



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**BRUNO DE ARAÚJO GOMES**

**ANFIDINOLIDOS ISOLADOS DE *Stragulum bicolor* (van Ofwegen & Haddad) E  
SESQUITERPENOS DE *Ophionereis reticulata* (Say), DOIS INVERTEBRADOS  
MARINHOS ENDÊMICOS DO LITORAL BRASILEIRO.**

**FORTALEZA**

**2017**

BRUNO DE ARAÚJO GOMES

ANFIDINOLIDOS ISOLADOS DE *Stragulum bicolor* (van Oefwegen & Haddad) E  
SESQUITERPENOS DE *Ophionereis reticulata* (Say), DOIS INVERTEBRADOS  
MARINHOS ENDÊMICOS DO LITORAL BRASILEIRO.

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Orientadora: Prof. Dra. Otília Deusdênia Loiola Pessoa.

FORTALEZA  
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

G612a Gomes, Bruno de Araújo.

Anfidinólidos isolados de *Stragulum bicolor* (van Oefwegen & Haddad) e sesquiterpenos de *Ophionereis reticulata* (Say), dois invertebrados marinhos endêmicos do litoral brasileiro. / Bruno de Araújo Gomes. – 2017.

123 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2017.

Orientação: Profa. Dra. Otília Deusdênia Loiola Pessoa.

1. *Stragulum bicolor*. 2. anfidinólidos. 3. *Ophionereis reticulata*. 4. sesquiterpenos. 5. elatol. I. Título.  
CDD 540

---

BRUNO DE ARAÚJO GOMES

ANFIDINOLIDOS ISOLADOS DE *Stragulum bicolor* (van Oefwegen & Haddad) E  
SESQUITERPENOS DE *Ophioneis reticulata* (Say), DOIS INVERTEBRADOS  
MARINHOS ENDÊMICOS DO LITORAL BRASILEIRO.

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovada em 08 / 02 / 2017

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dra. Otília Deusdênia Loiola Pessoa (Orientadora - UFC)

---

Prof. Dr Daniel Esdras Uchoa (Membro - UFC)

---

Prof. Dra. Gilvandete Maria Pinheiro Santiago (Membro - UFC)

---

Prof. Dra Maria Rose Jane Ribeiro Albuquerque (Membro - UVA)

---

Prof. Dra. Jane Eire Silva Alencar de Menezes (Membro - UECE)

A Deus,  
À minha família.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me dar forças, paciência, sabedoria e, além disso, colocar pessoas maravilhosas no meu caminho, permitindo que esse trabalho pudesse ser possível.

Aos meus pais Inês de Araújo Cavalcante Gomes e Wallace Gomes da Silva que sempre me apoiaram e deram liberdade e autonomia para seguir em buscas de meus sonhos e objetivos.

Ao meu irmão Felipe de Araújo Gomes que nunca me abandonou e sempre foi um ídolo para mim.

À minha confidente e companheira Ana Lídia Martins Magalhães por sua cumplicidade e que por muitas vezes suportou-me sempre com muito amor e carinho.

À minha orientadora Profa. Dra. Otília Deusdênia Loiola Pessoa que me deu a oportunidade de avançar no universo da pesquisa acadêmica e sempre se colocou a disposição para ajudar no que fosse necessário e deu total apoio em todo o tempo.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Química pelas experiências de vida e conhecimentos a mim fornecidos.

Ao meu mestre e amigo Prof. Livre Docente Francisco Belmino Romero que com sua vida dedicada aos estudos me estimula e impulsiona a sempre buscar novos conhecimentos e desafios.

A todos meus amigos e colegas de curso e trabalho que estiveram comigo nos mais diversos momentos da caminhada acadêmica. Em especial a todos que ainda estão ou já passaram pelos três LAFIPLAM's, pois independente de qualquer coisa sempre fomos uma família.

Ao Doutor Angelo Fontana que abriu as portas do Istituto di Chimica Biomolecolare – ICB em Pozzuoli – Nápoles e me deu todo o apoio para que eu pudesse desenvolver os procedimentos experimentais necessários, bem como a todos os meus amigos italianos (Jenny, Adele, Angela, Elvira, Pierpaolo, Lucio, Laura, Carmen, Emiliano e Dario) que me receberam de braços abertos e fizeram de tudo para que eu nunca me sentisse sozinho e longe de casa.

A Universidade Federal do Ceará por ser um lugar tão aconchegante que sempre me fez sentir em casa.

As Agências de Fomento à Pesquisa CNPq, CAPES pelo apoio financeiro.

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo investigar os extratos orgânicos das espécies marinhas *Stragulum bicolor* (Octocorallia: Clavulariidae) e *Ophionereis reticulata* (Ofiura: Ophionereididae), dois invertebrados marinhos endêmicos do litoral brasileiro com grande incidência na costa cearense. O extrato metanólico de *S. bicolor* foi submetido à cromatografia gravitacional, utilizando gel de sílica como fase estacionária, e teve como resultado o isolamento de dois compostos pertencentes à classe dos anfidinólidos, o anfidinólido P (SB 2H) e seu análogo metilado, 3-*O*-metil anfidinólido P (SB 2F), o qual está sendo descrito pela primeira vez. Posteriormente, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foram isolados mais quatro anfidinólidos, um deles já conhecido na literatura, denominado de anfidinólido T (SB 5E). Os demais anfidinólidos foram relatados pela primeira vez, e foram designados como: anfidinólido B8 (SB 4E), anfidinólido B9 (SB 4D) e anfidinólido C4 (SB 4M). Já do extrato metanólico de *O. reticulata*, após cromatografia utilizando como fase estacionária gel de dextrana Sephadex LH-20, resultou no isolamento de três sesquiterpenos pertencentes à classe dos chamigrano, sendo eles o elatol (OREDM2F), isoobtusadieno (OREDM2D) e acetil-isoobtusadieno (OREDM2B). Alguns dos compostos isolados de *S. bicolor* foram testados contra a linhagem de célula cancerígena HCT-116 (câncer de cólon), apresentando atividade entre leve a moderada. Para a caracterização dos compostos isolados foram empregadas técnicas espectroscópicas como RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (1D e 2D), e espectrometria de massas.

**Palavras chaves:** *Stragulum bicolor*. Anfidinólidos. *Ophionereis reticulata*. Sesquiterpenos. Elatol.

## ABSTRACT

The goal of the present work was to investigate the organic extracts of the marine species *Stragulum bicolor* (Octocorallia: Clavulariidae) and *Ophionereis reticulata* (Ofiura: Ophionereididae), two endemic invertebrates of the Brazilian seas, widespread in the coast of Ceara State. The methanolic extract of *S. Bicolor* was subjected to successive chromatography columns on silica gel to yield two amphidinolides, the amphidinolide P (SB 2H) and its methy ester derivative, 3-*O*-methyl amphidinolide P (SB 2F), which is described for the first time. Posteriorly, using high performance liquid cromatography (HPLC), was isolated four amphidinolides, three of which are new, and the known amphidinolide T (SB 5E). The new compounds were designated as amphidinolides B8 (SB 4E), B9 (SB 4D) and C4 (SB 4M). From the methanolic extract of *O. Reticulata*, using chromatography on silica gel and Sephadex LH-20, were isolated three sesquiterpenes of skeleton chamigrane: elatol (OREDM2F), isoobtusadiene (OREDM2D) and acetyl-isoobtusadiene (OREDM2B). All compounds isolated from *S. bicolor* were assayed against the cancer cell line HCT-116 (colon) showing weak or moderate activities. The structures of all compounds were determinated by means of spectroscopic techniques ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR – 1D and 2D) and HRESIMS.

**Keywords:** *Stragulum bicolor*. Amphidinolides. *Ophionereis reticulata*. Sesquiterpenes. Elatol.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Extensão territorial do litoral brasileiro .....	18
Figura 2. Imagem do <i>Stragulum bicolor</i> . .....	18
Figura 3. Imagem de <i>Ophionereis reticulata</i> . .....	19
Figura 4. Fragmentos estruturais construídos a partir de acoplamentos observados nos espectros homonucleares $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ TOCSY e COSY do composto 1. ....	33
Figura 5. Principais correlações observadas nos espectros de RMN 2D $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY, TOCSY e $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC apresentadas pelo composto 1.....	34
Figura 6. Estrutura do composto SB 2H (1). .....	35
Figura 7. Espectro de massas de alta resolução (EMAR-ESI) de SB 2H (1). .....	36
Figura 8. Espectro de massa MS/MS do íon 397,22 correspondente ao íon molecular sodiado $[\text{M} + \text{Na}]^+ m/z$ 397,1982 do composto 1. ....	36
Figura 9. Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz) do composto SB 2H (1). .....	38
Figura 10. Espectro de RMN $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HSQC editado de SB 2H (1) ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz). .....	38
Figura 11. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) do composto SB 2H (1). .....	39
Figura 12. Espectro de correlação homonuclear $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ TOCSY do composto 1 ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz). .....	39
Figura 13. Espectro de correlação homonuclear $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ COSY do composto 1 ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz). .....	40
Figura 14. Correlações observadas no espectro $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ COSY ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz) do composto 1. ....	40
Figura 15. Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HMBC do composto 1 ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz). .....	41
Figura 16. Correlações observadas no espectro bidimensional $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HMBC ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz) de SB 2H (1). .....	41
Figura 17. Espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz) do composto 1 (superior) e do composto 2 (inferior). .....	43
Figura 18. Espectro bidimensional de correlação homonuclear $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ TOCSY do composto 2 ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz). .....	44
Figura 19. Espectro de massas de alta resolução (EMAR-ESI) de SB 2F (2). .....	44
Figura 20. Fragmentos estruturais dos principais acoplamentos observados nos espectros homonucleares $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ TOCSY e COSY do composto 3. ....	46
Figura 21. Correlações observadas em RMN 2D $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ COSY, TOCSY e $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HMBC apresentadas pelo composto 3. ....	49
Figura 22. Espectro de massa de alta resolução do composto 3. ....	50
Figura 23. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto 3 ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz). .....	50
Figura 24. Espectro de RMN $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ (HSQC) do composto 3 ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz). .....	51
Figura 25. Espectro de correlação homonuclear $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ COSY do composto 3 ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz). .....	52
Figura 26. Espectro de correlação homonuclear $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ TOCSY do composto 3 ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz). .....	53
Figura 27. Correlações observadas no espectro $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ TOCSY ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) do composto 3. ....	53

Figura 28. Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HMBC do composto 3 ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz). .....	54
Figura 29. Correlações observadas no espectro $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HMBC ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) do composto 3.....	54
Figura 30. Espectro de massa de alta resolução do composto 4.....	55
Figura 31. Correlações observadas em RMN 2D $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ COSY, TOCSY e $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HMBC apresentadas pelo composto 4.....	57
Figura 32. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto 4 ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz).....	57
Figura 33. Espectro de RMN $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ (HSQC) do composto 4 ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz).....	58
Figura 34. Espectro de correlação homonuclear $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ COSY do composto 4 ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz). .....	58
Figura 35. Correlação apresentada no $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ COSY ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) do composto 4 que o diferencia do composto 3. ....	59
Figura 36. Espectro de correlação homonuclear $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ TOCSY do composto 4 ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz). .....	59
Figura 37. Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HMBC do composto 4 ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz). .....	60
Figura 38. Correlação apresentada no $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HMBC ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) do composto 4 que o diferencia do composto 3. ....	60
Figura 39. Estruturas dos anfidinólido B8 (3) e anfidinólido B9 (4). ....	61
Figura 40. Fragmentos estruturais dos principais acoplamentos observados nos espectros homonucleares $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ TOCSY e COSY do composto 5. ....	63
Figura 41. Sistemas de <i>spins</i> e correlações para o composto 5.....	64
Figura 42. Estrutura do anfidinólido C2 segundo Kubota et al., 2004.....	65
Figura 43. Espectro de massa de alta resolução do composto 5.....	67
Figura 44. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto 5 ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz). ....	67
Figura 45. Espectro de RMN $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ (HSQC) do composto 5 ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz).....	68
Figura 46. Espectro de correlação homonuclear $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ COSY do composto 5 ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz). .....	69
Figura 47. Espectro de correlação homonuclear $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ TOCSY do composto 5 ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz). .....	70
Figura 48. Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HMBC do composto 5 ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz). .....	71
Figura 49. Estrutura do anfidinólido C4 (5). ....	72
Figura 50. Fragmentos estruturais dos principais acoplamentos observados nos espectros homonucleares $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ TOCSY e COSY do composto 6. ....	73
Figura 51. Espectro de massa de alta resolução do composto 6.....	75
Figura 52. Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto 6 ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz). ....	75
Figura 53. Espectro de RMN $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HSQC do composto 6 ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz). ....	76
Figura 54. Espectro de correlação homonuclear $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ COSY do composto 6 ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz). .....	77
Figura 55. Espectro de correlação homonuclear $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$ TOCSY do composto 6 ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz). .....	78
Figura 56. Espectro de correlação heteronuclear $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HMBC do composto 6 ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz). .....	79
Figura 57. Sistemas de <i>spins</i> e correlações para o composto 6.....	79

Figura 58. Estrutura do anfidinolido T, descrito por Tsuda <i>et al.</i> , 2000. ....	80
Figura 59. Sistema de <i>spins</i> observados nos espectros de COSY e TOCSY para o composto 7.81	
Figura 60. Correlações apresentadas pelo espectro de RMN <sup>13</sup> C HMBC do composto 7.....	82
Figura 61. Espectro de massas do composto 7.....	85
Figura 62. Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 600 MHz) do composto 7.....	85
Figura 63. Espectro de correlação heteronuclear <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C HSQC do composto 7.....	86
Figura 64. Espectro de correlação homonuclear <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H COSY do composto 7.....	87
Figura 65. Espectro de correlação homonuclear <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H TOCSY do composto 7. ....	88
Figura 66. Espectro de correlação heteronuclear <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C HMBC do composto 7.....	89
Figura 67. Estrutura da substância OREDM2F (7). ....	90
Figura 68. Sistema de <i>spins</i> observados nos espectros de COSY e TOCSY para OREDM2D (8). .....	91
Figura 69. Correlações apresentadas pelo espectro de RMN <sup>13</sup> C HMBC do composto 8.....	92
Figura 70. Espectro de massas do composto 8.....	94
Figura 71. Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 600 MHz) do composto 8.....	94
Figura 72. Espectro de correlação heteronuclear <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C HSQC do composto 8.....	95
Figura 73. Espectro de correlação homonuclear <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H COSY do composto 8.....	96
Figura 74. Correlação apresentada no espectro de COSY que justifica a inversão de valores entre o composto 8 e o isoobtusadieno segundo Gerwick <i>et al.</i> , 1987.....	97
Figura 75. Espectro de correlação homonuclear <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H TOCSY do composto 8. ....	97
Figura 76. Espectro de correlação heteronuclear <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C HMBC do composto 8.....	98
Figura 77. Estrutura da substância OREDM2D (8). ....	99
Figura 79. Espectro de massas do composto 9.....	101
Figura 78. Sistema de <i>spins</i> observados nos espectros de COSY e TOCSY para OREDM2B (9). .....	101
Figura 80. Comparação entre os espectros de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 600 MHz) para o composto 8 (superior) e composto 9 (inferior). ....	102
Figura 81. Espectro bidimensional de correlação heteronuclear <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C HSQC para o composto 9. .....	103
Figura 82. Espectro bidimensional de correlação homonuclear <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H COSY do composto 9. ....	104
Figura 83. Espectro bidimensional de correlação homonuclear <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H TOCSY do composto 9. .....	105
Figura 84. Espectro bidimensional de correlação heteronuclear <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C HMBC para o composto 9.....	106
Figura 85. Estrutura da substância OREDM2B (9).....	107
Figura 86. Cromatograma para isolamento de SB 4E (3), SB 4D (4) e SB 4M (5). ....	114
Figura 87. Cromatograma para isolamento de SB 5E (6). ....	114

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Levantamento bibliográfico sobre os relatos de anfidinólidos descritos na literatura. ....	20
Tabela 2. Deslocamentos químicos de RMN de $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ - HSQC para o composto 1 ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz) e anfidinólido P <sup>a</sup> ( $\text{C}_6\text{D}_6$ ).....	35
Tabela 3. Deslocamentos químicos de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ (HSQC) para os compostos 1 e 2 ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz), e anfidinólido P <sup>a</sup> ( $\text{C}_6\text{D}_6$ ). ....	42
Tabela 4. Deslocamentos químicos de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ (HSQC) para o composto 3 ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) e RMN $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) do seu análogo anfidinólido B <sup>a</sup> .....	48
Tabela 5. Deslocamentos químicos de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ (HSQC) para o composto 3 e composto 4 ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) e RMN $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) do seu análogo anfidinólido B <sup>a</sup> . ....	56
Tabela 6. Deslocamentos químicos de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ (HSQC) para o composto 5 ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz) e RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz) do seu análogo anfidinólido C2.....	66
Tabela 7. Deslocamentos químicos de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ (HSQC) para o composto 6 ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz) e RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de anfidinólido T <sup>a</sup> ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 500 MHz).....	74
Tabela 8. Dados de RMN $^1\text{H}$ e RMN $^{13}\text{C}$ do composto 7 e do elatol (LHULLIER <i>et al.</i> , 2009). ....	84
Tabela 9. Dados de RMN $^1\text{H}$ e RMN $^{13}\text{C}$ do composto 8 e do isoobtusadieno por Gerwick <i>et al.</i> , 1987.....	93
Tabela 10. Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para os compostos 8 e 9.....	100
Tabela 11. Atividade citotóxica dos compostos 1, 2, 3, 5 e 6. ....	108
Tabela 12. Solventes utilizados no processo de extração em fase sólida do extrato metanólico de <i>Stragulum bicolor</i> para isolamento de SB 2H (1) e SB 2F (2).....	111
Tabela 13. Solventes utilizados no processo de extração, em fase sólida, do extrato metanólico de <i>S. bicolor</i> para isolamento de SB 4E (3), SB 4D (4), SB 4M (5), SB 5E (6). ....	112

## LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1. Fracionamento de SB 1C. ....	111
Fluxograma 2. Métodos de isolamento das substâncias SB 4E (3), SB 4D (4), SB 4M (5) e SB 5E (6).....	113
Fluxograma 3. Métodos de isolamento das substâncias OREDM2F (7), OREDM2D (8) e OREDM2B (9). ....	115

## LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1. Distribuição de publicações científicas sobre a classe de anfidinólidos. ....	31
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

<b>2D</b>	Bidimensional
<b><i>J</i></b>	Constante de acoplamento
<b>CCD</b>	Cromatografia em Camada Delgada
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>COSY</b>	<i>Correlation Spectroscopy</i>
<b><math>\delta</math></b>	Deslocamento químico
<b>d</b>	Dupleto
<b>dt</b>	Dupleto de tripleto
<b>EM</b>	Espectrometria de Massa
<b>Hz</b>	Hertz
<b>HMBC</b>	<i>Heteronuclear Multi Bond Correlation</i>
<b>HSQC</b>	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
<b>HRESIMS</b>	High Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry
<b>IV</b>	Infravermelho
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>m</b>	Multiplete
<b>OReD</b>	<i>Ophionereis reticulata</i>
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<b>SB</b>	<i>Stragulum bicolor</i>
<b>s</b>	Simpleto
<b>TOCSY</b>	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
<b>t</b>	Tripleto

# SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	16
2.	LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO .....	20
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	32
3.1	Determinação estrutural .....	32
3.1.1	SB 2H e SB 2F .....	32
3.1.2	SB 4E e SB 4D .....	45
3.1.3	SB 4M .....	61
3.1.4	SB 5E .....	72
3.1.5	OREDM2F .....	80
3.1.6	OREDM2D .....	90
3.1.7	OREDM2B .....	99
3.2	Atividade Citotóxica .....	108
4.	METODOLOGIA EXPERIMENTAL .....	109
4.1	Material de estudo .....	109
4.2	Materiais e equipamentos utilizados .....	109
4.3	Procedimento experimental .....	110
4.3.1	Preparação dos extratos metanólicos de <i>S. bicolor</i> e <i>O. reticulata</i> .....	110
4.3.2	Isolamento de SB 2H (1) e SB 2F (2) .....	110
4.3.3	Isolamento de SB 4E (3), SB 4D (4), SB 4M (5) e SB 5E (6) .....	112
4.3.4	Isolamento dos compostos OREDM2F (7), OREDM2D (8) e OREDM2B (9) .....	115
4.3.5	Atividade citotóxica .....	116
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	117
	REFERÊNCIAS .....	118

## 1 INTRODUÇÃO

A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas já conhecidas, contribuindo de forma significativa para o fornecimento de metabólitos secundários, muitos destes de grande valor devido às suas inúmeras aplicações nos mais diversos setores industriais como medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos (PHILLIPSON; ANDERSON, 1989).

Os produtos naturais possuem uma rica história no desenvolvimento de medicamentos. Muitas drogas sintéticas usadas na prática clínica foram desenvolvidas, ao menos parcialmente, a partir de fontes naturais. Desde o início das primeiras civilizações, compostos farmacologicamente ativos têm auxiliado no tratamento de doenças humanas, cujas propriedades terapêuticas variam desde antibióticos (penicilina), analgésicos (aspirina, opioides), imunossupressivos (rapamicina), dentre outras aplicações (CHERBLANC *et al.*, 2013; NEWMAN; CRAGG; KINGSTON, 2008).

Os oceanos cobrem cerca de 70% da superfície terrestre e são habitados por cerca de 200.000 espécies de plantas e invertebrados marinhos, e milhões de microorganismos. Além das plantas marinhas, esponjas, octocorais, ascídeas e briozoários são organismos que se desenvolvem em condições adversas, em virtude disto, a evolução e sobrevivência dessas espécies resultam em organismos que produzem substâncias únicas com enorme diversidade nas suas funções ecológicas (PINTO *et al.*, 2002).

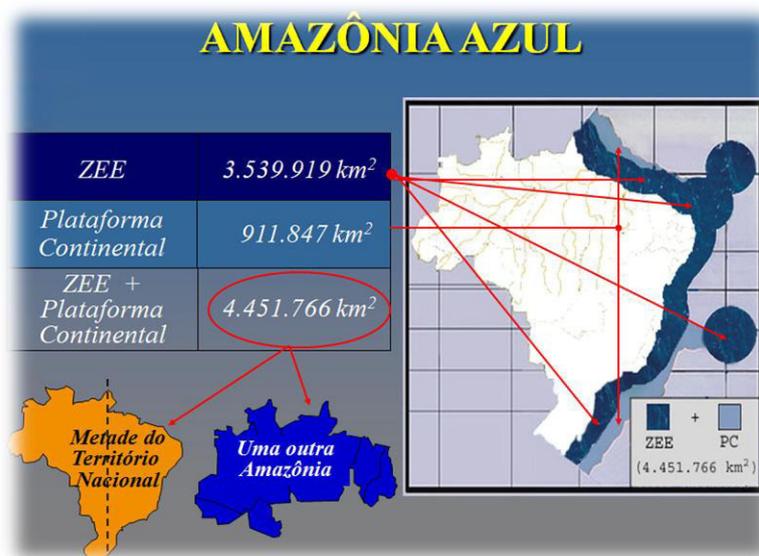
Os investimentos por parte das indústrias farmacêuticas em produtos naturais marinhos na busca por substâncias bioativas vêm crescendo desde a década de 1960. O desenvolvimento de equipamentos e metodologias para coletas no ambiente marinho são dois dos principais fatores que contribuem para o estudo de organismos marinhos. Arelado a isso, há também a perspectiva de descoberta de substâncias novas com características peculiares e com grande potencial farmacológico, graças ao ambiente completamente distinto das plantas, as quais têm sido estudadas desde longas datas e que podem ser utilizadas como um bom exemplo e incentivo aos estudos dos produtos naturais marinhos.

A descoberta de uma grande quantidade de prostaglandinas - substâncias com inúmeras funções no organismo, tais como: função reprodutora (contração uterina, transporte do sêmen, dentre outras), vasodilatadora, broncodilatadora e no sistema imunológico a partir do octocoral *Plexaura homomalla* (SILVA, 2005), fez com que houvesse um considerável aumento no interesse pelas pesquisas em produtos naturais marinhos. Com isto, pesquisadores de diversos centros de estudos de diversas partes do mundo passaram a ter um maior interesse pela prospecção dos organismos marinhos. Particularmente interessante e envolvente é o fato de que uma grande parcela das substâncias isoladas e identificadas de fontes marinhas apresentam estruturas singulares, altamente complexas e funcionalizadas, incomparáveis aos relatos de outras fontes de origem terrestre.

Vale ressaltar, a importância do estudo sobre as substâncias químicas produzidas pelos organismos marinhos que também tem sido usado como fonte de conhecimento para auxiliar na compreensão no que diz respeito à evolução das espécies marinhas, bem como na compreensão da conservação e preservação das comunidades marinhas (PINTO *et al.*, 2002).

A química de produtos naturais marinhos no Brasil, cujo litoral é de cerca de 7.500 km de extensão como mostrado na Figura 1, página 18 tem se desenvolvido somente nos últimos anos. Considerando sua extensão e que a fauna marinha do mesmo é praticamente inexplorada, e ainda, que os organismos marinhos são promissoras fontes de metabólitos secundários potencialmente importantes do ponto de vista farmacológico e biológico, a costa brasileira representa uma incontestável fonte de substâncias ativas, a serem exploradas.

**Figura 1.** Extensão territorial do litoral brasileiro.



Fonte: <http://www.naval.com.br/blog/2010/10/16/poder-naval-no-seminario-da-amazonia-azul-na-escola-naval/>

A espécie *Stragulum bicolor* (Figura 2) pertence ao Filo Cnidário, um grande, diverso e ecologicamente importante grupo de invertebrados marinhos, é um octocoral da família Clavulariidae, que vive em colônias sobre um substrato, e que, desde o ano de 2002, tem relatos de sua presença ao longo do litoral brasileiro.

De acordo com Altvater e Coutinho (2015) este octocoral apresenta crescimento rápido e com bastante frequência, cresce cobrindo outros invertebrados marinhos. É uma espécie que não é endêmica do Brasil, sendo possivelmente introduzida no país, através de sua incrustação em cascos de navios.

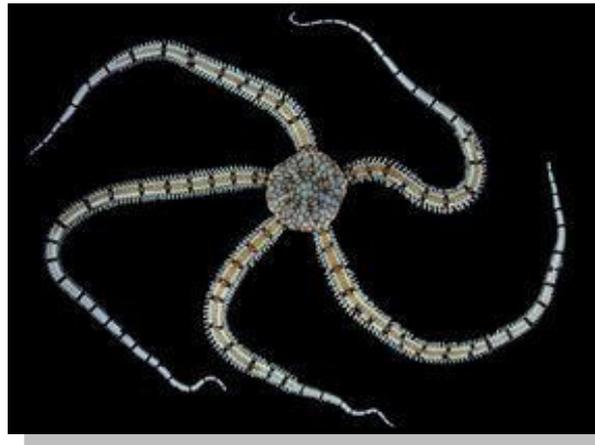
**Figura 2.** Imagem do *Stragulum bicolor*.



Fonte: Altvater e Coutinho (2015).

*Ophionereis reticulata* (Figura 3) é uma estrela do mar pertencente ao Filo Echinodermata, da família Ophionereididae. Possui um disco pentagonal e cinco braços alongados e estreitos. O disco pode crescer até um diâmetro de 15 mm e os braços com crescimento até 120 mm. É um herbívoro que se alimenta principalmente de algas verdes e vermelhas (YOKOYAMA; AMARAL, 2008).

**Figura 3.** Imagem de *Ophionereis reticulata*.



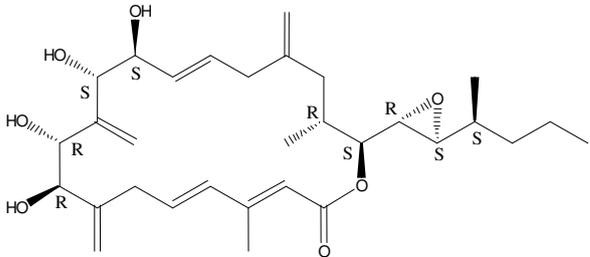
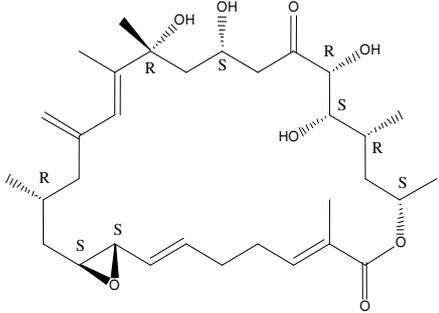
Fonte: <http://echinoderms.myspecies.info/taxonomy/term/54822>

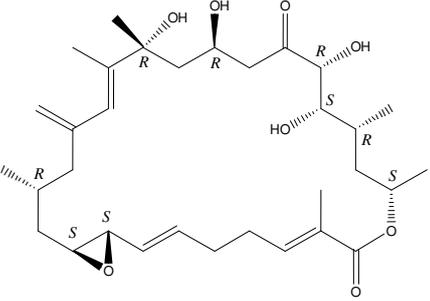
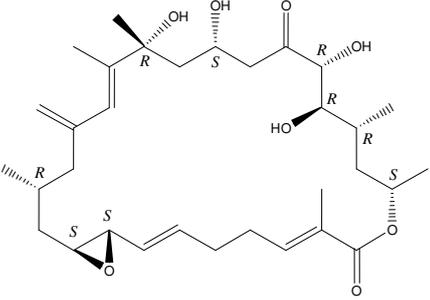
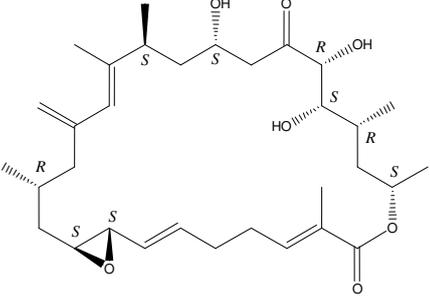
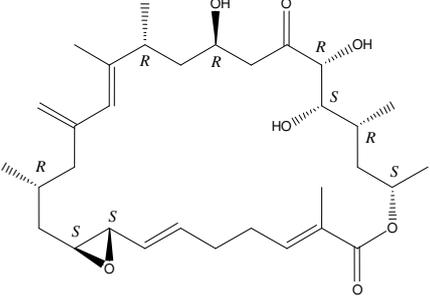
Os objetivos do trabalho se concentrou em realizar um estudo químico com os invertebrados marinhos *S. bicolor* coletado na praia na Caponga, no município de Cascavel e com o equinodermata *O. reticulata*, coletado na praia do Paracuru visando o isolamento e caracterização de metabólitos secundários, bem como a avaliação do potencial citotóxico frente a linhagens tumorais HCT-116 (câncer de cólon).

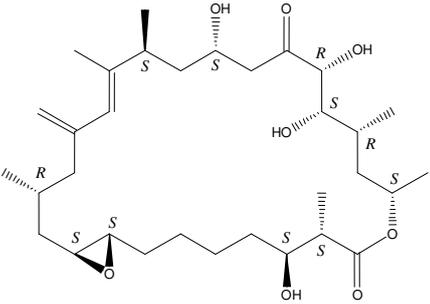
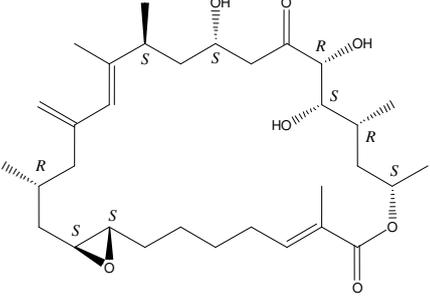
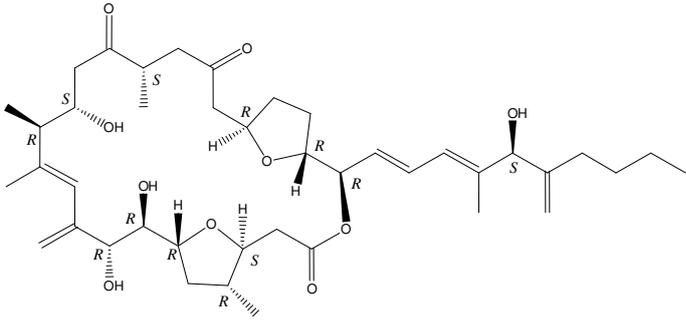
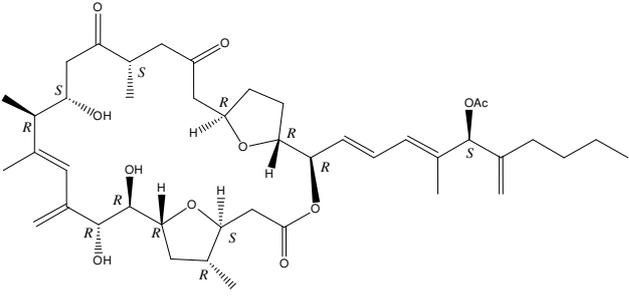
## 2 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

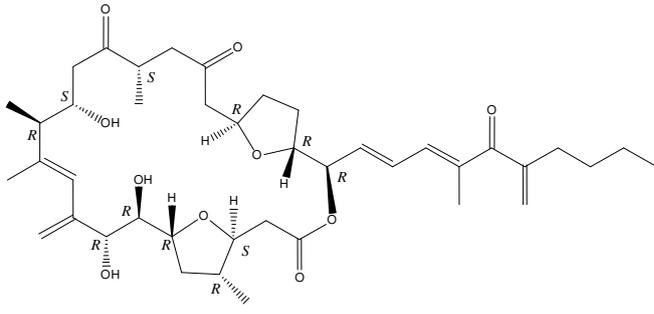
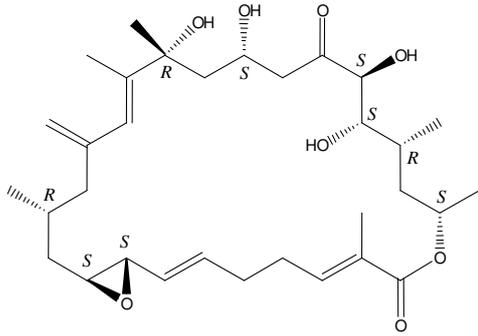
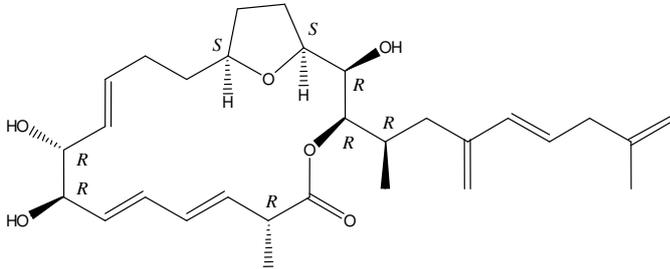
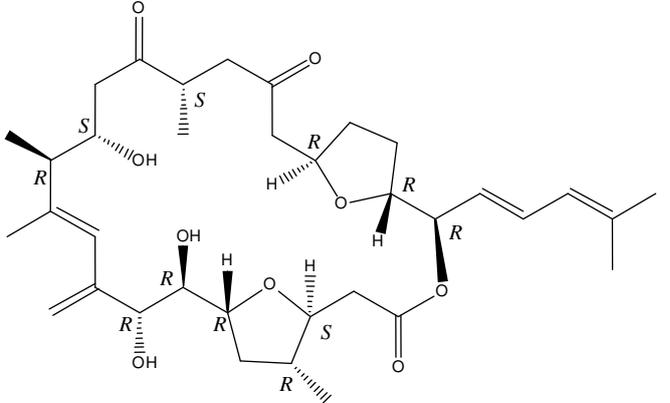
Com o intuito de conhecer melhor a química dos *Amphidinium*, produtores em potencial de anfidinólidos, realizou-se um levantamento bibliográfico sobre as espécies já investigadas. A Tabela 1 mostra os anfidinólidos descritos na literatura até a data da elaboração deste trabalho (Maio/2016), todos foram isolados da espécie *Amphidinium* sp. Também são relatadas as referências relacionadas aos estudos de isolamento, caracterização, estereoquímica e atividade tumoral.

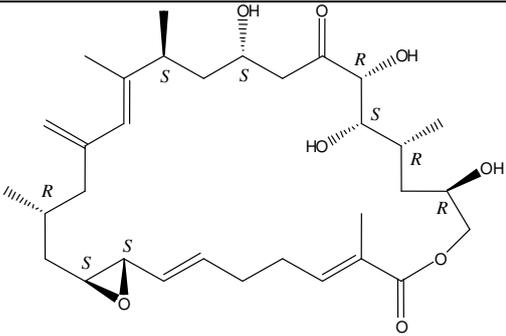
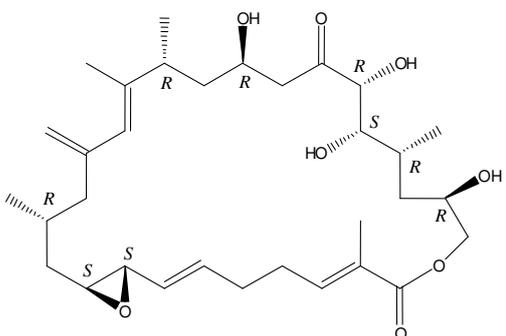
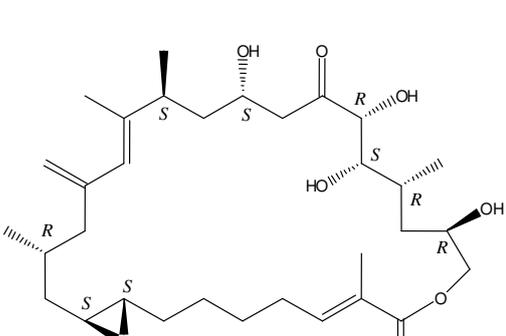
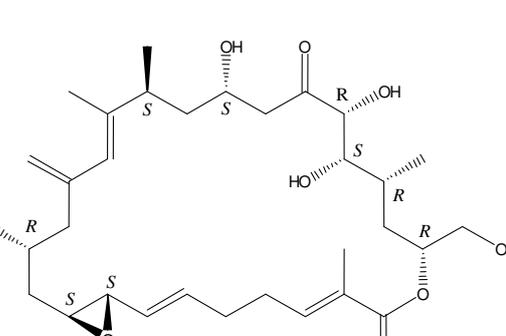
**Tabela 1.** Levantamento bibliográfico sobre os relatos de anfidinólidos descritos na literatura.

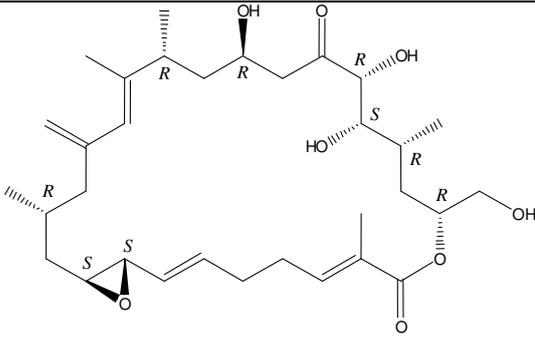
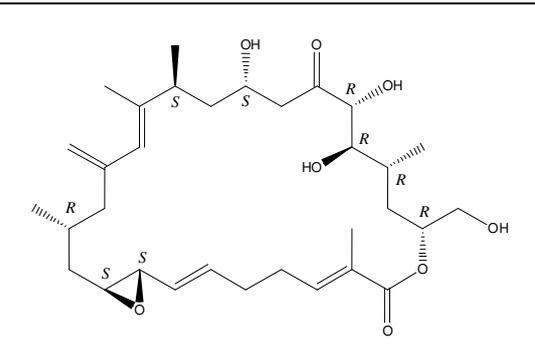
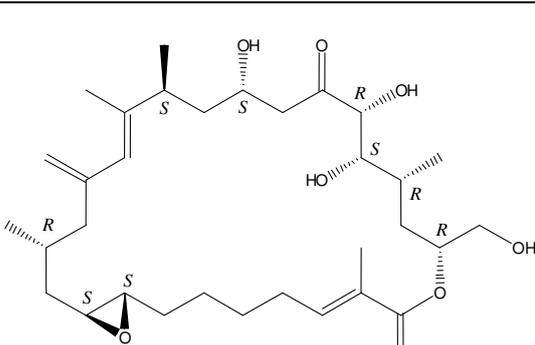
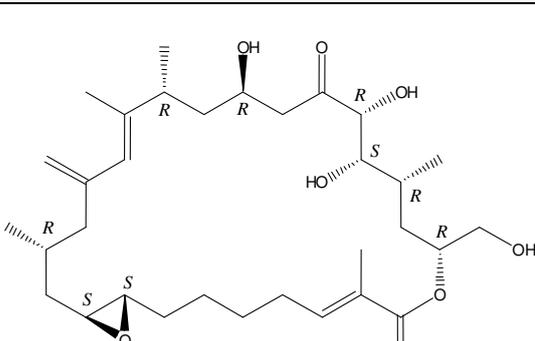
ESTRUTURA / NOME	ATIVIDADE	REFERÊNCIAS
 <p style="text-align: center;">Anfidinólido A</p>	Antitumoral	Kobayashi <i>et al.</i> , 1986. Kobayashi; Kubota, 2007.
 <p style="text-align: center;">Anfidinólido B</p>	Antitumoral	Ishibashi <i>et al.</i> , 1987. Ishibashi; Ishiyama; Kobayashi, 1994a. Kobayashi <i>et al.</i> , 1987. Kobayashi <i>et al.</i> , 1989. Kobayashi <i>et al.</i> , 2003. Matsunaga <i>et al.</i> , 1999. Shimbo <i>et al.</i> , 2005.

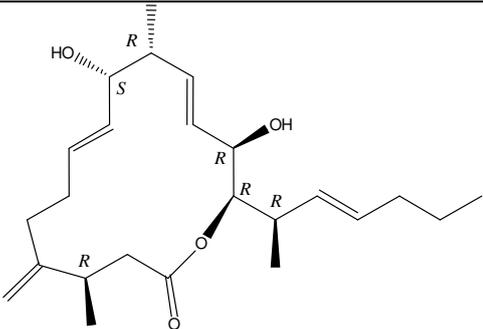
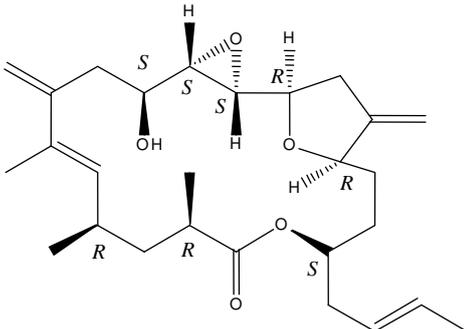
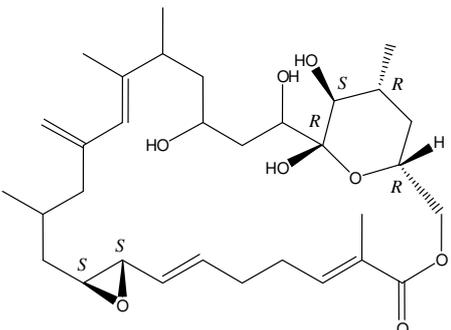
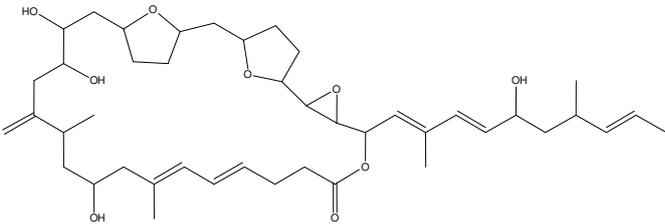
 <p>Anfidinolido B2</p>	Antitumoral	Bauer <i>et al.</i> , 1994.
 <p>Anfidinolido B3</p>	Antitumoral	Bauer <i>et al.</i> , 1994.
 <p>Anfidinolido B4</p>	Antitumoral	Kobayashi; Kubota, 2007. Tsuda <i>et al.</i> , 2005.
 <p>Anfidinolido B5</p>	Antitumoral	Kobayashi; Kubota, 2007. Tsuda <i>et al.</i> , 2005.

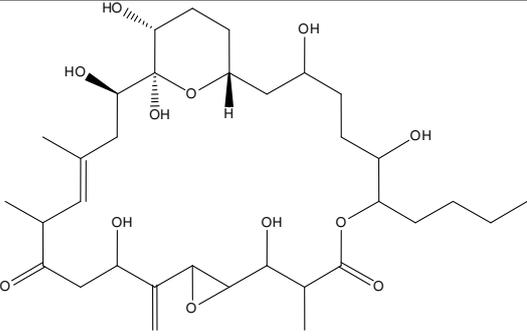
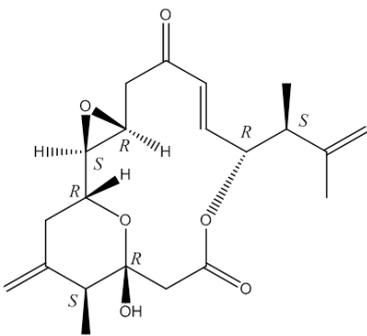
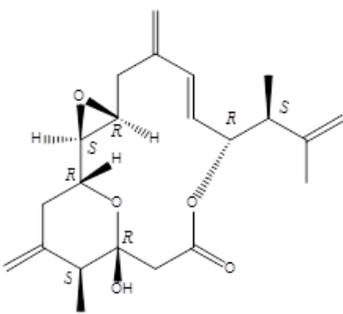
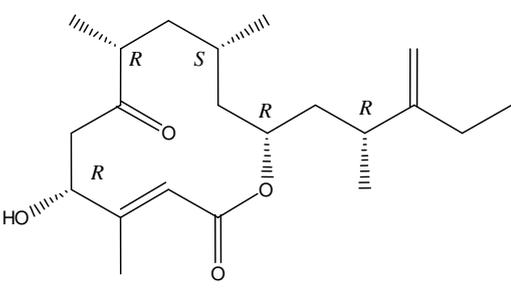
 <p>Anfidinólido B6</p>	-	Oguchi <i>et al.</i> , 2007.
 <p>Anfidinólido B7</p>	-	Oguchi <i>et al.</i> , 2007.
 <p>Anfidinólido C</p>	Antitumoral	Kobayashi <i>et al.</i> , 1988. Kobayashi <i>et al.</i> , 2003. Kubota; Tsuda, 2003. Kubota <i>et al.</i> , 2001a.
 <p>Anfidinólido C2</p>	-	Kubota <i>et al.</i> , 2004. Kobayashi; Kubota, 2007.

