



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

INVESTIGAÇÃO QUÍMICA DA ESPONJA MARINHA
Raspailia bouryesnaultae

Eliane de Oliveira Tabalipa

Florianópolis
2017

Eliane de Oliveira Tabalipa

INVESTIGAÇÃO QUÍMICA DA ESPONJA MARINHA
Raspailia bouryesnaultae

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel

Coorientadora : Dr.^a Cintia Lhullier

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Tabalipa, Eliane de Oliveira

Investigação química da esponja marinha *Raspailia bouryesnaultae* / Eliane de Oliveira Tabalipa ; orientador, Eloir Paulo Schenkel ; coorientadora, Cintia Lhullier. - Florianópolis, SC, 2017.
182 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. *Raspailia bouryesnaultae*. 3. Diterpeno clerodano. 4. *Raspailol*. I. Schenkel, Eloir Paulo. II. Lhullier, Cintia. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

Eliane de Oliveira Tabalipa

INVESTIGAÇÃO QUÍMICA DA ESPONJA MARINHA

Raspailia bouryesnaultae

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Miriam de Barcellos Falkenberg (UFSC – Membro Titular)

Prof.^a Dr.^a Lilian Sibelle Campos Bernardes (UFSC – Membro Titular)

Prof. Dr. Miguel Soriano Balparda Caro (UFSC – Membro Titular)

Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel (UFSC – Orientador)

Prof.^a Dr.^a Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

Florianópolis, 08 de fevereiro de 2017.

Dedico este trabalho à minha família.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ter me presenteado com um anjo da guarda presente em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel, pela orientação, paciência, conhecimento e tempo dedicado à realização deste trabalho.

À minha coorientadora Dra. Cintia Lhullier que prestou todo o suporte para a realização deste trabalho, além de toda a sua dedicação e amizade.

À UFSC, ao Programa de Pós-graduação em Farmácia e a todos os professores pelos conhecimentos compartilhados durante o mestrado.

Aos meus pais, Jovita (*in memoriam*) e Gentil pelo amor incondicional, pela vida que me proporcionaram e pelo apoio na conquista dos meus ideais. Pai, te amo! Rose, obrigado pelo cuidado, carinho e dedicação com toda a família.

Aos meus irmãos Luiz Fernando, Maurício Carlos, Tiago, Ângela e minhas sobrinhas Camila e Rafaela que mesmo de longe torcem por mim. Maninha, amo você! Camila e Rafaela vocês moram no meu coração!

Ao meu marido, Carlos, pelo companheirismo, apoio e amor. Te amo muito!

Aos meus filhos, Ivana e Fábio, meus grandes amores. Obrigada por todo amor, carinho, amizade e por sempre me darem tanto orgulho. Vocês me ensinaram muito... Amo vocês pra sempre!

Ao meu genro Ayton e minha norinha Ana Luiza, pelo incentivo, carinho e amizade. I love you, too!

Fabinho!!! Obrigada pelo apoio técnico na área de informática... Sem sua ajuda seria muito mais difícil.

Meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

Muito obrigada!

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

Nas últimas décadas, ampla variedade de metabólitos secundários bioativos tem sido isolada de invertebrados marinhos. Entre esses organismos, as esponjas são os maiores provedores de compostos bioativos até o presente momento. A esponja *Raspailia bouryesnaultae* foi selecionada para isolamento e elucidação estrutural de metabólitos secundários, tendo em vista que em estudos anteriores apresentou promissora atividade citotóxica em seus extratos orgânicos. Considerando que organismos marinhos da mesma espécie podem apresentar diversidade química significativa quando coletados em locais diferentes, amostras da esponja foram coletadas na Ilha do Coral e na Ilha das Aranhas, no estado de Santa Catarina. As amostras foram submetidas a maceração exaustiva com etanol e após concentração em rotaevaporador, foram feitas extrações com hexano (RBH) e etanol (RBE) para a amostra da Ilha do Coral e extrações com hexano (RBH), acetato de etila (RBAE) e etanol (RBE) para a amostra da Ilha das Aranhas. As frações obtidas foram avaliadas com relação às atividades citostática, anti-herpética, antiprotozoária, antibacteriana e antifúngica. As frações da Ilha do Coral, RBE e RBH, apresentaram atividade antitripanossoma e RBE também apresentou atividade anti-herpética. As frações da Ilha das Aranhas, RBAE e RBE, apresentaram atividade anti-herpética e RBAE antitripanossoma. As frações hexânicas foram selecionadas para dar prosseguimento ao isolamento porque apresentaram maior diversidade química, verificada através de cromatografia de camada delgada e ressonância magnética nuclear de ^1H . Foram isolados doze compostos pertencentes à classe dos diterpenos clerodanos, sendo que seis foram elucidados. Para o composto RB1 não foram encontrados relatos na literatura, muito provavelmente trata-se de composto inédito. RB2 foi identificado como isômero do éster metílico do ácido kerlínico e RB3 é o raspailol, substância anteriormente isolada das esponjas *Raspailia sp* e *Raspailia topsenti*. RB9 foi identificado como sendo isômero do anoneno, enquanto que RB6 é um aldeído derivado do anoneno e RB7 é o 6-hidroxianoneno. Em relação às atividades biológicas testadas, os compostos RB2 e RB3 apresentaram atividade antitripanossoma e o composto RB2 apresentou atividade anti-herpética para cepas KOS e 29R. Para os demais compostos isolados, os estudos não puderam ser concluídos devido à degradação das amostras.

Palavras-chave: *Raspailia bouryesnaultae*. Diterpeno clerodano. Anti-herpética. Antitripanossoma.

ABSTRACT

In the last decades, a wide variety of bioactive secondary metabolites has been isolated from marine invertebrates. Among these organisms, sponges are the largest suppliers of bioactive compounds to date. The sponge *Raspailia bouryesnaultae* was selected for isolation and structural elucidation of secondary metabolites considering that in previous studies it presented promising cytotoxic activity in its organic extracts. Considering that marine organisms of the same species may exhibit significant chemical diversity when collected at different sites, samples of the *Raspailia bouryesnaultae* sponge were collected in Coral Island and Aranhas Island, from the Brazilian State Santa Catarina. The samples were submitted to exhaustive maceration with ethanol. After rotavaporator concentration the Coral Island sample was extracted with hexane (RBH) and ethanol (RBE) and the Aranhas Island sample extracted with hexane (RBH) ethyl acetate (RBAE) and ethanol (RBE). The obtained fractions were evaluated in relation to cytostatic, antiherpetic, antiprotozoal, antibacterial and antifungal activities. For the fractions of Coral Island, both RBE and RBH presented antitrypanosomal activity and RBE also presented antiherpetic activity. For the fractions of Aranhas Island, RBAE and RBE presented antiherpetic activity and RBAE presented antitrypanosomal activity, too. The hexane fractions (RBH) were selected to proceed the isolation of the compounds because they presented greater chemical diversity verified by thin layer chromatography and nuclear magnetic resonance of ^1H . Twelve compounds belonging to the class diterpenes of clerodane type were isolated and six were elucidated. For the compound named RB1 no reports were found in the literature and most likely this is a new compound. RB2 was identified as an isomer of kerlinic acid methyl ester and RB3 is raspailol, a substance previously isolated from the *Raspailia sp* and *Raspailia topsenti* sponges. RB9 was identified as an annonene isomer, while RB6 is an aldehyde derived from annonene and RB7 is 6-hydroxyannonene. Concerning the tested biological activities, the compounds RB2 and RB3 showed antitrypanosomal activity and RB2 compound presented antiherpetic activity for KOS and 29R strains. For the other isolated compounds the studies could not be concluded due to the degradation of the samples.

Keywords: *Raspailia bouryesnaultae*. Clerodane diterpene. Antiherpetic. Antitrypanosomal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Nucleosídeos isolados da esponja <i>Cryptotethya crypta</i> e análogos sintéticos.....	29
Figura 2 – Percentual da diversidade de espécies das quatro classes de esponjas marinhas	32
Figura 3 – Diversidade química dos compostos isolados de esponjas marinhas entre 2001 a 2010	34
Figura 4 – Raspailino e raspailol A e B isolados das esponjas <i>Raspailia pumila</i> , <i>Raspailia ramosa</i> e <i>Raspailia sp</i> , respectivamente	36
Figura 5 – Asmarinas A-K, barekol e nosyberkol isolados de esponjas <i>Raspailia sp</i> coletadas no Mar Vermelho, Oceano Índico e Costa de Madagascar.	37
Figura 6 – Agminosídeo isolado da esponja <i>Raspailia agminata</i>	38
Figura 7 – Raspailenona A, raspailodano A, topsenanos A e B e raspailol isolados da esponja <i>Raspailia topsenti</i>	39
Figura 8 – Foto <i>in situ</i> da esponja <i>Raspailia bouryesnaultae</i>	40
Figura 9 – Locais das coletas da esponja <i>Raspailia bouryesnaultae</i>	47
Figura 10 – Fluxograma da obtenção do extrato e frações da esponja <i>Raspailia bouryesnaultae</i> coletada na Ilha do Coral.....	49
Figura 11 – Fluxograma do processo de fracionamento de parte da fração hexânica do material coletado na Ilha do Coral (1,4 g), indicando as frações que conduziram aos compostos isolados (CLMP1-Coral)	50
Figura 12 – Fluxograma do processo de fracionamento de parte da fração hexânica do material coletado na Ilha do Coral (1,0 g), indicando as frações que conduziram aos compostos isolados (CLMP2-Coral)	52
Figura 13 – Fluxograma do processo de fracionamento de parte da fração hexânica do material coletado na Ilha do Coral (0,9 g), indicando as frações que conduziram aos compostos isolados (CLMP3-Coral)	53
Figura 14 – Fluxograma da obtenção do extrato e frações da esponja <i>Raspailia bouryesnaultae</i> coletada na Ilha das Aranhas	55
Figura 15– Fluxograma do processo de fracionamento de parte da fração hexânica do material coletado na Ilha das Aranhas (1,0 g), indicando as frações que conduziram aos compostos isolados (CLMP1-Aranhas)	56
Figura 16 – Fluxograma do processo de fracionamento de parte da fração hexânica do material coletado na Ilha das Aranhas (1,0 g), com indicação das frações que conduziram aos compostos isolados (CLMP2-Aranhas).....	57
Figura 17 – Fluxograma do processo de fracionamento de parte da fração hexânica do material coletado na Ilha das Aranhas (0,87 g), com	

indicação das frações que conduziram aos compostos isolados (CLMP3-Aranhas).....	57
Figura 18 – Cromatograma dos extratos e frações da esponja <i>Raspailia bouryesnaultae</i> coletada na Ilha do Coral (IC) e na Ilha das Aranhas (IA).....	65
Figura 19 – Fluxograma do fracionamento da fração hexânica para obtenção dos compostos RB1, RB2, RB3, RB4, RB5, RB6, RB7 e RB8 ...	71
Figura 20 – Cromatograma das frações contendo os compostos que foram isolados da esponja <i>Raspailia bouryesnaultae</i>	72
Figura 21 – Fluxograma do fracionamento da fração hexânica para obtenção dos compostos RB1, RB2, RB3, RB6, RB8, RB9, RB10, RB11 e RB13	73
Figura 22 – Cromatograma das frações contendo os compostos que foram isolados da esponja <i>Raspailia bouryesnaultae</i>	74
Figura 23 – Formação de diterpenos.....	75
Figura 24 – Esquema de formação dos clerodanos	76
Figura 25 – Estrutura básica dos diterpenos clerodanos, com destaque para os centros estereogênicos	77
Figura 26 – Estruturas químicas da clerodina e da columbina.....	77
Figura 27 – Variedade estereoquímica em diterpenos do tipo clerodano	78
Figura 28 – Espectro de ^1H RMN do composto RB3 (400 MHz, CDCl_3) ...	80
Figura 29 – Espectro de ^{13}C RMN do composto RB3 (100 MHz, CDCl_3) ..	81
Figura 30 – Estrutura do composto RB3 (raspailol)	83
Figura 31 – Espectro de ^1H RMN do composto RB2 (400 MHz, CDCl_3) ...	84
Figura 32 – Espectro de ^{13}C RMN do composto RB2 (100 MHz, CDCl_3) ..	84
Figura 33 – Espectro DEPT 135 do composto RB2 (100 MHz, CDCl_3)	85
Figura 34 – Correlações do anel furano nos espectros de HMBC e COSY, respectivamente	87
Figura 35 – Ampliações dos espectros ^1H - ^{13}C HMBC e ^1H - ^1H COSY RMN do composto RB2	87
Figura 36 – Estrutura parcial para RB2.....	89
Figura 37 – Espectro parcial de ^1H - ^1H COSY do composto RB2.....	90
Figura 38 – Correlações de ^1H - ^1H COSY do hidrogênio da ligação olefínica do anel bicíclico com os hidrogênios da metila δ 1,76 no composto RB2.....	90
Figura 39– Correlações de ^1H - ^{13}C HMBC dos hidrogênios da metila δ 1,76 com os carbonos do anel bicíclico no composto RB2	91
Figura 40 – Ampliação do espectro de ^1H - ^{13}C HMBC do composto RB2...	91
Figura 41 – Estrutura proposta para o composto RB2	92
Figura 42 – Estrutura do éster metílico do ácido kerlínico	93
Figura 43 – Espectro de ^1H RMN do composto RB1 (400 MHz, CDCl_3) ...	94

Figura 44 – Espectro de ^{13}C RMN do composto RB1 (100 MHz, CDCl_3) ..	95
Figura 45 – Espectro DEPT 135 do composto RB1 (100 MHz, CDCl_3)	96
Figura 46 – Correlações entre os ^1H e ^{13}C do anel furano extraídas do espectro HMBC.....	98
Figura 47 – Ampliação do espectro COSY do composto RB1, mostrando correlações do anel furano.....	98
Figura 48 – Correlações no anel furano observadas no espectro COSY para o composto RB1	99
Figura 49 – Estrutura parcial para RB1.....	101
Figura 50 – Ampliação do espectro COSY do composto RB1, mostrando correlações entre o hidrogênio da dupla ligação do anel bicíclico e os hidrogênios da dupla ligação terminal.....	102
Figura 51 – Correlações entre o hidrogênio da dupla ligação do anel bicíclico e os hidrogênios da dupla ligação terminal.....	102
Figura 52 – Estrutura proposta para o composto RB1	103
Figura 53 – Espectro de ^1H RMN do composto RB4 (400 MHz, CDCl_3) ...	104
Figura 54 – Espectro de ^1H RMN do composto RB5 (400 MHz, CDCl_3) ...	104
Figura 55 – Espectro de ^1H RMN do composto RB6 (400 MHz, CDCl_3) ...	105
Figura 56 – Estrutura proposta para o composto RB6	107
Figura 57 – Espectro de ^1H RMN do composto RB7 (400 MHz, CDCl_3) ...	108
Figura 58 – Espectro de ^{13}C RMN do composto RB7 (100 MHz, CDCl_3) ..	108
Figura 59 – Deslocamento químico do carbono da metila na posição 20 para configuração <i>trans</i>	111
Figura 60 – Estrutura proposta para o composto RB7	112
Figura 61 – Espectro de ^1H RMN do composto RB8 (400 MHz, CDCl_3) ...	113
Figura 62 – Espectro de ^1H RMN do composto RB9 (400 MHz, CDCl_3) ...	113
Figura 63 – Espectro de ^{13}C RMN do composto RB9 (100 MHz, CDCl_3) ..	114
Figura 64 – Deslocamento químico do carbono da metila na posição 20 para configuração <i>cis</i>	115
Figura 65 – Estrutura proposta para o composto RB9	117
Figura 66 – Espectro de ^1H RMN do composto RB10 (400 MHz, CDCl_3).....	118
Figura 67 – Espectro de ^{13}C RMN do composto RB10 (100 MHz, CDCl_3).....	118
Figura 68 – Espectro de ^1H RMN do composto RB11 (400 MHz, CDCl_3).....	119
Figura 69 – Espectro de ^1H RMN do composto RB12 (400 MHz, CDCl_3).....	120
Figura 70 – Espectros ^1H , ^{13}C e DEPT RMN comparando os compostos RB12 e RB2	120

Figura 71 – Espectro de ^1H RMN do composto RB13 (400 MHz, CDCl_3)	122
Figura 72 – Espectro de ^{13}C RMN do composto RB13 (100 MHz, CDCl_3)	122
Figura 73 – Espectro DEPT 135 do composto RB13 (100 MHz, CDCl_3) ...	123
Figura 74 – Estrutura parcial proposta para o composto RB13	123
Figura 75 – Espectro de ^1H RMN do composto RB14 (400 MHz, CDCl_3)	124
Figura 76 – Espectros ^1H RMN comparando os compostos RB14 e RB2 ...	124
Figura 77 – Espectro de ^1H RMN do composto RB15 (400 MHz, CDCl_3)	125
Figura 78 – Ampliação do espectro de ^1H RMN do composto RB15, na região entre 6,20 e 7,45 ppm (400 MHz, CDCl_3)	125
Figura 79 – Compostos isolados da esponja <i>Raspailia bouryesnaultae</i>	126
Figura 80 – Estrutura química da salvinorina A	135
Figura 81 – Estrutura química da clerodicina	136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fármacos originários de PNM disponíveis comercialmente	30
Tabela 2 – Número de compostos com atividades biológicas (A-I) isolados de esponjas marinhas, de diferentes ordens, na última década.....	35
Tabela 3 – Triagem antitripanossoma das frações da esponja <i>Raspailia bouryesnaultae</i> coletada na Ilha do Coral.	67
Tabela 4 – Efeitos antiproliferativos das frações da esponja <i>Raspailia bouryesnaultae</i> coletada na Ilha do Coral em linhagem celular tumoral e não tumoral após 48 horas de experimento	67
Tabela 5 – Efeitos antiproliferativos das frações da esponja <i>Raspailia bouryesnaultae</i> coletada na Ilha do Coral em células VERO e atividade antiviral frente ao vírus HSV-1 (cepas KOS e 29R) após 48 horas de experimento.....	68
Tabela 6 – Efeitos antiproliferativos das frações da esponja <i>Raspailia bouryesnaultae</i> coletada na Ilha das Aranhas, em duas linhagens celulares tumorais e não tumoral após 48 horas de experimento pelo método da Sulforrodamina B	69
Tabela 7 – Atividade anti-herpética das frações da esponja <i>Raspailia bouryesnaultae</i> coletada na Ilha das Aranhas, frente ao vírus HSV-1 (cepas KOS e 29R) após 48 horas de experimento	69
Tabela 8 – Triagem das frações da esponja <i>Raspailia bouryesnaultae</i> coletada na Ilha das Aranhas, utilizando tripomastigotas intracelulares de <i>Trypanossoma cruzi</i> expressando β -galactosidase	70
Tabela 9 – Triagem das frações da esponja <i>Raspailia bouryesnaultae</i> coletada na Ilha das Aranhas, utilizando tripomastigotas intracelulares de <i>Leishmania amazonensis</i> expressando β -galactosidase.....	70
Tabela 10 – Comparação dos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C RMN do raspailol e do composto RB3.....	82
Tabela 11 – Dados obtidos através dos espectros de RMN do composto RB2 (300 MHz; CDCl_3).....	86
Tabela 12 – Comparação dos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C RMN do raspailol e do composto RB2.....	88
Tabela 13 – Dados obtidos através dos espectros de RMN do composto RB1 (300 MHz; CDCl_3).....	97
Tabela 14 – Comparação dos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C RMN do composto RB2 e do composto RB1	100
Tabela 15 – Dados de ^1H RMN para o composto CAS 138052-43-4 e para o composto RB6 (400 MHz, CDCl_3).....	106
Tabela 16 – Dados de RMN para o composto RB7 (300 MHz, CDCl_3).....	109

Tabela 17 – Comparação dos deslocamentos químicos de ^{13}C RMN para os compostos RB2, RB7e 6-hidroxianoneno.	110
Tabela 18 – Comparação dos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C RMN do anoneno e do composto RB9 (400 e 100 MHz; CDCl_3).	116
Tabela 19 – Deslocamento químico ^{13}C RMN para os compostos isolados, exceto RB6, cujos dados não foram obtidos (100 MHz; CDCl_3).	128
Tabela 20 – Efeitos antiproliferativos dos compostos isolados em células VERO e atividade antiviral frente às cepas KOS e 29R do vírus <i>Herpes simplex</i> -tipo1 após 48 horas de experimento.	130
Tabela 21 – Triagem antiprotozoária dos compostos isolados da esponja <i>Raspailia bouryesnaultae</i>	131
Tabela 22 – Ocorrência de diterpenos clerodanos no reino vegetal e em animais marinhos	133

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS, UNIDADES E SIGLAS

- A549** – Linhagem celular de carcinoma de pulmão humano
AcOEt - Acetato de etila
Benzeno-*d*₆ - Benzeno deuterado
CC₅₀ - Concentração citotóxica 50%
CCA - Cromatografia em coluna aberta
CCD - Cromatografia em camada delgada
CDCl₃ - Clorofórmio deuterado
CI₅₀ - Concentração inibitória 50%
CIL - *Cambridge Isotope Laboratories*
CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência
CLMP - Cromatografia líquida de média pressão
CO₂ – Dióxido de carbono
COSY - *Correlated spectroscopy* (espectro de correlação ¹H-¹H)
d - Dubleto
dd - Duplo dubleto
ddd - Duplo dubleto de dubleto
DMSO - Dimetilsulfóxido
dt - Duplo tripleto
EM – Espectroscopia de massa
FGH – Células de fibroblasto gengival saudável
H460 – Linhagem celular de carcinoma de derrame pleural de pulmão humano
HMBC - *Heteronuclear multiple bond correlation* (correlação heteronuclear através de múltiplas ligações) ¹H-¹³C
HSQC - *Heteronuclear single quantum correlation* (correlação heteronuclear de quantum-simples) ¹H-¹³C
HSV-1 – Vírus *Herpes simplex* tipo 1
HT29 – Linhagem celular de carcinoma colorretal
Hz – Hertz
IA – Ilha das Aranhas
IC – Ilha do Coral
IS – Índice de seletividade
IV - Infravermelho
J - Constante de acoplamento
m - Multiplete
MeOH - Metanol
MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
Mult. – Multiplicidade

NCI – H460 – Linhagem celular de carcinoma pulmonar
nm - nanômetro
NOE - *Nuclear Overhauser effect* (efeito nuclear de Overhauser)
PBS – Tampão fosfato salino
PN - Produtos naturais
PNM - Produtos naturais marinhos
ppm - Parte por milhão
RBAE - Fração acetato de etila da esponja *Raspailia b.*
RBE - Fração etanólica da esponja *Raspailia b.*
RBH - Fração hexânica da esponja *Raspailia b.*
RMN - Ressonância Magnética Nuclear
¹³C RMN - Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13
¹H RMN - Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
s - Singleto
SCUBA - *Self-Contained Breating Apparatus*
sl - Singleto largo
t - Tripleto
td - Triplo dubleto
TMS – Tetrametilsilano
U373 – Linhagem celular de carcinoma cerebral
UV/Vis - Ultravioleta-visível
VERO – Células de rim de macaco verde africano

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	27
1.1 PRODUTOS NATURAIS MARINHOS	27
1.2 TRIAGEM DE PNM BIOATIVOS NA UFSC.....	30
1.3 ESPONJAS MARINHAS	32
1.4 GENERO <i>RASPAILIA</i>	35
1.5 ESPONJA <i>Raspailia bouryesnaultae</i>	39
1.5.1 Classificação taxonômica da esponja marinha	
<i>Raspailia bouryesnaulta</i>	40
2. OBJETIVOS	43
2.1 OBJETIVO GERAL	43
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3. MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 MATERIAIS	45
3.1.1 Solventes, Adsorventes e Reagentes	45
3.1.2 Equipamentos	45
3.2 MÉTODOS	46
3.2.1 Coleta	46
3.2.1.1 Coleta Ilha do Coral	47
3.2.1.2 Coleta Ilha das Aranhas.....	47
3.2.2 Preparo da amostra	48
3.2.2.1 Obtenção do extrato e frações da esponja <i>R. bouryesnaultae</i> coletada na Ilha do Coral (maio de 2014)	48
3.2.2.2 Obtenção do extrato e frações da esponja <i>R. bouryesnaultae</i> coletada na Ilha das Aranhas (maio de 2016) .	48
3.2.3 Procedimentos de isolamento e purificação	48
3.2.3.1 Fracionamento do extrato da esponja <i>R. bouryesnaultae</i> Coletada na Ilha do Coral em maio de 2014	49
3.2.3.1.1 Fracionamento de 1,4 g da fração hexânica (CLMP1-Coral).....	50
3.2.3.1.2 Isolamento dos compostos RB1, RB2, RB5 e RB6.....	51
3.2.3.1.3 Isolamento dos compostos RB3 e RB4	51

3.2.3.1.4 Fracionamento de 1,0 g da fração hexânica (CLMP2-Coral).....	51
3.2.3.1.5 Reisolamento dos compostos RB1, RB2, RB4, RB5, RB6 e isolamento do composto RB7	52
3.2.3.1.6 Fracionamento de 0,9 g da fração hexânica (CLMP3-Coral).....	53
3.2.3.1.7 Reisolamento dos compostos RB1, RB2 e RB3	54
3.2.3.1.8 Reisolamento dos compostos RB2, RB7 e isolamento do composto RB8.....	54
3.2.3.2 Fracionamento do extrato da esponja <i>R. bouryesnaultae</i> coletada na Ilha das Aranhas em maio de 2016	54
3.2.3.2.1 Fracionamento de 1,0 g da fração hexânica (CLMP1-Aranhas)	55
3.2.3.2.2 Isolamento do composto RB9.....	56
3.2.3.2.3 Fracionamento de 1,0 g da fração hexânica (CLMP2-Aranhas)	56
3.2.3.2.4 Fracionamento de 0,87 g da fração hexânica (CLMP3-Aranhas)	57
3.2.3.2.5 Reisolamento do composto RB3.....	58
3.2.3.2.6 Reisolamento dos compostos RB1, RB2, RB6, RB8 e isolamento dos compostos RB10, RB11 e RB13	58
3.2.4 Ensaios biológicos <i>in vitro</i> das frações e substâncias isoladas.....	60
3.2.4.1 Avaliação da atividade citotóxica e antiviral	60
3.2.4.1.1 Avaliação da atividade citotóxica	60
3.2.4.1.2 Avaliação da atividade antiviral.....	61
3.2.4.2 Avaliação das atividades antibacteriana e antifúngica	62
3.2.4.3 Avaliação da atividade antiprotozoária.....	62
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS EXTRATOS E DAS FRAÇÕES DA ESPONJA <i>Raspailia bouryesnaultae</i>	65
4.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS FRAÇÕES	67

4.2.1 Triagem biológica das frações da esponja	
<i>R.bouryesnaultae</i> coletada na Ilha do Coral.....	67
4.2.2 Triagem biológica das frações da esponja	
<i>R. bouryesnaultae</i> coletada na Ilha das Aranhas	68
4.3 ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS DA ESPONJA	
<i>Raspailia bouryesnaultae</i>	71
4.3.1 Isolamento dos compostos da esponja	
<i>R. bouryesnaultae</i> coletada na Ilha do Coral-2014	71
4.3.2 Isolamento dos compostos da esponja	
<i>R.bouryesnaultae</i> coletada na Ilha das Aranhas-2016.....	72
4.4 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS	74
4.4.1 Composto RB3	79
4.4.2 Composto RB2	83
4.4.3 Composto RB1	94
4.4.4 Composto RB4	103
4.4.5 Composto RB5	104
4.4.6 Composto RB6	105
4.4.7 Composto RB7	107
4.4.8 Composto RB8	112
4.4.9 Composto RB9	113
4.4.10 Composto RB10	117
4.4.11 Composto RB11	119
4.4.12 Composto RB12	119
4.4.13 Composto RB13	121
4.4.14 Composto RB14	124
4.4.15 Composto RB15	125
4.4.16 Comparação dos dados espectrais e estereoquímica dos compostos elucidados	126
4.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS COMPOSTOS ISOLADOS	130
5. DISCUSSÃO GERAL	133
6. CONCLUSÃO	137
REFERÊNCIAS	139

ANEXOS – ESPECTROS RMN DOS COMPOSTOS	
ISOLADOS DA ESPONJA <i>Raspailia bouryesnaultae</i>	149
APÊNDICE – FLUXOGRAMAS DOS FRACIONAMENTOS	
DA ESPONJA <i>Raspailia bouryesnaultae</i>	175

1. INTRODUÇÃO

A natureza tem proporcionado às civilizações humanas os recursos necessários para sua sobrevivência e os produtos naturais, especialmente os metabólitos secundários, tem desempenhado um papel fundamental na terapêutica de diferentes patologias (AMADOR *et al.*, 2003). Os metabólitos secundários geralmente são moléculas pequenas, produzidas por uma fonte biológica como plantas, animais e microrganismos. Sua ocorrência pode ser limitada a uma determinada família taxonômica, gênero, espécie ou organismo (MANN *et al.*, 1994).

Durante milhares de anos, as plantas formaram a base da medicina tradicional com registros desde 2600 a. C. gravados em tábuas de argila, na Mesopotâmia (CRAGG; NEWMAM, 2013; SCHMIDT *et al.*, 2008). Atualmente, a medicina tradicional continua a ter uma função fundamental em muitos países devido a vários fatores, tais como a falta de acesso a tratamento médico e o custo elevado dos medicamentos. De fato, estimativas indicam que grande parcela da população mundial não tem acesso aos produtos da indústria farmacêutica, dependendo do uso de remédios tradicionais, que são principalmente derivados de plantas (JOY *et al.*, 1998; BUSS; BUTLER, 2010).

Contudo, a necessidade de se combater novas linhagens resistentes de patógenos e produzir fármacos eficazes contra novas doenças estimula a procura por fontes não convencionais de medicamentos (CHIN *et al.*, 2006). Por conseguinte, os oceanos e mares tornaram-se um campo bastante atrativo para a busca de compostos bioativos tendo em vista sua imensidão e enorme biodiversidade (KELECOM, 1999; FREITAS *et al.*, 2012). Os organismos marinhos, com frequência, produzem metabólitos secundários com estruturas químicas diferenciadas e complexas, cujas substâncias bioativas podem ser utilizadas como protótipos para criação de fármacos (LEAL *et al.*, 2012).

1.1 PRODUTOS NATURAIS MARINHOS

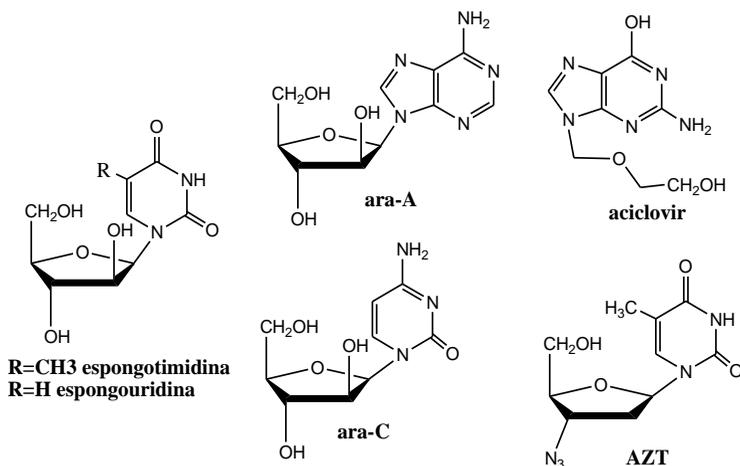
Embora a diversidade de vida do ambiente terrestre seja extraordinária, a maior biodiversidade encontra-se nos oceanos. Os oceanos cobrem 70% da superfície terrestre (NATIONAL OCEANIC AND ATMOSPHERIC ADMINISTRATION, 2016) e são habitados por milhões de espécies de organismos vivos, entre plantas, animais e microrganismos (PINTO *et al.*, 2002). Esses organismos são, na sua maioria, sésseis e se desenvolvem em condições totalmente diferentes

do ambiente terrestre como temperaturas variáveis, correntes, ação das ondas, pressões e alta salinidade. Além do que, o ambiente marinho é um sistema extremamente competitivo, colonizado por uma enorme variedade de organismos vivos, que disputam entre si por espaço, luz e nutrientes, necessitando possuir defesa contra organismos patogênicos e predadores. Assim, a evolução e sobrevivência destas espécies resultaram em organismos que produzem e/ou acumulam metabólitos secundários com estruturas únicas e com funções ecológicas das mais diversas, os quais possuem importantes atividades biológicas (FAULKNER, 2001; HESTER; HARRISON, 2000; PEREIRA; SOARES-GOMES, 2002; DONIA; HAMANN, 2003; HAEFNER, 2003; SALEMM *et al.*, 2007).

Historicamente, o uso de organismos marinhos desempenhou um papel muito pequeno no desenvolvimento de medicamentos tradicionais, em comparação com os produtos naturais terrestres, principalmente devido ao difícil acesso (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2009). Com a criação do Self-Contained Underwater Breathing Apparatus – SCUBA (aparelho autônomo para respiração subaquática), popularizado por Jacques Cousteau em 1943 quando lançou no mercado o Aqua-Lung, surgiu a possibilidade da coleta de organismos marinhos à profundidade de até 35 m, fato que alavancou os estudos dos produtos naturais marinhos (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2009; DIAS ; URBAN ; ROESSNER, 2012).

Os primeiros produtos naturais marinhos isolados e identificados foram os nucleosídeos biologicamente ativos espongotimidina e espongouridina, a partir da esponja caribenha *Cryptotethya crypta* (atualmente denominada *Tectitethya crypta*), no início da década de 1950 por Bergmann e seus colaboradores (SOEST, 2016; BERGMANN; FEENEY, 1951; BERGMANN *et al.*, 1957). Estes compostos levaram ao desenvolvimento dos análogos sintéticos Vidarabina (ara-A), Citarabina (ara-C), aciclovir e azidotimidina (AZT) (KIJJOA; SAWANGWONG, 2004; NEWMAN; CRAGG, 2004; BAKER *et al.*, 2007) (Figura 1). Desde então, muitas outras moléculas com potencial terapêutico foram obtidas por isolamento ou por síntese química inspirada em produtos naturais marinhos (MARTINS *et al.*, 2014).

Figura 1: Nucleosídeos isolados da esponja *Cryptotethya crypta* e análogos sintéticos.



Nas últimas décadas, os estudos químicos e farmacológicos com organismos marinhos originaram aproximadamente 15000 compostos, relatados até o ano de 2010 (MEHBUB *et al.*, 2014), com significativa diversidade de atividades biológicas (BLUNT *et al.*, 2014 e 2015). De acordo com Leal e colaboradores (2012) Japão, Austrália, Coreia, Taiwan e China são responsáveis por mais de 40% dos novos produtos naturais marinhos descobertos nas últimas décadas, enquanto que os países situados na América do Sul não apresentaram contribuição significativa.

O Brasil é um dos países com grande potencial para descoberta de produtos naturais marinhos bioativos devido ao seu litoral com mais de 8.000 Km de extensão. Contudo, as investigações com produtos naturais marinhos no Brasil estão em estágio inicial, quando comparadas com países que possuem companhias que investem em fármacos de origem marinha como Espanha (PharmaMar), Estados Unidos (Nereus Pharmaceuticals) e Japão (Eisai) (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2014). Na Tabela 1 encontram-se os fármacos já disponíveis no comércio, com origem baseada em produtos naturais marinhos.

Tabela 1: Fármacos originários de produtos naturais marinhos disponíveis comercialmente.

Composto	Natural ou derivado	Fonte	Uso
Citarabina	Derivado	<i>C. crypta</i>	Anticâncer
Vidarabina	Derivado	<i>C. crypta</i>	Antiviral
Ziconotida	Natural	<i>C. magnus</i>	Analgésico
Mesilato de eribulina	Derivado	<i>H. okadai</i>	Anticâncer
Ácido ômega 3-etil-éster	Derivado	<i>Peixes</i>	Antilipêmico
Trabectedina	Natural	<i>E. turbinata</i>	Anticâncer
Brentuximabe vedotina	Derivado	<i>D. auricularia</i>	Anticâncer
Carragelose	Natural	Algas vermelhas	Antiviral

Fonte: adaptado Martins *et al.*, 2014.

Nos próximos anos novos fármacos de origem marinha devem ser aprovados para uso terapêutico, tendo em vista que existem atualmente mais de 20 produtos naturais marinhos promissores, em diferentes estágios de ensaios clínicos (MOLINSKI *et al.*, 2009; GERWICK; MOORE, 2012; MARTINS *et al.*, 2014).

1.2 TRIAGEM DE PRODUTOS NATURAIS MARINHOS BIOATIVOS NA UFSC

Na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) a linha de pesquisa com foco na busca de metabólitos secundários bioativos, a partir de organismos marinhos, foi iniciada em 2005 com duas dissertações de mestrado: uma sobre esponjas (DA SILVA, 2005) e outra sobre macroalgas marinhas (LHULLIER, 2005). A pesquisa nesta área foi consolidada através de uma dissertação de mestrado com a alga *Acanthophora spicifera* (LANG, 2006) e duas teses de doutorado, uma com as algas do gênero *Laurencia* Lamouroux (LHULLIER, 2009) e outra com esponjas e cnidários do sul do Brasil e Argentina (MORITZ, 2014), entre outros.

Além disso, conta com cooperação internacional iniciada em 2005, com importantes grupos de investigação na área de química de produtos naturais marinhos da América do Sul, especificamente com aquele liderado pelo Dr. Jorge Palermo (Departamento de Química, Universidade de Buenos Aires, Argentina).

Em trabalhos prévios, realizados pelo grupo de Produtos Naturais da UFSC, no screening de atividades biológicas (antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiprotozoária e citotóxica frente a linhagens celulares tumorais) observou-se a presença de uma ou mais atividades para as espécies *Trachycladus sp* e *Petromica citrina*, sendo que esta última apresentou atividade anti-herpética para os compostos isolados, sulfato de halistanol e sulfato de halistanol C (BIANCO *et al.*, 2013; GUIMARÃES *et al.*, 2013).

A partir destes dados, foi aprovado em dezembro de 2013, o projeto associado intitulado “Busca de metabólitos secundários bioativos a partir de organismos recifais com potenciais atividades citostática, anti-herpética, antiprotozoária, antibacteriana e antifúngica” (processo 408496/2013-4), através da chamada Nº 63/2013 MCTI/CNPq/FNDCT - Ação Transversal - Estruturação de uma Rede de Pesquisa em Biotecnologia Marinha e coordenado pelo Prof. Dr. Eloir Schenkel da Universidade Federal de Santa Catarina. Este projeto está vinculado ao Projeto Integrado em Rede “Bioprospecção de compostos bioativos de organismos recifais com potencial aplicação biotecnológica”, coordenado pelo Prof. Dr. Carlos Daniel Peréz, o qual abrange na rede de pesquisa proposta pesquisadores da Universidade Federal de Pernambuco, da Universidade Federal do Ceará e da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC- BAHIA).

A presente investigação se insere no âmbito deste projeto visto que em estudos anteriores, extratos orgânicos da esponja marinha *Raspailia elegans* (atualmente *Raspailia bouryesnaultae*) coletada na costa sudeste brasileira, apresentaram resultados promissores frente à atividade citotóxica (RANGEL *et al.*, 2001). Monks e colaboradores (2002) por sua vez, relataram o rastreamento *in vitro* de dez esponjas marinhas coletadas no litoral de Santa Catarina, sendo que o extrato orgânico da esponja *Raspailia sp* apresentou atividade citotóxica contra células tumorais humanas da linhagem HT29 (tumor colorretal), U373 (tumor cerebral) e NCI-H460 (tumor pulmonar). Estes resultados, aliados ao fato de não haverem publicações com relação aos metabólitos secundários da esponja *Raspailia bouryesnaultae*, induziram à escolha desta espécie como objeto de estudo da presente dissertação.

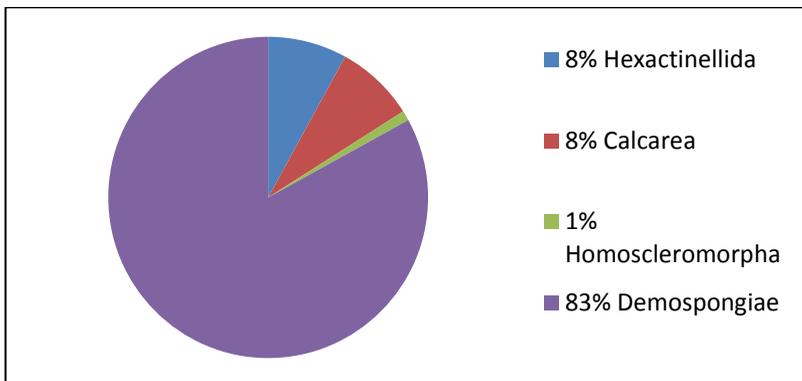
1.3 ESPONJAS MARINHAS

As esponjas pertencem ao Filo Porífera e estão entre os animais pluricelulares mais antigos existentes, com origem estimada entre 800-900 milhões de anos (MULLER, 1998). Apresentam poucas características usualmente associadas a animais, não possuindo sistemas nervoso, circulatório ou digestivo. São organismos bentônicos, filtradores e sésseis na fase adulta, ou seja, costumam fixar-se em substratos sólidos como rochas e conchas. Possuem dimensões variadas e atraem atenção devido a grande variedade de cores, formas e consistências (SOEST *et al.*, 2016; VOGEL, 2008).

As esponjas estão agrupadas em quatro classes (Figura 2), de acordo com a composição de suas espículas:

- Calcarea - esqueleto mineral composto por espículas de carbonato de cálcio.
- Hexactinellida - esqueleto mineral composto por espículas de silício, conhecidas como esponjas de vidro.
- Demospongiae - espículas silicosas e esqueleto de fibras de espongina.
- Homoscleromorpha - historicamente pertencia à classe Demospongiae, contudo análise filogenética demonstrou tratar-se de uma classe distinta (World Porifera Database, 2016).

Figura 2: Percentual da diversidade de espécies das quatro classes de esponjas marinhas.



Fonte: World Porifera Database

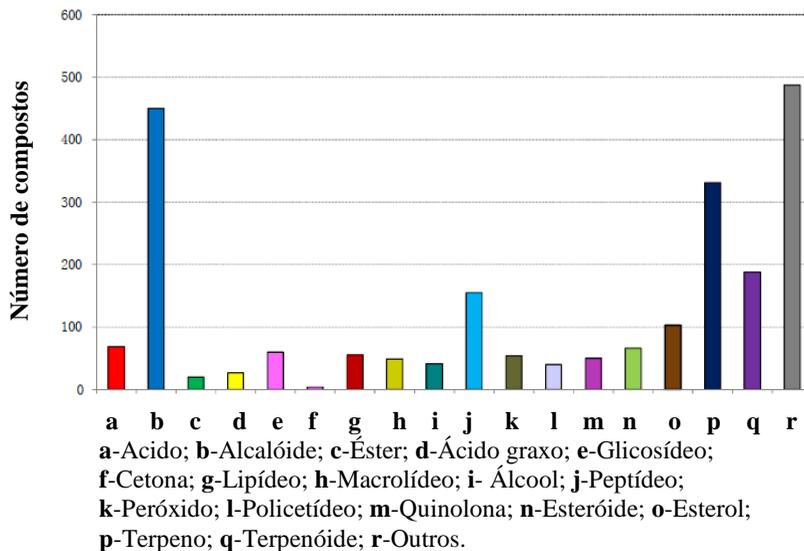
Geralmente, as esponjas são organismos dominantes em ambientes mais profundos e o fato de serem animais praticamente imóveis fez com que desenvolvessem mecanismos de proteção de natureza química, através da produção de metabólitos secundários (BERLINCK *et al.*, 2004).

Metabólitos secundários são substâncias químicas produzidas naturalmente e não são necessárias para sustentar a vida de um determinado organismo (como ocorre com os metabólitos primários) (VON POSER; MENTZ, 2007). Estes compostos, mesmo em pequenas concentrações, podem ser tóxicos para outros organismos e asseguram vantagens na sobrevivência e na competição por espaço (MEHBUB *et al.*, 2014).

Devido a essa particularidade, ou seja, habilidade para sintetizar uma série de compostos de diferentes classes estruturais, as esponjas tornaram-se uma das fontes mais promissoras de isolamento de metabólitos secundários bioativos os quais tem apresentado uma ampla variedade de atividades biológicas, o que torna estes compostos promissores fontes de fármacos para tratamento de diversas doenças (BERLINCK *et al.*, 2004; CARTÉ, 1996; MEHBUB *et al.*, 2014).

Efetivamente, observa-se um amplo espectro de diversidade química e funcional nos compostos isolados das esponjas entre 2001 e 2010, de acordo com Mehbub e colaboradores (Figura 3).

Figura 3: Diversidade química dos compostos isolados de esponjas marinhas entre 2001 a 2010.



Fonte: adaptado MEHBUB *et al.*, 2014.

As principais atividades biológicas apresentadas pelos novos compostos isolados de esponjas marinhas durante a última década, foram anticancerígena/citotóxica, antimicrobiana, anti-HIV, anti-inflamatória, anti-malária e anti-tuberculose (MEHBUB *et al.*, 2014) como mostra a Tabela 2.

Na mesma Tabela 2 observa-se que a ordem Poecilosclerida, onde se insere o gênero *Raspailia*, apresenta importantes atividades biológicas e destaca-se na produção de metabólitos secundários antitumorais/citotóxicos. Cita-se como exemplos o tedanolídeo, potente citotóxico isolado da esponja marinha caribenha *Tedania ignis* (SCHMITZ *et al.*, 1984) e os asmarinas A e B, isolados de esponjas *Raspailia sp* e que demonstraram serem citotóxicos para células cancerosas humanas (leucemia, carcinoma de pulmão e cólon) (VIK; GUNDERSEN, 2007).

