHMAN, Y.; HIRSH, S.; MCCONNELL, O. J.; OHTANI, I.; KUSUMI, T.; KAKISAWA, H.; Ptilomycalin A: a novel polycyclic guanidine alkaloid of marine origin, **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, p. 8925-8926, 1989.

KATO, T.; SHIZURI, Y.; IZUMIDA, H.; YOKOYAMA, A.; ENDO, M.; Styloguanidines, New Chitinase Inhibitors from the Marine Sponge *Stylotella aurantium*, Konbu'acidin A, a New Bromopyrrole Alkaloid with cdk4 Inhibitory Activity from *Hymeniacidon* Sponge **Tetrahedron Letters**, v. 36, p. 2133-2136, 1995.

KINNEL, R. B.; GEHRKEN, H. H.; SWALI, R.; SKOROPOWSKI, G.; SCHEUER, P. J.; Palau'amine and Its Congeners: A Family of Bioactive Bisguanidines from the Marine Sponge *Stylotella aurantium*, **Journal of Organic Chemistry**, v. 63, p. 3281-3286, 1998.

KOURANY-LEFOLL, E.; LAPREVOTE, O.; SEVENET, T.; MONTAGNAC, A.; PAIS, M.; DEBITUS, C.; Phloeodictines A1-A7 and C1-C2, antibiotic and cytotoxic guanidine alkaloids from the New Caledonian sponge, *Phloeodictyon sp.*, **Tetrahedron**, v. 50, p. 3415-3426, 1994.

KOBAYASHI, J.; SUZUKI, M.; TSUDA, M.; Konbu'acidin A, a New Bromopyrrole Alkaloid with cdk4 Inhibitory Activity from *Hymeniacidon* Sponge, **Tetrahedron**, v. 53, p. 15681-15684, 1997.

KOSSUGA, M. H.; DE LIRA, S. P.; NASCIMENTO, A. M.; GAMBARDELLA, M. T. P. & BERLINCK, R.G. S.; TORRES, Y. R.; NASCIMENTO, G. G. F.; PIMENTA, E. F.; SILVA, M.; THIEMANN, O. H. & OLIVA, G.; TEMPONE, A. G. & MELHEM, M. S. C.; SOUZA, A. O. DE.; GALETI, F. C. S. & SILVA, C. L.; CAVALCANTI, B.; PESSOA, C. O. & MORAIS, M. O.; HADJU, E; PEIXINHO, S.; ROCHA, R. M.; Isolamento e atividades biológicas de produtos naturais das esponjas *Monanchora arbuscula*, *Aplysina sp.*, *Petromica ciocalyptoides* e *Topsentia ophiraphidites*, da ascídia *Didemnum ligulum* e do octocoral *Carijoa Riisei*, **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1194, 2007.

LONGLEY, R.; CADDIGAN, D.; HARMODY, D.; GUNASEKERA, M. & GUNASEKERA, S., Discodemolide: a new marine-derived immunosuppressive compound, **Transplantation**, v. 52, p. 650, 1991.

LININGTON, R. G.; WILLIAMS, D. E.; AKBAR TAHIR, ROB VAN SOEST, ANDERSEN, R. J.; Latonduines A and B, New Alkaloids Isolated from the Marine Sponge *Stylissa carteri*: Structure Elucidation, Synthesis, and Biogenetic Implications, **Organic Letters**, v. 05, p. 2735-2738, 2003.

Referências Bibliográficas

MERAGELMAN, K. M.; MCKEE, T. C.; MCMAHON, J. B.; Monanchorin, a Bicyclic Alkaloid from the Sponge *Monanchora unguiculata*, **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1165-1167, 2004.

MORALES, J. J.; RODRIGUEZ, A. D.; Th estructure of clathrodin, a novel alcaloide isolated from the Caribbean sea sponge *Agelas clathrodes*, **Journal of Natural Products**, v. 54, p. 629-631, 1991.

MUNRO, M.H.G.; BLUNT, J.W.; LAKE, R.J.; LITAUDON, M.; BATTERSHILL, C.N.; PAGE, M.J.; From seabed to sickbed: what are the prospects? *In: Sponges in Time and Space*. A. A Balkema, p. 473, 1994.