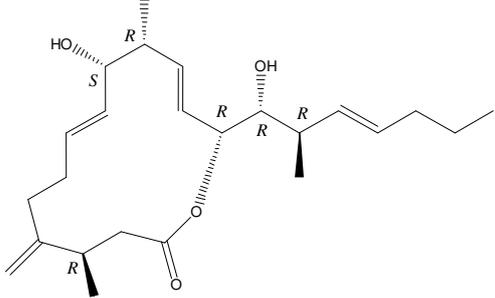
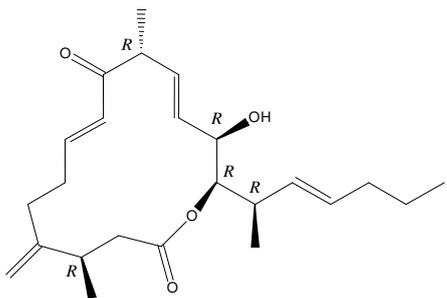
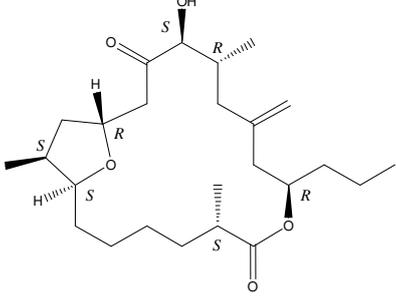
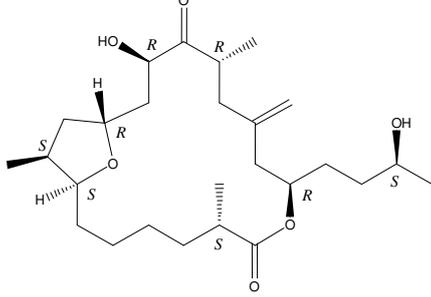
 <p>The structure of Anfidinolido C3 is a complex polyketide chain. It features a central 1,3-dioxolane ring system. Attached to this ring are several side chains, including a long chain with a terminal methyl group and a double bond, and another chain with a terminal methyl group and a double bond. There are also two hydroxyl groups and a carbonyl group attached to the ring system. Stereochemistry is indicated with 'R' and 'S' labels and wedged/dashed bonds.</p>	Antitumoral	Kubota <i>et al.</i> , 2010.
 <p>The structure of Anfidinolido D is a polyketide chain with a central 1,3-dioxolane ring. It has a long chain with a terminal methyl group and a double bond, and another chain with a terminal methyl group and a double bond. There are also two hydroxyl groups and a carbonyl group attached to the ring system. Stereochemistry is indicated with 'R' and 'S' labels and wedged/dashed bonds.</p>	Antitumoral	Kobayashi <i>et al.</i> , 1989.
 <p>The structure of Anfidinolido E is a polyketide chain with a central 1,3-dioxolane ring. It has a long chain with a terminal methyl group and a double bond, and another chain with a terminal methyl group and a double bond. There are also two hydroxyl groups and a carbonyl group attached to the ring system. Stereochemistry is indicated with 'R' and 'S' labels and wedged/dashed bonds.</p>	Antitumoral	Kobayashi <i>et al.</i> , 1990. Kubota <i>et al.</i> , 2002.
 <p>The structure of Anfidinolido F is a polyketide chain with a central 1,3-dioxolane ring. It has a long chain with a terminal methyl group and a double bond, and another chain with a terminal methyl group and a double bond. There are also two hydroxyl groups and a carbonyl group attached to the ring system. Stereochemistry is indicated with 'R' and 'S' labels and wedged/dashed bonds.</p>	Antitumoral	Kobayashi <i>et al.</i> , 1991a.

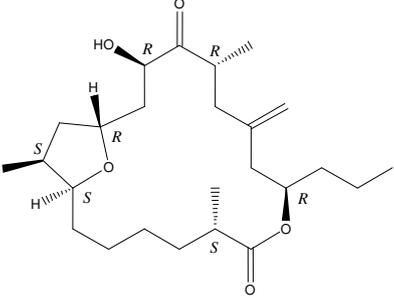
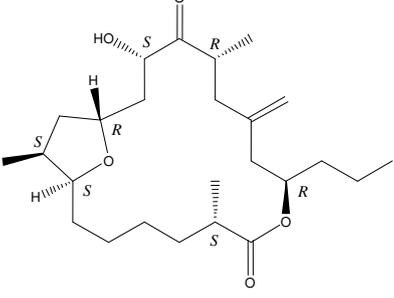
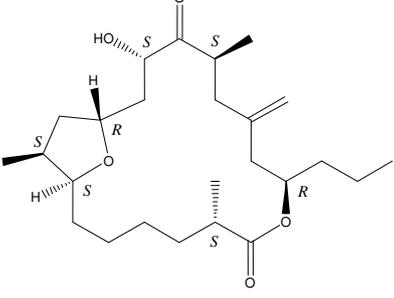
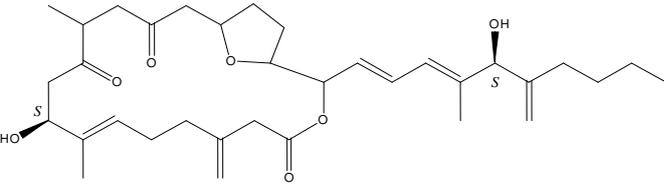
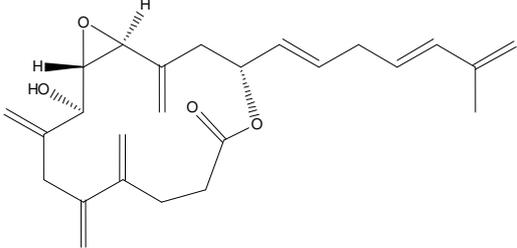
 <p>Anfidinolido G</p>	Antitumoral	Kobayashi <i>et al.</i> , 1991b. Kobayashi <i>et al.</i> , 2000. Kobayashi <i>et al.</i> , 2003. Kobayashi; Tsuda, 2005.
 <p>Anfidinolido G2</p>	Antitumoral	Kobayashi <i>et al.</i> , 2002. Kobayashi <i>et al.</i> , 2003.
 <p>Anfidinolido G3</p>	Antitumoral	Kobayashi <i>et al.</i> , 2002. Kobayashi <i>et al.</i> , 2003.
 <p>Anfidinolido H</p>	Antitumoral	Kobayashi <i>et al.</i> , 1991b. Kobayashi <i>et al.</i> , 2000. Kobayashi <i>et al.</i> , 2003. Kobayashi; Tsuda, 2005. Kobayashi; Kubota, 2007. Saito <i>et al.</i> , 2004. Shimbo <i>et al.</i> , 2005. Usui <i>et al.</i> , 2004.

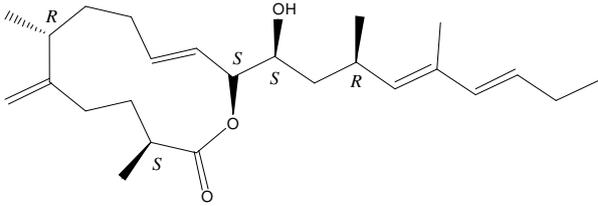
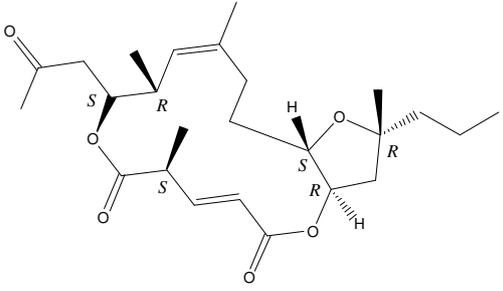
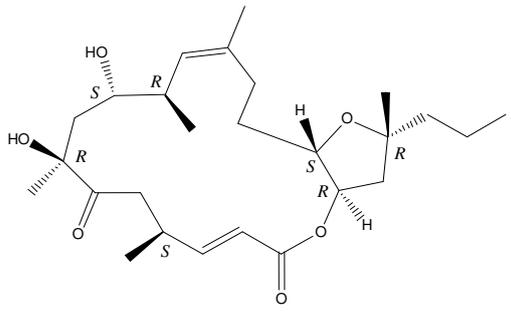
 <p>The structure of Anfidinolido H2 is a complex polyhydroxylated sesquiterpene. It features a central ring system with a lactone bridge and a diene system. The molecule is highly substituted with hydroxyl groups and methyl groups, with stereochemistry indicated by wedged and dashed bonds. The label 'Anfidinolido H2' is centered below the structure.</p>	Antitumoral	Kobayashi <i>et al.</i> , 2002. Kobayashi <i>et al.</i> , 2003. Shimbo, <i>et al.</i> , 2005.
 <p>The structure of Anfidinolido H3 is a complex polyhydroxylated sesquiterpene, similar to H2 but with a different stereochemistry at the C-10 position. The label 'Anfidinolido H3' is centered below the structure.</p>	Antitumoral	Kobayashi <i>et al.</i> , 2002. Kobayashi <i>et al.</i> , 2003.
 <p>The structure of Anfidinolido H4 is a complex polyhydroxylated sesquiterpene, similar to H2 but with a different stereochemistry at the C-10 position. The label 'Anfidinolido H4' is centered below the structure.</p>	Antitumoral	Kobayashi <i>et al.</i> , 2002. Kobayashi <i>et al.</i> , 2003.
 <p>The structure of Anfidinolido H5 is a complex polyhydroxylated sesquiterpene, similar to H2 but with a different stereochemistry at the C-10 position. The label 'Anfidinolido H5' is centered below the structure.</p>	Antitumoral	Kobayashi <i>et al.</i> , 2002. Kobayashi <i>et al.</i> , 2003.

 <p>Anfidinolido J</p>	Antitumoral	Kobayashi <i>et al.</i> , 1993. Kobayashi <i>et al.</i> , 2003.
 <p>Anfidinolido K</p>	Antitumoral	Ishibashi <i>et al.</i> , 1993.
 <p>Anfidinolido L</p>	Antitumoral	Tsuda <i>et al.</i> , 1994.
 <p>Anfidinolido M</p>	Antitumoral	Kobayashi <i>et al.</i> , 1994.

 <p>Anfidinolido N</p>	Antitumoral	Ishibashi <i>et al.</i> , 1994b.
 <p>Anfidinolido O</p>	Antitumoral	Ishibashi <i>et al.</i> , 1995.
 <p>Anfidinolido P</p>	Antitumoral	Ishibashi <i>et al.</i> , 1995.
 <p>Anfidinolido Q</p>	Antitumoral	Kobayashi <i>et al.</i> , 1996. Takahashi <i>et al.</i> , 2008.

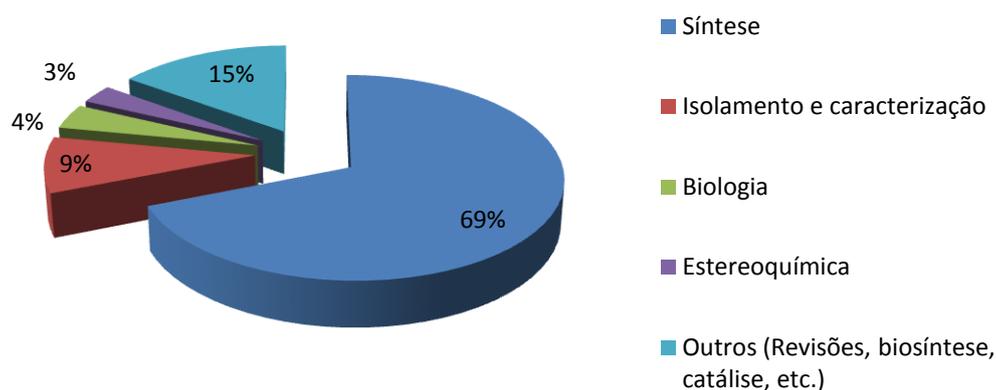
 <p>Anfidinolido R</p>	Antitumoral	Ishibashi; Takahashi; Kobayashi, 1997.
 <p>Anfidinolido S</p>	Antitumoral	Ishibashi; Takahashi; Kobayashi, 1997.
 <p>Anfidinolido T</p>	-	Kobayashi <i>et al.</i> , 2003. Kubota <i>et al.</i> , 2001a. Tsuda; Endo; Kobayashi, 2000.
 <p>Anfidinolido T2</p>	-	Kobayashi <i>et al.</i> , 2001. Kubota <i>et al.</i> , 2001a.

 <p style="text-align: center;">Anfidinolido T3</p>	-	Kobayashi <i>et al.</i> , 2001. Kubota <i>et al.</i> , 2001a.
 <p style="text-align: center;">Anfidinolido T4</p>	-	Kobayashi <i>et al.</i> , 2001. Kubota <i>et al.</i> , 2001a.
 <p style="text-align: center;">Anfidinolido T5</p>	-	Kubota <i>et al.</i> , 2001a. Kubota <i>et al.</i> , 2001b.
 <p style="text-align: center;">Anfidinolido U</p>	-	Tsuda <i>et al.</i> , 1999.
 <p style="text-align: center;">Anfidinolido V</p>	Antitumoral	Kubota; Tsuda; Kobayashi, 2000.

 <p>Anfidinolido W</p>	Antitumoral	Kobayashi <i>et al.</i> , 2003. Shimbo <i>et al.</i> , 2002.
 <p>Anfidinolido X</p>	Antitumoral	Kobayashi; Tsuda, 2005. Tsuda <i>et al.</i> , 2003a.
 <p>Anfidinolido Y</p>	Antitumoral	Kobayashi; Tsuda, 2005. Tsuda <i>et al.</i> , 2003b.

O gráfico 1 a seguir, representa a distribuição de todos os artigos publicados que possuem alguma relação com a classe de compostos dos anfidinólidos. A fonte da pesquisa foi o banco de dados *Scifinder*, e a busca foi realizada entre o período de abril de 2014 a maio de 2016.

**Gráfico 1.** Distribuição de publicações científicas sobre a classe de anfidinólidos.



Os metabólitos secundários anfidinólidos são uma classe de compostos de grande importância, apresentando significativa atividade antitumoral, o que torna o estudo dessa classe bastante interessante, tanto pela perspectiva de se obter novos compostos, como pela possibilidade de base para síntese de compostos com a perspectiva de aumento na atividade antitumoral.

Os anfidinólidos são um grupo de macrolídeos que atualmente possuem cerca de 40 membros conhecidos. Apresentam uma grande variedade estrutural em seus esqueletos e geralmente possuem um anel com 12 a 29 átomos, e mais da metade dos anfidinólidos conhecidos possuem anéis macrolactonas com número ímpar de átomos, grande parte dos anfidinólidos contém cadeias carbônicas ramificadas e unidades exometilênicas. Estudos de síntese orgânica têm crescido para obtenção de anfidinólidos devido sua grande complexidade, reconhecida importância citotóxica e abundância natural baixa (KOBAYASHI, 2008).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como resultado do desenvolvimento do projeto de pesquisa foi possível isolar seis substâncias a partir do octocoral *S. bicolor*, todas pertencendo a classe dos anfidinólidos, das quais somente duas tinham sido registradas na literatura, sendo elas, os anfidinólidos P (SB 2H) e T (SB 5E). As quatro novas substâncias, cujas determinações estruturais serão descritas a seguir, foram codificadas como SB 2F, SB 4D, SB 4E, SB 4M. Até o momento não há relatos de anfidinólidos isolados de outros organismos que não sejam de dinoflagelados do gênero *Amphidinium sp.*

Também foi realizado o estudo de uma espécie de ofiuroide, *O. Reticulata* a qual é uma estrela marinha. Seu estudo permitiu o isolamento de três substâncias da classe dos sesquiterpenos do tipo chamigrano, dois deles já conhecidos na literatura, o elatol (OREDM2F) e o isoobtusadieno (OREDM2B) e seu derivado acetilado (OREDM2D).

#### 3.1 Determinação estrutural

##### 3.1.1 SB 2H e SB 2F

O composto denominado como SB 2H (**1**), foi isolado a partir do fracionamento cromatográfico do extrato metanólico do octocoral *S.bicolor* conforme a metodologia descrita no item 4.3.2.

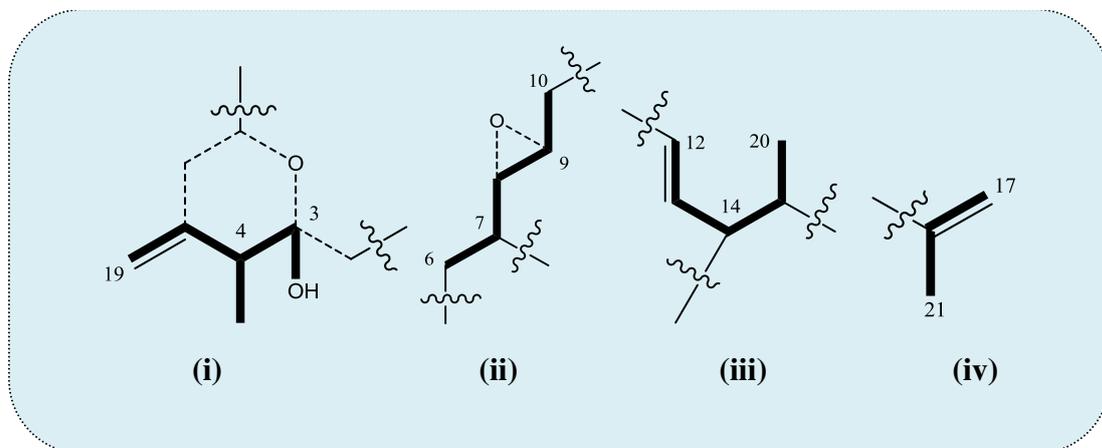
O espectro de massas de alta resolução de **1** (Figura 7, pág. 36), apresentou um pico correspondente ao aduto de sódio  $[M + Na]^+$  em  $m/z$  397,1980 (calculada 397,1991; erro 2,26 ppm) indicando a fórmula molecular  $C_{22}H_{30}O_5Na$ , a qual apresenta índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a oito.

O espectro de RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 150 MHz) (Figura 11, pág. 39) mostrou 22 linhas espectrais, destacando os sinais para o grupo carbonila em  $\delta_C$  172,3 e oito sinais para carbonos olefínicos em  $\delta_C$  146,5; 143,5; 142,7; 133,4; 128,8; 117,6; 111,9 e 109,5. Além disso, foi possível observar sinais característicos de carbonos oxigenados em  $\delta_C$  99,0; 78,1; 73,3; 62,3 e 57,4, sendo os dois últimos característicos de anel epóxido.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz), (Figura 9, pág. 38) e HSQC ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz) (Figura 10, pág. 38) revelaram oito sinais para hidrogênios ligados a carbonos olefínicos em  $\delta_{\text{H}}$  6,19 (d, 15,0 Hz); 5,59 (dd, 8,0 e 15,0 Hz); 4,93 (s); 4,80 (s); 4,81 (s); 4,76 (s); 4,88 (s) e 4,87 (s). No espectro HSQC, os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  2,61 (dd, 2,0 e 8,0 Hz, H-8) e 2,47 (dd, 2,0 e 8,0 Hz, H-9) mostraram correlação com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  62,3 (C-8) e 57,4 (C-9) corroborando a presença do anel epóxido. Também é importante citar a presença de três sinais intensos correspondentes a hidrogênios metílicos em  $\delta_{\text{H}}$  1,66 (s, H-20), 0,91 (d, 7,0 Hz, H-18) e 0,90 (d, 7,0 Hz, H-21). Os dados de deslocamento químico de hidrogênio e carbono para o composto **1** podem ser observados na Tabela 2, página 35.

Os espectros bidimensionais homonucleares  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  TOCSY (Figura 12, pág. 39) e COSY (Figura 13, pág. 40) do composto **1** mostraram correlações que possibilitaram elaborar quatro fragmentos estruturais como visto na Figura 4, construídos de acordo com os sistemas de *spins* a seguir: **(i)** do hidrogênio da hidroxila OH-3 ( $\delta_{\text{H}}$  4,3) para os hidrogênios metilênicos H<sub>2</sub>-19 ( $\delta_{\text{H}}$  4,76 e 4,81); **(ii)** dos hidrogênios metilênicos H<sub>2</sub>-6 ( $\delta_{\text{H}}$  2,09 e 2,51) para os hidrogênios metilênicos H<sub>2</sub>-10 ( $\delta_{\text{H}}$  2,17 e 2,64); **(iii)** do hidrogênio olefínico H-12 ( $\delta_{\text{H}}$  6,19) para os hidrogênios metílicos H<sub>3</sub>-20 ( $\delta_{\text{H}}$  1,66) e por fim, **(iv)** dos hidrogênios olefínicos H<sub>2</sub>-17 ( $\delta_{\text{H}}$  4,87 e 4,88) para os hidrogênios metílicos H<sub>3</sub>-21 ( $\delta_{\text{H}}$  0,90).

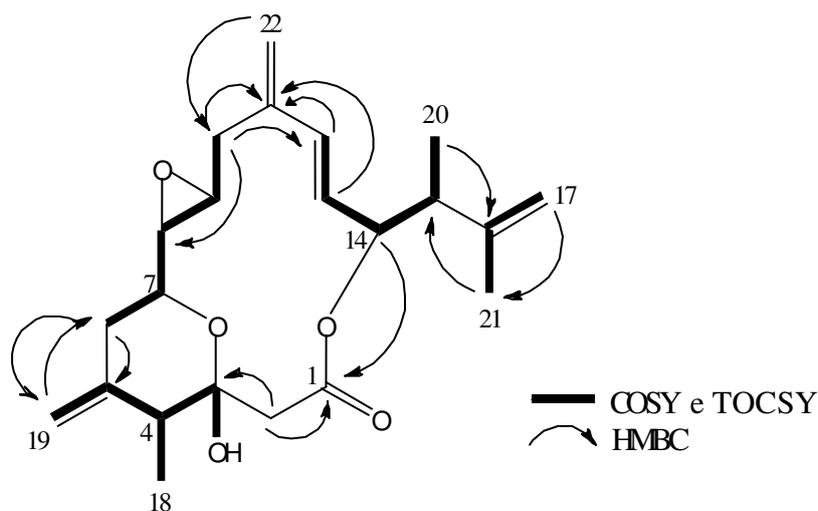
**Figura 4.** Fragmentos estruturais construídos a partir de acoplamentos observados nos espectros homonucleares  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY e COSY do composto **1**.



As conectividades dessas quatro subunidades estruturais foram estabelecidas através do espectro de correlação heteronuclear HMBC (Figura 15, pág. 41), conforme mostrado na Figura 5.

As unidades i e ii foram conectadas através das correlações dos hidrogênios metilênicos H<sub>2</sub>-6 ( $\delta_{\text{H}}$  2,09 e 2,51) com os carbonos da dupla C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  143,5) e C-19 ( $\delta_{\text{C}}$  109,5). As correlações dos hidrogênios metilênicos H<sub>2</sub>-2 ( $\delta_{\text{H}}$  2,27 e 2,36) e metínico H-14 ( $\delta_{\text{H}}$  5,29) com o carbono carbonílico C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  172,3) permitiu interligar as unidades i e iii. Já as correlações dos hidrogênios metilênicos H<sub>2</sub>-10 ( $\delta_{\text{H}}$  2,17 e 2,64) e H-12 ( $\delta_{\text{H}}$  6,19) com o carbono olefínico C-11 ( $\delta_{\text{C}}$  142,7) foram determinantes para ligar as unidades ii e iii, enquanto o grupo propenil (iv), foi posicionado em C-15 ( $\delta_{\text{C}}$  45,0) através das correlações de H<sub>3</sub>-20 ( $\delta_{\text{H}}$  1,66) com C-16 ( $\delta_{\text{C}}$  146,5) e de H<sub>3</sub>-21 ( $\delta_{\text{H}}$  0,90) com C-15 ( $\delta_{\text{C}}$  45,0).

**Figura 5.** Principais correlações observadas nos espectros de RMN 2D <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H COSY, TOCSY e <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C HMBC apresentadas pelo composto **1**.

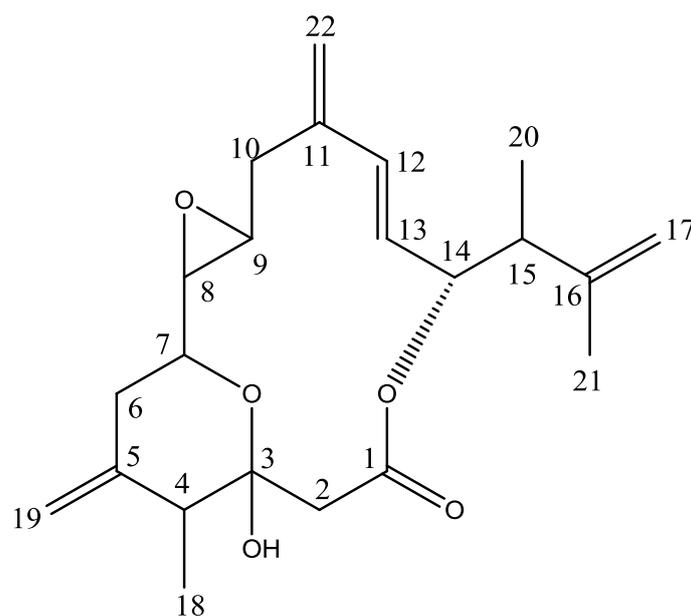


**Tabela 2.** Deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC para o composto **1** ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz) e anfidinolido  $\text{P}^a$  ( $\text{C}_6\text{D}_6$ ).

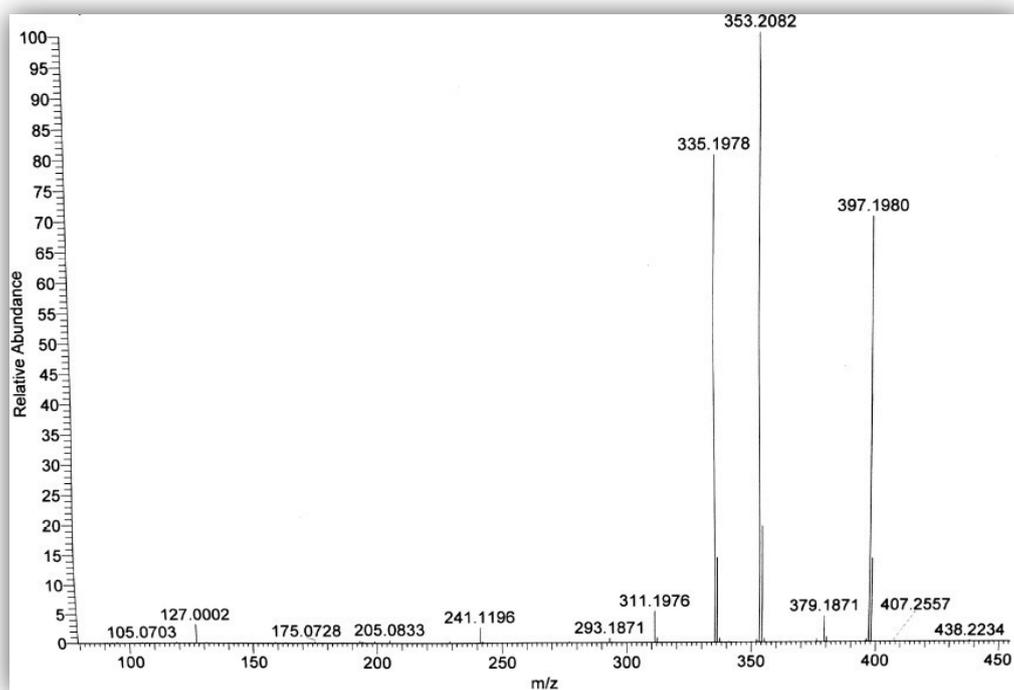
N°	(1)		Anfidinolido $\text{P}^a$	
	$\delta_{\text{H}}$ (J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	-	172,3	-	172,4
2	2,27 (d; 12,0) 2,36 (d; 12,0)	44,7	2,31 (d; 12,0) 2,41 (d; 12,0)	45,01
3	4,30	99,0	4,31	99,2
4	1,94 (m)	45,1	1,99 (ql; 6,9)	45,2
5	-	143,5	-	143,7
6	2,09 (dd; 12,0; 12,0) 2,51 (dd; 2,5; 12,0)	38,9	2,14 (t; 11,7) 2,56 (dd; 2,5 e 11,7)	39,4
7	3,46 (m)	73,3	3,51 (ddd; 2,5; 8,3; 11,7)	73,5
8	2,61 (dd; 2,0; 8,0)	62,3	2,66 (dd; 1,4; 8,3)	62,8
9	2,47 (dd; 2,0; 8,0)	57,4	2,52 (d; 9,5)	58,2
10	2,17 (dd; 8,0; 14,0) 2,64 (d; 14,0)	36,2	2,21 (dd; 9,5; 13,9) 2,72 (d; 13,9)	36,4
11	-	142,7	-	142,3
12	6,19 (d; 15,0)	133,4	6,24 (d; 16,2)	133,6
13	5,59 (dd; 8,0; 15,0)	128,8	5,64 (dd; 7,5; 16,2)	129,1
14	5,29 (t; 8,0)	78,1	5,34 (dd; 7,5; 9,3)	78,5
15	2,42 (m)	45,0	2,47 (qd; 7,3; 9,3)	45,04
16	-	146,5	-	146,5
17	4,87 (s) 4,88 (s)	111,9	4,92 (s) 4,93 (s)	112,3
18	0,91 (d; 7,0)	11,4	0,95 (d; 7,3)	11,8
19	4,76 (s) 4,81 (s)	109,5	4,81 (s) 4,82 (s)	110,0
20	1,66 (s)	19,4	1,71 (s)	19,5
21	0,90 (d; 7,0)	16,0	0,96 (d; 6,9)	16,1
22	4,80 (s) 4,93 (s)	117,6	4,85 (s) 4,98 (s)	118,1

<sup>a</sup> Ishibashi *et al.*, 1995;

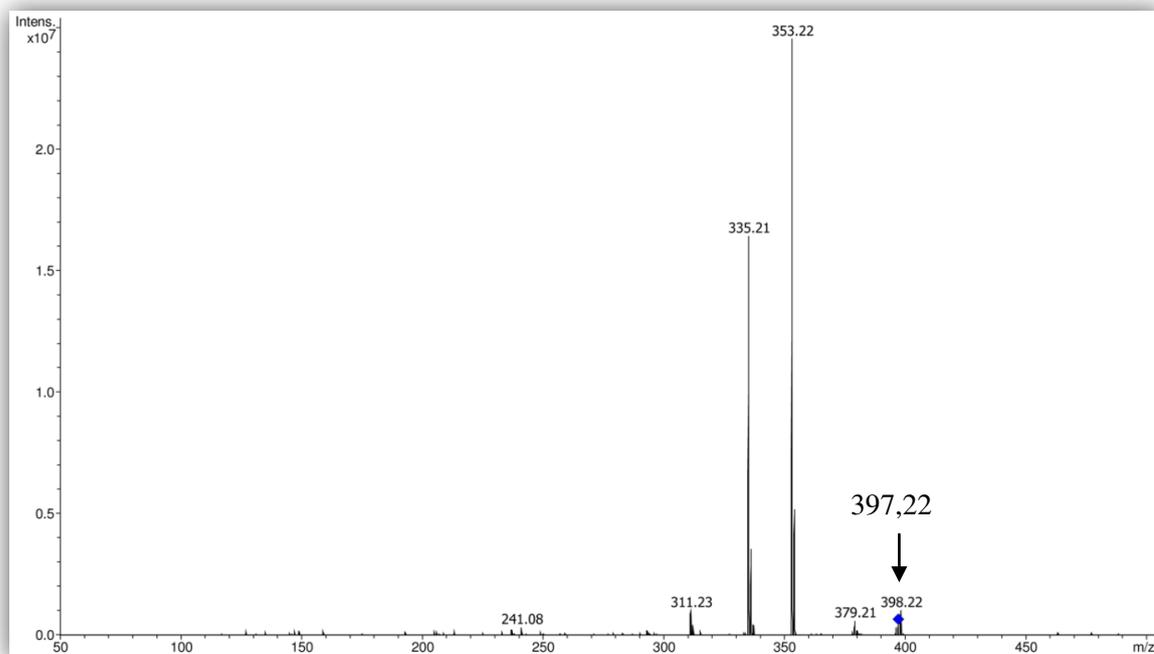
**Figura 6.** Estrutura do composto SB 2H (1).



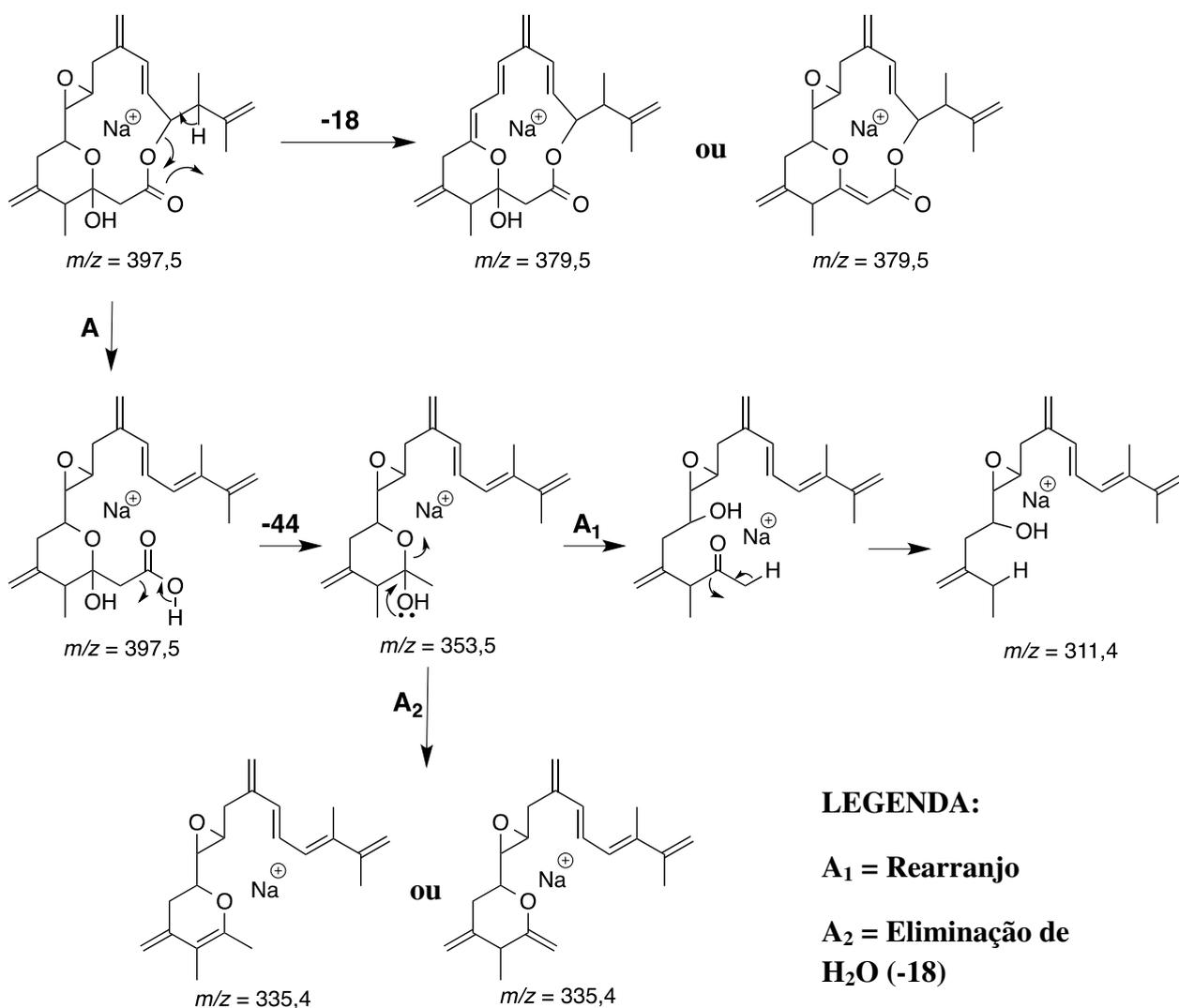
**Figura 7.** Espectro de massas de alta resolução (EMAR-ESI) de SB 2H (1).



**Figura 8.** Espectro de massa MS/MS do íon 397,22 correspondente ao íon molecular sodiado  $[M + Na]^+$   $m/z$  397,1982 do composto 1.



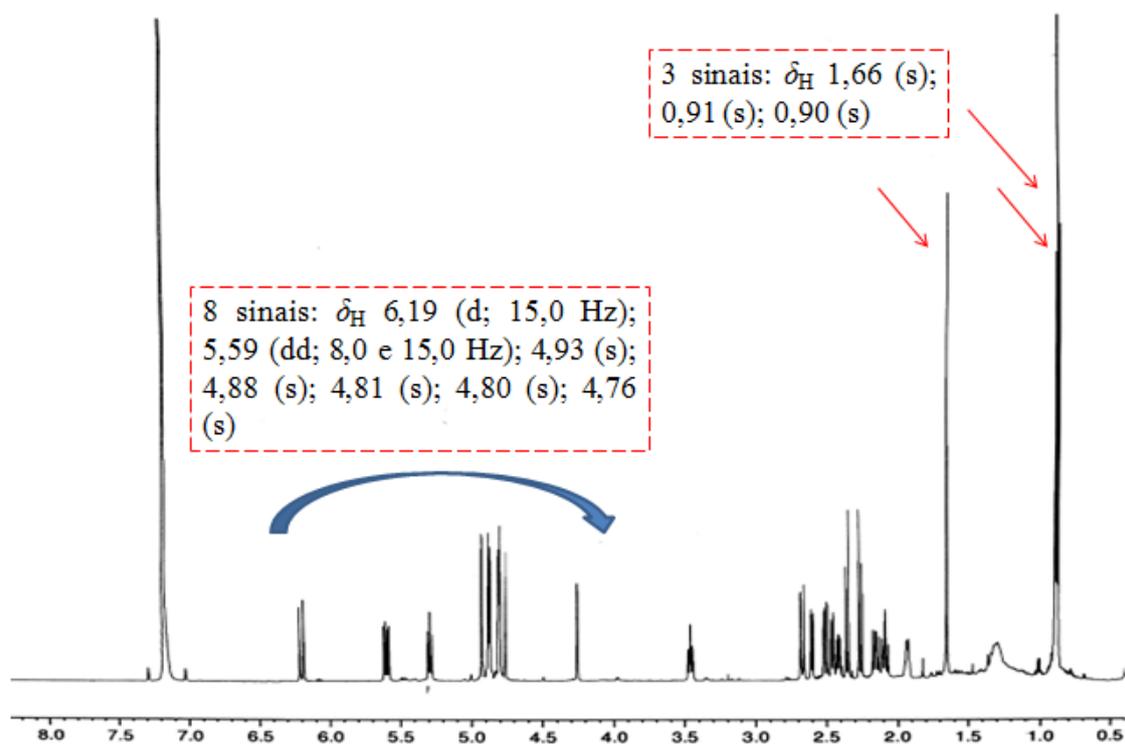
Com base no espectro de massas de alta resolução (Figura 7, pág. 36) e no espectro de massas sequencial MS/MS (Figura 8, pág. 36) para o pico correspondente a razão  $m/z$  397,22 foram propostas as seguintes fragmentações confirmando a estrutura proposta para o composto **1**.



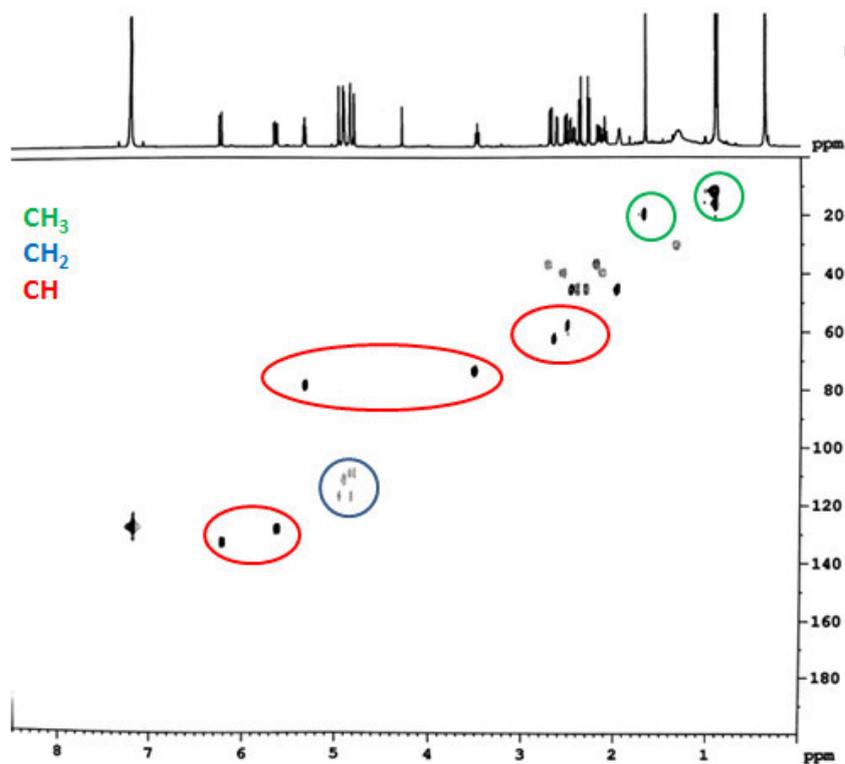
Dessa maneira, o composto **1** foi definido como sendo o anfidinolído P, previamente descrito por Ishibashi *et al*, 1995.

**Anfidinolído P:** óleo incolor,  $[\alpha]_D^{25} +12,8$  ( $c$  0,04; MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\epsilon$ ) 225 nm ( $\epsilon$  26,452), 231 nm ( $\epsilon$  28,101), 239 nm (18,095), C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>.

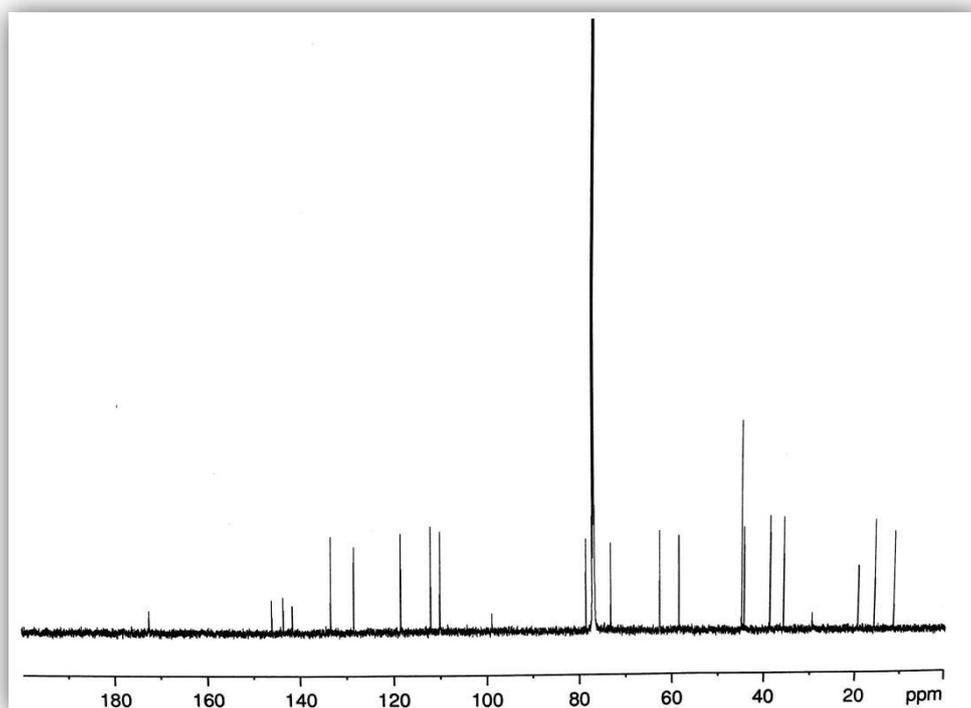
**Figura 9.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz) do composto SB 2H (1).



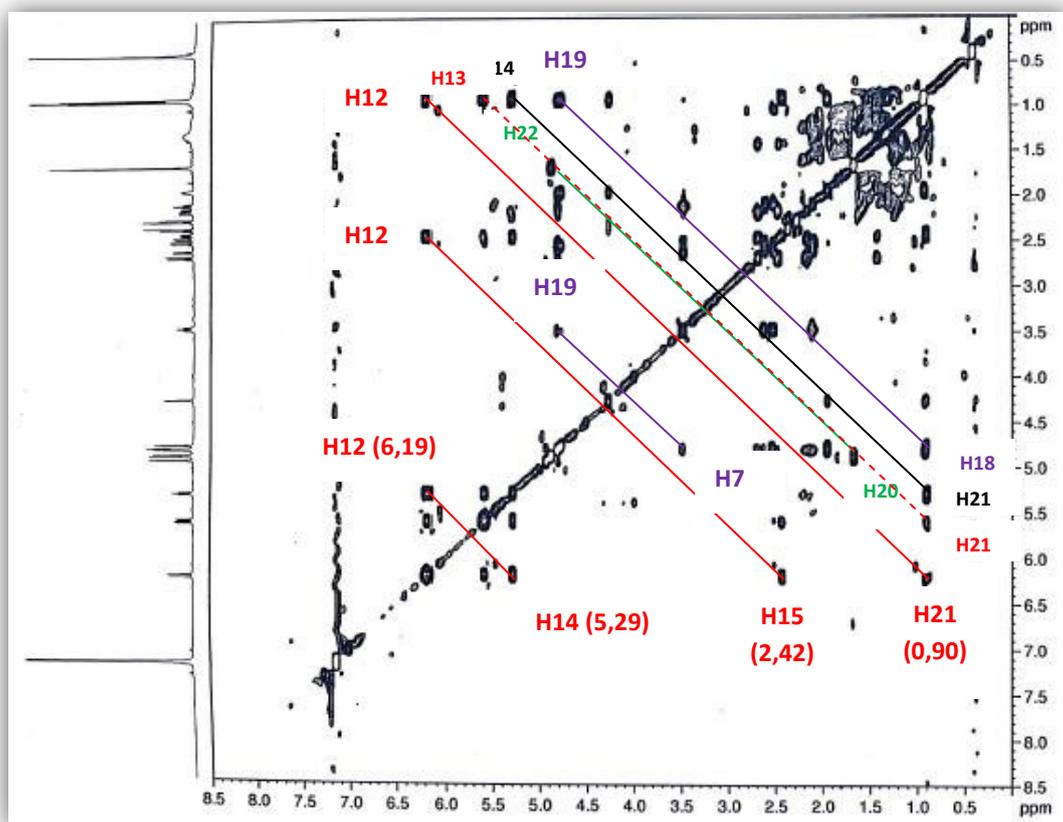
**Figura 10.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC editado de SB 2H (1) ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz).