Tabela 2: Número de compostos com atividades biológicas (A-I) isolados de esponjas marinhas, de diferentes ordens, na última década. **A**=Anti-Alzheimer; **B**=Antibacteriana; **C**=Anti-tuberculose; **D**=Anticancerígena/Citotoxicidade; **E**=Antifúngica; **F**=Anti-inflamatória; **G**=Anti-malária; **H**=Anti-HIV e **I**=Antiviral.

Ordem das esponjas	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Agelasida		17		11	6		6		
Astrophorida		8	6	97	7		1	5	3
Axinellida									
Chondrosida				3	3				
Choristida				12					
Clathrinida		4	3	3	2				
Dendroceratida		4		14	3	3			
Dictyoceratida		38	3	182	11	2	1	5	
Hadromerida		2	3	45	1			5	
Halichondrida	1	18	4	99	16	1	2	1	
Haplosclerida	8	15	2	100	20		7	4	
Homosclerophorida		2	3	55	10		9	1	
Leucosolenida		1		2					
Lithistida		5	2	38	9	2		16	
Lyssacosida				1					
Ocilosclerida									
Poecilosclerida		17	5	143	21	1	1	4	1
Spirophorida				4					
Verongida		14		17	5				
Total	9	145	31	826	114	9	27	41	4

Fonte: adaptado Mehbub e colaboradores, 2014.

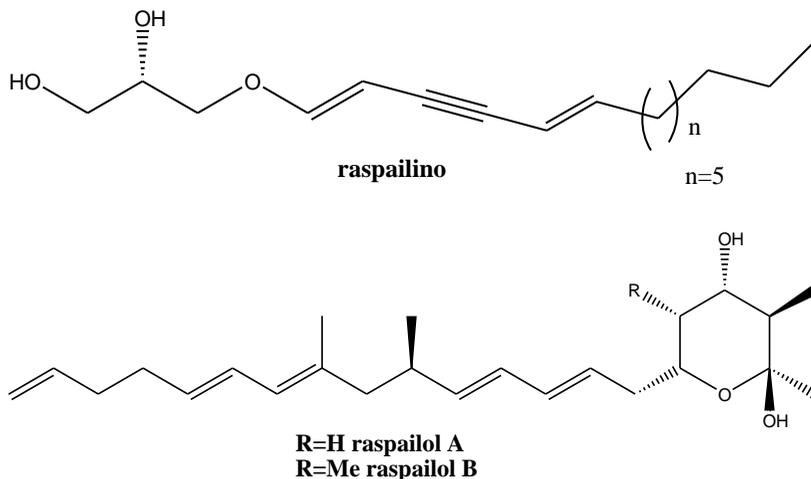
1.4 GÊNERO *RASPAILIA*

Atualmente há mais de 100 espécies de esponjas descritas para o gênero *Raspailia* e estão distribuídas em todo o mundo, principalmente em águas rasas. Até o momento mais de 40 metabólitos secundários já foram relatados para o gênero.

O primeiro relato de metabólitos secundários isolados do gênero foi das esponjas *Raspailia pumila* e *Raspailia ramosa* coletadas no Oceano Atlântico. Foram encontrados novos éteres do glicerol de cadeia longa insaturada, denominados raspailinos (GUELLA; MANCINI; PIETRA, 1986). Em meados de 1990, dois hemiacetais cíclicos também

contendo cadeias longas e insaturadas, nomeados de raspailol A e B foram isolados de uma esponja *Raspailia* sp, coletada em Palau no Oceano Pacífico (CERDA-GARCÍA-ROJAS; FAULKNER, 1995) (Figura 4).

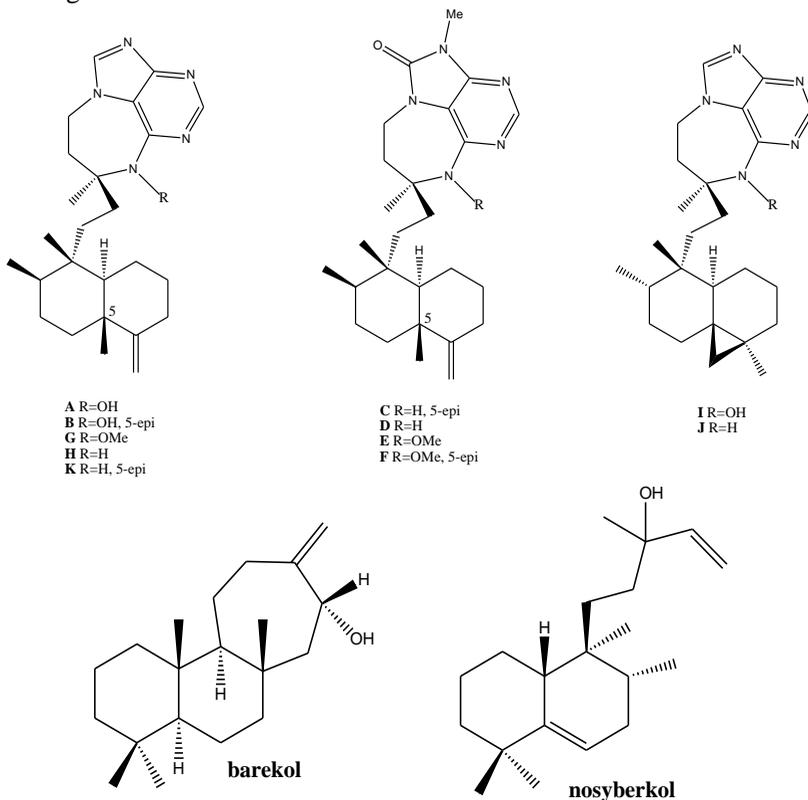
Figura 4: Raspailino e raspailol A e B isolados das esponjas *Raspailia pumila*, *Raspailia ramosa* e *Raspailia* sp., respectivamente.



Fonte: Guella, Mancini e Pietra (1986); Cerda-Garcia-Rojas e Faulkner (1995).

Os compostos denominados asmarinas A-K são metabólitos nitrogenados que contém a estrutura da adenina além de um diterpeno, especificamente do tipo clerodano. Foram isolados de *Raspailia* sp coletada em três diferentes localidades: Mar Vermelho: asmarinas A-F; Oceano Índico: asmarinas G e H; Costa de Madagascar: asmarinas I, J e K (YOSIEF *et al.*, 1998; YOSIEF; RUDI; KASHMAN, 2000; RUDI *et al.*, 2004). Nos mesmos organismos, foram identificados dois novos diterpenos: o barekol, isolado da esponja *Raspailia* sp coletada no Oceano Índico e o nosyberkol, isolado da esponja *Raspailia* sp coletada na Costa de Madagascar (RUDI *et al.*, 2004) (Figura 5).

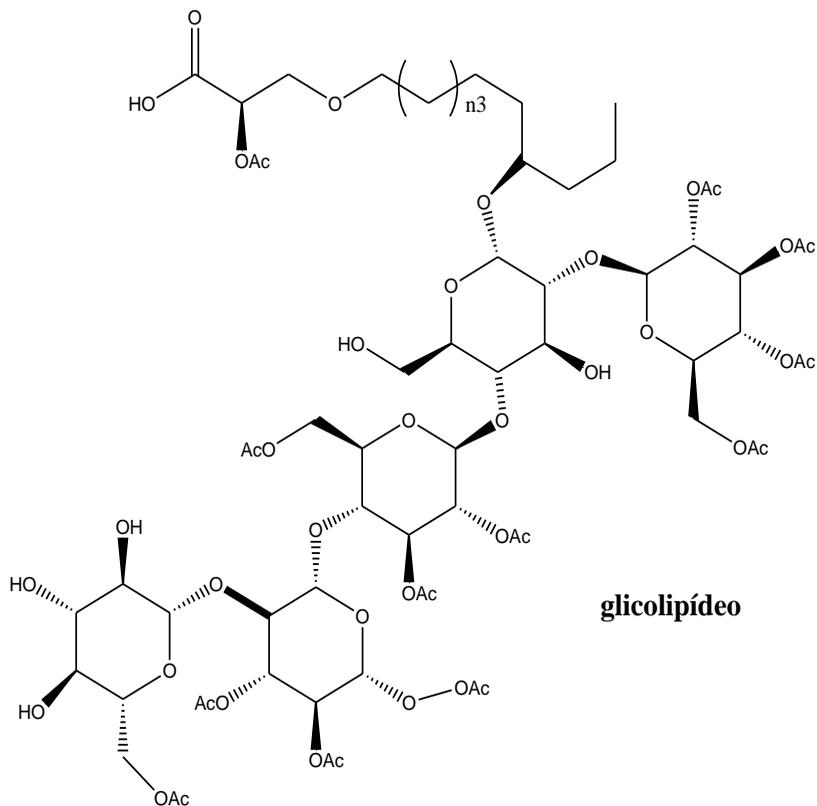
Figura 5: Asmarinas A-K, barekol e nosyberkol isolados de esponjas *Raspailia sp* coletadas no Mar Vermelho, Oceano Índico e Costa de Madagascar.



Fonte: Yosief e colaboradores (1998, 2000); Rudi e colaboradores (2004).

Da esponja *Raspailia agminata*, coletada na Nova Zelândia, foram isolados os agminosídeos, uma nova família de glicolipídeos acetilados. Apesar das estruturas serem quimicamente interessantes, ainda não apresentaram atividade biológica promissora (WOJNAR; NORTHCOTE, 2011) (Figura 6).

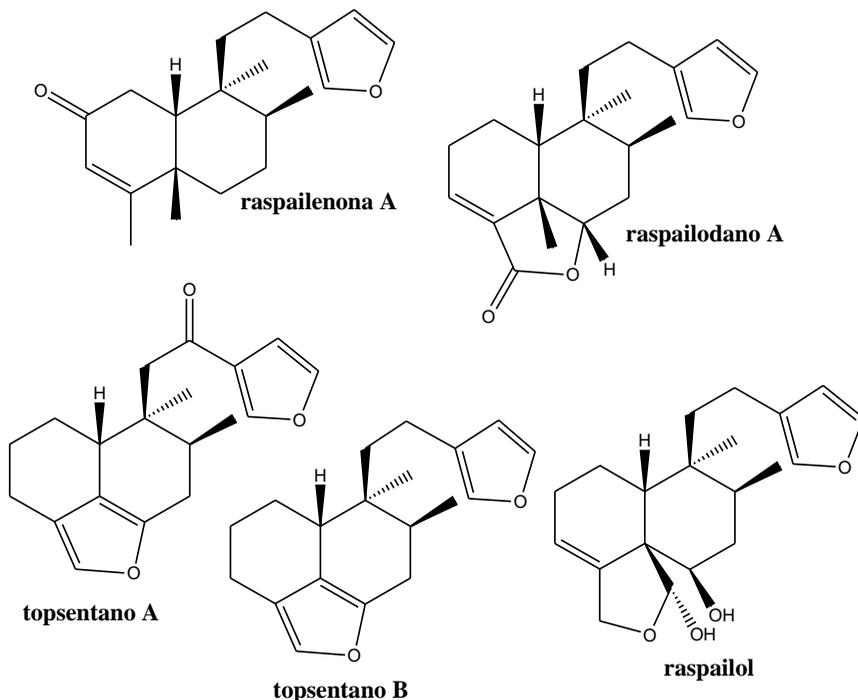
Figura 6: Agminosídeo isolado da esponja *Raspailia agminata*.



Fonte: Wojnar e Northcote (2011).

A esponja *Raspailia topsenti*, coletada na Nova Zelândia, tem sido uma rica fonte de metabólitos secundários do tipo diterpeno clerodano. Desta esponja foram isolados o raspailol, as raspailenonas A e B, os raspailodanos A-G e os topsentanos A e B, entre outros (WEST; NORTHCOTE; BATTERSHILL, 1998; RYAN, 2007; MORAES, 2006) (Figura 7).

Figura 7: Raspailenona A, raspailodano A, topsenanos A e B e raspailol isolados da esponja *Raspailia topsenti*.



Fonte: Adaptado de West e colaboradores (1998), Ryan (2007) e Moraes (2006).

1.5 ESPONJA *Raspailia bouryesnaultae*

A esponja marinha *Raspailia bouryesnaultae* Boury-Esnault 1973, apresenta forma de crescimento arborescente com pequenas ramificações secundárias decorrentes de ramos principais maiores, medindo 5,5 a 9,7 cm de comprimento. A estrutura da esponja é suportada por um pedúnculo de 2,5 cm de diâmetro. Possui superfície aveludada, consistência firme e macia. Exibe coloração amarela brilhante *in situ* (Figura 8) e laranja escuro em álcool (LERNER; CARRARO; SOEST, 2006). Sua classificação é apresentada a seguir.

1.5.1 Classificação taxonômica da esponja *Raspailia bouryesnaultae*

- ❖ Filo: Porífera
- ❖ Classe: Demospongiae
- ❖ Sub-classe: Ceractinomorpha
- ❖ Ordem: Poecilosclerida
- ❖ Sub-ordem: Microcionina
- ❖ Família: Raspailiidae
- ❖ Gênero: *Raspailia*
- ❖ Espécie: *Raspailia bouryesnaultae*

Figura 8: Foto *in situ* da esponja *Raspailia bouryesnaultae*.



Fonte: João Luís Carraro.

A esponja *Raspailia bouryesnaultae* é uma espécie recentemente redescrita (LERNER *et al.*, 2006). Até 2001, quando foi coletada na costa catarinense, não apresentava registro para a região. Os caracteres desta esponja conferem com *Raspailia (Raspaxilla) elegans* Boury-Esnault (1973). Entretanto, devido à sucinta descrição de Boury-Esnault, foi feita uma redescrição da espécie acrescentando informações complementares com base em estudos de microscopia eletrônica de varredura e detalhes do esqueleto. A espécie foi renomeada para *Raspailia bouryesnaultae*.

Na literatura não foram encontrados estudos químicos para esta espécie, por outro lado, em triagem realizada com extratos de 24 esponjas marinhas por Rangel e colaboradores (2001), o extrato orgânico da esponja *Raspailia elegans* (atualmente *Raspailia bouryesnaultae*) apresentou atividade citotóxica promissora. No screening farmacológico realizado com organismos marinhos em 2014, a esponja *Raspailia bouryesnaultae* foi selecionada por exibir perfil químico interessante, enquanto que na triagem de atividades biológicas realizada em 2015 apresentou atividade anti-herpética e antitripanossoma nas frações hexânica e etanólica.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigação química da esponja marinha *Raspailia bouryesnaultae* coletada na costa catarinense, visando a descoberta de substâncias bioativas, guiada por ensaios farmacológicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Isolamento e elucidação estrutural de substâncias bioativas da esponja *Raspailia bouryesnaultae*.

Comparação da composição química dos metabólitos secundários dos diferentes locais de coleta: Ilha do Coral e Ilha das Aranhas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Solventes, Adsorventes e Reagentes

Os solventes e reagentes utilizados para a extração, análise por cromatografia em camada delgada (CCD) e para fracionamento cromatográfico foram de grau analítico, de procedência Synth® e Vetec®.

Para o fracionamento em coluna aberta (CCA) e cromatografia líquida de média pressão (CLMP), foi utilizado gel de sílica 60 de procedência Vetec®, com tamanho de partículas na faixa de 0,04 - 0,063 mm e 0,2 - 0,5 mm.

Nas cromatografias em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatoplasas de alumínio de gel de sílica 60 F 254nm, da marca Macherey-Nagel®.

Para a purificação por exclusão foi utilizada resina de Sephadex® LH-20.

Na revelação das cromatoplasas foi usada solução de anisaldeído-sulfúrico, preparado a partir de reagentes de grau analítico.

Para fracionamento por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram utilizados solventes de grau HPLC e coluna de fase reversa Phenomenex® Luna C18, 250 cm x 10 mm, 10 µm.

Os solventes utilizados para a obtenção dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram clorofórmio deuterado e benzeno deuterado, fabricante CIL (Cambridge Isotope Laboratories).

3.1.2 Equipamentos

O extrato e as frações obtidas nos procedimentos cromatográficos foram concentrados em rotaevaporador da marca Büchi.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos usando espectrômetros Bruker, modelos Fourier 300 e DRX-400. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento em Hertz (Hz).

Tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como padrão interno. Os experimentos de ressonância magnética nuclear 2D (^1H - ^1H COSY, HSQC, HMBC) foram realizados usando software Topspin 1.3.

Para fracionamento utilizou-se sistema de cromatografia líquida de média pressão (CLMP) tipo SEPACORE/Syncore® da marca Büchi.

Quando necessário, a purificação final foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), usando aparelho Shimadzu LC-10A, detector de ultravioleta.

3.2. MÉTODOS

3.2.1 Coleta

Após triagem através de ensaios biológicos realizados em 2014, a esponja *Raspailia bouryesnaultae* foi selecionada para dar continuidade aos estudos químicos.

O material foi coletado com o apoio do Dr. João Luis Carraro (pesquisador associado ao laboratório de Taxonomia de Poríferas, Museu Nacional, UFRJ) através de mergulho autônomo. Foram realizadas duas coletas sendo uma na Ilha do Coral, município de Garopaba, Santa Catarina e uma na Ilha das Aranhas, município de Florianópolis, Santa Catarina (Figura 9).

Após cada coleta o material foi armazenado em gelo e transferido para o laboratório. O grupo possui a autorização do IBAMA para coleta e transporte de invertebrados marinhos (Autorização nº 37981-2, ICMBio/SISBIO).

Figura 9: Locais das coletas da esponja *Raspailia bouryesnaultae*.



Fonte:Google Earth.

3.2.1.1 Coleta Ilha do Coral

A esponja *Raspailia bouryesnaultae* foi coletada a 12 metros de profundidade na Ilha do Coral, município de Garopaba, Santa Catarina, no dia 30 de maio de 2014.

3.2.1.2 Coleta Ilha das Aranhas

A esponja *Raspailia bouryesnaultae* foi coletada a 10 metros de profundidade na Ilha das Aranhas, município de Florianópolis, Santa Catarina, no dia 05 de maio de 2016.

3.2.2 Preparo da amostra

3.2.2.1 Obtenção do extrato e frações da esponja *Raspailia bouryesnaultae* coletada na Ilha do Coral (maio de 2014)

A amostra fresca da esponja *Raspailia bouryesnaultae*, coletada na Ilha do Coral, foi submetida à maceração exaustiva com etanol durante sete dias por duas vezes. O extrato etanólico resultante foi concentrado em rotaevaporador até diminuir de volume. Em seguida, esse extrato bruto foi extraído com hexano resultando nas frações hexânica e etanólica.

Foram obtidos 3,47 g de fração hexânica e 2,33 g de fração etanólica. A fração hexânica foi selecionada para dar continuidade ao isolamento dos compostos.

3.2.2.2 Obtenção do extrato e frações da esponja *Raspailia bouryesnaultae* coletada na Ilha das Aranhas (maio de 2016)

A amostra fresca da esponja *Raspailia bouryesnaultae*, coletada na Ilha das Aranhas, foi macerada com etanol durante sete dias. Este procedimento foi repetido por três vezes e o extrato obtido foi concentrado em rotaevaporador, gerando 6,35 g de extrato bruto. Em seguida, uma parte do extrato bruto foi reservada (1,12 g) e o restante (5,23 g) foi extraído com hexano, acetato de etila e etanol. Assim, foram obtidos 2,87 g de fração hexânica, 0,72 g de fração acetato de etila e 1,64 g de fração etanólica.

Após a extração etanólica a amostra foi macerada com acetona durante sete dias e o extrato foi concentrado em rotaevaporador dando origem ao extrato acetônico (718,6 mg). A fração hexânica foi selecionada para dar continuidade ao isolamento dos compostos por apresentar um perfil químico mais diverso.

3.2.3 Procedimentos de isolamento e purificação de compostos

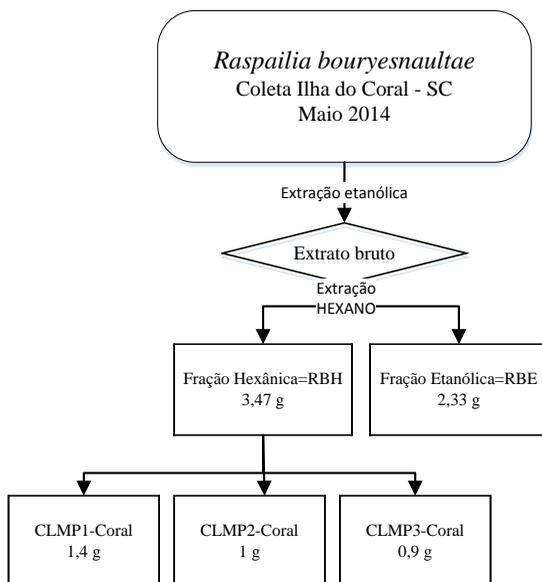
As frações hexânicas obtidas foram novamente fracionadas a fim de se proceder ao isolamento dos compostos. O fracionamento foi realizado através de separações cromatográficas sobre gel de sílica 60 com eluentes de polaridade crescente. Foram utilizadas cromatografia líquida de média pressão (CLMP) e cromatografia em coluna aberta (CCA). Para algumas frações a separação cromatográfica foi realizada por exclusão, utilizando-se a resina Sephadex® LH20 em CCA. A

purificação final de metabólitos, quando necessária, foi obtida através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3.2.3.1 Fracionamento do extrato da esponja *Raspailia bouryesnaultae* coletada na Ilha do Coral em maio de 2014

Após a extração com hexano, a porção de 3,47 g da fração hexânica foi dividida em três partes e cada parte foi submetida à separação cromatográfica em coluna líquida de média pressão (CLMP) modelo Sepacore/ Syncore® (Figura 10), buscando o isolamento dos compostos.

Figura 10: Fluxograma da obtenção do extrato e frações da esponja *Raspailia bouryesnaultae* coletada na Ilha do Coral.



CLMP=Coluna líquida de média pressão.

Em seguida, algumas frações resultantes desses fracionamentos foram selecionadas, de acordo com suas características químicas, para serem submetidas a novas colunas cromatográficas, visando proporcionar a separação dos compostos. Nesse processo foram utilizadas colunas cromatográficas abertas (CCA) e cromatografia de exclusão utilizando resina Sephadex® LH20. A purificação dos

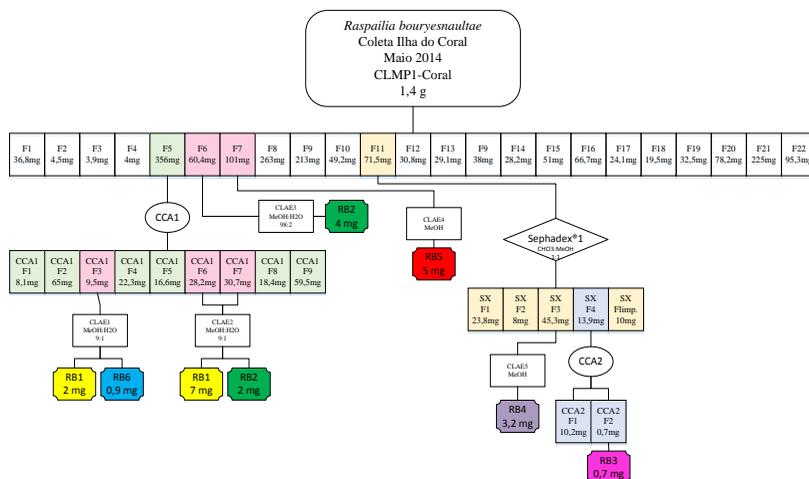
compostos, quando necessária, foi feita através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3.2.3.1.1 Fracionamento de 1,4 g da fração hexânica (CLMP1-Coral)

Para proporcionar a separação dos compostos, a porção de 1,4 g da fração hexânica da coleta Ilha do Coral foi submetida ao fracionamento em cromatografia líquida de média pressão (CLMP1), modelo Sepacore/Syncore®, utilizando como fase estacionária gel de sílica 60 (60-200 mm) e como fase móvel gradiente de solventes iniciando com hexano 100% e finalizando com metanol 100%. Foram coletadas 23 frações. Estas foram analisadas por cromatografia de camada delgada (CCD), observadas sob luz ultravioleta (254 e 366 nm) e reveladas com anisaldeído-sulfúrico.

Foram selecionadas as frações F5 (356 mg), F6 (60,4 mg), F7 (101 mg) e F11 (71,5 mg) da CLMP1-Coral, de acordo com suas características químicas, para serem submetidas a novas colunas cromatográficas visando proporcionar a separação dos compostos (Figura 11).

Figura 11: Fluxograma do processo de fracionamento de parte da fração hexânica do material coletado na Ilha do Coral (1,4 g), indicando as frações que conduziram aos compostos isolados (CLMP1-Coral).



3.2.3.1.2 Isolamento dos compostos RB1, RB2, RB5 e RB6.

A fração F5 (356 mg) da CLMP1-Coral foi submetida a coluna de sílica gel 60 (CCA1) utilizando como fase móvel hexano:acetato de etila (99:1) resultando em 9 frações.

A fração F3 (9,5 mg) da CCA1 foi purificada através de CLAE1 utilizando fase móvel MeOH:H₂O (9:1) resultando nos compostos RB1 (2 mg) e RB6 (0,9 mg).

As frações F6 (28,2 mg) e F7 (30,7 mg) da CCA1 foram reunidas e purificadas através de CLAE2 utilizando fase móvel MeOH:H₂O (9:1) resultando nos compostos RB1 (7 mg) e RB2 (2 mg).

A fração F6 (60,4 mg) da CLMP1-Coral foi purificada através de CLAE3 utilizando fase móvel MeOH:H₂O (98:2) resultando no composto RB2 (4 mg).

A fração F7 (101 mg) da CLMP1-Coral foi purificada através de CLAE4 utilizando fase móvel MeOH resultando no composto RB5 (5 mg).

3.2.3.1.3 Isolamento dos compostos RB3 e RB4

A fração F11 (71,5 mg) da CLMP1-Coral foi submetida a coluna de separação por peso molecular (Sephadex®1) utilizando como fase móvel clorofórmio:metanol (1:1) resultando em 19 frações que foram reunidas, de acordo com suas características químicas, em 5 frações.

A fração F3 (45,3 mg) da coluna Sephadex®1 foi purificada através de CLAE5 utilizando fase móvel MeOH resultando no composto RB4 (3,2 mg).

A fração F4 (13,9 mg) da coluna Sephadex®1 foi submetida a coluna de sílica gel 60 (CCA-2) utilizando como fase móvel ciclohexano:acetato de etila (7:3) e acetato de etila resultando em 13 frações, as quais foram reunidas de acordo com suas características químicas em 2 frações. Destas, a fração F2 resultou no composto denominado RB3 (0,7 mg).

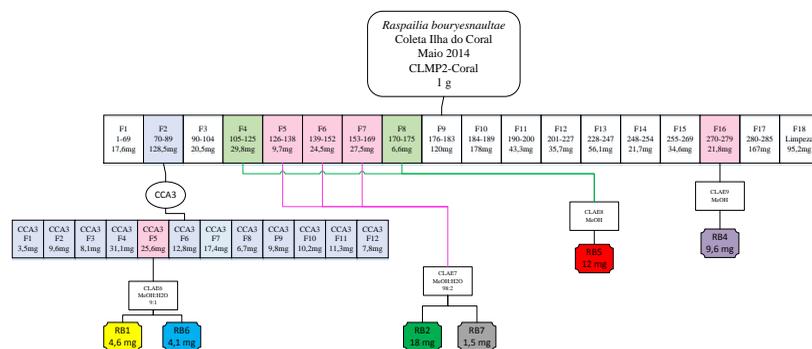
3.2.3.1.4 Fracionamento de 1,0 g da fração hexânica (CLMP2-Coral)

Para obter maior quantidade dos compostos já isolados e isolamento de outros compostos, a porção 1,0 g da fração hexânica da Ilha do Coral foi submetida à separação cromatográfica em CLMP2, modelo Sepacore®/Syncore. Utilizou-se como fase estacionária gel de sílica 60 (0,2 – 0,5 mm) e como fase móvel misturas de hexano com

proporções crescentes de acetato de etila. Obtiveram-se 285 frações que foram agrupadas, em função de sua semelhança cromatográfica, em 18 frações.

Foram selecionadas as frações F2 (128,5 mg), F4 (29,8 mg), F5 (9,7 mg), F6 (24,5 mg), F7 (27,5 mg), F8 (6,6 mg) e F16 (21,8 mg) da CLMP2-Coral, de acordo com suas características químicas, para serem submetidas a novas colunas cromatográficas visando proporcionar a separação dos compostos (Figura 12).

Figura 12: Fluxograma do processo de fracionamento de parte da fração hexânica do material coletado na Ilha do Coral (1,0 g), indicando as frações que conduziram aos compostos isolados (CLMP2-Coral).



3.2.3.1.5 Reisolamento dos compostos RB1, RB2, RB4, RB5, RB6 e isolamento do composto RB7

A fração F2 (128,5 mg) da CLMP2-Coral foi submetida a coluna de sílica gel 60 (CCA3) utilizando como fase móvel hexano: acetato de etila (95:5) até acetato de etila 100%, resultando em 12 frações.

A fração F5 (25,6 mg) da CCA3 foi purificada através de CLAE6 utilizando fase móvel MeOH:H₂O (9:1) resultando nos compostos RB1 (4,6 mg) e RB6 (4,1 mg).

As frações F5 (9,7 mg), F6 (24,5 mg) e F7 (27,5 mg) da CLMP2-Coral foram reunidas e purificadas através de CLAE7 utilizando fase móvel MeOH:H₂O (98:2) resultando nos compostos RB2 (18 mg) e RB7 (1,5 mg).

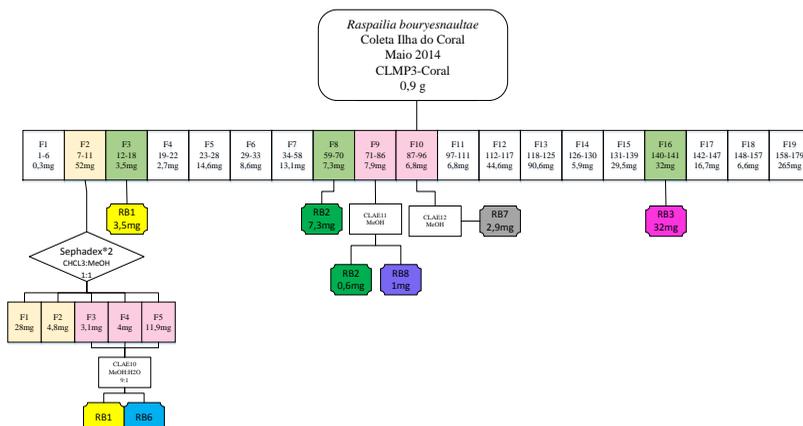
As frações F4 (29,8 mg) e F8 (6,6 mg) da CLMP2-Coral foram reunidas e purificadas através de CLAE8 utilizando fase móvel MeOH resultando no composto RB5 (12 mg).

A fração F16 (21,8 mg) da CLMP2-Coral foi purificada através de CLAE9 utilizando fase móvel MeOH resultando no composto RB4 (9,6 mg).

3.2.3.1.6 Fracionamento de 0,9 g da fração hexânica (CLMP3-Coral)

Para obter maior quantidade dos compostos já isolados e isolamento de outros compostos, a porção 0,9 g da fração hexânica da coleta da Ilha do Coral foi submetida à separação cromatográfica em CLMP3, modelo Sepacore®/Syncore. Utilizou-se como fase estacionária gel de sílica 60 (0,043 – 0,063 mm) e como fase móvel misturas de hexano com proporções crescentes de acetato de etila, finalizando com etanol. Obtiveram-se 179 frações que foram agrupadas, em função de sua semelhança cromatográfica, em 19 frações.

Figura 13: Fluxograma do processo de fracionamento de parte da fração hexânica do material coletado na Ilha do Coral (0,9 g), indicando as frações que conduziram aos compostos isolados (CLMP3-Coral).



3.2.3.1.7 Reisolamento dos compostos RB1, RB2 e RB3

A fração F3 da CLMP3-Coral resultou no composto denominado RB1 (3,5 mg).

A fração F8 da CLMP3-Coral resultou no composto denominado RB2 (7,3 mg).

A fração F16 da CLMP3-Coral resultou no composto denominado RB3 (32 mg).

Foram selecionadas as frações F2 (52 mg), F9 (7,9 mg) e F10 (6,8 mg) da CLMP3-Coral, de acordo com suas características químicas, para serem submetidas a novas colunas cromatográficas visando proporcionar a separação dos compostos (Figura 13).

3.2.3.1.8 Reisolamento dos compostos RB2, RB7 e isolamento do composto RB8

A fração F2 (52 mg) da CLMP3-Coral foi submetida a coluna de separação por peso molecular (Sephadex®2) utilizando como fase móvel clorofórmio:metanol (1:1) resultando em 5 frações.

As frações F3 (3,1 mg), F4 (4 mg) e F5 (11,9 mg) da coluna Sephadex®2 foram reunidas e purificadas através de CLAE10 utilizando fase móvel MeOH:H₂O (9:1) resultando na mistura dos compostos RB1 e RB6 que não foram separados (2 mg).

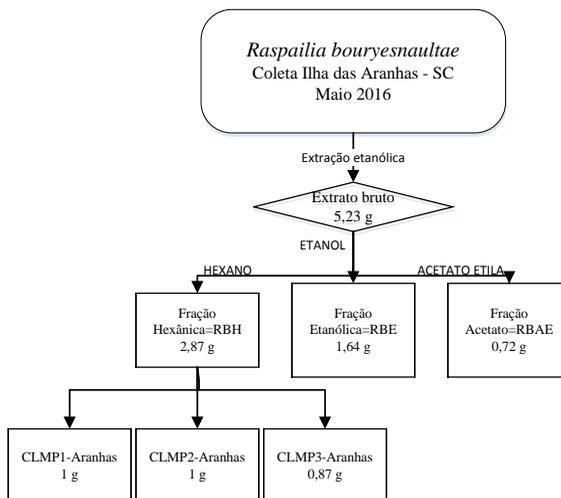
A fração F9 (7,9 mg) da CLMP3-Coral foi purificada através de CLAE11 utilizando fase móvel MeOH, resultando nos compostos RB2 (0,6 mg) e RB8 (1 mg).

A fração F10 (6,8 mg) da CLMP3-Coral foi purificada através de CLAE12 utilizando fase móvel MeOH, resultando no composto RB7 (2,9 mg).

3.2.3.2 Fracionamento do extrato da esponja *Raspailia bouryesnaultae* coletada na Ilha das Aranhas em maio de 2016

Após a extração com hexano, a porção 2,87 g da fração hexânica foi dividida em três partes e cada parte foi submetida à separação cromatográfica em coluna líquida de média pressão (CLMP), modelo Sepacore/ Syncore, buscando o isolamento dos compostos (Figura 14).

Figura 14: Fluxograma da obtenção do extrato e frações da esponja *Raspailia bouryesnaultae* coletada na Ilha das Aranhas.



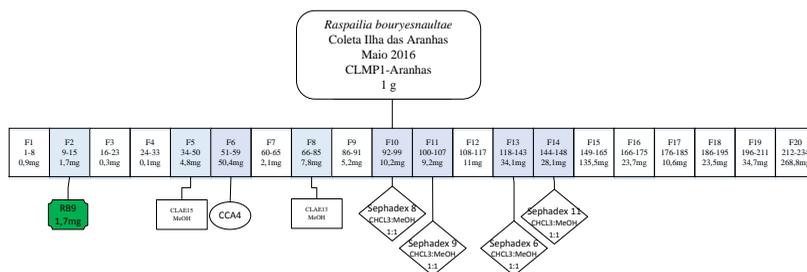
CLMP=Coluna líquida de média pressão.

Em seguida, algumas frações resultantes desses fracionamentos foram selecionadas, de acordo com suas características químicas, para serem submetidas a novas colunas cromatográficas visando proporcionar a separação dos compostos. Nesse processo foram utilizadas colunas cromatográficas abertas (CCA) e colunas de separação por peso molecular (Sephadex® LH20). A purificação dos compostos, quando necessária, foi feita através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3.2.3.2.1 Fracionamento de 1,0 g da fração hexânica (CLMP1-Aranhas)

Para proporcionar a separação dos compostos, a porção 1,0 g da fração hexânica da coleta das Ilhas das Aranhas foi submetida ao fracionamento em cromatografia líquida de média pressão (CLMP1), modelo Sepacore/Syncore®, utilizando como fase estacionária gel de sílica 60 (0,2-0,5 mm) e como fase móvel gradiente de solventes que iniciou com hexano 100%, passou para misturas de hexano com proporções crescentes de acetato de etila e finalizou com etanol 100%. Foram coletadas 234 frações que foram agrupadas, em função da sua semelhança cromatográfica, em 20 frações.

Figura 15: Fluxograma do processo de fracionamento de parte da fração hexânica do material coletado na Ilha das Aranhas (1,0 g), indicando as frações que conduziram aos compostos isolados (CLMP1-Aranhas).



3.2.3.2.2 Isolamento do composto RB9

A fração F2 da CLMP1-Aranhas é o composto denominado RB9 (1,7 mg).

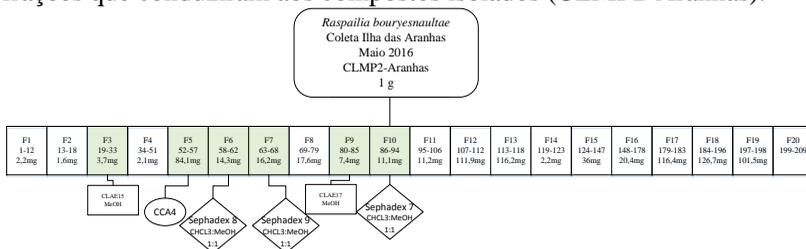
Foram selecionadas as frações F5 (4,8 mg), F6 (50,4 mg), F8 (7,8 mg), F10 (10,2 mg), F11 (9,2 mg), F13 (34,1 mg) e F14 (28,1 mg) da CLMP1-Aranhas, de acordo com suas características químicas, para serem submetidas a novas colunas cromatográficas com a finalidade de proporcionar a separação dos compostos (Figura 15).

3.2.3.2.3 Fracionamento de 1,0 g da fração hexânica (CLMP2-Aranhas)

Para obter maior quantidade do composto já isolado e isolamento de outros compostos, a porção 1,0 g da fração hexânica da coleta das Ilhas das Aranhas foi submetida ao fracionamento em cromatografia líquida de média pressão (CLMP2), modelo Sepacore/Syncore®, utilizando como fase estacionária gel de sílica 60 (0,043-0,063 mm) e como fase móvel gradiente de solventes que iniciou com hexano 100%, passou para misturas de hexano com proporções crescentes de acetato de etila e finalizou com etanol 100%. Foram coletadas 209 frações que foram agrupadas, em função da sua semelhança cromatográfica, em 20 frações.

Foram selecionadas as frações F3 (3,7 mg), F5 (84,1 mg), F6 (14,3 mg), F7 (16,2 mg), F9 (7,4 mg) e F10 (11,1 mg) da CLMP2-Aranhas, de acordo com suas características químicas, para serem submetidas a novas colunas cromatográficas com a finalidade de proporcionar a separação dos compostos (Figura 16).

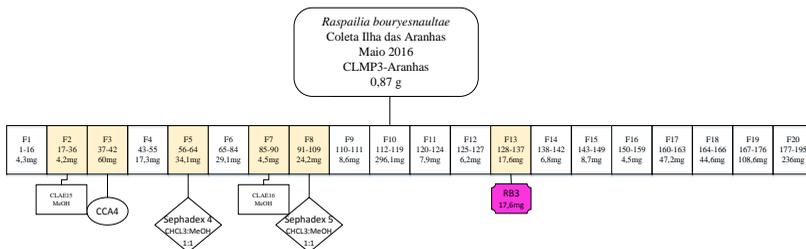
Figura 16: Fluxograma do processo de fracionamento de parte da fração hexânica do material coletado na Ilha das Aranhas (1,0 g), indicando as frações que conduziram aos compostos isolados (CLMP2-Aranhas).



3.2.3.2.4 Fracionamento de 0,87 g da fração hexânica (CLMP3-Aranhas)

Para obter maior quantidade do composto já isolado e isolamento de outros compostos, a porção 0,87 g da fração hexânica da coleta das Ilhas das Aranhas foi submetida ao fracionamento em cromatografia líquida de média pressão (CLMP3), modelo Sepacore/Syncore®, utilizando como fase estacionária gel de sílica 60 (0,043-0,063 mm) e como fase móvel gradiente de solventes que iniciou com hexano 100%, passou para misturas de hexano com proporções crescentes de acetato de etila e finalizou com etanol 100%. Foram coletadas 195 frações que foram agrupadas, em função da sua semelhança cromatográfica, em 20 frações.

Figura 17: Fluxograma do processo de fracionamento de parte da fração hexânica do material coletado na Ilha das Aranhas (0,87 g), indicando as frações que conduziram aos compostos isolados (CLMP3-Aranhas).



3.2.3.2.5 Reisolamento do composto RB3

A fração F13 da CLMP3-Aranhas é o composto denominado RB3 (17,6 mg).

Foram selecionadas as frações F2 (4,2 mg), F3 (60 mg), F5 (34,1 mg), F7 (4,5 mg) e F8 (24,2 mg) da CLMP3-Aranhas, de acordo com suas características químicas, para serem submetidas a novas colunas cromatográficas com a finalidade de proporcionar a separação dos compostos (Figura 17).

3.2.3.2.6 Reisolamento dos compostos RB1, RB2, RB6, RB8 e isolamento dos compostos RB10, RB11 e RB13

As frações F6 (50,4 mg) da CLMP1-Aranhas, F5 (84,1 mg) da CLMP2-Aranhas e F3 (60 mg) da CLMP3-Aranhas foram reunidas e submetidas a cromatografia em coluna aberta (CCA4), utilizando como fase estacionária gel de sílica 60 (0,043-0,063) e como fase móvel gradiente de solventes que iniciou com hexano 100%, passou para misturas de hexano com proporções crescentes de acetato de etila e finalizou com acetato de etila 100%. Foram coletadas 60 frações que foram agrupadas, em função da sua semelhança cromatográfica, em 5 frações.

A fração F2 (162 mg) da CCA4 foi submetida a coluna de separação por peso molecular (Sephadex®3) utilizando como fase móvel clorofórmio:metanol (1:1) resultando em 24 frações que foram agrupadas, em função de sua semelhança cromatográfica, em 2 frações.

A fração F5 (34,1 mg) da CLMP3-Aranhas foi submetida a coluna de separação por peso molecular (Sephadex®4) utilizando como fase móvel clorofórmio:metanol (1:1) resultando em 20 frações que foram agrupadas, em função de sua semelhança cromatográfica, em 3 frações.

A fração F8 (24,2 mg) da CLMP3-Aranhas foi submetida a coluna de separação por peso molecular (Sephadex®5) utilizando como fase móvel clorofórmio:metanol (1:1) resultando em 24 frações que foram agrupadas, em função de sua semelhança cromatográfica, em 4 frações.

A fração F13 (34,1 mg) da CLMP1-Aranhas foi submetida a coluna de separação por peso molecular (Sephadex®6) utilizando como fase móvel clorofórmio:metanol (1:1) resultando em 20 frações que foram agrupadas, em função de sua semelhança cromatográfica, em 2 frações.

A fração F10 (11,1 mg) da CLMP2-Aranhas foi submetida a coluna de separação por peso molecular (Sephadex®7) utilizando como fase móvel clorofórmio:metanol (1:1) resultando em 20 frações que foram agrupadas, em função de sua semelhança cromatográfica, em 3 frações.

A fração F3 da Sephadex®7 resultou no composto denominado RB12 (6,3 mg).

A fração F10 (10,2 mg) da CLMP1-Aranhas e a fração F6 (14,3 mg) da CLMP2-Aranhas foram reunidas e submetidas a coluna de separação por peso molecular (Sephadex®8) utilizando como fase móvel clorofórmio:metanol (1:1) resultando em 17 frações que foram agrupadas, em função de sua semelhança cromatográfica, em 2 frações.

A fração F11 (9,2 mg) da CLMP1-Aranhas e a fração F7 (16,2 mg) da CLMP2-Aranhas foram reunidas e submetidas a coluna de separação por peso molecular (Sephadex®9) utilizando como fase móvel clorofórmio:metanol (1:1) resultando em 21 frações que foram agrupadas, em função de sua semelhança cromatográfica, em 2 frações.

A fração F14 (28,1 mg) da CLMP1-Aranhas foi submetida a coluna de separação por peso molecular (Sephadex®10) utilizando como fase móvel clorofórmio:metanol (1:1) resultando em 24 frações que foram agrupadas, em função de sua semelhança cromatográfica, em 3 frações.

As frações F4 (10,8 mg) da CCA4, F2 (19,7 mg) da coluna Sephadex®3 e F8 (7,8 mg) da CLMP1-Aranhas foram reunidas e purificadas através de CLAE13 utilizando fase móvel MeOH. Foram obtidas 8 frações, sendo que a fração F7 é o composto denominado RB13 (4,1 mg).

As frações F3 (2,7 mg), F4 (9,5 mg) e F5 (1,8 mg) da CLAE13 foram reunidas e purificadas através de CLAE14 utilizando fase móvel MeOH:H₂O (9:1). Foram obtidas 8 frações, sendo que a fração F3 é o composto RB1 (2,5 mg) e a fração F6 é o composto RB6 (1 mg).

As frações F5 (4,8 mg) da CLMP1-Aranhas, F3 (3,7 mg) da CLMP2-Aranhas e F2 (4,2 mg) da CLMP3-Aranhas foram reunidas e purificadas através de CLAE15 utilizando fase móvel MeOH. Foram obtidas 4 frações, sendo que a fração F2 é o composto denominado RB10 (3 mg) e a fração F3 é o composto denominado RB11 (2,1 mg).