MUNRO, M. H.G.; BLUNT, J. H.; DUMDEI, E. J.; HICKFORD, S. J. H.; LILL, R. E.; LI, S.; BATTERSHILL, C. N. & DUCKWORTH, A. R.; The discovery and evelopment of marine compounds with pharmaceutical potential. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 15, 1999.

OHTANI, I.; KUSUMI, T.; KAKISAWA, H.; KASHMAN, Y.; HIRSH, S.; MCCONNELL, O. J.; **Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu** v. 34, p.356-363, 1989.

PALAGIANO, E.; MARINO, S.; MINALE, L.; RICCIO, R.; ZOLLO, F.; Ptilomycalin A, Crambescidin 800 and Related New Highly Cytotoxic Guanidine Alkaloids from the Starfishes *Fromia monilis* and *Celerina heffernani*, **Journal of Natural Products**, v. 51, p. 3675-3682, 1995.

PATIL, A. D.; FREYER, A. J. OFFEN, P.; BEAN, M. F.; JOHNSON, R. K.; Three New Tricyclic Guanidine Alkaloids from the Sponge *Batzella* sp, **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 704, 1997.

PEARCE, N.; CHIA, E. W.; BERRIDGE, M. V.; MAAS, E. W.; PAGE, M. J.; HARPER, J. L.; WEBB, V. L.; COPP, B. R.; Orthidines A - E, tubastrine, 3,4-dimethoxyphenethyl- β -guanidine and 1,14-sperminedihomovanillamide: potential anti-inflammatory alkaloids isolated from the New Zealandascidian *Aplidium orthium* that act as inhibitors of neutrophil respiratory burst, **Tetrahedron**, v. 64 p. 5748-5755, 2008.

PEARCE, A.N.; APPLETON, D. R.; BABCOCK, R. C.; COPP, B.R.; Distomadines A and B, novel 6-hydroxyquinoline alkaloids from the New Zealand ascidian, *Pseudodistoma aureum*, **Tetrahedron Letters**, v. 44, p. 3897-3899, 2003.

PHILIPS, C. J. R.; MARCEL, J.; **Organic Structure Analysis**. University of California, Santa Cruz, 1998.

Referências Bibliográficas

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S. & BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A.; Produtos naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**, v. 25 (supl.), p. 45, 2002.

Porífera Brasil, <http://acd.ufrj.br/labpor/>, acessado em 11/09/2007

PRETSCH, E.; BÜHLMANN, P.; AFFOLTER, C.; **Structure Determination of Organic**, Springer, Alemanha, 2000.

RAVINDER, K.; REDDY, A. V.; KRISHNAIAH, P.; RAMESH, P.; S. RAMAKRISHNA, S.; LAATSCH, H.; VENKATESWARLU, Y.; Isolation and synthesis of a novel b-carboline guanidine derivative tiruchanduramine from the Indian ascidian *Synoicum macroglossum*, **Tetrahedron Letters**, v. 46, p. 5475-5478, 2005.

RUPPERT, E. E. & BARNES, R. B.; **Zoologia dos Invertebrados**. Ed. Rocca Ltda. 6^a edição. São Paulo, 1996.

SHARMA, G.; MAGDOFF-FAIRCHILD, B.; Natural products of marine sponges. 7. The constitution of weakly basic guanidine compounds, dibromophakellin and monobromophakellin, **Journal of Organic Chemistry**, v. 42, p. 4118-4124, 1977.

SOREK, H.; RUDI, A.; GUETA, S.; REYES, F.; MARTIN, M. J.; AKNIN, M.; GAYDOU, E.; VACELET, J.; KASHMAN, Y.; Netamines A-G: seven new tricyclic guanidine alkaloids from the marine sponge *Biemna laboutei*, **Tetrahedron**, v. 62, p. 8838-8843, 2006.

SUNA, H.; AOKI, S.; SETIAWAN, A.; KOBAYASHI, M.; Crambescidin 800, a pentacyclic guanidine alkaloid, protects a mouse hippocampal cell line against glutamate-induced oxidative stress, **Journal of Natural Medicines**, v. 61, p. 288-295, 2007.