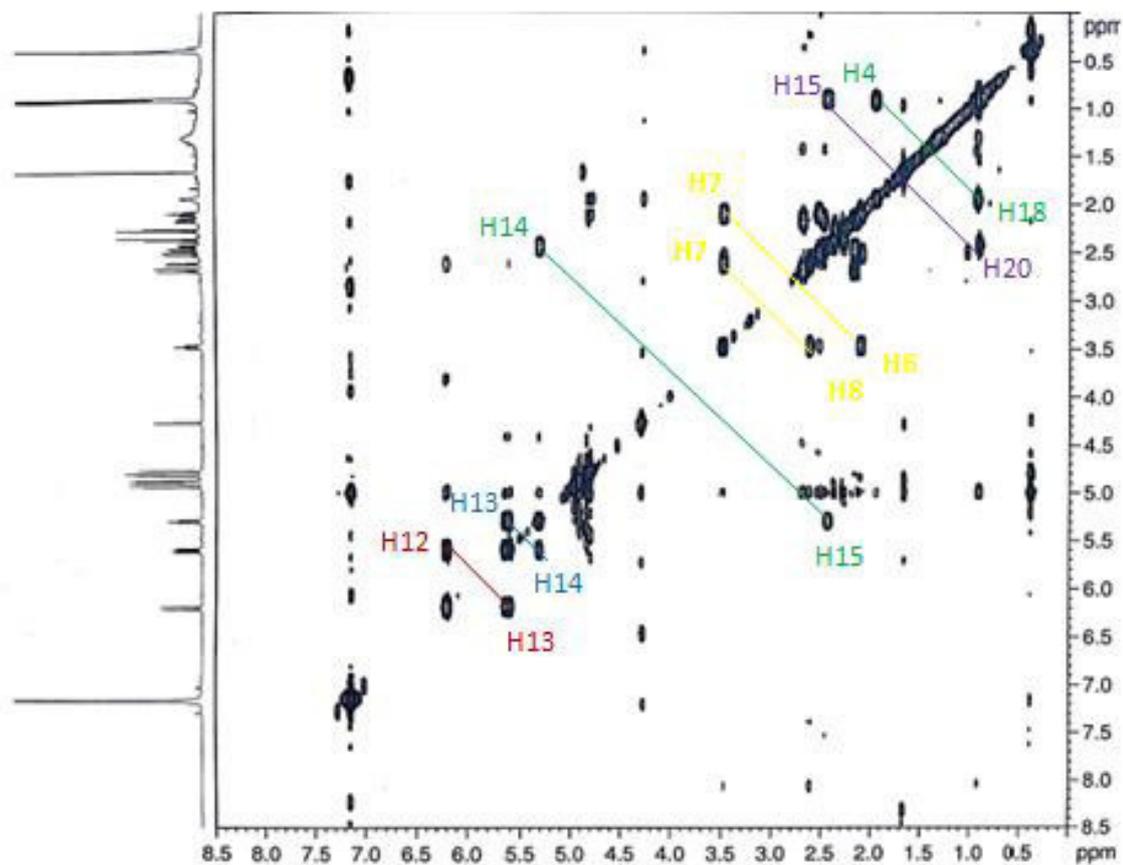
**Figura 11.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) do composto SB 2H (1).



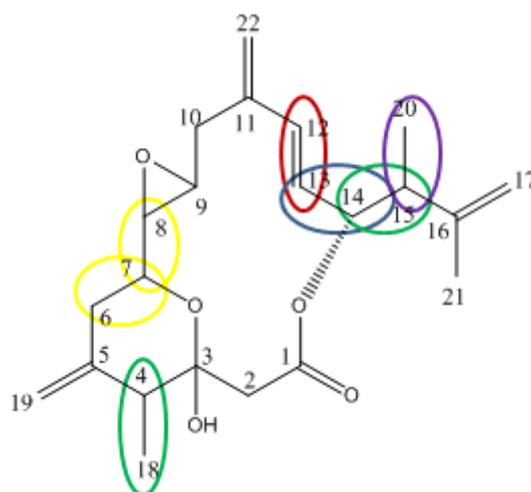
**Figura 12.** Espectro de correlação homonuclear  $^1\text{H},^1\text{H}$  TOCSY do composto 1 ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz).



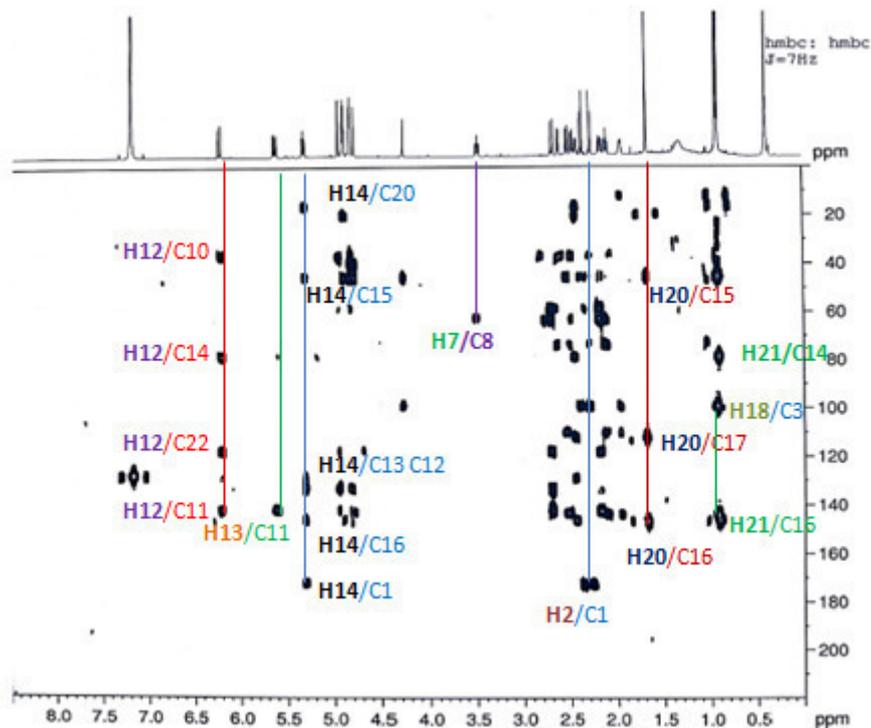
**Figura 13.** Espectro de correlação homonuclear  $^1\text{H}, ^1\text{H}$  COSY do composto **1** ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz).



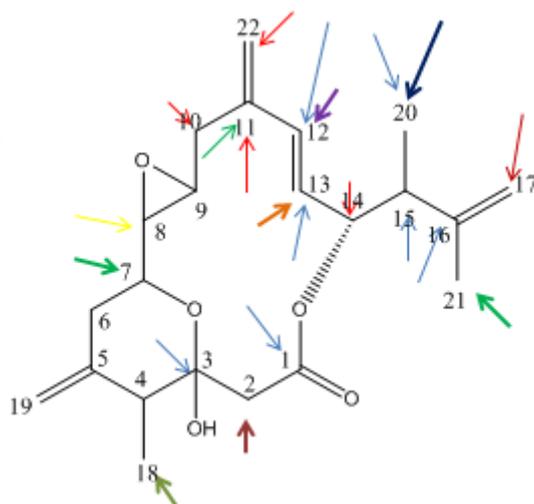
**Figura 14.** Correlações observadas no espectro  $^1\text{H}, ^1\text{H}$  COSY ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz) do composto **1**.



**Figura 15.** Espectro de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC do composto **1** ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz).



**Figura 16.** Correlações observadas no espectro bidimensional  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz) de SB 2H (**1**).



O composto SB 2F (**2**) também apresentou um aspecto oleoso e incolor. Seu espectro de massa de alta resolução apresentou um pico referente ao aduto de sódio [ $M + Na$ ]<sup>+</sup> em  $m/z$  411,2134 (Figura 19, pág. 44) indicando a fórmula molecular  $C_{23}H_{32}O_5Na^+$ .

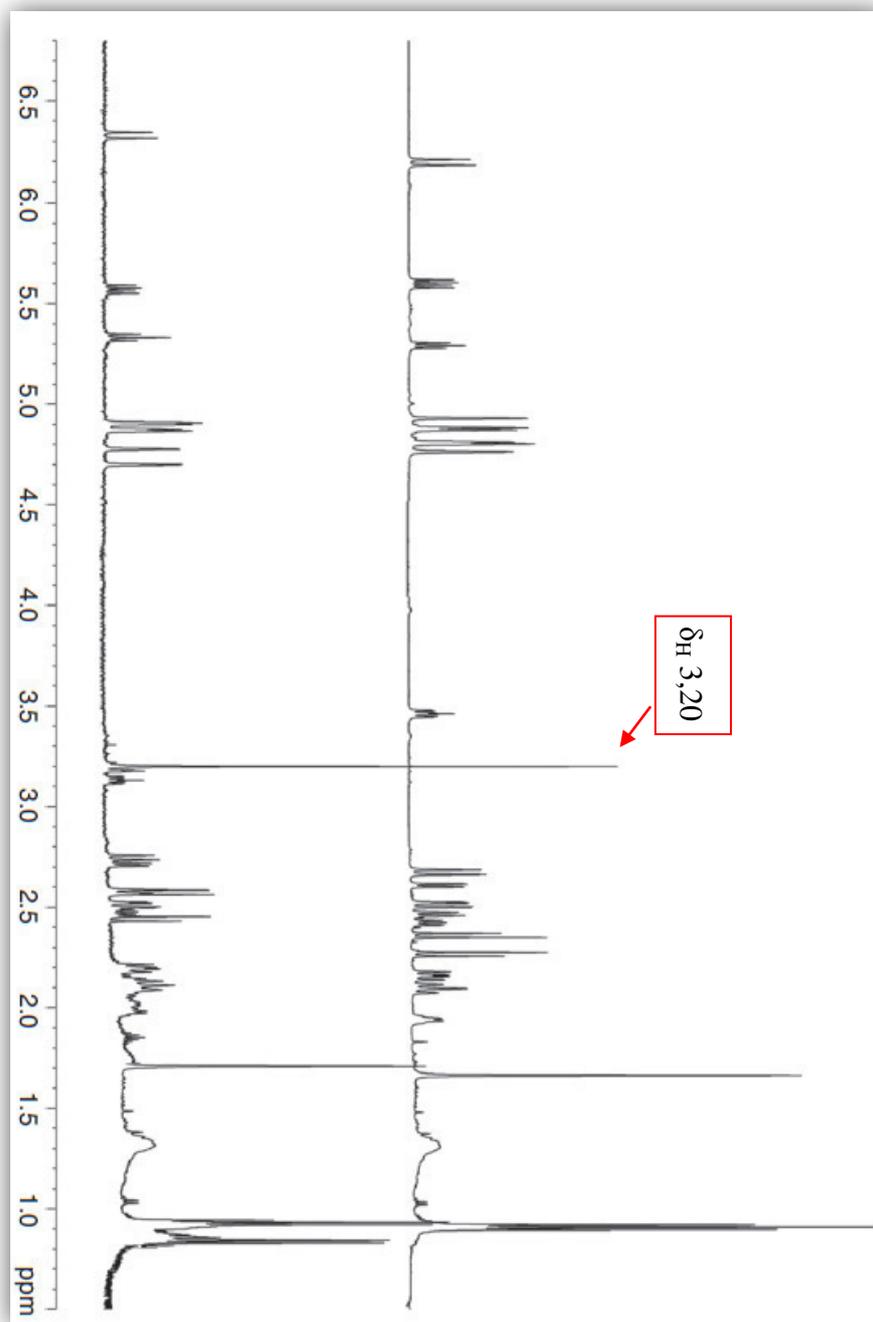
Os espectros de RMN de  $^1H$  dos compostos anfidinólido P (**2**) e (**1**) (Figura 17, pág. 43) se mostraram semelhantes conforme pode ser observado na Tabela 3. Exceto pelo surgimento, em (**2**), de um singlete intenso em  $\delta_H$  3,20 referente a um grupo metoxila, aliado aos valores de massa, cuja diferença de 14 unidades de massa atômica, nos induziu a propor a substituição do hidrogênio da hidroxila por um grupo metila. Isso foi evidenciado pelas correlações dos hidrogênios metílicos ( $\delta_H$  3,20) com os hidrogênios metilênicos  $H_{2-2}$  ( $\delta_H$  2,44 e 2,57) conforme mostrado no espectro de correlação homonuclear TOCSY (Figura 18, pág. 44).

**Tabela 3.** Deslocamentos químicos de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$  (HSQC) para os compostos **1** e **2** ( $C_6D_6$ , 600 MHz), e anfidinólido P<sup>a</sup> ( $C_6D_6$ ).

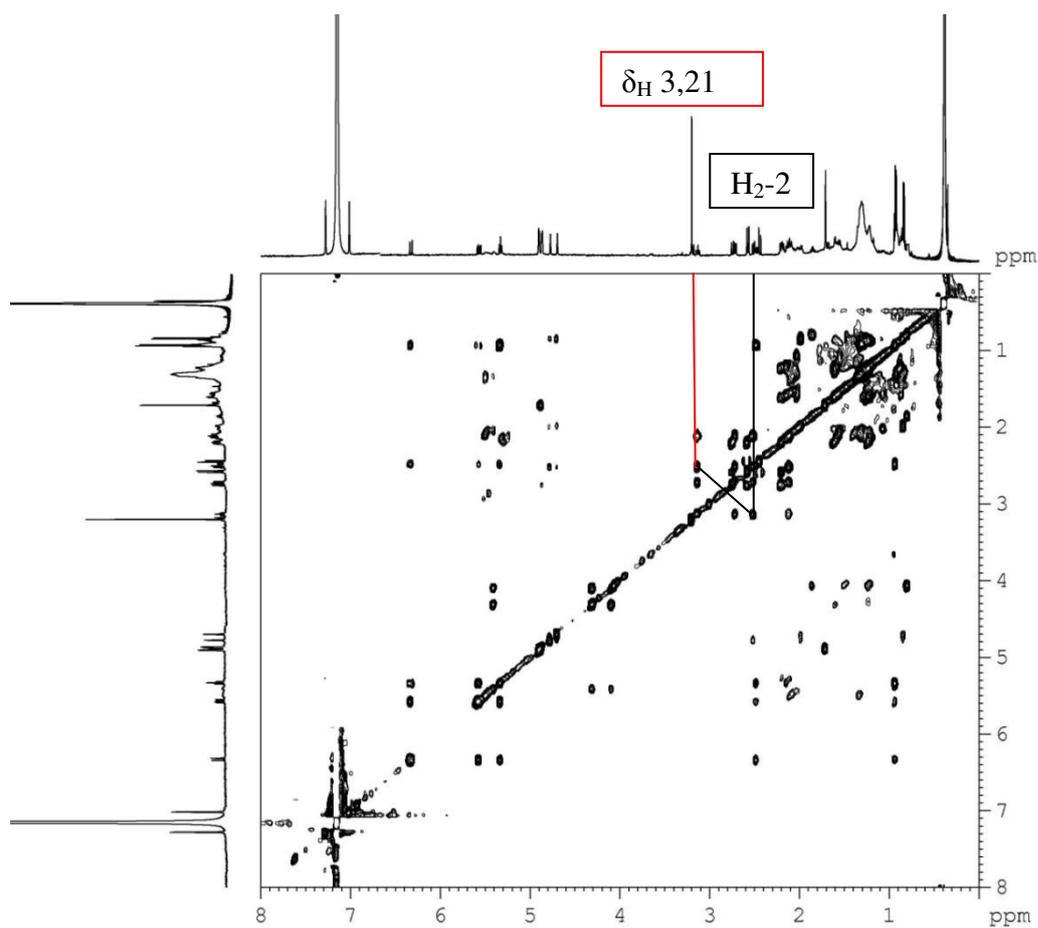
N <sup>o</sup>	(1)		(2)		Anfidinólido P <sup>a</sup>	
	$\delta_H$ (J em Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ (J em Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ (J em Hz)	$\delta_C$
1	-	172,3	-	168,7	-	172,4
2	2,27 (d; 12,0) 2,36 (d; 12,0)	44,7	2,44 (d; 12,5) 2,57 (d; 12,5)	44,9	2,31 (d; 12,0) 2,41 (d; 12,0)	45,01
3	-	99,0	-	100,7	-	99,2
4	1,94 (m)	45,1	1,98 (m)	47,7	1,99 (ql; 6,9)	45,2
5	-	143,5	-	143,8	-	143,7
6	2,09 (dd; 12,0; 12,0) 2,51 (dd; 2,5; 12,0)	38,9	2,11 (dd; 12,0; 12,6) 2,51 (dd; 2,5; 12,0)	39,1	2,14 (t; 11,7) 2,56 (dd; 2,5 e 11,7)	39,4
7	3,46 (m)	73,3	3,13 (ddd; 2,5; 3,0; 8,0)	74,1	3,51 (ddd; 2,5; 8,3; 11,7)	73,5
8	2,61 (dd; 2,0; 8,0)	62,3	2,71 (dd; 2,0; 8,0)	63,2	2,66 (dd; 1,4; 8,3)	62,8
9	2,47 (dd; 2,0; 8,0)	57,4	2,57 <sup>b</sup>	56,7	2,52 (d; 9,5)	58,2
10	2,17 (dd; 8,0; 14,0) 2,64 (d; 14,0)	36,2	2,19 (dd; 9,0; 14,0) 2,74 (d; 14,0)	36,0	2,21 (dd; 9,5; 13,9) 2,72 (d; 13,9)	36,4
11	-	142,7	-	140,8	-	142,3
12	6,19 (d; 15,0)	133,4	6,33 (d; 15,0)	134,8	6,24 (d; 16,2)	133,6
13	5,59 (dd; 8,0; 15,0)	128,8	5,57 (dd; 8,0; 15,0)	129,1	5,64 (dd; 7,5; 16,2)	129,1
14	5,29 (t; 8,0)	78,1	5,33 (t; 8,0)	78,1	5,34 (dd; 7,5; 9,3)	78,5
15	2,42 (m)	45,0	2,47 (m)	44,6	2,47 (qd; 7,3; 9,3)	45,04
16	-	146,5	-	146,8	-	146,5
17	4,87 (s) 4,88 (s)	111,9	4,87 (s) 4,90 (s)	111,7	4,92 (s) 4,93 (s)	112,3
18	0,91 (d; 7,0)	11,4	0,84 (d; 7,0)	10,7	0,95 (d; 7,3)	11,8
19	4,76 (s) 4,81 (s)	109,5	4,69 (s) 4,77 (s)	108,6	4,81 (s) 4,82 (s)	110,0
20	1,66 (s)	19,4	1,71 (s)	19,1	1,71 (s)	19,5
21	0,90 (d; 7,0)	16,0	0,93 (d; 7,0)	16,2	0,96 (d; 6,9)	16,1
22	4,80 (s) 4,93 (s)	117,6	4,86 (s) 4,91 (s)	119,0	4,85 (s) 4,98 (s)	118,1
OMe	-	-	3,20 (s)	49,5	-	-

<sup>a</sup> Ishibashi *et al.*, 1995; <sup>b</sup> Sobreposição de sinal

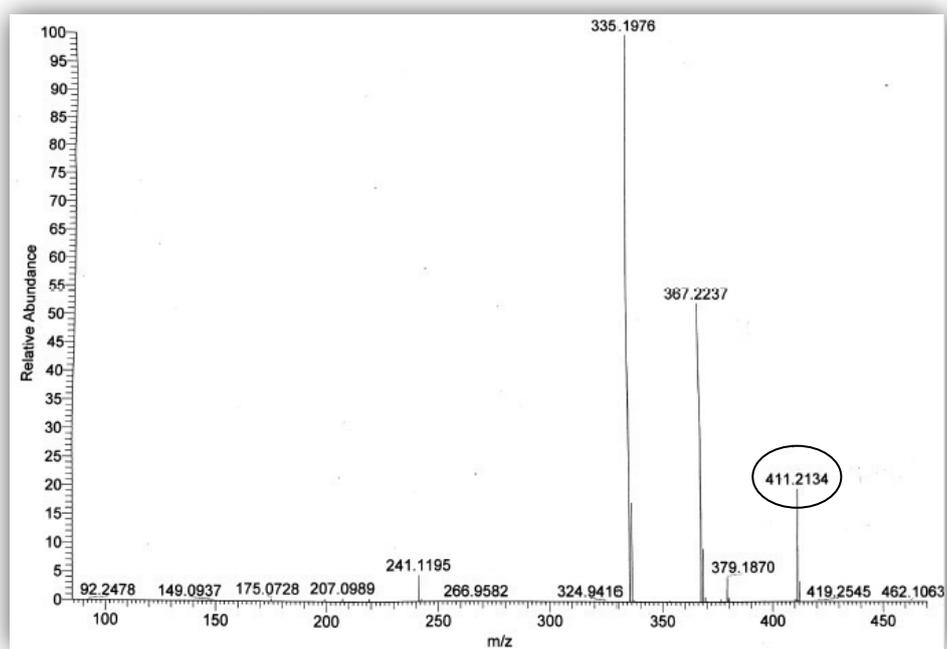
**Figura 17.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz) do composto **1** (superior) e do composto **2** (inferior).



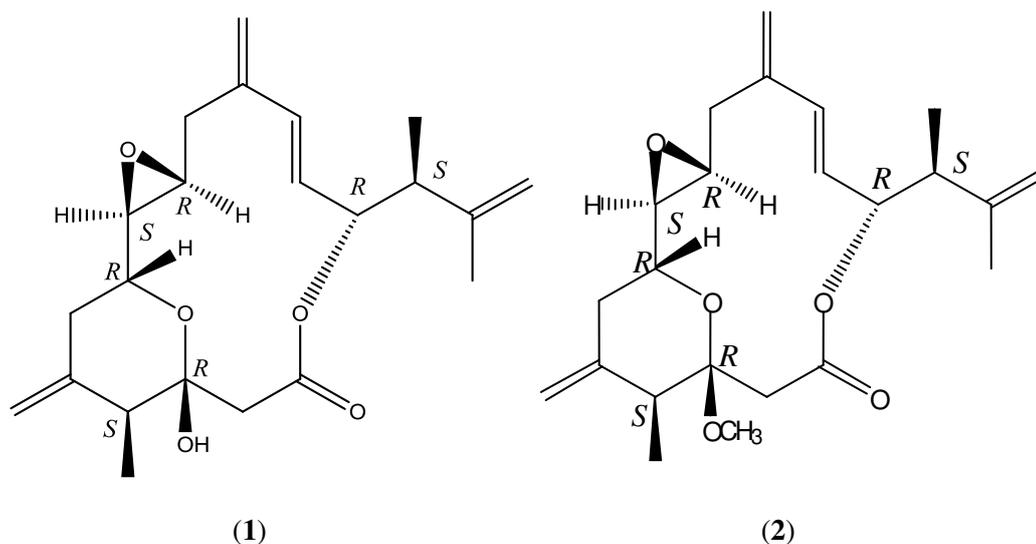
**Figura 18.** Espectro bidimensional de correlação homonuclear  $^1\text{H},^1\text{H}$  TOCSY do composto **2** ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz).



**Figura 19.** Espectro de massas de alto resolução (EMAR-ESI) de SB 2F (**2**).



Com a compilação de todos os dados apresentados observa-se as seguintes estruturas para os compostos **1** e **2**.



O composto **2** é portanto o derivado metoxilado do anfidinolido P, denominado 3-*O*-metilanfidinolido P, segundo Sousa *et al.*, 2015.

**3-*O*-metilanfidinolido P:** óleo incolor, UV (MeOH)  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\epsilon$ ) 225 nm ( $\epsilon$  16,452), 231 nm ( $\epsilon$  18,101), 239 nm (12,095),  $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_5$ .

### 3.1.2 SB 4E e SB 4D

A substância SB 4E (**3**) foi isolada a partir do extrato metanólico de *S. bicolor* por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) segundo a metodologia descrita no item 4.3.3. O espectro de massas de alta resolução de **3** revelou o pico do aduto de sódio  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  com  $m/z$  603,34999 (Figura 22, pág. 50) indicando a fórmula molecular  $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_9\text{Na}^+$  (Calculado 603,35040, erro 0,67 ppm).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 23, pág. 50) revelou seis sinais para hidrogênios ligados a carbonos olefínicos em  $\delta_{\text{H}}$  6,73 (tl; 5,5 Hz); 6,00 (s); 5,71 (dt; 5,7 e 15,0 Hz); 5,58 (dd; 7,5 e 15,0 Hz); 5,04 (s) e 4,82 (s), cinco sinais referentes a hidrogênios metílicos em  $\delta_{\text{H}}$  1,82 (s); 1,40 (s); 1,28 (d; 6,0 Hz); 1,02 (d; 6,5 Hz) e 0,82 (d; 6,5 Hz). Vale destacar que o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  1,82 mostrou correlação, no espectro de HSQC (Figura

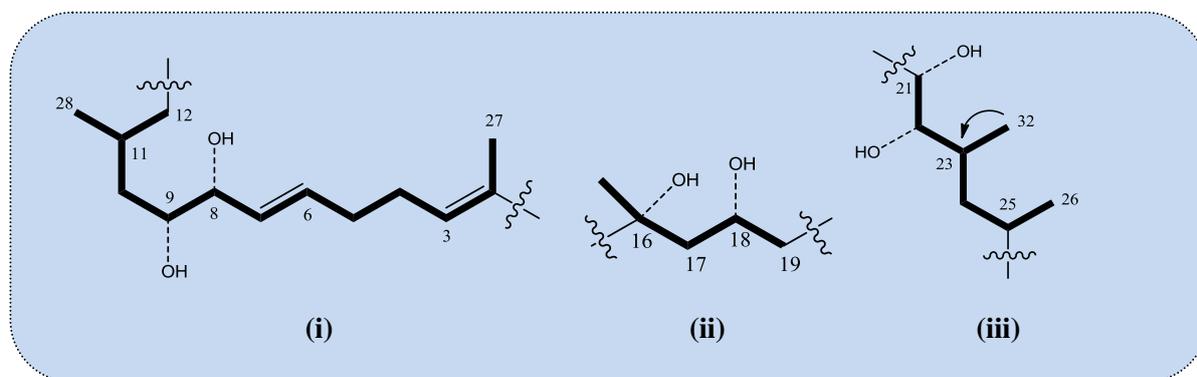
24, pág. 51), com os sinais em  $\delta_C$  12,7 e 14,7 indicando, portanto que são hidrogênios de dois grupos metílicos distintos, totalizando com isso seis grupos metilas.

A combinação dos espectros de HSQC (Figura 24, pág. 51) e HMBC (Figura 28, pág. 54) permitiu definir dois sinais para carbonilas, uma em  $\delta_C$  213,0 atribuído a cetona e a outra em  $\delta_C$  167,0 relativo a éster, oito sinais para carbonos olefínicos em  $\delta_C$  144,5; 143,0; 140,7; 133,7; 129,3; 128,0; 124,0 e 114,9; seis sinais para carbonos metínicos oxigenados em  $\delta_C$  77,1; 76,3; 74,8; 71,5; 68,4 e 66,0. Além de um sinal de carbono oxigenado não hydrogenado em  $\delta_C$  75,4. Também foi observado sinais para sete carbonos metilênicos em  $\delta_C$  46,0; 45,0; 40,0; 39,6; 30,4 e 26,7; sinais para carbonos metínicos em  $\delta_C$  32,8 e 28,1 e por fim cinco sinais referentes a seis carbonos metílicos com  $\delta_C$  28,4; 20,8; 18,3; 15,6; 14,7 e 12,7.

Os valores de deslocamento químico das metilas em  $\delta_C$  12,7 (C-27) e 14,7 (C-30) são compatíveis com metilas ligadas a dupla ligação, enquanto a constante de acoplamento para os prótons H-6 e H-7 ( $J = 15,0$  Hz) sugere a configuração *E* para a dupla ligação C-6/C-7.

Os espectros bidimensionais homonucleares COSY (Figura 25, pág. 52) e TOCSY (Figura 26, pág. 53) exibiram correlações entre alguns sistemas de *spins* que permitiram elaborar os fragmentos estruturais representados na Figura 20 a seguir: (i) correlação dos hidrogênios metílicos H<sub>3</sub>-27 ( $\delta_H$  1,82) para os hidrogênios metilênicos H<sub>2</sub>-12 ( $\delta_H$  2,14 e 1,98), (ii) dos hidrogênios metílicos H<sub>3</sub>-31 ( $\delta_H$  1,40) para os hidrogênios metilênicos H<sub>2</sub>-17 ( $\delta_H$  1,95 e 1,75) e (iii) do hidrogênio metínico H-21 ( $\delta_H$  4,36) para os hidrogênios metílicos H<sub>3</sub>-26 ( $\delta_H$  1,28).

**Figura 20.** Fragmentos estruturais dos principais acoplamentos observados nos espectros homonucleares  $^1H$ ,  $^1H$  TOCSY e COSY do composto **3**.



—  $^1H$ - $^1H$  COSY & TOCSY

O espectro HMBC (Figura 28, pág. 54) foi fundamental para determinar a conectividade entre as estruturas parciais propostas, por exemplo, a correlação dos hidrogênios metilênicos H<sub>2</sub>-12 ( $\delta_H$  2,14 e 1,98) com os carbonos olefínicos C-13 ( $\delta_C$  144,5) e C-14 ( $\delta_C$  124,5), e do hidrogênio olefínico H-14 ( $\delta_H$  6,00) com o carbono oxigenado não hidrogenado C-16 ( $\delta_C$  75,4) foram importantes para conectar a subestrutura i a ii. De maneira semelhante, a correlação dos hidrogênios metilênicos H<sub>2</sub>-19 ( $\delta_H$  2,90 e 2,79) com o carbono da carbonila de cetona C-20 ( $\delta_C$  213,0) e do hidrogênio metínico oxigenado H-21 ( $\delta_H$  4,36) com o carbono C-20 ( $\delta_C$  213,0) foram essenciais para ligar as subestruturas ii e iii. Já as subunidades i e iii foram conectadas através das correlações dos hidrogênios metílicos H<sub>3</sub>-27 ( $\delta_H$  1,82) e do hidrogênio metínico H-25 ( $\delta_H$  5,07) com C-21 ( $\delta_C$  77,1).

Com isso chegou-se a estrutura do composto **3** (Figura 21, pág. 49) cujos sistemas de *spin* sugeridos pelo COSY (Figura 25, pág. 52) e TOCSY (Figura 26, pág. 53) e as correlações a longa distância apresentadas pelo espectro de HMBC (Figura 28, pág. 54), estão também representadas.

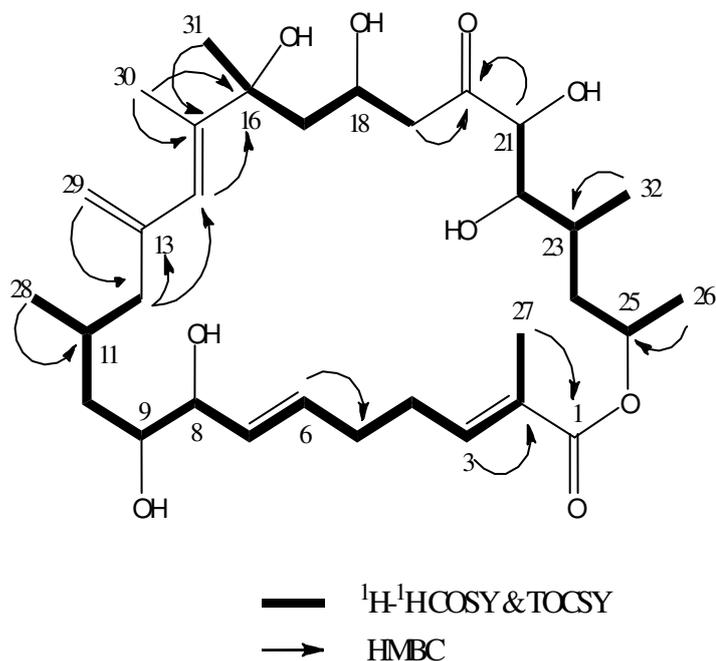
**Tabela 4.** Deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (HSQC) para o composto **3** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) e RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) do seu análogo anfidinólido B<sup>a</sup>.

N <sup>o</sup>	(3)	Anfidinólido B	
	$\delta_{\text{H}}$ (J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	-	167,4	167,7
2	-	128,0	128,3
3	6,73 (tl; 5,5)	140,7	139,9
4	2,27 <sup>b</sup>	26,7	26,8
	2,36 <sup>b</sup>		
5	2,28 <sup>b</sup>	30,4	30,8
6	5,71 (dt; 5,7; 15,0)	133,7	135,4
7	5,58 (dd; 7,5; 15,0)	129,3	128,5
8	3,82 (dd; 5,0; 7,5)	76,3	60,0
9	3,63 (m)	71,5	59,3
10	1,25 <sup>b</sup>	40,0	39,4
	1,30 <sup>b</sup>		
11	1,67 <sup>b</sup>	28,1	29,1
12	1,98 <sup>b</sup>	46,0	46,7
	2,14 (dd; 5,0; 13,5)		
13	-	144,5	144,4
14	6,00 (s)	124,5	124,3
15	-	143,0	143,1
16	-	75,4	75,9
17	1,75 (dd; 5,1; 14,5)	45,0	45,2
	1,95 <sup>b</sup>		
18	4,22 (m)	66,0	66,5
19	2,79 (dd; 8,8; 15,5)	46,0	45,9
	2,90 (dl; 15,5)		
20	-	213,0	212,4
21	4,36 (s)	77,1	77,7
22	3,72 (dl; 7,2)	74,8	75,5
23	1,88 <sup>b</sup>	32,8	33,2
24	1,93 <sup>b</sup>	39,6	39,3
25	5,07 (m)	68,4	68,3
26	1,28(d; 6,0)	20,8	21,0
27	1,82 (s)	12,7	12,4
28	0,82 (d; 6,5)	18,3	18,2
29	4,82 (s)	114,9	114,8
	5,04 (s)		
30	1,82 (s)	14,7	15,6
31	1,40 (s)	28,4	28,3
32	1,02 (d; 6,5)	15,6	15,0

<sup>a</sup> Bauer *et al.*, 1994.

<sup>b</sup> Sobreposição de sinais.

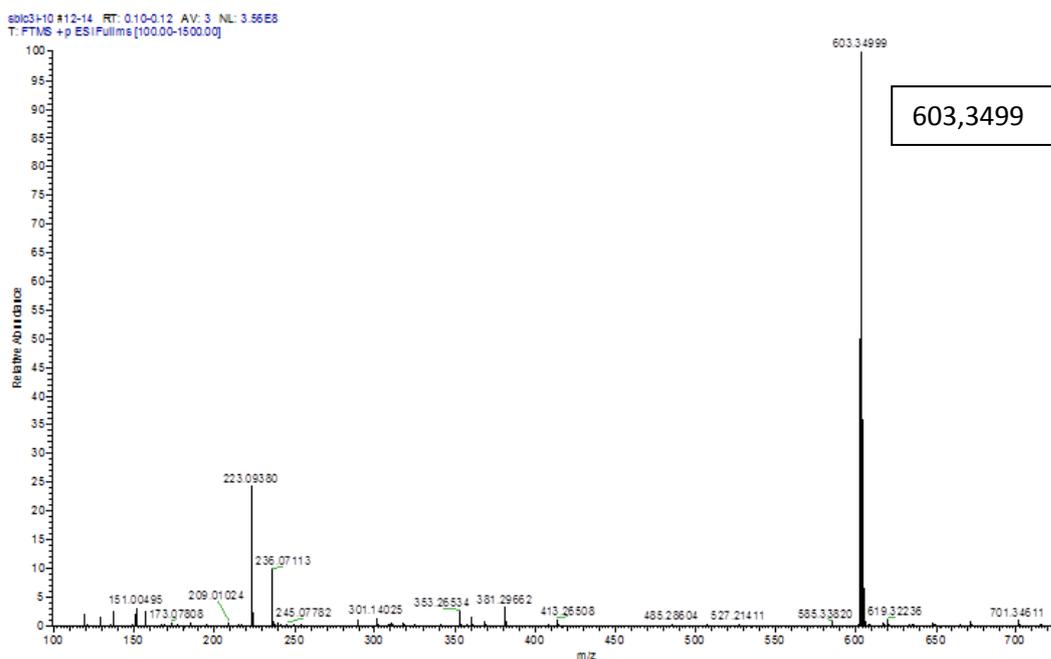
**Figura 21.** Correlações observadas em RMN 2D  $^1\text{H},^1\text{H}$  COSY, TOCSY e  $^1\text{H},^{13}\text{C}$  HMBC apresentadas pelo composto **3**.



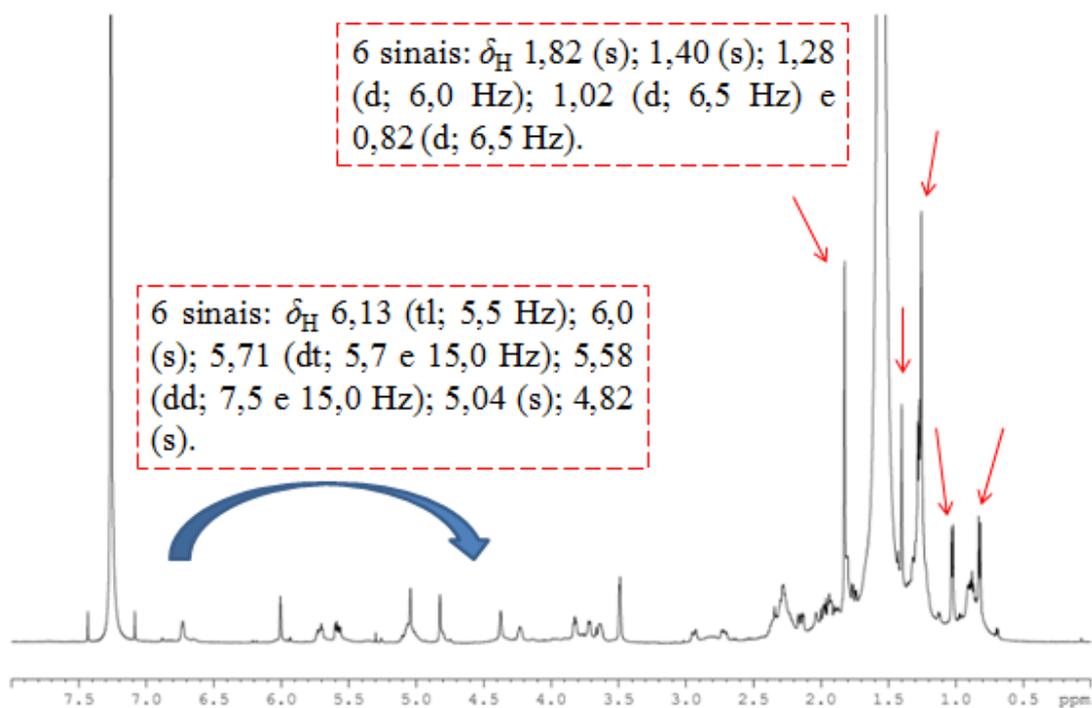
Os dados espectroscópicos mostrados na Tabela 4, página 48, bem como as correlações observadas nos espectros bidimensionais COSY (Figura 25, pág. 52), TOCSY (Figura 26, pág. 53) e HMBC (Figura 28, pág. 54), indicam uma grande similaridade com o anfidinolido B descrito por Bauer *et al.*, 1994; tendo com principal diferença a presença do sistema 1,2 diol para o composto **3** em substituição ao epóxido em C-8 e C-9 no anfidinolido B. Não há relatos na literatura de algum composto com essa estrutura determinada.

Os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  e de  $^1\text{H}$ , incluindo os valores das constantes de acoplamento nos leva a considerar que a configuração relativa do segmento entre os carbonos C-16 a C-26 seja igual ao do anfidinolido B.

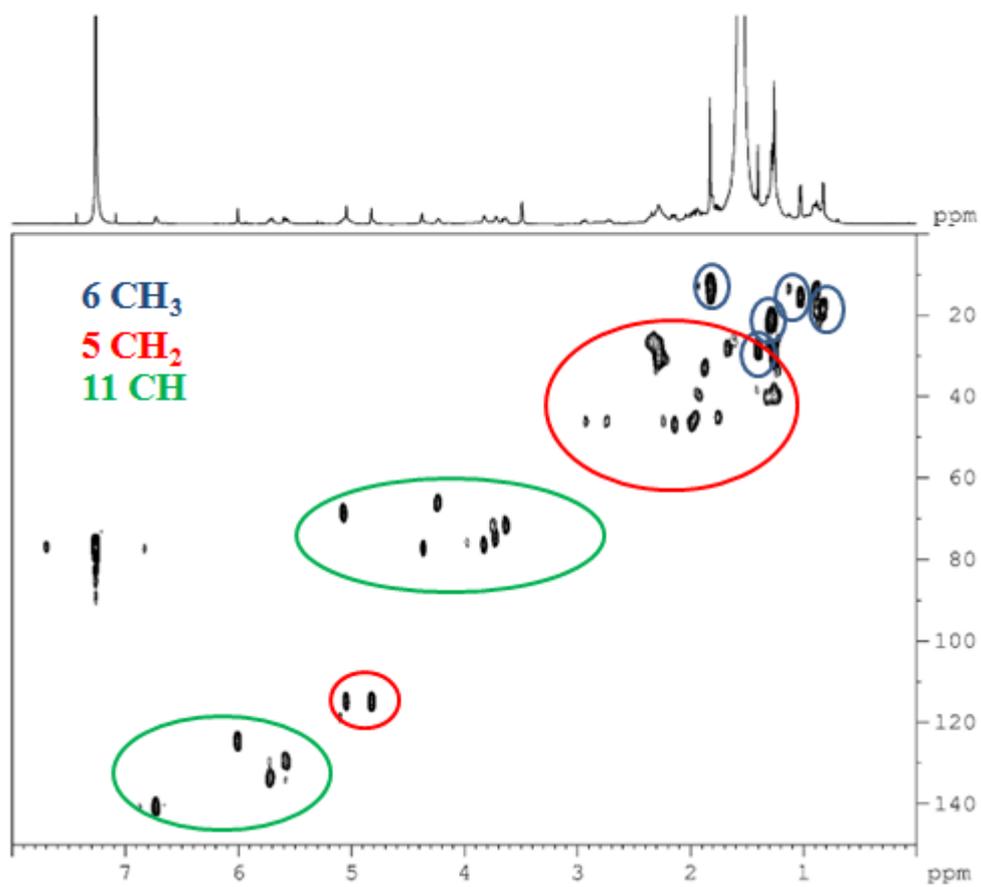
**Figura 22.** Espectro de massa de alta resolução do composto **3**.



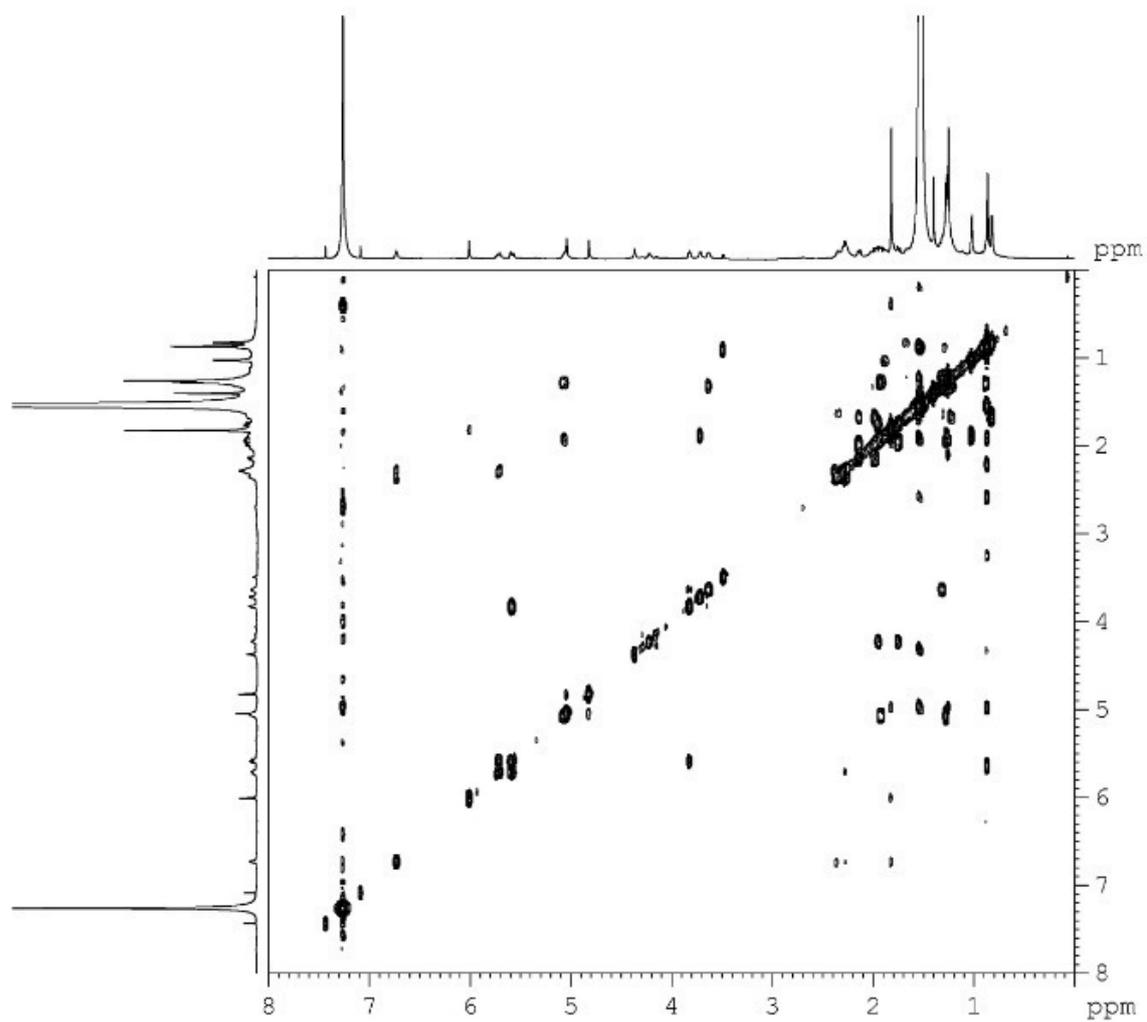
**Figura 23.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **3** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz).



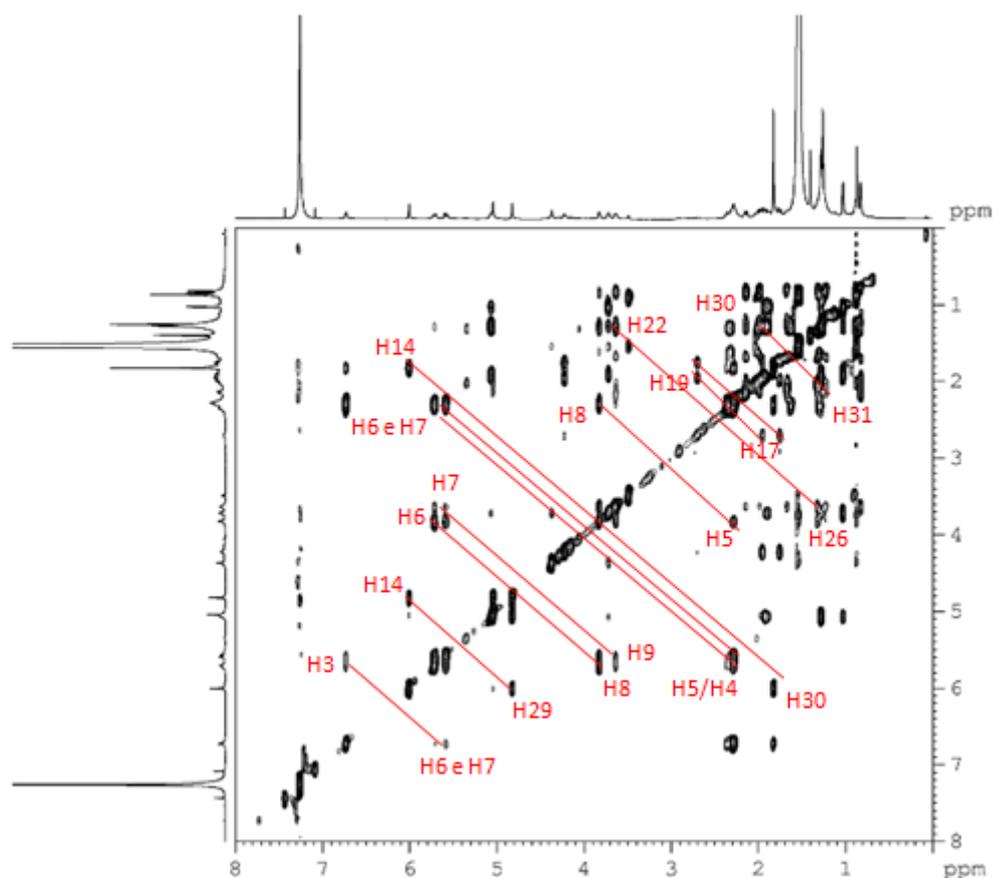
**Figura 24.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (HSQC) do composto **3** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz).



