

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA – UFPB**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA FARMACÊUTICA – LTF**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS**  
**BIOATIVOS**

**NARLIZE SILVA LIRA**

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DA**  
**ESPONJA MARINHA *Aplysina fistularis***

**JOÃO PESSOA – PB**

**2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**NARLIZE SILVA LIRA**

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DA  
ESPONJA MARINHA *Aplysina fistularis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para a obtenção do título de Mestre em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de Concentração: Farmacoquímica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Celidarque da Silva Dias

Co-orientador: Prof. Dr. Emidio Vasconcelos Leitão da Cunha

**João Pessoa – PB**

**2008**

**NARLIZE SILVA LIRA**

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DA  
ESPONJA MARINHA *Aplysina fistularis***

Dissertação aprovada em 31/01/2008

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>.: Dr<sup>a</sup>. Celidarque da Silva Dias  
Universidade Federal da Paraíba - UFPB  
(Orientadora)

---

Prof.: Dr. Davi Antas e Silva  
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE  
(Examinador Externo)

---

Prof.: Dr. Josean Fechine Tavares  
Universidade Federal da Paraíba - UFPB  
(Examinador Interno)

“Não escolhi ser uma pessoa comum.  
É meu direito ser diferente, ser singular, incomum,  
desenvolver os talentos que Deus me deu.  
Não desejo ser um cidadão pacato e modesto, dependendo  
sempre de alguém. Quero correr o risco calculado, sonhar e  
construir, falhar e suceder.  
Recuso trocar o incentivo por doação.  
Prefiro as intemperanças à vida garantida.  
Não troco minha dignidade por ajuda de outros.  
Não me acovardo e nem me curvo ante ameaças.  
Minha herança é ficar ereto, altivo e sem medo;  
Pensar e agir por conta própria e, aproveitando os benefícios  
da minha criatividade encarar arrojadamente o mundo e dizer  
**ISTO É O QUE EU SOU.**”

**Autor Desconhecido**

## **DEUS**

Graças a ti, Senhor! Hoje estou vitoriosa pela conquista obtida depois de tanta luta, tantas incertezas, tantas dificuldades...

Agradeço-te por teres me ajudado durante todo esse tempo, segurando minha mão diante dos obstáculos e me dando forças para seguir em frente e continuar a caminhada.

Ensina-me agora, Senhor, a enfrentar com dignidade o futuro que me espera, para que dessa forma, possa ser feliz e abençoada por ti.

Muito obrigada pela tua proteção e pelo teu amor, assim como pela certeza de que tu estarás cuidando de mim durante todos os dias de minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus Pais que me ensinaram a viver com dignidade, que me iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação, para que os trilhassem sem medo e cheios de esperança. Que erraram, certamente até por excesso de amor, para que eu pudesse ter um caminho mais digno. Lutaram pela minha instrução e educação, por minha saúde e felicidade. Devo-lhes a vida, a honra, a dignidade e meu valor moral. Sou, o que hoje sou, à custa dos seus sacrifícios sejam, pois, estas palavras, a expressão da minha gratidão por tudo que lhes devo.

Em especial a você, Mamãe, que se doou e renunciou aos seus sonhos, para que, muitas vezes, pudesse realizar os meus. Quero dizer-lhe que não tenho palavras para lhe agradecer.

Aos meus irmãos, pelo apoio e incentivo na realização deste trabalho.

A você Fred, que esteve comigo durante esta jornada e que soube compreender minhas ausências. Muito obrigada por tudo. Você também faz parte desta vitória.

Aos professores minha gratidão pela dedicação, pela amizade, pela tolerância e bondade com que dispensaram às minhas falhas, esforçando-se em transmitir os ensinamentos de que precisei para minha formação.

Aos professorres Dr<sup>a</sup>. Celidarque da Silva Dias e Dr. Emidio Vasconcelos Leitão da Cunha, por terem confiado e acreditado sempre em mim, por terem me ajudado a chegar onde cheguei, com todos os seus ensinamentos e amizade para realização deste trabalho.