As frações F1 (8,6 mg), F2 (10,7 mg), F4 (4,9 mg) da Sephadex®5 e a fração F7 (4,5 mg) da CLMP3-Aranhas foram reunidas e purificadas através de CLAE16 utilizando fase móvel MeOH. Foram obtidas 10 frações, sendo que a fração F3 (4,6 mg) é a mistura dos compostos denominados RB14 e RB15.

As frações F2 (14,1 mg) da Sephadex®6, F2 (1,6 mg) da Sephadex®7 e a fração F9 (7,4 mg) da CLMP2-Aranhas foram reunidas e purificadas através de CLAE17 utilizando fase móvel MeOH. Foram obtidas 18 frações, sendo que a fração F4 (2,9 mg) é o composto denominado RB8 (2,9 mg) e a fração F5 (4,6 mg) é a mistura dos compostos denominados RB14 e RB15.

As frações F3 (4,6 mg) da CLAE16 e a fração F5 (4,6 mg) da CLAE17 foram reunidas e purificadas através de CLAE18 utilizando fase móvel MeOH:H₂O (98:2). Foram obtidas 14 frações, sendo que a fração F4 (2 mg) e a fração F5 (2,6 mg) são a mistura dos compostos denominados RB14 e RB15 e não foram separadas.

As frações F2 (3,1 mg) da CLAE16 e a fração F3 (2,9 mg) da CLAE17 foram reunidas e purificadas através de CLAE19 utilizando fase móvel MeOH:H₂O (98:2). Foram obtidas 16 frações, sendo que a fração F5 foi denominada RB14 (4,5 mg).

3.2.4 Ensaios biológicos *in vitro* das frações e substâncias isoladas

As frações e substâncias isoladas foram enviadas para avaliação quanto à atividade citotóxica em células tumorais (A549 e H460) ou células normais (Vero), atividade antiviral, antimicrobiana e antiprotozoária realizadas por grupos parceiros localizados na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Abaixo estão descritas, de forma sucinta, as metodologias empregadas.

3.2.4.1 Avaliação da atividade citotóxica e antiviral

Os estudos *in vitro* de atividade citotóxica frente a linhagens celulares tumorais e atividade anti-herpética foram realizados pelo grupo da Prof. Dr^a Cláudia Maria Oliveira Simões, vinculado aos PPGs em Farmácia e em Biotecnologia e Biociências.

3.2.4.1.1 Avaliação da atividade citotóxica

Para avaliação da citotoxicidade em linhagens tumorais de células não pequenas de tumor de pulmão humano (A549), carcinoma de derrame pleural de pulmão humano (H460), células normais (Vero) ou fibroblasto gengival saudável (FGH), o método utilizado foi o ensaio colorimétrico com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (MOSMANN, 1983).

Para a realização do ensaio, suspensões celulares foram distribuídas em placas de 96 cavidades e incubadas por 24 horas, a 37° C, em estufa de CO₂. Após 24 horas, o meio de cultivo foi substituído pelos diversos materiais-teste, em diferentes concentrações, e as placas foram incubadas por 72 horas. Em seguida, o meio de cada cavidade foi substituído por uma solução de MTT (1mg/mL) e as placas foram novamente incubadas por 4 horas. A solução de MTT foi removida e substituída por dimetilsulfóxido (DMSO) para dissolver os cristais de formazana. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro, a 540 nm, e os valores de absorbância medidos para cada concentração de cada material-teste foram transformados em porcentagens de viabilidade (X%), em relação aos controles celulares, considerados 100% viáveis. Os percentuais calculados referentes às diferentes concentrações das amostras foram inseridos em um gráfico e, através de análise de regressão não linear, foi possível calcular a CC₅₀, ou seja, a concentração de cada amostra que reduziu em 50% a viabilidade celular. Os valores de CC₅₀ calculados representam a média de três experimentos independentes e intervalo de confiança de 95%. Como controles positivos foram utilizados os fármacos paclitaxel, irinotecano e cisplatina. Foram calculados, também, a CI₅₀ que é a concentração que inibe 50% da proliferação celular e o índice de seletividade (IS). Onde $IS = CI_{50}$ das células saudáveis (FGH)/CI₅₀ das células tumorais (A549) ou (H460).

3.2.4.1.2 Avaliação da atividade antiviral

Na avaliação da atividade antiviral, primeiramente as amostras foram testadas para a detecção dos seus níveis de citotoxicidade em células Vero, através do ensaio do MTT, com cálculo dos valores de CC₅₀. Definidas as concentrações não tóxicas para este modelo celular, a potencial atividade antiviral das amostras foi avaliada frente ao vírus herpético do tipo 1 (HSV-1, cepa KOS e 29R) através do ensaio clássico de inibição da formação do número de placas de lise, com cálculo dos valores de CI₅₀ obtidos por análise de regressão não-linear. Com estes valores é realizado o cálculo do índice de seletividade ($IS=CC_{50}/CI_{50}$), que viabiliza a avaliação do potencial antiviral de cada amostra, relacionando a sua toxicidade com o perfil antiviral. Como controle positivo foi utilizado o fármaco de primeira escolha para tratamento de infecções herpéticas, o aciclovir.

3.2.4.2 Avaliação das atividades antibacteriana e antifúngica

Os estudos das atividades antibacteriana e antifúngica foram realizados pelo grupo do Prof. Dr. Flávio H. Reginatto, vinculado ao PPG em Farmácia.

Os microrganismos utilizados para esta avaliação foram *Clostridium sporogenes* (ATCC 11437), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 49619), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), *Enterobacter cloacae* (ATCC 13047), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Shigella flexneri* (ATCC 12022), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Candida tropicalis* (ATCC 13803).

A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de difusão em disco. Resumidamente, discos de filtro de papel (6 mm) foram impregnados com 20 µL das soluções estoque das amostras (100 mg/mL, DMSO) e colocados sobre placas de ágar Muller-Hinton (HIMEDIA®), que foram inoculadas com os microrganismos teste de acordo com protocolo padrão descrito pelo Clinical Laboratory Standard Institute. As placas foram então incubadas a 35 ± 1 °C e após 18 horas os diâmetros das zonas de inibição foram medidas. Discos de papel contendo apenas DMSO foram utilizados como controle negativo. Controles positivos foram selecionados de acordo com a sensibilidade dos microrganismos testados. Ampicilina (10 µg), oxacilina (1 µg), ceftazidima (30 µg), imipeném (10 µg), cloranfenicol (30 µg), levofloxacino (5 µg), doxacilina (30 µg) e fluconazol (25 µg) foram utilizados.

3.2.4.3 Avaliação da atividade antiprotozoária

A investigação *in vitro* das atividades antileishmania e antitripanossoma foi realizada em parceria com o Laboratório de Protozoologia, sob supervisão do professor Dr. Mário Steindel, vinculado ao Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFSC.

A atividade antiprotozoária foi realizada com as cepas de *Leishmania amazonensis* e de *Trypanosoma cruzi* transfectadas com o gene da beta-galactosidase.

As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (4×10^6 parasitos /mL) do 4º dia de cultivo foram incubadas em meio RPMI-1640 suplementado com soro humano AB+ inativado por calor durante uma hora, a 34 °C, para opsonização do parasito. A seguir, os parasitos foram adicionados às monocamadas de células na proporção de 5:1 parasitas/célula.

Para *Trypanossoma cruzi*, tripomastigotas de cultura celular foram adicionados às monocamadas de células na proporção de 3:1 parasitos/célula por 3 horas. As monocamadas infectadas foram cultivadas por 24 horas e adicionadas às amostras em diferentes concentrações e as células cultivadas por 72 horas a 34 °C para *L. amazonensis* e 37 °C para *T. cruzi*.

A anfotericina B e o benzonidazol foram utilizados como controle positivo para as atividades antileishmania e antitripanossoma, respectivamente. DMSO 1% foi empregado como controle negativo. Após a incubação, o sobrenadante foi removido e acrescentado tampão salino fosfato (PBS) contendo clorfenol vermelho- β -D-galactopiranosídeo (CPRG) e NP-40(Nonidet P-40). Os resultados são expressos por % de inibição do crescimento dos parasitas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

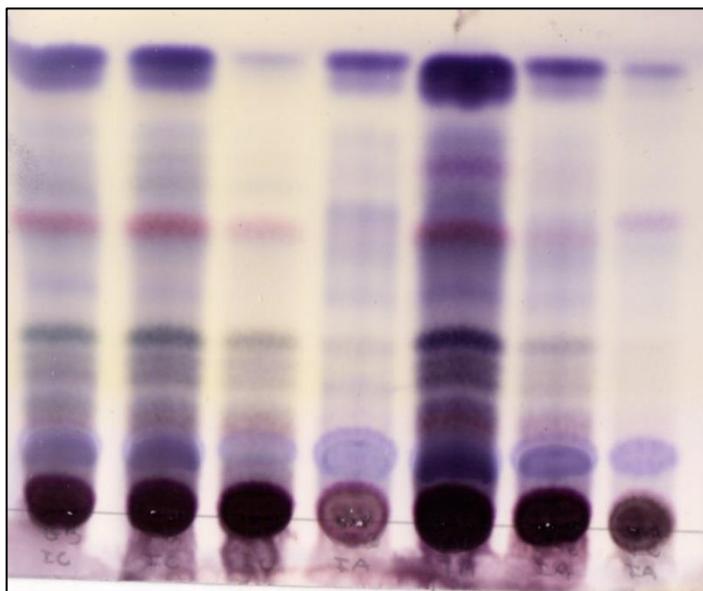
4.1 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS EXTRATOS E DAS FRAÇÕES DA ESPONJA *Raspailia bouryesnaultae*

Os extratos brutos e frações obtidos das amostras da esponja *Raspailia bouryesnaultae*, coletada na Ilha do Coral em maio de 2014 e na Ilha das Aranhas em maio de 2016, foram submetidos à análise cromatográfica por CCD, para avaliação do perfil químico dos mesmos.

Na inspeção do perfil cromatográfico dos extratos e frações, verificou-se a maior diversidade química nas frações hexânicas, tanto na amostra coletada na Ilha do Coral quanto na amostra coletada na Ilha das Aranhas. Dessa forma, a fração hexânica foi selecionada para o isolamento dos compostos que a compõem, nas duas coletas.

As frações hexânicas, da amostra coletada na Ilha do Coral (IC/FH) e da amostra coletada na Ilha das Aranhas (IA/FH) podem ser observadas na Figura 18.

Figura 18: Cromatograma dos extratos e frações da esponja *Raspailia bouryesnaultae* coletada na Ilha do Coral (IC) e na Ilha das Aranhas (IA).



IC/EB IC/FH IC/FE IA/EB IA/FH IA/FAE IA/FE

Fonte: Cromatograma dos extratos brutos e das frações da esponja *Raspailia bouryesnaultae*. Fase móvel: hexano:acetato de etila (8:2). Revelador: anisaldeído-sulfúrico sob aquecimento (100 °C).

IC/EB = extrato bruto da amostra coletada na Ilha do Coral;

IC/FH = fração hexânica da amostra coletada na Ilha do Coral;

IC/FE = fração etanólica da amostra coletada na Ilha do Coral;

IA/EB = extrato bruto da amostra coletada na Ilha das Aranhas;

IA/FH = fração hexânica da amostra coletada na Ilha das Aranhas;

IA/FAE = fração acetato de etila da amostra coletada na Ilha das Aranhas;

IA/FE = fração etanólica da amostra coletada na Ilha das Aranhas.

4.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS FRAÇÕES

4.2.1 Triagem biológica das frações da esponja *Raspailia bouryesnaultae* coletada na Ilha do Coral (2014)

Com as frações hexânica (RBH) e etanólica (RBE) da esponja *Raspailia bouryesnaultae* coletada na Ilha do Coral, foram realizadas as triagens da atividade antitripanossoma, da atividade citotóxica frente às linhagens A549 e FGH e da atividade antiviral frente às cepas KOS e 29R do vírus *Herpes simplex* tipo 1.

Para a atividade antitripanossoma, ambas as frações apresentaram resultados promissores (maior que 50%) para inibição do crescimento de *Trypanossoma cruzi* (Tabela 3).

Tabela 3: Triagem antitripanossoma das frações da esponja *Raspailia bouryesnaultae* coletada na Ilha do Coral.

Amostra	% Inibição para <i>Trypanossoma cruzi</i>
RBE	97,64% ($\pm 0,16$)
RBH	78,78% ($\pm 1,14$)

Triagem realizada na concentração 50 $\mu\text{g/mL}$. Resultados expressos em percentual de inibição \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

Para a atividade citotóxica frente à linhagem de célula tumoral A549, as frações não apresentaram resultados promissores, em vista da baixa seletividade observada (Tabela 4).

Tabela 4: Efeitos antiproliferativos das frações da esponja *Raspailia bouryesnaultae* coletada na Ilha do Coral em linhagem celular tumoral e não tumoral após 48 horas de experimento.

	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) $\pm DP$ 48 horas		
	FGH	A549	IS
RBH	>500	219,24 \pm 43,14	>2,28
RBE	>125	99,43 \pm 8,53	>1,25

FGH: Fibroblasto gengival humano saudável; A549: células não pequenas de tumor de pulmão; CI_{50} : concentração que inibe 50% da proliferação celular; IS: índice de seletividade = CI_{50} das células saudáveis (FGH)/ CI_{50} das células

tumorais (A549). Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Para a atividade anti-herpética a fração etanólica apresentou resultados promissores frente às cepas KOS (42,33±13,79 e IS 4,3) e 29R (41,56±15,14 e IS 4,4) do vírus HSV-1 (Tabela 5).

Tabela 5: Efeitos antiproliferativos das frações da esponja *Raspailia bouryesnaultae* coletada na Ilha do Coral em células VERO e atividade antiviral frente ao vírus HSV-1 (cepas KOS e 29R) após 48 horas de experimento.

	CI₅₀(µg/mL) ± DP				
	48 horas				
	Células VERO	HSV-1 Cepa KOS	IS KOS	HSV-1 Cepa 29R	IS 29R
RBH	68,32±24,45	>100	-	>100	-
RBE	183,14±39,08	42,33±13,79	4,3	41,56±15,14	4,4

VERO: Fibroblasto de rim de macaco verde da África; CI₅₀: concentração que inibe 50% da replicação viral e/ou celular; IS: Índice de Seletividade= CI₅₀ proliferação celular/ CI₅₀ replicação viral. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes.

4.2.2 Triagem biológica das frações da esponja *Raspailia bouryesnaultae* coletada na Ilha das Aranhas (2016)

Com as frações hexânica (RBH), acetato de etila (RBAE) e etanólica (RBE) da esponja *Raspailia bouryesnaultae* coletada na Ilha das Aranhas, foram realizadas as triagens da atividade citotóxica frente às linhagens A549, H460 e Vero, da atividade antiviral frente às cepas KOS e 29R do vírus *Herpes simplex* tipo 1 e da atividade antiprotozoária para *Trypanossoma cruzi* e *Leishmania amazonensis*.

A avaliação da atividade citotóxica frente às linhagens de células tumorais A549 e H460, novamente não apresentou resultados promissores (Tabela 6).

Tabela 6: Efeitos antiproliferativos das frações da esponja *Raspailia bouryesnaultae* coletada na Ilha das Aranhas, em duas linhagens celulares tumorais e não tumoral após 48 horas de experimento pelo método da Sulforrodamina B.

	CI ₅₀ (µg/mL)			IS	
	Intervalo de confiança 95%				
	H460	A549	VERO	H460	A549
RBH	95,19 (58,7 a 154,3)	89,32 (55,6 a 143,3)	156,9 (88,9 a 206,9)	1,64	1,84
RBAE	80,27 (45,4 a 111,8)	67,22 (34,6 a 100,4)	161,9 (88,9 a 206,9)	2,01	2,40
RBE	>500	>500	>500	-	-

Células VERO: Fibroblasto de rim de macaco verde da África; células H460: carcinoma de derrame pleural de pulmão humano; células A549: células não pequenas de pulmão humano. CI₅₀: concentração que inibe 50% da proliferação celular; IS: índice de seletividade = CI₅₀ das células saudáveis/CI₅₀ das células tumorais (A549 ou H460). Os resultados são representativos de dois experimentos independentes.

Para a atividade anti-herpética, tanto a fração etanólica quanto a fração acetato de etila apresentaram resultados promissores: a fração etanólica apresentou resultados positivos para porcentagem de inibição das cepas KOS (92,45±8,60) e 29R (100) frente ao vírus HSV-1 e a fração acetato de etila, apesar de testada em concentração baixa, apresentou percentual de inibição próximo a 50% para a cepa 29R (47,17±2,98) do vírus HSV-1 (Tabela 7).

Tabela 7: Atividade anti-herpética das frações da esponja *Raspailia bouryesnaultae* coletada na Ilha das Aranhas, frente ao vírus HSV-1 (cepas KOS e 29R) após 48 horas de experimento.

Amostra	Concentração testada (µg/mL)	Porcentagem de inibição (%)	
		KOS	29R
RBH	100	25,34±3,21	32,08±7,56
RBAE	25	20,54±3,52	47,17±2,98
RBE	100	92,45±8,60	100

Os dados foram expressos em porcentagem de inibição da replicação viral em relação ao controle viral. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes.

Na avaliação da atividade antitripanossoma, a fração acetato de etila inibiu mais de 50% ($90,49 \pm 0,44$) do crescimento do parasita *Trypanossoma cruzi* (Tabela 8).

Tabela 8: Triagem das frações da esponja *Raspailia bouryesnaultae* coletada na Ilha das Aranhas, utilizando tripomastigotas intracelulares de *Trypanossoma cruzi* expressando β -galactosidase.

Extrato (50 $\mu\text{g/mL}$)	% Inibição de crescimento <i>T. cruzi</i> - $\mu\text{g/mL}$	CI ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	CC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	IS
RBH	$9,22 \pm 1,08$	-	-	-
RBAE	$90,49 \pm 0,44$	$18,96 \pm 0,97$	-	3,4
RBE	$14,33 \pm 1,83$	-	-	-

Na avaliação da atividade antileishmania observou-se baixa atividade para a fração hexânica ($4,97 \pm 0,03$) (Tabela 9).

Tabela 9: Triagem das frações da esponja *Raspailia bouryesnaultae* coletada na Ilha das Aranhas, utilizando tripomastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis* expressando β -galactosidase.

Extrato (50 $\mu\text{g/mL}$)	% Inibição de crescimento <i>L. amazonensis</i> - $\mu\text{g/mL}$	CI ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	CC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	IS
RBH	$4,97 \pm 0,03$	-	-	-
RBAE	S/A	-	-	-
RBE	S/A	-	-	-

S/A: sem atividade.

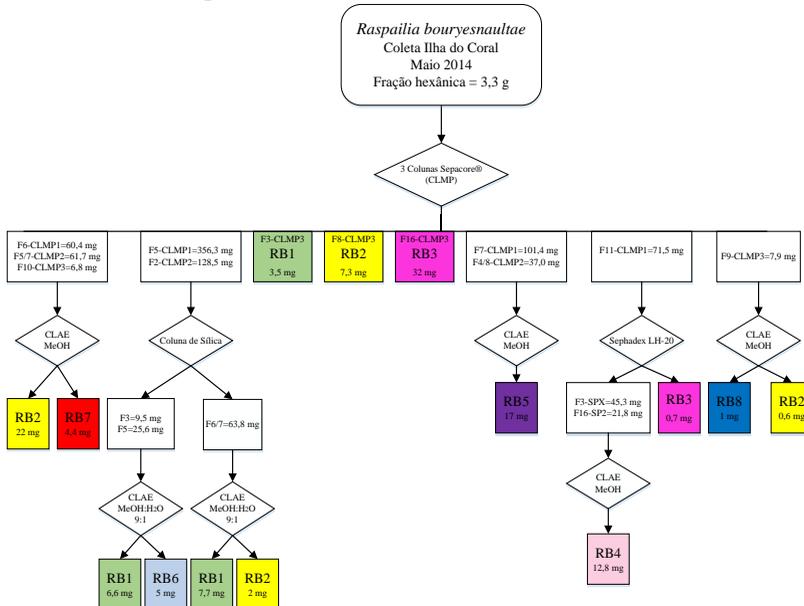
4.3 ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS DA ESPONJA *Raspailia bouryesnaultae*

Tendo em vista a maior diversidade química sugerida pela análise CCD para a fração hexânica e considerando também os resultados biológicos da atividade antitripanossoma para o material da Ilha do Coral, essa fração foi selecionada para os processos de isolamento.

4.3.1 Isolamento dos compostos da esponja *Raspailia bouryesnaultae* coletada na Ilha do Coral em maio de 2014

A partir do material coletado na Ilha do Coral, foi possível o isolamento de oito compostos. O fluxograma da Figura 19 sumariza os processos de fracionamento, detalhado na parte Métodos (item 3.2.3.1), bem como os rendimentos obtidos. Na Figura 20, realizada posteriormente aos processos de isolamento e elucidação, é apresentada uma comparação cromatográfica desses compostos.

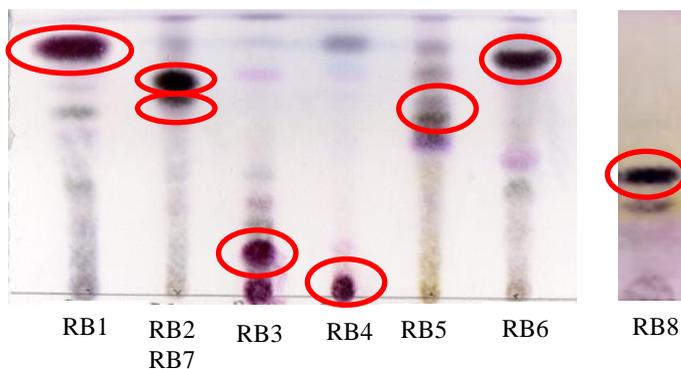
Figura 19: Fluxograma do fracionamento da fração hexânica para obtenção dos compostos RB1, RB2, RB3, RB4, RB5, RB6, RB7 e RB8.



SPX = coluna Sephadex LH-20.

CLAE = coluna líquida de alta eficiência.

Figura 20: Cromatograma das frações contendo os compostos que foram isolados da esponja *Raspailia bouryesnaultae*.

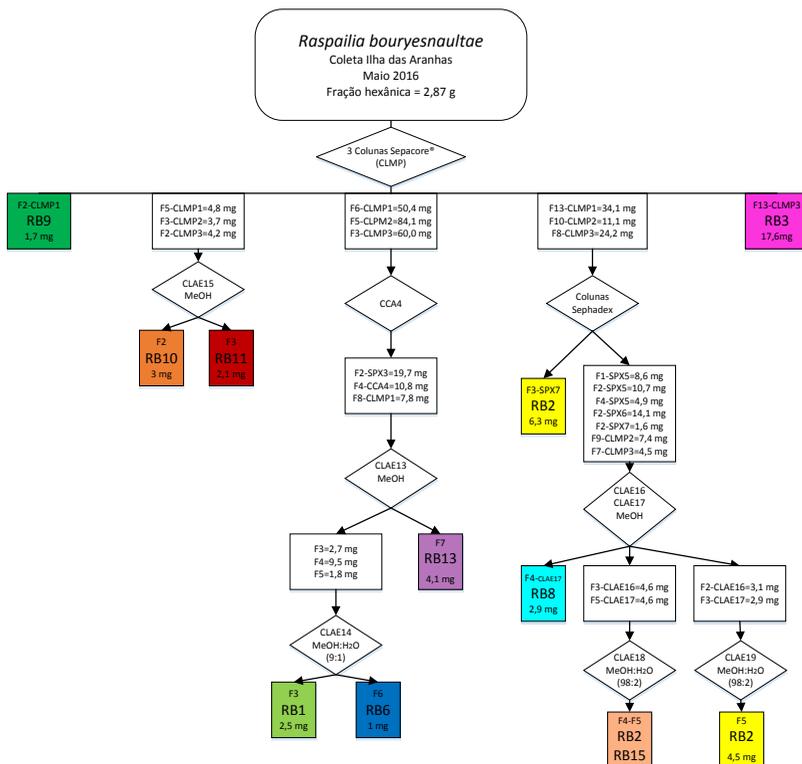


Fase móvel: hexano:ACOEt (8:2). Revelador: anisaldeído-sulfúrico sob aquecimento (100 °C).

4.3.2 Isolamento dos compostos da esponja *Raspailia bouryesnaultae* coletada na Ilha das Aranhas em maio de 2016

A partir do material coletado na Ilha das Aranhas foi possível o isolamento de nove compostos, tendo em vista que após análises espectroscópicas detalhadas, que serão apresentadas na elucidação estrutural, verificou-se que os compostos denominados RB12 e RB14 são o mesmo composto (= RB2). O fluxograma da Figura 21 sumariza os processos de fracionamento, detalhado na parte Métodos (ítem 3.2.3.2), bem como os rendimentos obtidos. Na Figura 22 é apresentada uma comparação cromatográfica desses compostos.

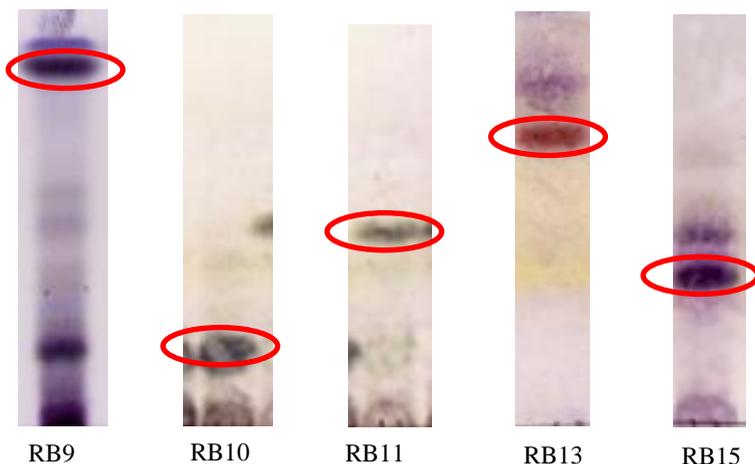
Figura 21: Fluxograma do fracionamento da fração hexânica para obtenção dos compostos RB1, RB2, RB3, RB6, RB8, RB9, RB10, RB11 e RB13.



SPX = coluna Sephadex LH-20.

CLAE = coluna líquida de alta eficiência.

Figura 22: Cromatograma das frações contendo os compostos que foram isolados da esponja *Raspailia bouryesnaultae*.



Fase móvel: hexano:ACOEt (8:2). Revelador: anisaldeído-sulfúrico sob aquecimento (100 °C).

4.4 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPOSTOS ISOLADOS

Os compostos isolados foram submetidos a análises espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) mono e bidimensional, com o objetivo de serem identificados ou terem suas estruturas químicas elucidadas.

Os dados obtidos através de RMN foram processados em software TopSpin 3.1, licenciado pela Bruker® e as informações obtidas através dos espectros de RMN foram analisadas e comparadas com dados disponíveis na literatura.

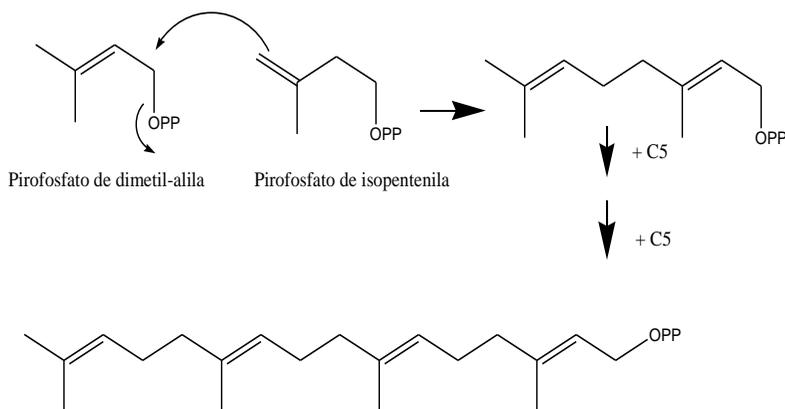
Após análise de ^1H RMN e comparação com a literatura disponível para o gênero *Raspailia*, verificou-se que os doze compostos isolados da esponja marinha *Raspailia bouryesnaultae* pertencem à classe dos terpenos, especificamente do tipo diterpeno clerodano.

Os terpenos representam uma grande classe de produtos naturais com muitas funções biológicas. A característica comum dos terpenos é o fato de todos eles serem construídos por unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno), chamadas de unidades isoprenóides (TORSSSELL, 1983). Dependendo do número de unidades isoprenóides na estrutura, os terpenos são classificados em monoterpeno (2 unidades), sesquiterpeno

(3 unidades), diterpeno (4 unidades), triterpeno (6 unidades), tetraterpeno (8 unidades) e politerpeno (maior número de unidades).

Os diterpenos por sua vez, derivam biogeneticamente do pirofosfato de geranilgeranila e possuem esqueleto básico com vinte átomos de carbono, decorrente do encadeamento cabeça-cauda de quatro unidades isoprenóides (RAMAWAT; MERILLON, 2013; TORSSELL, 1983)(Figura 23).

Figura 23: Formação de diterpenos.



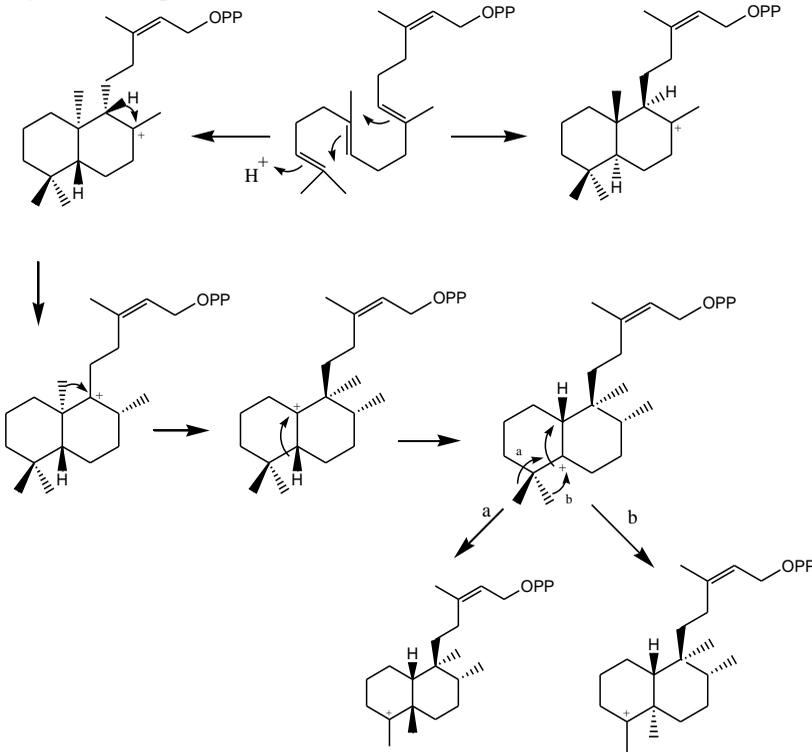
PIROFOSFATO DE GERANIL GERANILA

Fonte: adaptado de Torszell, 1983.

Os diterpenos do tipo clerodano integram uma classe de diterpenos bicíclicos cujo nome genérico deriva da clerodina, que foi o primeiro diterpeno do tipo clerodano, isolado da árvore *Clerodendron infotunatum* (MACIEL *et al.*, 2006).

Biossinteticamente, os diterpenos do tipo clerodano estão relacionados ao esqueleto do labdano, formando-se através de rearranjos que envolvem migrações consecutivas de hidreto e metila (MERRITT; LEY, 1992) (Figura 24).

Figura 24: Esquema de formação dos clerodanos.

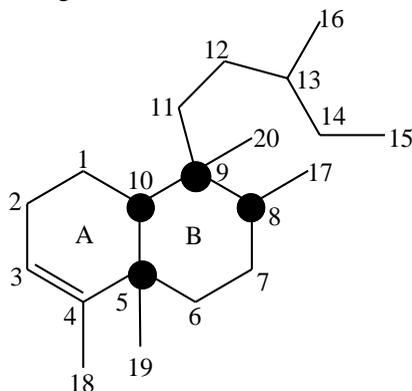


Fonte: adaptado TOKOROYAMA, 2000.

De acordo com Akhila e seus colaboradores, os *trans* clerodanos são obtidos por migração da metila na posição 19 e os *cis* clerodanos por migração da metila na posição 18 (AKHILA *et al.*, 1991).

Geralmente, os novos terpenos recebem nomes triviais e o emprego de prefixos é bastante comum, como *ent*, *seco* e *nor*. *Ent* aponta inversão em todos os centros quirais, *seco* quebra de alguma ligação do esqueleto anelar e *nor* assinala um carbono a menos na estrutura (TOKOROYAMA, 2000). A Figura 25 apresenta o esqueleto básico dos diterpenos do tipo clerodano.

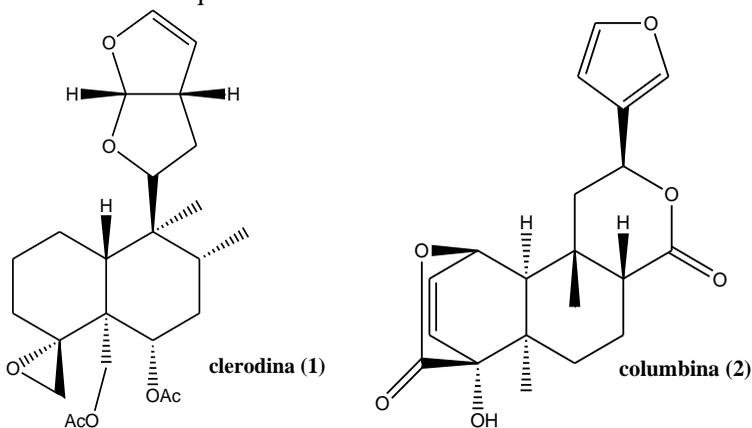
Figura 25: Estrutura básica dos diterpenos clerodanos, com destaque para os centros estereogênicos.



Estruturalmente, os diterpenos do tipo clerodano possuem quatro centros estereogênicos em um esqueleto decalínico (Figura 25). Por conta desses centros estereogênicos, as configurações dos diterpenos do tipo clerodano podem ser:

- ✓ *cis* ou *trans* em relação a fusão dos anéis A/B da decalina, sendo que 75% dos diterpenos do tipo clerodano isolados de produtos naturais são *trans*, como a clerodina(1) e 25% são *cis*, como a columbina(2);
- ✓ *cis* ou *trans* em relação aos grupos conectados em C-8 e C-9 (LI; MORRIS-NATSCHKE; KUO-HSIUNG, 2016).

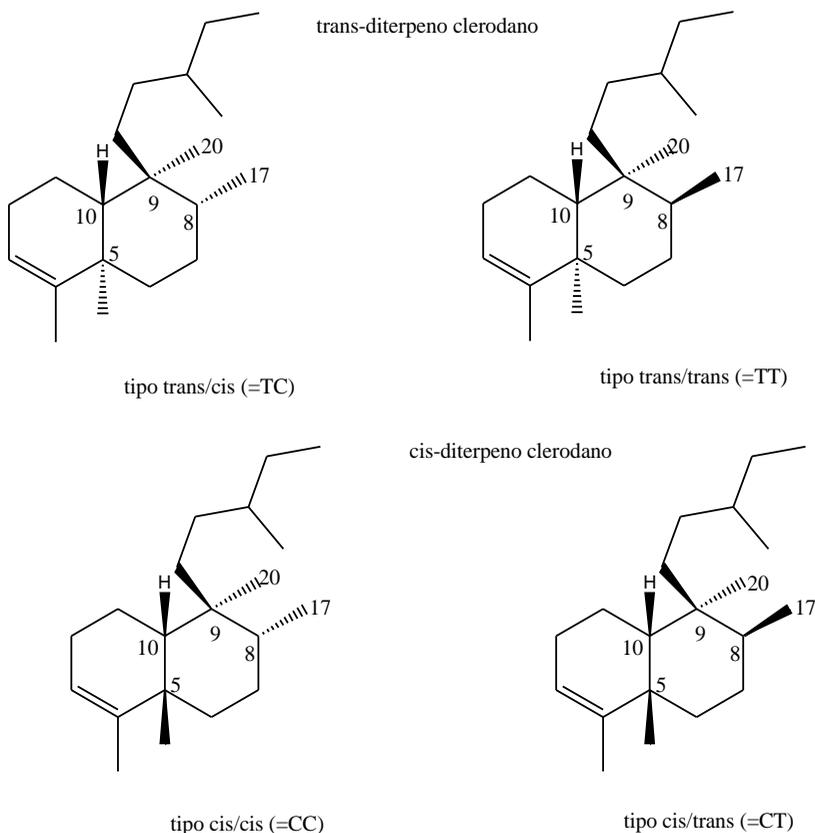
Figura 26: Estruturas químicas da clerodina e da columbina.



Fonte: adaptado de (LI; MORRIS-NATSCHKE; KUO-HSIUNG, 2016).

Dessa forma, são definidos quatro tipos de esqueletos clerodanos, como mostra a Figura 27.

Figura 27: Variedade estereoquímica em diterpenos do tipo clerodano.



Fonte: adaptado LI *et al.*, 2016.

Durante o processo de identificação e elucidação estrutural a pesquisa bibliográfica mostrou-se primordial, tendo em vista que algumas correlações importantes não apareciam nos espectros de HSQC para o composto RB1, especialmente as correlações HSQC relacionadas ao anel furano. Entretanto, na revisão bibliográfica referente ao gênero *Raspailia*, verificou-se que compostos químicos com dados de RMN similares aos obtidos para a esponja *Raspailia bouryesnaultae*, já haviam sido isolados de esponja *Raspailia sp.*, coletada e estudada na

Nova Zelândia. Desta forma, após analisar os dados obtidos por RMN, foi possível elucidar a estrutura de seis dos doze compostos isolados.

Os demais compostos isolados não puderam ser elucidados devido à degradação dos mesmos. No decorrer das análises de RMN os compostos foram estocados em CDCl_3 por períodos de tempo variados, em função da disponibilidade de equipamento ou necessidade de medidas adicionais. Contudo, ao longo do trabalho constatou-se que os compostos isolados são instáveis quando em solução de CDCl_3 . Pesquisando literatura científica disponível para diterpenos do tipo clerodano, verificou-se que Williams e colaboradores (2007) mostraram que todos os compostos estocados em CDCl_3 , por períodos de tempo variáveis, lentamente hidrolisam para seus dialdeídos correspondentes que, por sua vez, são instáveis. Por conseguinte, presumem que a hidrólise ocorre devido a presença de traços de ácido no CDCl_3 usado na ocasião, visto que a hidrólise não ocorreu em presença de CDCl_3 em amostras realizadas de imediato.

Santos e colaboradores (2010) descreveram o mesmo problema de degradação com os diterpenos do tipo clerodano que estavam sendo estudados pelo seu grupo de pesquisa. Com o objetivo de comprovar se CDCl_3 era realmente responsável pela degradação dos compostos, estocaram um dos compostos em diferentes solventes deuterados (clorofórmio, DMSO, acetona, metanol e piridina) durante um mês. A degradação foi detectada somente na amostra estocada em CDCl_3 .

No caso dos diterpenos da esponja *Raspailia bouryeseaultae*, em razão da degradação das amostras, não foi possível obter espectros de RMN adicionais para concluir a elucidação de alguns dos compostos isolados. Também não puderam ser feitas análises de UV, IV, EM e as atividades biológicas dos compostos isolados RB6 a RB13.

Os compostos foram isolados na ordem em que estão numerados, de RB1 a RB13. Entretanto, para fins didáticos o composto denominado RB3 será o primeiro a ser apresentado, uma vez que revelou ser um composto já descrito na literatura e sua estrutura química serviu de base para a identificação ou elucidação estrutural dos demais compostos isolados.

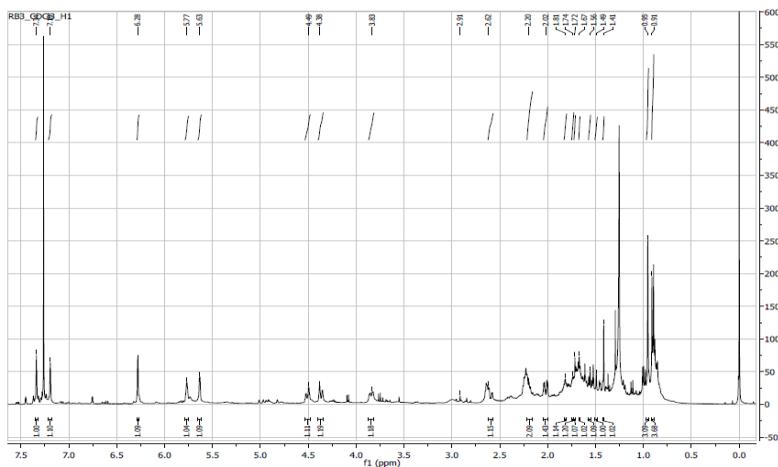
4.4.1 Composto RB3

O composto denominado RB3 foi isolado da fração hexânica tanto da amostra coletada na Ilha do Coral (32,7 mg) quanto da amostra coletada na Ilha das Aranhas (17,6 mg) como um óleo de coloração amarelada e ao todo foram obtidos 50,3 mg. Entretanto, para as análises

espectroscópicas essas quantidades não foram reunidas, tendo em vista degradação ocorrida nas amostras.

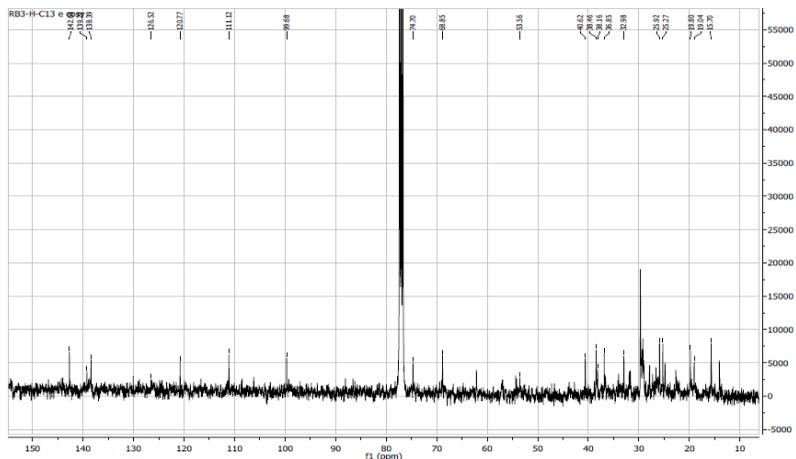
O espectro ^1H RMN (Figura 28) apresenta sinais em δ 7,33 (1H, t, $J=1,6$ Hz), δ 7,19 (1H, s) e δ 6,27 (1H, s) com deslocamentos químicos característicos dos três hidrogênios de anel furano monossustituído. O sinal em δ 5,76 (1H, sl) indica a presença de metino olefínico e em δ 3,84 (1H, m) exibe deslocamento químico característico de hidrogênio próximo a um grupo eletronegativo. Em δ 5,64 aparece um metino (1H, s) com deslocamento químico compatível a hidrogênio vizinho a átomos eletronegativos. Observam-se outros dois sinais de hidrogênios vizinhos a elemento eletronegativo em δ 4,48 (1H, m) e δ 4,38 (1H, dq $J=11,70$; 1,9). Os sinais em δ 0,95 (3H, s) e 0,91 (3H, d, $J=6,8$ Hz) correspondem a metilas, de acordo com a integração. O desdobramento da metila em δ 0,91 indica acoplamento vicinal com hidrogênio metínico. Além destes, observa-se uma série de sinais na região entre δ 1,00-3,00, relativos a hidrogênios de grupos CH e CH_2 .

Figura 28: Espectro de ^1H RMN do composto RB3 (400 MHz, CDCl_3).



O espectro de ^{13}C RMN (Figura 29) apresenta 20 carbonos, na região espectral compreendida entre δ 15,7 e δ 142,6. O sinal em δ 74,6 indica proximidade a elemento eletronegativo. Os sinais em δ 142,6, 138,3 e δ 111,1 são característicos de metinos olefínicos pertencentes ao anel furano, enquanto que o sinal em δ 120,7 indica a presença de outro carbono olefínico.

Figura 29: Espectro de ^{13}C RMN do composto RB3 (100 MHz, CDCl_3).



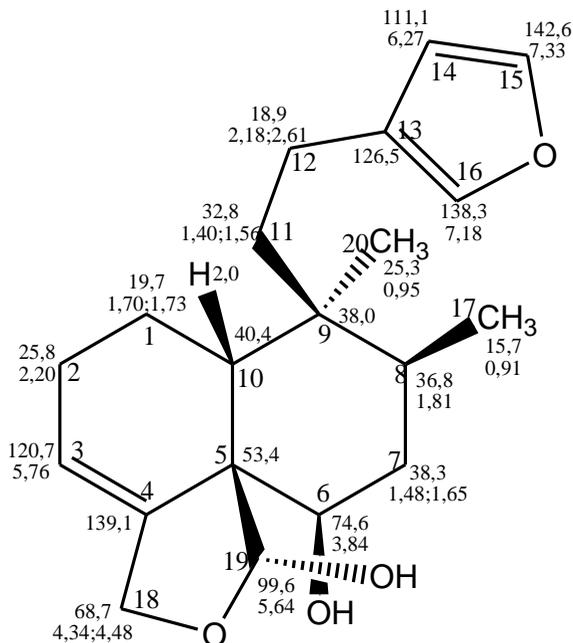
Consultando a bibliografia disponível sobre o gênero *Raspailia*, constatou-se que os deslocamentos químicos nos espectros de ^{13}C RMN e de ^1H RMN do composto RB3 são semelhantes aos deslocamentos químicos dos espectros de ^{13}C RMN e ^1H RMN do raspailol, um diterpeno do tipo clerodano. O raspailol foi isolado pela primeira vez da esponja *Raspailia sp* coletada e estudada na Nova Zelândia (WEST; NORTHCOTE; BATTERSHILL, 1998).