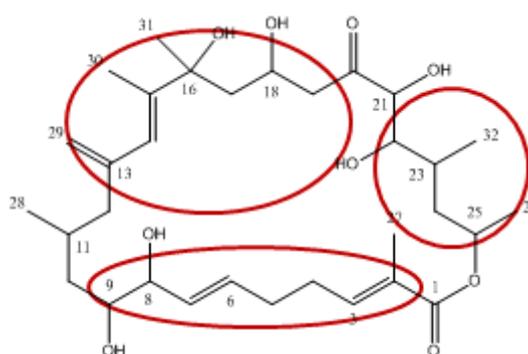
**Figura 25.** Espectro de correlação homonuclear  $^1\text{H},^1\text{H}$  COSY do composto **3** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz).



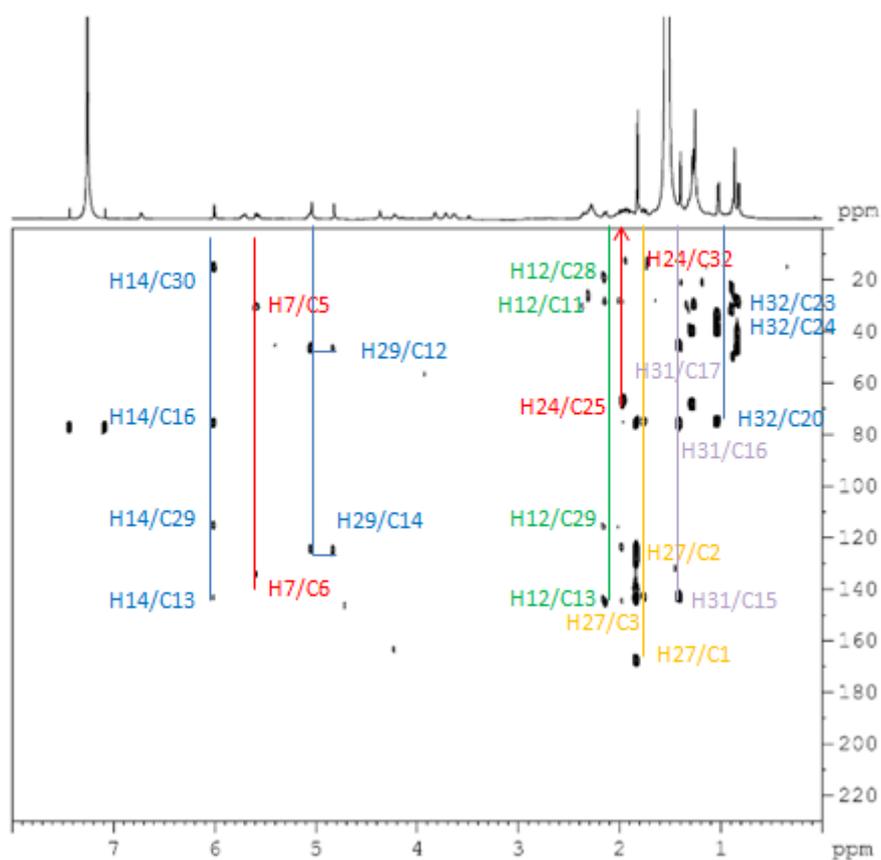
**Figura 26.** Espectro de correlação homonuclear  $^1\text{H}, ^1\text{H}$  TOCSY do composto **3** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz).



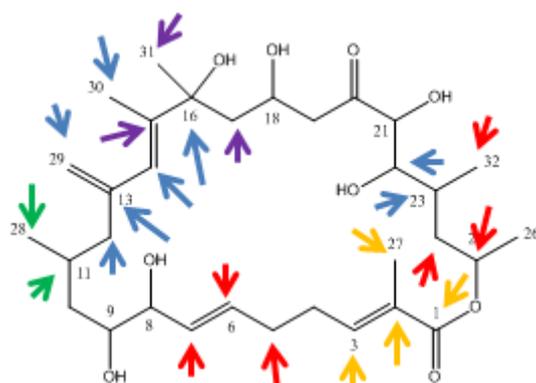
**Figura 27.** Correlações observadas no espectro  $^1\text{H}, ^1\text{H}$  TOCSY ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) do composto **3**.



**Figura 28.** Espectro de correlação heteronuclear  $^1\text{H},^{13}\text{C}$  HMBC do composto **3** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz).

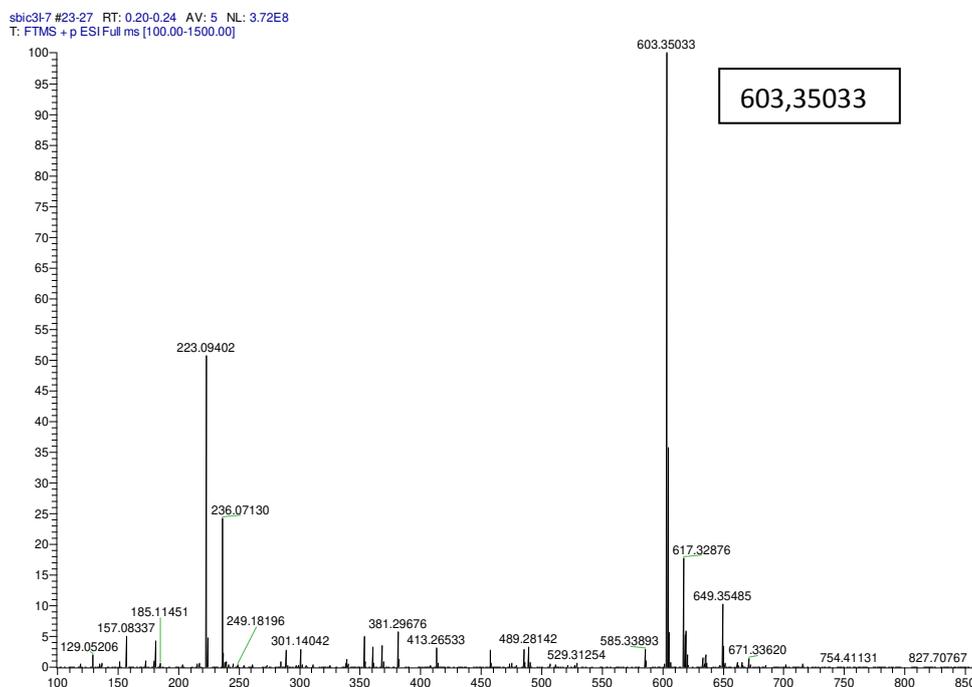


**Figura 29.** Correlações observadas no espectro  $^1\text{H},^{13}\text{C}$  HMBC ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) do composto **3**.



A substância SB 4D (**4**) apresentou o mesmo valor de  $m/z$  que o composto **3** no espectro de alta resolução EMAR, Figura 30, logo também sugere-se a fórmula molecular  $C_{32}H_{52}O_9$ .

**Figura 30.** Espectro de massa de alta resolução do composto **4**.



Os dados de RMN  $^1H$  (Figura 32, pág. 57) e  $^{13}C$  HSQC (Figura 33, pág. 58) mostrados na Tabela 5, página 56, são muito similares ao do composto **3**.

Os valores de deslocamento químico e constante de acoplamento, bem como a análise dos espectros bidimensionais de COSY (Figura 34, pág. 58), TOCSY (Figura 36, pág. 59) e HMBC (Figura 37, pág. 60), mostram que a dupla ligação antes existente nos carbonos C-6 ( $\delta_C$  133,7) e C-7 ( $\delta_C$  129,3) no composto **3**, passa a estar presente agora nos carbonos C-7 ( $\delta_C$  133,4) e C-8 ( $\delta_C$  134,2) no composto **4**. Além disso, a hidroxila até então no carbono C-8 ( $\delta_C$  76,3) no composto **3**, agora está no carbono C-6 ( $\delta_C$  71,7) no composto **4**.

O grupo metileno de C-10 ( $\delta_C$  43,8) mostra acoplamento escalar com o próton oxigenado H-9 ( $\delta_H$  4,19), assim como correlação com o próton olefínico H-8 ( $\delta_H$  5,6). Como também o próton olefínico H-7 ( $\delta_H$  5,7) se correlaciona com H-6 ( $\delta_H$  4,12) carbinólico e com o grupo metilênico em carbono C-5 ( $\delta_C$  35,4), corroborando para a estrutura proposta para o composto **4**, apresentada a seguir (Figura 31, pág. 57) com as correlações observadas nos espectros bidimensionais.

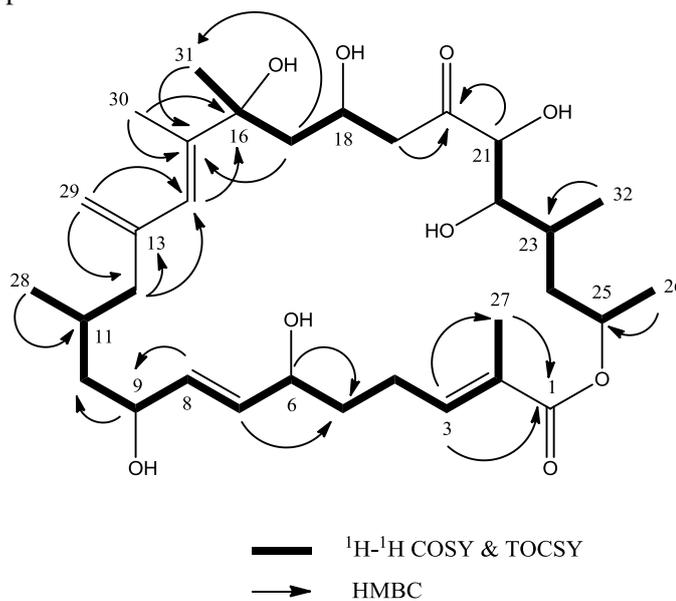
**Tabela 5.** Deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (HSQC) para o composto **3** e composto **4** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) e RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) do seu análogo anfidinólido B<sup>a</sup>.

Nº	(3)		(4)		Anfidinólido B
	$\delta_{\text{H}}$ (J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	-	167,4	-	168,3	167,7
2	-	128,0	-	128,0	128,3
3	6,73 (tl; 5,5)	140,7	6,8 (t; 7,0)	143,0	139,9
4	2,27 <sup>b</sup>	26,7	2,29 <sup>b</sup>	24,3	26,8
	2,36 <sup>b</sup>				
5	2,28 <sup>b</sup>	30,4	1,74 <sup>b</sup>	35,4	30,8
			1,82 <sup>b</sup>		
6	5,71 (dt; 5,7; 15,0)	133,7	4,12 <sup>b</sup>	71,7	135,4
7	5,58 (dd; 7,5; 15,0)	129,3	5,7 (m)	133,4	128,5
8	3,82 (dd; 5,0; 7,5)	76,3	5,6 (dd;6,4; 14,0)	134,2	60,0
9	3,63 (m)	71,5	4,19 <sup>b</sup>	70,2	59,3
10	1,25 <sup>b</sup>	40,0	1,52 <sup>b</sup>	43,8	39,4
	1,30 <sup>b</sup>		1,24 <sup>b</sup>		
11	1,67 <sup>b</sup>	28,1	1,64 <sup>b</sup>	27,7	29,1
12	1,98 <sup>b</sup>	46,0	1,90 <sup>b</sup>	45,6	46,7
	2,14 (dd; 5,0; 13,5)		2,14 (dd; 5,0; 13,5)		
13	-	144,5	-	144,2	144,4
14	6,00 (s)	124,5	5,95 (s)	123,9	124,3
15	-	143,0	-	143,0	143,1
16	-	75,4	-	75,9	75,9
17	1,75 (dd; 5,1; 14,5)	45,0	1,79 <sup>b</sup>	45,0	45,2
	1,95 <sup>b</sup>				
18	4,22 (m)	66,0	4,33 (m)	66,1	66,5
19	2,79 (dd; 8,8; 15,5)	46,0	2,68(dd; 3,6; 15,5)	45,5	45,9
	2,90 (dl;15,5)		2,88 (dd; 7,8; 15,5)		
20	-	213,0	-	211,9	212,4
21	4,36 (s)	77,1	4,29 (s)	78,1	77,7
22	3,72 (dl; 7,2)	74,8	3,78 (dl; 6,4)	74,7	75,5
23	1,88 <sup>b</sup>	32,8	1,82 <sup>b</sup>	34,7	33,2
24	1,93 <sup>b</sup>	39,6	1,39 <sup>b</sup>	40,3	39,3
			1,88 <sup>b</sup>		
25	5,07 (m)	68,4	5,10 (m)	69,3	68,3
26	1,28(d; 6,0)	20,8	1,29 (d; 6,0)	20,7	21,0
27	1,82 (s)	12,7	1,82 (s)	12,3	12,4
28	0,82 (d; 6,5)	18,3	0,85 (d; 6,5)	19,2	18,2
29	4,82 (s)	114,9	4,80 (s)	114,7	114,8
	5,04 (s)		5,00 (s)		
30	1,82 (s)	14,7	1,80 (s)	14,8	15,6
31	1,40 (s)	28,4	1,39 (s)	28,5	28,3
32	1,02 (d; 6,5)	15,6	1,05 (d; 6,5)	16,0	15,0

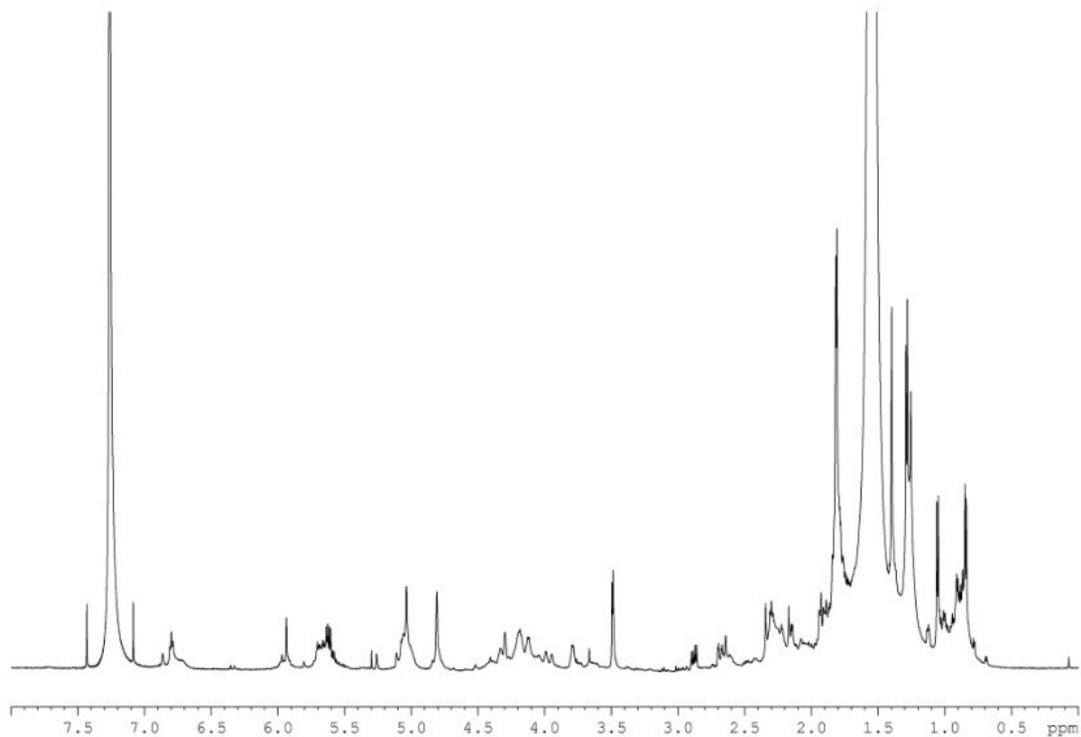
<sup>a</sup> Bauer *et al.*, 1994.

<sup>b</sup> Sobreposição de sinais.

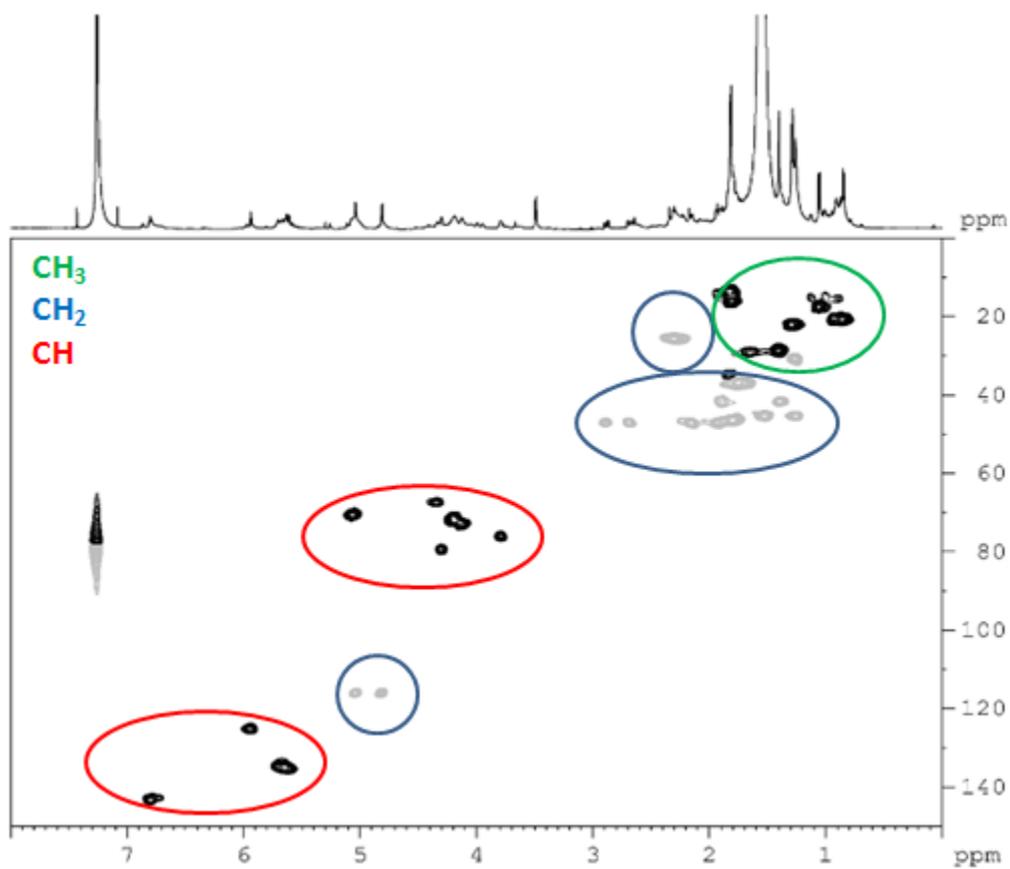
**Figura 31.** Correlações observadas em RMN 2D  $^1\text{H}$ , $^1\text{H}$  COSY, TOCSY e  $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$  HMBC apresentadas pelo composto **4**.



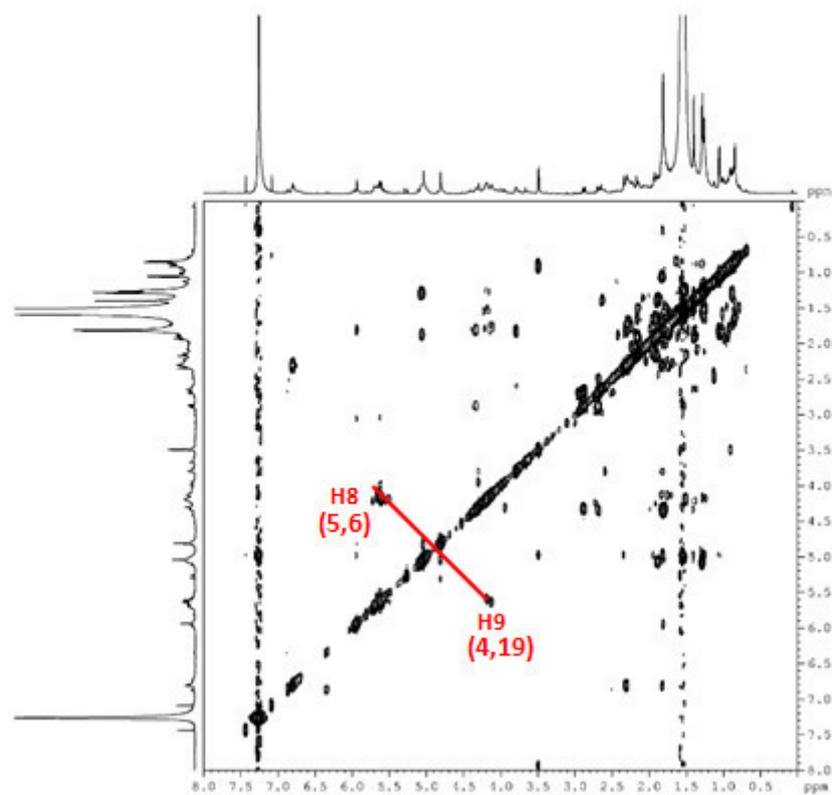
**Figura 32.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **4** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz).



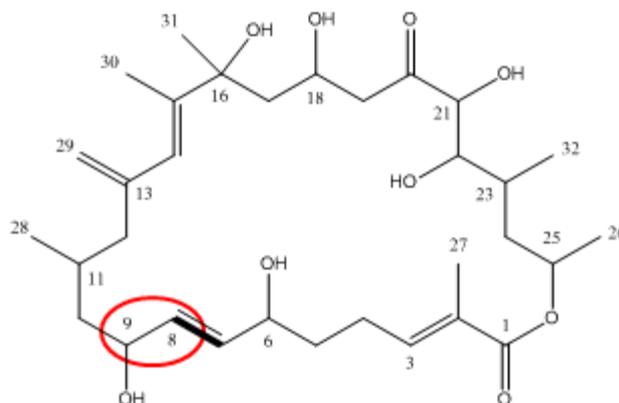
**Figura 33.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (HSQC) do composto **4** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz).



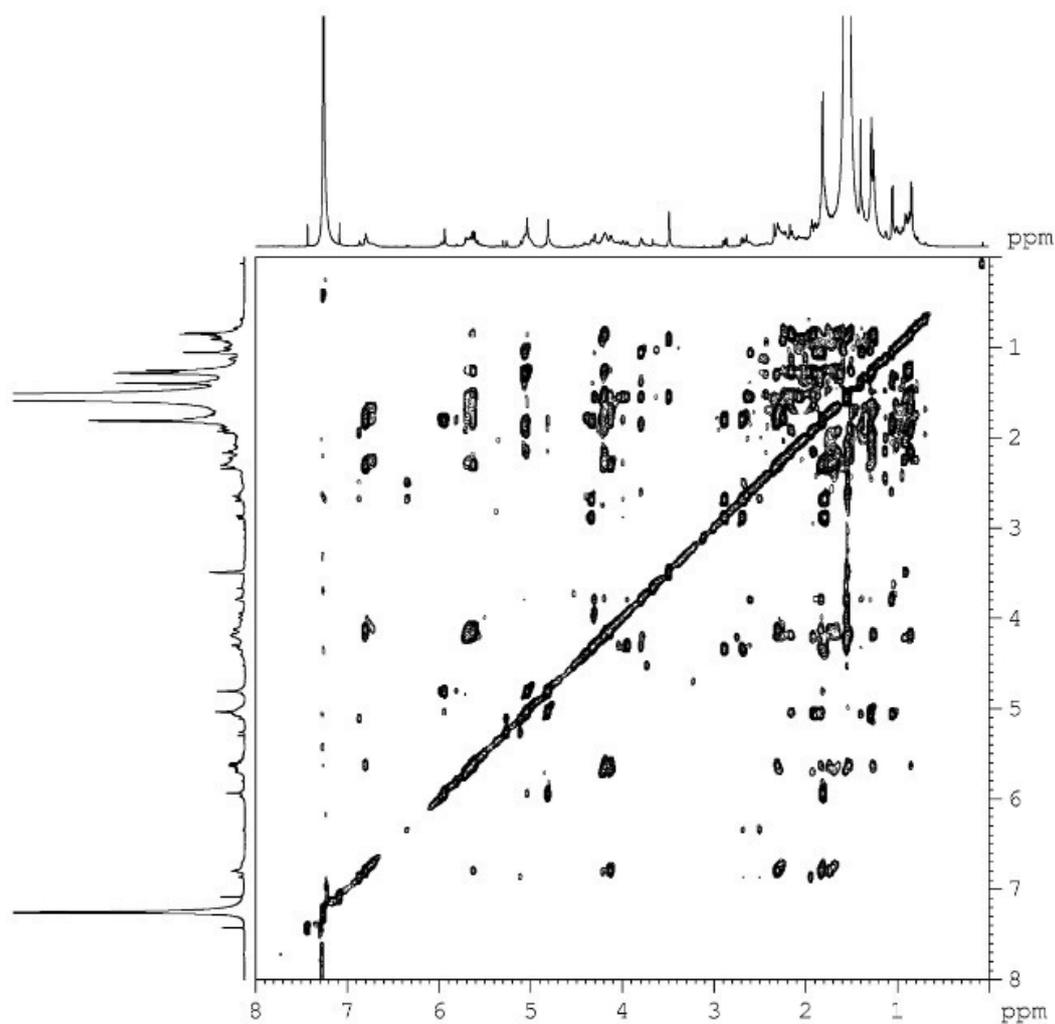
**Figura 34.** Espectro de correlação homonuclear  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY do composto **4** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz).



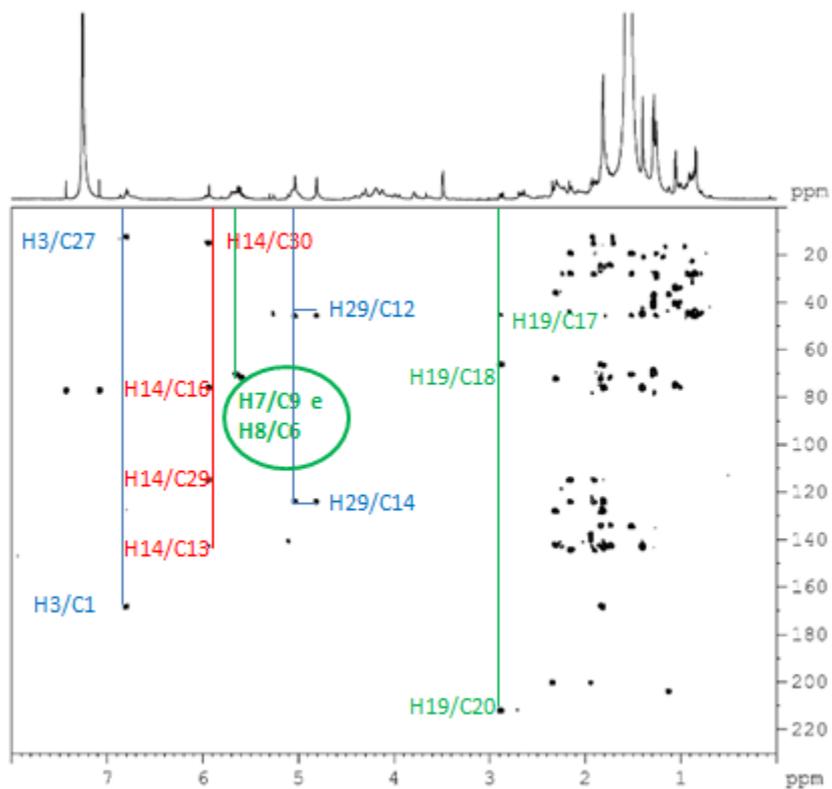
**Figura 35.** Correlação apresentada no  $^1\text{H}, ^1\text{H}$  COSY ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) do composto **4** que o diferencia do composto **3**.



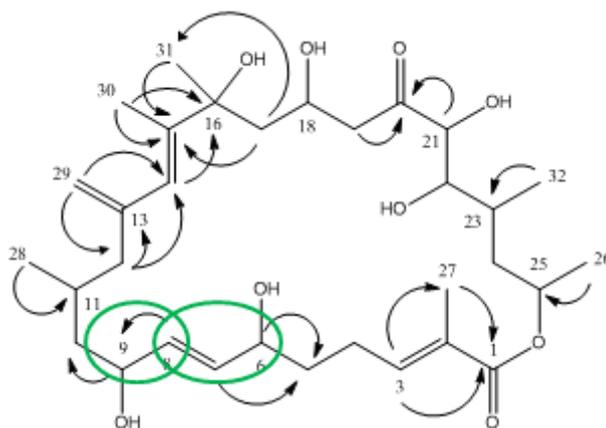
**Figura 36.** Espectro de correlação homonuclear  $^1\text{H}, ^1\text{H}$  TOCSY do composto **4** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz).



**Figura 37.** Espectro de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC do composto **4** ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz).

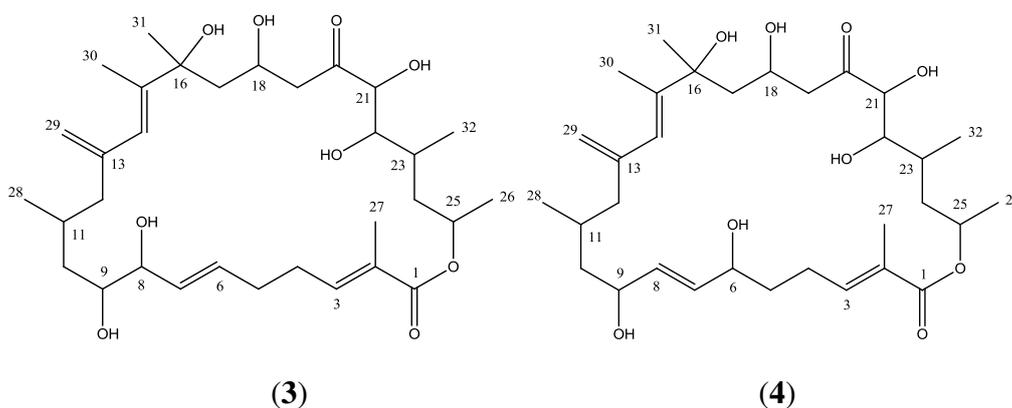


**Figura 38.** Correlação apresentada no  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) do composto **4** que o diferencia do composto **3**.



A figura 39 mostra as substâncias SB 4E denominada de composto **3** e a SB 4D denominada de composto **4** como análogos do anfidinólido B descrito por Bauer *et al.*,1994. As mesmas receberam a nomenclatura de anfidinólido B8 e B9 respectivamente, sendo até o momento descrito pela primeira vez, estes nomes seguem a proposta por Prof. J. Kobayashi um dos pioneiros nas descobertas sobre essa classe de compostos como visto em Kobayashi e Tsuda, 2004; Kobayashi, 2008.

**Figura 39.** Estruturas dos anfidinólido B8 (**3**) e anfidinólido B9 (**4**).



**Anfidinólido B8:** sólido amorfo branco,  $[\alpha]_D^{20}$  -21,2 (*c* 0,2; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\epsilon$ ) 205 nm ( $\epsilon$  2323), 221 nm ( $\epsilon$  2612). C<sub>32</sub>H<sub>52</sub>O<sub>9</sub>.

**Anfidinólido B9:** sólido amorfo branco,  $[\alpha]_D^{20}$  -16,3 (*c* 0,5; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\epsilon$ ) 206 nm ( $\epsilon$  5065), 221 nm ( $\epsilon$  6380). C<sub>32</sub>H<sub>52</sub>O<sub>9</sub>.

### 3.1.3 SB 4M

A substância SB 4M (**5**) foi isolada a partir do extrato metanólico do *S. bicolor* por CLAE, segundo metodologia descrita no item 4.3.3. O espectro de massa de alta resolução EMAR (Figura 43, pág. 67) de **5** apresentou um pico de *m/z* 707,41522 para o aduto de sódio  $[M + Na]^+$  indicando a fórmula molecular C<sub>40</sub>H<sub>60</sub>O<sub>9</sub>Na<sup>+</sup> (calculada 707,41295; erro 3,20 ppm) com índice de deficiência de hidrogênios igual a onze.

O espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 44, pág. 67) revelou a presença de oito sinais de hidrogênios olefínicos em  $\delta_H$  6,71 (dd; 10,9 e 14,9 Hz); 6,20 (d; 11,4 Hz); 5,88 (s); 5,58 (dd; 7,1 e 14,9 Hz); 5,18 (s); 5,03 (s); 4,90 (s) e 4,89 (s), seis sinais para hidrogênios

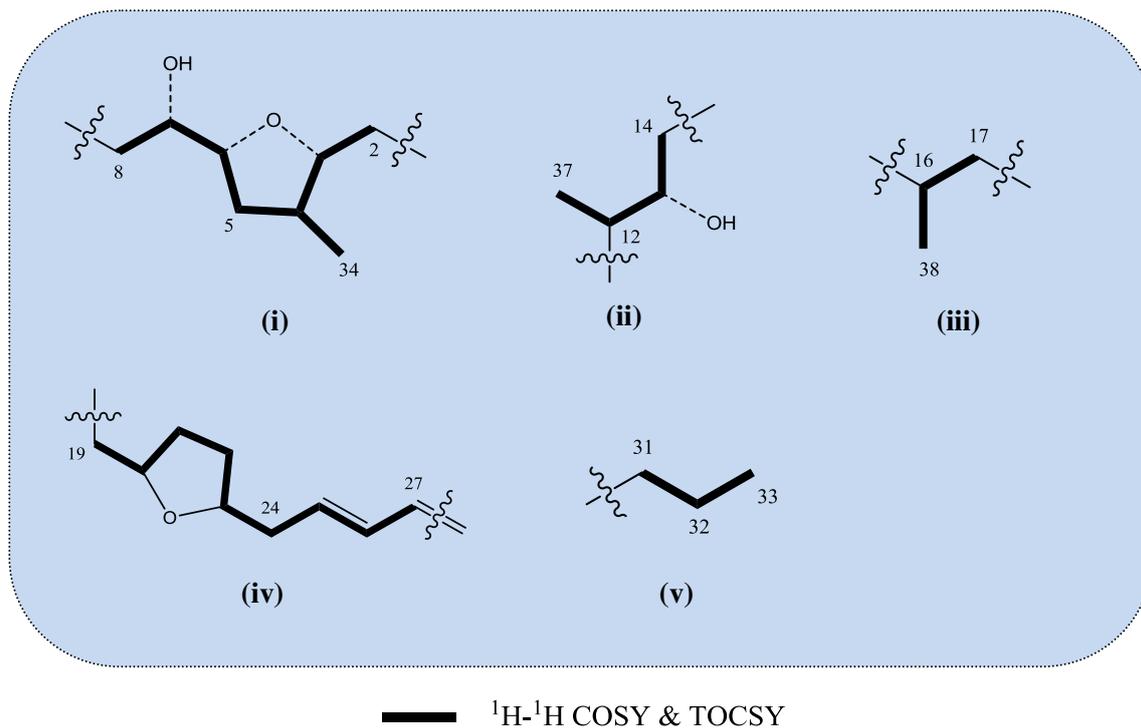
metílicos em  $\delta_H$  1,81 (s); 1,60 (s); 1,04 (d; 7,0 Hz); 1,00 (d; 7,0 Hz); 0,8 (t; 7,3 Hz) e 0,7 (d; 6,6 Hz).

A análise do espectro de RMN  $^1H$ ,  $^{13}C$  HMBC (Figura 48, pág. 71) destaca três sinais de carbonilas em  $\delta_C$  214,8 e 207,4 atribuídos a cetonas e  $\delta_C$  171,1 de éster, dez sinais para carbonos olefínicos em  $\delta_C$  150,0; 143,9; 140,4; 139,8; 130,3; 128,1; 127,8; 125,2; 114,9; 110,0; oito sinais para carbonos metínicos oxigenados em  $\delta_C$  82,0; 81,2; 80,0; 79,6; 76,8; 75,6; 71,6 e 71,0. Há também três sinais para carbonos metínicos não oxigenados com  $\delta_C$  49,0; 43,3 e 40,4; nove sinais em  $\delta_C$  48,5; 45,6; 42,2; 40,5; 34,2; 33,2; 32,4; 28,40; 21,3 para dez carbonos metilênicos e por fim seis sinais para carbonos metílicos em  $\delta_C$  16,0; 15,9; 15,5; 15,4; 14,3 e 12,8.

Todos estes sinais contabilizados levam a dez das onze insaturações sugeridas pela fórmula molecular proposta. Tomando como base a estrutura de um anfidinólido em virtude dos compostos isolados até então do extrato metanólico do *S. bicolor* a última insaturação foi associada a um anel lactona de um macrolídeo.

As correlações exibidas nos espectros bidimensionais COSY (Figura 46, pág. 69) e TOCSY (Figura 47, pág. 70) possibilitou a formação de cinco sistemas de *spins* representados pelos fragmentos estruturais mostrados na Figura 40: (i) correlação dos hidrogênios metilênicos H<sub>2</sub>-2 de ( $\delta_H$  2,43 e 2,30) para os metilênicos H<sub>2</sub>-8 em ( $\delta_H$  2,26 e 2,12); (ii) dos hidrogênios metílicos H<sub>3</sub>-37 em ( $\delta_H$  1,04) para os metilênicos H<sub>2</sub>-14 em ( $\delta_H$  2,39 e 2,71); (iii) dos hidrogênios metílicos H<sub>3</sub>-38 em ( $\delta_H$  1,00) para os metilênicos H<sub>2</sub>-17 ( $\delta_H$  2,33 e 2,92); (iv) dos hidrogênios metilênicos H<sub>2</sub>-19 ( $\delta_H$  2,16 e 2,49) para o hidrogênio olefínico H-27 ( $\delta_H$  6,20) e (v) dos hidrogênios metilênicos H<sub>2</sub>-31 ( $\delta_H$  1,80 e 1,89) para os metílicos H<sub>3</sub>-33 em ( $\delta_H$  0,8).

**Figura 40.** Fragmentos estruturais dos principais acoplamentos observados nos espectros homonucleares  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  TOCSY e COSY do composto **5**.

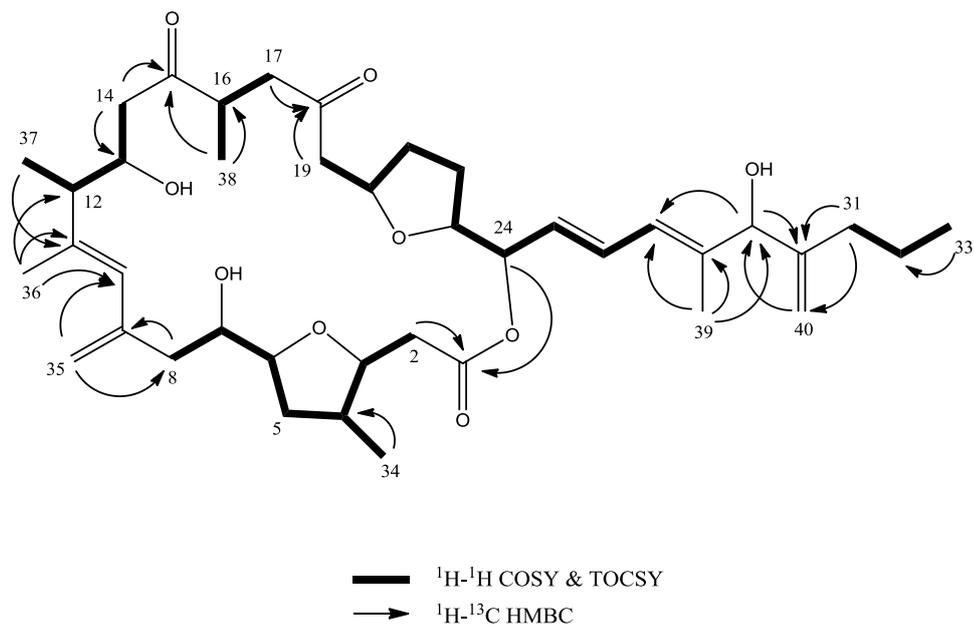


As correlações mostradas no espectro HMBC (Figura 48, pág. 71) e nos espectros bidimensionais COSY (Figura 46, pág. 69) e TOCSY (Figura 47, pág. 70) permitiram determinar a conectividade entre as estruturas parciais propostas, como por exemplo, as correlações entre os hidrogênios metilênicos  $\text{H}_2$ -8 ( $\delta_{\text{H}}$  2,12 e 2,26) com o carbono olefínico C-9 ( $\delta_{\text{C}}$  143,9) e os hidrogênios metílicos  $\text{H}_3$ -37 ( $\delta_{\text{H}}$  1,04) com o carbono olefínico C-11 em ( $\delta_{\text{C}}$  139,8) possibilitando a conectividade entre a subestrutura i e ii; já as correlações entre os hidrogênios metilênicos  $\text{H}_2$ -14 ( $\delta_{\text{H}}$  2,39 e 2,71) e os hidrogênios metílicos  $\text{H}_3$ -38 ( $\delta_{\text{H}}$  1,00) com a carbonila C-15 em ( $\delta_{\text{C}}$  214,8) permite a conectividade das subestruturas ii e iii; já a conectividade entre as subestruturas iii e iv deve-se a correlação entre os hidrogênios metilênicos  $\text{H}_2$ -17 ( $\delta_{\text{H}}$  2,33 e 2,92) e  $\text{H}_2$ -19 ( $\delta_{\text{H}}$  2,16 e 2,49) com a carbonila de cetona C-18 em ( $\delta_{\text{C}}$  207,4), esta análise ainda permite a conectividade entre as subestruturas iv e v devido às correlações entre os hidrogênios metílicos  $\text{H}_3$ -39 ( $\delta_{\text{H}}$  1,60) com os carbonos olefínicos C-27 em ( $\delta_{\text{C}}$  125,2) bem como a correlação entre os hidrogênios metilênicos  $\text{H}_2$ -31 ( $\delta_{\text{H}}$  1,80 e 1,89) com os carbonos olefínicos C-30 em ( $\delta_{\text{C}}$  150,0) e C-40 ( $\delta_{\text{C}}$  110,0) e por fim as correlações entre os hidrogênios metilênicos  $\text{H}_2$ -2 em ( $\delta_{\text{H}}$  2,30 e 2,43) e do hidrogênio metínico H-24 em ( $\delta_{\text{H}}$

5,74) com a carbonila de éster C-1 em ( $\delta_C$  171,1) permite conectar as subestruturas i e iv.

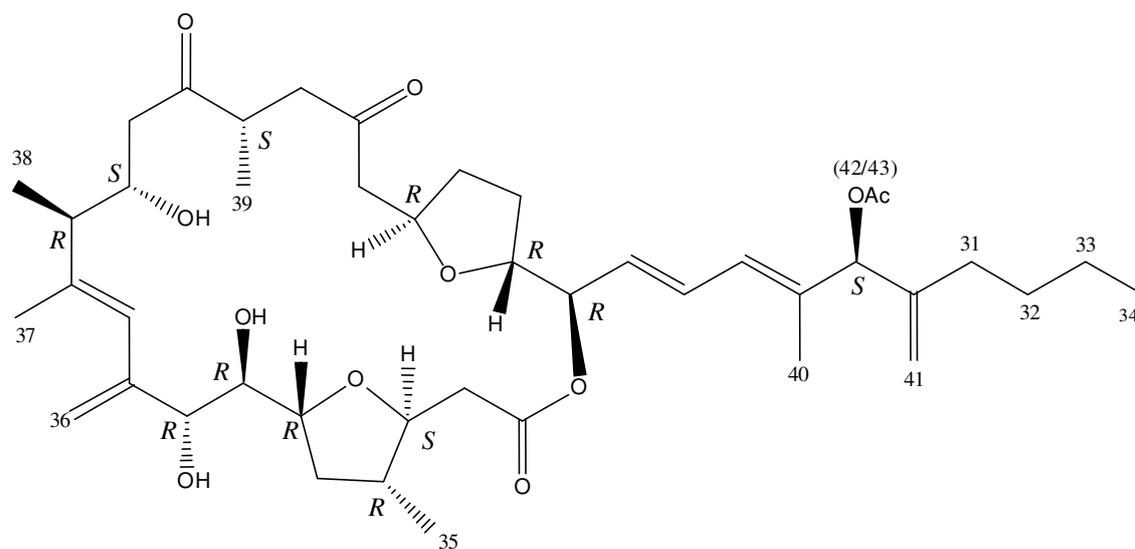
Todas as correlações apresentadas pelo espectro de HMBC (Figura 48, pág. 71) bem como os sistemas de spins sugeridos pela interpretação dos espectros de COSY (Figura 46, pág. 69) e TOCSY (Figura 47, pág. 70) leva a elaboração da estrutura descrita na Figura 41.

**Figura 41.** Sistemas de *spins* e correlações para o composto 5.



A estrutura resultante observada na Figura 41 é bastante similar ao anfidinolído C2 (Figura 42, pág. 65) mostrado a seguir descrito por Kubota *et al*, 2004; um macrolídeo de 25 membros que se diferem pela cadeia alquila lateral do segmento C31-C33, ausência do 1,2 diol no anel da lactona, pela falta da hidroxila no carbono C-8 e por fim, pela hidroxila no carbono C-29 ao invés do grupo acetila ( $\text{COCH}_3$ ) apresentado no anfidinolido C2. Os dados de deslocamento químico dos dois compostos, (5) e o anfidinolido C2, podem ser comparados ao observar a Tabela 6, página 66.