Ao professor José Maria Barbosa Filho, pela valiosa contribuição a este trabalho e na minha vida como estudante, passando alguns ensinamentos e sempre tirando dúvidas quando precisei, pelo o incentivo à pesquisa com seu exemplo de vida.

Aos professores Raimundo Braz Filho, Marcos Eberlin, Marcelo Sobral da Silva, Josean Fachine Tavares e Elaine Cabral, pela colaboração na obtenção dos espectros e pelas sugestões nas determinações estruturais.

A Rubens Lima e a João Guilherme Barreto pela coleta das esponjas marinhas.

Ao professor Dr. Ulisses Pinheiro pela identificação do material marinho.

Aos amigos Raimundo Nonato e Vicente Carlos, pelo apoio técnico, cuja ajuda neste trabalho foi de valiosa importância, pelo apoio nas horas em que precisei, pela companhia nos momentos mais difíceis dessa caminhada e por todas as lições de vida que aprendi com vocês.

As professoras Maria do Socorro Ramos de Queiroz, Rosemary Sousa Cunha Lima e Valeria Morgiana Duarte que me incentivaram para a pesquisa e repartiram comigo seus

conhecimentos, transformando meus ideais em realizações.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, pela ajuda na minha formação acadêmica, especialmente à Prof<sup>ª</sup>. Bagnólia Silva, pelo apoio e pelas boas lições que levo comigo para a vida.

À Professora Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima, que juntamente com sua equipe realizou os testes farmacológicos descritos neste trabalho.

À secretaria Tânia Maria pela disponibilidade e pronto atendimento sempre que necessitei dos seus préstimos.

Aos alunos de iniciação científica Ricardo Carneiro Montes, Fábio Henrique Sousa e Ana Silvia Suassuna, pelo apoio direto a esse trabalho.

Aos meus amigos e colegas de pós-graduação, em especial a Adriana Maria, Aldeíde Rocha, Ana Cláudia, Danielle Serafim, Ethiene Castelluci, Gabriela Lemos, José Guedes Filho, Marianne Guedes, Rafael Rodrigo, Roosevelt Gomes, Sócrates Golzio, Steno Lacerda e Viviane Marcelino, que estiveram sempre ao meu lado me apoiando e pelos ensinamentos compartilhados enquanto cursamos as disciplinas. Os obstáculos foram inúmeros, as adversidades constantemente presentes e o cansaço tornou-se comum em nosso cotidiano. Convivemos em clima de união e amizade, nos ajudando mutuamente e a incondicional vontade de vencer foi a propulsora do nosso sucesso.

A Ana Lívia Tiburtino, Analucia Guedes, Camila, Dayse, Hellane Fabrícia, Karine Queiroga, Mariana, Meri Emili, Priscilla Neris e Thaisa Rolim, pela paciência, amizade e companheirismo. A ajuda de vocês foi fundamental no alcance desse objetivo.

A todos os funcionários do LTF, pelos diversos serviços prestados, fundamentais para o bom andamento deste trabalho.

A todos os cidadãos brasileiros, que com o pagamento dos seus impostos, financiaram os meus estudos e o desenvolvimento deste trabalho.

Enfim, agradeço a todos aqueles que de forma direta ou indireta, viabilizaram a execução do meu trabalho e que sempre acreditaram em mim, sempre confiantes de que eu chegaria aonde cheguei. A todos, o meu “muito obrigada”.