A tabela 10 mostra os deslocamentos químicos de ^1H RMN e ^{13}C RMN do raspailol e da substância RB3, indicando tratar-se daquela estrutura. Destaca-se a estereoquímica *cis* nos elementos conectados aos carbonos 5 e 10 entre os anéis decalina e a posição *trans* das metilas 17 e 20, conectadas aos carbonos 8 e 9 (Figura 30). Portanto, o raspailol é um diterpeno clerodano do tipo *cis-trans* (CT). Dessa forma, conclui-se que o composto RB3 é o raspailol, cuja fórmula molecular é $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_4$ revelando a presença de sete insaturações na molécula.

Tabela 10: Comparação dos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C RMN do raspailol e do composto RB3.

	Raspailol (300 MHz; CDCl_3) <i>West et al, 1998</i>		RB3 (400 MHz; CDCl_3)	
	δ ^1H (mult., J Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H (mult., J Hz)	δ ^{13}C
1	1,73 (m)	19,7	1,73 (m)	19,7
	1,60 (m)		1,70 (m)	
2	2,20 (m)	25,8	2,20 (m)	25,8
3	5,76 (m)	120,7	5,76 (m)	120,7
4	---	139,1	---	139,1
5	---	53,4	---	53,4
6	3,84(ddd,11,8; 8,7; 3,8)	74,7	3,84 (m)	74,6
7	1,66 (dt, 13,3; 3,6)	38,3	1,65 (m)	38,3
	1,48 (q, 13,8)		1,48 (m)	
8	1,80 (m)	36,8	1,81 (m)	36,8
9	---	38,0	---	38,0
10	2,00 (dd, 13,2; 3,3)	40,4	2,03 (dd, 13,2; 3,1)	40,4
11	1,54 (td, 13,3; 3,5)	32,8	1,56 (m)	32,8
	1,38 (td, 12,9; 3,8)		1,40 (m)	
12	2,60 (td, 13,6; 3,5)	18,9	2,61(td,12,9; 3,3)	18,9
	2,17 (m)		2,18 (m)	
13	---	126,4	---	126,5
14	6,28 (dd, 1,7; 0,8)	111,1	6,27 (s)	111,1
15	7,33 (t, 1,7)	142,6	7,33 (t, 1,6)	142,6
16	7,19 (s)	138,3	7,18 (s)	138,3
17	0,90 (d, 6,9)	15,7	0,91 (d, 6,8)	15,7
18	4,48 (dq, 11,7; 2,3)	68,7	4,48 (m)	68,7
	4,35 (dq, 11,6; 1,8)		4,38 (dq, 11,7; 1,9)	
19	5,62 (d, 2,7)	99,6	5,64 (d, 2,6)	99,6
20	0,95 (s)	25,2	0,95 (s)	25,3
6 OH	2,98 (d, 8,7)		2,92 (d, 5,4)	

Figura 30: Estrutura do composto RB3 (raspailol).



7-[2-(3-furanil)-etil]- (6aR,7S,8S,10R,10aR)-7,8-dimetil -
3,5,6,6a,7,8,9,10-octahidro-naftaleno-(1,8a-c)-furano-1,10-diol

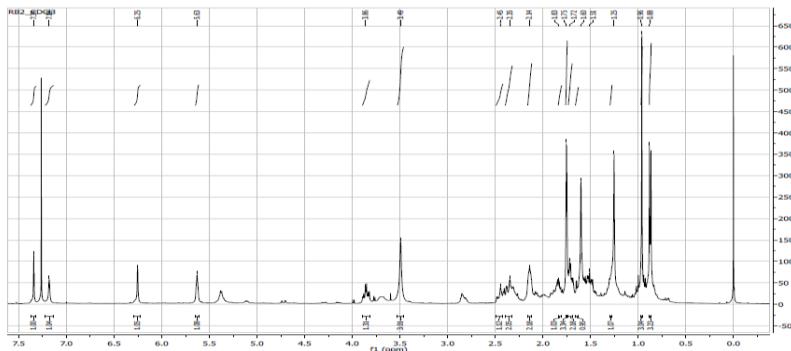
4.4.2 Composto RB2

O composto denominado RB2 foi isolado de diferentes frações da fração hexânica tanto da amostra coletada na Ilha do Coral (31,9 mg), quanto da amostra coletada na Ilha das Aranhas (10,8 mg). Foi obtido na forma de óleo de coloração amarelada, resultando 42,7 mg.

O espectro ^1H RMN (Figura 31) apresenta sinais em δ 7,35 (1H, t, $J=1,6$ Hz), δ 7,19 (1H, s) e δ 6,27 (1H, s), com deslocamentos químicos característicos dos três hidrogênios de anel furano monossustituído. O sinal em δ 5,64 (1H, sl) indica a presença de metino olefínico e o sinal em δ 3,87 (1H, td, $J=11,8; 4,7$ Hz) apresenta deslocamento químico compatível com metino próximo a elemento eletronegativo. Dois singletos relativos a grupos metila aparecem em δ 1,76 (3H) e δ 0,97(3H), bem como um singlete de metoxila em δ 3,51 (3H). Em δ 0,88 (3H, d, $J=6,5$ Hz) o desdobramento da metila indica acoplamento vicinal

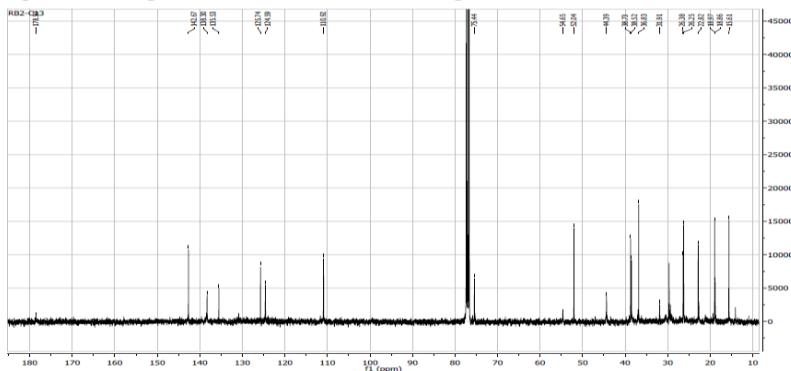
com hidrogênio metínico. Além destes, observa-se uma série de sinais na região entre δ 1,00 – 3,00, relativos a hidrogênios de grupo metino (CH) e grupo metileno (CH₂).

Figura 31: Espectro de ¹H RMN do composto RB2 (400 MHz, CDCl₃).



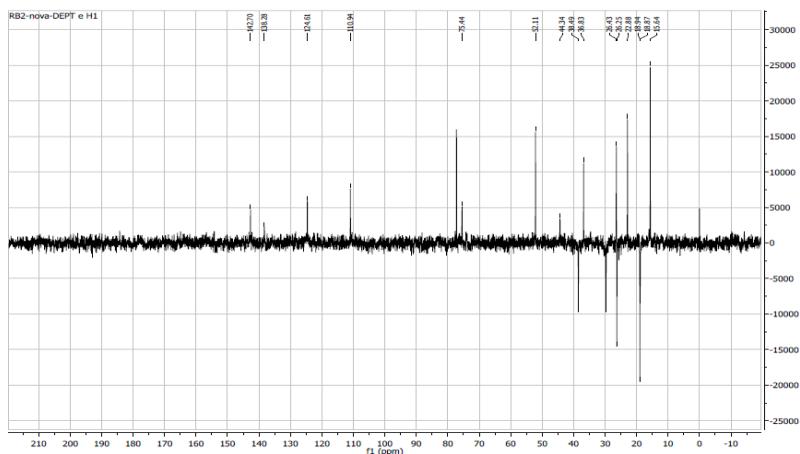
O espectro de RMN de ¹³C (Figura 32) apresenta 21 sinais de carbono na região espectral compreendida entre δ 15,7 e δ 178,5, sendo que o carbono em δ 178,5 tem deslocamento químico compatível com função éster, enquanto que o carbono em δ 75,5 tem deslocamento químico característico de carbono próximo a elemento eletronegativo. Os sinais em δ 142,7, 138,3 e δ 110,9 são característicos de metinos olefínicos pertencentes ao anel furano, enquanto que o sinal em δ 124,8 indica a presença de outro carbono olefínico.

Figura 32: Espectro de ¹³C RMN do composto RB2 (100 MHz, CDCl₃).



O padrão de hidrogenação correspondente aos átomos de carbono foi determinado através do espectro DEPT 135: observou-se que a estrutura do composto RB2 é formada por 7 carbonos metínicos (CH), 5 carbonos metilênicos (CH₂) e 4 carbonos metílicos (CH₃), estando um destes localizado na região espectral de carbono ligado a elemento eletronegativo, possivelmente oxigênio com absorção em δ 52,0. A subtração dos sinais do espectro de ¹³C pelos sinais do espectro de DEPT 135 revelou a presença de 5 carbonos quaternários na molécula do composto RB2 (Figura 33). Dessa forma, pode-se deduzir a fórmula molecular C₂₁H₃₀O₄, que indica sete insaturações na molécula.

Figura 33: Espectro DEPT 135 do composto RB2 (100 MHz, CDCl₃).



Através do espectro bidimensional de correlação heteronuclear ¹H-¹³C (HSQC) foi possível associar os sinais de hidrogênios aos seus respectivos carbonos. Com os dados obtidos no espectro de HMBC, confirmou-se que ao carbono em δ 138,3 (correlação HMBC com os hidrogênios δ 6,27 e δ 7,35) conecta-se o hidrogênio em δ 7,19 e ao carbono em δ 142,7 (correlação com os hidrogênios δ 6,27 e δ 7,19) conecta-se o hidrogênio em δ 7,35 (Tabela 11).

Tabela 11: Dados obtidos através dos espectros de RMN do composto RB2 (300 MHz; CDCl₃).

RB2				
	δ ¹H	HSQC	DEPT 135	HMBC
1	1,73 1,52	19,1	CH ₂	
2	2,16 2,16	26,5	CH ₂	
3	5,64	124,8	CH	1,76
4	---	135,5	C	1,76
5	---	54,6	C	1,76
6	3,87	75,5	CH	
7	1,73 1,62	38,8	CH ₂	
8	1,83	36,8	CH	0,88/0,97
9	---	38,7	C	
10	2,36	44,4	CH	0,97
11	1,52 1,26	32,1	CH ₂	
12	2,45 2,36	18,9	CH ₂	0,97
13	---	125,7	C	7,35/7,19/6,27
14	6,27	110,9	CH	7,35/7,19
15	7,35	142,7	CH	7,19/6,27
16	7,19	138,3	CH	7,35/6,27
17	0,88	15,7	CH ₃	
18	1,76	22,8	CH ₃	
19	---	178,5	C	3,51
20	0,97	26,4	CH ₃	
21	3,51	52,0	CH ₃	

As conexões do anel furano foram confirmadas através do espectro de HMBC e do espectro de correlação homonuclear ¹H-¹H (COSY) (Figura 34 e 35). Esses espectros podem ser visualizados nos anexos.

Figura 34: Correlações do anel furano nos espectros de HMBC e COSY, respectivamente.

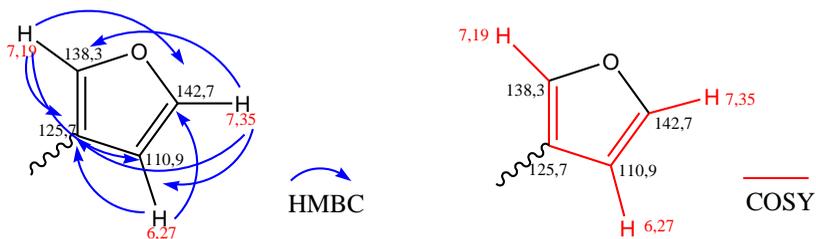
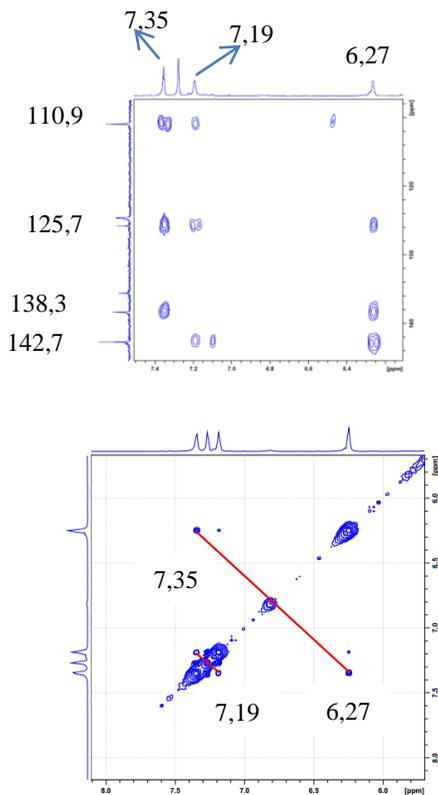


Figura 35: Ampliações dos espectros ^1H - ^{13}C HMBC e ^1H - ^1H COSY RMN do composto RB2.



Após analisar os espectros de RMN obtidos, constatou-se que o composto RB2 possui os deslocamentos químicos característicos dos diterpenos do tipo clerodano, como o raspailol.

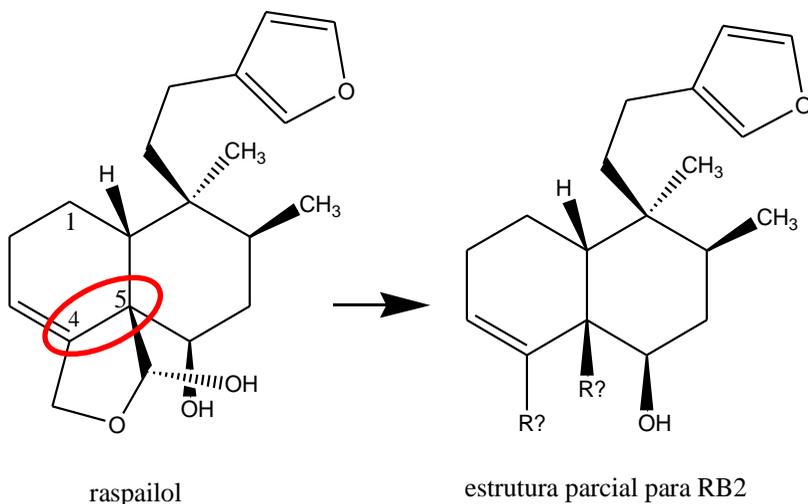
Com efeito, comparando os espectros de ^1H e ^{13}C RMN do raspailol com os espectros de ^1H e ^{13}C RMN do composto RB2, verificou-se que a maioria dos deslocamentos químicos são similares (Tabela 12).

Tabela 12: Comparação dos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C RMN do raspailol (West *et al.*, 1998) e do composto RB2.

	Raspailol (300 MHz; CDCl_3)		RB2 (400 MHz; CDCl_3)	
	δ ^1H (mult., J Hz)	δ ^{13}C	δ ^1H (mult., J Hz)	δ ^{13}C
1	1,73 (m) 1,60 (m)	19,7	1,73 (m) 1,52 (m)	19,1
2	2,20 (m)	25,8	2,16 (m) 2,16 (m)	26,5
3	5,76 (m)	120,7	5,64 (sl)	124,8
4	---	139,1	---	135,5
5	---	53,4	---	54,6
6	3,84 (ddd, 11,8; 8,7;3,8)	74,7	3,87 (td, 11,8; 4,7)	75,5
7	1,66 (dt, 13,3; 3,6) 1,48 (q, 13,8)	38,3	1,73 (m) 1,62 (m)	38,8
8	1,80 (m)	36,8	1,83 (m)	36,8
9	---	38,0	---	38,7
10	2,00 (dd, 13,2; 3,3)	40,4	2,36 (d, 14,1)	44,4
11	1,54 (td, 13,3; 3,5) 1,38 (td, 12,9; 3,8)	32,8	1,52 (m) 1,26 (m)	32,1
12	2,60 (td, 13,6; 3,5) 2,17 (m)	18,9	2,45 (m) 2,36 (m)	18,9
13	---	126,4	---	125,7
14	6,28 (dd, 1,7; 0,8)	111,1	6,27 (s)	110,9
15	7,33 (t, 1,7)	142,6	7,35 (t, 1,6)	142,7
16	7,19 (sl)	138,3	7,19 (s)	138,3
17	0,90 (d, 6,9)	15,7	0,88 (d, 6,5)	15,7
18	4,48 (dq, 11,7; 2,3) 4,35 (dq, 11,6; 1,8)	68,7	1,76 (s)	22,8
19	5,62 (d, 2,7)	99,6	---	178,5
20	0,95 (s)	25,2	0,97 (s)	26,4
21			3,50 (s)	52,0

As diferenças existentes nos deslocamentos químicos do raspailol e do composto RB2 são mais acentuadas nos carbonos 18 e 19. Estes carbonos conectam-se ao restante da molécula nos carbonos na posição 4 e 5, respectivamente (Figura 36).

Figura 36: Estrutura parcial para RB2.



No decorrer das análises dos espectros de ^1H e ^{13}C RMN constatou-se a presença de quatro metilas para o composto RB2, sendo que uma delas com deslocamento químico característico de metoxila. Verificou-se, também, a presença de carbono com deslocamento químico compatível com função éster. Sendo assim, na estrutura parcial para RB2, verifica-se que restam uma metila e o éster para serem conectados aos carbonos na posição 4 e 5. Esses grupos funcionais, com suas respectivas correlações foram observados no espectro COSY (Figura 37 e Figura 38) e nas correlações de ^1H - ^{13}C HMBC (Figura 39 e 40).

Figura 37: Espectro parcial de ^1H - ^1H COSY do composto RB2.

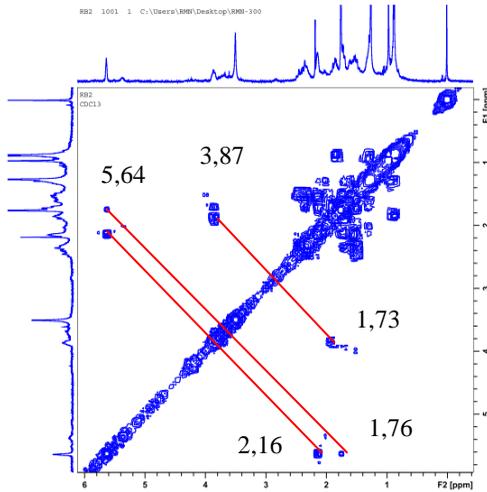


Figura 38: Correlações de ^1H - ^1H COSY do hidrogênio da ligação olefínica do anel bicíclico com os hidrogênios da metila δ 1,76 no composto RB2.

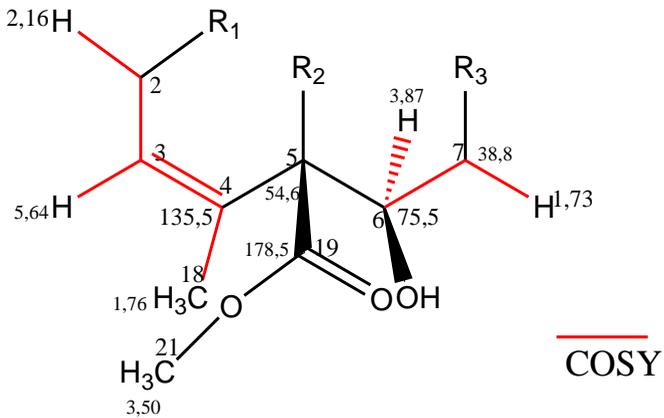


Figura 39: Correlações de ^1H - ^{13}C HMBC dos hidrogênios da metila δ 1,76 com os carbonos do anel bicíclico no composto RB2.

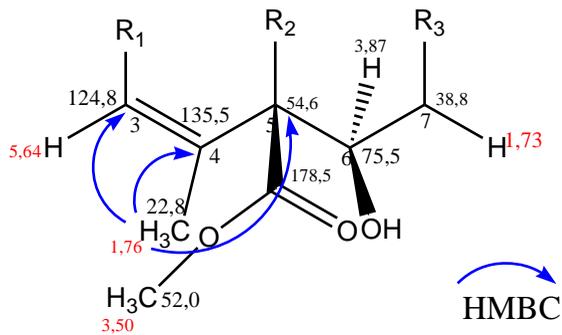
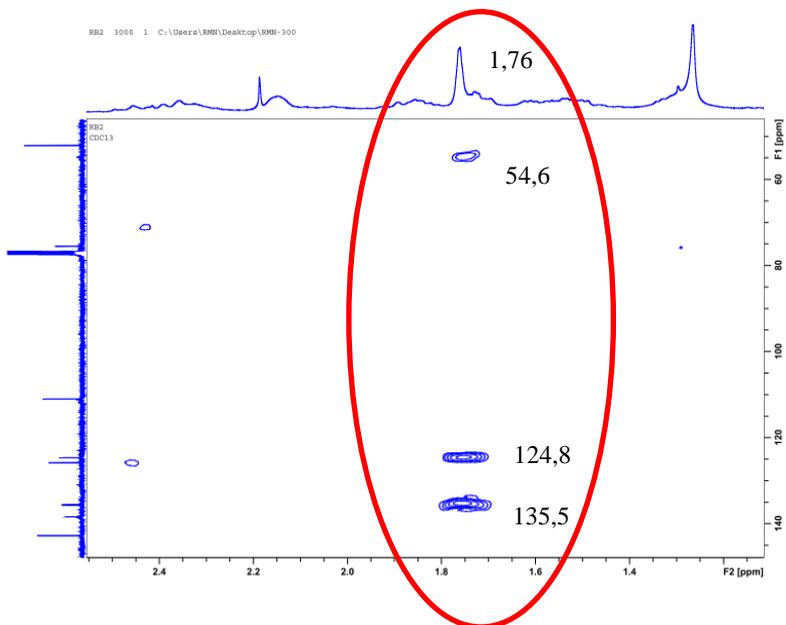


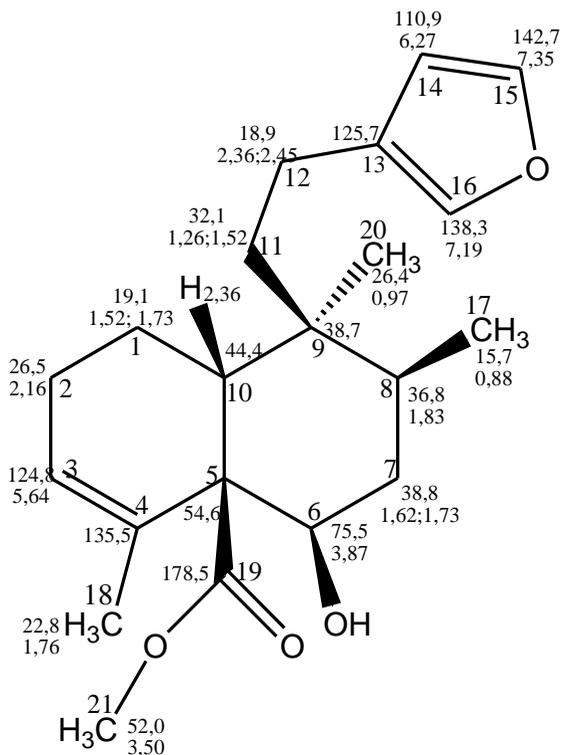
Figura 40: Ampliação do espectro de ^1H - ^{13}C HMBC do composto RB2.



Tanto nas correlações observadas no espectro de COSY, quanto nas observadas no espectro de HMBC, verifica-se que a metila em δ 1,76 conecta-se ao carbono δ 135,5, que ocupa a posição 4 na molécula restando o carbono da posição 5 para se conectar ao éster.

Portanto, após as análises dos espectros de RMN e comparação com o raspailol, conclui-se que RB2 apresenta a estrutura mostrada na Figura 41.

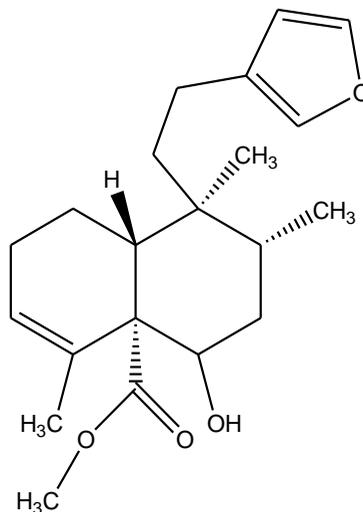
Figura 41: Estrutura proposta para o composto RB2.



A pesquisa na base de dados SciFinder® revelou que um composto com essa estrutura havia sido descrito e denominado como éster metílico do ácido kerlínico. Entretanto, neste éster os elementos conectados aos carbonos C-5 e C-10, na junção dos anéis, assumem posição *trans* e as metilas C-17 e C-20 assumem posição *cis*, ou seja, é um composto *trans-cis* (TC) (Figura 42). Para RB2 a configuração

esperada é *cis-trans* (CT) nessas posições, de acordo com a configuração do raspailol (RB3). Sendo assim, RB2 é um isômero do éster metílico do ácido kerlínico.

Figura 42: Estrutura do éster metílico do ácido kerlínico.



éster metílico do ácido kerlínico

A nomenclatura para o éster metílico do ácido kerlínico, de acordo com Chemical Abstracts, é metil éster do ácido 1-[2-(3-furanyl)-etil]-4-hidroxi-1,2,5-trimetil-1,3,4,7,8,8a-hexahidro-[1S-(1a,2b,4b,4ab,8aa)]-4a(2H)-naftaleno-9-carboxílico, CAS 112606-15-2.

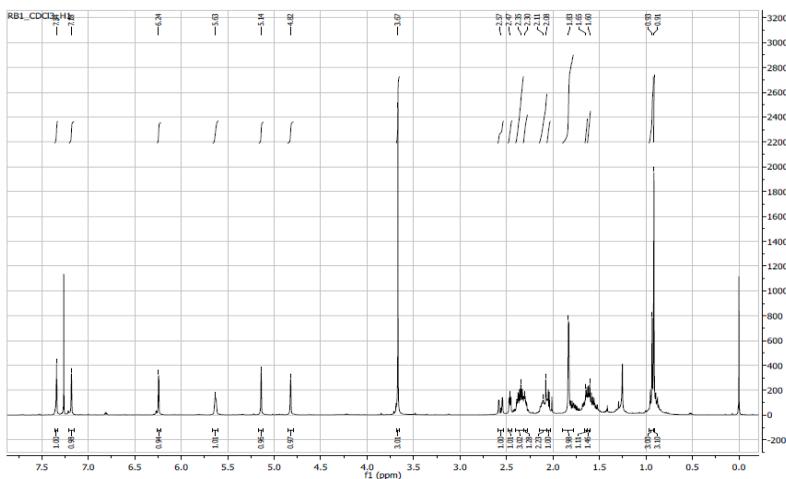
O éster metílico do ácido kerlínico foi obtido a partir do ácido kerlínico, um diterpeno clerodano isolado da *Salvia keerlii*, através de esterificação com diazometano (RODRIGUEZ-HAHN *et al.*, 1987). Na literatura não foram encontrados registros do isolamento do éster metílico do ácido kerlínico diretamente de plantas ou organismos marinhos.

4.4.3 Composto RB1

O composto denominado RB1 foi isolado de diferentes frações da fração hexânica tanto da amostra coletada na Ilha do Coral (17,8 mg), quanto da amostra coletada na Ilha das Aranhas (2,5 mg). Foi obtido na forma de óleo de coloração amarelada, resultando 20,3 mg.

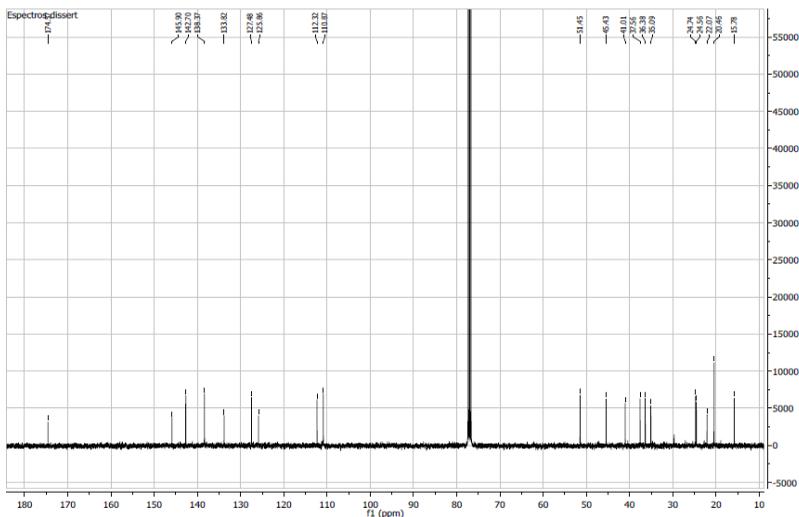
O espectro ^1H RMN (Figura 43) apresenta sinais em δ 7,34 (1H, t, $J=1,6$ Hz), δ 7,18 (1H, s) e δ 6,24 (1H, s), sendo que estes sinais são compatíveis com os deslocamentos químicos dos três hidrogênios pertencentes ao anel furano monossustituído. O sinal em δ 5,63 (1H, sl) indica a presença de metino olefínico, enquanto que os sinais em δ 5,14 (1H, s) e δ 4,82 (1H, s) evidenciam a existência de ligação dupla terminal. Três singletos relativos a grupos metila podem ser vistos em δ 1,83 (3H), δ 0,93(3H) e δ 0,91 (3H), bem como um singlete de metoxila em δ 3,87 (3H). Além destes, observa-se uma série de sinais na região entre δ 1,00 – 3,00, relativos a hidrogênios de grupos metino (CH) e metileno (CH_2).

Figura 43: Espectro de ^1H RMN do composto RB1 (400 MHz, CDCl_3).



O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 44) apresentou 21 sinais de carbono, na região espectral compreendida entre δ 15,75 e δ 174,62. O sinal em δ 174,62 é compatível com grupo éster.

Figura 44: Espectro de ^{13}C RMN do composto RB1 (100 MHz, CDCl_3).

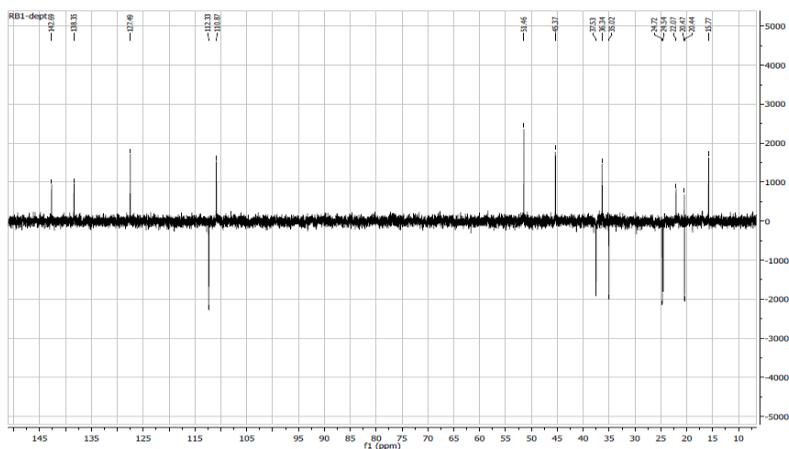


O padrão de hidrogenação correspondente aos átomos de carbono foi determinado através do espectro DEPT 135: observou-se que a estrutura do composto RB1 é formada por 6 carbonos metínicos, 6 carbonos metilênicos e 4 carbonos metílicos, estando um destes localizado na região espectral de carbono ligado a oxigênio, com absorção em δ 51,5.

O carbono metilênico em δ 112,3 é compatível com ligação dupla terminal, enquanto que os carbonos metínicos em δ 142,7, δ 138,4 e δ 110,9 evidenciam a presença do anel furano.

A subtração dos sinais do espectro de ^{13}C dos sinais do espectro de DEPT 135 revelou a presença de 5 carbonos quaternários (Figuras 44 e 45). Dessa forma pode-se deduzir a fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_3$, que indica sete insaturações na molécula.

Figura 45: Espectro DEPT 135 do composto RB1 (100 MHz; CDCl_3).



Através do espectro de ^1H - ^{13}C HSQC, foi possível relacionar praticamente todos os sinais dos hidrogênios aos seus respectivos carbonos. Apenas os carbonos em δ 142,7 e δ 138,4 não apresentaram as correlações esperadas no espectro de HSQC. Contudo, seus hidrogênios puderam ser determinados através do espectro bidimensional de correlação heteronuclear a longa distância ^1H - ^{13}C (HMBC).

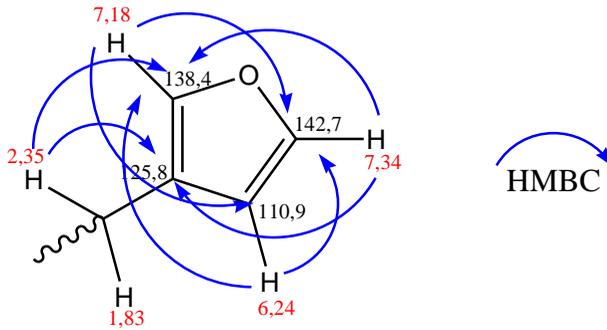
Dessa forma, com os dados obtidos no espectro de HMBC, verificou-se que ao carbono em δ 138,4 (correlação HMBC com os hidrogênios δ 6,24 e δ 7,34) conecta-se o hidrogênio em δ 7,18 e ao carbono em δ 142,7 (correlação com os hidrogênios δ 6,24 e δ 7,18) conecta-se o hidrogênio em δ 7,34 (Tabela 13).

Tabela 13: Dados obtidos através dos espectros de RMN do composto RB1 (300 MHz; CDCl₃).

	RB1			
	(300 MHz; Benzeno-d6)			
	δ ¹H	HSQC	DEPT 135	HMBC
1	2,11 2,35	24,7	CH ₂	2,47
2	2,11 2,35	24,5	CH ₂	
3	5,63	127,5	CH	2,11/ 1,83
4	---	133,8	C	5,14/ 4,82/ 2,47/ 1,83
5	---	145,9	C	2,47/ 1,83
6	4,82 5,14	112,3	CH ₂	2,47
7	2,08 2,57	37,6	CH ₂	
8	2,30	36,4	CH	0,91
9	---	41,0	C	2,47/ 1,83/ 0,93
10	2,47	45,5	CH	5,14/ 4,82/ 0,93
11	1,60 1,65	35,1	CH ₂	0,91
12	1,83 2,35	20,5	CH ₂	
13	---	125,8	C	7,34/ 2,35
14	6,24	110,9	CH	7,18
15	7,34		CH	7,18/ 6,24
16	7,18		CH	7,34/ 6,24/ 2,35/ 0,93
17	0,91	15,8	CH ₃	2,57
18	1,83	20,5	CH ₃	
19	---	174,6	C	3,87/ 2,57/ 2,08
20	0,93	22,1	CH ₃	
21	3,87	51,5	OCH ₃	

No espectro de HMBC as correlações referentes ao anel furano são evidentes (Figura 46).

Figura 46: Correlações entre os ^1H e ^{13}C do anel furano extraídas do espectro HMBC.



A ampliação do espectro de COSY confirma a presença do anel furano na molécula do composto RB1 (Figura 47 e 48).

Figura 47: Ampliação do espectro COSY do composto RB1, mostrando correlações do anel furano.

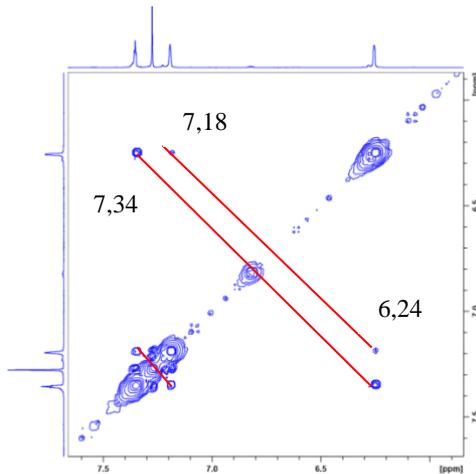
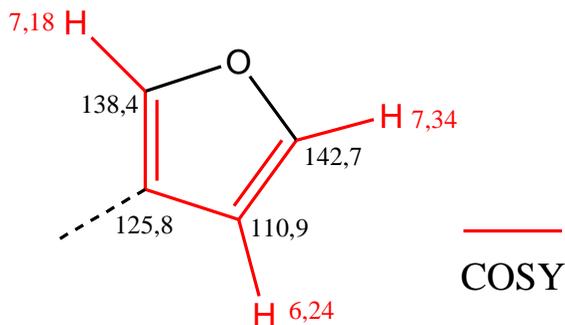


Figura 48: Correlações no anel furano observadas no espectro COSY para o composto RB1.



Após analisar os espectros de RMN obtidos, constatou-se que o composto RB1 possui os deslocamentos químicos característicos dos diterpenos do tipo clerodano, como o raspailol e o composto denominado RB2.

Efetivamente, comparando os espectros de ^1H e ^{13}C RMN do composto RB2 com os espectros de ^1H e ^{13}C RMN do composto RB1, verificou-se que a maioria dos deslocamentos químicos são similares, como mostrado na Tabela 14.

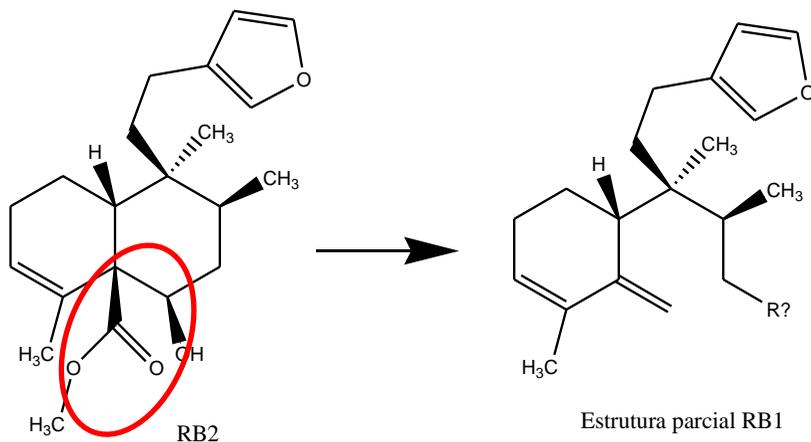
Tabela 14: Comparação dos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C RMN do composto RB2 e do composto RB1.

	RB2 (400 MHz; CDCl_3)		RB1 (400 MHz; CDCl_3)	
	δ ^1H	δ ^{13}C	δ ^1H (mult. J Hz)	δ ^{13}C
1	1,73 (m) 1,52 (m)	19,1	2,11 (m) 2,35 (m)	24,7
2	2,16 (m) 2,16 (m)	26,5	2,11 (m) 2,35 (m)	24,5
3	5,64 (sl)	124,8	5,63 (sl)	127,5
4	---	135,5	---	133,8
5	---	54,6	---	145,9
6	3,87 (td, 11,8;4,7)	75,5	4,82 (s) 5,14 (s)	112,3
7	1,73 (m) 1,62 (m)	38,8	2,08 (s) 2,57 (d, 14,6)	37,6
8	1,83 (m)	36,8	2,30 (ddd, 8,8;5,5;2,1)	36,4
9	---	38,7	---	41,0
10	2,36 (d, 14,1)	44,4	2,47 (dd, 5,8; 2,0)	45,4
11	1,52 (m) 1,26 (m)	32,1	1,60 (m) 1,65 (m)	35,1
12	2,45 (m) 2,36 (m)	18,9	1,83 (d, 1,4) 2,35 (m)	20,5
13	---	125,7	---	125,8
14	6,27 (s)	110,9	6,24 (s)	110,9
15	7,35 (t, 1,6)	142,7	7,34 (t, 1,6)	142,7
16	7,19 (s)	138,3	7,18 (s)	138,4
17	0,88 (d, 6,5)	15,7	0,91 (s)	15,8
18	1,76 (s)	22,8	1,83 (s)	20,4
19	---	178,5	---	174,6
20	0,97 (s)	26,4	0,93 (s)	22,1
21	3,50 (s)	52,0	3,87 (s)	51,4

Entretanto, nos carbonos na posição 5 e 6 da molécula, as diferenças dos deslocamentos químicos no composto RB2 e no composto RB1 são maiores (Tabela 14).

A partir desses dados, é apresentada na Figura 49 a estrutura parcial proposta para RB1.

Figura 49: Estrutura parcial para RB1.



Após as análises dos dados obtidos nos espectros de RMN e na Tabela 14, constata-se que na posição 5 conecta-se a dupla ligação terminal.

Através das correlações obtidas no espectro COSY (Figura 50 e 51) foi possível confirmar a conexão da ligação dupla terminal na posição 5.

Dessa forma, resta conectar o éster na molécula RB1. A presença do grupo éster é claramente indicada tanto no espectro ^1H RMN (sinal de metoxila em δ 3,87) quanto no espectro ^{13}C RMN (sinal em δ 174,6). No entanto, esse grupo éster não apresenta vizinhança com a ligação dupla do anel decalínico como no composto RB2.

Figura 50: Ampliação do espectro COSY do composto RB1, mostrando correlações entre o hidrogênio da dupla ligação do anel bicíclico e os hidrogênios da dupla ligação terminal.

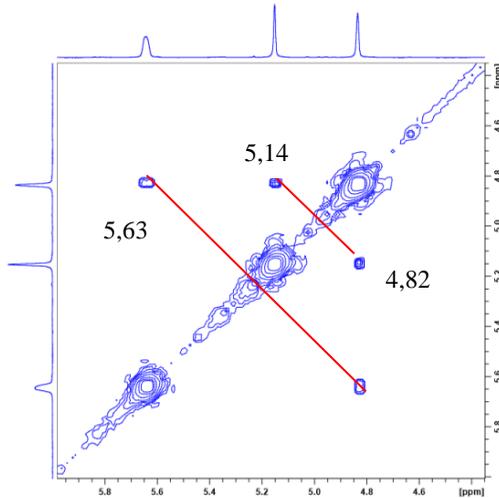
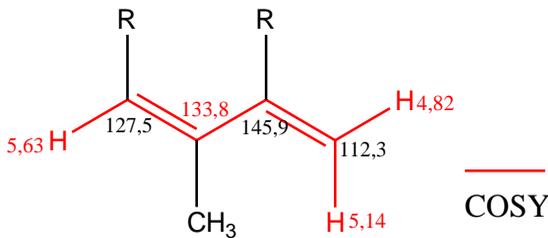


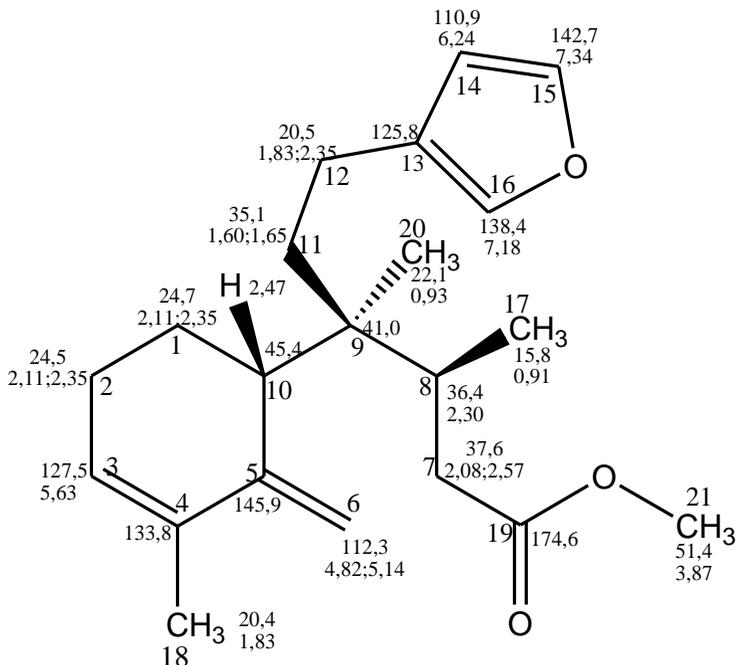
Figura 51: Correlações entre o hidrogênio da dupla ligação do anel bicíclico e os hidrogênios da dupla ligação terminal.



Assim sendo, a dupla ligação conecta-se ao carbono na posição 5 e o éster ao carbono na posição 6, na molécula do composto RB1.

Dessa forma, pode-se concluir que o composto RB1 apresenta a estrutura mostrada na Figura 52.

Figura 52: Estrutura proposta para o composto RB1.



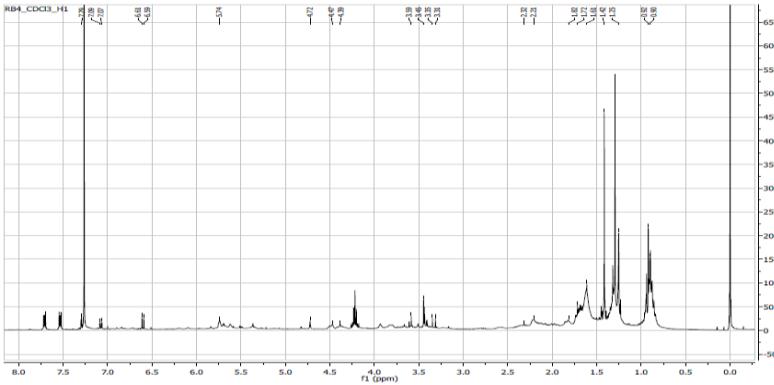
Para essa estrutura não foram encontrados relatos na base de dados SciFinder®. Muito provavelmente trata-se de composto inédito.

4.4.4 Composto RB4

O composto denominado RB4 (12,8 mg) foi isolado da fração hexânica da amostra coletada na Ilha do Coral. Foi obtido na forma de óleo de coloração amarelada.