**Figura 42.** Estrutura do anfidinolido C2 segundo Kubota et al., 2004.



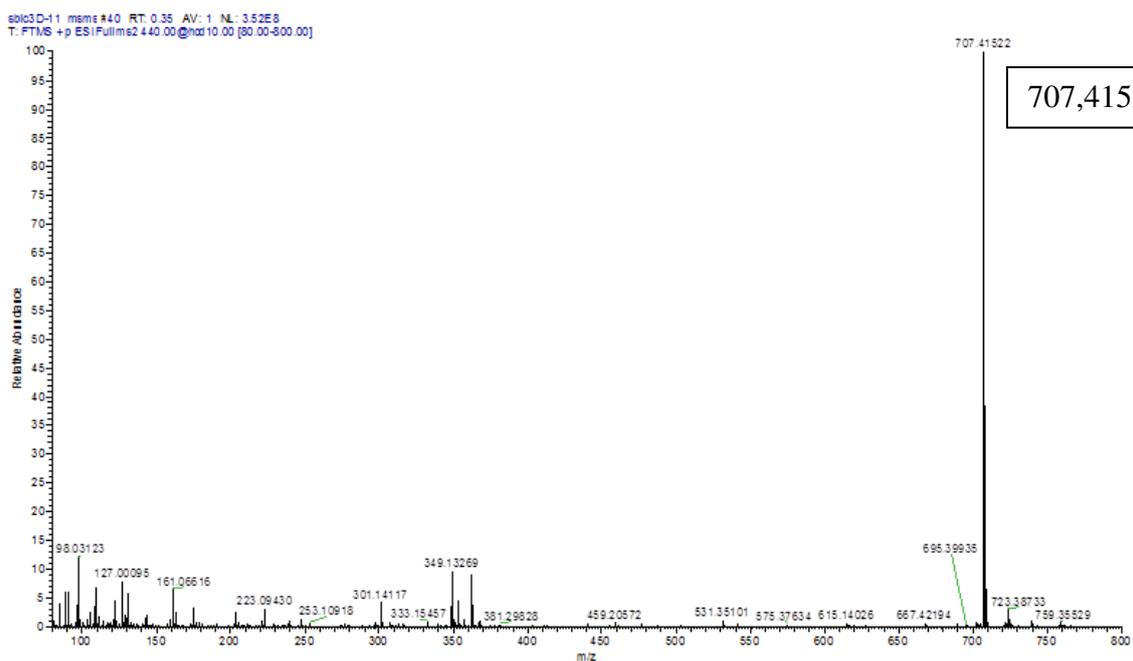
**Tabela 6.** Deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (HSQC) para o composto **5** ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz) e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz) do seu análogo anfidinolido C2.

Nº	(5)		Anfidinolido C2	
	$\delta_{\text{H}}$ (J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	-	171,1	-	171,13
2	2,30 (dd; 2,6; 15,9)	40,5	2,50 (dd; 8,2; 14,9)	48,72
	2,43 (dd; 6,8; 15,6)		3,00 (dd; 8,5; 17,6)	
3	3,98 (m)	82,0	3,89 (dt; 2,5; 9,4)	81,73
4	1,43 (m)	40,4	1,53 (m)	40,12
5	1,57 (m)	33,2	1,45 (m)	37,06
	1,61 (m)		1,86 (m)	
6	3,73 (m)	81,2	4,09 (m)	79,28
7	4,05	71,0	3,62 (tl; 4,5)	76,64
8	2,12 (dd; 5,4; 13,6)	42,2	4,32 (d; 4,5)	77,67
	2,26 (m)			
9	-	143,9	-	140,35
10	5,88 (s)	128,1	6,30 (s)	125,42
11	-	139,8	-	146,07
12	2,21 (m)	49,0	2,29 (m)	49,38
13	4,18	71,6	4,10	71,03
14	2,39 (dd; 2,2; 14,4)	45,6	2,35 (m)	39,13
	2,71 (dd; 10,4; 14,7)		2,59 (dd; 9,5; 15,7)	
15	-	214,8	-	213,27
16	3,10	43,3	3,14	42,57
17	2,33 (dd; 4,3; 17,3)	45,6	2,17 (m)	46,25
	2,92 (dd; 9,0; 17,3)			
18	-	207,4	-	207,38
19	2,16 (m)	48,5	2,35 (m)	45,83
	2,49 (dd; 7,6; 15,4)		2,75 (dd; 9,5; 15,7)	
20	4,20 (m)	75,6	4,30 (m)	75,60
21	1,05 (m)	32,4	1,13 (m)	32,18
	1,74 (m)		1,75 (m)	
22	1,31 (m)	28,40	1,36 (m)	28,40
	1,50 (m)		1,56 (m)	
23	3,95 (m)	80,0	4,0 (m)	80,02
24	5,47 (t; 7,1)	76,8	5,47 (t; 8,0)	77,13
25	5,58 (dd; 7,1; 14,9)	127,8	5,64 (dd; 8,0; 15,1)	130,46
26	6,71 (dd; 10,9; 14,9)	130,3	6,74 (dd; 10,9; 15,1)	129,44
27	6,20 (d; 11,4)	125,2	6,30 (d; 10,9)	127,46
28	-	140,4	-	136,67
29	4,28	79,6	5,89 (s)	80,34
30	-	150,0	-	146,15
31	1,80 (m)	34,2	1,95 (m)	32,38
	1,89 (m)		1,99 (m)	
32	1,38	21,3	1,56	30,10
33	0,8 (t; 7,3)	14,3	1,64 (m)	22,64
34*	-	-	0,86 (t; 7,4)	14,07
34/35 <sup>#</sup>	0,7 (d; 6,6)	16,0	0,72 (d; 6,4)	15,71
35/36 <sup>#</sup>	4,90 (s)	114,9	5,00 (s)	115,27
	5,03 (s)		5,19 (s)	
36/37 <sup>#</sup>	1,81 (s)	15,9	1,77 (sl)	15,09
37/38 <sup>#</sup>	1,04 (d; 7,0)	15,4	1,00 (d; 7,0)	15,39
38/39 <sup>#</sup>	1,00 (d; 7,0)	15,5	1,00 (d; 7,0)	16,27
39/40 <sup>#</sup>	1,60 (s)	12,8	1,72 (sl)	13,6
40/41	4,89 (s)	110,0	4,97 (s)	111,36
	5,18(s)		5,19 (s)	
- /42 <sup>#</sup>	-	-	-	168,91
- /43 <sup>#</sup>	-	-	1,74 (s)	20,59

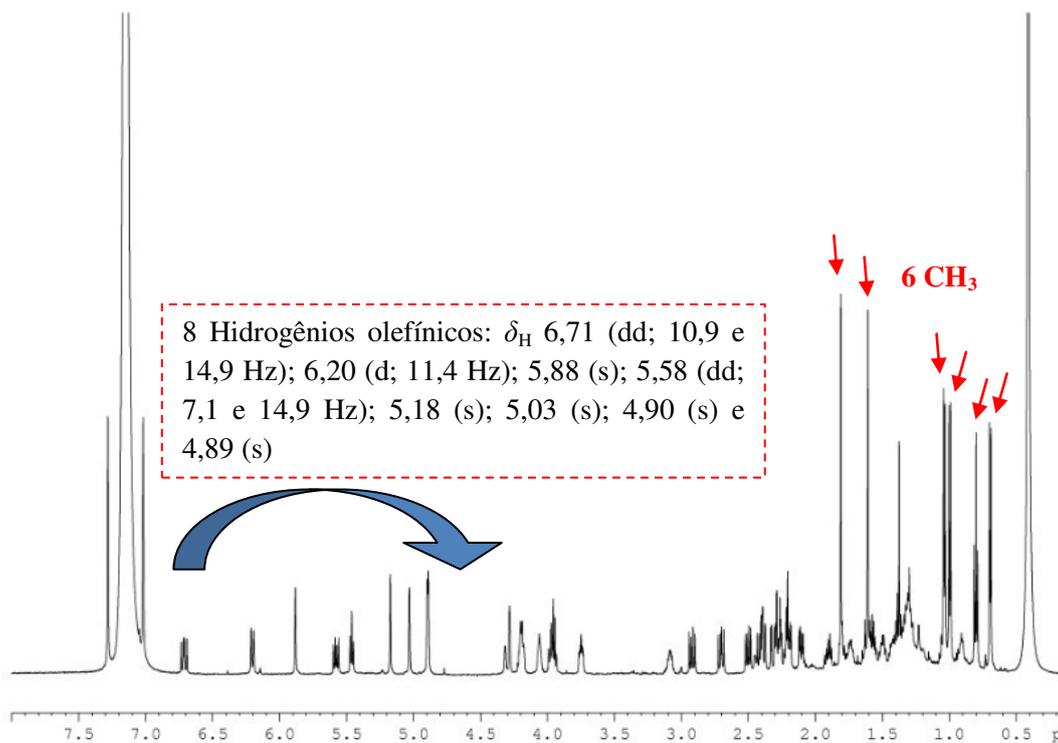
\* O anfidinolido C2 possui um carbono a mais na cadeia alquílica lateral no respectivo segmento C31-C34 em relação ao composto **5**.

<sup>#</sup> Devido esse carbono a mais, a partir da numeração 34 ocorre o seguinte ajuste nas posições para manter a comparação dos mesmos grupos, Composto **5**/Anfidinolido C2.

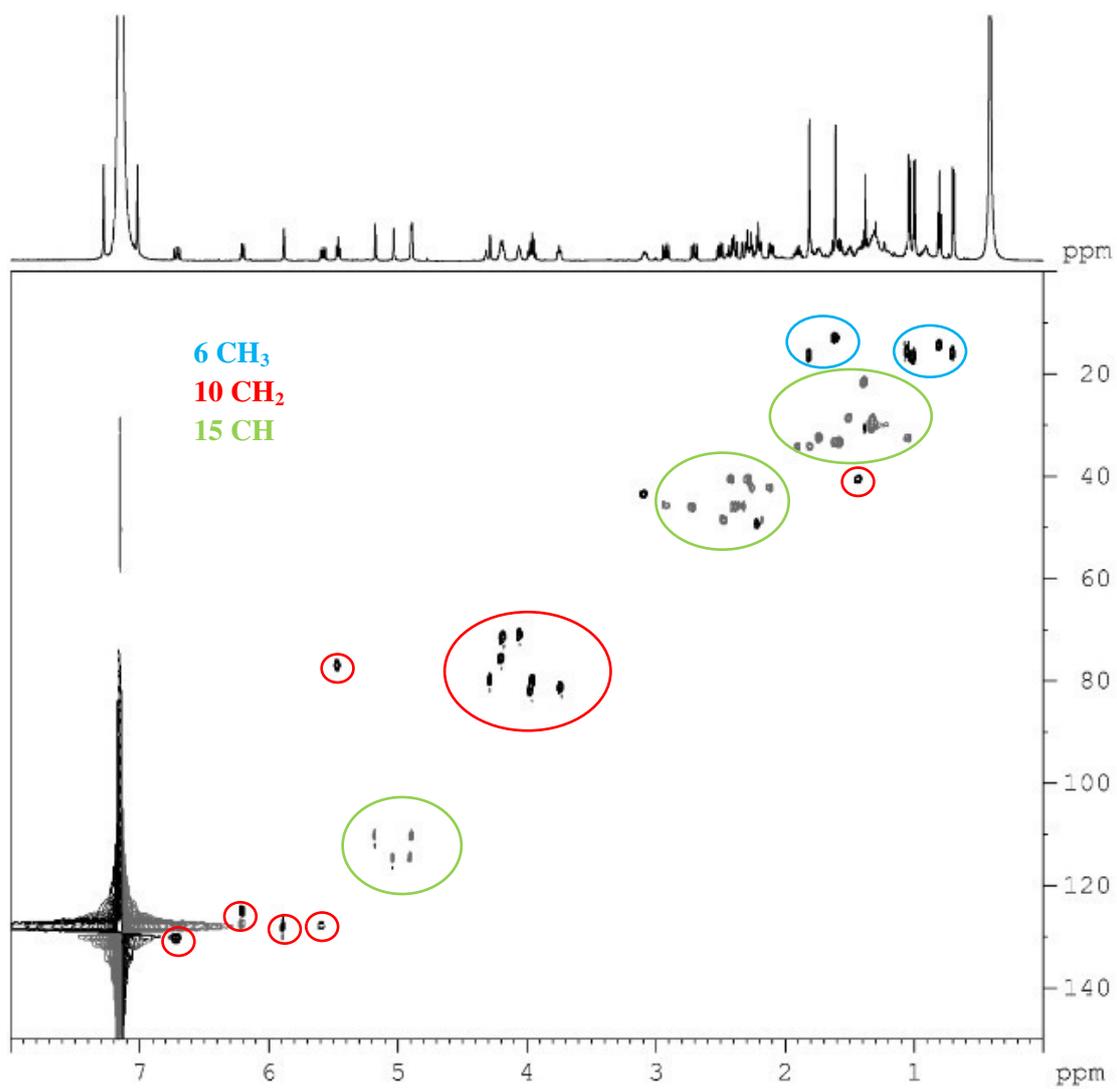
**Figura 43.** Espectro de massa de alta resolução do composto **5**.



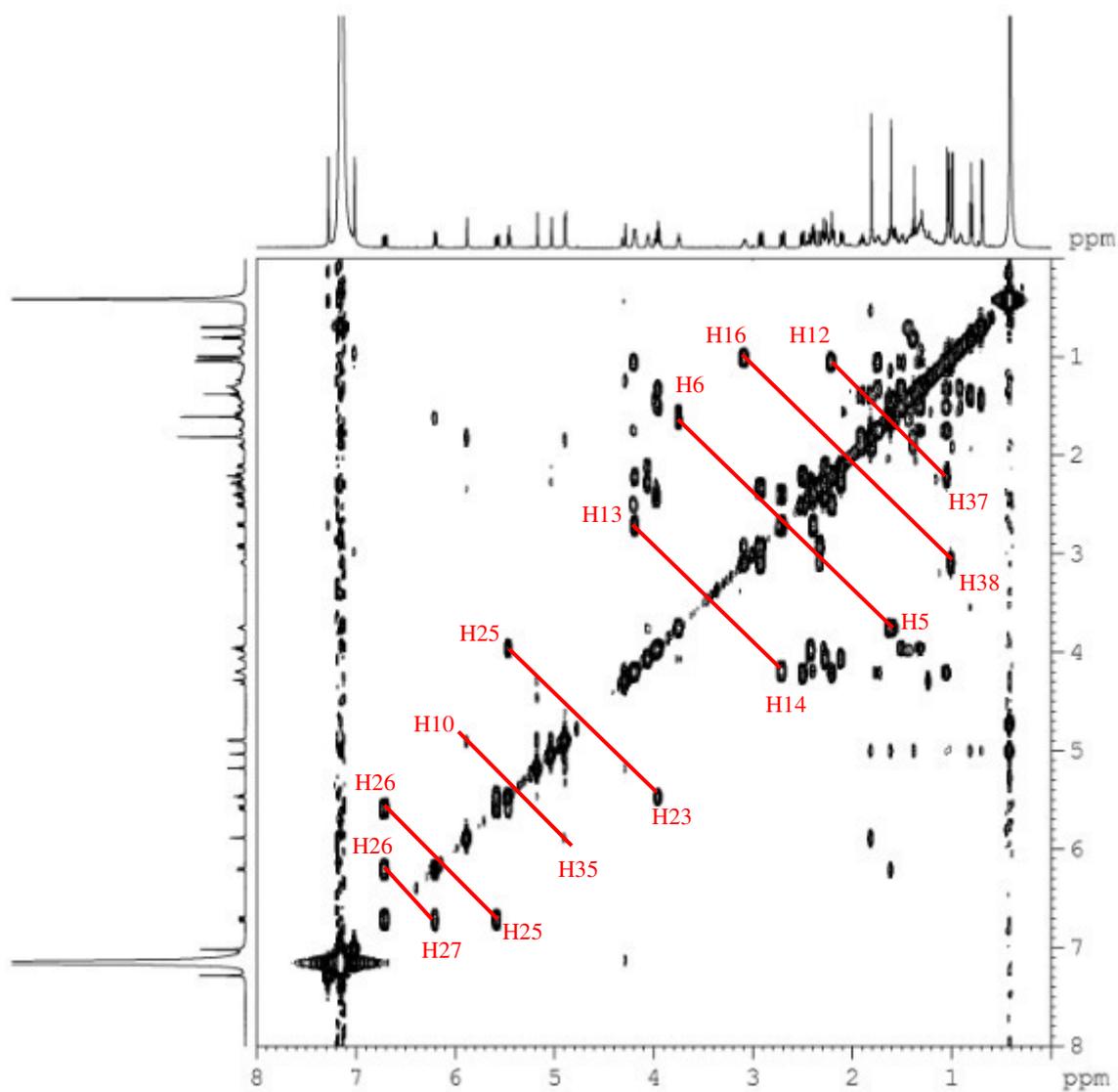
**Figura 44.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **5** ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz).



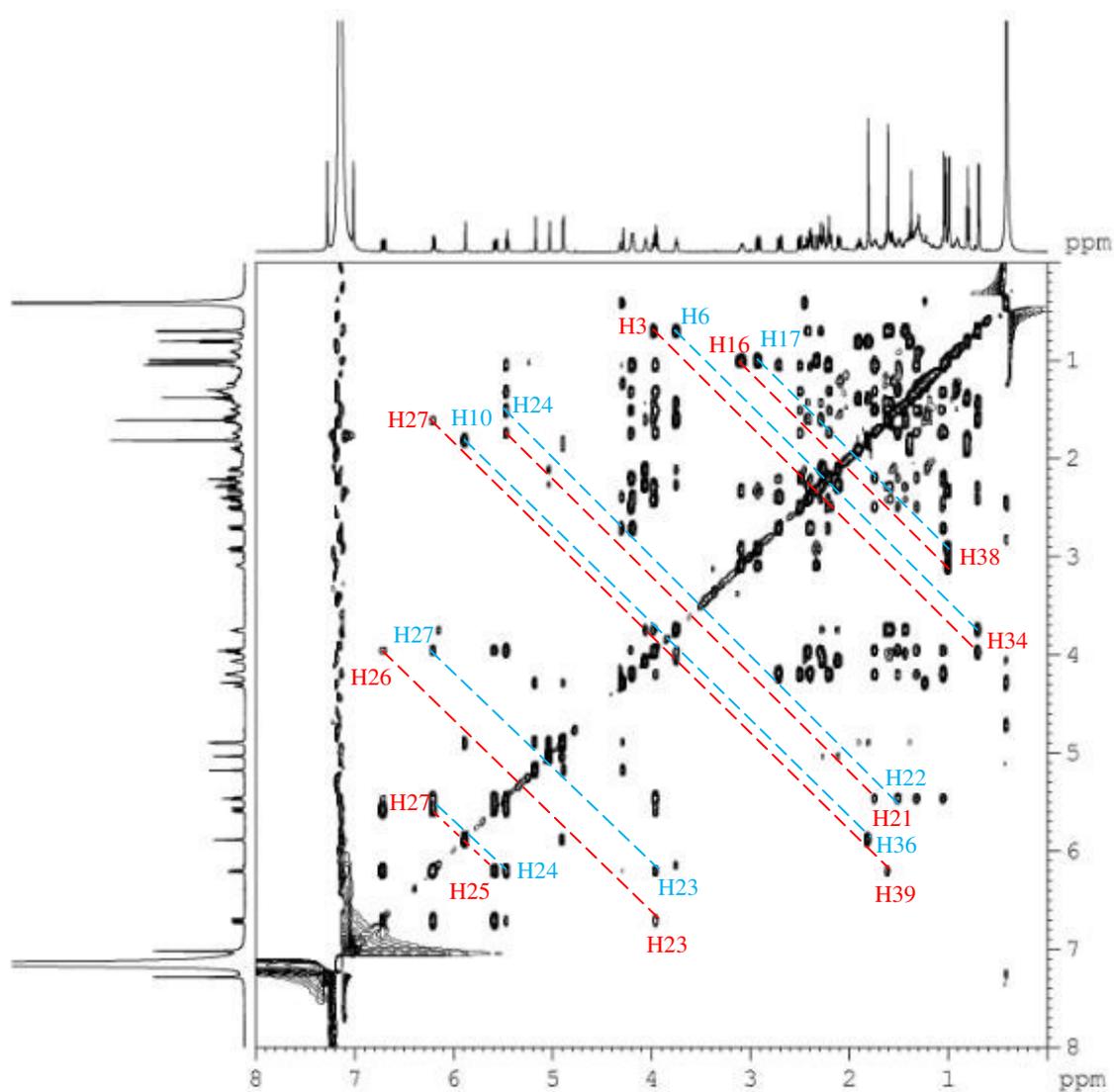
**Figura 45.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (HSQC) do composto **5** ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz).



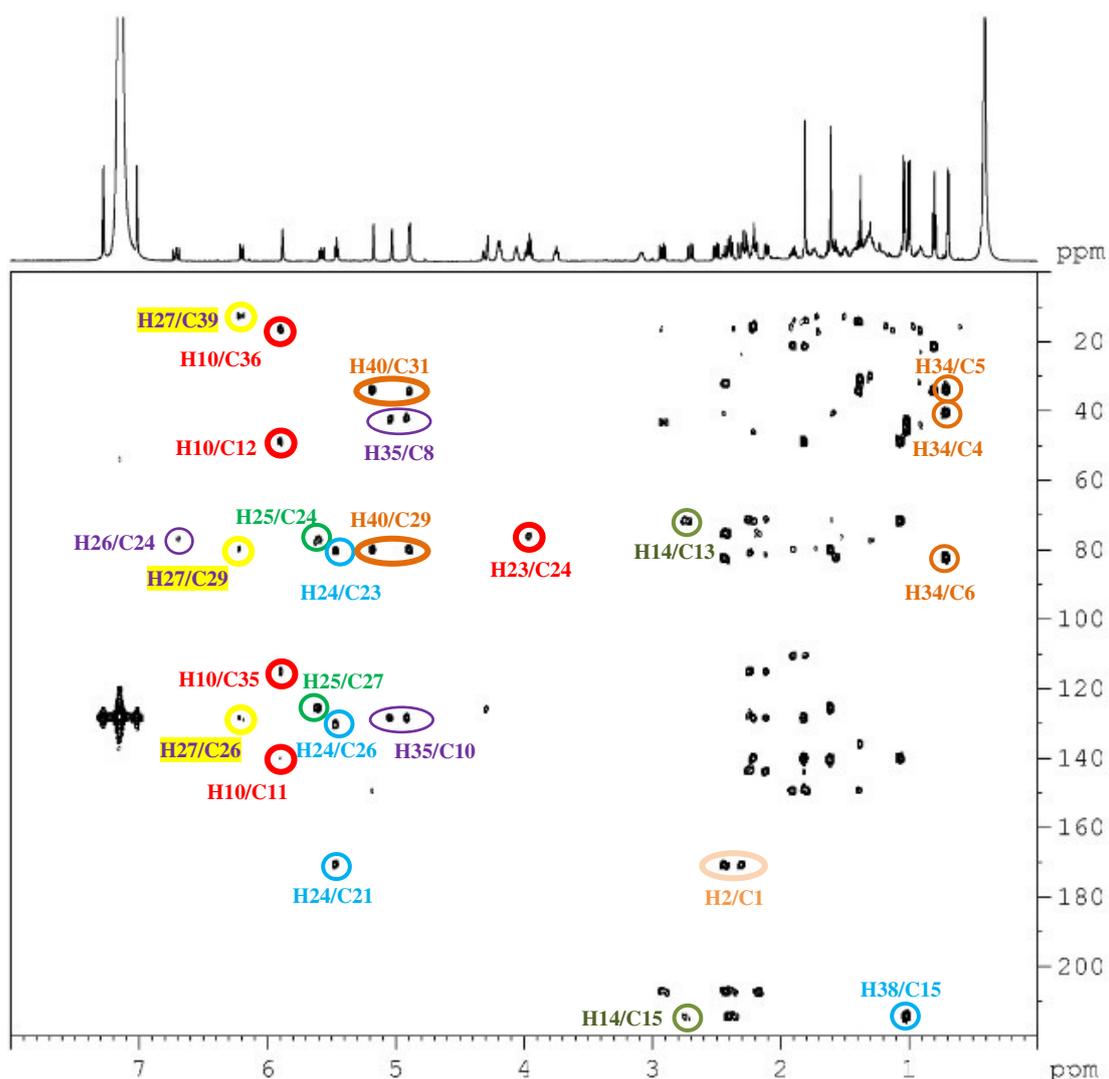
**Figura 46.** Espectro de correlação homonuclear  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY do composto **5** ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz).



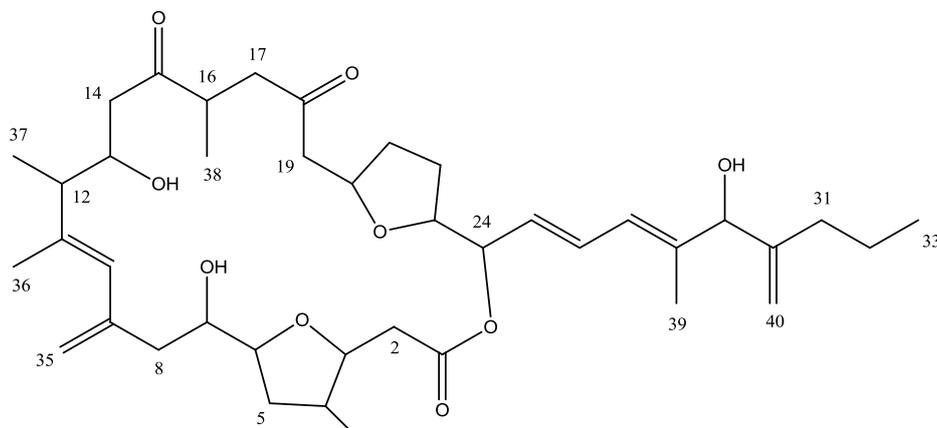
**Figura 47.** Espectro de correlação homonuclear  $^1\text{H}, ^1\text{H}$  TOCSY do composto **5** ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz).



**Figura 48.** Espectro de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC do composto **5** ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz).



A substância SB 4M denominada composto **5** (Figura 49, pág. 72) foi determinada como análoga do anfidinólido C descrito por Kobayashi *et al.*, 1988, e recebeu a nomenclatura de anfidinólido C4, sendo até o momento descrito pela primeira vez, este nome também segue a proposta do Prof. J. Kobayashi, como relatado em Kobayashi e Tsuda, 2004; Kobayashi, 2008.

**Figura 49.** Estrutura do anfidinolido C4 (**5**).

**Anfidinolido C4:** sólido amorfo branco,  $[\alpha]_D^{20}$  -53,6 ( $c$  0,7;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{máx}}$  ( $\epsilon$ ) 242,5 nm ( $\epsilon$  2345).  $\text{C}_{40}\text{H}_{60}\text{O}_9$ .

### 3.1.4 SB 5E

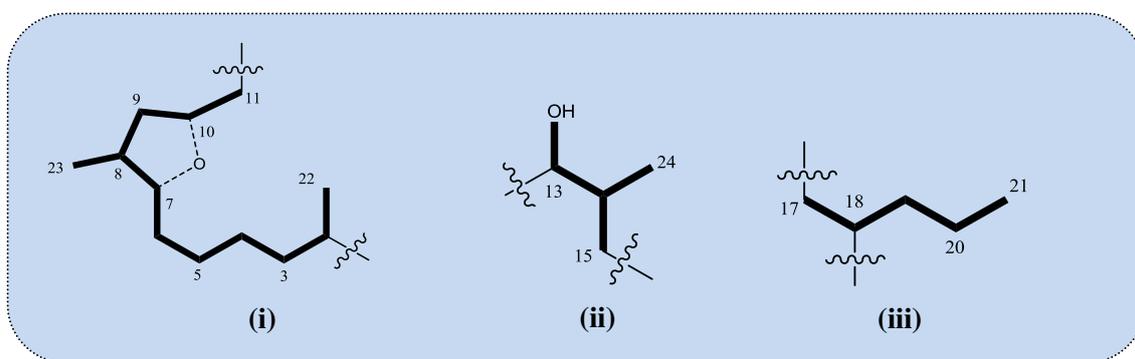
A substância SB 5E (**6**) foi isolada do extrato metanólico do octocoral *S. bicolor* por meio de análise por CLAE, segundo a metodologia descrita no item 4.3.3. O espectro de massa de alta resolução EMAR (Figura 51, pág. 75) de **6** apresentou um pico em  $m/z$  445,2932 referente ao aduto de sódio  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  indicando a fórmula molecular de  $\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{O}_5\text{Na}^+$  e um valor de IDH igual a cinco.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 52, pág. 75) revelou dois sinais para hidrogênios ligados a carbonos olefínicos em  $\delta_{\text{H}}$  5,10 (s) e 4,90 (s) e quatro sinais para hidrogênios metílicos em  $\delta_{\text{H}}$  1,07 (d; 7,0 Hz); 0,91 (d; 6,5 Hz); 0,85 (t; 7,0 Hz) e 0,61 (d; 7,0 Hz).

Já o espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC (Figura 53, pág. 76) traz como característica a presença de dois sinais para carbonos de carbonila em  $\delta_{\text{C}}$  212,1 e 175,0 associados à cetona e éster respectivamente, dois sinais de carbonos olefínicos  $\delta_{\text{C}}$  143,5 e 115,7, quatro sinais para carbonos metínicos oxigenados em  $\delta_{\text{C}}$  78,24; 77,74; 73,5 e 71,3, três sinais para carbonos metínicos não oxigenados  $\delta_{\text{C}}$  41,99; 36,26 e 31,66; dez sinais para carbonos metilênicos em  $\delta_{\text{C}}$  44,75; 40,39; 40,0; 39,51; 35,21; 34,88; 29,54; 26,28; 25,79 e 18,79. Por fim, três sinais para quatro carbonos metílicos com  $\delta_{\text{C}}$  17,58; 13,56 e 13,23.

Os espectros bidimensionais COSY (Figura 54, pág. 77) e TOCSY (Figura 55, pág. 78) apresentaram correlações que permitiram desenvolver três sistemas de *spins*: (i) correlação entre os hidrogênios metilênicos H<sub>2</sub>-11 ( $\delta_{\text{H}}$  2,45 e 1,90) com os hidrogênios metílicos H<sub>3</sub>-22 ( $\delta_{\text{H}}$  1,07); (ii) do hidrogênio metínico H-13 ( $\delta_{\text{H}}$  4,28) para os hidrogênios metilênicos H<sub>2</sub>-15 ( $\delta_{\text{H}}$  2,52 e 2,27); (iii) entre os hidrogênios metilênicos H<sub>2</sub>-17 ( $\delta_{\text{H}}$  2,27) e os hidrogênios metílicos H<sub>3</sub>-21 ( $\delta_{\text{H}}$  0,85). Esses sistemas de *spins* estão representados por fragmentos estruturais observados na Figura 50.

**Figura 50.** Fragmentos estruturais dos principais acoplamentos observados nos espectros homonucleares <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H TOCSY e COSY do composto 6.



O espectro bidimensional de RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C HMBC (Figura 56, pág. 79) foi muito importante para determinar a conectividade dos sistemas de *spins* sugeridos por COSY (Fig. 54, pág. 77) e TOCSY (Fig. 55, pág. 78) devido as seguintes correlações, entre os hidrogênios metilênicos H<sub>2</sub>-11 ( $\delta_{\text{H}}$  2,45 e 1,90) e o hidrogênio metínico H-13 ( $\delta_{\text{H}}$  4,28) com o carbono da carbonila de cetona C-12 em ( $\delta_{\text{C}}$  212,1) permitindo a conexão das subestruturas i e ii; já as correlações entre os hidrogênios olefínicos H<sub>2</sub>-25 em ( $\delta_{\text{H}}$  5,10 e 4,90) com os carbonos metilênicos C-15 em ( $\delta_{\text{C}}$  40,39) e C-17 em ( $\delta_{\text{C}}$  40,0) possibilitam a ligação entre as subestruturas ii e iii. Por fim as correlações entre os hidrogênios metilênicos H<sub>2</sub>-3 ( $\delta_{\text{H}}$  1,55 e 1,23), os hidrogênios metílicos H<sub>3</sub>-22 ( $\delta_{\text{H}}$  1,07) e o hidrogênio metínico oxigenado H-18 ( $\delta_{\text{H}}$  5,33) com o carbono da carbolina de éster C-1 em ( $\delta_{\text{C}}$  175,0) permite ligar as subestruturas i e iii.

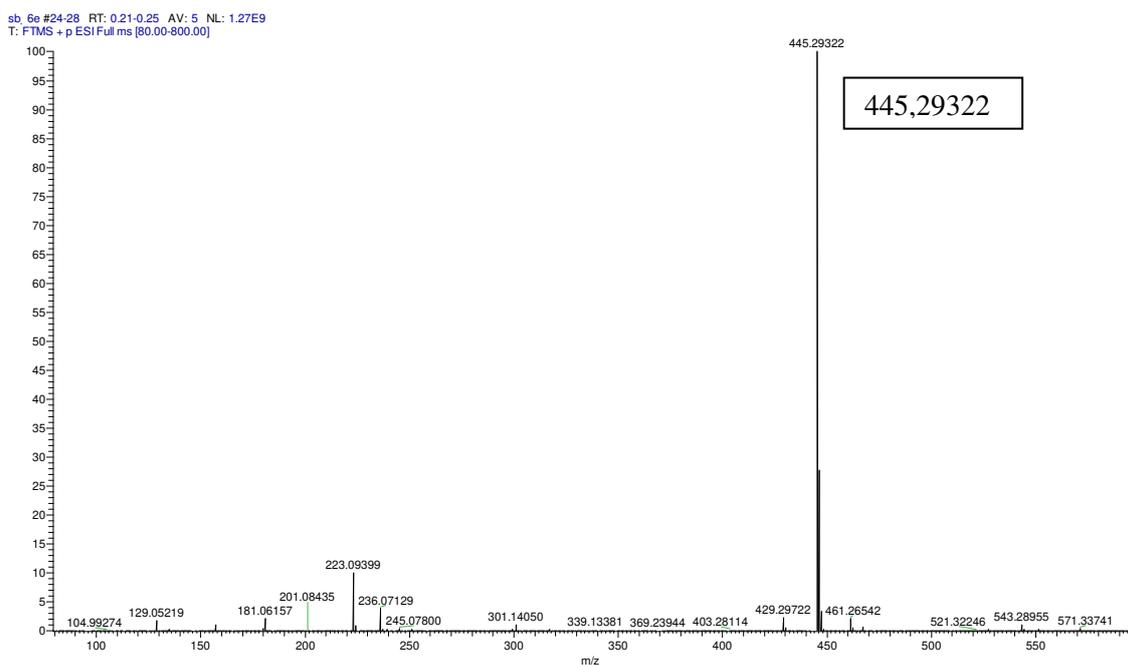
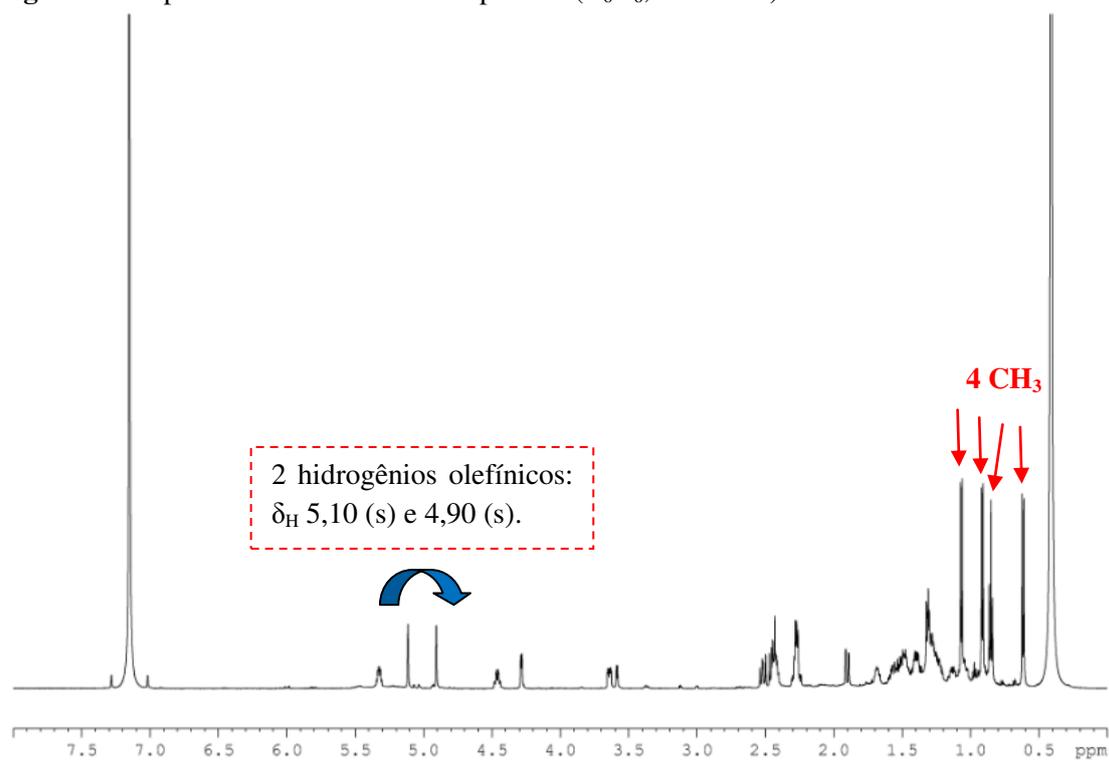
Os valores de deslocamentos químicos de RMN <sup>1</sup>H (Figura 52, pág. 75) e <sup>13</sup>C através do RMN 2D <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C HSQC (Figura 53, pág. 76) se encontram na Tabela 7, página 74. Todos os sistemas de *spins* sugeridos e correlações existentes e descritas anteriormente são apresentadas na Figura 57, página 79.

**Tabela 7.** Deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (HSQC) para o composto **6** ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz) e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de anfidinolido T<sup>a</sup> ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 500 MHz).

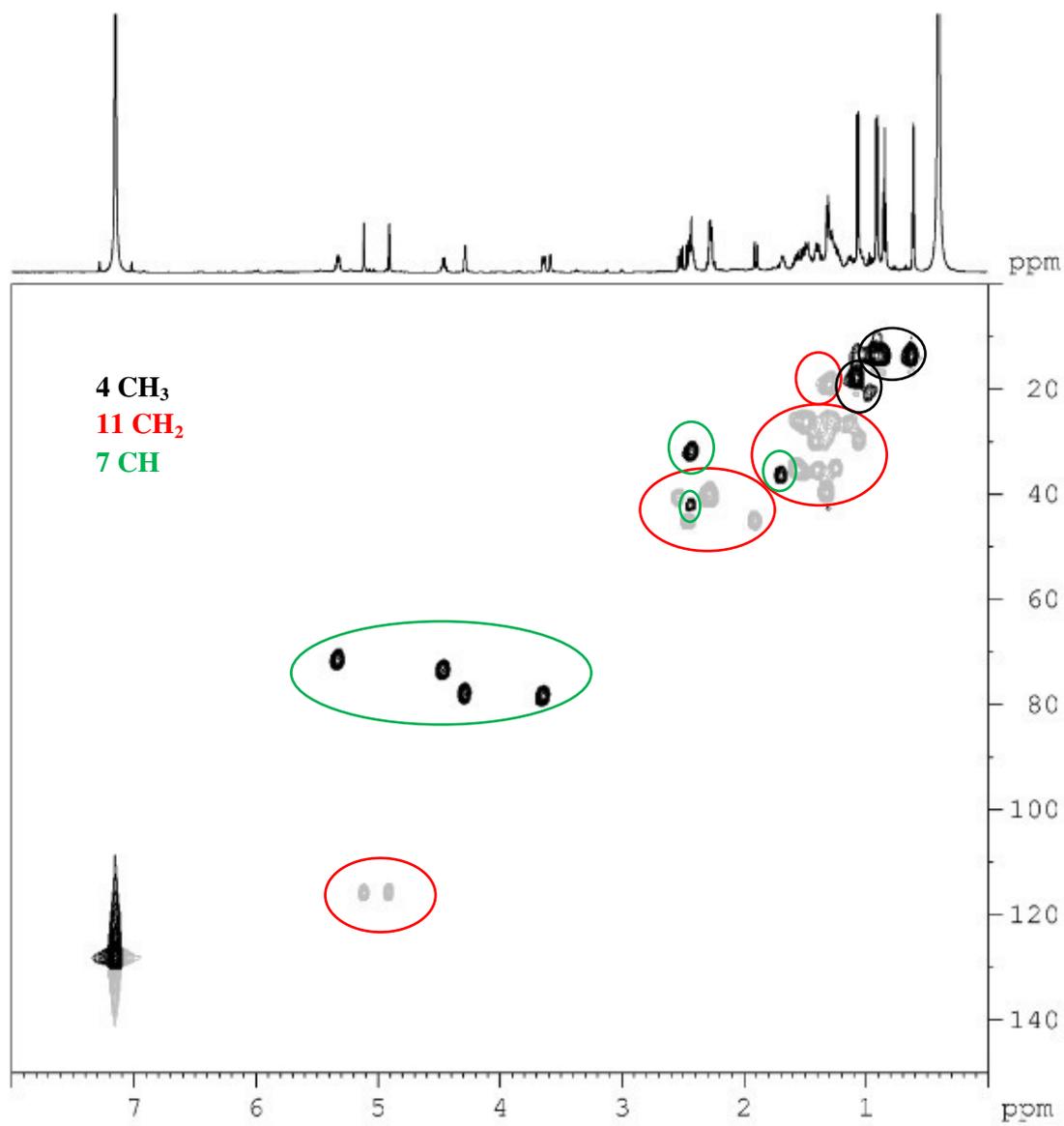
N <sup>o</sup>	<b>(6)</b>		<b>Anfidinolido T</b>	
	$\delta_{\text{H}}$ (J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	-	175,0	-	174,9
2	2,43 <sup>b</sup>	41,99	2,49 (m)	41,7
3	1,55 <sup>b</sup>	34,88	1,62 (m)	35,1
4	1,23 <sup>b</sup>	26,28	1,29 (m)	26,8
	1,48 <sup>b</sup>		1,55 (m)	
5	1,13 <sup>b</sup>	25,79	1,18 (m)	26,2
	1,27 <sup>b</sup>		1,53 (m)	
6	1,40 <sup>b</sup>	29,54	1,34 (m)	29,7
	1,04 <sup>b</sup>		1,47 (m)	
7	3,64 (ddd; 2,5; 4,0 e 10,7)	78,24	3,69 (ddd; 2,6; 4,1; 10,7)	78,6
8	1,68 (m)	36,26	1,73 (m)	36,5
9	1,31 <sup>b</sup>	39,51	1,36 (m)	39,7
10	4,46 (m)	73,5	4,53 (m)	73,6
11	2,45 (dd; 9,0 e 14,0)	44,75	2,50 (dd; 9,2; 14,2)	45,0
	1,90 (dd; 2,5 e 14,0)		1,95 (dd; 2,7; 14,2)	
12	-	212,1	-	212,0
13	4,28 (dd; 1,3 e 5,5)	77,74	4,34 (d; 5,5)	78,2
14	2,42 <sup>b</sup>	31,66	2,47 (m)	32,0
15	2,52 (dd; 10,4 e 13,5)	40,39	2,57 (dd; 10,3; 13,5)	41,2
16	2,27 (m)	143,5	-	143,5
	-		2,33 (m)	
17	2,27	40,0	2,33 (m)	40,1
18	5,33 (m)	71,3	5,38 (m)	71,7
19	1,52 <sup>b</sup>	35,21	1,58 (m)	35,7
	1,40 <sup>b</sup>		1,44 (m)	
20	1,29 <sup>b</sup>	18,79	1,35 (m)	19,1
			1,32 (m)	
21	0,85 (t; 7,0)	13,23	0,91 (t; 7,3)	13,9
22	1,07 (d; 7,0)	17,58	1,12 (d; 6,9)	18,0
23	0,61 (d; 7,0)	13,56	0,67 (d; 7,1)	14,0
24	0,91 (d; 6,5)	13,23	0,97 (d; 6,6)	13,7
25	5,10 (s)	115,7	5,17 (s)	116,1
	4,90 (s)		4,96 (s)	

<sup>a</sup> Tsuda *et al.*, 2000.

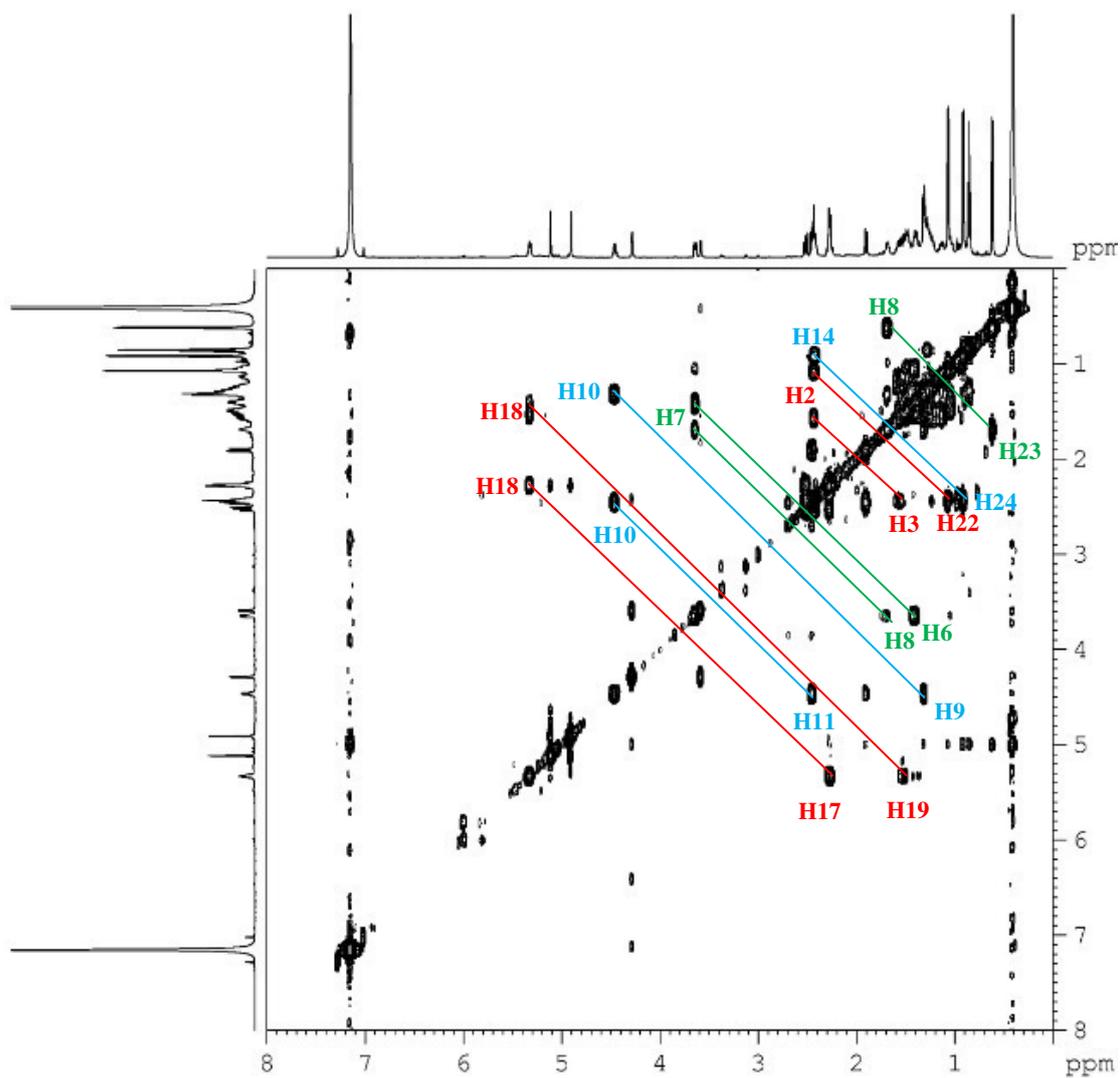
<sup>b</sup> Sobreposição de sinais.