## RESUMO

A espécie *Aplysina fistularis* é uma esponja marinha da ordem Verongida, pertencente à família Aplysinidae. Possui forma tubular, maciça e elástica com coloração amarelada, sendo frequentemente encontrada no litoral brasileiro. Assim como outros gêneros da família Aplysinidae, esse gênero possui alcalóides isoxazolinícos com resíduos de tirosina bromados que demonstram uma tendência para as seguintes atividades farmacológicas: antitumoral, antimicrobiana e citotóxica. Isso implica a importância em se estudar os constituintes químicos e as atividades farmacológicas desta espécie. O estudo químico foi realizado através de métodos cromatográficos usuais e permitiu o isolamento de três constituintes: um alcalóide quaternário (aplysifistularina), ainda não relatado na literatura, apresentando, portanto, importância quimiotaxômica para a espécie e uma mistura de esteróides, o aplysterol e o 24,28-dideidroaplysterol, isolados pela primeira vez na espécie. A identificação estrutural destas substâncias foi realizada através da análise de dados obtidos por métodos espectroscópicos como IV, RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  uni e bidimensionais (COSY, HMQC, HMBC e NOESY) e espectrometria de massas, além de comparação com valores da literatura. O Extrato Etanólico Bruto não apresentou atividade inibitória sobre o crescimento de algumas cepas de bactérias e fungos testadas. Assim, os resultados obtidos neste trabalho contribuíram para o estudo químico, antimicrobiano da esponja marinha *Aplysina fistularis*.

**Palavras-chave:** Aplysinidae, *Aplysina fistularis*, Alcalóides, Esteróides

## ABSTRACT

The species *Aplysina fistularis* is a marine sponge from the order Verongida belonging to the family Aplysinidae; it has tubular, concise and elastic form with a yellowish color and is frequently found in the Brazilian coast. Like the other genera of the Aplysinidae family, this one is known for its isoxazoline alkaloids with residues of brominated tyrosines presenting a tendency for antitumoral, antimicrobial and citotoxic pharmacological activities. This implies several factors to justify the study in depth this species' chemical constituents and pharmacological activities. The chemical study was carried out through usual chromatographic methods and it allowed the isolation of three constituents from *Aplysina fistularis*: a quaternary alkaloid (aplysfistularina), novel in the literature, showing, therefore, chemotaxonomic importance for the species and a mixture of steroids, aplysterol and 24,28-didehydroaplysterol, isolated for the first time from this species. The structural identification of these substances was conducted through data analysis obtained by spectroscopic methods such as IR, NMR of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  uni and two-dimensional (COSY, HMQC, HMBC and spectrometry NOESY) and mass spectrum, besides the comparison with values from the literature. The results of the antimicrobial activity essays of the ethanol crude extract didn't show inhibitory activity over growth of the tested bacteria and fungi species. So, the obtained results in this paper have contributed for the chemical and antimicrobial study of *Aplysina fistularis*.

**Keywords:** Aplysinidae, *Aplysina fistularis*, Alkaloids, Steroids

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Bioconversão induzida por lesão dos alcalóides isoxazolínicos bromados no tecido da esponja *Aplysina aerophoba* ao ser atacada hostilmente.....30
- FIGURA 2.** Compostos derivados da bromo-tirosina isolados da *Aplysina fistularis insularis*.....31
- FIGURA 3.** *Aplysina fistularis* por Eugene Weber © California Academy of Sciences, 2001.....32
- FIGURA 4.** *Aplysina archeri* por Eugene Weber © California Academy of Sciences, 2001.....33
- FIGURA 5.** Localização geográfica das espécies de esponjas marinhas do gênero *Aplysina*.....35
- FIGURA 6.** Compostos presentes no gênero *Aplysina*, onde a 11-hidroxi-aerotionina e 11-oxoaerotionina já foram isolados anteriormente.....37
- FIGURA 7.** Alguns metabólitos bromo-derivados encontrados na espécie *Aplysina fistularis insularis*.....38
- FIGURA 8.** *Aplysina fistularis* por Eugene Weber © California Academy of Sciences, 2001.....39
- FIGURA 9.** Compostos produzidos pela *Aplysina fistularis* derivados da bromo-tirosina e um composto próximo a histidina.....40
- FIGURA 10.** Núcleo isoxazolínico (A) encontrado nos alcalóides de esponjas da ordem Verongida; resíduo de bromo-tirosina (B).....42
- FIGURA 11.** Alguns esteróides comuns isolados de esponjas marinhas.....44