O espectro ^1H RMN (Figura 53) evidencia a presença de um ftalato (δ 7,71; δ 7,54; δ 4,22) e apresenta três sinais de hidrogênios aromáticos em δ 7,30 (1H, d, $J=2,4$ Hz), δ 7,08 (1H, dd, $J=8,2$; $2,4$ Hz) e δ 6,60 (1H, d, $J=8,2$ Hz), indicando a presença de derivado com anel furano, como nos compostos anteriores. Entre a região espectral δ 6 a δ 3 são observados muitos sinais de hidrogênios e entre δ 1,5 a δ 0,80 sinais correspondentes a metilas. Contudo, não foi possível verificar quais pertencem à molécula do composto RB4, pois quando submetido à CLAE preparativa para purificação, decompôs-se na coluna.

Figura 53: Espectro de ^1H RMN do composto RB4 (400 MHz, CDCl_3).

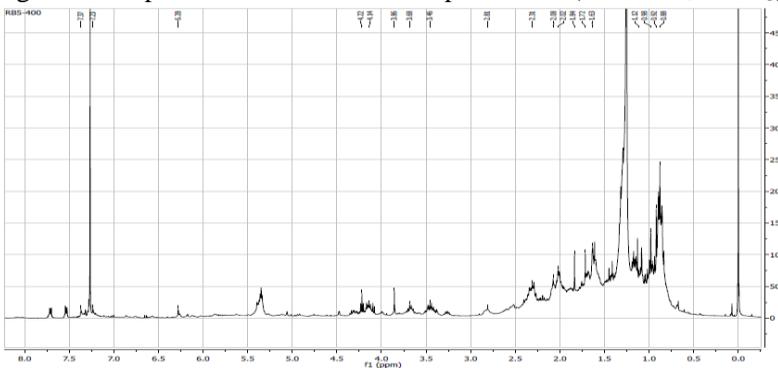


4.4.5 Composto RB5

O composto denominado RB5 (17 mg) foi isolado da fração hexânica da amostra coletada na Ilha do Coral. Foi obtido na forma de óleo de coloração amarelada.

O espectro ^1H RMN (Figura 54) apresenta os três sinais de hidrogênios atribuídos ao anel furano monossustituído em δ 7,37, δ 7,23 e δ 6,28. Entretanto, essa fração mostrou-se impura deduzindo-se a presença de ftalato e colesterol pelos sinais de ^1H RMN. Não foi possível elucidar sua estrutura, pois quando submetida à CLAE preparativa para purificação decompôs-se durante esse processo.

Figura 54: Espectro de ^1H RMN do composto RB5 (400 MHz, CDCl_3).

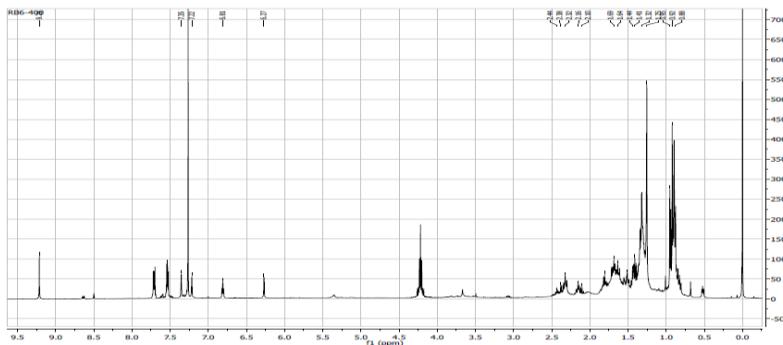


4.4.6 Composto RB6

O composto denominado RB6 foi isolado da fração hexânica tanto da amostra coletada na Ilha do Coral (5 mg), quanto da amostra coletada na Ilha das Aranhas (1 mg). Foi obtido na forma de óleo de coloração amarelada, resultando 6 mg.

O espectro ^1H RMN (Figura 55) apresenta os sinais atribuídos aos hidrogênios do anel furano monossustituído em δ 7,35 (1H, t, $J=1,6$ Hz), δ 7,22 (1H, s) e δ 6,27 (1H, s). Em δ 9,21(1H) observa-se um singlete com deslocamento químico compatível com aldeído e em δ 6,81 (1H, t, $J=4,5$ Hz) o hidrogênio metínico da dupla ligação do anel decalínico, bastante desblindado. A amostra está impura, pois são nítidos os sinais dos hidrogênios característicos de ftalato. Entretanto, com o auxílio dos conhecimentos obtidos através das estruturas dos demais compostos, foi possível propor uma provável estrutura para o composto RB6 (Figura 56). Não foi possível elucidar sua estrutura de maneira inequívoca, devido à decomposição da amostra, o que inviabilizou a obtenção de espectros complementares. No entanto, considerando a presença do grupo aldeído e ao mesmo tempo a ausência do grupo metila conectado a dupla ligação do anel decalínico ($\pm \delta$ 1,80), como nos compostos RB1 e RB2, pode-se propor a presença do grupo aldeído, ao invés da metila, conectado na posição 4. A presença do aldeído nessa posição é coerente com o deslocamento químico do hidrogênio da ligação dupla, em δ 6,81.

Figura 55: Espectro de ^1H RMN do composto RB6 (400 MHz, CDCl_3).



A pesquisa na base de dados SciFinder® revelou que existe um composto compatível com essa estrutura, registrado com CAS 138052-43-4, que é o 5-[2-(3-furanil)-etil]-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahidro-5,6,8a-

trimetil- [4aR-(4aa,5a,6b,8aa)]-1-naftaleno carboxaldeído. Esse composto foi isolado das partes aéreas de *Badilloa salicina* (ZDERO; BOHLMANN; KING, 1991). Entretanto, esse composto tem a configuração do tipo *cis-cis* (CC), enquanto que a configuração esperada para RB6 é do tipo *cis-trans* (CT), como no raspailol. Na Tabela 15 encontram-se os dados de ^1H RMN para o composto CAS 138052-43-4 e para o composto RB6.

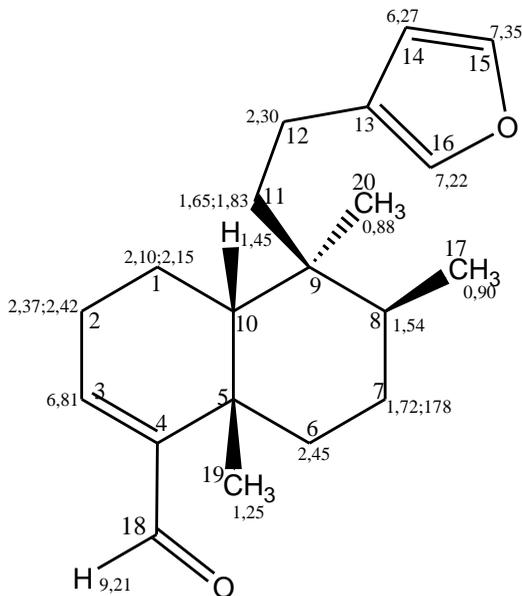
Tabela 15: Dados de ^1H RMN para o composto CAS 138052-43-4 e para o composto RB6.

CAS 138052-43-4 400 MHz; CDCl_3 ZDERO <i>et al.</i> , 1991	RB6 400 MHz; CDCl_3
δ ^1H (mult., J Hz)	δ ^1H (mult., J Hz)
2,03 (m)	2,15 (m)
1,92 (m)	2,10 (m)
2,56 (m)	2,42 (m)
2,41 (m)	2,37 (m)
6,72 (t, 3,5)	6,81 (t, 4,5)
---	---
---	---
2,63 (m)	2,45 (m)
1,11 (m)	no
1,32 (m)	1,72 (m)
1,11 (m)	1,78 (m)
1,54 (m)	1,54 (m)
---	---
1,48 (m)	1,45 (m)
1,71 (m)	1,83 (m)
1,54 (m)	1,65 (m)
2,30 (m)	2,30 (m)
---	---
6,27 (sl)	6,27 (sl)
7,22 (sl)	7,22 (sl)
7,36 (t, 1,5)	7,35 (t, 1,6)
0,79 (d, 7)	0,90 (d, 6,5)
9,41 (s)	9,21 (s)
1,16 (s)	1,25 (s)
0,74 (s)	0,88 (s)

no = não observado

Dessa forma, pode-se propor a fórmula molecular $C_{20}H_{28}O_2$ a qual prevê sete insaturações na molécula, cuja estrutura é mostrada na Figura 56.

Figura 56: Estrutura proposta para o composto RB6.



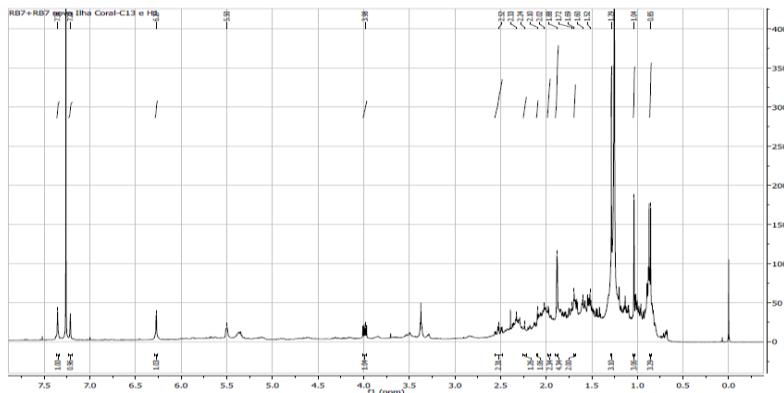
4.4.7 Composto RB7

O composto denominado RB7 (4,4 mg) foi isolado da fração hexânica da amostra coletada na Ilha do Coral. Foi obtido na forma de óleo de coloração amarelada.

O espectro 1H RMN (Figura 57) apresenta sinais compatíveis com os três hidrogênios do anel furano monossustituído em δ 7,35 (1H, t, $J=1,6$ Hz), δ 7,21 (1H, s) e δ 6,27 (1H, s). O sinal em δ 5,50 (1H, sl) indica a presença de metino olefínico e o sinal em δ 3,98 (1H, m) apresenta deslocamento químico compatível com hidrogênio próximo a elemento eletronegativo. Dois singletos relativos a grupos metila aparecem em δ 1,28 (3H) e δ 1,03 (3H). Em δ 0,85 (3H, d, $J=6,9$ Hz) o desdobramento da metila indica acoplamento vicinal com hidrogênio metínico. Outra metila aparece em δ 1,88 (3H, m). Além destes,

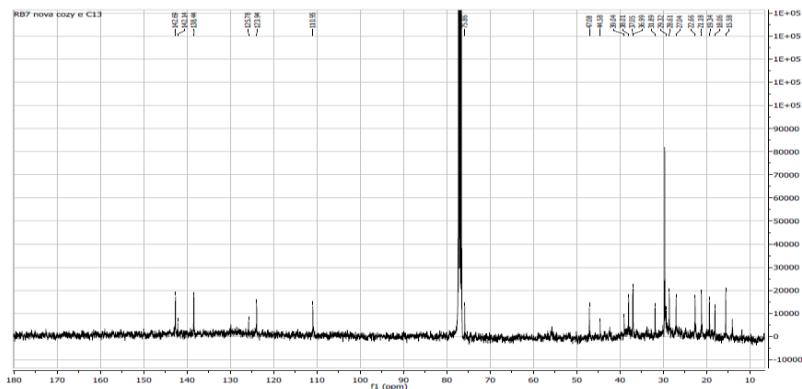
observa-se uma série de sinais na região entre δ 1,00 – 3,00, relativos a hidrogênios de grupo metino (CH) e grupo metileno (CH_2).

Figura 57: Espectro de ^1H RMN do composto RB7 (400 MHz, CDCl_3).



O espectro ^{13}C RMN (Figura 58) apresenta 20 sinais de carbono na região espectral compreendida entre δ 15,6 e δ 142,7, sendo que o carbono em δ 75,7 tem deslocamento químico característico de carbono próximo a elemento eletronegativo, como o grupo hidroxila. Em δ 142,7, δ 138,4, δ 125,7 e δ 110,9 aparecem os carbonos compatíveis com carbonos de anel furano monossustituído.

Figura 58: Espectro de ^{13}C RMN do composto RB7 (100 MHz, CDCl_3).



Através do espectro HSQC foi possível associar os sinais de hidrogênios aos seus respectivos carbonos (Tabela 16).

Tabela 16: Dados de RMN para o composto RB7 (300 MHz, CDCl₃).

RB7			
300 MHz, CDCl₃			
	δ ¹ H (mult., J Hz)	δ ¹³ C	HMBC
1	1,69 (m) 1,69	21,1	
2	2,04 (m) 2,04	27,0	
3	5,50 (sl)	123,9	1,88/ 2,04
4	---	142,1	1,28/ 1,88
5	---	47,1	1,28/ 1,88
6	3,98 (m)	75,7	1,28
7	1,56 (m) 1,75 (m)	39,0	1,03/ 1,28
8	2,16 (m)	37,0	0,85/ 1,03
9	---	38,0	0,85/ 1,03
10	2,20 (d, 7,8)	44,5	1,69/ 1,28
11	1,83 (m) 2,09 (m)	31,8	1,03
12	2,52 (m) 2,52	19,3	
13	---	125,7	7,21
14	6,27 (s)	110,9	7,21
15	7,35 (t, 1,6)	142,7	6,27
16	7,21 (s)	138,4	6,27/7,35
17	0,85 (d, 6,9)	15,6	
18	1,88 (m)	22,7	
19	1,28 (s)	18,1	
20	1,03 (s)	28,6	

Os deslocamentos químicos nos espectros de RMN para RB7 são, de modo geral, similares aos deslocamentos químicos nos espectros RMN para o composto RB2, indicando a similaridade estrutural dos dois compostos (Tabela 17).

Tabela 17: Comparação dos deslocamentos químicos de ^{13}C RMN para os compostos RB2, RB7 e 6-hidroxianoneno

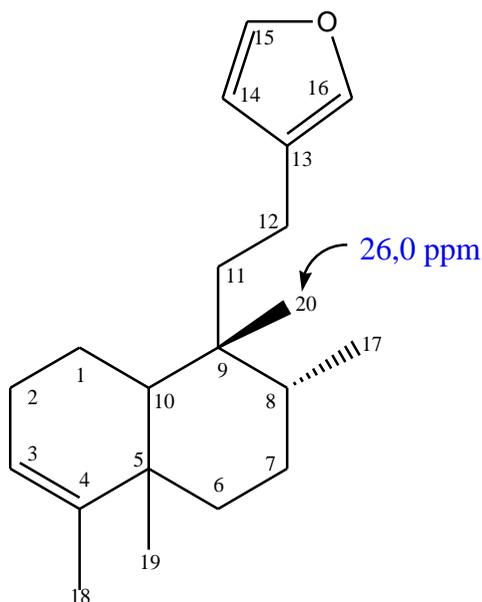
	RB2 400 MHz; CDCl_3	RB7 400 MHz; CDCl_3	6-hidroxianoneno 200 MHz; CDCl_3 (<i>SILVEIRA et al., 1994</i>)
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$
1	19,1	21,1	18,0
2	26,5	27,0	26,7
3	124,8	123,9	122,0
4	135,5	142,1	143,8
5	54,6	47,1	44,4
6	75,5	75,7	75,5
7	38,8	39,0	38,4
8	36,8	37,0	34,6
9	38,7	38,0	38,6
10	44,4	44,5	45,5
11	32,1	31,8	37,9
12	18,9	19,3	18,0
13	125,7	125,7	125,5
14	110,9	110,9	110,9
15	142,7	142,7	142,8
16	138,3	138,4	138,3
17	15,7	15,6	15,6
18	22,8	22,7	15,0
19	178,5	18,1	22,3
20	26,4	28,6	17,7
21	52,0		

No entanto, o composto RB7 não apresenta o grupo éster e sim uma metila a mais localizada em carbono quaternário, ou seja, um singleto em δ 1,28. Dessa forma, a fórmula molecular para RB7 seria $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$. A molécula apresenta anel furano como nos compostos RB1, RB2 e RB3 e possui uma hidroxila conectada em C-6, como em RB2.

Buscando na literatura um composto com essas características, observa-se que o composto 6-hidroxianoneno apresenta dados similares, mas também algumas diferenças como mostra a Tabela 17. Enquanto o deslocamento químico da metila 20 conectada na posição C-9 para RB7 é 28,6 para o 6-hidroxianoneno é 17,7. Em diterpenos do tipo clerodano quando as metilas na posição 17 e 20 estão em posição *cis*, o deslocamento químico da metila 20 é aproximadamente 18,0 ppm. Se

estas mesmas metilas estão em posição *trans*, o deslocamento químico da metila 20 é aproximadamente 26,0 ppm (SANTOS *et al.*, 2007). Assim sendo, no composto RB7 as metilas na posição 17 e 20 estão em posição *trans*, (Figuras 59 e 60) tal como observado para os compostos RB2 e RB3.

Figura 59: Deslocamento químico do carbono da metila na posição 20 para configuração *trans*.

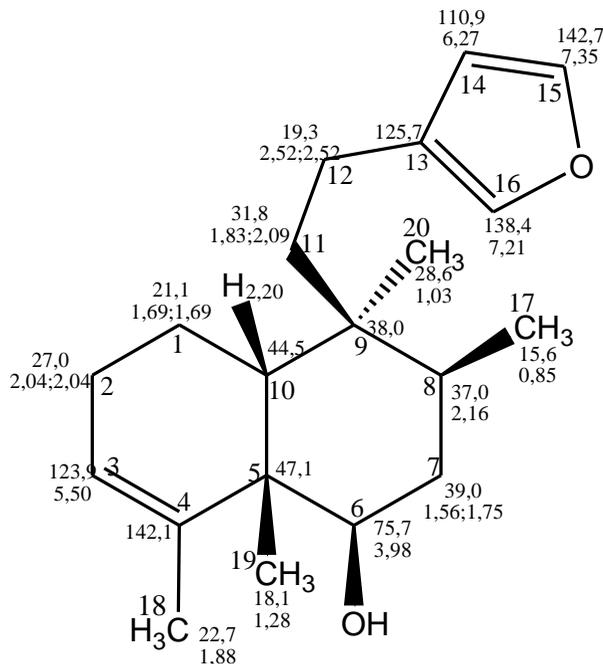


trans

A análise dos dados obtidos em comparação com os da literatura (SILVEIRA; MCCHESENEY, 1994) permitiu identificar RB7 como sendo um dos isômeros do composto 4-[2-(3-furânil) etil]- 3,4,8,8a-tetrametil-1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidro-(1a,3b,4b,4ab,8ab)-naftalen-1-ol, um derivado hidroxilado do anoneno, registrado com CAS 106190-15-2.

O composto 6-hidroxianoneno foi isolado pela primeira vez de *Croton sonderianus* Muell. Arg. conhecido no nordeste brasileiro como “marmeleiro preto”. Esse arbusto é usado na medicina popular para tratar distúrbios gástricos e tem se revelado rica fonte de terpenóides.

Figura 60: Estrutura proposta para o composto RB7.

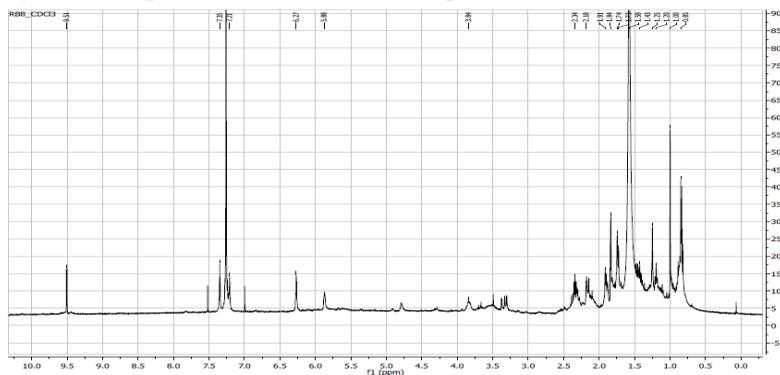


4.4.8 Composto RB8

O composto denominado RB8 foi isolado da fração hexânica tanto da amostra coletada na Ilha do Coral (1 mg) quanto da amostra coletada na Ilha das Aranhas (2,9 mg). Foi obtido na forma de óleo de coloração amarelada, resultando 3,9 mg.

O espectro ^1H RMN (Figura 61) apresenta os sinais atribuídos aos três hidrogênios do anel furano monossustituído em δ 7,35 (1H, t, $J=1,5$ Hz), δ 7,21 (1H-s) e δ 6,27 (1H-s) e sinal para um hidrogênio com deslocamento químico compatível com aldeído em δ 9,50 (1H, d, $J=2,9$ Hz). O sinal característico de hidrogênio metínico da dupla ligação do anel bicíclico aparece em δ 5,87 (1H, s). A análise dos dados espectrais obtidos sugerem que RB8 pertence à classe dos diterpenos clerodanos, entretanto não foi possível elucidar sua estrutura devido à instabilidade da amostra, o que inviabilizou a obtenção de espectros complementares.

Figura 61: Espectro de ^1H RMN do composto RB8 (400 MHz, CDCl_3).

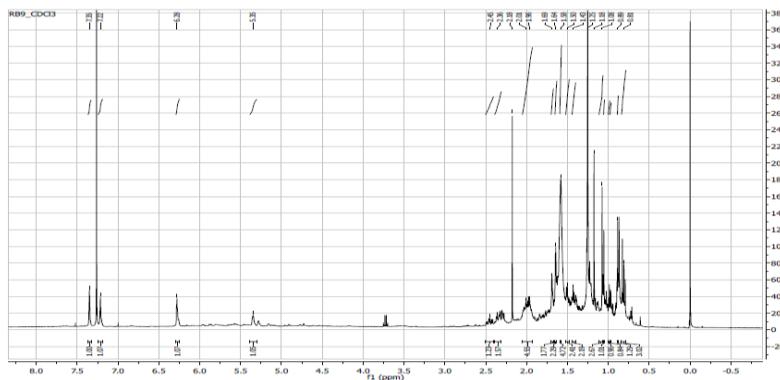


4.4.9 Composto RB9

O composto denominado RB9 (1,7 mg) foi isolado da fração hexânica da amostra coletada na Ilha das Aranhas. Foi obtido na forma de óleo de coloração amarelada.

O espectro ^1H RMN (Figura 62) apresenta sinais em δ 7,35 (1H, sl), δ 7,21 (1H, sl) e δ 6,28 (1H, sl), com deslocamentos químicos característicos dos três hidrogênios de anel furano monossustituído. O sinal em δ 5,35 (1H, m) indica a presença de metino olefínico. Quatro grupos metila aparecem em δ 1,98 (3H, m), δ 1,55 (3H, sl), δ 1,07 (3H, m) e δ 0,81 (3H, d, 6,8 Hz). Além destes, observa-se uma série de sinais na região entre δ 1,00 – 3,00, relativos a hidrogênios de grupo metino (CH) e grupo metileno (CH_2).

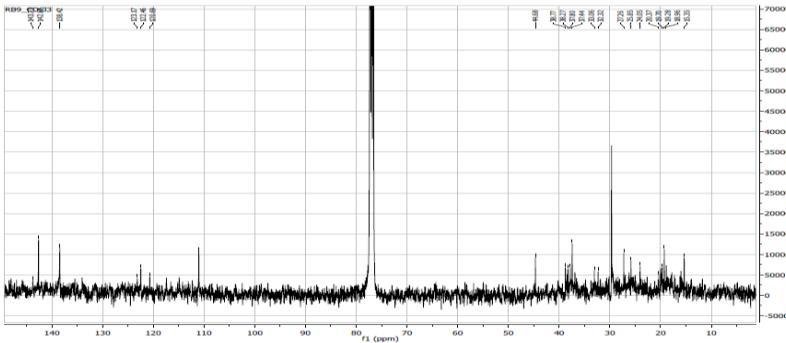
Figura 62: Espectro de ^1H RMN do composto RB9 (400 MHz, CDCl_3).



O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 63) apresenta 20 sinais de carbono na região espectral compreendida entre δ 15,3 e δ 143,7, sendo que os carbonos em δ 142,6, δ 138,5, δ 111,0 e δ 123,2 apresentam deslocamentos químicos característicos de anel furano monossustituído.

A comparação entre os espectros de ^1H e ^{13}C dos composto RB7 e RB9 evidencia a ausência do grupo hidroxila no composto RB9. Dessa forma, propõe-se uma estrutura para RB9 onde o grupo hidroxila é substituído por um grupo metileno. Assim, observou-se que a estrutura do composto RB9 é formada por 6 carbonos metínicos (CH), 6 carbonos metilênicos (CH_2) e 4 carbonos metílicos (CH_3), sendo os quatro carbonos restantes quaternários, o que indica a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}$, revelando a presença de 6 insaturações na molécula.

Figura 63: Espectro de ^{13}C RMN do composto RB9 (100 MHz, CDCl_3).



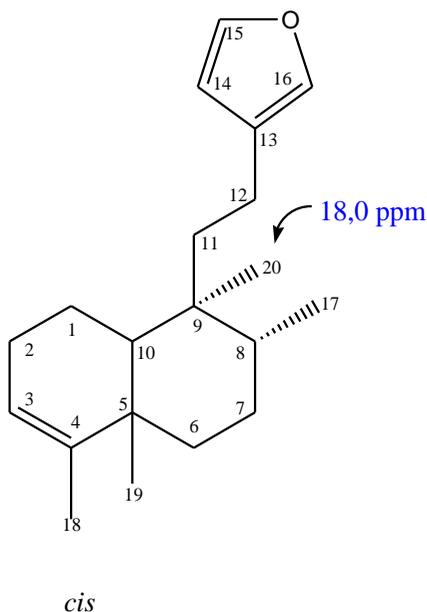
Consultando a bibliografia disponível sobre diterpenos clerodanos, constatou-se que muitos deslocamentos químicos nos espectros de ^{13}C RMN e de ^1H RMN da substância RB9 são semelhantes aos deslocamentos químicos dos espectros de ^{13}C RMN e ^1H RMN do anoneno, substância isolada da planta *Annona coriácea* (FERRARI *et al.*, 1971).

A Tabela 18 traz os deslocamentos de ^{13}C e ^1H RMN para o anoneno e para o composto RB9. Verifica-se que na posição 19 e 20 os deslocamentos químicos para o anoneno e o composto RB9 são bastante distintos.

A diferença de deslocamento químico dos carbonos na posição 20 deve-se a diferentes configurações nesta parte da molécula. Como visto anteriormente para o composto RB7, em diterpenos do tipo clerodano

quando as metilas 17 e 20 estão em posição *cis*, o deslocamento químico da metila 20 é aproximadamente 18,0 ppm. Se estas mesmas metilas estão em posição *trans*, o deslocamento químico da metila 20 é aproximadamente 26,0 ppm (SANTOS *et al.*, 2007). Assim sendo, no composto RB9 as metilas 17 e 20 estão em posição *trans*, como para RB3, RB2 e RB7. No anoneno estão em posição *cis* (Figura 64).

Figura 64: Deslocamento químico do carbono da metila na posição 20 para configuração *cis*.



Ainda cabe ressaltar que a diferença de deslocamento químico dos carbonos 19 no composto RB9 e no anoneno, decorre em virtude de diferentes configurações na fusão dos anéis A/B na decalina, podendo ser *cis* ou *trans*. Na fusão *cis* o deslocamento químico da metila C-19 conectada na posição 5 é aproximadamente 33,0 ppm, enquanto que na *trans* pode ocorrer em 20,0 ppm, ou seja, essa metila encontra-se em campo mais alto, o que é explicável em termos de congestionamento estérico. (SANTOS *et al.*, 2007). No composto RB9 a fusão dos anéis é *cis* (Tabela 18). Em conclusão, o composto RB9 tem configuração do tipo *cis-trans* (CT) e o anoneno do tipo *trans-cis* (TC) (TAKAHASHI; KUSUMI; KAKISAWA, 1979).

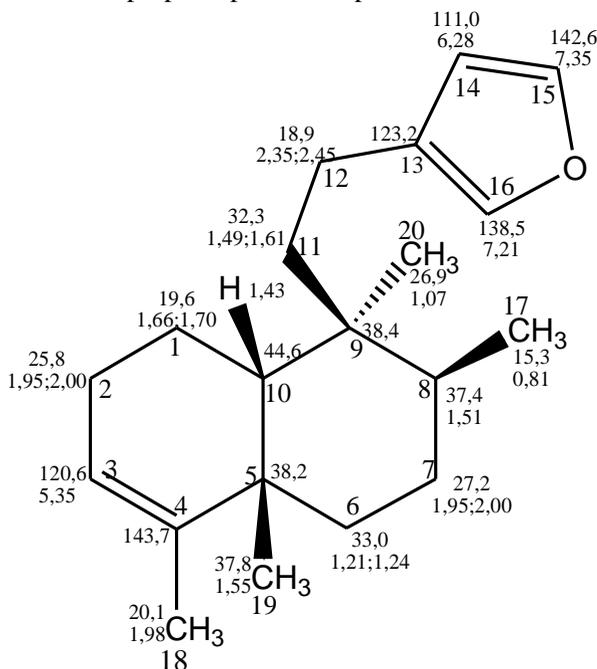
Tabela 18: Comparação dos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C RMN do anoneno [100,6⁽¹⁾ e 75 MHz⁽²⁾; CDCl_3] e do composto RB9 (400 e 100 MHz; CDCl_3).

	δ ^1H		δ $^{13}\text{C}13$	
	Anoneno (1)	RB9	Anoneno (2)	RB9
1	1,54-1,34 (m)	1,66 (m) 1,70 (m)	18,2	19,6
2	1,99-1,90 (m) 2,09-2,03 (m)	1,95 (m) 2,00 (m)	26,7	25,8
3	5,17 (sl)	5,35 (sl)	120,6	120,6
4	---	---	143,7	143,7
5	---	---	37,9	38,2
6	1,71 (d, J=12,7 Hz) 1,20-1,12 (m)	1,21 (m) 1,24 (s)	36,6	33,0
7	1,54-1,38 (m)	1,95 (m) 2,00 (m)	27,4	27,2
8	1,54-1,38 (m)	1,51 (m)	36,2	37,4
9	---	---	38,4	38,4
10	1,30 (dd, J=10,2; 3,5 Hz)	1,43 (m)	46,1	44,6
11	1,65 (td, J=13,6; 4,9 Hz) 1,54-1,38 (m)	1,49 (m) 1,61 (m)	38,5	32,3
12	2,32-2,24 (m) 2,22-2,14 (m)	2,35 (m) 2,45 (m)	18,2	18,9
13	---	---	125,2	123,2
14	6,25 (dd, J=3,2; 0,8 Hz)	6,28 (sl)	110,7	111,0
15	7,35 (dd, J=3,2; 1,6 Hz)	7,35 (sl)	142,3	142,6
16	7,26 (dd, J=1,6; 0,8 Hz)	7,21 (sl)	138,0	138,5
17	0,79 (d, J=5,2 Hz)	0,81	16,1	15,3
18	1,56 (s)	1,98	17,9	20,1
19	0,99 (s)	1,55 (s)	19,8	37,8
20	0,75 (s)	1,07 (s)	18,2	26,9

Fonte: (1) Hagiwara *et al.*, 1995; (2) Costa *et al.*, 1998

Após analisar os dados espectrais e demais informações obtidas conclui-se que o composto RB9 é um isômero do anoneno.

Figura 65: Estrutura proposta para o composto RB9.



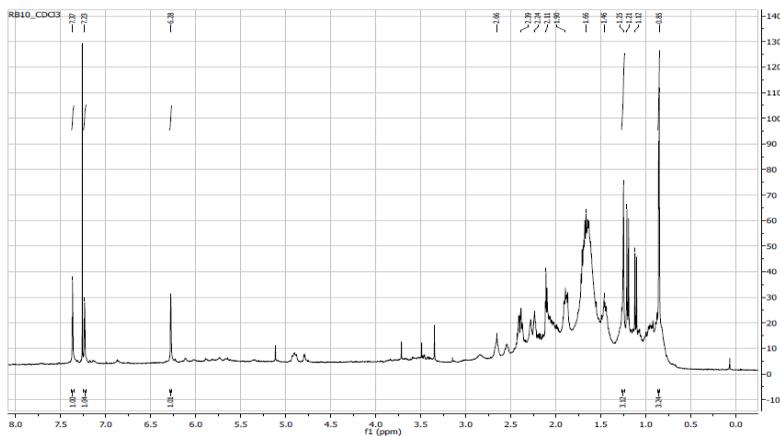
3-[2-(1,2,3,4,4a,7,8,8a-octahydro-1,2,4a,5-tetrametil-1-naftalenil)-etil]-furano

4.4.10 Composto RB10

O composto denominado RB10 (3 mg) foi isolado da fração hexânica da amostra coletada na Ilha das Aranhas. Foi obtido na forma de óleo incolor.

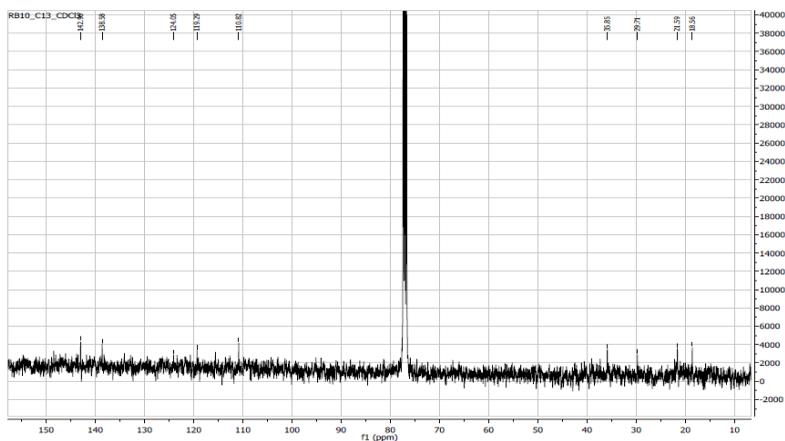
O espectro ^1H RMN (Figura 66) apresenta três sinais de hidrogênios em δ 7,37 (1H, t, $J = 1,6$ Hz), δ 7,23 (1H, s) e δ 6,28 (1H, s), com deslocamentos químicos característicos de anel furano monossustituído. Metilas aparecem em δ 0,85 (3H, d, $J = 2,6$ Hz) e δ 1,25 (3H, s). Dois sinais de hidrogênios acoplados aparecem em δ 1,20 (1H, d, $J = 7,4$ Hz) e δ 1,11 (1H, d, $J = 7,4$ Hz). A região espectral de δ 1,4 a δ 3 apresenta multipletos referentes a grupos metileno (CH_2) e metino (CH).

Figura 66: Espectro de ^1H RMN do composto RB10 (400 MHz, CDCl_3).



O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 67) apresenta em δ 142,9, δ 138,5 e δ 110,8 deslocamentos químicos compatíveis com anel furano entretanto, os demais sinais são pouco visíveis ou ausentes. Pelas características espectrais apresentadas, o composto RB10 pertence à classe dos diterpenos do tipo clerodano. Entretanto, não foi possível sua elucidação estrutural tendo em vista a pouca quantidade e a decomposição da amostra, o que impossibilitou a obtenção dos espectros de RMN adicionais.

Figura 67: Espectro de ^{13}C RMN do composto RB10 (100 MHz, CDCl_3).

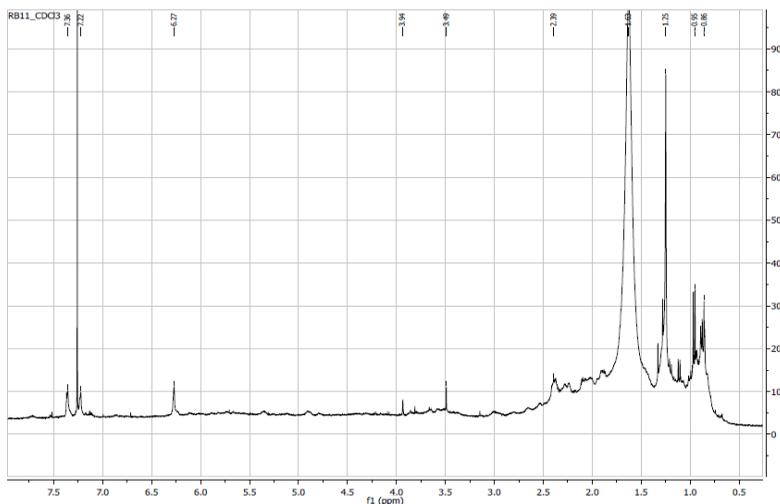


4.4.11 Composto RB11

O composto denominado RB11 (2,1 mg) foi isolado da fração hexânica da amostra coletada na Ilha das Aranhas. Foi obtido na forma de óleo incolor.

O espectro ^1H RMN (Figura 68) apresenta os três sinais de hidrogênios em δ 7,36 (1H, m), δ 7,22 (1H, sl) e δ 6,27 (1H, s), com deslocamentos químicos característicos de anel furano monossustituído. Metilas aparecem em δ 0,85 (3H, s) e δ 1,25 (3H, s). Não foi possível elucidar sua estrutura devido a pouca quantidade e degradação da amostra, o que inviabilizou a obtenção de espectros conclusivos.

Figura 68: Espectro de ^1H RMN do composto RB11 (400 MHz, CDCl_3).



4.4.12 Composto RB12

O composto denominado RB12 (6,3 mg) foi isolado da fração hexânica da amostra coletada na Ilha das Aranhas em forma de óleo. Após análise dos espectros de ^1H , ^{13}C e DEPT RMN, verificou-se que o composto RB12 é o composto RB2, ou seja, o isômero do éster metílico do ácido kerlinico (Figura 69 e 70).

Figura 69: Espectro de ^1H RMN do composto RB12 (400 MHz, CDCl_3).

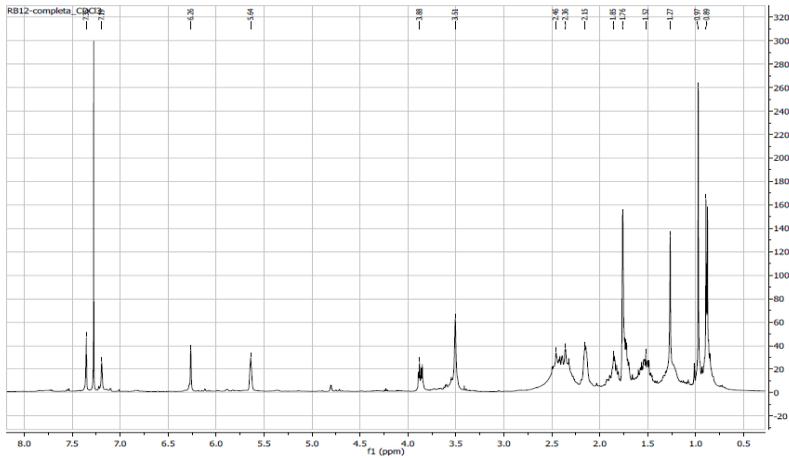
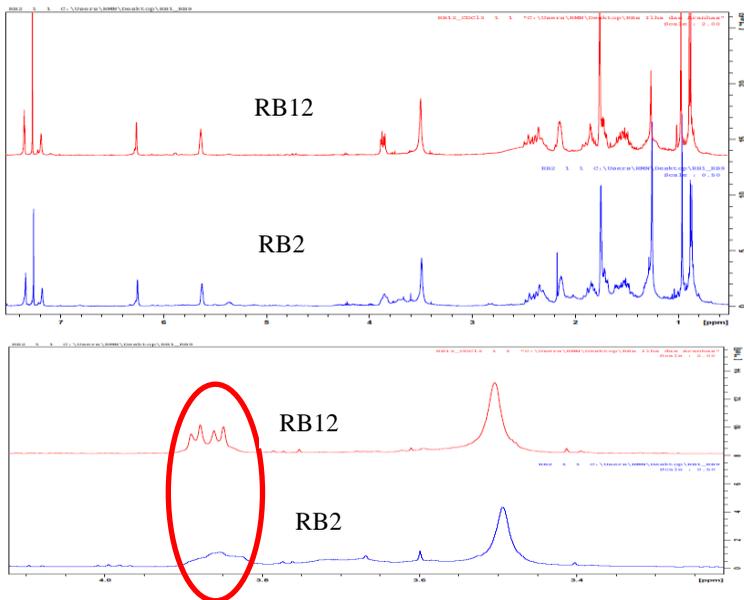
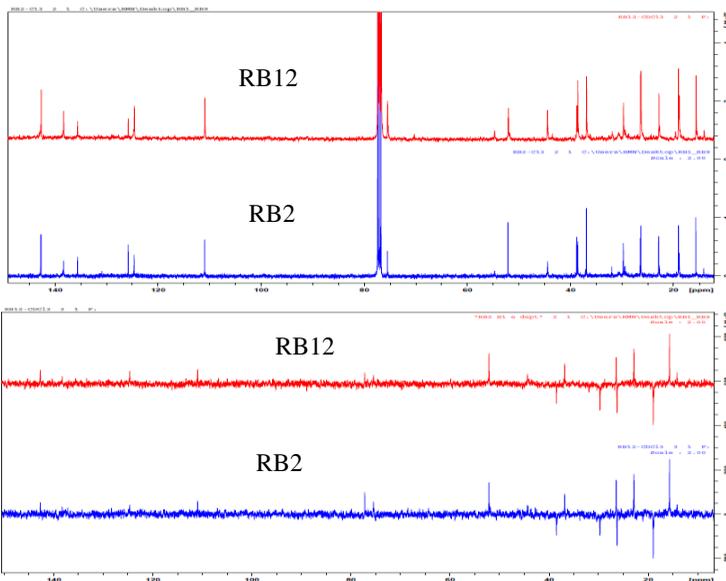


Figura 70: Espectros ^1H , ^{13}C e DEPT RMN comparando os compostos RB12 e RB2.



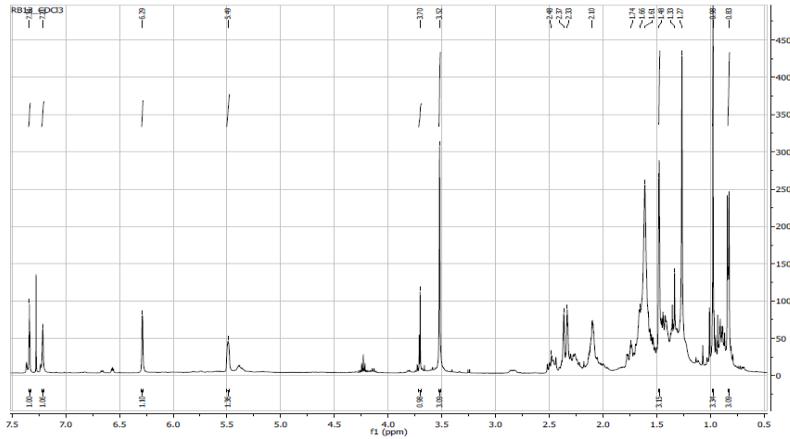


4.4.13 Composto RB13

O composto denominado RB13 (4,1 mg) foi isolado da fração hexânica da amostra coletada na Ilha das Aranhas. Foi obtido na forma de óleo incolor.

O espectro ¹H RMN (Figura 71) apresenta os três sinais dos hidrogênios em δ 7,34 (1H, t, J= 1,6 Hz), δ 7,21 (1H, s) e δ 6,29 (1H, s), com deslocamentos químicos característicos de anel furano monossustituído. O sinal em δ 5,49 (1H, sl) indica a presença de metino olefínico, enquanto que os dois sinais de hidrogênios em δ 3,71 (1H, d, J= 3,6 Hz) e δ 3,52 (3H, s) evidenciam a proximidade com elementos eletronegativos, provavelmente oxigênio. Três sinais relativos a grupos metila aparecem em δ 1,48 (3H, m), δ 0,98 (3H, s) e δ 0,84 (3H, d, J=6,4). Além destes, observa-se uma série de sinais na região entre 1,00 e δ 3,00 relativos a hidrogênios de grupo metino (CH) e grupo metileno (CH₂).

Figura 71: Espectro de ^1H RMN do composto RB13 (400 MHz, CDCl_3).



O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 72) apresenta sinais de carbono na região espectral compreendida entre δ 15,79 e δ 177,8 sendo que o carbono em δ 177,8 tem deslocamento químico compatível com função éster. Os carbonos característicos do anel furano aparecem em δ 142,4, δ 138,5, δ 126,1 e δ 111,1. O espectro RMN DEPT 135 não permitiu verificar o padrão de hidrogenação para todos os carbonos (Figura 73).

Figura 72: Espectro de ^{13}C RMN do composto RB13 (100 MHz, CDCl_3).

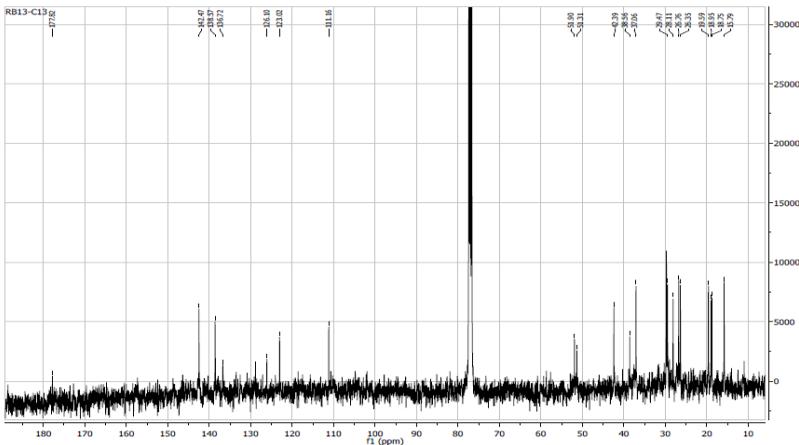
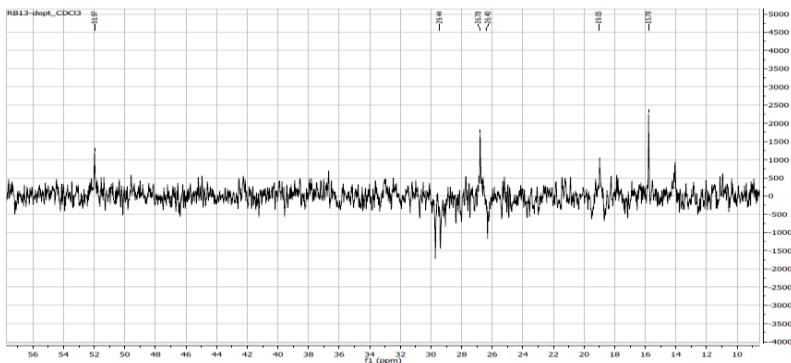
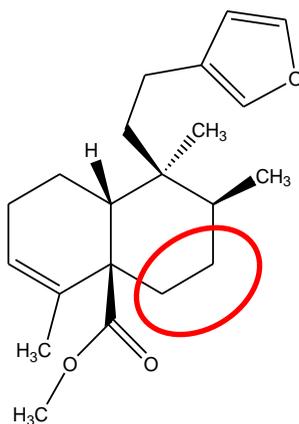


Figura 73: Espectro DEPT 135 do composto RB13 (100 MHz, CDCl_3).