**Figura 51.** Espectro de massa de alta resolução do composto **6**.**Figura 52.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **6** ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz).

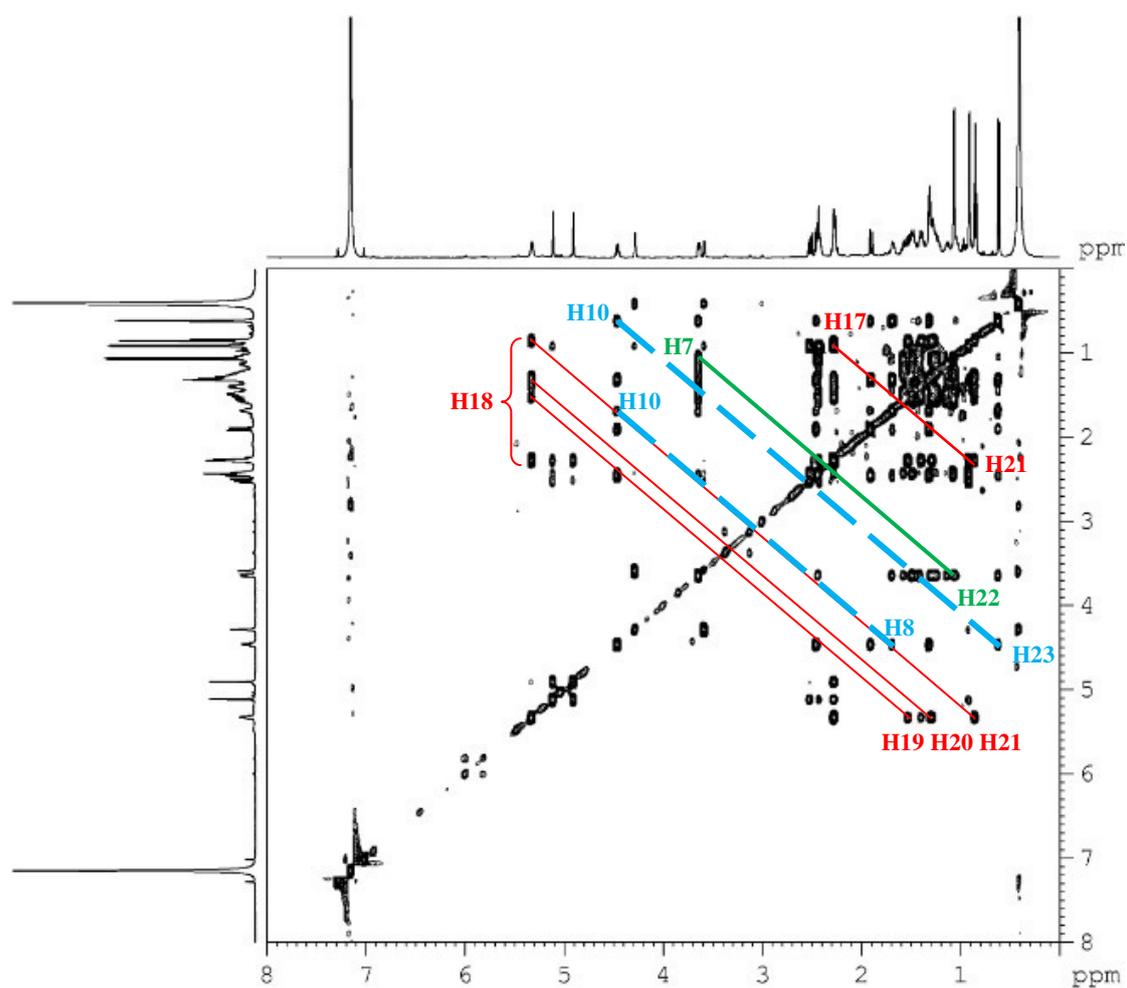
**Figura 53.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC do composto **6** ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz).



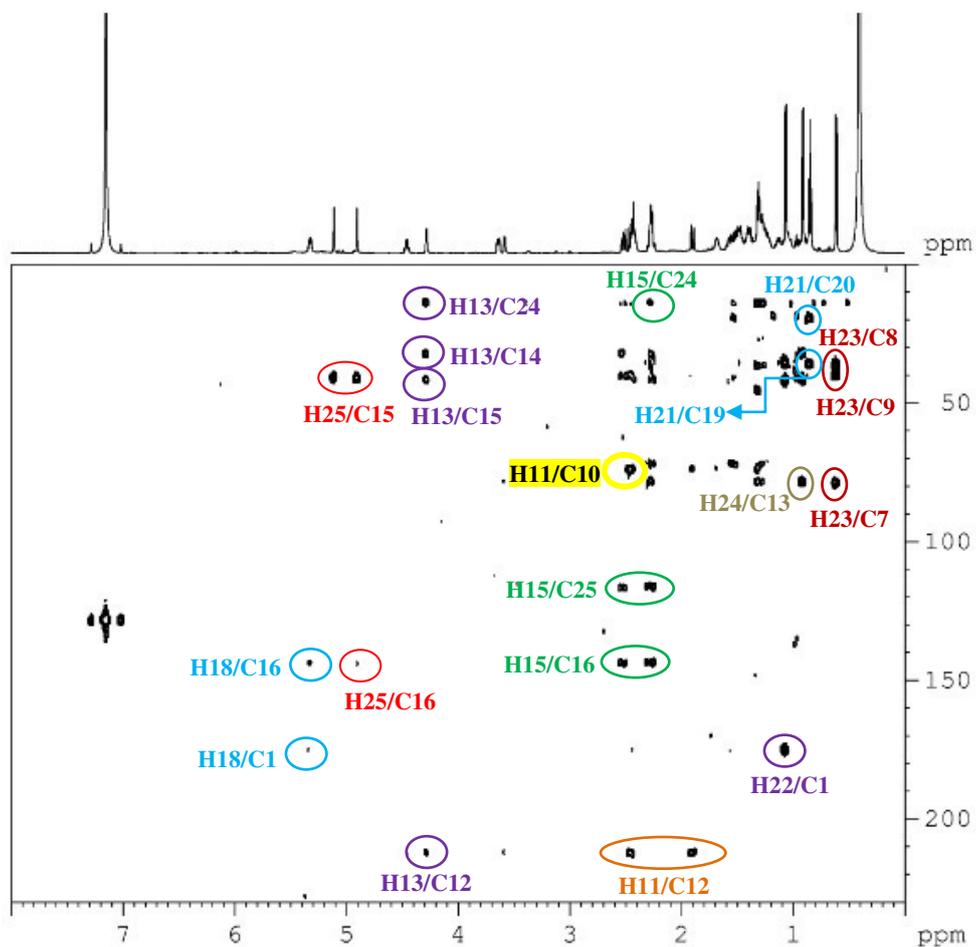
**Figura 54.** Espectro de correlação homonuclear  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY do composto **6** ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz).



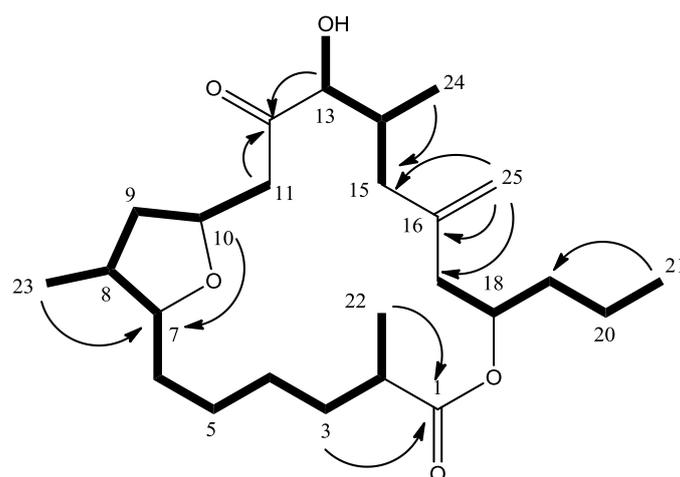
**Figura 55.** Espectro de correlação homonuclear  $^1\text{H},^1\text{H}$  TOCSY do composto **6** ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz).



**Figura 56.** Espectro de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC do composto **6** ( $\text{C}_6\text{D}_6$ , 600 MHz).



**Figura 57.** Sistemas de *spins* e correlações para o composto **6**.

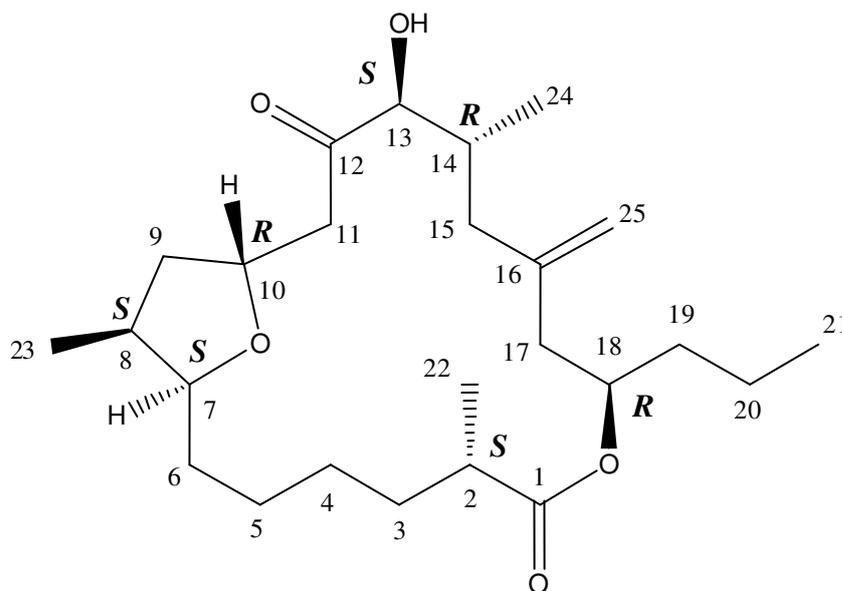


  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY & TOCSY  
  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC

Os dados de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 52, pág. 75), e  $^{13}\text{C}$  por HSQC (Figura 53, pág. 76) representados na Tabela 7, página 74, apontam para uma grande similaridade com o anfidinolido T descrito por Tsuda *et al.*, 2000. As interpretações dos espectros bidimensionais de COSY (Figura 54, pág. 77) e TOCSY (Figura 55, pág. 78) junto com as correlações observadas pelo espectro de HMBC (Figura 56, pág. 79), confirmam que o composto **6** realmente trata-se do anfidinolido T.

A seguir é apresentada a estrutura do anfidinolido T já com sua configuração relativa definida, como propõe Tsuda *et al.*, 2000.

**Figura 58.** Estrutura do anfidinolido T, descrito por Tsuda *et al.*, 2000.



**Anfidinolido T:** óleo incolor;  $[\alpha]_{\text{D}}^{24} + 18^\circ$  ( $c$  0,3;  $\text{CHCl}_3$ ); IV (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$  3490, 2935 e  $1720 \text{ cm}^{-1}$ .  $\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{O}_5$ .

### 3.1.5 OREDM2F

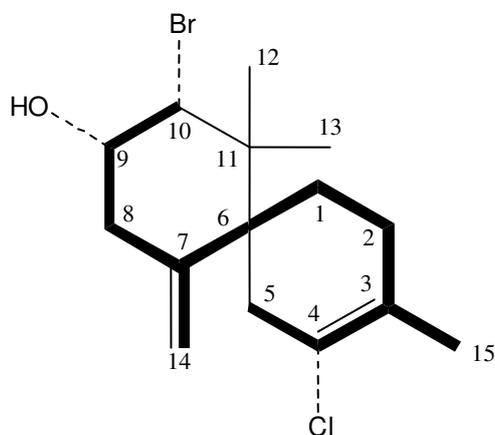
O composto denominado OREDM2F (**7**), foi isolado do extrato metanólico obtido da estrela do mar *O. reticulata* segundo a metodologia descrita no item 4.3.4.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 62, pág. 85) revelou dois sinais para hidrogênios olefínicos em  $\delta_{\text{H}}$  5,13 (s) e 4,80 (s), dois sinais para hidrogênios metínicos em  $\delta_{\text{H}}$  4,65 (d; 2,5 Hz) e 4,15 (ddd; 1,6; 2,5 e 6,0), três sinais para hidrogênios metílicos com valores de deslocamento químico em  $\delta_{\text{H}}$  1,70 (s); 1,08 (s) e 1,07 (s), além de uma série de sinais para hidrogênios metilênicos como visto na Tabela 8, página 84.

A análise do espectro bidimensional de RMN  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$  HSQC (Figura 63, pág. 86) mostrou quatro sinais para carbonos olefínicos em  $\delta_{\text{C}}$  140,5; 128,0; 124,3 e 116,5; dois sinais para carbonos metínicos, sendo um deles oxigenado em  $\delta_{\text{C}}$  72,9 e o outro bromado em  $\delta_{\text{C}}$  71,8; quatro sinais para carbonos metilênicos em  $\delta_{\text{C}}$  39,7; 38,9; 30,4; 26,8; três sinais para carbonos metílicos em  $\delta_{\text{C}}$  25,2; 21,7 e 20,4; e por fim, sinais para cinco carbonos não hidrogenados, sendo três  $\text{sp}^2$  em  $\delta_{\text{C}}$  140,5; 128,0; 124,3 os quais já foram citados acima, e dois  $\text{sp}^3$  em  $\delta_{\text{C}}$  48,9 e 42,3.

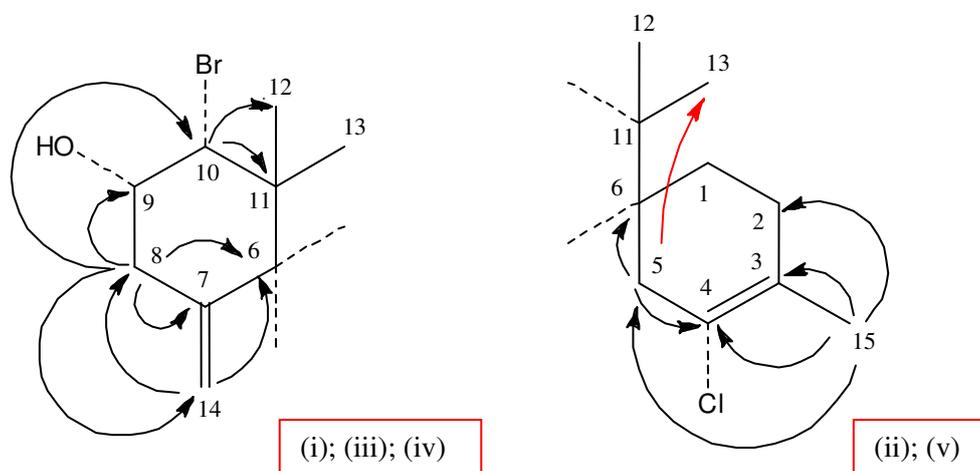
A análise dos espectros bidimensionais COSY (Figura 64, pág. 87) e TOCSY (Figura 65, pág. 88) permitiu construir os sistemas de *spins* conforme as seguintes correlações: (i) do hidrogênio metínico bromado H-10 ( $\delta_{\text{H}}$  4,65) com o hidrogênio metínico oxigenado H-9 ( $\delta_{\text{H}}$  4,15) e H<sub>2</sub>-8 ( $\delta_{\text{H}}$  2,63 e 2,52); (ii) entre o hidrogênio H-9 ( $\delta_{\text{H}}$  4,15) com H<sub>2</sub>-8 em ( $\delta_{\text{H}}$  2,63 e 2,52); (iii) dos hidrogênios olefínicos H<sub>2</sub>-14 ( $\delta_{\text{H}}$  5,13 e 4,80) com H<sub>2</sub>-8 ( $\delta_{\text{H}}$  2,63 e 2,52); (iv) entre os hidrogênios metilênicos H<sub>2</sub>-5 ( $\delta_{\text{H}}$  2,59 e 2,37) e H<sub>2</sub>-2 em ( $\delta_{\text{H}}$  1,96 e 1,81) e com os hidrogênios metílicos H<sub>3</sub>-15 ( $\delta_{\text{H}}$  1,70). Essas correlações são observadas na Figura 59.

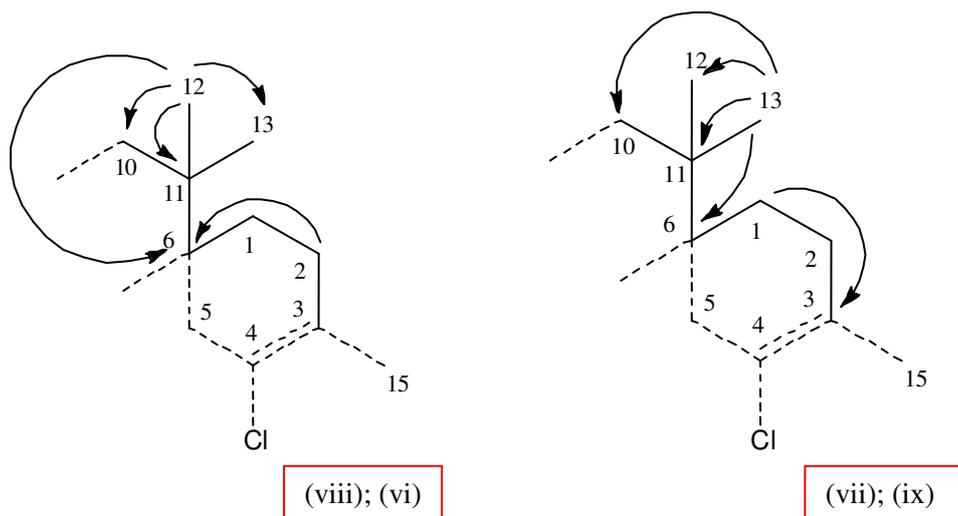
**Figura 59.** Sistema de *spins* observados nos espectros de COSY e TOCSY para o composto 7.



O espectro bidimensional de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC (Figura 66, pág. 89) permitiu realizar a conectividade dos sistemas de *spins* propostos pelo COSY (Figura 64, pág. 87) e TOCSY (Figura 65, pág. 88) conforme segue: (i) dos hidrogênios olefínicos H<sub>2</sub>-14 ( $\delta_{\text{H}}$  5,13 e 4,80) com C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  48,9) e C-8 ( $\delta_{\text{C}}$  38,9); (ii) dos hidrogênios metílicos H<sub>3</sub>-15 ( $\delta_{\text{H}}$  1,70) com C-2 ( $\delta_{\text{C}}$  30,4), C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  39,7), C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  128,0) e C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  124,3); (iii) do hidrogênio metínico H-10 ( $\delta_{\text{H}}$  4,65) com C-11 ( $\delta_{\text{C}}$  42,3) e C-12 ( $\delta_{\text{C}}$  21,7); (iv) dos hidrogênios metilênicos H<sub>2</sub>-8 ( $\delta_{\text{H}}$  2,63 e 2,52) com C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  48,9), C-9 ( $\delta_{\text{C}}$  72,9), C-10 ( $\delta_{\text{C}}$  71,8), C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  140,5) e C-14 ( $\delta_{\text{C}}$  116,5); (v) dos hidrogênios metilênicos H<sub>2</sub>-5 ( $\delta_{\text{H}}$  2,59 e 2,37) com C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  124,3), C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  48,9) e C-13 ( $\delta_{\text{C}}$  25,2); (vi) dos hidrogênios metilênicos H<sub>2</sub>-2 ( $\delta_{\text{H}}$  1,96 e 1,81) com C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  48,9); (vii) dos hidrogênios metilênicos H<sub>2</sub>-1 ( $\delta_{\text{H}}$  1,83 e 1,62) com C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  128,0); (viii) dos hidrogênios metílicos H<sub>3</sub>-12 ( $\delta_{\text{H}}$  1,07) com C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  48,9), C-11 ( $\delta_{\text{C}}$  42,3), C-10 ( $\delta_{\text{C}}$  71,8) e C-13 ( $\delta_{\text{C}}$  25,2); (ix) dos hidrogênios metílicos H<sub>3</sub>-13 ( $\delta_{\text{H}}$  1,08) com C-12 ( $\delta_{\text{C}}$  21,7), C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  48,9), C-11 ( $\delta_{\text{C}}$  42,3) e C-10 ( $\delta_{\text{C}}$  71,8). Essas conectividades podem ser observadas através das correlações descritas na Figura 60.

**Figura 60.** Correlações apresentadas pelo espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  HMBC do composto 7.





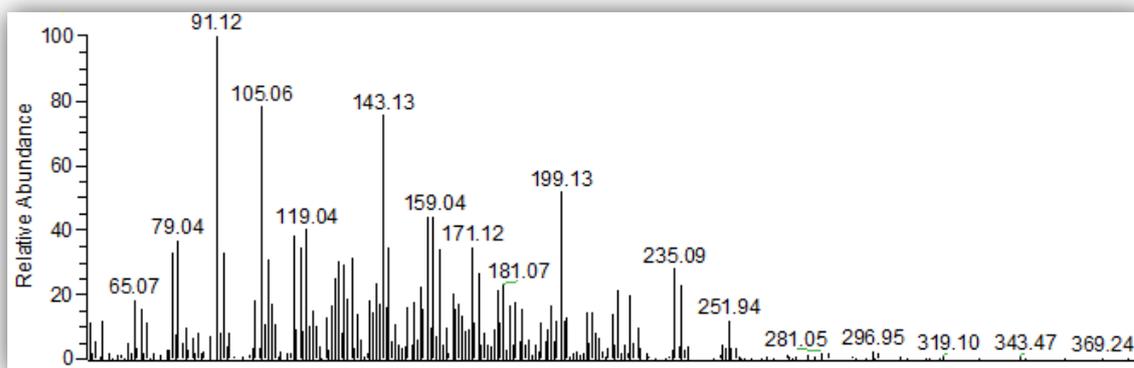
Após as análises dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 62, pág. 85) e HSQC (Figura 63, pág. 86), de seus dados de deslocamento químico na Tabela 8, página 84 e juntamente com as correlações apresentadas pelo espectro HMBC (Figura 66, pág. 89) e a comparação com os dados da literatura, foi possível concluir que a substância OREDM2F (7) se trata do sesquiterpeno já descrito na literatura, designado como elatol (LHULLIER *et al.*, 2009) observada na Figura 67, página 90.

O espectro de massas, obtido pela técnica de ionização por eletrospray, não forneceu o pico do íon molecular. Dessa maneira, foi analisado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas CG-EM (Figura 61, pág. 85).

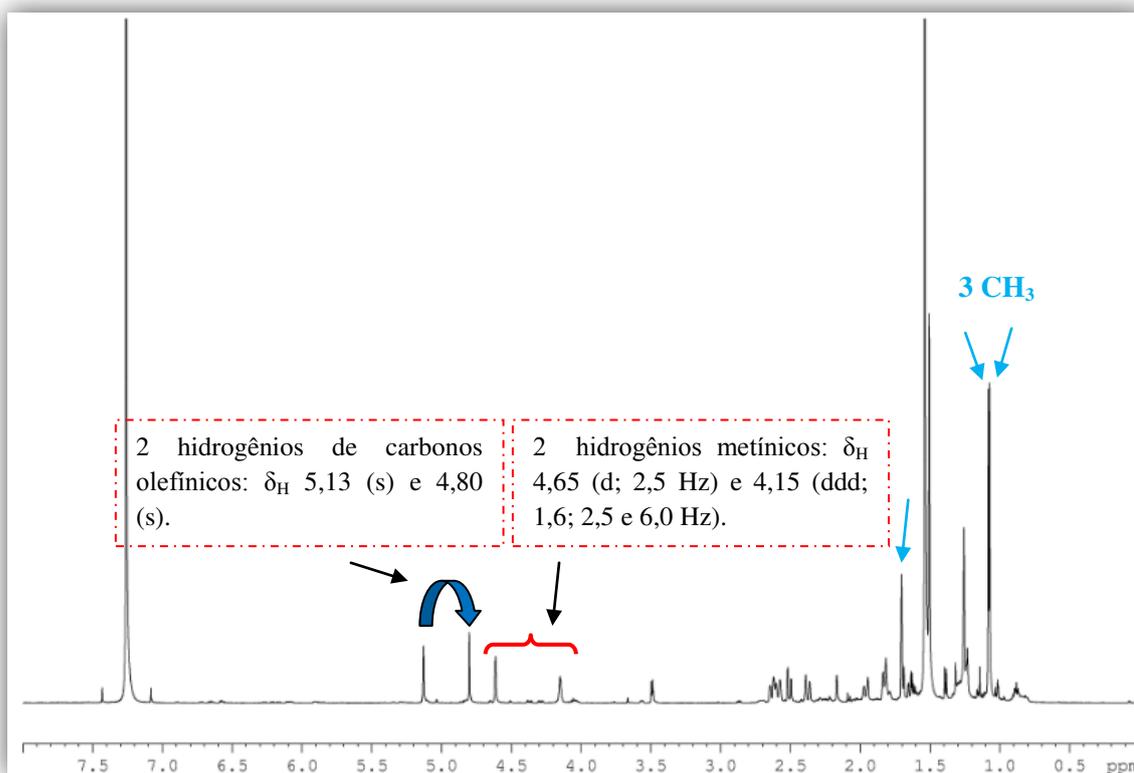
**Tabela 8.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **7** e do elatol (LHULLIER *et al.*, 2009).

N°	OREDM2F (7)		Elatol	
	$\delta_{\text{H}}$ (multi, <i>J</i> em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (multi, <i>J</i> em Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	1,83 (dd; 12,0 e 2,0) 1,62 (dd; 12,0 e 5,0)	26,8	1,82 (m) 1,63 (m)	25,6
2	1,96(m) 1,81(m)	30,4	1,95 (m) 1,81(m)	29,4
3	-	128,0	-	128,1
4	-	124,3	-	124,2
5	2,59 (d; 17,0) 2,37 (d; 17,0)	39,7	2,59 (d; 17,0) 2,38 (d; 17,0)	38,6
6	-	48,9	-	49,2
7	-	140,5	-	140,8
8	2,63 (dd; 1,6 e 14,0) 2,52 (dd; 2,0 e 14,0)	38,9	2,63 (d; 14,6) 2,50 (dd; 14,6 e 2,5)	38,0
9	4,15 (ddd; 1,6; 2,5 e 6,0)	72,9	4,15 (d l; 3,4)	72,2
10	4,65 (d; 2,5)	71,8	4,61 (d; 2,6)	70,9
11	-	42,3	-	43,1
12	1,07 (s)	21,7	1,07 (s)	20,8
13	1,08 (s)	25,2	1,08 (s)	24,3
14	4,80 (s) 5,13 (s)	116,5	5,12 (s) 4,79 (s)	115,9
15	1,70 (s)	20,4	1,70 (s)	19,5

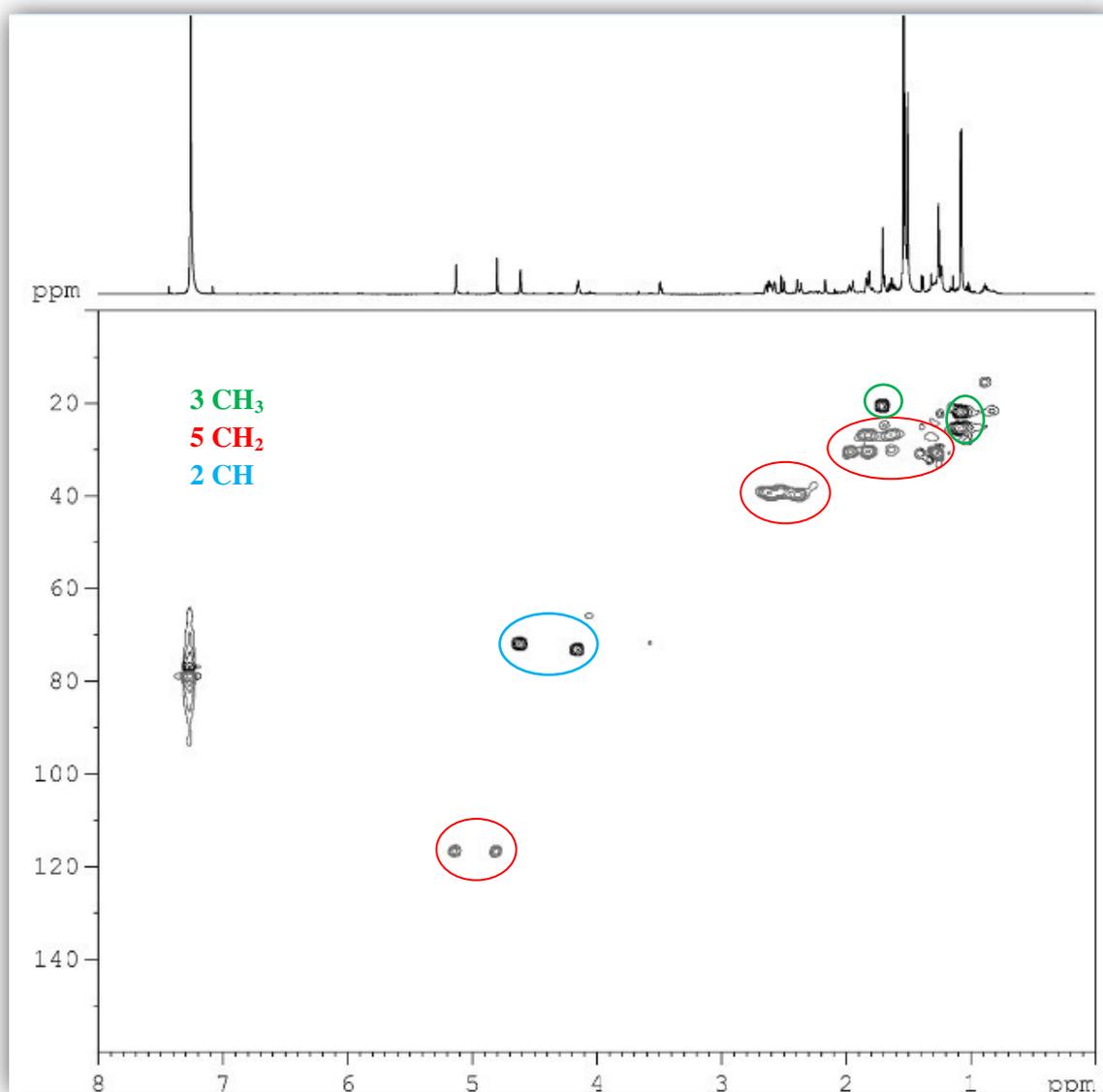
**Figura 61.** Espectro de massas do composto 7.



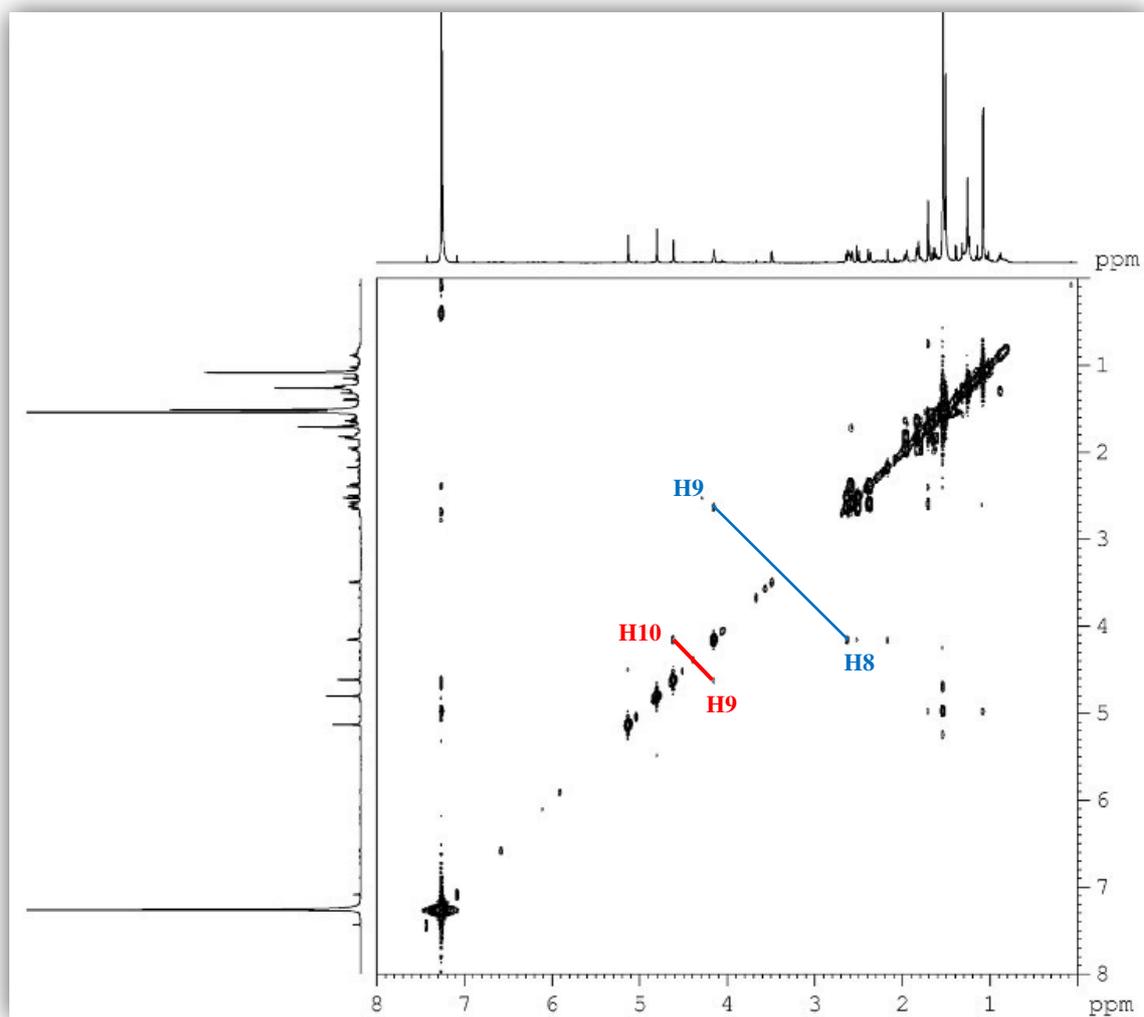
**Figura 62.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) do composto 7.



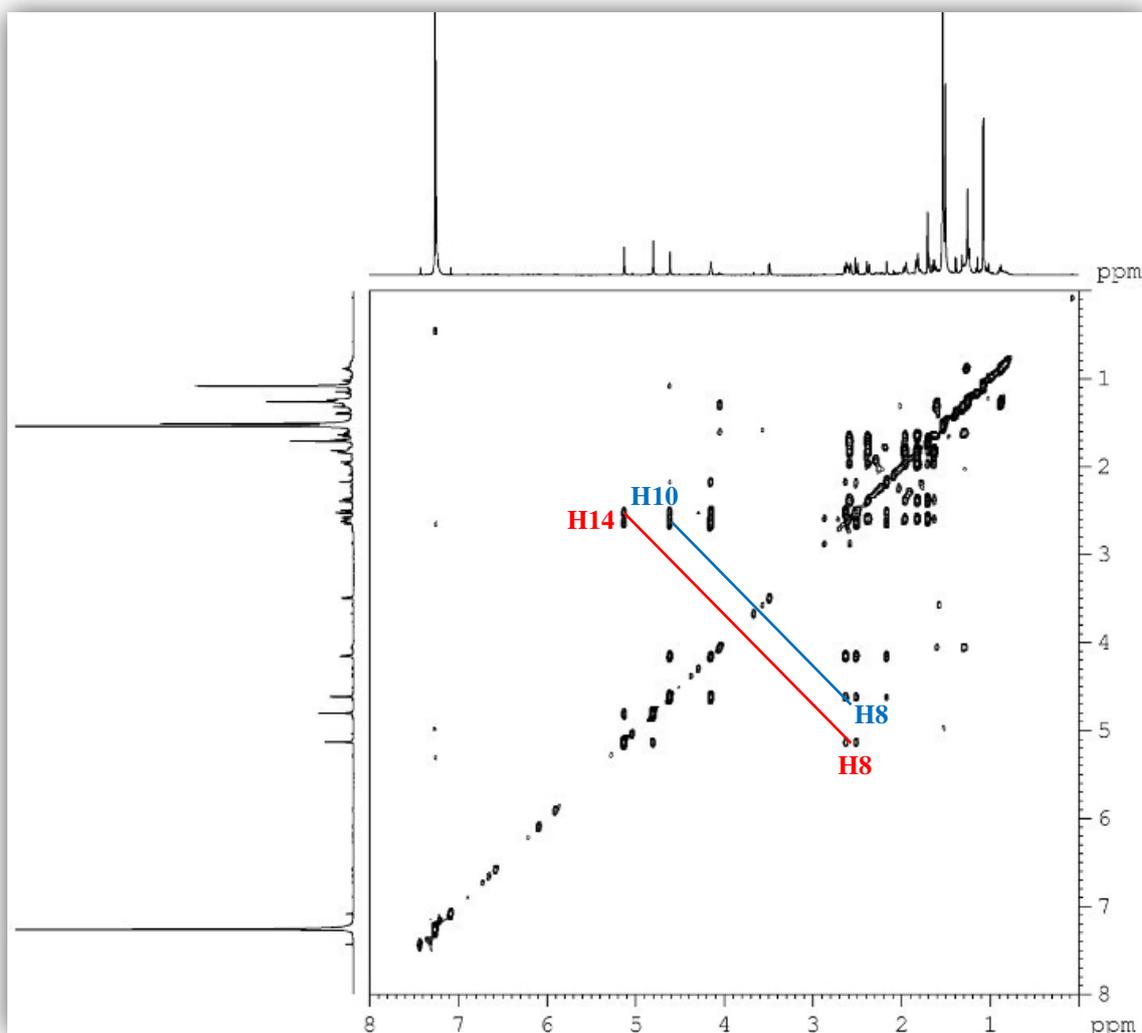
**Figura 63.** Espectro de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC do composto 7.

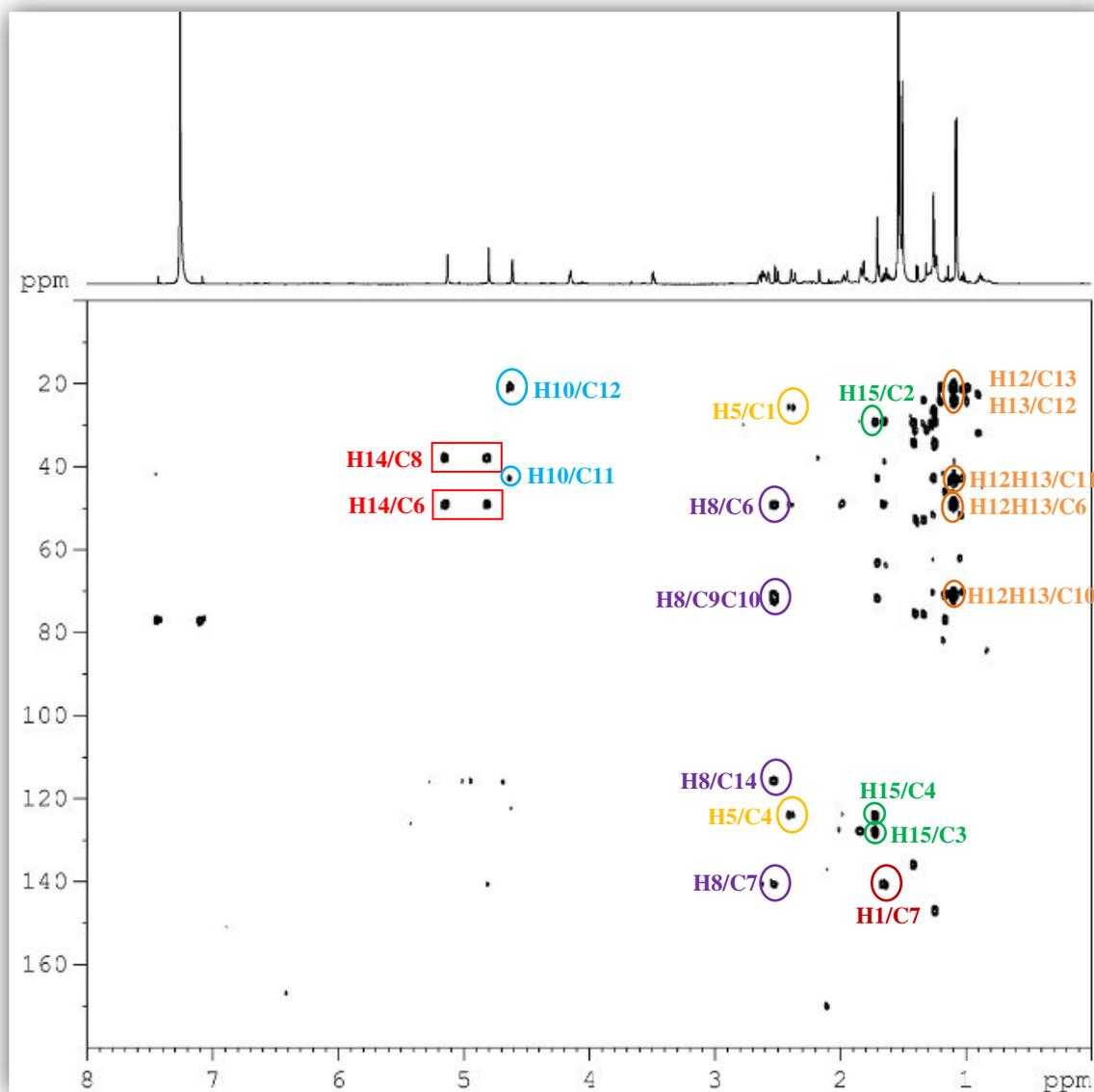


**Figura 64.** Espectro de correlação homonuclear  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY do composto 7.

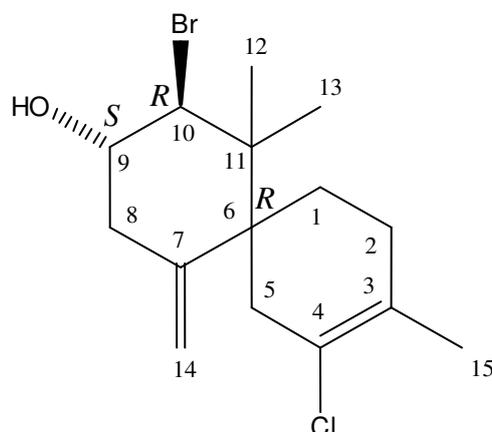


**Figura 65.** Espectro de correlação homonuclear  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  TOCSY do composto 7.



**Figura 66.** Espectro de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC do composto 7.

**Figura 67.** Estrutura da substância OREDM2F (7).



**ORED M2F (7):** Sólido branco;  $[\alpha]_D^{20} = +21,0$  ( $c$  0.02 em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ); Fórmula molecular:  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{OClBr}$ ; Massa molar 332,00 g/mol.

### 3.1.6 OREDM2D

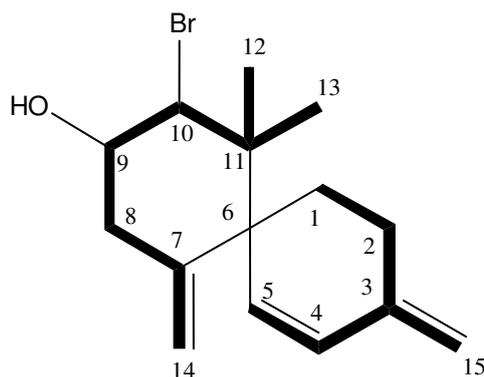
A substância OREDM2D (**8**) foi isolada do extrato metanólico da estrela do mar *O. reticulata* segundo a metodologia descrita no item 4.3.4.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) (Figura 71, pág. 94) de **8** revelou seis sinais para hidrogênios olefínicos em  $\delta_{\text{H}}$  6,26 (d; 10,0 Hz); 5,84 (d; 10,0 Hz); 5,12 (s); 4,87 (s); 4,81 (s) e 4,79 (s), dois sinais para hidrogênios metílicos em  $\delta_{\text{H}}$  1,23 (s) e 1,02 (s), assim como uma série de sinais para hidrogênios metilênicos como pode ser visto na Tabela 9, página 93.

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC (Figura 72, pág. 95) mostrou seis sinais para carbonos olefínicos em  $\delta_{\text{C}}$  143,5; 142,4; 133,6; 132,5; 118,1; 112,0; dois sinais para carbonos metínicos, sendo um deles oxigenado em  $\delta_{\text{C}}$  73,1 e o outro bromado em  $\delta_{\text{C}}$  71,6; três sinais para carbonos metilênicos com  $\delta_{\text{C}}$  38,9; 27,7 e 27,3; dois sinais para carbonos metílicos com  $\delta_{\text{C}}$  27,6 e 22,3; e por fim, sinais para carbonos não hydrogenados em  $\delta_{\text{C}}$  51,1 e 42,6, além dos olefinicos já mencionados em  $\delta_{\text{C}}$  143,5; 142,4; 118,1 e 112,0.