SUPRIYONO, A.; SCHWARZ, B.; WRAY, V.; MUELLER, W. E. G.; VAN SOEST, R.; SUMARYONO, W.; PROKSCH, P.; Bioactive Alkaloids From The Tropical Marine Sponge *Axinella carteri*, **Biosciences**, v. 50, p. 669-674, 1995.

TAVARES, R.; DALOZE, D.; BRAEKMAN, J.C.; HAJDU, E.; VAN SOEST, R. W. M.; 8b-hydroxyptilocaulin, a new guanidine alkaloid from the sponge *Monanchora arbuscula* **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 7, p. 1139, 1995.

TAVARES, R.; DALOZE, D.; BRAEKMAN, J.C.; HAJDU, E.; MURICY, G.; VAN SOEST, R. W. M.; Isolation of crambescidin 800 from *Monanchora arbuscula*, **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 22, p. 645-646, 1994.

Referências Bibliográficas

THACKER, R. W.; BECERRO, M. K.; LUMBANG, W. A.; PAUL, V. J.; Allelopathic interactions between sponges on a tropical reef. **Ecology**, v. 79, n. 5, p. 1740, 1998.

TSUKAMOTO, S.; YAMASHITA, T.; MATSUNAGA, S.; FUSETANI, N.; Bioactive marine metabolites. 89. Stelletazole A: antibacterial guanidinoimidazole alkaloid from a marine sponge *Stelletta sp.*, **Tetrahedron Letters**, v. 40, p. 737-738, 1999.

VAN SOEST, R. W. M.; BRAEKMAN, J.C.; FAULKNER, D. J.; HAJDU, E.; HARPER, M. K.; VACELET, J.; The genus *Batzella*: a chemosystematic problem, **Bulletin de l'Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique, Biologie**, v. 66, suppl., p. 89, 1996.

VAN SOEST, R. W. M.; Family Crambeidae Lévi, 1963, *In*: John N. A.; Hooper and Van Soest (Eds). **Systema Porifera. A guide to the classification of sponges**. Kluwer Academic/Plenum publishers: New York, 2002.

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

VENKATESWARLU, Y.; REDDY, M.; VENKATA, R.; RAMESH, P.; RAO, J. VENKATESWARA, Neofolitispatas, pentacyclic guanidine alkaloids from the sponge *Neofolitispa dianchora*, **Journal of Chemistry**, Section B: Organic Chemistry including medicinal Chemistry, v. 38, p. 254-256, 1999.

VERGNE, C.; BOURY-ESNAULT, N.; PEREZ, T.; MARTIN, M.; ADELIN, M.; DAU, E. T. H.; AL-MOURABIT, A.; Verpacamides A-D, a Sequence of C11N5 Diketopiperazines Relating Cyclo(Pro-Pro) to Cyclo(Pro-Arg), from the Marine Sponge *Axinella vacaleti*: Possible Biogenetic Precursors of Pyrrole-2-aminoimidazole Alkaloids, **Organic Letters**, v. 08, p. 2421-2424, 2006.

WILKE, D. V.; **Fracionamento bioguiado do extrato hidroalcólico da esponja marinha *Ircinia felix* (Porífera, Demospongiae) encontrada no Parque Estadual Marinho Pedra da Risca do Meio (Fortaleza – Ce)**. 2005. Monografia submetida à Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2005.

WILLIAMS, D. H.; AULKNER, D. J.; Isomers and tautomers of hymenialdisine and debromohymenialdisine, **Natural Product Letters**, v. 9, p. 57-64, 1996.

Referências Bibliográficas

XU, X.; YAO, G.; KONG, C.; LI, Y.; LIN, C.; WANG, XIN, SU, J.; ZENG, L.; Four compounds containing nitrogen from marine sponge *Phacellia fusca* Schmidt, **Youji Huaxue**, v. 23, p. 953-957, 2003.

YANG, S.; CHAN, T. POMPONI, S. A.; CHEN, G.; WRIGHT, A. E.; PATEL, M.; GULLO, V.; PRAMANIK, B.; CHU, M.; A new bicyclic guanidine alkaloid, Sch 575948, from a marine sponge, *Ptilocaulis spiculifer*, **Journal of Antibiotics**, v. 56, p. 970-972, 2003.