O composto RB13 tem os sinais, no espectro de ^1H RMN, similares aos do composto RB2, entretanto não apresenta hidroxila. Outra diferença observada é a presença de um sinal em δ 3,71 com integração para um hidrogênio. No entanto, esse sinal não apresenta correlações ^1H - ^1H COSY com outros hidrogênios da molécula e não foi possível verificar onde esse hidrogênio conecta-se ou se é uma contaminação. A degradação da amostra inviabilizou a obtenção de espectros complementares. Dessa forma, não foi possível definir a estrutura do composto RB13 e somente propor uma estrutura parcial, ficando os grupos conectados nas posições C-6 e C-7 a esclarecer (Figura 74).

Figura 74: Estrutura parcial proposta para o composto RB13.



4.4.14 Composto RB14

O composto denominado RB14 (4,5 mg) foi isolado da fração hexânica da amostra coletada na Ilha das Aranhas em forma de óleo amarelado. Após análise dos espectros de RMN, verificou-se que o composto RB14 é o composto RB2 (Figura 75 e 76).

Figura 75: Espectro de ^1H RMN do composto RB14 (400 MHz, CDCl_3).

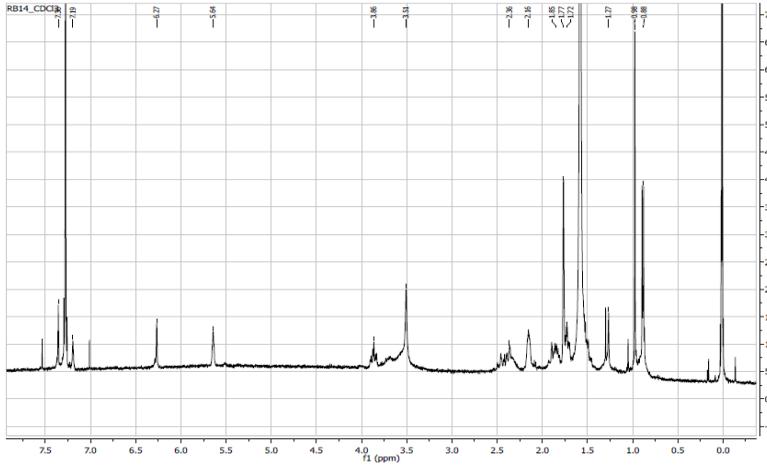
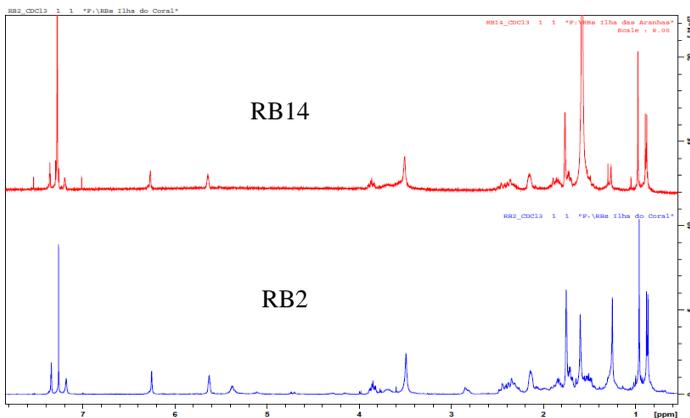


Figura 76: Espectros ^1H RMN comparando os compostos RB14 e RB2.



4.4.15 Composto RB15

O composto denominado RB15 (4,5 mg) foi isolado em forma de óleo amarelado, da fração hexânica da amostra coletada na Ilha das Aranhas.

Após análise do espectro de ^1H RMN (Figura 77), verificou-se que o composto RB15 é uma mistura do composto RB2 com outra substância, que também possui os deslocamentos químicos característicos de diterpeno clerodano (Figura 78). Contudo, não foi possível separá-los devido a pouca quantidade de amostra.

Figura 77: Espectro de ^1H RMN do composto RB15 (400 MHz, CDCl_3).

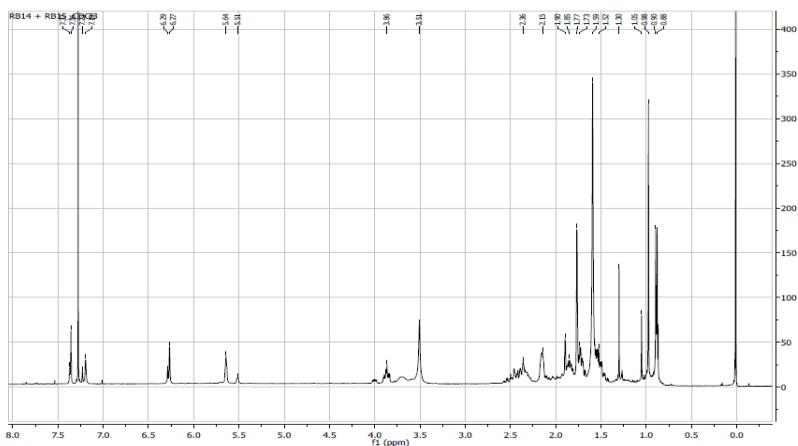
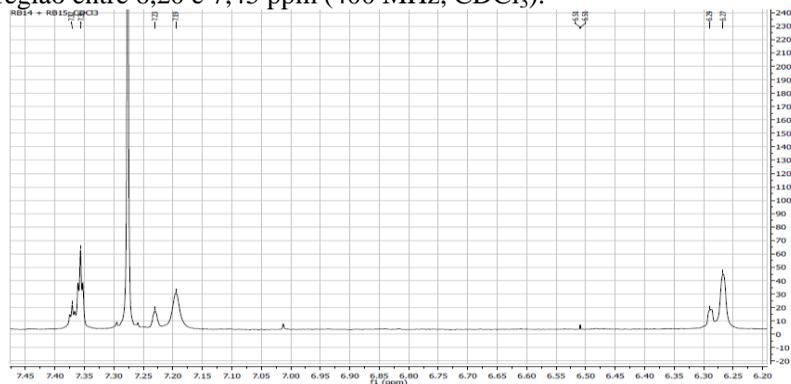


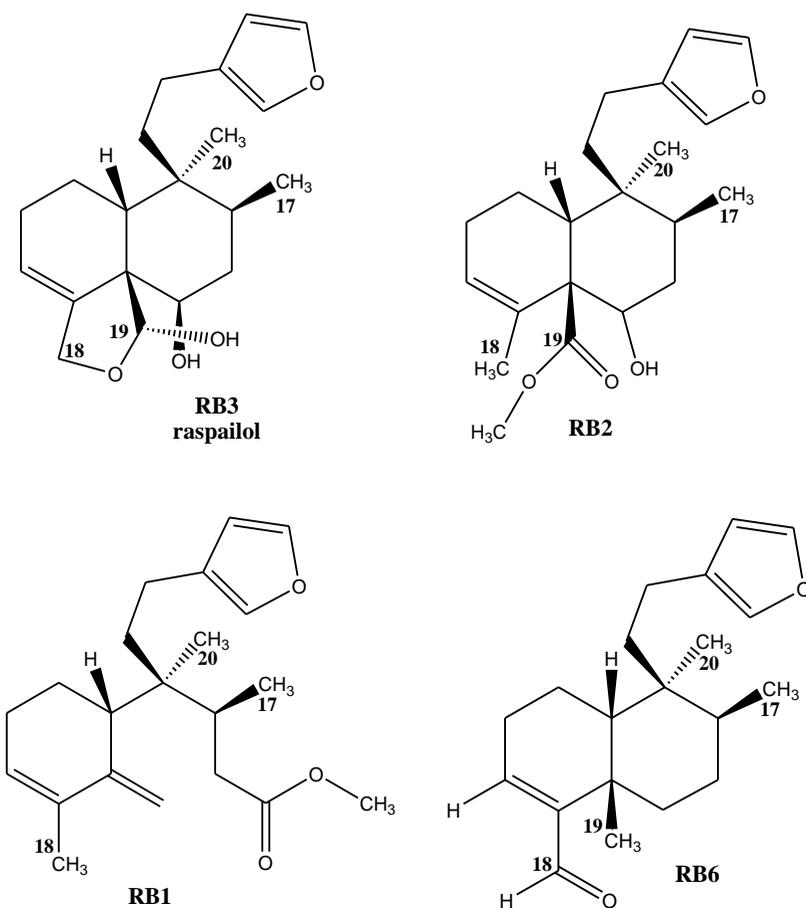
Figura 78: Ampliação do espectro de ^1H RMN do composto RB15, na região entre 6,20 e 7,45 ppm (400 MHz, CDCl_3).

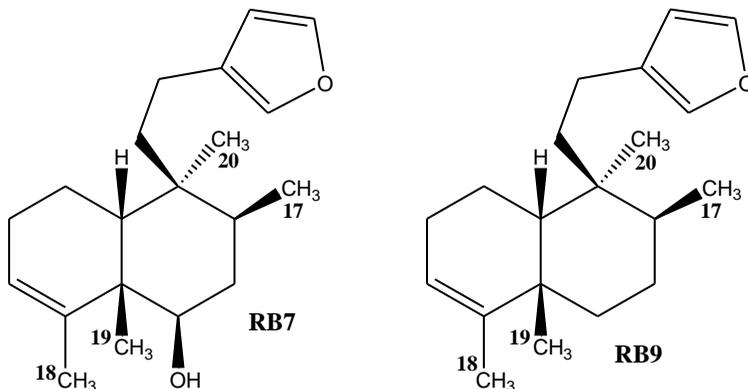


4.4.16 Comparação dos dados espectrais e estereoquímica dos compostos elucidados

Após analisar as estruturas químicas dos compostos elucidados, constatou-se que os seis compostos apresentam o mesmo esqueleto estrutural, sendo que as diferenças encontradas devem-se aos substituintes conectados nas posições C-4, C-5 e C-6 do anel decalínico, como pode ser observado na Figura 79.

Figura 79: Compostos isolados da esponja *Raspailia bouryesnaultae*.





Durante a elucidação estrutural dos compostos isolados verificou-se que os deslocamentos químicos no espectro de ^{13}C RMN, além de fornecerem as informações usuais sobre a estrutura da molécula, também forneceram informações referentes à estereoquímica dos compostos isolados.

Como visto anteriormente, em diterpenos do tipo clerodano quando as metilas C-17 e C-20 estão em configuração relativa *cis*, o deslocamento químico da metila C-20 é aproximadamente 18,0 ppm. Se estas mesmas metilas estão em configuração relativa *trans*, o deslocamento químico da metila C-20 é aproximadamente 26,0 ppm (SANTOS *et al.*, 2007), como pode ser observado na Tabela 19 para os compostos RB3, RB2, RB7 e RB9.

Tabela 19: Deslocamento químico ^{13}C RMN para os compostos isolados, exceto RB6, cujos dados não foram obtidos (100 MHz; CDCl_3).

C	RB1	RB3	RB2	RB7	RB9
1	24,7	19,7	19,1	21,1	19,6
2	24,5	25,8	26,5	27,0	25,8
3	127,5	120,7	124,8	123,9	120,6
4	133,8	139,1	135,5	142,1	143,7
5	145,9	53,4	54,6	47,1	38,2
6	112,3	74,7	75,5	75,7	33,0
7	37,6	38,3	38,8	39,0	27,2
8	36,4	36,8	36,8	37,0	37,4
9	41,0	38,0	38,7	38,0	38,4
10	45,4	40,4	44,4	44,5	44,6
11	35,1	32,8	32,1	31,8	32,3
12	20,5	18,9	18,9	19,3	18,9
13	125,8	126,4	125,7	125,7	123,2
14	110,9	111,1	110,9	110,9	111,0
15	142,7	142,6	142,7	142,7	142,6
16	138,4	138,3	138,3	138,4	138,5
17	15,8	15,7	15,7	15,6	15,3
18	20,4	68,7	22,8	22,7	20,1
19	174,6	99,6	178,5	18,1	37,8
20	22,1	25,2	26,4	28,6	26,9
21	51,4		52,0		

No que se refere à fusão dos anéis A/B na decalina, a configuração também pode ser *cis* ou *trans*. Na fusão *cis* o deslocamento químico da metila C-19, na ausência de outros substituintes, é aproximadamente 33,0 ppm, enquanto que na *trans* pode ocorrer em 20,0 ppm (SANTOS *et al*, 2007). Para o composto RB9, a metila C-19 aparece em 37,8 ppm indicando a configuração *cis*, enquanto que para RB7 é observada em 18,1 ppm o que é explicável pela interação estérica, em vista da hidroxila presente em C-6.

O raspailol (RB3) tem configuração *cis* na fusão dos anéis em C-5:C-10 e configuração *trans* em relação as metilas C-17 e C-20 (WEST; NORTHCOTE; BATTERSHILL, 1998). Portanto, o raspailol é diterpeno clerodano do tipo *cis-trans*. Através da análise dos espectros de ^{13}C RMN constata-se que os compostos RB2, RB7 e RB9 assumem posição *trans* em relação as metilas C-17 e C-20, como o raspailol (Tabela 19).

4.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS COMPOSTOS ISOLADOS

Em 2015 foram realizadas, com os compostos isolados da fração hexânica da esponja *Raspailia bouryeseaultae* coletada na Ilha do Coral, as avaliações biológicas quanto aos efeitos antiproliferativos em células VERO e atividade antiviral frente às cepas KOS e 29R do vírus *Herpes simplex* tipo 1 e triagem antitripanossoma.

O composto RB2 mostrou-se promissor para a atividade antiviral nas duas cepas testadas: KOS (21,24±8,17 e IS 11,41) e 29R (41,93±17,19 e IS 5,8) frente ao vírus *Herpes simplex* tipo 1 (Tabela 20).

Tabela 20: Efeitos antiproliferativos dos compostos isolados em células VERO e atividade antiviral frente às cepas KOS e 29R do vírus *Herpes simplex*-tipo1 após 48 horas de experimento.

	CI ₅₀ (µg/mL)				
	Celulas VERO	HSV-1 Cepa KOS	IS KOS	HSV-1 Cepa 29R	IS 29R
RB1	>250	75,71±20,50	>3,3	>100	-
RB2	245,87 ±46,12	21,24±8,17	11,41	41,93±17,19	5,8
RB3	>250	82,41±21,35	>3,0	>100	-
RB4	>250	>100	-	>100	-
RB5	>250	49,08±10,50	>5,09	76,96±18,12	>3,2

VERO: Fibroblasto de rim de macaco verde da África; CI₅₀: concentração que inibe 50% da replicação viral e/ou celular; IS: Índice de Seletividade = CI₅₀ proliferação celular / CI₅₀ replicação viral. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes.

Em relação à atividade antitripanossoma, os compostos RB2 e RB3 inibiram mais de 50% do crescimento do parasita *Trypanosoma cruzi* (Tabela 21).

Tabela 21: Triagem antiprotozoária dos compostos isolados da esponja *Raspailia bouryesnaultae*.

Amostra	% Inibição de crescimento para <i>Trypanossoma cruzi</i>
RB1	S/A
RB2	89,66±1,88
RB3	77,95±2,62
RB4	31,65±2,16
RB5	12,19±3,83

Triagem realizada na concentração 50 µg/mL. Resultados expressos em percentual de inibição± desvio padrão de três experimentos independentes. S/A= sem atividade.

5. DISCUSSÃO GERAL

Os diterpenos do tipo clerodano foram isolados de várias centenas de espécies de plantas de diferentes famílias, majoritariamente em angiospermas (plantas com flores) e em organismos de outros grupos taxonômicos, tais como fungos, bactérias e esponjas marinhas (MERRITT; LEY, 1992). A Tabela 22 apresenta uma visão geral da distribuição de diterpenos do tipo clerodano na natureza, com base em uma revisão (LI; MORRIS-NATSCHKE; KUO-HSIUNG, 2016) complementada com algumas referências do gênero *Raspailia*.

Tabela 22: Ocorrência de diterpenos clerodanos no reino vegetal e em animais marinhos.

<i>Classe</i>	<i>Família</i>	<i>Gênero</i>	<i>Nº</i>		
Dicotiledôneas	Lamiaceae	<i>Ajuga, Ballota,</i>	81		
		<i>Elsholtzia,</i>			
		<i>Glossocarya,</i>			
		<i>Gomphostemma,</i>			
		<i>Kinostemon, Nepeta,</i>			
		<i>Otostegia,</i>			
		<i>Plectranthus, Salvia,</i>			
		<i>Scutellaria, Teucrium</i>			
		Verbenaceae/ Lamiaceae		<i>Callicarpa,</i>	7
				<i>Clerodendrum,</i>	
	<i>Cornutia, Premma,</i>				
	<i>Vitex</i>				
	Euphorbiaceae	<i>Aparisthmium,</i>	27		
		<i>Cleidion, Croton,</i>			
		<i>Macaranga</i>			
	Compositae ou Asteraceae	<i>Aster, Baccharis,</i>	18		
		<i>Conyza,</i>			
		<i>Haplopappus,</i>			
		<i>Microglossa,</i>			
		<i>Nannoglottis,</i>			
		<i>Pulicaria</i>			
	Flacourtiaceae/ Salicaceae	<i>Casearia, Laetia,</i>	16		
		<i>Zuelania</i>			
	Menispermaceae	<i>Burasaia,</i>	10		
		<i>Fibraurea,</i>			
		<i>Tinospora</i>			
	Annonaceae	<i>Polyalthia</i>	7		
	Portulacaceae	<i>Portulaca</i>	3		

Monocotiledôneas	Caesalpiniaceae	<i>Detarium,</i> <i>Hymenaea</i>	2
	Meliaceae	<i>Amoora</i>	2
	Araliaceae	<i>Cussonia</i>	1
	Chrysobalanaceae	<i>Licania</i>	1
	Combretaceae	<i>Bucida</i>	1
	Loganiaceae/Stilbaceae	<i>Nuxia</i>	1
	Mimosaceae	<i>Entada</i>	1
	Rutaceae	<i>Clausena</i>	1
	Dioscoreaceae	<i>Dioscorea</i>	2
	Alismataceae	<i>Echinodorus</i>	1
	Hydrocharitaceae	<i>Halophila</i>	1
	Gleicheniaceae	<i>Dicranopteris</i>	5
	Geocalycaceae	<i>Heteroscyphus</i>	2
	Jungermanniaceae	<i>Jamesoniella</i>	2
	Scapaniaceae	<i>Scapania</i>	2
Marinhos	Adelanthaceae	<i>Adelanthus</i>	1
	Lejeuneaceae	<i>Thysananthus</i>	1
	Espunja marinha	<i>Agelas</i>	3
	Espunja marinha	<i>Raspailia</i>	2
	Molusco marinho	<i>Syphonota</i>	1

Fonte: adaptado LI *et al.*, 2016.

No que diz respeito ao isolamento de diterpenos do tipo clerodano em organismos marinhos, encontram-se poucos trabalhos publicados. Em recente revisão sobre compostos dessa classe (LI; MORRIS-NATSCHKE; KUO-HSIUNG, 2016), que cobre o período compreendido entre 1990 e 2015, foram citados apenas quatro espécies sendo três esponjas marinhas do gênero *Agelas* e um molusco marinho do gênero *Syphonota*.

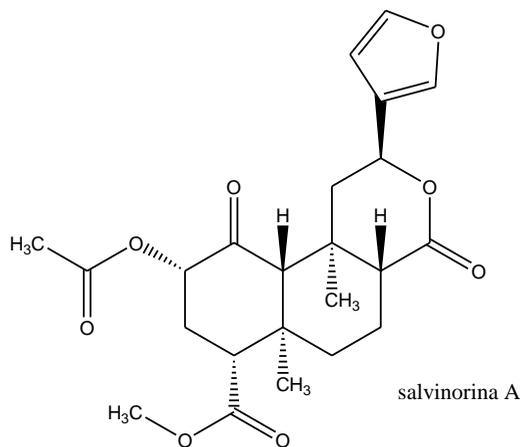
Entretanto, existem ao menos mais duas esponjas marinhas do gênero *Raspailia* (*Raspailia sp* e *Raspailia topsenti*) das quais já foram isolados diterpenos do tipo clerodano. Os compostos denominados asmarinas A-K foram isolados de *Raspailia sp* coletada em três diferentes localidades: Mar Vermelho: asmarinas A-F; Oceano Índico: asmarinas G e H; Costa de Madagascar: asmarinas I, J e K (Figura 5, p. 37) (YOSIEF *et al.*, 1998; YOSIEF; RUDI; KASHMAN, 2000; RUDI *et al.*, 2004). Da esponja *Raspailia topsenti* foram isolados o raspailol, as raspailononas A e B, os raspailodanos A-G e os topsentanos A e B,

entre outros (Figura 7, p. 39) (WEST; NORTHCOTE; BATTERSHILL, 1998; RYAN, 2007; MORAES, 2006).

Nos últimos anos, os diterpenos do tipo clerodano têm atraído interesse devido às suas notáveis atividades biológicas (GEBBINCK *et al.*, 2002; LI; MORRIS-NATSCHKE; KUO-HSIUNG, 2016), como por exemplo, as atividades apresentadas pelos compostos asmarinas A e B, salvinorina A e clerodicina. De particular interesse, destacam-se os asmarinas A e B que demonstraram atividade antiproliferativa contra linhagens de células de câncer humano (pulmão, cólon e melanoma) e foram isolados de esponjas marinhas *Raspailia sp* (Figura 5, p. 37) (YOSIEF *et al.*, 1998; 2000).

Da planta *Salvia divinorum* foi isolada a salvinorina A (Figura 80), cujos ensaios *in vitro* e *in vivo* indicaram ser um agonista pleno dos receptores κ opióides, responsável pelos efeitos analgésico e psicotomimético. Esta planta possui propriedades alucinógenas e é utilizada pelos Mazatecas, povo indígena de uma região do estado de Oaxaca (sul do México), em seus rituais místico-religiosos (McCURDY *et al.*, 2006).

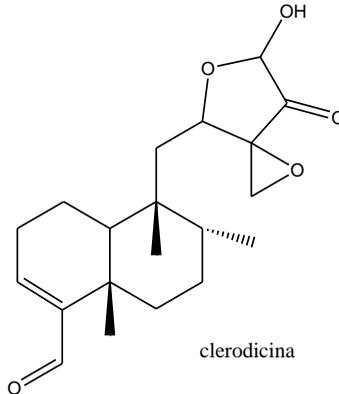
Figura 80: Estrutura química da salvinorina A.



Clerodicina (Figura 81) é um potente fármaco antibacteriano e antitumoral. A clerodicina foi isolada do fungo *Oidiodendron truncatum* e mostrou amplo espectro de atividade contra microrganismos *Gram-*

positivo e *Gram-negativo*, bem como atividade contra leucemia P 388 em ratos (ANDERSEN; RASMUSSEN, 1984).

Figura 81: Estrutura química da clerodicina.



Os diterpenos do tipo clerodano apresentam, com muita frequência, a propriedade antialimentar para insetos. Até o momento, mais de 400 clerodanos naturais e semi-sintéticos foram investigados em laboratório, obtendo-se vários compostos com potente atividade antialimentar contra várias espécies de insetos (GEBBINCK *et al.*, 2002).

6. CONCLUSÃO

A esponja marinha *Raspailia bouryesnaultae* foi coletada em dois locais distintos da costa catarinense, sendo uma coleta na Ilha do Coral em maio de 2014 e uma coleta na Ilha das Aranhas em maio de 2016.

Do material coletado na Ilha do Coral foi possível o isolamento de oito compostos, enquanto que do material coletado na Ilha das Aranhas foram isolados nove compostos, sendo que cinco já haviam sido isolados do material coletado na Ilha do Coral. Portanto, foram isolados doze compostos:

- RB1, RB2, RB3, RB6 e RB8 - foram isolados nas duas coletas;
- RB4, RB5 e RB7 - foram isolados somente na coleta da Ilha do Coral;
- RB9, RB10, RB11 e RB13 - foram isolados somente na coleta da Ilha das Aranhas.

Os compostos isolados pertencem à classe dos diterpenos do tipo clerodano.

A acumulação de diterpenos do tipo clerodano já havia sido encontrada em outras espécies do mesmo gênero.

As amostras coletadas em locais e anos diferentes apresentaram o mesmo esqueleto químico estrutural, com mudanças pontuais nos grupos conectados nas posições C-4, C-5 e C-6.

A variação observada na produção dos metabólitos secundários de uma mesma espécie de esponja marinha, coletada em diferentes locais, pode ocorrer devido ao ambiente físico no qual a esponja se encontra (tais como luminosidade, temperatura, pressão, quantidade relativa dos diversos elementos químicos presentes na água) e ao ambiente biológico, ou seja, as interações de parasitismo, competição ou predação às quais a esponja está sujeita (CARRARO, 2012).

Nas duas coletas o raspailol (RB3) foi o composto majoritário. Essa substância foi descrita na literatura em 1998, por West e colaboradores e foi isolado de esponja *Raspailia sp.*, coletada na Nova Zelândia. Posteriormente, o raspailol também foi isolado da esponja *Raspailia topsenti*, igualmente coletada na Nova Zelândia.

O composto denominado RB2, foi identificado como isômero do éster metílico do ácido kerlínico. O composto ácido kerlínico foi isolado inicialmente da planta *Salvia keerlii* e no processo de elucidação estrutural foi descrito também seu éster metílico, obtido através de reação de esterificação.

O composto denominado RB9 foi identificado como sendo um isômero do anoneno, substância anteriormente isolada da planta *Annona coriácea*.

O composto denominado RB6 foi isolado em pequena quantidade (1 mg) e foi identificado como sendo um aldeído derivado do anoneno através de comparação com dados da literatura.

O composto denominado RB7, foi identificado como isômero do 6-hidroxiannoneno, o qual foi isolado anteriormente de *Croton sonderianus* conhecido como “marmeleiro preto”.

Nas bases de dados não foram encontradas referências de compostos com a estrutura proposta para o composto RB1, sendo provavelmente um composto inédito. Também não foram encontradas publicações sobre o isolamento de RB2 de produtos naturais, já que RB2 (éster metílico do ácido kerlínico) foi obtido a partir do ácido kerlínico.

Na triagem de atividades biológicas:

- Coleta Ilha do Coral - as frações etanólica e hexânica apresentaram atividade antitripanossoma na forma tripomastigota e a fração etanólica apresentou atividade anti-herpética *in vitro*;
- Coleta Ilha das Aranhas - a fração acetato de etila apresentou atividade antitripanossoma na forma tripomastigota e as frações etanólica e acetato de etila apresentaram atividade anti-herpética *in vitro*;
- Os compostos RB2 e RB3 apresentaram promissora atividade antitripanossoma;
- RB2 apresentou atividade anti-herpética na concentração $21,24 \pm 8,17$ para cepa KOS (IS=11,41) e $41,93 \pm 17,19$ para cepa 29R (IS=5,8) do vírus *Herpes simplex* tipo 1.

Para as atividades citotóxica, antibacteriana e antifúngica não foram observados resultados promissores para as frações e para os compostos isolados.

Não foram encontrados na literatura dados sobre estudos desse tipo de atividade para a esponja *Raspailia bouryesnaultae*.

As substâncias isoladas estão sendo relatadas pela primeira vez para a espécie, sendo que este é o primeiro estudo químico da esponja *Raspailia bouryesnaultae*.

Tendo em vista as variações químicas observadas em função do local de coleta da esponja *Raspailia bouryesnaultae* e os resultados obtidos em relação às atividades biológicas, a continuidade dos estudos desta espécie contribuirá para a identificação dos demais compostos isolados e para a avaliação do potencial farmacológico dos mesmos.

REFERÊNCIAS

- AKHILA, A.; RANI, K.; THAKUR, R.S. Biosynthesis of the clerodane furano-diterpene lactone skeleton in *Tinospora cordifolia*. **Phytochemistry**, v.30, n.8, p.2573-2576, 1991.
- AMADOR, M.L.; JIMENO, L.; PAZ-ARES, L.; CORTES-FUNES, H.; HIDALGO, M. Progress in the development and acquisition of anticancer agents from marine sources. **Annals of Oncology**, v. 14, p. 1607-1615, 2003.
- ANDERSEN, N.R.; RASMUSSEN, P.R. The constitution of clerodicin a new antibiotic isolated from *Iodiendron truncatum*. **Tetrahedron Letters**, v. 25, n. 4, p. 465-468, 1984.
- BAKER, D.D.; CHU, M.; OZA, U.; RAJGARHIA, V. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Natural Products Reports**, v. 24, p. 1225-1244, 2007.
- BERGMANN, W.; FEENEY, R.J. Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. **Journal of Organic Chemistry**, v.16, p. 981-987, 1951.
- BERGMANN, W.; WATKINS, J.C.; STEMPIEN, H.F. Contributions of the study of marine products, XIV, Sponges nucleic acids. **Journal of Organic Chemistry**, v. 22, p. 1308, 1957.
- BERLINCK, R.G.S.; HAJDU, E.; ROCHA, R.M.; OLIVEIRA, J.H.H.L.; HERNÁNDEZ, I.L.C.; SELEGHIM, M.H.R.; GRANATO, A.C.; ALMEIDA, E.V.R.; NUÑEZ, C.V.; MURICY, G.; PEIXINHO, S.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; CAVALCANTI, B.C.; NASCIMENTO, G.G.F.; THIEMANN, O.; SILVA, M.; SOUZA, A.O.; SILVA, C.L.; MINARINI, P.R.R. Challenges and rewards of research in marine natural products chemistry in Brazil. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 3, p. 510-522, 2004.
- BIANCO, E.M. ; OLIVEIRA, S.Q. ; RIGOTTO, C.B. ; TONINI, M.L. ; GUIMARÃES, T.R. ; BITTENCOURT, F. ; GOUVÊA, L.P. ; ARESI, C. ; ALMEIDA, M.T.R. ; MORITZ, M.I.G. ; MARTINS, C.D.L.; SCHERNER, F. ; CARRARO, J.L. ; HORTA, P.A. ; REGINATTO,

F.H.; STEINDEL, M.; SIMÕES, C.O. ; SCHENKEL, E.P. Anti-Infective Potential of Marine Invertebrates and Seaweeds from the Brazilian Coast. **Molecules** (Basel. Online), v. 18, p. 5761-5778, 2013.

BLUNT, J.W.; COPP, B.R.; KEYZERS, R.A.; MUNRO, M.H.G.; PRINSEP, M.R. Marine natural products. **Natural Products Reports**, v.31, p. 160-258, 2014.

BLUNT, J.W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R.A.; MUNRO, M.H.G.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 2, p. 116-211, 2015.

BUSS, A.D.; BUTLER, M.S. Natural Product Chemistry for Drug Discovery. **Royal Society of Chemistry Publishing**. Cambridge, United Kingdom, 2010.

CARRARO, J.L.F. Esponjas marinhas do Sul do Brasil: estrutura das assembléias, interações e biodiversidade. 2012. 104f. **Tese** (Doutorado em Ecologia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2012.

CARTÉ, B.K. Biomedical Potencial of Marine Natural Products. **BioScience**, v. 46, n. 4, p. 271-286, 1996.

CERDA-GARCIA-ROJAS, C.M.; FAULKNER, D.J. Cyclic Hemiketals from the Sponge *Raspailia* (*Raspaxilla*) *sp.* **Tetrahedron**, v. 51, n. 4, p. 1087-1092, 1995.

CHIN, Y.W.; BALUNAS, M.J.; CHAI, H.B.; KINGHORN, A.D. Drugs Discovery from Natural Sources, **The AAPS Journal**, v. 8, n.2, p. 239-253, 2006.

COSTA-LOTUFO, L.V.; WILKE, D.V.; JIMENEZ, P.C.; EPIFANIO, R.A. Organismos Marinhos como fonte de novos fármacos: Histórico e Perspectivas. **Química Nova**, v. 32, p. 703-716, 2009.

COSTA, M.; FUJIWARA, F.Y.; IMAMURA, P.M. Assignment of ^{13}C NMR data of methyl (+)-hardwickiate and its derivatives. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 36, p. 542-544, 1998.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

DA SILVA, A.C. Triagem da potencial atividade antiviral de Produtos Marinhos: esponjas coletadas na costa brasileira e compostos de organismos marinhos. **Dissertação (Mestrado)**- Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2005. 100 p.

DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**, 2nd ed. West Sussex: John Wiley, 2002.

DIAS, D.A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v.2, p.303-306, 2012.

DONIA, M.; HAMANN, M.T. Marine natural products and their potential applications in anti-infective agents. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 6, p. 338-348, 2003.

FAULKNER, D. J. Marine natural products. **Natural Products Reports**, v. 18, p. 1-49, 2001.

FERRARI, M.; PELIZZONI, F. New diterpenoids with clerodane skeleton. **Pergamon**, v. 10, p. 3267-3269, 1971.

FREITAS, A.C.; RODRIGUES, D.; ROCHA-SANTOS, T.A.P.; GOMES, A.M.P.; DUARTE, A.C. Marine biotechnology advances towards applications in new functional foods. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1506-1515, 2012.

GEBBINCK, E.A.K.; JANSEN, B.J.M; GROOT, A. Insect antifeedant activity of clerodane diterpenes and related model compounds. **Phytochemistry**, v. 61, p. 737-770, 2002.

GERWICK, W.H.; MOORE, B.S. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. **Chemistry & Biology**, v.19, p. 85-98, 2012.

GUELLA, G.; MANCINI, I.; PIETRA, F. (+) - Raspailyne-A, a Novel, Acid-sensitive Acetylenic Enol Ether Glyceride from the Marine Sponge *Raspailia pumila*. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, p. 77-78, 1986.

GUIMARÃES, R.T.; QUIROZ, C.G.; BORGES, C.R.; DE OLIVEIRA, S.Q.; DE ALMEIDA, M.T.R.; BIANCO, E.M.; MORITZ, M.I.G.; CARRARO, J.L.; PALERMO, J.A.; CABRERA, G.; SCHENKEL, E.P.; REGINATTO, F.H.; SIMÕES, C.M.O. Anti HSV-1 Activity of Halistanol Sulfate and Halistanol Sulfate C Isolated from Brazilian Marine Sponge *Petromica citrina* (*Demospongiae*). **Marine Drugs**, v. 11, p. 4176-4192, 2013.

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

HAGIWARA, H.; INOME, K.; UDA, H.J. A total synthesis of an antibacterial clerodane, 16-hydroxycyclohexa-3,13(14) Z-dien-15,16-olide. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, p. 757-764, 1995.

HESTER, R.E; HARRISON, R.M. Chemistry in the marine environment. Cambridge: **The Royal Society of Chemistry**, 2000.

JOY, P.P.; THOMAS, J.; MATHEW, S.; SKARIA, B.P. Medicinal plants. **Kerala Agricultural University** – Aromatic and medicinal plants research station. Keral, India, 1998.

KELECOM, A. Chemistry of marine natural products: Yesterday, today and tomorrow. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 71, n. 2, p. 249-263, 1999.

KIJJOA, A.; SAWANGWONG, P. Drugs and Cosmetics from the Sea. **Marine Drugs**, v. 2, p. 73-82, 2004.

LANG, K.L. Investigação química e biológica da alga vermelha *Acanthophora spicifera* (Vahl) Borgesen. **Dissertação** (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2006. 136p.

LERNER, C.; CARRARO, J.L.; SOEST, R.V. *Raspailia (Raspaxilla) bouryesnaultae*, a new name for Brazilian *Raspaxilla elegans* Boury-Esnault, 1973 (*Demospongiae, Poecilosclerida, Raspailleidae*) with a redescription and a new record. **Zootaxa**, v. 1129, p. 37-45, 2006.

LEAL, M.C.; MADEIRA, C.; BRANDÃO, C.A.; PUGA, J.; CALADO, R. Bioprospecting of marine invertebrates for new natural products – A chemical and zoogeographical perspective. **Molecules**, v. 17, p. 9842-9854, 2012.

LI, R.; MORRIS-NATSCHKE, S.L.; KUO-HSIUNG, L. Clerodane diterpenes: sources, structures, and biological activities. **Natural Product Reports**, v. 33, n.10, 1166-1226, 2016.

LHULLIER, C. Triagem de macroalgas bênticas do litoral de Santa Catarina biomonitorada pelo ensaio de letalidade para larvas de *Iartema salina* e investigação fitoquímica de *Pteroclaidiella capilacea*. **Dissertação (Mestrado)** - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2005. 89p.

LHULLIER, C. Investigação química de espécies do gênero *Laurencia* Lamourox na costa sul brasileira. **Tese (Doutorado)** - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2009, 291p.

MACIEL, M.A.M.; CORTEZ, J.K.P.C.; GOMES, F.E.S. O Gênero *Croton* e Aspectos Relevantes de Diterpenos Clerodanos. **Revista Fitos**, v. 2, n. 3, p. 54-72, 2006.

MANN, J.; DAVIDSON, R.S.; HOBBS, J.B.; BANTHORPE, D.V.; HARBOURNE, J.B. **Natural Products, Their Chemistry and Biological Significance**, 1st ed.; Longman Scientific and Technical Longman Group: London, UK, 1994.

MARTINS, A.; VIEIRA, H.; GASPAR, H.; SANTOS, S. Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: tips for success. **Marine Drugs**, v.12, p. 1066-1101, 2014.

MAYER, A.M.S.; GLASER, K.B.; CUEVAS, C.; JACOBS, R.S.; KEM, W.; LITTLE, D.; MCINTOSH, J.M.; NEWMAN, D.J.; POTTS, B.C.; SHUSTER, D.E. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 31, p. 255-265, 2010.

McCURDY, C.R.; SUFKA, K.J.; SMITH, G.H.; WARNICK, J.E.; NIETO, M.J. Antinociceptive profile salvinorin A, a structurally unique kappa opioid receptor agonist. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 83, p. 109-113, 2006.

MEHBUB, M.F.; LEI, J.; FRANCO, C.; ZHANG, W. Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: trends and opportunities for discovery of bioactives. **Marine Drugs**, v.12, p. 4539-4577, 2014.

MERRITT, A.T; LEY, S.V. Clerodane diterpenoids. **Natural Product Reports**, n.9, p. 243-287, 1992.

MOLINSKI, T.F.; DALISAY, D.S.; LIEVENS, S.L.; SALUDES, J.P. Drug development from marine natural products. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.8, p. 69-85, 2009.

MONKS, N. R.; LERNER, C.; HENRIQUES, A. T.; FARIAS, F. M.; SCHAPOVAL, E. E. S.; SUYENAGA, E. S.; DA ROCHA, A. B.; SCHWARTSMANN, G.; MOTHES, B. Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine sponges collected off the coast of Santa Catarina, southern Brazil. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.281, p. 1-12, 2002.

MORAES, G. The Isolation and Structure Elucidation of Novel, Anti-inflammatory Secondary Metabolites from New Zealand Marine Invertebrates, **PhD thesis**, Victoria University of Wellington, 2006.

MORITZ, M.I.G. Investigação química de organismos marinhos do sul do Brasil e da Argentina. **Tese** (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de P s-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2014, 141p.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MULLER, W.E.G. Molecular phylogeny of Eumetazoa: experimental evidence for monophyly of animals based in sponges (Porífera). **Progress in Molecular Subcellular Biology**, v. 19, p. 98-132, 1998.

NATIONAL OCEANIC AND ATMOSPHERIC ADMINISTRATION: United States Department of Commerce. **Ocean**. Disponível em: <<http://www.noaa.gov/ocean.html>>. Acesso em : 15 Set. 2016.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1216-1238, 2004.

PEREIRA, R.C.; SOARES-GOMES, A. *Biologia Marinha*. Rio de Janeiro: **Interciência**, 2002.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos Naturais: Atualidades, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

RAMAWAT, K.G.; MERILLON, J.M. Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes. **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, p. 3174-3189, 2013.

RANGEL, M.; SANCTIS, B.; FREITAS, J.C.; POLATTO, J.M.; GRANATO, A.C.; BERLINCK, R.G.S.; HAJDU, E. Cytotoxic and neurotoxic activities in extracts of marine sponges (Porifera) from southeastern Brazilian coast. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 262, p. 31-40, 2001.

RODRÍGUEZ-HAHN, L.; GARCÍA, A.; ESQUIVEL, B.; CÁRDENAS, J. Structure of kerlinic acid from *Salvia keerlii*. Chemical correlation with melisodoric acid. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 65, p. 2687-2690, 1987.

RUDI, A.; AKNIN, M.; GAYDOU, E.; KASHMAN, Y. Asmarines I, J, and K and Nosyberkol: Four New Compounds from the Marine Sponge *Raspailia sp.* **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1932-1935, 2004.

RUDI, A.; SHALOM, H.; SCHLEYER, M.; BENAYAHU, Y.; KASHMAN, Y. Asmarines G and H and Barekol, Three New Compounds from the Marine Sponge *Raspailia sp.* **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 106-109, 2004.

RYAN, J.M. Novel Secondary Metabolites from New Zealand Marine Sponges, **PhD thesis**, Victoria University of Wellington, 2007.

SALEEM, M.; ALI, M.S.; HUSSAIN, S.; JABBAR, A.; ASHRAF, M.; LEE, T.S. Marine natural products of fungal origin. **Natural Product Reports**, v. 24, p. 1142-1152, 2007.

SANTOS, A.G.; PEREZ, C.C.; TININIS, A.G.; BOLZANI, V.S.; CAVALHEIRO, A.J. Clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Swartz. **Quimica Nova**, v. 30, n. 5, p. 1100-1103, 2007.

SANTOS, A.D.; FERREIRA, P.M.P.; JUNIOR, G.M.V.; PEREZ, C.C.; TININIS, A.G.; SILVA, G.H.; BOLZANI, .S.; COSTA-LOTUFO, L.V.; PESSOA, C.O; CAVALHEIRO, A.J. Casearin X, Its Degradation Product and Other Clerodane Diterpenes from Leaves of *Casearia sylvestris*: Evaluation of Cytotoxicity against Normal and Tumor Human Cells. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, p. 205-215, 2010.

SCHMIDT, B.; RIBNICKY, D.M.;POULEV, A.; LOGENDRA, S.; CEFALU, W.T.; RASKIN,I. A natural history of botanical therapeutics. **Metabolism**, v. 57, n. 7, p. 1-12, 2008.

SCHMITZ, F.J.; GUNASEKERA, S.P.; YALAMANCHILI, G.; HOSSAIN, M.B.; HELM, D.V. Tedanolide: a potent cytotoxic macrolide from the Caribbean sponge *Tedania ignis*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 106, n. 23, p. 7251-7252, 1984.

SILVA, A.C.; KRATZ, J.M.; FARIAS, F.M.; HENRIQUES, A.T.; SANTOS, J.; LEONEL, R.M.; LERNER, C.; MOTHE, B.; BARARDI, C.R.M.; SIMÕES, C.M.O. In Vitro Antiviral Activity of Marine

Sponges Collected of Brazilian Coast. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 1, p. 135-140, 2006.

SILVEIRA, E.R.; MCCHESENEY, J.D. 6,7-Oxygenated neo-clerodane furan diterpenes from *Croton sonderianus*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 6, p. 1457-1463, 1994.

SOEST, R.W.M.; BOURY-ESNAULT, N.; VACELET, J.; DOHRMANN, M.; ERPENBECK, D.; VOOGD, N.J.; SANTODOMINGO, N.; VANHOORNE, B.; KELLY, M.; HOOPER, J. N.A. **Global Diversity of Sponges** (Porifera). Disponível em: www.plosone.org. Acesso em: 13 Agos. 2016.

SOEST, R.W.M.; BOURY-ESNAULT, N.; HOOPER, J.N.A.; RÜTZLER, K.; DE VOOGD, N.J.; ALVAREZ DE GLASBY, B.; HAJDU, E.; PISERA, A.B.; MANCONI, R.; SCHOENBERG, C.; JANUSSEN, D.; TABACHNICK, K.R.; KLAUTAU, M.; PICTON, B.; KELLY, M.; VACELET, J.; DOHRMANN, M.; DÍAZ, M.C.; CÁRDENAS, P. **World Porifera database**: World Register of Marine Species. Disponível em: www.marinespecies.org/porifera. Acesso em: 18 Set. 2016.

TAKAHASHI, S.; KUSUMI, T.; KAKISAWA, H. Total synthesis of (+₁-) – annonene, a trans-clerodane diterpene. **Chemistry Letters**, p. 515-518, 1979.

TOKOROYAMA, T. Synthesis of Clerodane Diterpenoids and Related Compounds – Stereoselective Construction of the Decalin Skeleton with Multiple Contiguous Stereogenic Centers. **Synthesis**, n. 5, p. 611-633, 2000.

TORSSELL, K.G.B. The melavonic acid pathway. New York: John Wiley, 189, 1983.