<b>FIGURA 12.</b> Alguns esteróides incomuns isolados de organismos marinhos.....	45
<b>FIGURA 13.</b> Estrutura química do Ara-A e Ara-C.....	46
<b>FIGURA 14.</b> <i>Aplysina fistularis</i> após a coleta, mostrando seu comprimento.....	58
<b>FIGURA 15.</b> Base da esponja <i>Aplysina fistularis</i> .....	59
<b>FIGURA 16.</b> Ápice da esponja <i>Aplysina fistularis</i> .....	59
<b>FIGURA 17.</b> Análise comparativa com modelos da literatura.....	75
<b>FIGURA 18.</b> Análise utilizando software ChemDraw Ultra ( Chemical Structure Drawing Stantard) especializado em química.....	76
<b>FIGURA 19.</b> Racionalização mecanística proposta para a molécula de Aplysfistularina.....	77
<b>FIGURA 20.</b> Espectro na região do IV de Af-1 (Pastilha de KBr).....	78
<b>FIGURA 21.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C-APT de Af-1 (CD <sub>3</sub> OD, 125 MHz).....	79
<b>FIGURA 22.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H de Af-1 (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz).....	80
<b>FIGURA 23.</b> Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H na região de 3,0-3,6 de Af-1 (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz).....	81
<b>FIGURA 24.</b> Espectro de correlação de <sup>1</sup> H x <sup>1</sup> H-COSY de Af-1 (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz).....	82
<b>FIGURA 25.</b> Espectro de correlação <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C-HMQC de Af-1 (CD <sub>3</sub> OD, 500 e 125 MHz, respectivamente).....	83
<b>FIGURA 26.</b> Espectro de correlação <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C-HMBC de Af-1 (CD <sub>3</sub> OD, 500 e 125 MHz, respectivamente).....	84

<b>FIGURA 27.</b> Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC de Af-1 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 e 125 MHz, respectivamente).....	85
<b>FIGURA 28.</b> Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC de Af-1 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 e 125 MHz, respectivamente).....	86
<b>FIGURA 29.</b> Expansão do espectro de correlação $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC de Af-1 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 e 125 MHz, respectivamente).....	87
<b>FIGURA 30.</b> Espectro de correlação espacial $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -NOESY de Af-1 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).....	88
<b>FIGURA 31.</b> Expansão do espectro de correlação espacial $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -NOESY de Af-1 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz).....	89
<b>FIGURA 32.</b> Espectro de massas de Af-1 (Electrospray – ESMS).....	90
<b>FIGURA 33.</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de Af-2a e Af-2b ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).....	96
<b>FIGURA 34.</b> Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ na região de 3,4-5,6 de Af-2a e Af-2b ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).....	97
<b>FIGURA 35.</b> Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ na região de 0,6-2,4 de Af-2a e Af-2b ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).....	98
<b>FIGURA 36.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ -APT de Af-2a e Af-2b ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).....	99
<b>FIGURA 37.</b> Expansão do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ -APT na região de 50-160 de Af-2a e Af-2b ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).....	100
<b>FIGURA 38.</b> Expansão do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ -APT na região de 11-45 de Af-2a e Af-2b ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz).....	101

<b>FIGURA 39.</b> Espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC de Af-2a e Af-2b ( $\text{CDCl}_3$ , 200 e 50 MHz, respectivamente).....	102
<b>FIGURA 40.</b> Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC na região de 0,4-2,8 x 10-60 de Af-2a e Af-2b ( $\text{CDCl}_3$ , 200 e 50 MHz, respectivamente).....	103
<b>FIGURA 41.</b> Espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC de Af-2a e Af-2b ( $\text{CDCl}_3$ , 200 e 50 MHz, respectivamente).....	104
<b>FIGURA 42.</b> Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC na região de 1,5-2,5 x 10-160 de Af-2a e Af-2b ( $\text{CDCl}_3$ , 200 e 50 MHz, respectivamente).....	105
<b>FIGURA 43.</b> Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC na região de 0,5-1,2 x 100-160 de Af-2a e Af-2b ( $\text{CDCl}_3$ , 200 e 50 MHz, respectivamente).....	106
<b>FIGURA 44.</b> Espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de Af-2a e Af-2b ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).....	107
<b>FIGURA 45.</b> Expansão do espectro de correlação de $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de Af-2a e Af-2b ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).....	108
<b>FIGURA 46.</b> Espectro de correlação espacial $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -NOESY de Af-2a e Af-2b ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).....	109
<b>FIGURA 47.</b> Expansão do espectro de correlação espacial $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -NOESY na região de 0,5-6 x 1-5,5 de Af-2a e Af-2b ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).....	110
<b>FIGURA 48.</b> Expansão do espectro de correlação espacial $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -NOESY na região de 0,4-2,6 x 0,6-2,4 de Af-2a e Af-2b ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).....	111