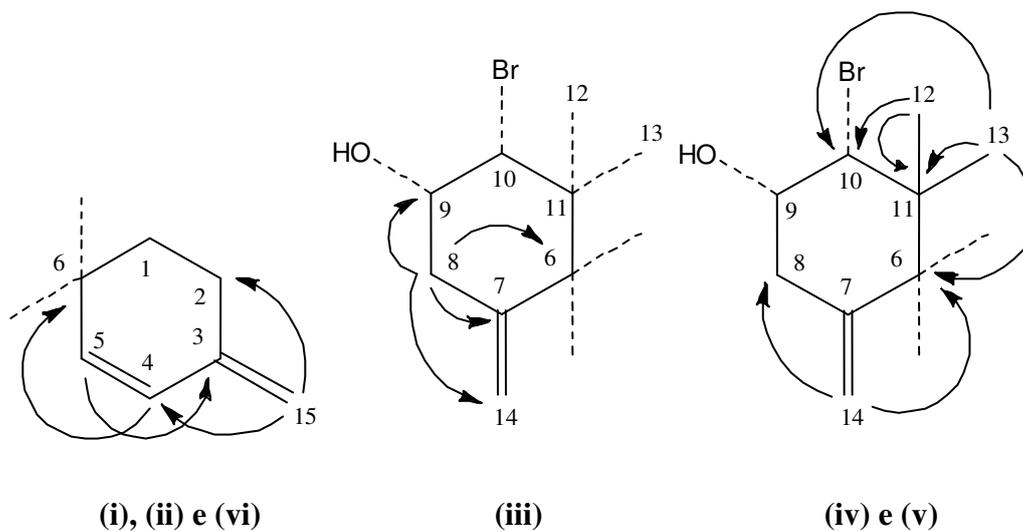
A análise dos espectros bidimensionais COSY (Figura 73, pág. 96) e TOCSY (Figura 75, pág. 97) permitiu construir os seguintes sistemas de *spins* conforme as seguintes correlações: (i) do hidrogênio metínico bromado H-10 ( $\delta_H$  4,65) com o hidrogênio metínico oxigenado H-9 ( $\delta_H$  4,16) e com os hidrogênios metilênicos H<sub>2</sub>-8 ( $\delta_H$  2,72 e 2,58); (ii) do H-9 ( $\delta_H$  4,16) com os hidrogênios H<sub>2</sub>-8 ( $\delta_H$  2,72 e 2,58); (iii) dos hidrogênios metilênicos H<sub>2</sub>-2 ( $\delta_H$  2,20) com H<sub>2</sub>-1 ( $\delta_H$  1,76); (iv) dos hidrogênios olefínicos H<sub>2</sub>-14 ( $\delta_H$  5,12) com H<sub>2</sub>-8 ( $\delta_H$  2,72 e 2,58) e com H-9 ( $\delta_H$  4,16); (v) dos hidrogênios olefínicos H<sub>2</sub>-15 ( $\delta_H$  4,81 e 4,79) com H<sub>2</sub>-2 em ( $\delta_H$  2,27 e 2,20), H<sub>2</sub>-1 ( $\delta_H$  1,93 e 1,76), H-5 ( $\delta_H$  5,84) e H-4 ( $\delta_H$  6,26); (vi) do hidrogênio H-4 ( $\delta_H$  6,26) com H-5 ( $\delta_H$  5,84); (vii) dos hidrogênios metílicos H<sub>3</sub>-13 ( $\delta_H$  1,23) com o H-10 ( $\delta_H$  4,65), e (viii) dos hidrogênios metílicos H<sub>3</sub>-12 ( $\delta_H$  1,02) com H-9 ( $\delta_H$  4,16).

**Figura 68.** Sistema de *spins* observados nos espectros de COSY e TOCSY para OREDM2D (**8**).



O espectro bidimensional de RMN <sup>13</sup>C HMBC (Figura 76, pág. 98) do composto **8** possibilitou realizar a conectividade dos sistemas de *spins* propostos pelo COSY (Figura 73, pág. 96) e TOCSY (Figura 75, pág. 97), como: (i) do hidrogênio olefínico H-4 ( $\delta_H$  6,26) com C-6 ( $\delta_C$  51,1); (ii) do hidrogênio olefínico H-5 ( $\delta_H$  5,84) com C-3 ( $\delta_C$  142,4); (iii) dos hidrogênios metilênicos H<sub>2</sub>-8 ( $\delta_H$  2,72 e 2,58) com C-14 ( $\delta_C$  118,1), C-7 ( $\delta_C$  143,5), C-9 ( $\delta_C$  73,1) e C-6 ( $\delta_C$  51,1); (iv) dos hidrogênios metílicos H<sub>3</sub>-12 ( $\delta_H$  1,02) e H<sub>3</sub>-13 ( $\delta_H$  1,23) com C-10 ( $\delta_C$  71,6), C-6 ( $\delta_C$  51,1) e C-11 ( $\delta_C$  42,6); (v) dos hidrogênios olefínicos H<sub>2</sub>-14 ( $\delta_H$  5,12 e 4,87) com C-6 ( $\delta_C$  51,1) e C-8 ( $\delta_C$  38,9); e por fim, (vi) dos hidrogênios olefínicos H<sub>2</sub>-15 em ( $\delta_H$  4,81 e 4,79) com C-4 ( $\delta_C$  132,5) e C-2 ( $\delta_C$  27,7). Estas correlações são observadas na figura 69, página 92.

**Figura 69.** Correlações apresentadas pelo espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  HMBC do composto **8**.



Após as análises dos espectros e a comparação com os dados da literatura, é possível concluir que a substância OREDM2D (**8**), se trata do isoobtusadieno, previamente relatado por Gerwick *et al.*, 1987.

A diferença existente entre o composto **8** e o isoobtusadieno descrito na literatura, são a inversão de certos valores de deslocamentos químicos em alguns sinais de carbono e hidrogênio, como pode ser observado na Tabela 9, página 93. Algumas correlações observadas no espectro de COSY (Figura 73, pág. 96) e HMBC (Figura 76, pág. 98).

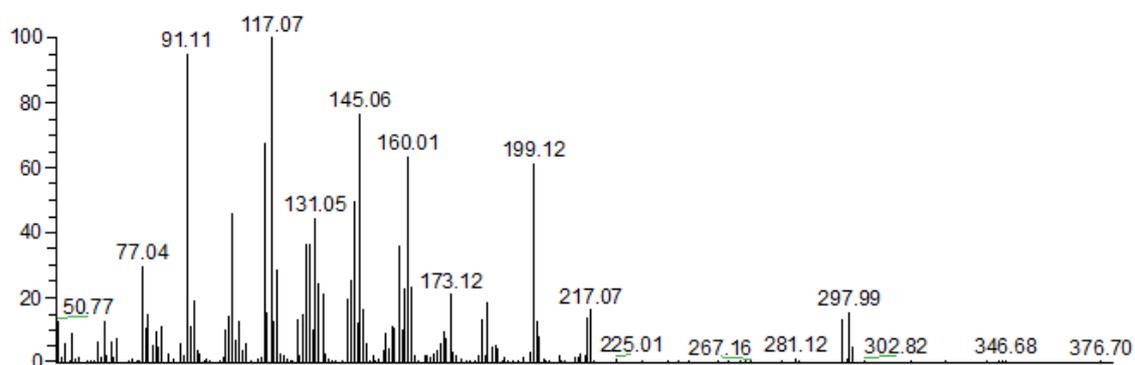
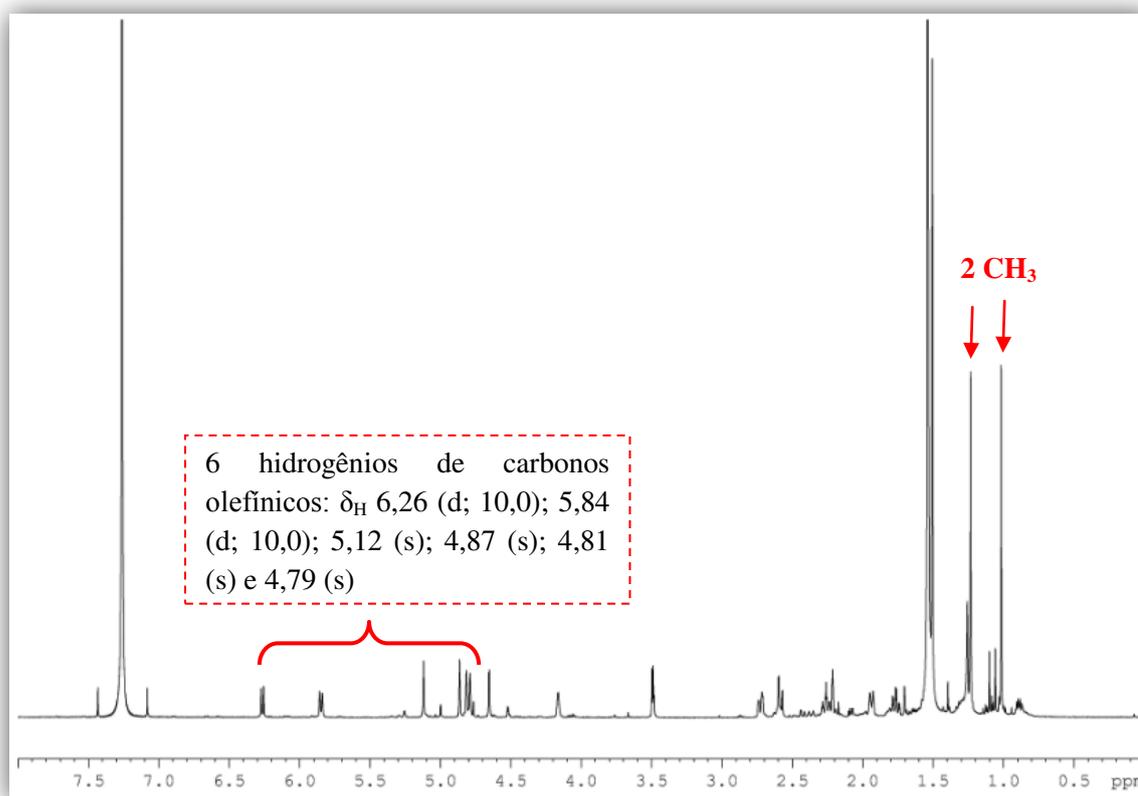
A exemplo de **7**, o composto **8** também foi analisado por CG-EM (Figura 70, pág. 94). Vale ressaltar que o isoobtusadieno foi isolado primeiramente da alga vermelha *Laurencia obtusa* (GERWICK *et al.*, 1987).

**Tabela 9.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **8** e do isoobtusadieno por Gerwick *et al.*, 1987.

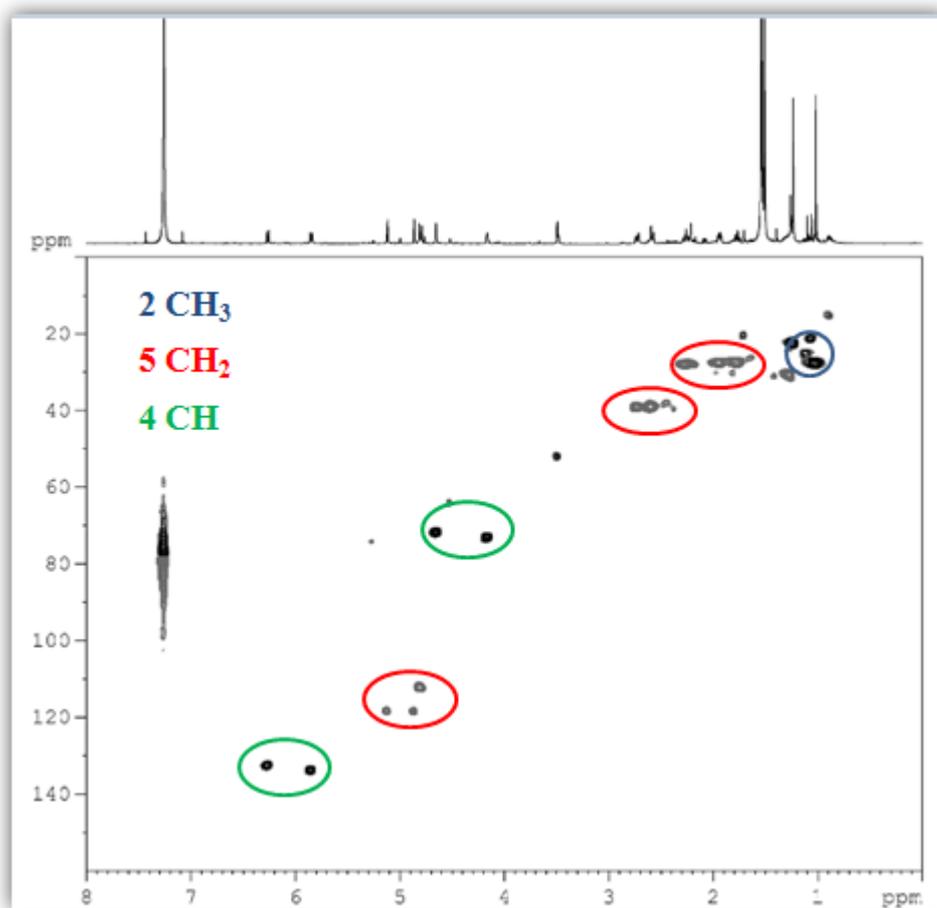
N <sup>o</sup>	OREDM2D ( <b>8</b> )		Isoobtusadieno	
	$\delta_{\text{H}}$ (multi, <i>J</i> em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (multi, <i>J</i> em Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	1,93 (m) 1,76(ddd; 13,0;13,0 e 4,0)	27,3	1,98-2,64 (m) <sup>a</sup>	26,5
2	2,27 (dt; 15,0 e 3,6) 2,20 (m)	27,7	1,98-2,64 (m) <sup>a</sup>	26,8
3	-	142,4	-	143,7 <sup>f</sup>
4	6,26 (d; 10,0)	132,5	5,84 (d; 10,2) <sup>b</sup>	131,5
5	5,84 (d; 10,0)	133,6	6,27 (d; 10,2) <sup>b</sup>	132,7
6	-	51,1	-	51,5
7	-	143,5	-	142,3 <sup>f</sup>
8	2,72 (dd; 15,5 e 1,6) 2,58 (dd; 15,5 e 2,0)	38,9	1,98-2,64 (m) <sup>a</sup>	37,9
9	4,16 (ddd; 2,6; 2,0 e 1,6)	73,1	4,15 (m)	72,1
10	4,65 (d; 2,6)	71,6	4,65 (d; 3,1)	70,6
11	-	42,6	-	42,8
12	1,02 (s)	27,6	1,23 (s) <sup>c</sup>	21,5 <sup>g</sup>
13	1,23 (s)	22,3	1,02 (s) <sup>c</sup>	26,5 <sup>g</sup>
14	4,87 (s) 5,12 (s)	118,1	4,80 (s) <sup>d</sup>	117,6
15	4,79 (s) 4,81 (s)	112,0	5,12 (s) <sup>e</sup> 4,86 (s) <sup>e</sup>	111,3

<sup>a</sup> Sobreposição de sinais.

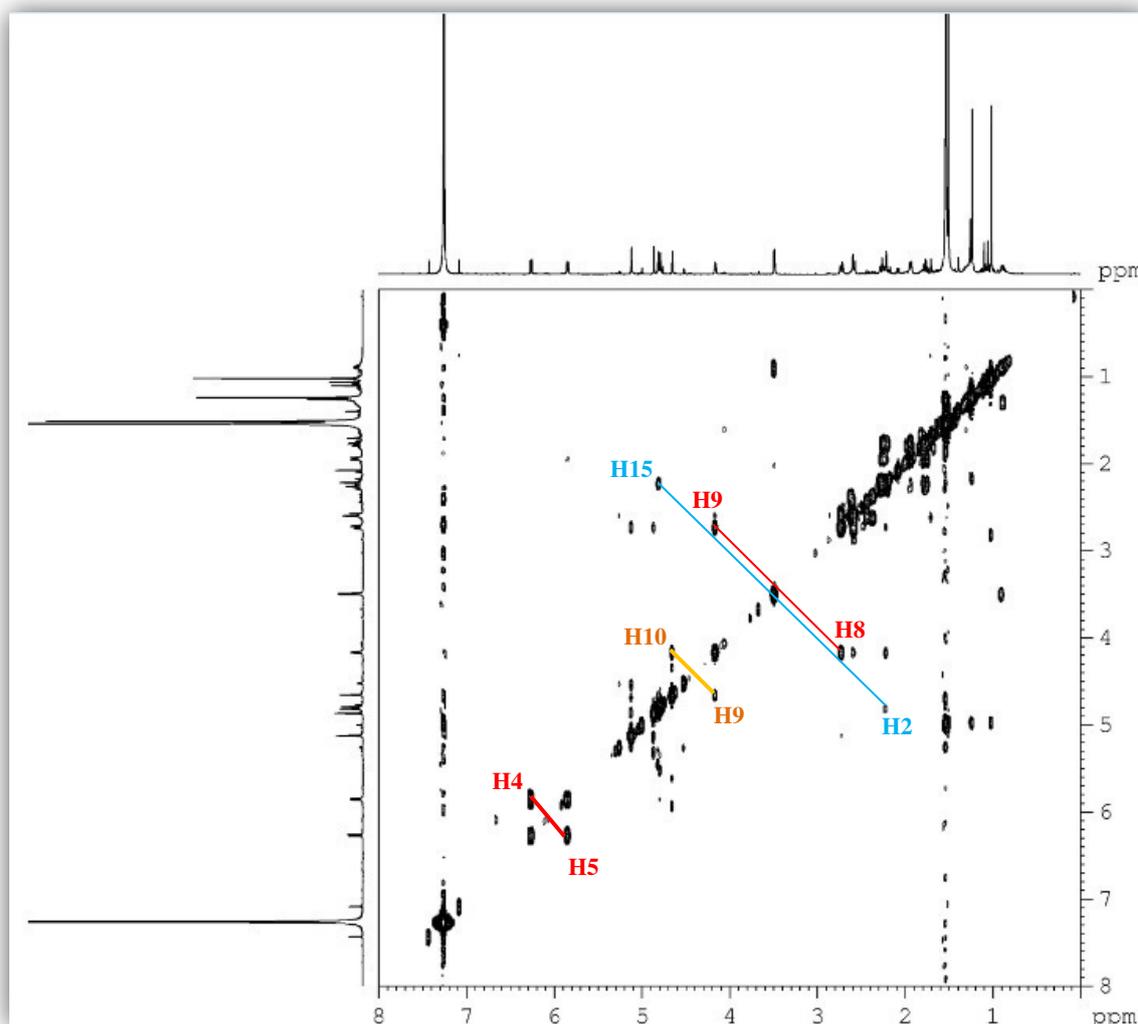
<sup>b,c,d,e</sup> Sinais com valores de deslocamento químico invertidos.

**Figura 70.** Espectro de massas do composto **8**.**Figura 71.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) do composto **8**.

**Figura 72.** Espectro de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC do composto **8**.

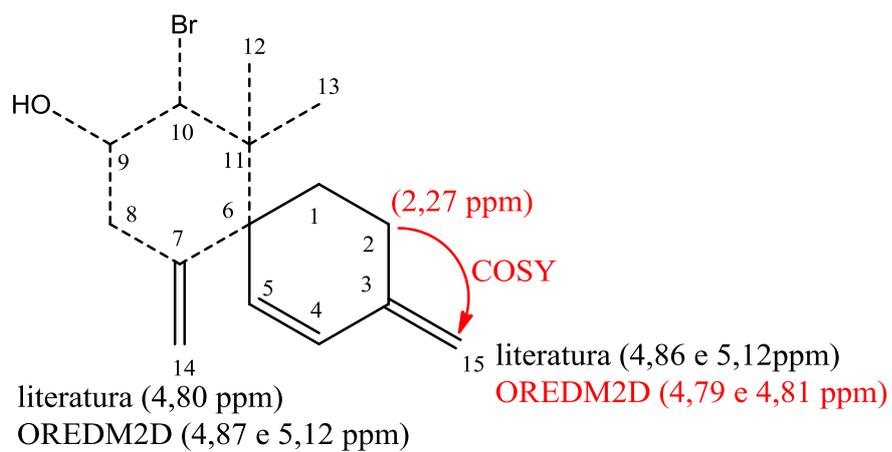


**Figura 73.** Espectro de correlação homonuclear  $^1\text{H}, ^1\text{H}$  COSY do composto **8**.

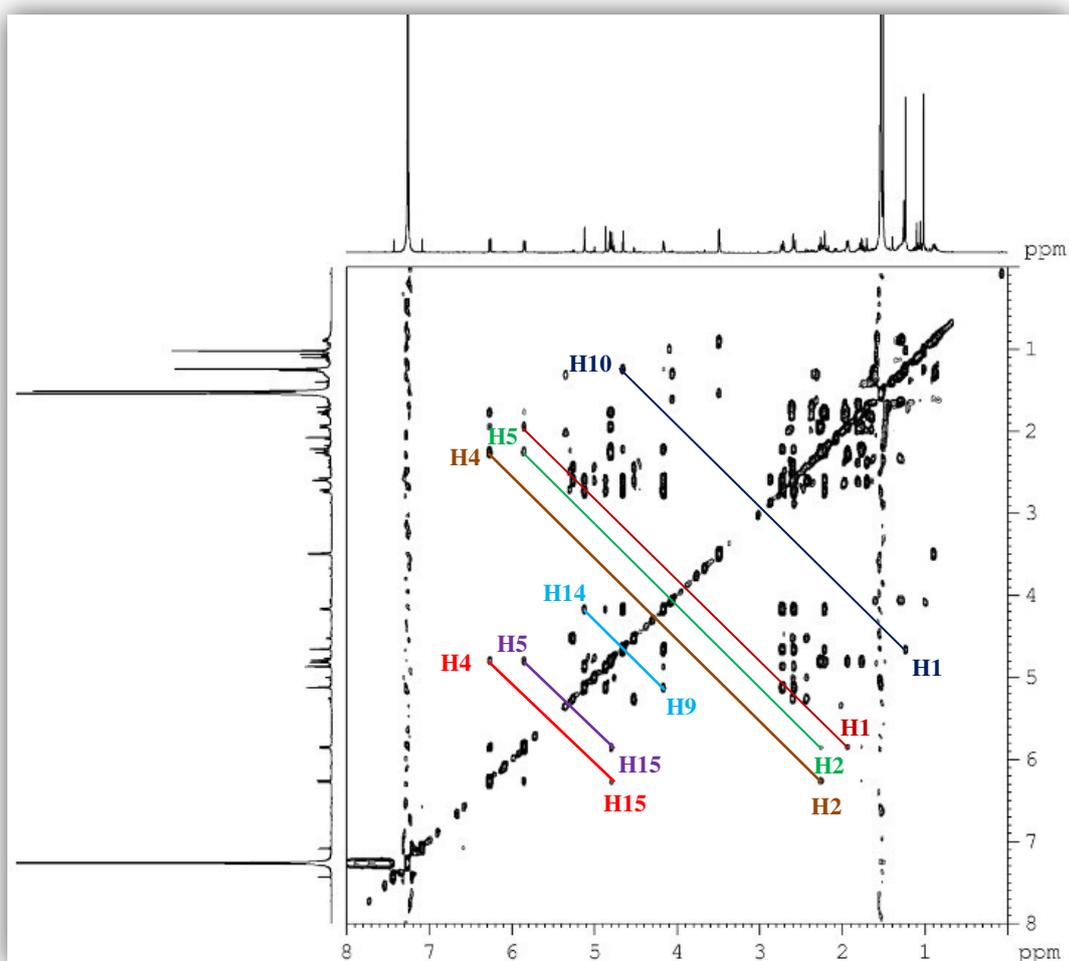


A correlação apresentada pelo hidrogênio metilênico ( $\text{H}_2$ -2) de  $\delta_{\text{H}}$  2,27 com os hidrogênios ligados a carbono olefínicos ( $\text{H}_2$ -15)  $\delta_{\text{H}}$  4,81, é utilizada para explicar a inversão de valores de deslocamento químico ( $\delta$ ) dos hidrogênios e carbonos localizados nas posições 14 e 15, pois se os valores de  $\delta$  permanecessem como Gerwick *et al.*, relata, não haveria a possibilidade dessa correlação, pois o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  4,81 seria atribuído aos hidrogênios na posição 14, sendo impossível a correlação desses hidrogênios na posição 2 ( $\text{H}_2$ -2) com os hidrogênios na posição 14 ( $\text{H}_2$ -14), como pode ser representado pela Figura 74, página 97.

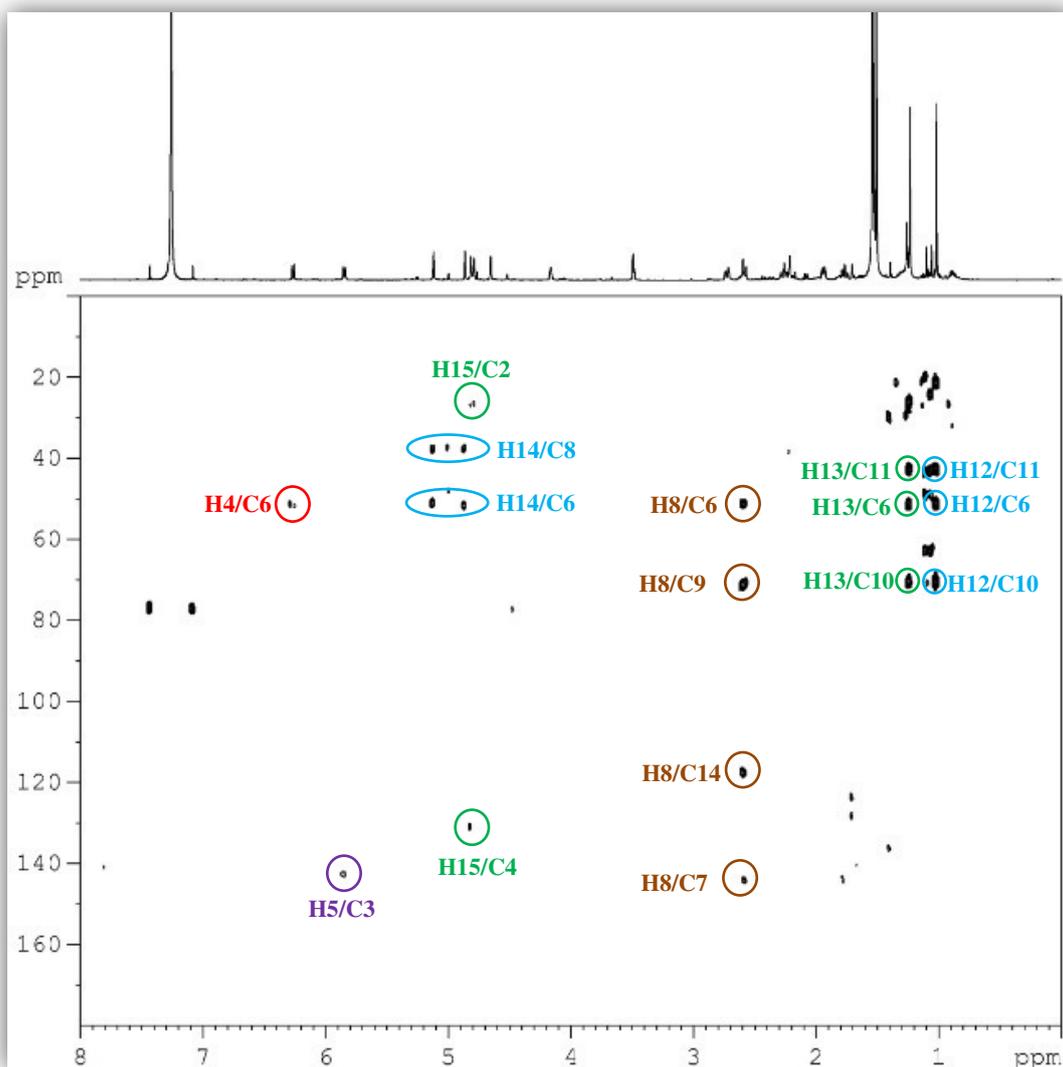
**Figura 74.** Correlação apresentada no espectro de COSY que justifica a inversão de valores entre o composto **8** e o isoobtusadieno segundo Gerwick *et al.*, 1987.



**Figura 75.** Espectro de correlação homonuclear  $^1\text{H}, ^1\text{H}$  TOCSY do composto **8**.

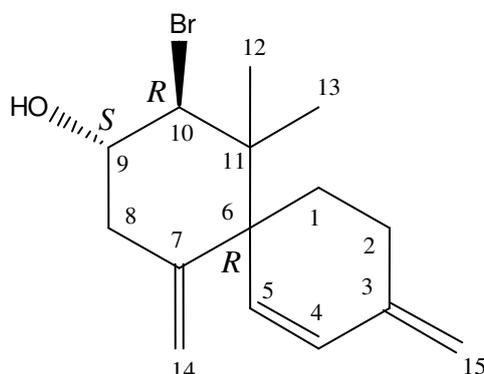


**Figura 76.** Espectro de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC do composto **8**.



As correlações entre  $\text{H}_2$ -14 ( $\delta_{\text{H}}$  4,87 e 5,12) com os C8 ( $\delta_{\text{C}}$  38,9) e C6 ( $\delta_{\text{C}}$  51,1) bem como entre  $\text{H}_2$ -15 ( $\delta_{\text{H}}$  4,79 e 4,81) com os C2 ( $\delta_{\text{C}}$  27,7) e C4 (132,5) corroboram para considerar realmente as inversões dos valores de deslocamento químico destacadas na tabela 9, página 93, quando comparados os compostos **8** e o isoobtusadieno descrito por Gerwick *et al.*, 1987. A estrutura do composto **8** está representada pela Figura 77, página 99.

**Figura 77.** Estrutura da substância OREDM2D (**8**).



**OREDMD2D (8):** Sólido branco,  $[\alpha]_D^{25} = -2,5$  (c 0,007 em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), fórmula molecular  $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{OBr}$ , massa molar 296,00 g/mol.

#### 4.1.7 OREDM2B

A substância OREDM2B (**9**) foi isolada do extrato metanólico da estrela do mar *O. reticulata* segundo a metodologia descrita no item 4.3.4.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) do composto **9** (Figura 80, pág. 102) mostrou-se semelhante ao do isoobtusadieno (**8**), sendo a diferença, o acréscimo de um singlete intenso em  $\delta_{\text{H}}$  2,08, correspondente a uma metila de um grupo acila, Tabela 10, página 100.

Os espectros bidimensionais de RMN  $^1\text{H},^{13}\text{C}$  HMBC (Figura 84, pág.106) e HSQC (Figura 81, pág. 103) mostraram sinais para uma carbonila de éster em  $\delta_{\text{C}}$  170,0 e uma metila em  $\delta_{\text{C}}$  22,9 em adição aos seis sinais para carbonos olefínicos em  $\delta_{\text{C}}$  143,2; 141,9; 135,3; 134,2; 119,4 e 113,6; dois sinais para carbonos metínicos, um deles oxigenado em  $\delta_{\text{C}}$  73,2 e o outro bromado em  $\delta_{\text{C}}$  63,5, três sinais para carbonos metilênicos em  $\delta_{\text{C}}$  37,0; 29,5 e 29,0, três sinais para carbonos metílicos em  $\delta_{\text{C}}$  28,4; 22,9 e 22,6; e por fim, dois sinais para carbonos  $\text{sp}^3$  não hidrogenados em  $\delta_{\text{C}}$  50,7 e 42,4 evidenciando a estrutura do isoobtusadieno acetilado.

A análise dos espectros bidimensionais COSY (Figura 82, pág. 104) e TOCSY (Figura 83, pág. 105) permitiu organizar os mesmos sistemas de *spins* (Figura 78, pág.

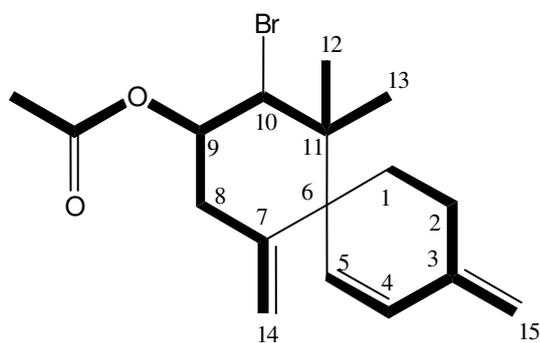
101) encontrados para o composto **8** (item 3.1.6), incluindo a correlação do sinal dos hidrogênios metílicos em ( $\delta_{\text{H}}$  2,08) com o hidrogênio metínico H-9 ( $\delta_{\text{H}}$  5,29). O grupamento acetila também foi confirmado através do espectro HMBC (Figura 84, pág. 106) com a correlação do sinal dos hidrogênios metílicos ( $\delta_{\text{H}}$  2,08) com o carbono da carbonila em ( $\delta_{\text{C}}$  170,0).

O espectro de massas de **9** foi obtido por CG-EM (Figura 79, página 101), confirmando a estrutura do isoobtusadieno acetilado, o qual ainda não havia sido registrado na literatura.

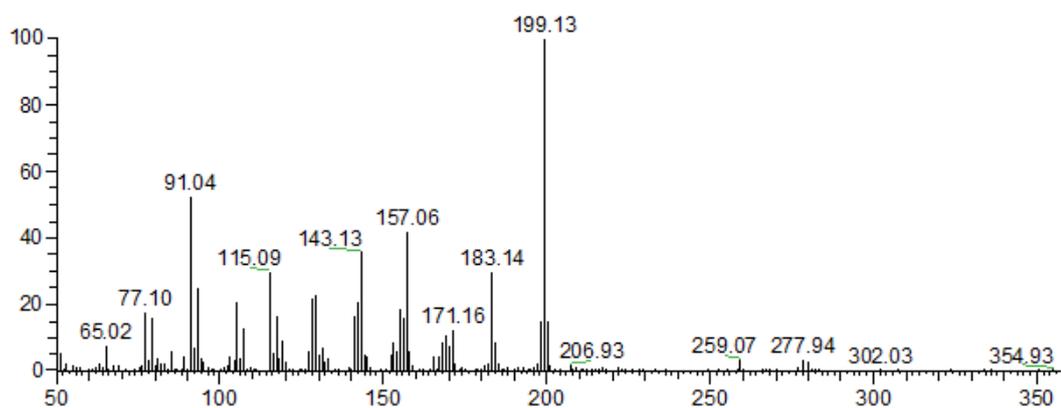
**Tabela 10.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para os compostos **8** e **9**.

Nº	OREDM2D ( <b>8</b> )		OREDM2B ( <b>9</b> )	
	$\delta_{\text{H}}$ (multi, J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (multi, J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	1,93 (m) 1,76(ddd; 13,0;13,0 e 4,0)	27,3	1,91 (m) 1,78 (ddd; 13,0; 13,0 e 4,0)	29,0
2	2,27 (dt; 15,0 e 3,6) 2,20 (m)	27,7	2,28 (dt; 15,0 e 3,7) 2,20 (m)	29,5
3	-	142,4	-	141,9
4	6,26 (d; 10,0)	132,5	6,28 (d; 10,5)	134,2
5	5,84 (d; 10,0)	133,6	5,84 (d; 10,5)	135,3
6	-	51,1	-	50,7
7	-	143,5	-	143,2
8	2,72 (dd; 15,5 e 1,6) 2,58 (dd; 15,5 e 2,0)	38,9	2,72 (dd; 15,5 e 1,6) 2,46 (dd; 15,5 e 2,0)	37,0
9	4,16 (ddd; 2,6; 2,0 e 1,6)	73,1	5,29 (ddd; 3,3; 2,0 e 1,6)	73,2
10	4,65 (d; 2,6)	71,6	4,55 (d; 3,3)	63,5
11	-	42,6	-	42,4
12	1,02 (s)	27,6	1,03 (s)	28,4
13	1,23 (s)	22,3	1,22 (s)	22,6
14	4,87 (s) 5,12 (s)	118,1	4,85 (s) 5,01 (s)	119,4
15	4,79 (s) 4,81 (s)	112,0	4,80 (s) 4,82 (s)	113,6
CH <sub>3</sub> COO-	-	-	-	170,0
CH <sub>3</sub> COO-	-	-	2,08 (s)	22,9

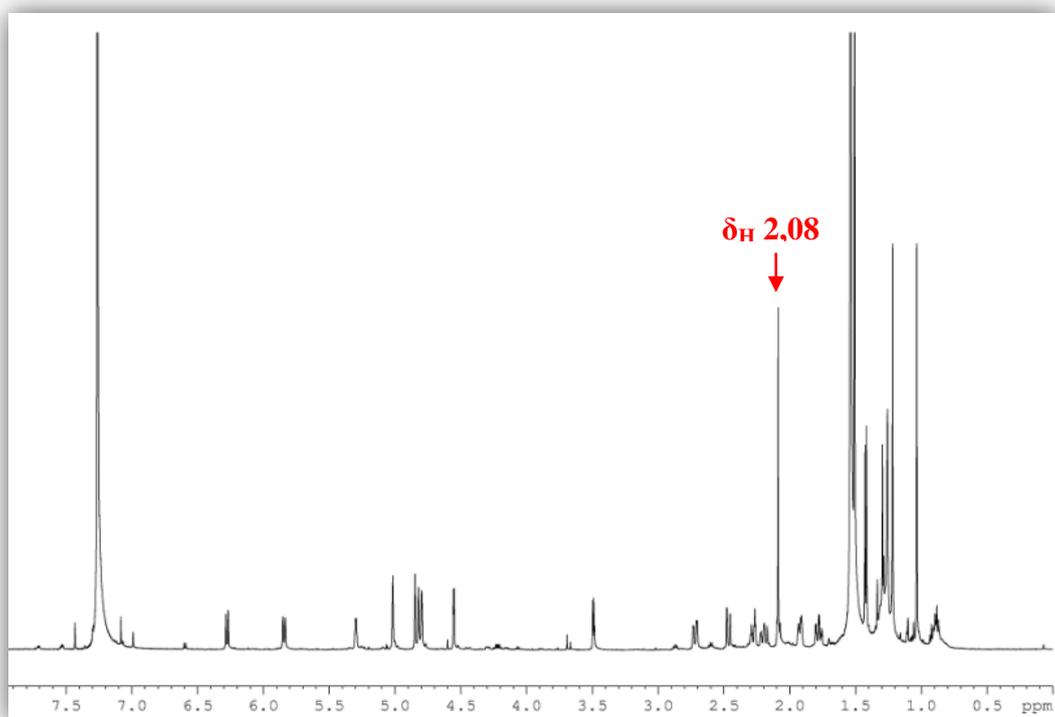
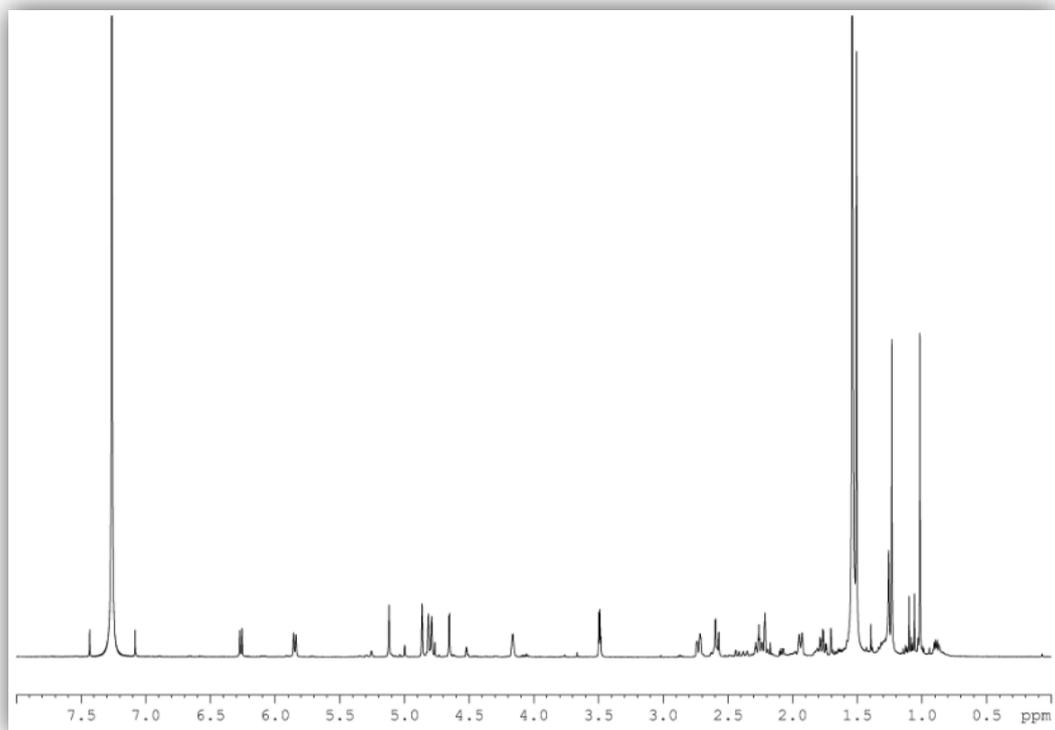
**Figura 78.** Sistema de *spins* observados nos espectros de COSY e TOCSY para OREDM2B (**9**).



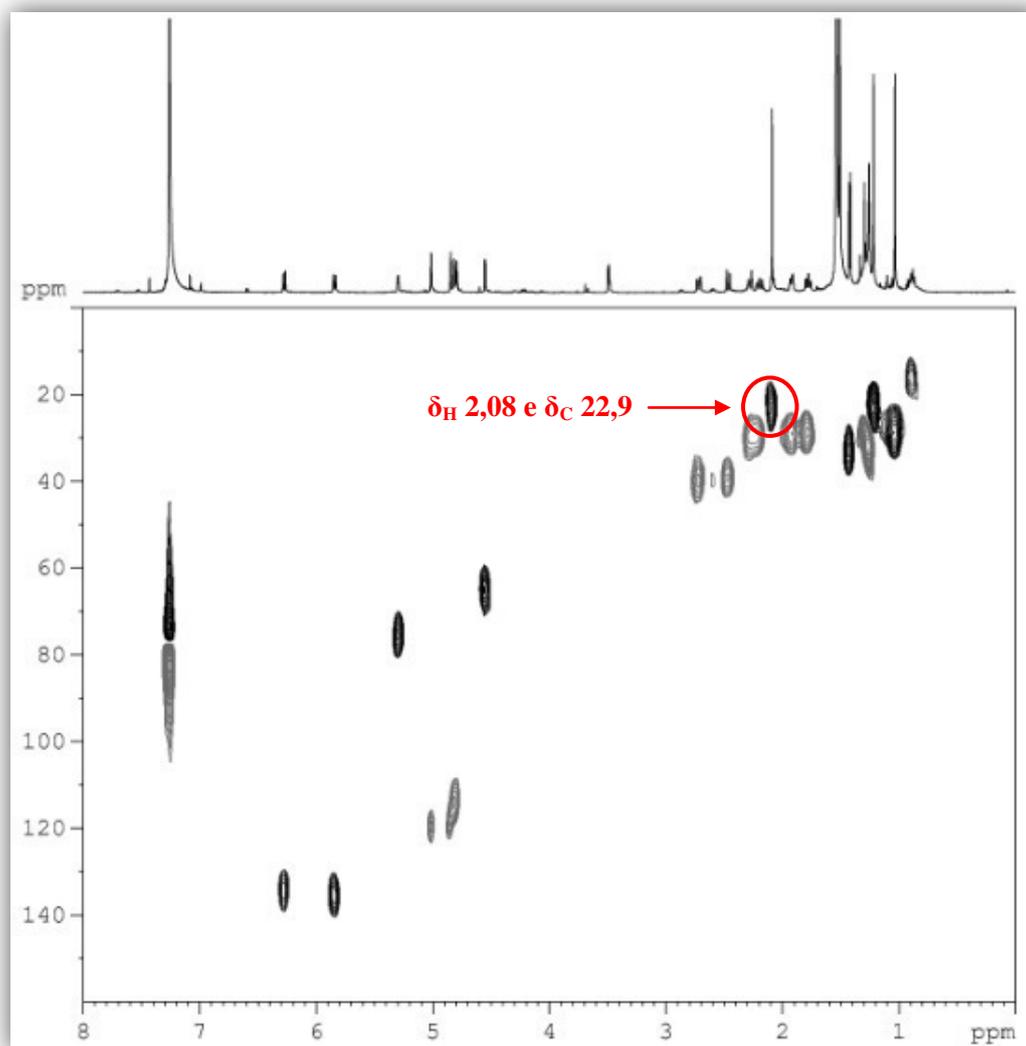
**Figura 79.** Espectro de massas do composto **9**.



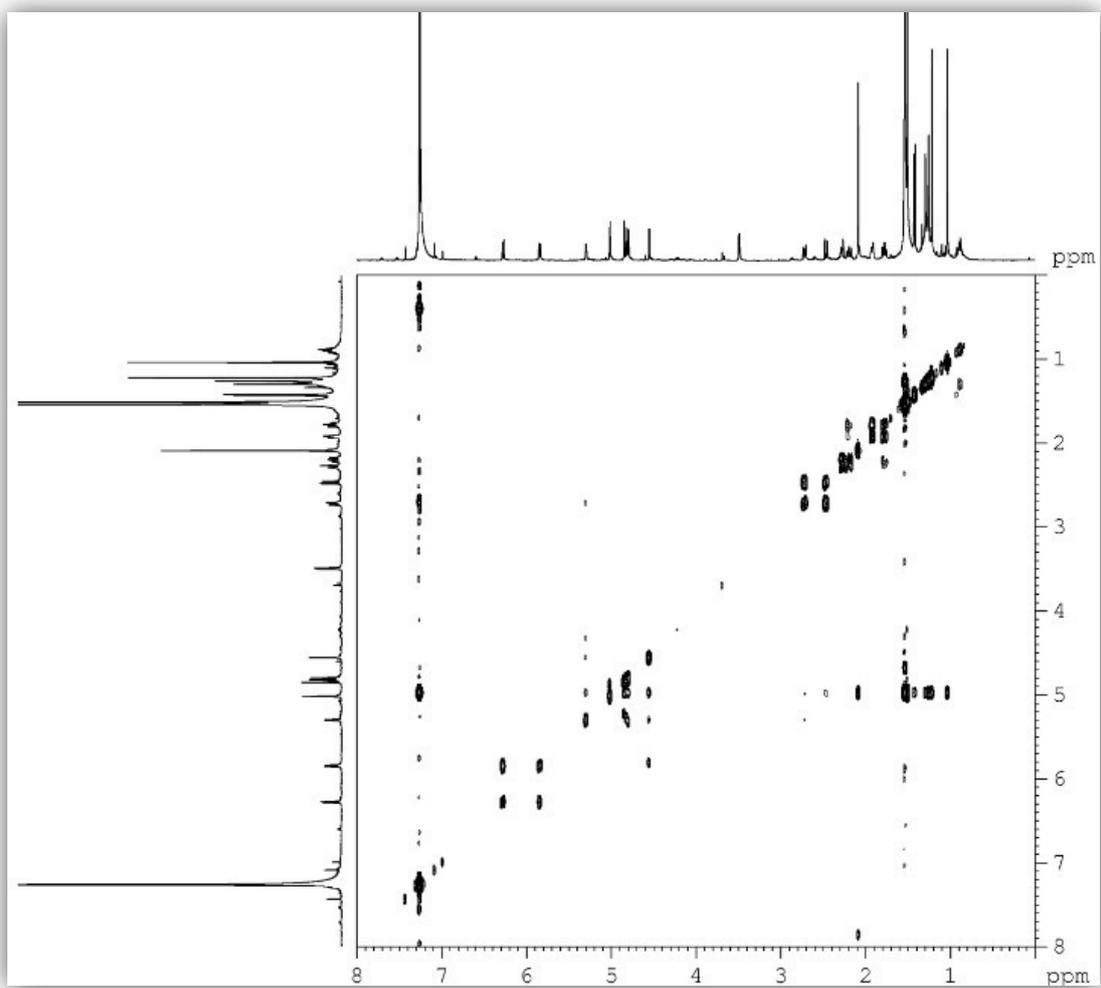
**Figura 80.** Comparação entre os espectros de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) para o composto **8** (superior) e composto **9** (inferior).