VIK, A.; GUNDERSEN, L.L. Synthetic studies directed towards asmarines; construction of the tetrahydrodiazepinopurine moiety by ring closing metathesis. **Tetrahedron Letters**, v. 48, p. 1931-1934, 2007.

VOGEL, G. The Inner Lives of Sponges. **Science**, v.320, p. 1028-1030, 2008.

VON POSER, G.L.; MENTZ, L.A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. in SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento, 6ª ed., Porto Alegre/Florianópolis, Brasil, Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 75-89, 2007.

WEST, L.M.; NORTHCOTE, P.T.; BATTERSHILL, C.N. Two New Clerodane Diterpenes from the New Zealand Marine Sponge *Raspailia* sp. **Australian Journal of Chemistry**, v. 51, p. 1097-1101, 1998.

WILLIAMS, R.B; NORRIS, A.; MILLER, J.S.; BIRKINSHAW, C.; RATOVOSON, F.; ANDRIANTSIFERANA, R.; RASAMISON, V.E.; KINGSTON, D.G.I. Cytotoxic Clerodane Diterpenoids and Their Hydrolysis Products from *Casearia nigrescens* from the Rainforest of Madagascar. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 206-209, 2007.

WOJNAR, J.M.; NORTHCOTE, P.T. The Agminosides: Naturally Acetylated Glycolipids from the New Zealand Marine Sponge *Raspailia agminata*. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 69-73, 2011.

World Porifera Database. Percentual species diversity of the four classes of sponges. Disponível em: www.marinespecies.org/porifera. Acesso em: 31 Ago. 2016.

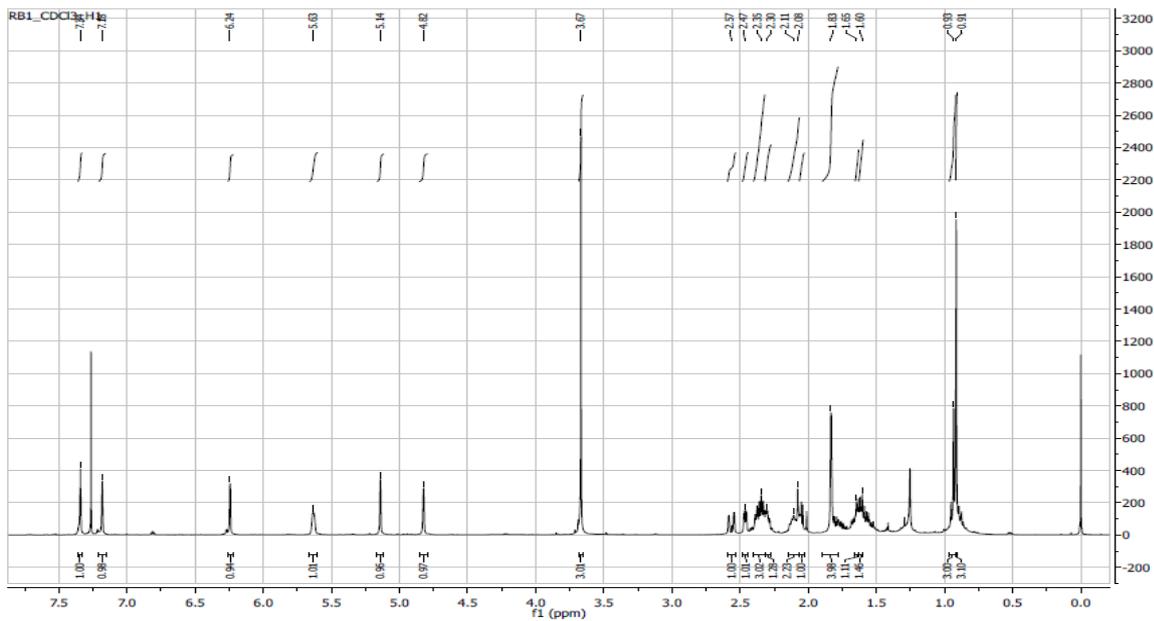
YOSIEF, T.; RUDI, A.; STEIN, Z.; GOLDBERG, I.; GRAVALOS, G.M.D.; SCHLEYER, M.; KASHMAN, Y. Asmarines A-C; Three novel cytotoxic metabolites from the marine sponge *Raspailia* sp. **Tetrahedron Letters**, v. 39, p. 3323-3326, 1998.

YOSIEF, T.; RUDI, A.; KASHMAN, Y. Asmarines A-F, Novel Cytotoxic Compounds from the Marine Sponge *Raspailia* Species. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 299-304, 2000.

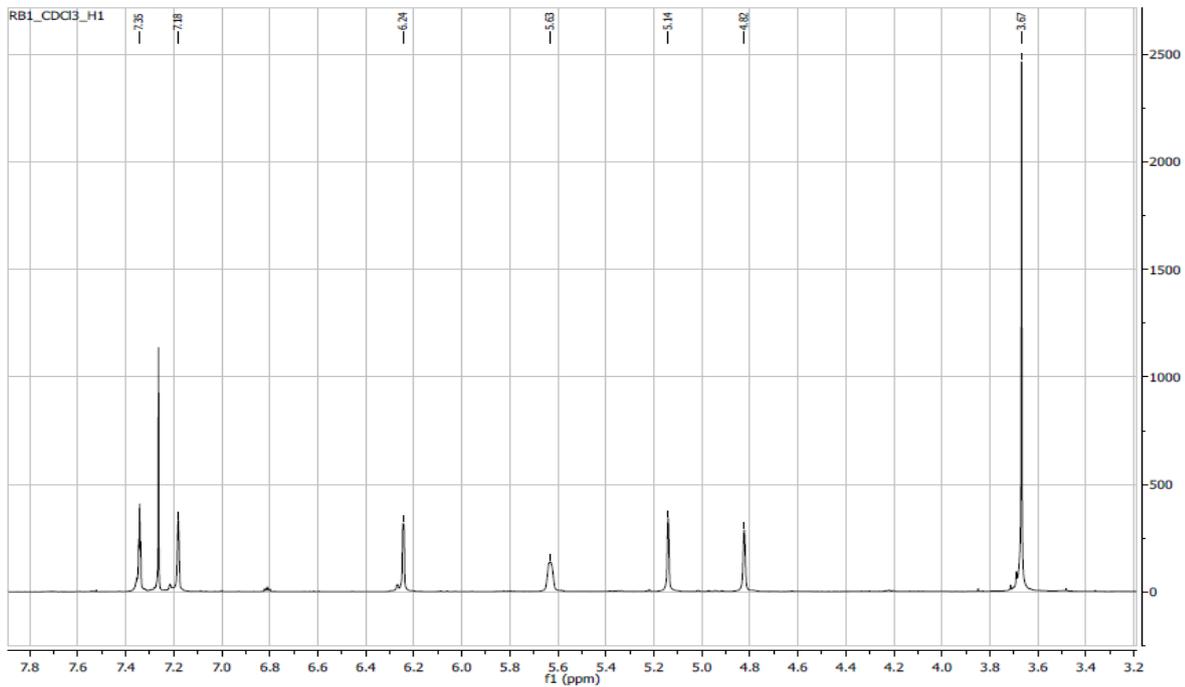
ZDERO, C.; BOHLMANN, F.; KING, R.M. Diterpenes and Norditerpenes from the *Aristeguetia* Group. **Phytochemistry**, v. 30, n. 9, p. 2991-3000, 1991.

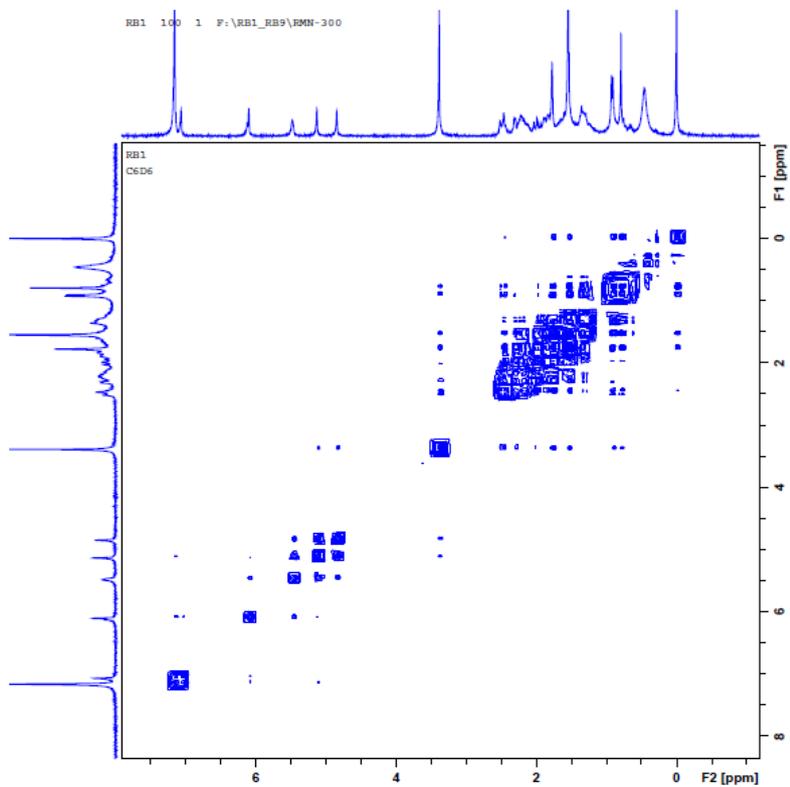
ANEXOS – ESPECTROS RMN DOS COMPOSTOS ISOLADOS DA ESPONJA MARINHA
Raspailia bouryesnaultae

Anexo 1: Espectro ^1H RMN do composto RB1 (400 MHz, CDCl_3).

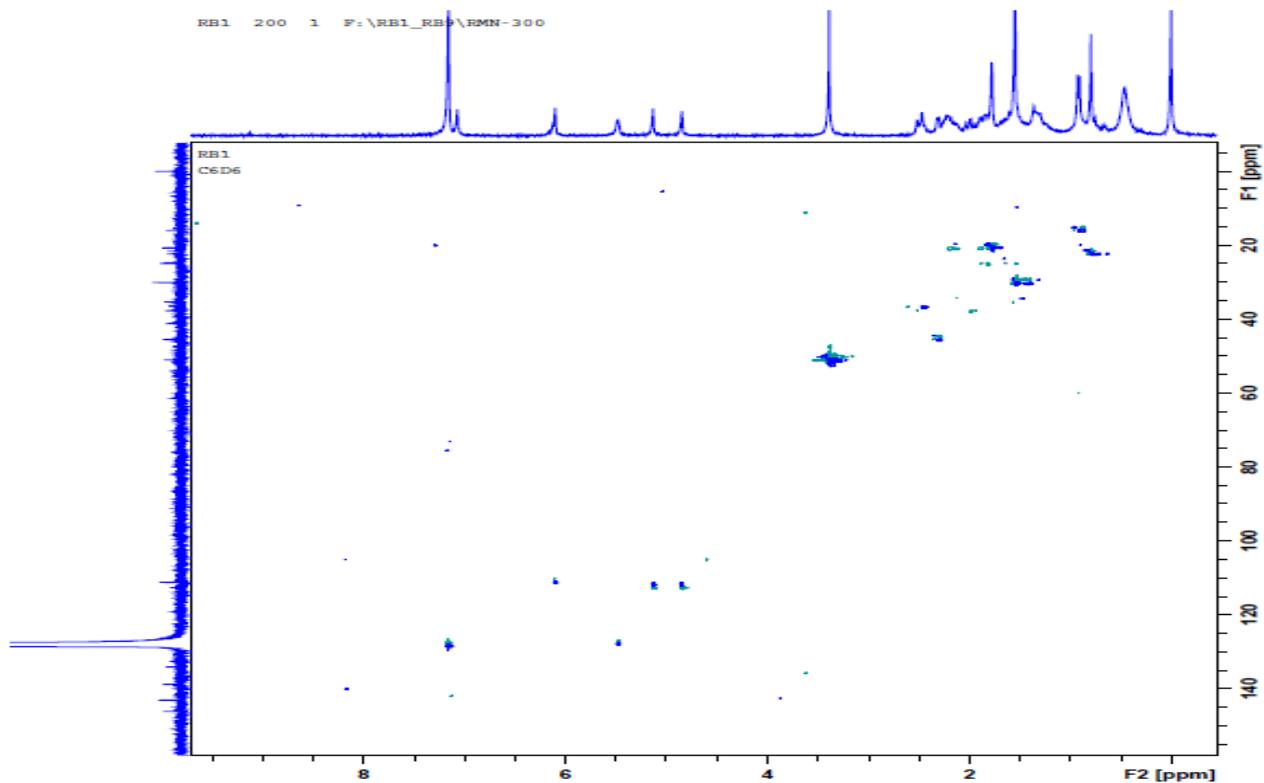


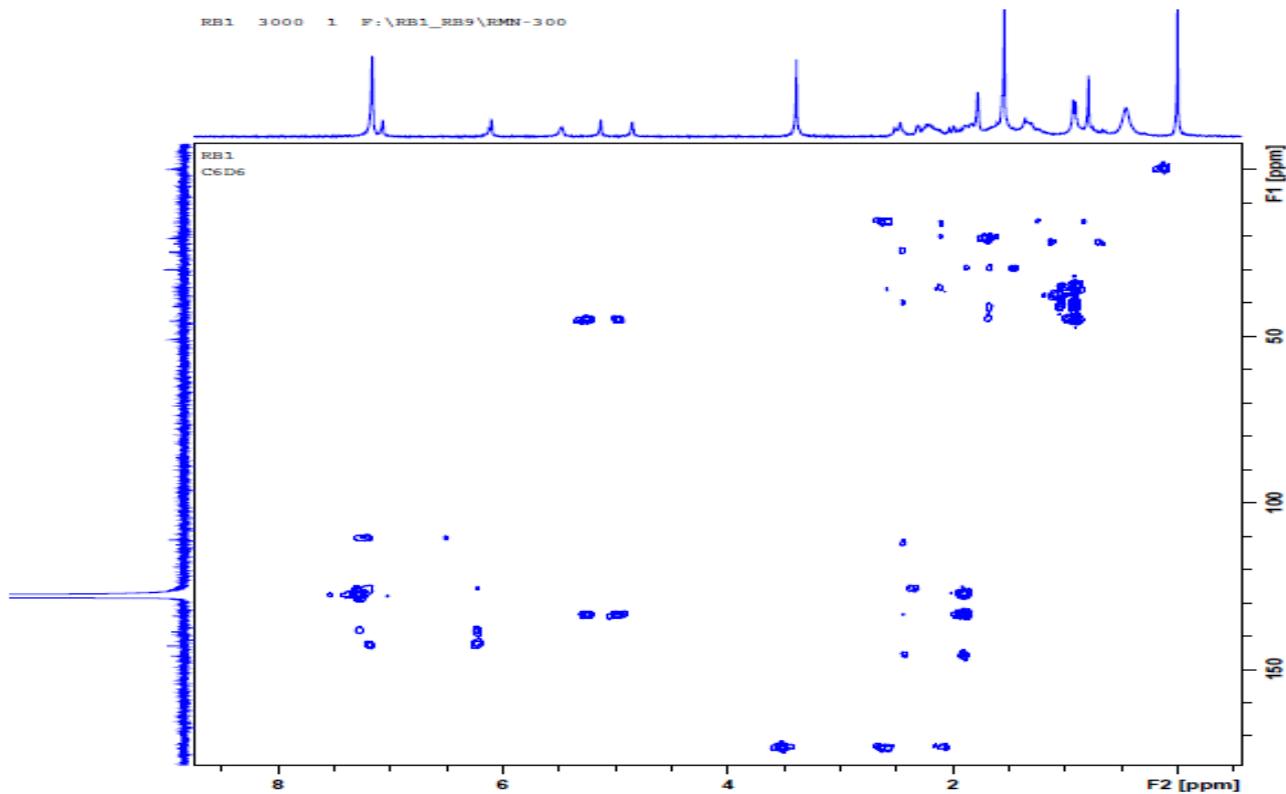
Anexo 2: Detalhe ampliado do espectro de ^1H RMN (3,2-7,8 ppm) de RB1 (400 MHz, CDCl_3).

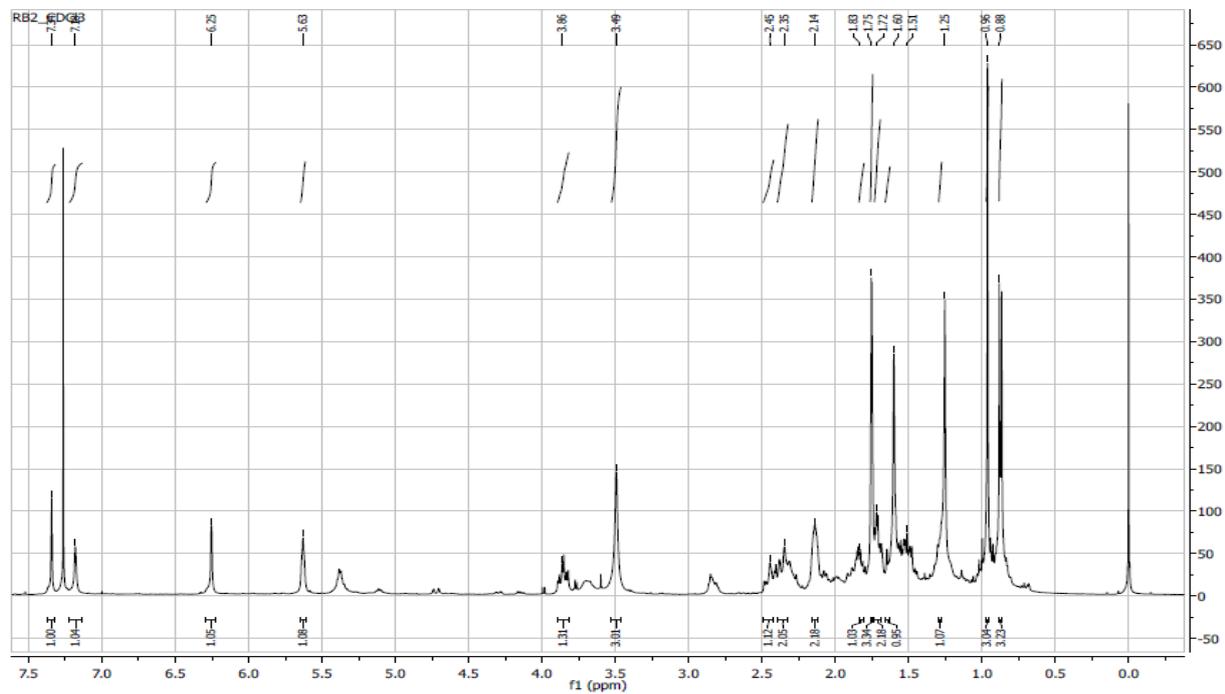


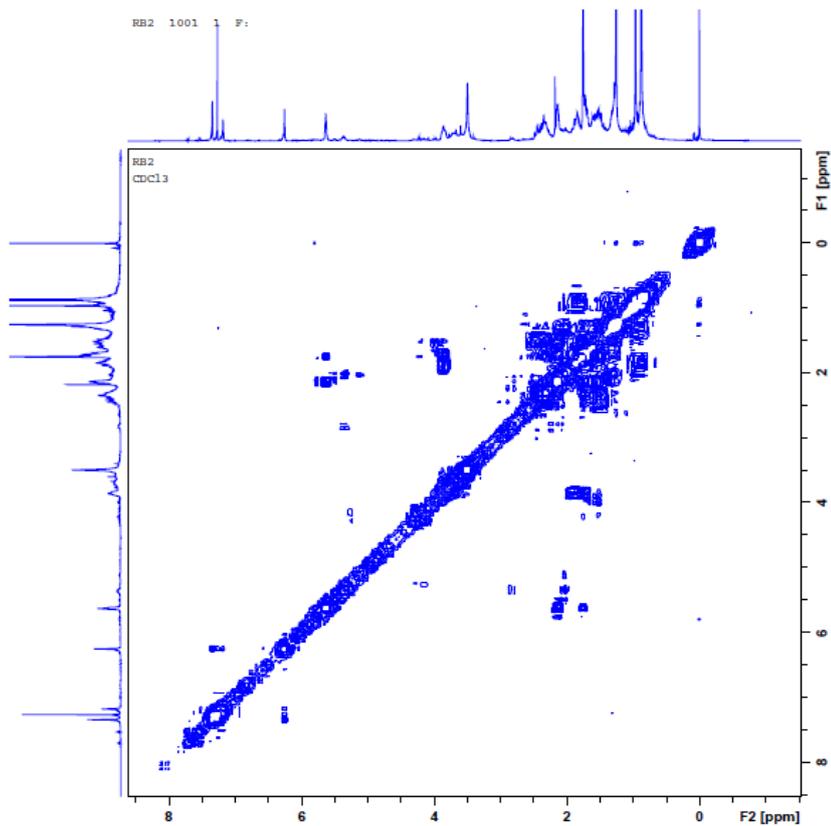
Anexo 3: Espectro ^1H - ^1H COSY RMN do composto RB1 (300 MHz, Benzeno- d_6).

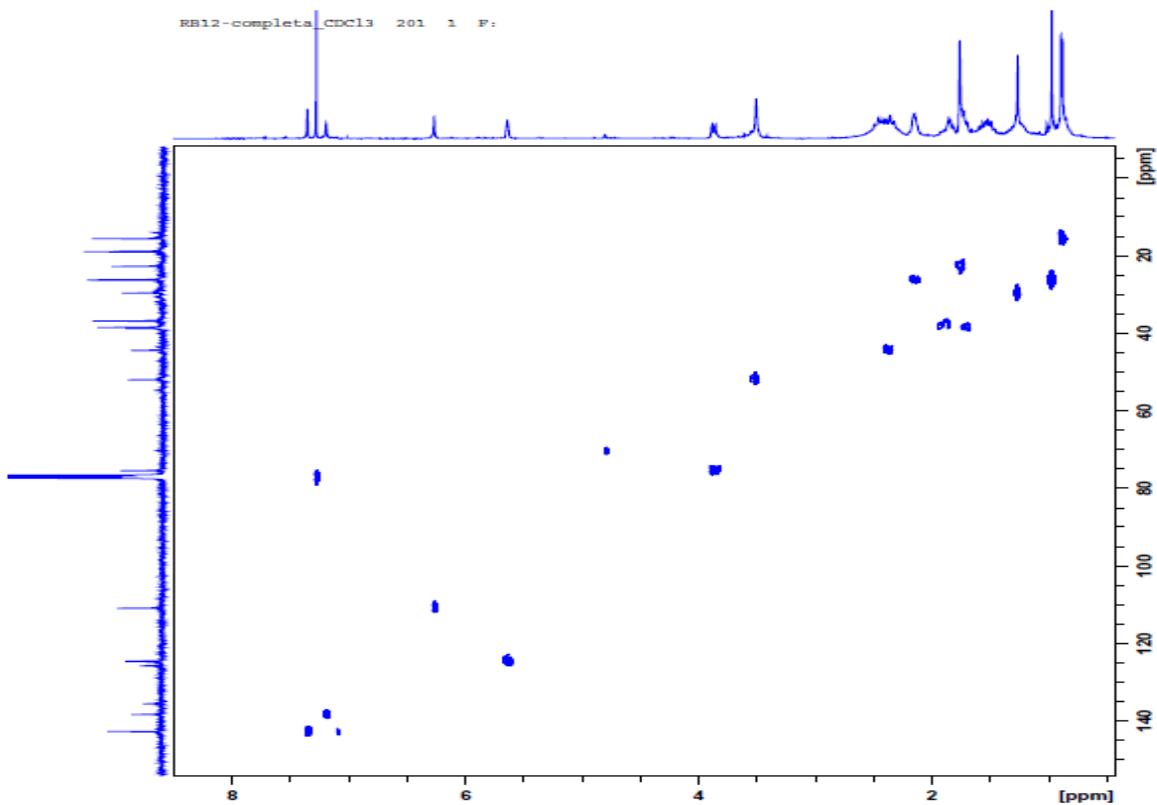
Anexo 4: Espectro ^1H - ^{13}C HSQC RMN do composto RB1 (300 MHz, Benzeno- d_6).



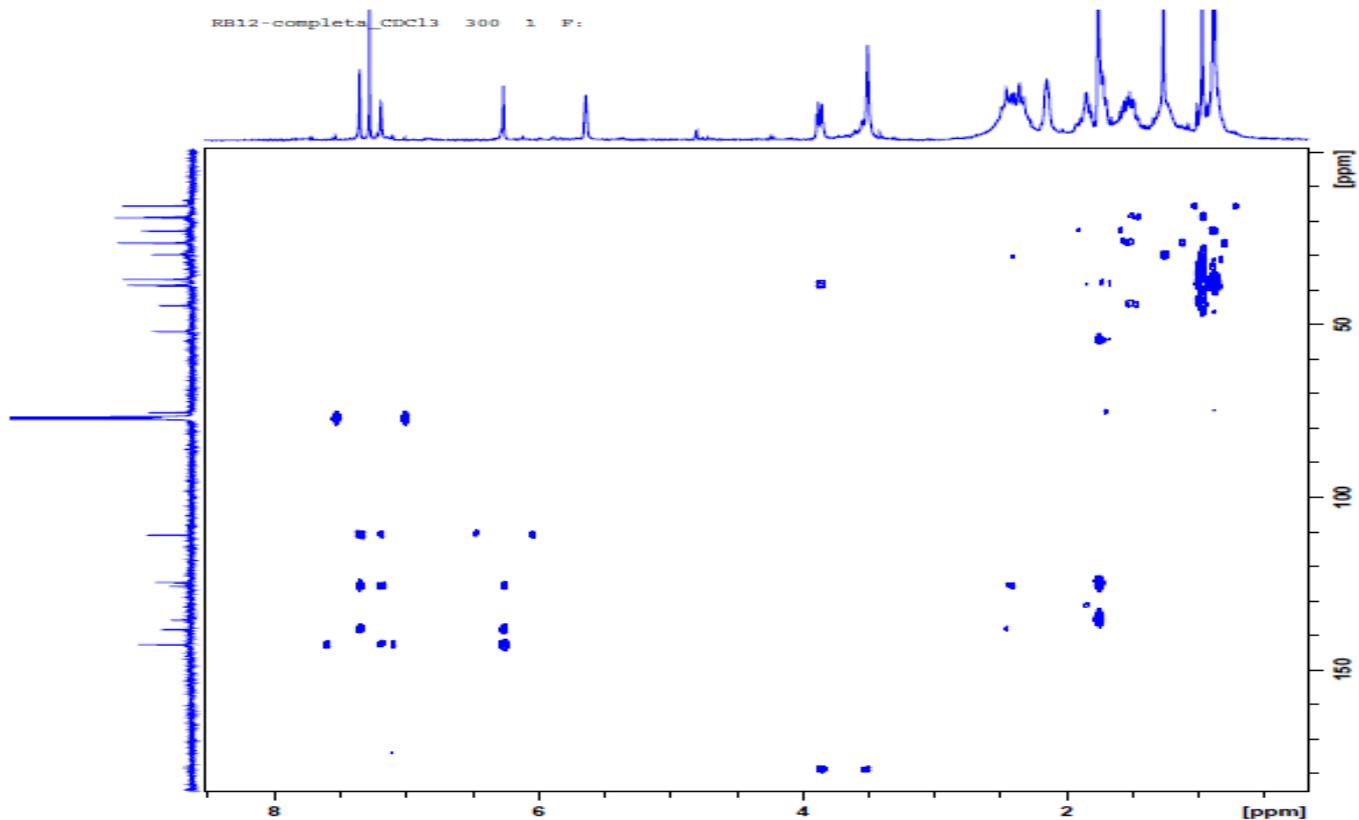
Anexo 5: Espectro ^1H - ^{13}C HMBC RMN do composto RB1 (300 MHz, Benzeno- d_6).

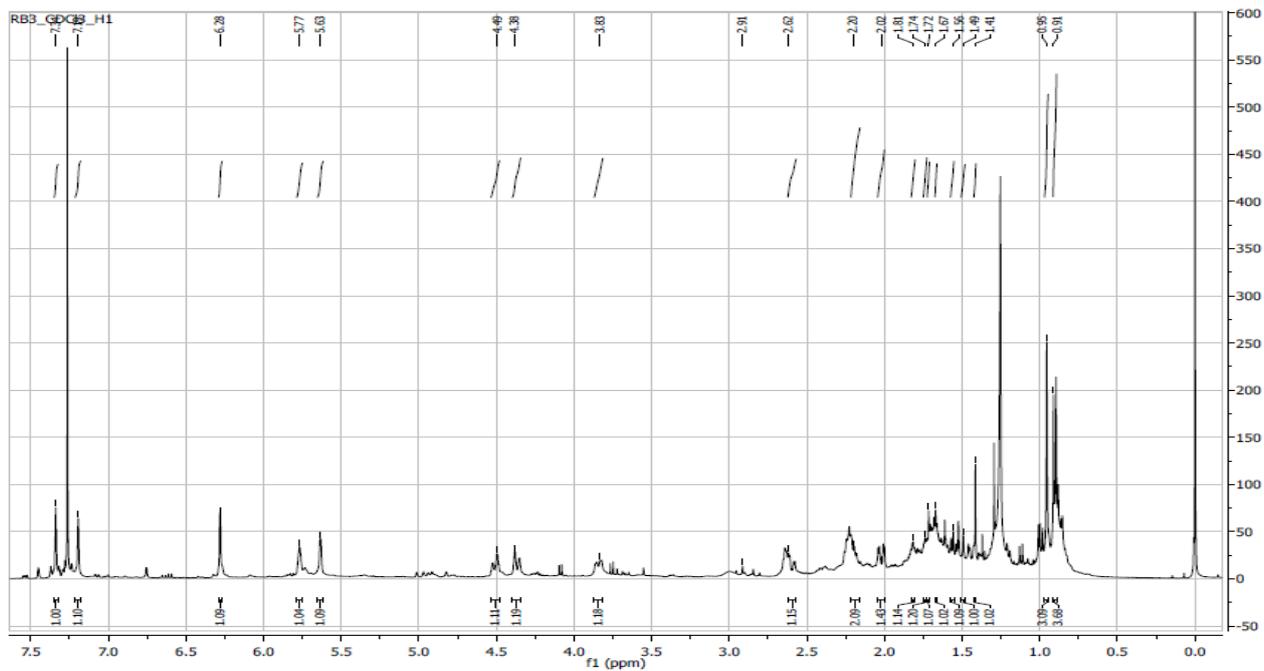
Anexo 6: Espectro ^1H RMN do composto RB2 (400 MHz, CDCl_3).

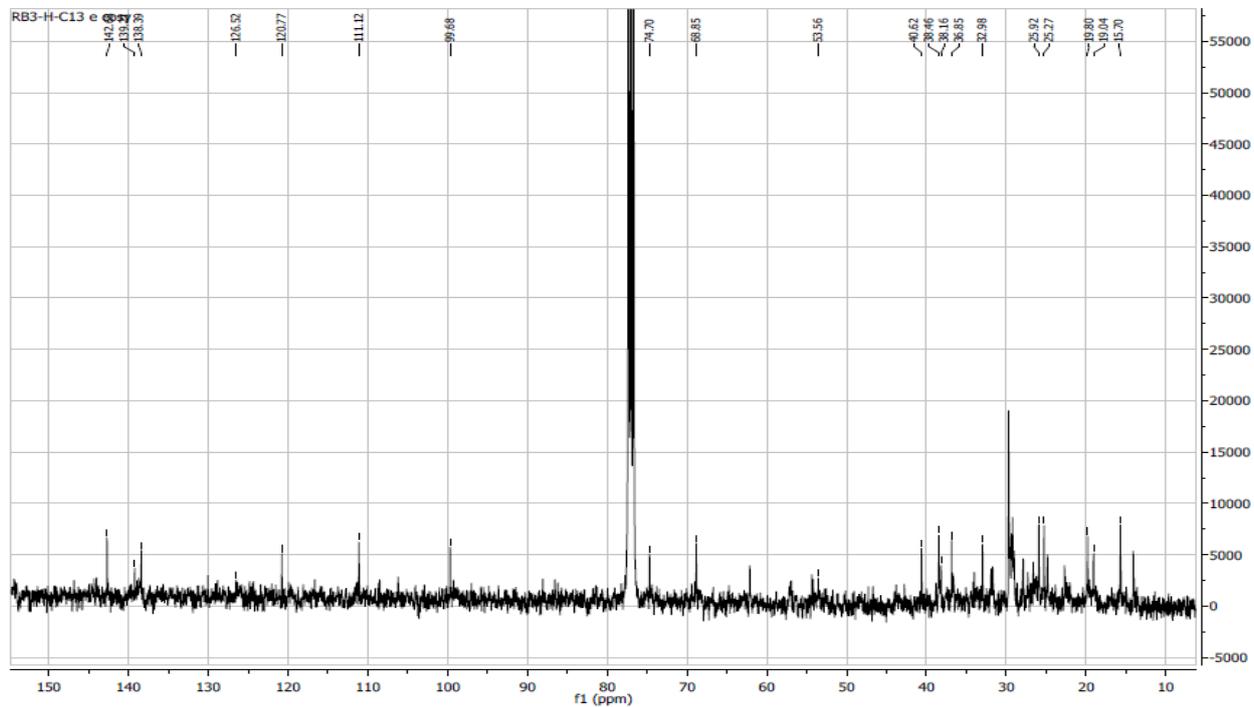
Anexo 7: Espectro ^1H - ^1H COSY RMN do composto RB2 (300 MHz, CDCl_3).

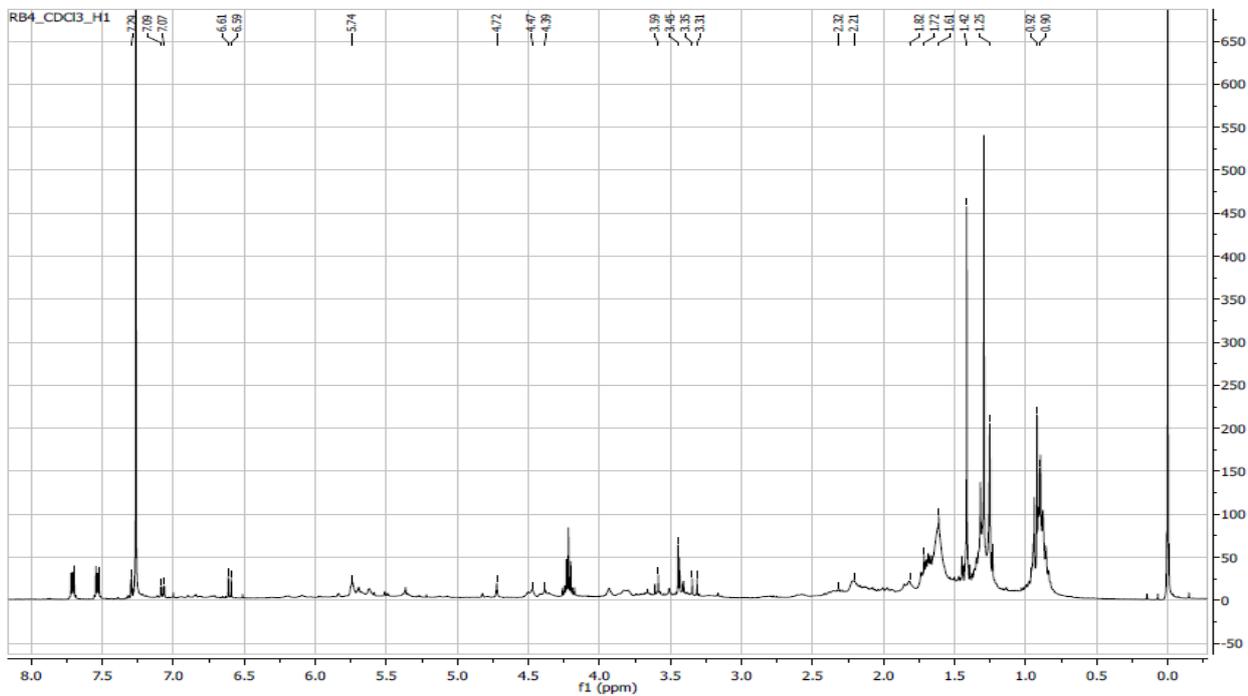
Anexo 8: Espectro ^1H - ^1H COSY RMN do composto RB2 (300 MHz, CDCl_3).

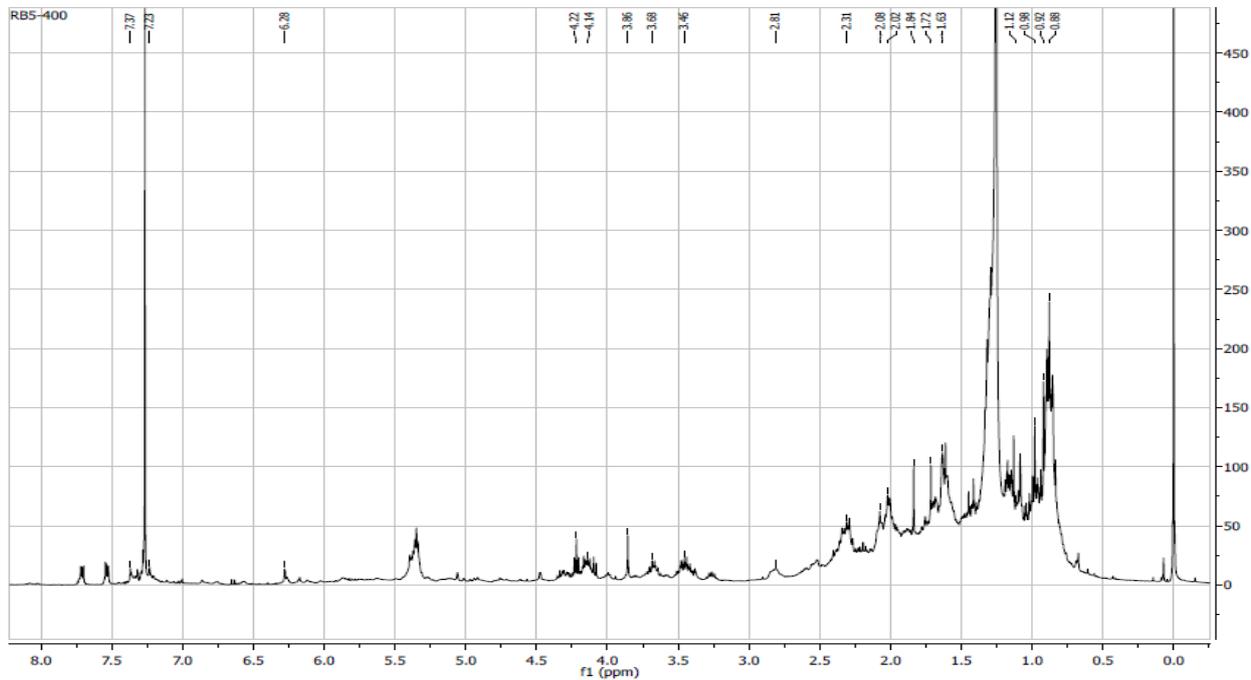
Anexo 9: Espectro ^1H - ^{13}C HMBC RMN do composto RB2 (300 MHz, CDCl_3).

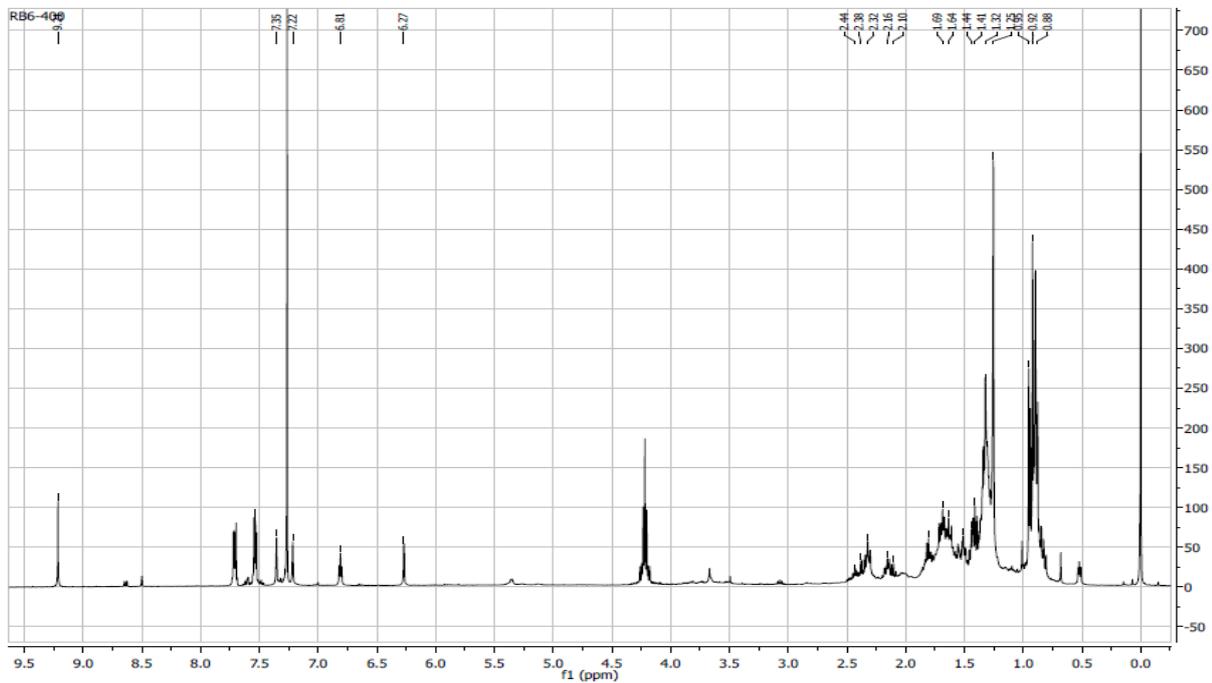


Anexo 10: Espectro ^1H RMN do composto RB3 (400 MHz, CDCl_3).

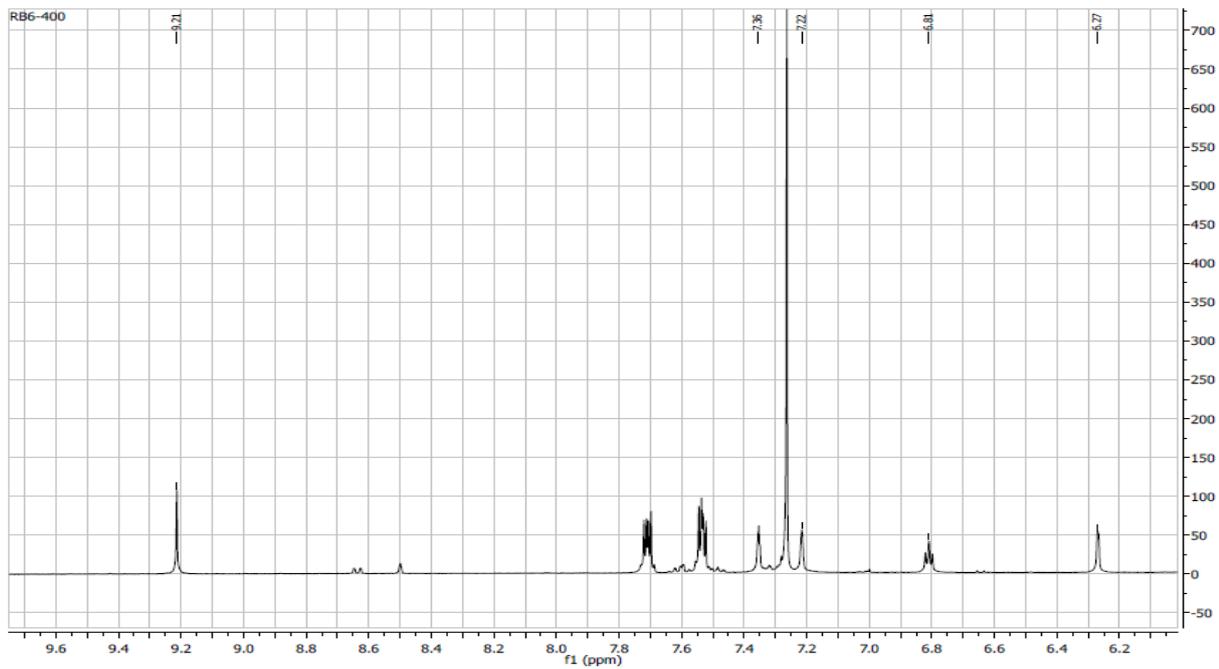
Anexo 11: Espectro ^{13}C RMN do composto RB3 (100 MHz, CDCl_3).