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1.** Dados referentes à triagem química realizada com o extrato etanólico bruto da esponja marinha *Aplysina fistularis*.....62
- TABELA 2.** Dados do fracionamento cromatográfico da fração de alcalóides terciários totais da esponja *Aplysina fistularis*.....67
- TABELA 3.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) para Af-1 em  $\text{CD}_3\text{OD}$  ( $\delta$  em ppm), incluindo os resultados dos experimentos 2D heteronucleares  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -COSY- $^n\text{J}_{\text{CH}}$  ( $n=1$ , HMQC;  $n=2$  e  $3$ , HMBC).....75
- TABELA 4.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (50 MHz) para Af-2a e Af-2b em  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta$  em ppm,  $J$  em Hz).....94
- TABELA 5.** Comparação dos dados  $^{13}\text{C}$  (50 MHz) para Af-2a e Af-2b em  $\text{CDCl}_3$  com dados de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz) para Aplysterol e 24,28-Didehidroaplysterol em  $\text{CDCl}_3$  encontrados na literatura ( $\delta$  em ppm) (KELECOM, 1979).....95

## LISTA DE QUADROS

<b>QUADRO 1.</b> Compostos isolados de algumas espécies de esponjas <i>Aplysina</i> .....	36
<b>QUADRO 2.</b> Produtos derivados de esponjas marinhas com propriedades antiinflamatórias .....	47
<b>QUADRO 3.</b> Produtos derivados de esponjas marinhas com propriedades antitumorais .....	47
<b>QUADRO 4.</b> Produtos imunossupressores derivados de esponjas marinhas .....	50
<b>QUADRO 5.</b> Alguns produtos derivados de esponjas marinhas que afetam doenças relacionadas ao sangue .....	51
<b>QUADRO 6.</b> Neurosupressores e relaxantes musculares derivados de esponjas marinhas ..	51
<b>QUADRO 7.</b> Produtos antivirais derivados de esponjas marinhas .....	52
<b>QUADRO 8.</b> Produtos antimaláricos derivados de esponjas marinhas .....	53
<b>QUADRO 9.</b> Produtos antimicrobianos e antifúngicos derivados de esponjas marinhas .....	53
<b>QUADRO 10.</b> Produtos antiincrustantes derivados de esponjas marinhas .....	54

## LISTA DE FLUXOGRAMAS

- FLUXOGRAMA 1.** Marcha sistemática clássica para extração de alcalóides terciários da esponja *Aplysina fistularis*.....64
- FLUXOGRAMA 2.** Marcha sistemática clássica para extração de alcalóides quaternários da esponja *Aplysina fistularis*.....65
- FLUXOGRAMA 3.** Esquema geral para o isolamento e purificação dos constituintes químicos da fração de alcalóides quaternários totais da esponja *Aplysina fistularis*.....66
- FLUXOGRAMA 4.** Esquema geral para o isolamento e purificação dos constituintes químicos encontrados na fração de alcalóides terciários totais da esponja *Aplysina fistularis*.....68

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS

AcOEt	Acetato de Etila
CC	Cromatografia em Coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio Deuterado
CD <sub>3</sub> OD	Metanol Deuterado
CHCl <sub>3</sub>	Clorofórmio
COSY	Correlation Spectroscopy
<i>d</i>	Dupleto
$\delta$	Deslocamento químico
EEB	Extrato Etanólico Bruto
EtOH	Etanol
FATT	Fração de Alcalóides Terciários Totais
FAQT	Fração de Alcalóides Quaternários Totais
Fig.	Figura
FM	Fórmula Molecular
<i>g</i>	Gramas
HCl	Ácido Clorídrico
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
<i>m</i>	Multiplete
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MHz	MegaHertz
NH <sub>4</sub> OH	Hidróxido de amônio
NOESY	Nuclear Overhauser effect Spectroscopy