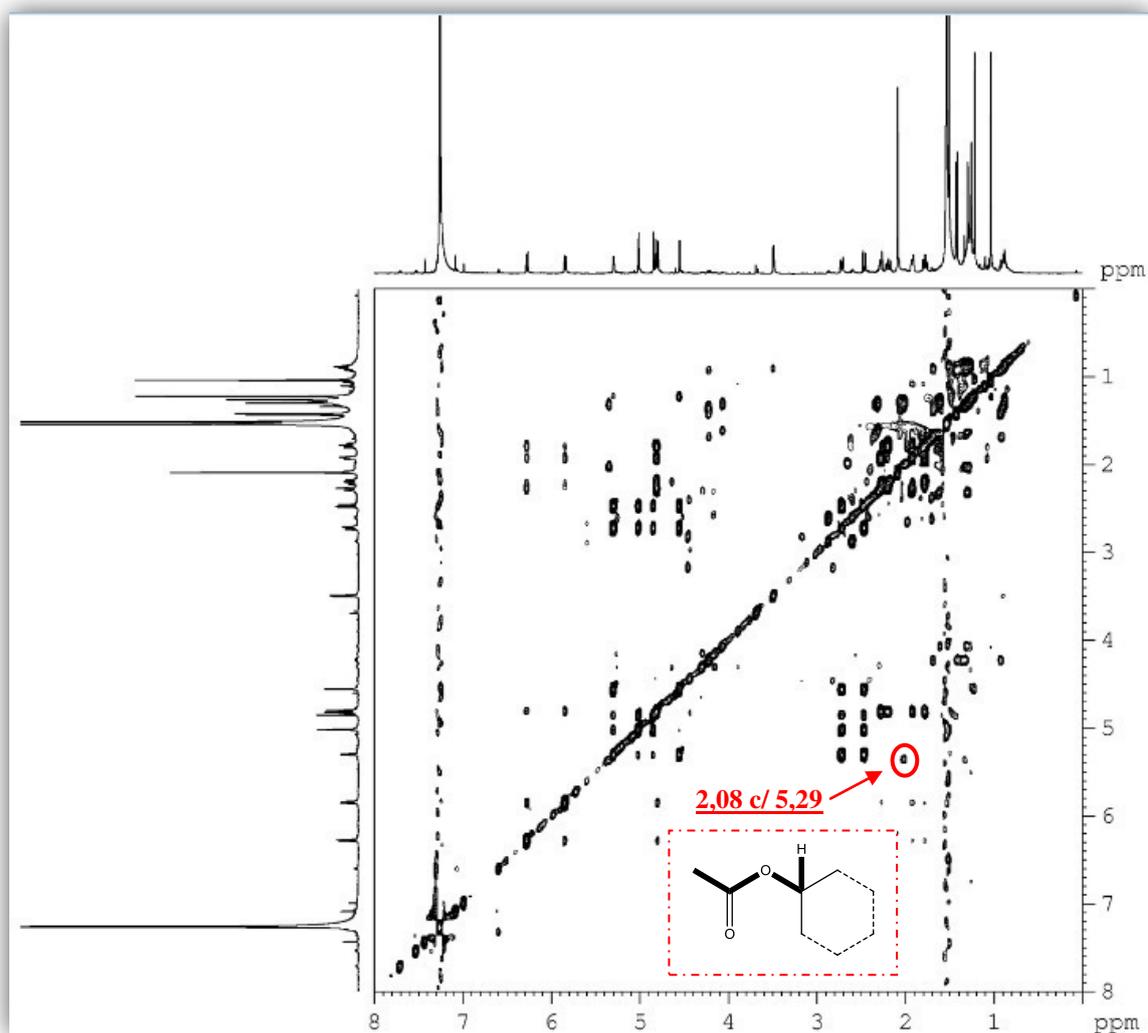
**Figura 81.** Espectro bidimensional de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC para o composto **9**.



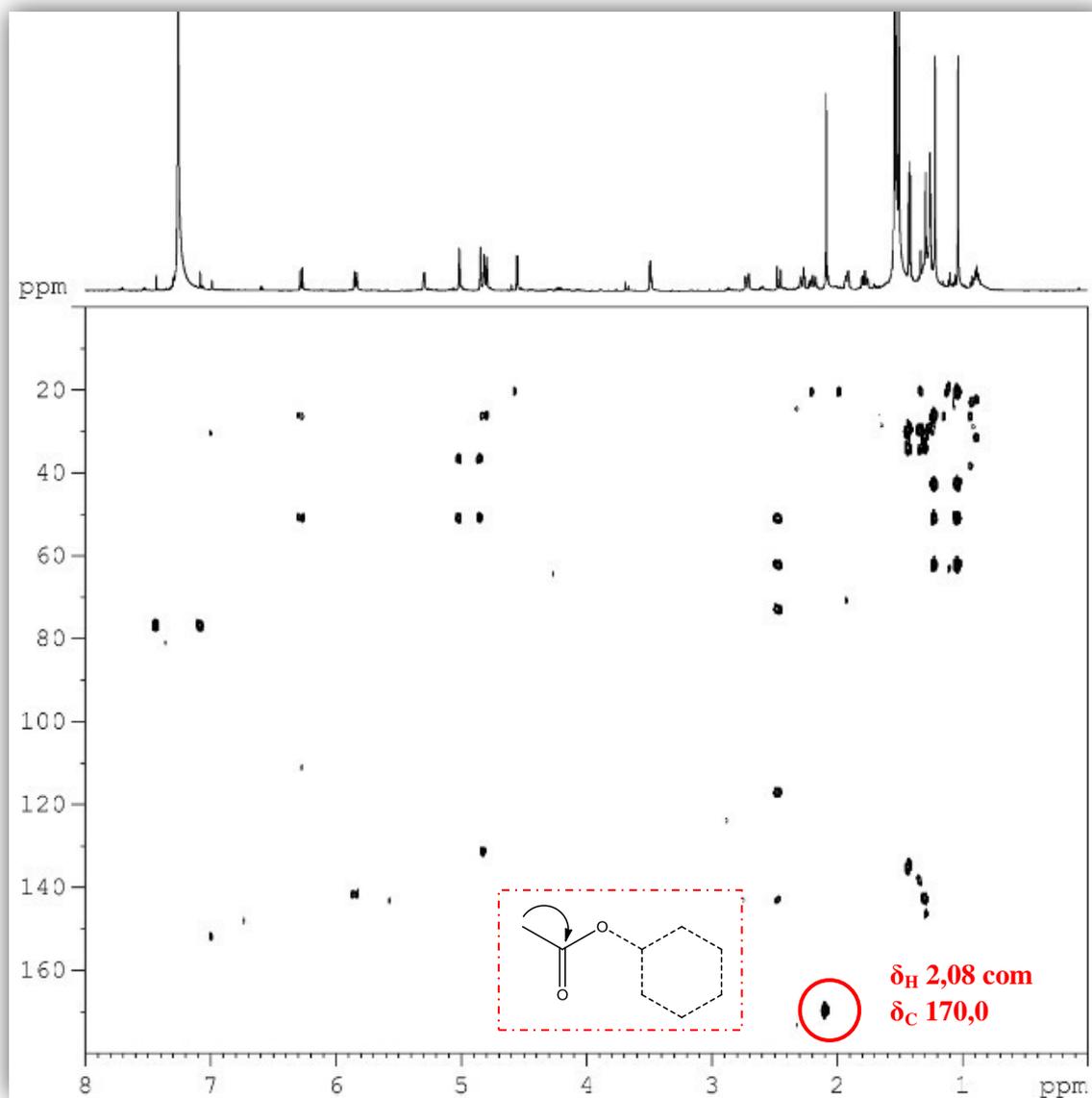
**Figura 82.** Espectro bidimensional de correlação homonuclear  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY do composto **9**.



**Figura 83.** Espectro bidimensional de correlação homonuclear  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  TOCSY do composto **9**.

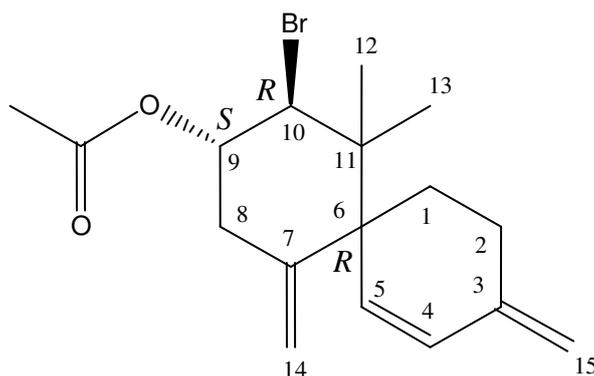


**Figura 84.** Espectro bidimensional de correlação heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC para o composto **9**.



Diante de todas as análises espectrais e comparações com os valores de deslocamento químico, o composto **9** trata-se realmente do derivado acetilado do composto **8** denominado de Isoobtusadieno, sendo assim o acetilisoobtusadieno visto na Figura 85 a seguir.

**Figura 85.** Estrutura da substância OREDM2B (**9**).



**ORED M2B (9):** Sólido branco,  $[\alpha]_D^{20} = -27,0$  ( $c$  0.007 em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); fórmula molecular C<sub>17</sub>H<sub>23</sub>O<sub>2</sub>Br; massa molar 338,00 g/mol.

### 3.2 Atividade Citotóxica

A atividade citotóxica dos compostos isolados (**1**, **2**, **3**, **5** e **6**) com quantidades suficientes para o teste foi realizada como descrito na experimental, item 4.3.5, página 116, cujos resultados estão expressos na Tabela 11, a seguir.

**Tabela 11.** Atividade citotóxica dos compostos **1**, **2**, **3**, **5** e **6**.

Compostos	IC <sub>50</sub> (μM)
SB 2H (1)	10,2
SB 2F (2)	12,15
SB 4E (3)	10,0
SB 4M (5)	10,0
SB 5E (6)	9,8
DOXORUBICINA	0,02 - 0,03

A linhagem de célula cancerígena testada foi a HCT-116 (câncer de cólon), e como controle positivo foi utilizada a doxorubicina.

Este estudo de atividade citotóxica visou incrementar dados e investigar mais a respeito dessa classe de substâncias, os anfidinolidos, já que a mesma apresenta inúmeros relatos na literatura como sendo bons agentes antitumorais, Bauer *et al.*, 1994; Ishibashi *et al.*, 1987; Ishibashi *et al.*, 1994, dentre outros. Em Ishibashi *et al.*, 1987, é relatado o anfidinolido B como um potente agente citotóxico, porém seu análogo isolado e testado nesse trabalho, SB 4E (**3**) definido como anfidinolido B8 não apresentou uma grande atividade citotóxica, podendo ser devido a diferença existente entre os dois, no que se trata do anel epóxido presente entre os carbonos 9 e 8 no anfidinolido B ao invés do dialcool vicinal existente no anfidinolido B8. Os estudos de atividade biológica são de grande importância para a descoberta de novos metabólitos bioativos e dos estudos da relação estrutura-atividade, podendo levar a elucidação da ineficiência das substâncias e indicando caminhos para o aumento da bioatividade das mesmas.

## 4 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

### 4.1 Material de estudo

Os materiais estudados foram o octocoral *Stragulum bicolor* (Octocorallia: Clavulariidae) que foi coletado em zona de maré baixa na praia da Caponga (04°02'S 38°11'W) no município de Cascavel, Ceará, Brasil e a estrela marinha *Ophionereis reticulata*, a qual foi coletada em zona de maré baixa na praia do Paracuru (03°25'30"S e 39°01'28"W), Ceará, Brasil. A identificação da espécie *S. bicolor* foi conduzida pelo Prof. Dr. Tito Monteiro da Cruz Lotufo da Universidade de São Paulo, e um exemplar está depositado no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. Já a identificação do *O. reticulata* foi conduzida pelo Prof. Ms. Felipe Monteiro do Instituto Federal de Educação do Ceará, e um exemplar do mesmo encontra-se depositado no Laboratório de Invertebrados Marinhos, na Universidade Federal do Ceará.

### 4.2 Materiais e equipamentos utilizados

Todas as análises deste trabalho foram realizadas na central analítica do Instituto de Química Biomolecular, localizado na cidade de Pozzuoli, Nápoles, Itália, com a supervisão do Dr. Angelo Fontana, Dra. Adele Cutignano e Dra. Genoveffa Nuzzo.

Os dados espectroscópicos foram obtidos em um espectrômetro Bruker DRX 600 equipado com uma criosonda inversa. Os valores de deslocamentos foram reportados em PPM e referenciados aos sinais internos dos prótons residuais ( $C_6D_6$   $^1H$   $\delta$  7,25;  $^{13}C$   $\delta$  128,0 ppm;  $CDCl_3$   $^1H$   $\delta$  7,26;  $^{13}C$  77,0 ppm).

Os espectros de massa de alta resolução foram adquiridos num Espectrômetro de Massa híbrido Quadrupolar-Orbitrap Thermo Scientific™ Q-Exactive™.

As rotações ópticas foram medidas no polarímetro digital Jasco modelo P2000.

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência foram realizadas em um HPLC Jasco (PU-2089) equipado com detector (MD-2018) de arranjo de diodo.

O sistema de extração em fase sólida foi uma resina de poliestireno-divinil benzeno (CHROMABOND® HR-X, Macherey-Nagel, Düren, Germany).

A sílica utilizada na cromatografia de camada delgada (CCD) foi da marca Merck do tipo F254.

Nas análises de CCD foram utilizados solventes de grau de pureza HPLC. E todos os solventes eram da marca SIGMA-ALDRICH.

### **4.3 Procedimento experimental**

#### **4.3.1 Preparação dos extratos metanólicos de *S. bicolor* e *O. reticulata*.**

Após a coleta, o invertebrado *S. bicolor* foi submetido à extração com metanol (3 x 300mL) resultando em um extrato em fase orgânica que após seco para a remoção total de metanol teve como massa 936,0 mg.

O *S. bicolor* (material biológico remanescente) após a extração e toda a evaporação de solvente e água residuais teve como massa 4,1 g.

Também após a coleta, *O. reticulata* foi submetido ao mesmo processo de extração com metanol (3 x 300mL), resultando em um extrato que após seco teve como massa 81,2 mg.

*O. reticulata* (material biológico remanescente) após toda a evaporação de solvente e água residuais apresentou massa de 876,0 mg.

#### **4.3.2 Isolamento de SB 2H (1) e SB 2F (2)**

Uma pequena parte do extrato metanólico de *S. bicolor* (250,0 mg) foi suspensa em 1,0 mL de água destilada e submetido a extração na resina CHROMABOND<sup>®</sup> HR-X (2,5 g) utilizando os solventes mostrados na Tabela 12.

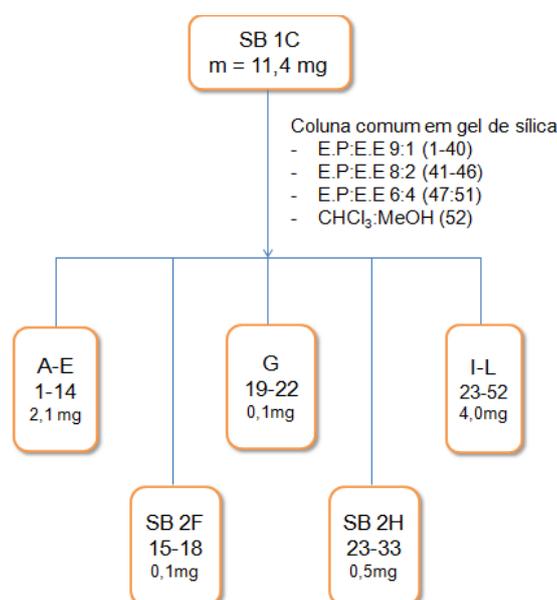
**Tabela 12.** Solventes utilizados no processo de extração em fase sólida do extrato metanólico de *Stragulum bicolor* para isolamento de SB 2H (1) e SB 2F (2).

Solvente	Volume (mL)	Massa (mg)	Denominação
Água 100%	90	145,1	SB 1A
Acetonitrila/água 7:3	60	17,5	SB 1B
Acetonitrila 100%	45	11,4	SB 1C
Diclorometano/metanol 9:1	45	17,4	SB 1D

A fração SB 1C (11,4 mg) por apresentar um excelente perfil cromatográfico quando analisada em CCD e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas foi submetida a uma cromatografia gravitacional em gel de sílica, utilizando como eluentes o éter de petróleo, éter etílico, clorofórmio e metanol nas proporções que são apresentadas no Fluxograma 1.

O resultado foi o isolamento de duas substâncias, SB 2F e SB 2H, que foram submetidas à análise de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas.

**Fluxograma 1.** Fracionamento de SB 1C.



### 4.3.3 Isolamento de SB 4E (3), SB 4D (4), SB 4M (5) e SB 5E (6)

A maior parte do extrato metanólico de *S. bicolor* (680,0 mg) foi suspenso em 2 mL de água destilada e submetido a extração na resina CHROMABOND<sup>®</sup> HR-X (6,4 g) utilizando os solventes mostrados na Tabela 13.

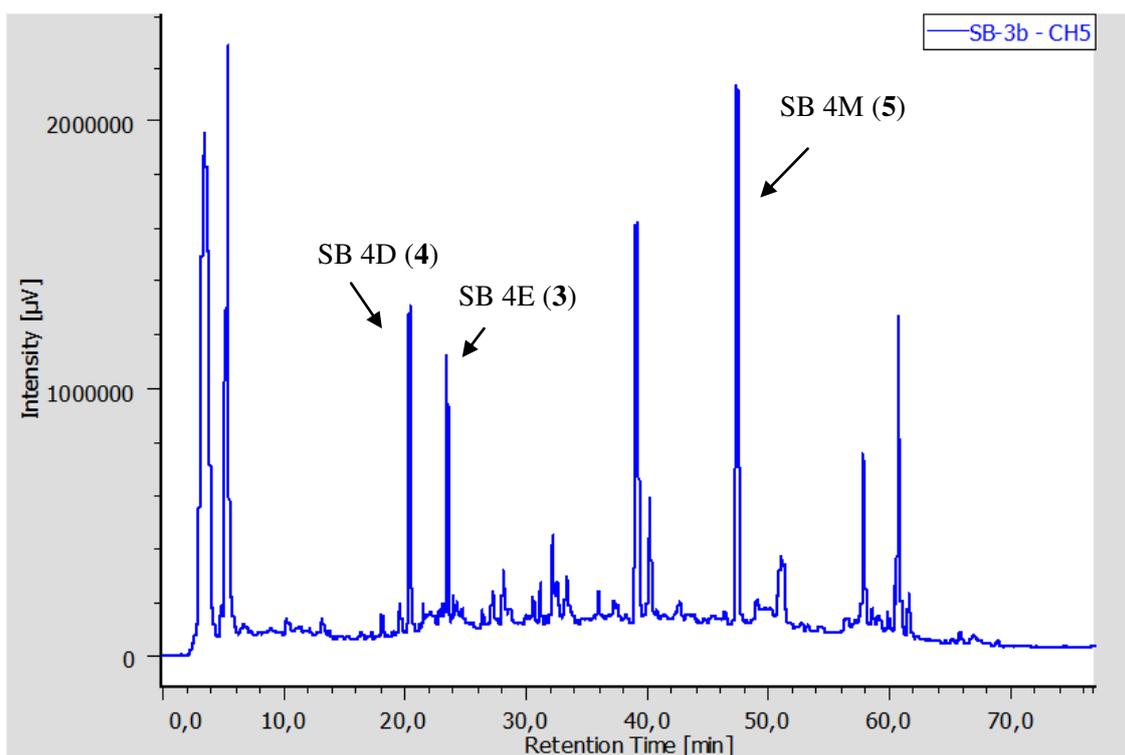
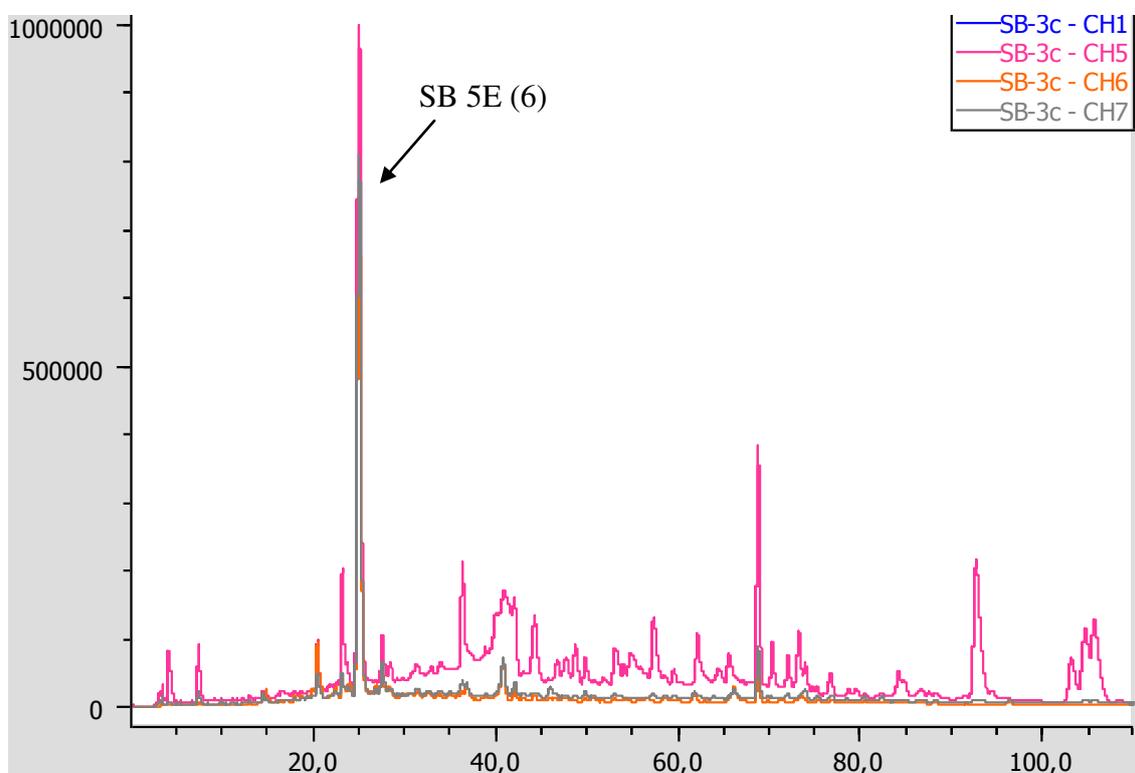
**Tabela 13.** Solventes utilizados no processo de extração, em fase sólida, do extrato metanólico de *S. bicolor* para isolamento de SB 4E (3), SB 4D (4), SB 4M (5), SB 5E (6).

Solvente	Volume (mL)	Massa (mg)	Denominação
Água 100%	240	445,1	SB 3A
Acetonitrila/água 7:3	160	18,17	SB 3B
Acetonitrila 100%	120	11,92	SB 3C
Diclorometano/metanol 9:1	120	45,74	SB 3D

A fração SB 3B cerca de 16,0 mg foi submetida a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa, fazendo uso de uma coluna Phenomenex Luna C18 (250 x 10 mm, 5 $\mu$ ) num fluxo contínuo de 3mL/min, usando os seguintes canais de observação (200-600 nm), com o seguinte método em gradiente de análise: inicia-se a corrida cromatográfica com a mistura Acetonitrila:água na proporção (3:7) durante 5 minutos, até chegar na proporção (4:6) que foi aumentada gradativamente para a proporção (80:20) em 45 minutos, em seguida aumentou-se para 100% de Acetonitrila em 5 minutos e finalizando por cerca 10 minutos. O cromatograma dessa análise é mostrado na Figura 86, página 114.

Uma amostra de 10,0 mg da fração SB 3C foi submetida a CLAE em fase reversa, fazendo uso de uma coluna Phenomenex Luna C18 (250 x 10 mm, 5 $\mu$ ) num fluxo contínuo de 3mL/min, usando os seguintes canais de observação (200-600 nm, 220nm, 240 nm), com o seguinte método em gradiente de análise: inicia-se a corrida cromatográfica com a mistura Acetonitrila:água na proporção (65:35) que foi

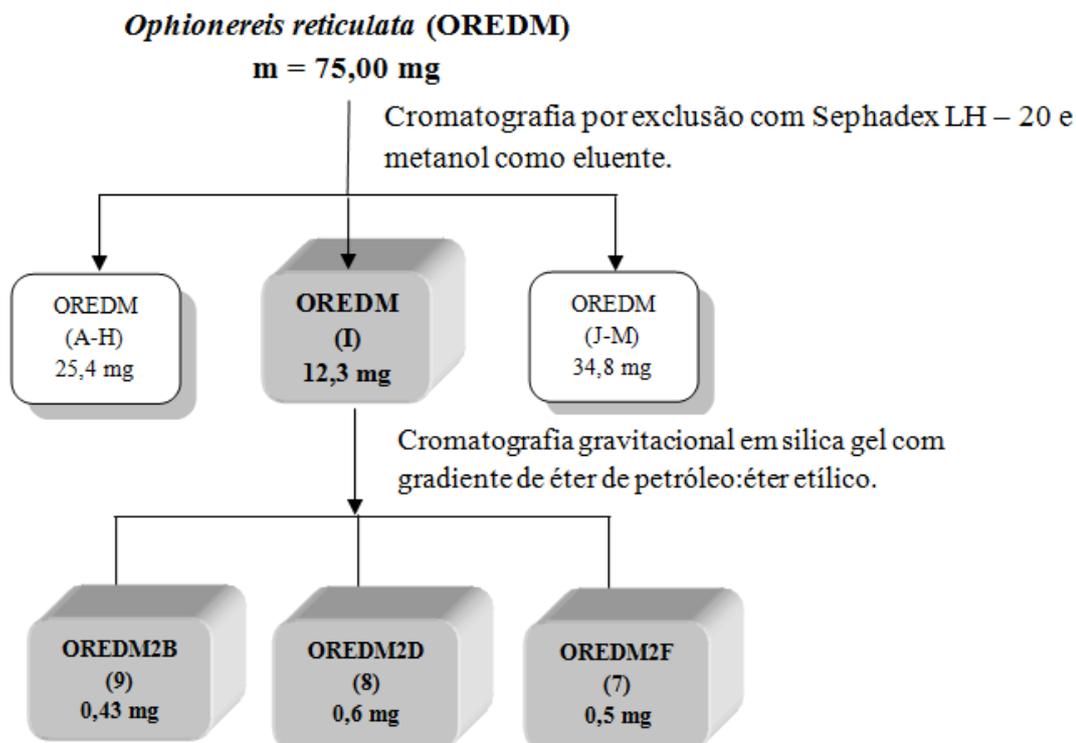


**Figura 86.** Cromatograma para isolamento de SB 4E (3), SB 4D (4) e SB 4M (5).**Figura 87.** Cromatograma para isolamento de SB 5E (6).

#### 4.3.4 Isolamento dos compostos OREDM2F (7), OREDM2D (8) e OREDM2B (9).

Uma parte do extrato metanólico de *O. reticulata* de massa 75,0 mg foi submetida a uma cromatografia por exclusão molecular usando como fase estacionária o polímero SEPHADEX LH-20 e como eluente metanol grau CLAE. As frações foram analisadas por CCD e agrupadas em treze grupos denominados de A a M segundo o perfil cromatográfico. A fração I (12,3 mg) apesar de possuir uma quantidade menor de massa em relação as demais, após análise em CCD e posteriormente, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, mostrou-se bem interessante, sendo assim submetida a cromatografia gravitacional em gel de sílica através de um gradiente, utilizando como eluentes, misturas de éter de petróleo e éter etílico em ordem crescente de polaridade. As frações correspondentes a mistura Éter de petróleo:Éter etílico 9:1 resultou na purificação dos compostos (7), (8) e (9). O processo de isolamento dessas substâncias é apresentado no Fluxograma 3.

**Fluxograma 3.** Métodos de isolamento das substâncias OREDM2F (7), OREDM2D (8) e OREDM2B (9).



#### 4.3.5 Atividade citotóxica

A citotoxicidade dos compostos foi avaliada contra linhagem celular de câncer do colon adenocarcinoma HCT-116 (ATCCCL-247<sup>TM</sup>). As células foram mantidas em meio RPMI 1640 suplementadas com soro 10% (v/v) de feto bovino, glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mL, streptomomicina 100 µg/mL a 37 °C sobre uma atmosfera de CO<sub>2</sub> 5%. Os compostos foram testados com as concentrações variando de 0,001 a 25 µM durante 72 horas. O efeito na proliferação celular foi avaliado *in vitro* usando o ensaio MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazolyl)-2,5diphenyl-2H-tetrazolium bromide], como descrito por Mosmann, 1983. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo. Os valores de IC<sub>50</sub> (Concentração de inibição de crescimento em 50%) foram calculados juntamente com o respectivo 95% CI (intervalo de confiança) por regressão não linear utilizando o software GrafPad Prism 5.0.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho compreende o primeiro estudo dos organismos marinhos, octocoral *S. bicolor* e estrela do mar *O. Reticulata*, ambos coletados no litoral cearense. De *S. bicolor* foram isolados substâncias da classe dos anfidinolidos que até então nunca tinham sido relatado sua presença em outras fontes, que não fossem dos dinoflagelados *Amphidinium* sp., de onde deriva o nome anfidinolidos. De *O. Reticulata* foram obtidos três sesquiterpenos do tipo chamigrano. Os anfidinolidos isolados nesse trabalho foram os já relatados na literatura, o (SB 2H) anfidinolido P e (SB 5E) anfidinolido T, além de quatro novos: (SB 2F) 3-O-metil-anfidinolido P, (SB 4E) anfidinolido B8, (SB 4D) anfidinolido B9, (SB 4M) anfidinolido C4. Os anfidinolidos são potentes agentes anticancer como descrito por Kobayashi e Tsuda, 2004; porém os compostos aqui isolados apresentaram atividades citotóxicas moderadas. Uma possível justificativa seria as pequenas alterações estruturais, como por exemplo, a ausência do grupo epóxido em C8-C9 nos anfidinolidos B8 e B9, mas presente em seu análogo anfidinolido B, fazendo deste um potente agente anticancer. Interessantemente, os sesquiterpenos elatol (OREDM2F), isoobtusadieno (OREDM2D) e o acetil-isoobtusadieno (OREDM2B) isolados de *O. Reticulata*, já são considerados marcadores quimiotaxonomico de algas do genero *Laurencia*. Uma vez que este invertebrado se alimenta de algas, é muito provável que estes compostos sejam fruto do regime alimentar destes animais marinhos. Os resultados e observações adquiridos corroboram para a importância dos estudos na área de Química de Produtos Naturais Marinhos como fonte de novos e potenciais agentes antitumorais, tanto para a obtenção de novas substâncias, quanto para a possibilidade de servir como modelo na síntese de compostos análogos visando o uso biológico e farmacológico.

## REFERÊNCIAS

- ALTVATER, L.; COUTINHO, R. Colonisation, competitive ability and influence of *Stragulum bicolor* van Ofwegen and Haddad, 2011 (Cnidaria, Anthozoa) on the fouling community in Paranaguá Bay, Southern Brazil. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 2015, v. 462, p. 55-61.
- BAUER, I.; MARANDA, L.; SHIMIZU, Y.; PETERSON, R. W.; CORNELL, L.; STEINER, J. R.; CLARDY, J. The Structures of Amphidinolide B Isomers: Strongly Cytotoxic Macrolides Produced by a Free-swimming Dinoflagellate, *Amphidinium* sp. **Journal American Chemical Society**. 1994, v. 116, p. 2657-2658.
- CHERBLANC, F. L.; DAVIDSON, R. W.; DI FRUSCIA, P.; SRIMONGKOLPITHAK, N.; FUCHTER, M. J. Perspectives on natural product epigenetic modulators in chemical biology and medicine. **Natural Product Reports**. 2013, v. 30, n. 5, p. 605-624.
- GERWICK, W.H; LOPEZ, A; DAVILA, R; ALBORS, R. Two nem chamigrene sesquiterpenoids from the tropical red alga *Laurencia obtusa*. **Journal of Natural Products**. 1987, v. 50, n. 6, p. 1131-1135.
- ISHIBASHI, M.; OHIZUMI, Y.; HAMASHIMA, M.; NAKAMURA, H.; HIRATA, Y.; SASAKI, T.; KOBAYASHI, J. Amphidinolide B, a novel macrolide with potent antineoplastic activity from the marine dinoflagellate *Amphidinium* sp. **Journal of the Chemical Society**. 1987, v. 14, p. 1127-1129.
- ISHIBASHI, M.; SATO, M.; KOBAYASHI, J. Amphidinolide K, a new 19-membered macrolide from the cultured symbiotic dinoflagellate *Amphidinium* sp. **Journal of Organic Chemistry**. 1993, v. 58, p. 6928-6929.
- ISHIBASHI, M.; ISHIYAMA, H.; KOBAYASHI, J. Absolute stereochemistry of amphidinolide B. **Tetrahedron Letters**. 1994a, v. 35, n. 44, p. 8241-8242.
- ISHIBASHI, M.; YAMAGUCHI, N.; SASAKI, T.; KOBAYASHI, J. Amphidinolide N, a novel 26-membered macrolide with remarkably potent cytotoxicity from the cultured marine dinoflagellate *Amphidinium* sp. **Journal of the Chemical Society**. 1994b, v. 12, p. 1455-1456.
- ISHIBASHI, M.; TAKAHASHI, M.; KOBAYASHI, J. Amphidinolides O and P, Novel 15-Membered Macrolides from the Dinoflagellate *Amphidinium* sp.: Analysis of the Relative Stereochemistry and Stable Solution Conformation. **Journal of Organic Chemistry**. 1995, v. 60, p. 6062-6066.

ISHIBASHI, M.; TAKAHASHI, M.; KOBAYASHI, J. Studies on the macrolides from marine dinoflagellate *Amphidinium sp.*: Structures of amphidinolides R and S and a succinate feeding experiment. **Tetrahedron**. 1997, v. 53, p. 7827-7832.

KOBAYASHI, J.; ISHIBASHI, M.; NAKAMURA, H.; OHIZUMI, Y.; YAMASU, T.; SASAKI, T.; HIRATA, Y. Amphidinolide-A, a novel antineoplastic macrolide from the marine dinoflagellate *Amphidinium sp.* **Tetrahedron Letters**. 1986, v. 27, p. 5755-5758.

KOBAYASHI, J.; ISHIBASHI, M.; NAKAMURA, H.; OHIZUMI, Y.; HIRATA, Y.; WALCHLI, M.R.; SASAKI, T. Structure of novel antineoplastic macrolides from a cultured symbiotic dinoflagellate. **Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu**. 1987, v. 29, p. 317-324.

KOBAYASHI, J.; ISHIBASHI, M.; WALCHLI, M. R.; NAKAMURA, H.; HIRATA, Y.; SASAKI, T.; OHIZUMI, Y. Amphidinolide C: the first twenty-five membered macrocyclic lactone with potent antineoplastic activity from the cultured dinoflagellate *Amphidinium sp.* **Journal American Chemical Society**. 1988, v. 110, p. 490-494.

KOBAYASHI, J.; ISHIBASHI, M.; NAKAMURA, H.; OHIZUMI, Y.; YAMASU, T.; HIRATA, Y.; SASAKI, T.; OHATA, T.; NOZOE, S. Cytotoxic macrolides from a cultured marine dinoflagellate of the genus *Amphidinium*. **Journal of Natural Products**. 1989, v. 52, p. 1036-1041.

KOBAYASHI, J.; ISHIBASHI, M.; MURAYAMA, T.; TAKAMATSU, M.; IWAMURA, M.; OHIZUMI, Y.; SASAKI, T. Amphidinolide E, a novel antileukemic 19-membered macrolide from the cultured symbiotic dinoflagellate *Amphidinium sp.* **Journal of Organic Chemistry**. 1990, v. 55, p. 3421-3423.

KOBAYASHI, J.; TSUDA, M.; ISHIBASHI, M.; SHIGEMORI, H.; YAMASU, T.; HIROTA, H.; SASAKI, T. Amphidinolide F, a new cytotoxic macrolide from the marine dinoflagellate *Amphidinium sp.* **The Journal of Antibiotics**. 1991a, v. 44, n. 11, p. 1259-1261.

KOBAYASHI, J.; SHIGEMORI, H.; ISHIBASHI, M.; YAMASU, T.; HIROTA, H.; SASAKI, T. Amphidinolides G and H: New potent cytotoxic macrolides from the cultured symbiotic dinoflagellate *Amphidinium sp.* **Journal of Organic Chemistry**. 1991b, v. 56, n. 17, p. 5221-5224.

KOBAYASHI, J.; SATO, M.; ISHIBASHI, M. Amphidinolide J: Cytotoxic macrolide from the marine dinoflagellate *Amphidinium sp.* determination of the absolute stereochemistry. **Journal of Organic Chemistry**. 1993, v. 58, p. 2645-2646.

KOBAYASHI, J.; YAMAGUCHI, N.; ISHIBASHI, M. Amphidinolide M, a novel 29-membered macrolide from the cultured marine dinoflagellate *Amphidinium sp.* **Journal of Organic Chemistry**. 1994, v. 59, p. 4698-4700.

- KOBAYASHI, J.; TAKAHASHI, M.; ISHIBASHI, M. Amphidinolide Q, a novel 12-membered macrolide from the cultured marine dinoflagellate *Amphidinium sp.* **Tetrahedron Letters**. 1996, v. 37, p. 1449-1450.
- KOBAYASHI, J.; SHIMBO, K.; SATO, M.; SHIRO, M.; TSUDA, M. Absolute stereochemistry of amphidinolides G and H. **Organic Letters**. 2000, v. 2, p. 2805-2807.
- KOBAYASHI, J.; KUBOTA, T.; ENDO, T.; TSUDA, M. Amphidinolides T2, T3 and T4, new 19-membered macrolides from the dinoflagellate *Amphidinium sp.* and the biosynthesis of amphidinolide T1. **Journal of Organic Chemistry**. 2001, v. 66, p. 134-142.
- KOBAYASHI, J.; SHIMBO, K.; SATO, M.; TSUDA, M. Amphidinolides H2-H5, G2 and G3, new cytotoxic 26 and 27-membered macrolides from dinoflagellate *Amphidinium sp.* **Journal of Organic Chemistry**. 2002, v. 67, p. 6585-6592.
- KOBAYASHI, J.; SHIMBO, K.; KUBOTA, T.; TSUDA, M. Bioactive macrolides and polyketides from marine dinoflagellates. **Pure and Applied Chemistry**. 2003, v. 75, p. 337-342.
- KOBAYASHI, J.; TSUDA, M. Amphidinolides, bioactive macrolides from symbiotic marine dinoflagellate. **Natural Product Reports**. 2004, v. 21, p. 77-93.
- KOBAYASHI, J.; TSUDA, M. Bioactive products from Okinawan marine micro and macroorganisms. **Phytochemistry Reviews**. 2005, v. 3, p. 267-274.
- KOBAYASHI, J.; KUBOTA, T. Bioactive macrolides and polyketides from marine dinoflagellates of the genus *Amphidinium*. **Journal of Natural Products**. 2007, v. 70, p. 451-460.
- KOBAYASHI, J. Amphidinolides and Its Related Macrolides from Marine Dinoflagellates. **The Journal of Antibiotics**. 2008, v. 61, p. 271-284.
- KUBOTA, T.; TSUDA, M.; KOBAYASHI, J. Amphidinolide V, novel 14-membered macrolide from marine dinoflagellate *Amphidinium sp.* **Tetrahedron Letters**. 2000, v. 41, p. 713-716.
- KUBOTA, T.; TSUDA, M.; ENDO, T.; SHIRO, M.; KOBAYASHI, J. Stereochemistry of amphidinolide C and T1~T5. **Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu**. 2001a, v. 43, p. 97-102.
- KUBOTA, T.; ENDO, T.; MASASHI, T.; SHIRO, M.; KOBAYASHI, J. Amphidinolide T5, a new 19-membered macrolide from a dinoflagellate and X-ray structure of amphidinolide T1. **Tetrahedron**. 2001b, v. 57, p. 6175-6179.

- KUBOTA, T.; TSUDA, M.; KOBAYASHI, J. Absolute stereochemistry of amphidinolide E. **Journal of Organic Chemistry**. 2002, v. 67, p. 1651-1656
- KUBOTA, T.; TSUDA, M.; KOBAYASHI, J.; Absolute stereochemistry of amphidinolide C: synthesis of C-1-C-10 and C-17-C-29 segments. **Tetrahedron**. 2003, v. 59, p. 1613-1625.
- KUBOTA, T.; SAKUMA, Y.; TSUDA, M.; KOBAYASHI, J. Amphidinolide C2, New Macrolide from Marine Dinoflagellate *Amphidinium* Species. **Marine Drugs**. 2004, v. 2, p. 83-87.
- KUBOTA, T.; SUZUKI, A.; YAMADA, M.; BABA, S.; KOBAYASHI, J. Amphidinolide C3, a new cytotoxic 25-membered macrolide from marine dinoflagellate *Amphidinium* sp. **Heterocycles**. 2010, v. 82, p. 333-338.
- LHULLIER, C.; DONNANGELLO, A.; CARO, M.; PALERMO, J. A.; HORTA, P. A.; FALKENBERG, M.; SCHENKEL, E. P. Isolation of elatol from *Laurencia microcladia* and its palatability to the sea urchin *Echinometra lucunter*. **Biochemical Systematics and Ecology**. 2009, v. 37, p. 254-259.
- MATSUNAGA, K.; NAKATANI, K.; ISHIBASHI, M.; KOBAYASHI, J.; OHIZUMI, Y. Amphidinolide B, a powerful activator of actomyosin ATPase, enhances skeletal muscle contraction. **Biochimica et Biophysica Acta, General Subjects**. 1999, v. 1427, p. 24-32.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. 1983, v. 65, p. 55-63.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; KINGSTON, D. G. I. **Natural Products as Pharmaceuticals and Sources for Lead Structures**. The Practice of Medicinal Chemistry. 3. ed. 2008, p. 159-186.
- OFWEGEN, L. P. V.; HADDAD, M. A. A probably invasive new genus and new species of softcoral (Octacorallia: Alcyonacea: Clavulariidae) from Brazil. **Zootaxa**. 2011, v. 3107, p. 38-46.
- OGUCHI, K.; TSUDA, M.; IWAMOTO, R.; OKAMOTO, Y.; ENDO, T.; KOBAYASHI, J.; OZAWA, T.; MASUDA, A. Amphidinolides B6 and B7, cytotoxic macrolides from a symbiotic dinoflagellate *Amphidinium* species. **Journal of Natural Products**. 2007, v. 70, p. 1676-1679.
- PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, A. S.; LOPES, N. P.; EPIFÂNIO, R. A. Produtos naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**. 2002, v. 25, p. 45-61.

PHILLIPSON, J. D.; ANDERSON, L. A. Ethnopharmacology and western medicine. **J. Ethnopharmacol.** 1989, v. 25, p. 61-72.

SAITO, S.; FENG, J.; KIRA, A.; KOBAYASHI, J.; OHIZUMI, Y. Amphidinolide H, a novel type of actin-stabilizing agent isolated from dinoflagellate. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** 2004, v. 320, p. 961-965.

SAY, T. On the species of the Linnaean genus *Asterias* inhabiting the coast of the United States. **Journal of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia.** 1825, v. 5, p. 141-154.

SHIMBO, K.; TSUDA, M.; IZUI, N.; KOBAYASHI, J. Amphidinolide W, a new 12-membered macrolide from dinoflagellate *Amphidinium sp.* **Journal of Organic Chemistry.** 2002, v. 67, p. 1020-1023.

SHIMBO, K.; NOZAWA, K.; TSUDA, M.; KOBAYASHI, J. Solution conformations of amphidinolide H. **Biorganic & Medicinal Chemistry.** 2005, v. 13, p. 5066-5071.

SILVA, I. C. M. Prostaglandinas: Metabolismo, Funções e Terapêutica\*. Rio Grande do Sul, 2005. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/lacvet/restrito/pdf/prostaglandina.pdf>. Acesso em: 20 nov.2014.

SOUSA, T. S.; NUZZO, G.; TORRES, M. C. M.; LOPES, N. P.; CUTIGNANO, A.; JIMENEZ, P. C.; SANTOS, E. A.; GOMES, B. A.; SARDO, A.; PESSOA, O. D. L.; COSTA-LOTUFO, L. V.; FONTANA, A. Amphidinolide P from the Brazilian octocoral *Stragulum bicolor*. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** 2015, v. 25, p. 600-604.

TAKAHASHI, Y.; KUBOTA, T.; FUKUSHI, E.; KAWABATA, J.; KOBAYASHI, J. Absolute Stereochemistry of Amphidinolide Q. **Organic Letters.** 2008, v. 10, p. 3709-3711.

TSUDA, M.; SASAKI, T.; KOBAYASHI, J. Amphidinolide L, a new cytotoxic 27-membered macrolide from the cultured dionoflagellate *Amphidinium sp.* **Journal of Organic Chemistry.** 1994, v. 59, p. 3734-3737.

TSUDA, M.; ENDO, T.; KOBAYASHI, J. Amphidinolide U, novel 20-membered macrolide from marine dinoflagellate *Amphidinium sp.* **Tetrahedron.** 1999, v. 55, p. 14565-14570.

TSUDA, M.; ENDO, T.; KOBAYASHI, J. Amphidinolide T, Novel 19-Membered Macrolide from Marine Dinoflagellate *Amphidinium sp.* **Journal of Organic Chemistry.** 2000, v. 65, p. 1349-1352.

TSUDA, M.; IZUI, N.; SHIMBO, K.; SATO, M.; FUKUSHI, E.; KAWABATA, J.; KATSUMARA, K.; HORIGUCHI, T.; KOBAYASHI, J. Amphidinolide X, a novel 16-

membered macrodiolide from dinoflagellate *Amphidinium sp.* **Journal of Organic Chemistry**. 2003a, v. 68, p. 5339-5345.

TSUDA, M.; IZUI, N.; SHIMBO, K.; SATO, M.; FUKUSHI, E.; KAWABATA, J.; KOBAYASHI, J. Amphidinolide Y, a novel 17-membered macrolide from dinoflagellate *Amphidinium sp.*: Plausible biogenetic precursor of amphidinolide X. **Journal of Organic Chemistry**. 2003b, v. 68, p. 9109-9112.

TSUDA, M.; KARIYA, Y.; IWAMOTO, R.; FUKUSHI, E.; KAWABATA, J.; KOBAYASHI, J. Amphidinolides B4 and B5, potent cytotoxic 26-membered macrolides from dinoflagellate *Amphidinium* species. **Marine Drugs**. 2005, v. 3, p. 1-8.

USUI, T.; KAZAMI, S.; DOHMAE, N.; MASHIMO, Y.; KONDO, H.; TSUDA, M.; TERASAKI, A. O.; OHASHI, K.; KOBAYASHI, J.; OSADA, H. Amphidinolide H, a potent cytotoxic macrolide, covalently binds on actin subdomain 4 and stabilizes actin filament. **Chemistry & Biology**. 2004, v. 11, p. 1269-1277.

YOKOYAMA, L. Q.; AMARAL, A. C. Z. The diet of *Ophionereis reticulata* (Echinodermata: Ophiuroidea) in southeastern Brazil. **Revsita Brasileira de Zoologia**. 2008, v. 25, n. 3, p. 576-578.