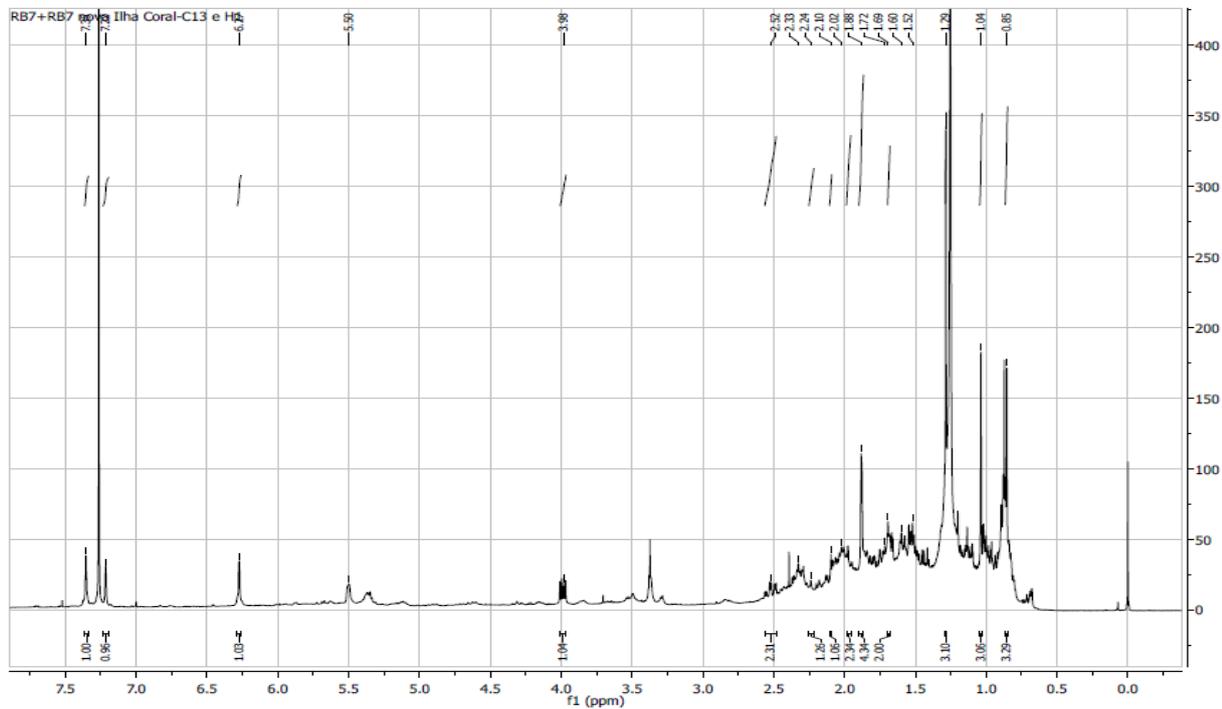
Anexo 12: Espectro ^1H RMN do composto RB4 (400 MHz, CDCl_3).

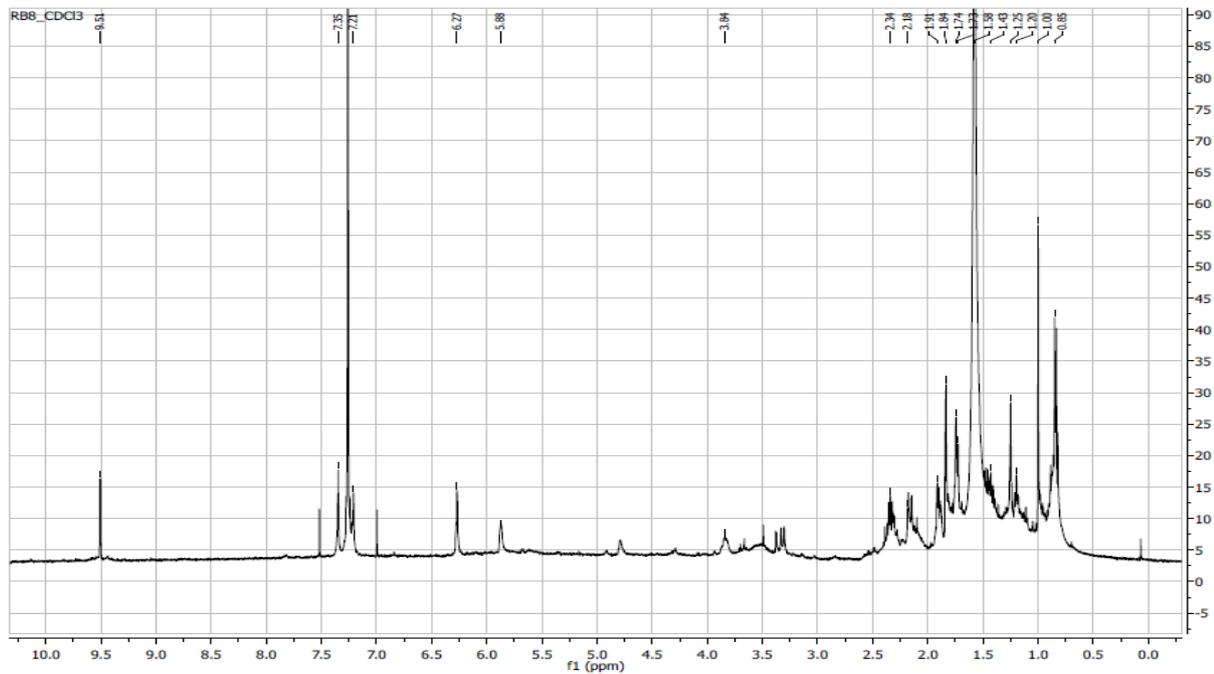
Anexo 13: Espectro ^1H RMN do composto RB5 (400 MHz, CDCl_3).

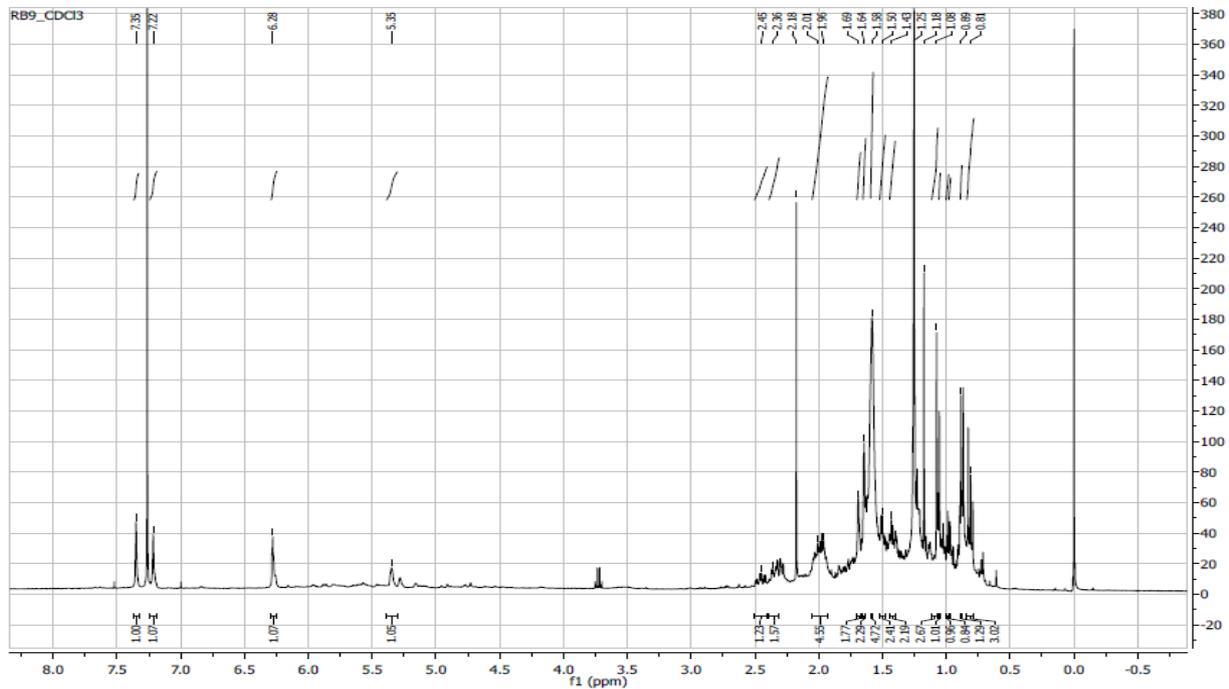
Anexo 14: Espectro ^1H RMN do composto RB6 (400 MHz, CDCl_3).

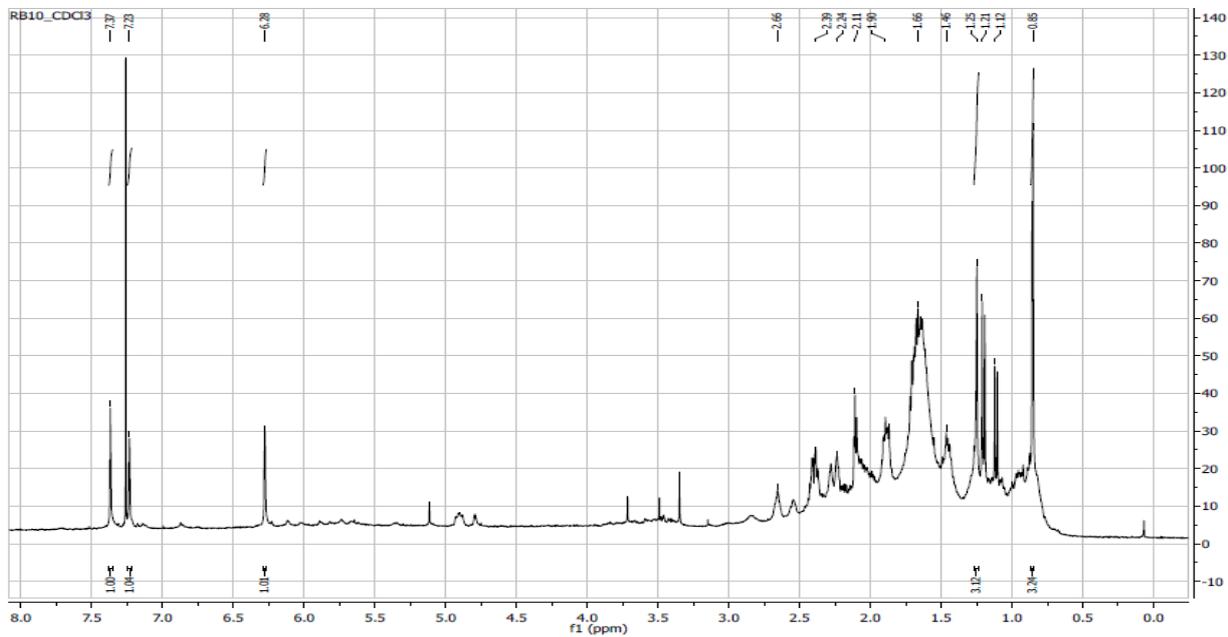
Anexo 15: Detalhe ampliado do espectro de ^1H RMN (6,2-9,6 ppm) de RB6 (400 MHz, CDCl_3).



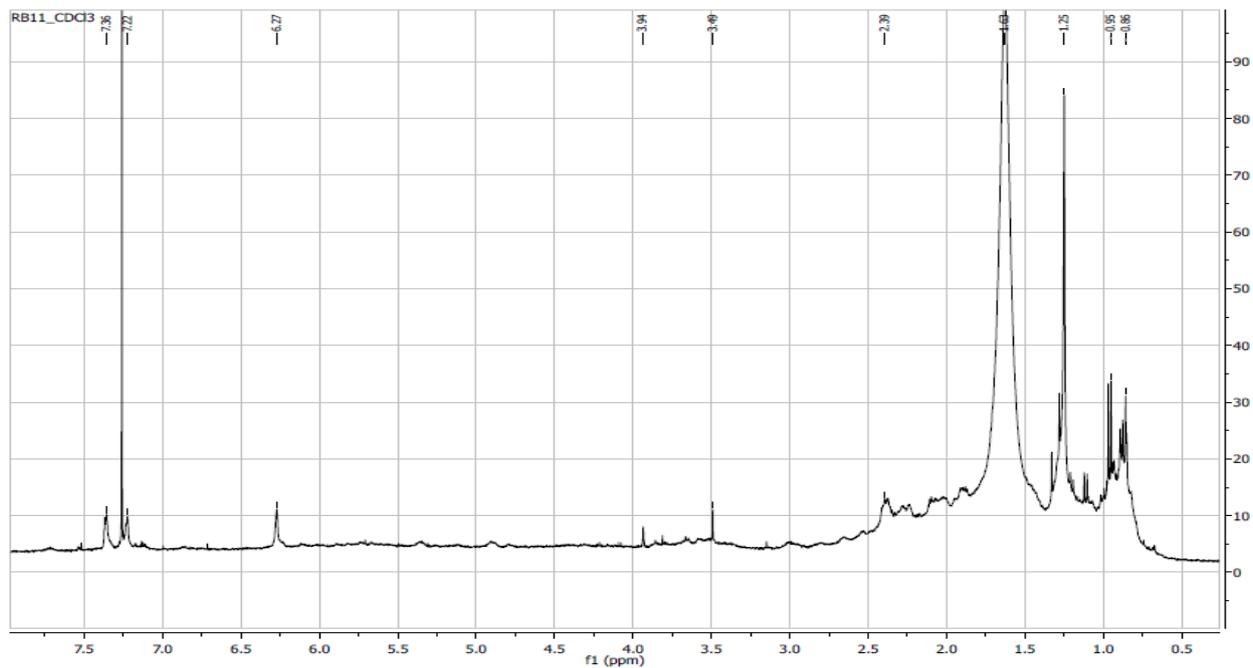
Anexo16: Espectro ^1H RMN do composto RB7 (400 MHz, CDCl_3).

Anexo 17: Espectro ^1H RMN do composto RB8 (400 MHz, CDCl_3).

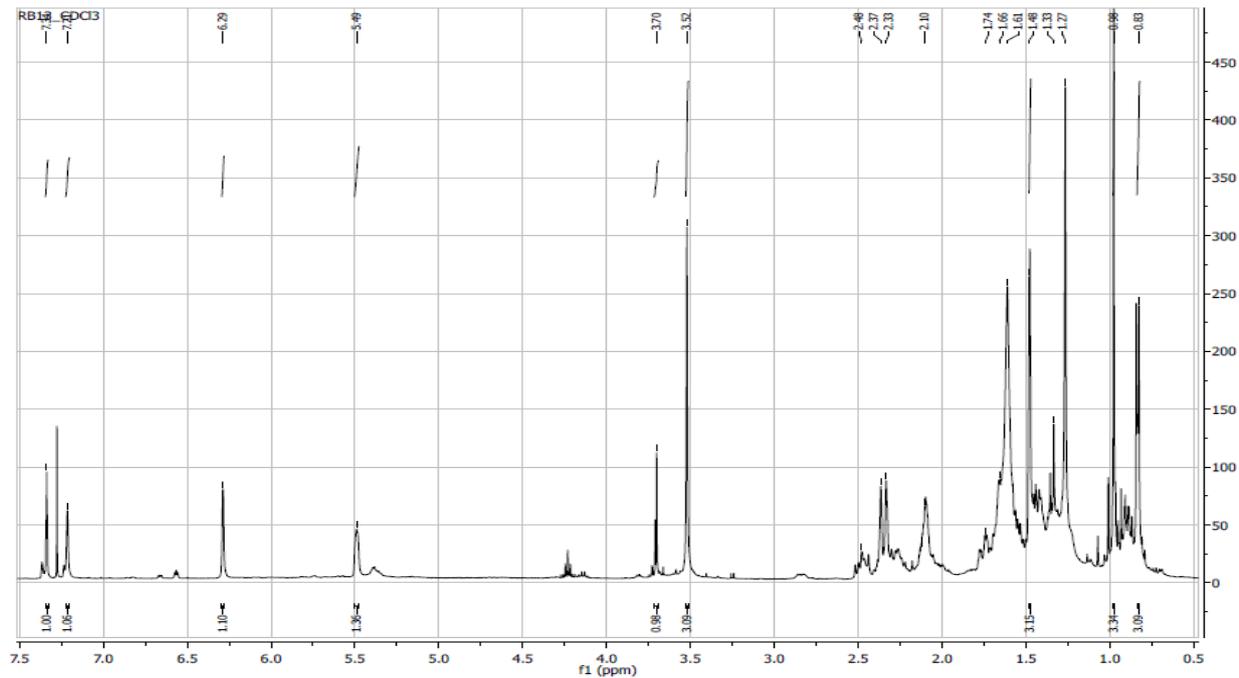
Anexo 18: Espectro ^1H RMN do composto RB9 (400 MHz, CDCl_3).

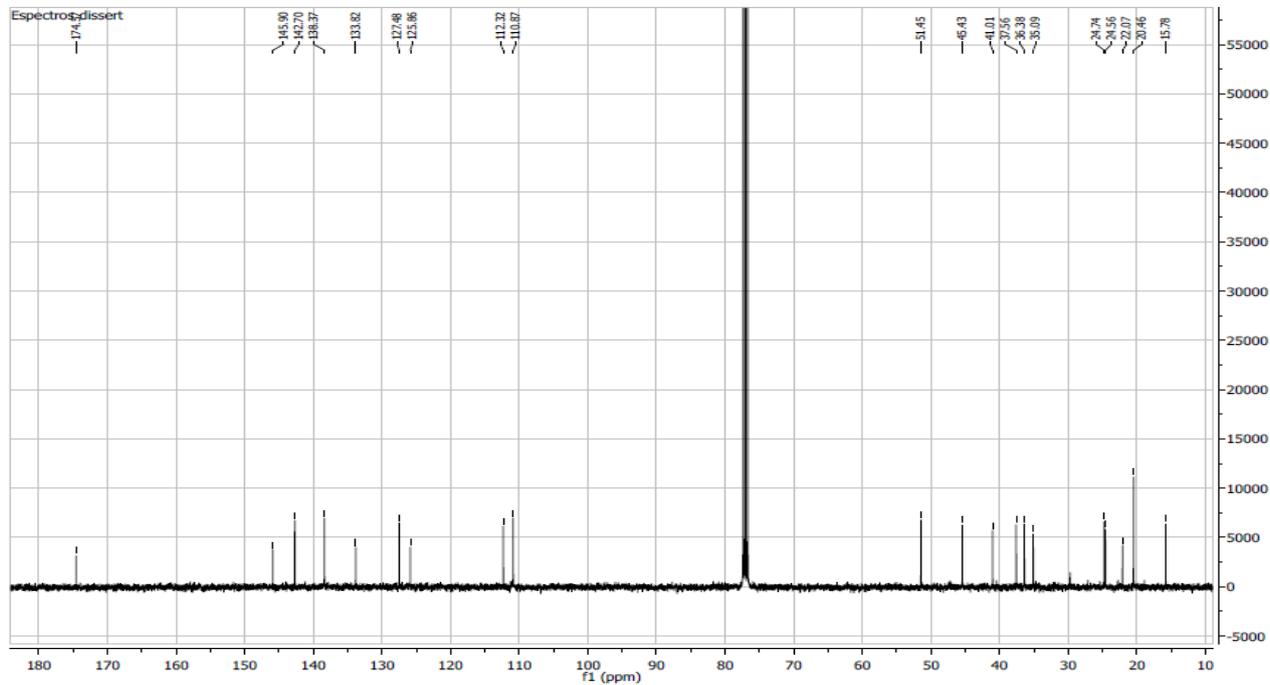
Anexo 19: Espectro ^1H RMN do composto RB10 (400 MHz, CDCl_3).

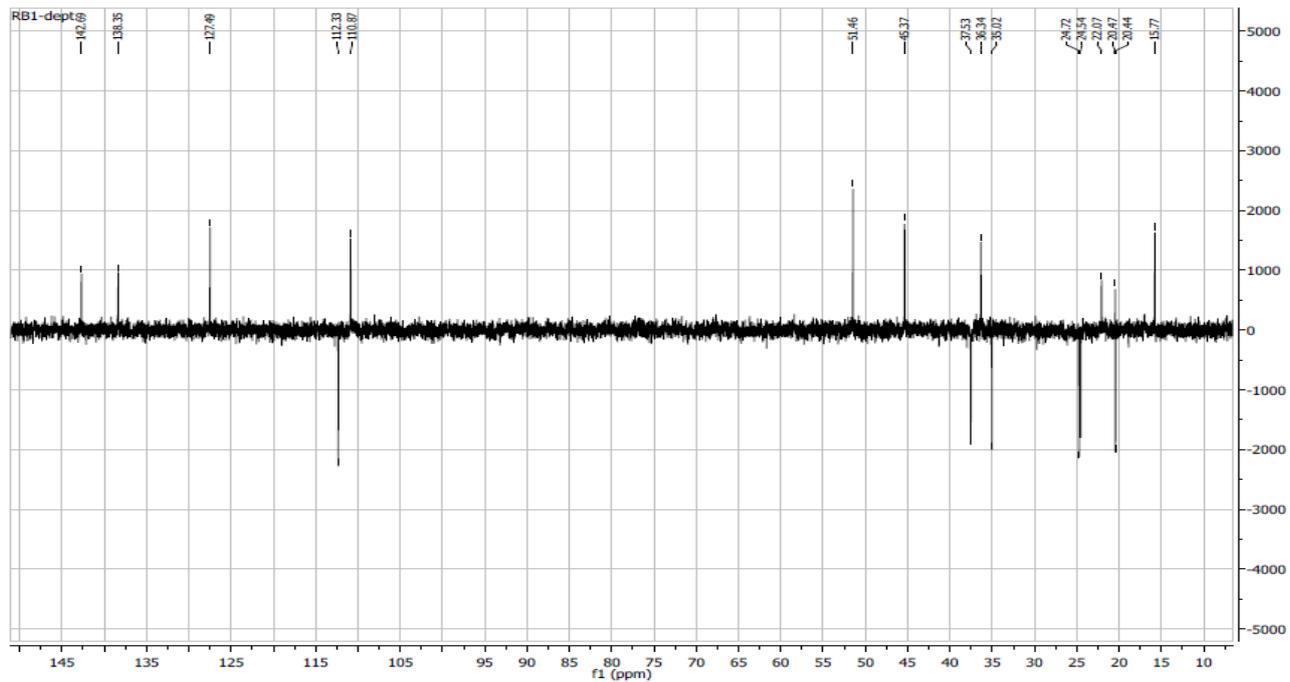
Anexo 20: Espectro ^1H RMN do composto RB11 (400 MHz, CDCl_3).

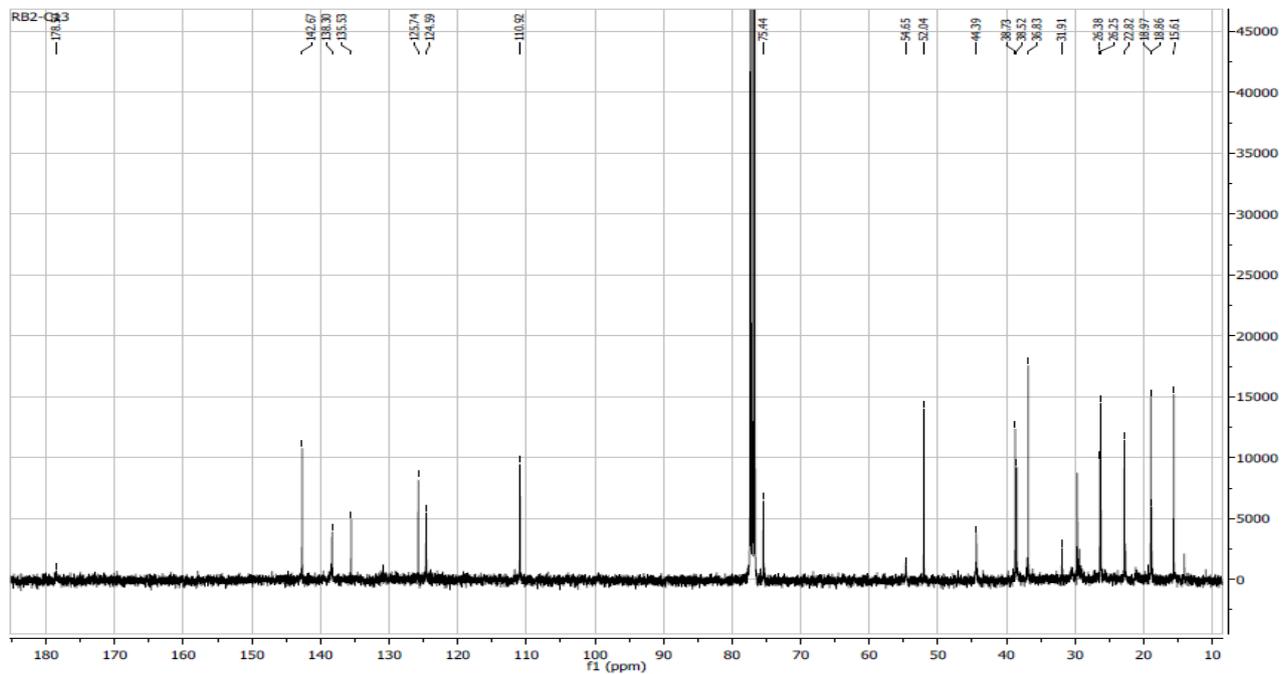


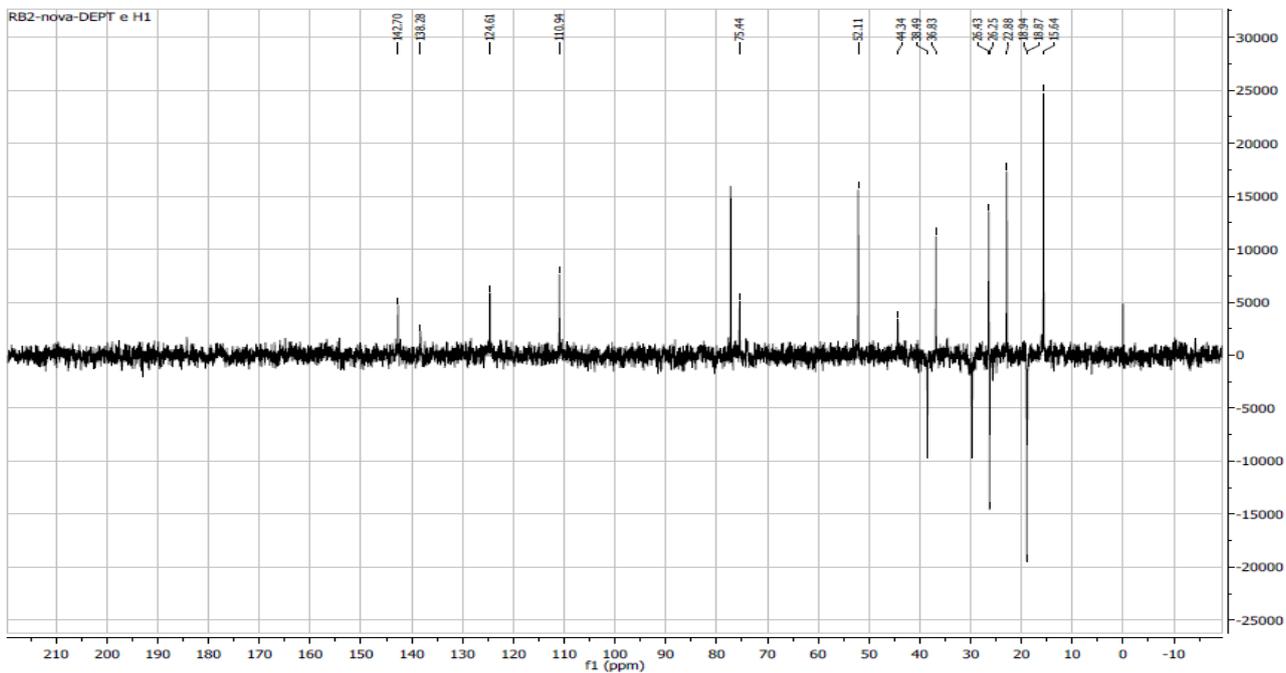
Anexo 21: Espectro ^1H RMN do composto RB13 (400 MHz, CDCl_3).

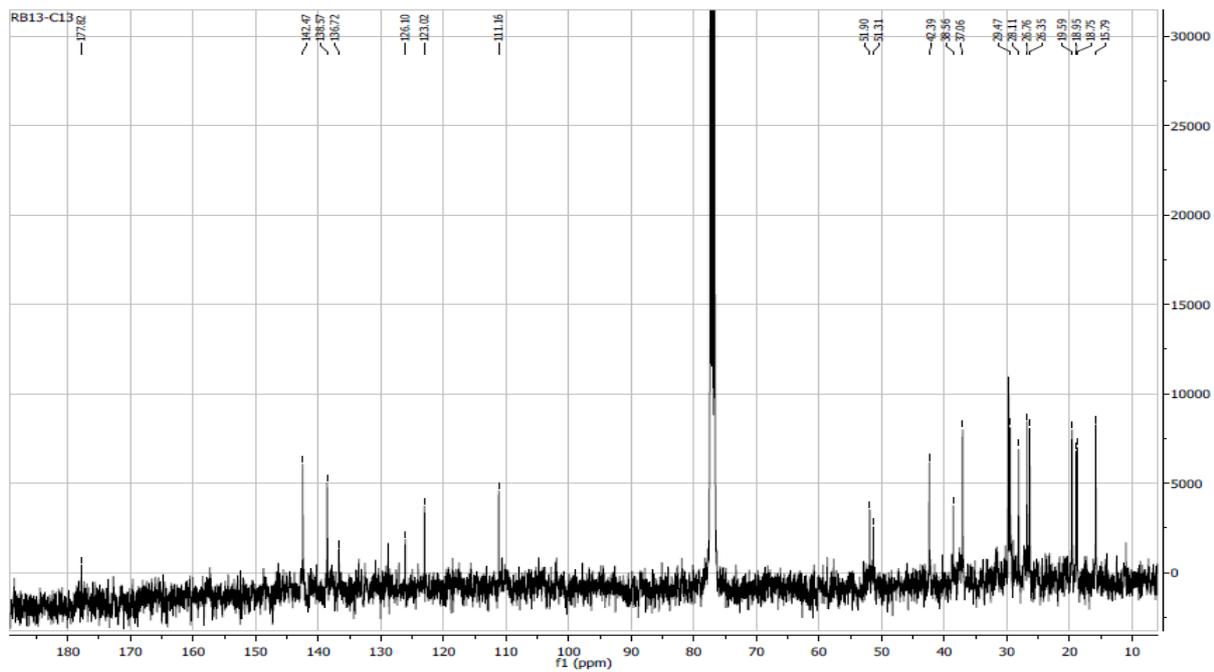


Anexo 22: Espectro ^{13}C RMN do composto RB1 (100 MHz, CDCl_3).

Anexo 23: Espectro DEPT 135 RMN do composto RB1 (100 MHz, CDCl_3).

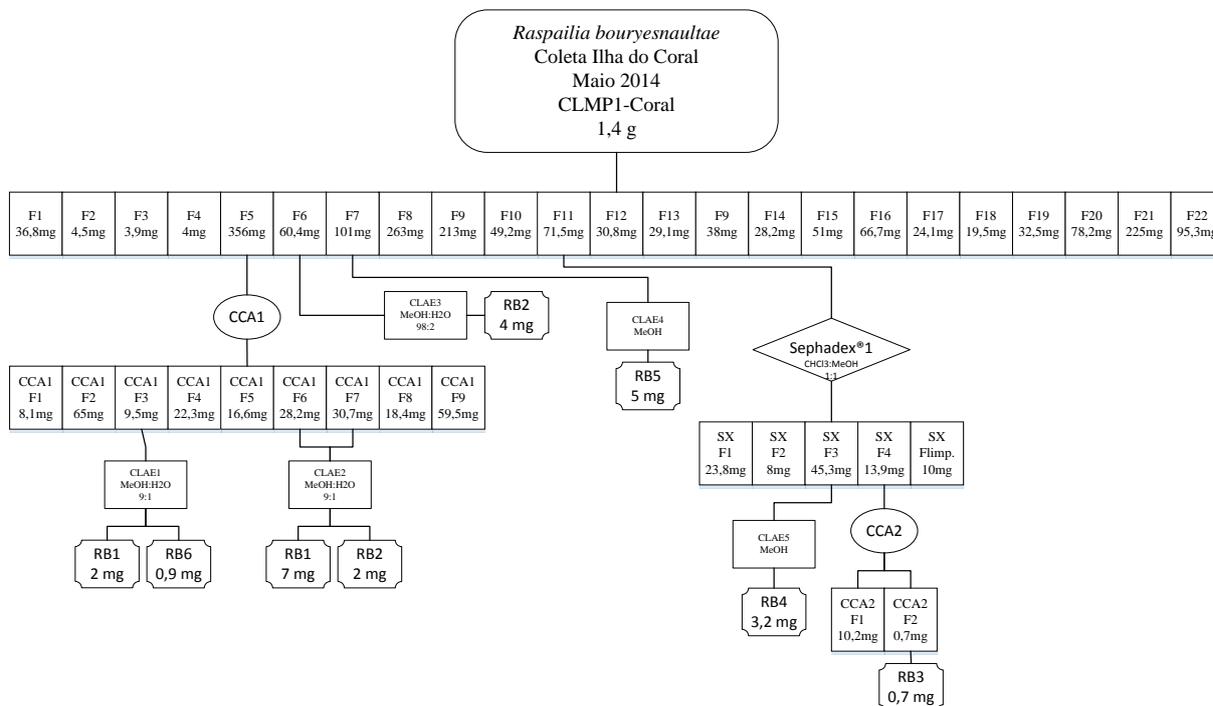
Anexo 24: Espectro ^{13}C RMN do composto RB2 (100 MHz, CDCl_3).

Anexo 25: Espectro DEPT 135 RMN do composto RB2 (100 MHz, CDCl_3).

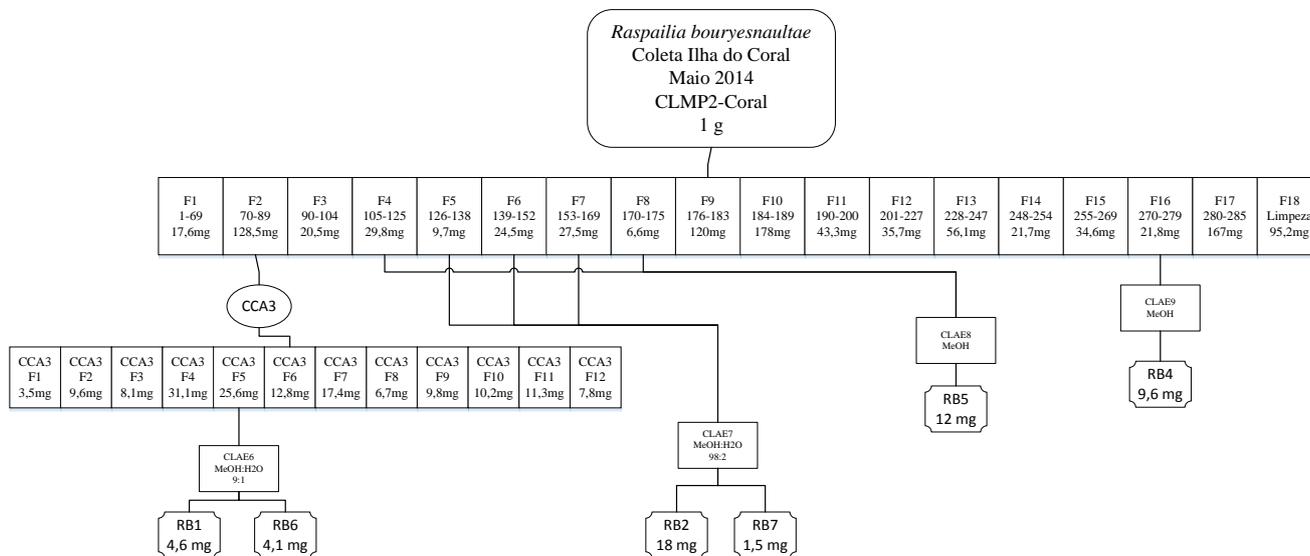
Anexo 26: Espectro ^{13}C RMN do composto RB13 (100 MHz, CDCl_3).

APÊNDICE – FLUXOGAMAS DOS FRACIONAMENTOS DA ESPONJA *R. bouryesnaultae*.

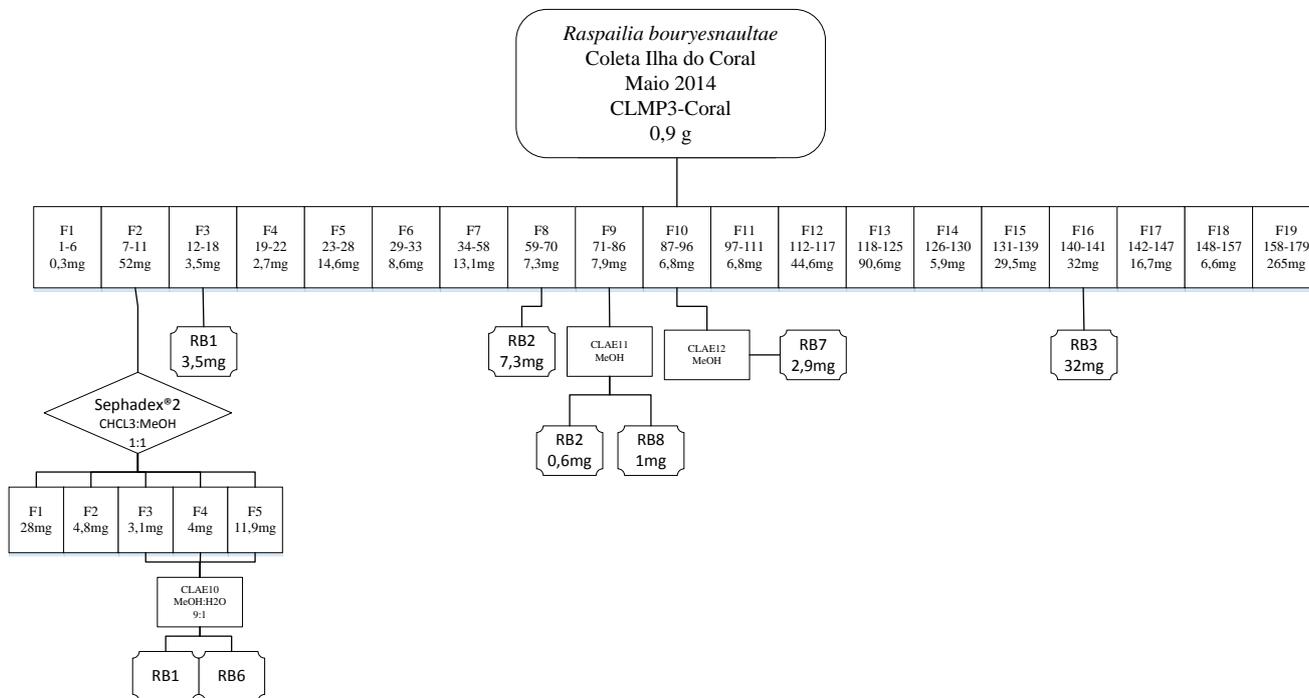
Apêndice 1: CLMP1 – Coral.



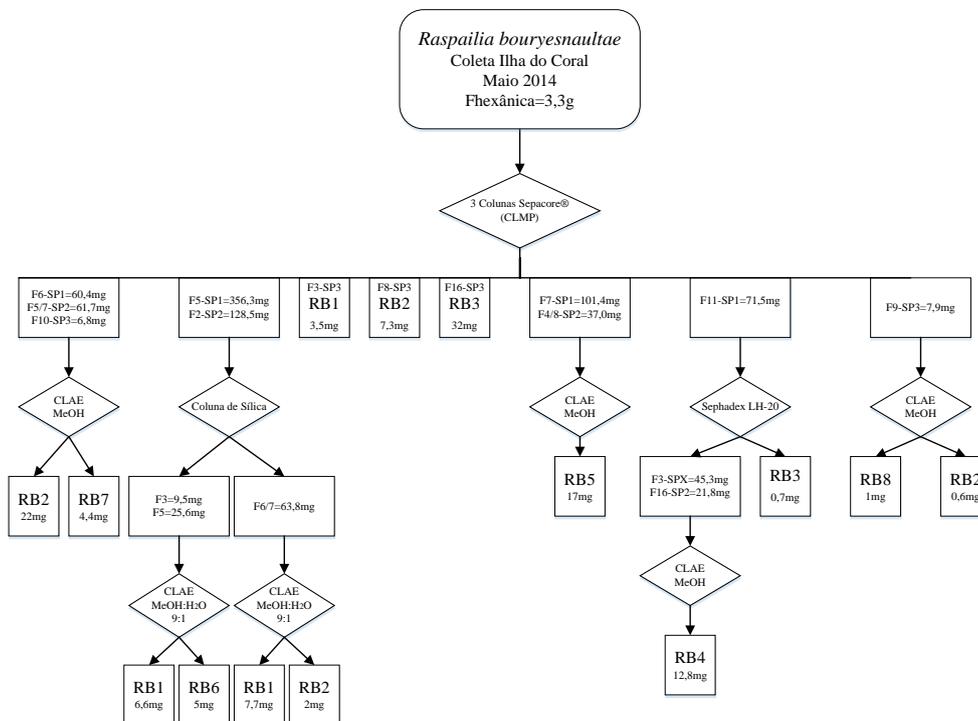
Apêndice 2: CLMP2 – Coral.



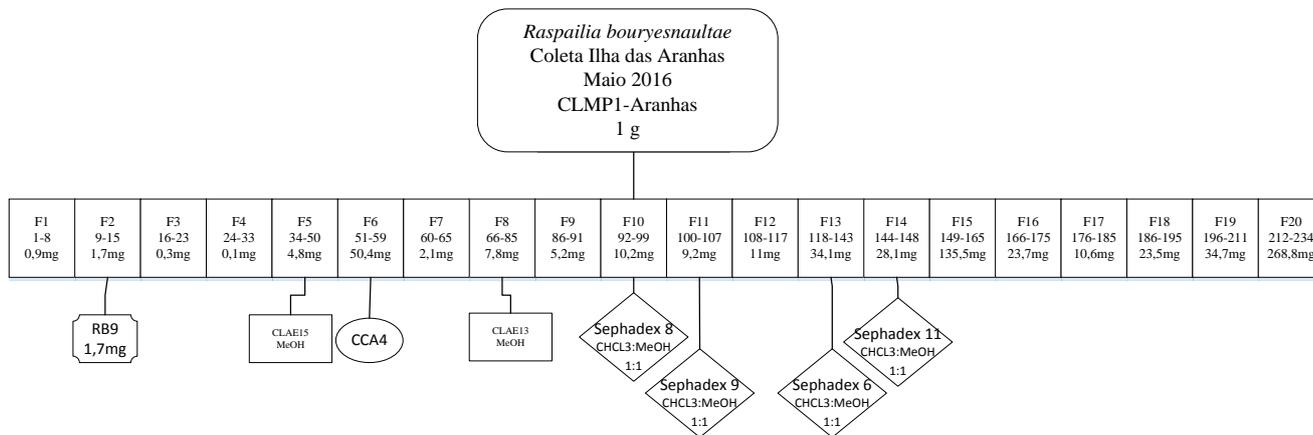
Apêndice 3: CLMP3 – Coral.



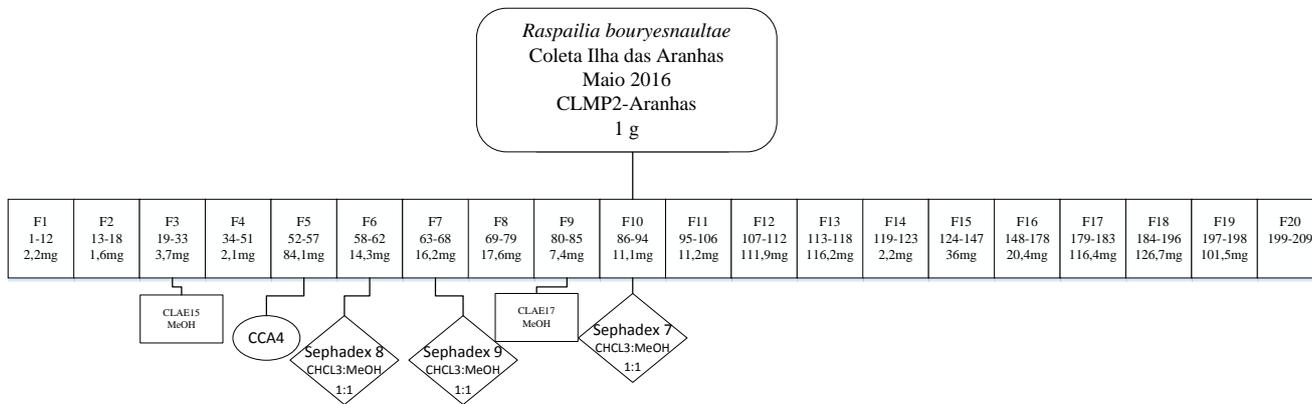
Apêndice 4: Compostos isolados da coleta Ilha do Coral.



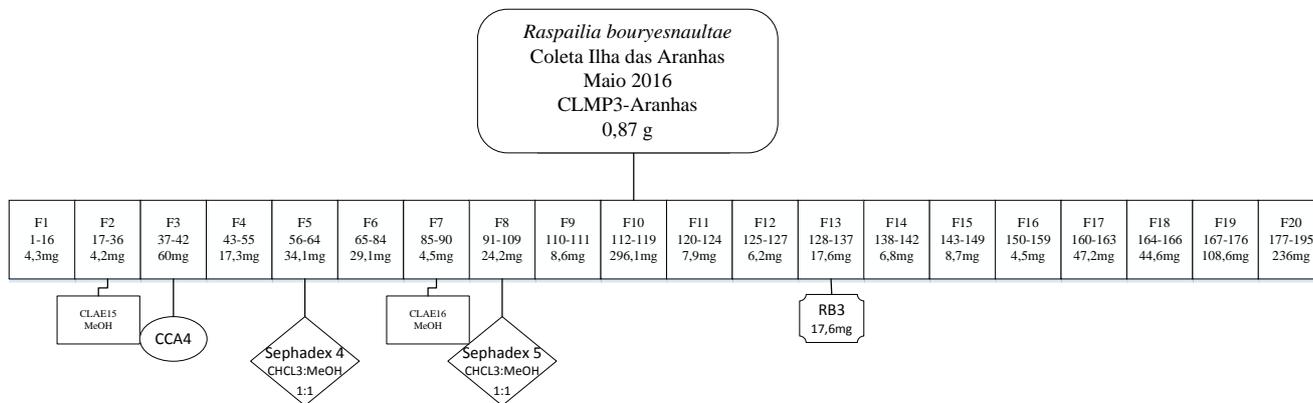
Apêndice 5: CLMP1 - Aranhas.



Apêndice 6: CLMP2 - Aranhas.



Apêndice 7: CLMP3 - Aranhas.



Apêndice 8: Compostos isolados da coleta Ilha das Aranhas.