Pág.	Página
PM	Peso Molecular
ppm	Partes por Milhão
PS	Peso seco
R <sub>f</sub>	Retention Factor (Fator de Retenção)
RMN de <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
RMN – 2D	Ressonância Magnética Nuclear Bi-Dimencional
<i>s</i>	Simpleto
Sol.	Solução
<i>t</i>	Tripleto
u.m.a.	Unidade de Massa Atômica

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	21
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	25
2.1. Objetivo Geral.....	25
2.2. Objetivos específicos.....	25
<b>3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	27
3.1. Considerações gerais sobre esponjas marinhas.....	27
3.2. Considerações sobre a família Aplysinidae.....	32
3.2.1. Classificação taxonômica da esponja.....	33
3.3. Considerações sobre o gênero <i>Aplysina</i> e a espécie <i>Aplysina fistularis</i> .....	34
3.3.1. Características marinhas da <i>Aplysina fistularis</i> .....	38
3.4. Aspectos químicos das esponjas marinhas.....	40
3.4.1. Alcalóides encontrados em esponjas marinhas.....	40
3.4.2. Importância química dos esteróides em esponjas marinhas.....	43
3.5. Atividade biológica de esponjas marinhas.....	45
3.5.1. Atividade antimicrobiana.....	55
<b>4. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	58
4.1. Coleta do material marinho.....	58
4.2. Processamento da esponja <i>Aplysina fistularis</i> .....	59
4.3. Métodos cromatográficos utilizados no estudo químico.....	59
4.4. Métodos espectrométricos utilizados para análise dos constituintes químicos.....	60
4.5. Determinação do ponto de fusão.....	61
4.6. Obtenção do extrato etanólico bruto (EEB) da esponja <i>Aplysina fistularis</i> .....	61
4.7. Avaliação Química Preliminar dos Constituintes Químicos Encontrados no EEB da Esponja Marinha <i>Aplysina fistularis</i> (Screening Químico).....	61
4.8. Marcha sistemática para extração de alcalóides da esponja <i>Aplysina fistularis</i> .....	63
4.8.1. Marcha sistemática para extração de alcalóides terciários totais (FATT).....	63
4.8.2. Marcha sistemática para extração de alcalóides quaternários totais (FAQT).....	63
4.9. Fracionamento cromatográfico.....	65
4.9.1. Fracionamento cromatográfico da fração de alcalóides quaternários totais (FAQT) da	

espécie <i>Aplysina fistularis</i> .....	65
4.9.2. Fracionamento cromatográfico da fração de alcalóides terciários totais (FATT) da espécie <i>Aplysina fistularis</i> .....	67
4.10. Atividade biológica do EEB da esponja <i>Aplysina fistularis</i> .....	69
4.10.1. Avaliação da atividade antimicrobiana do EEB da Espécie <i>Aplysina fistularis</i> .....	69
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	71
5.1. Determinação Estrutural de Af-1.....	71
5.2. Determinação Estrutural de Af-2.....	91
5.3. Testes de Atividade Biológica.....	112
5.3.1. Avaliação da atividade antimicrobiana do EEB da esponja <i>Aplysina fistularis</i> .....	112
<b>6. CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROMÉTRICOS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS</b> .....	114
6.1. Af-1: Identificada como Aplysfistularina.....	114
6.2. Af-2a: Identificada como Aplysterol.....	115
6.3. Af-2b: Identificada como 24,28-Didehidroaplysterol.....	116
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	118
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	120

An underwater photograph showing several large, yellow, cylindrical sponges on a seabed. The water is clear and blue, and there are some green plants or algae in the background.

# **1. INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

Todas as formas vivas atuais evoluíram a partir de organismos marinhos, os quais possuem uma imensa biodiversidade. Existem mais de 150 mil espécies de algas e invertebrados, entre eles as esponjas marinhas. Este número subestima o valor real da biodiversidade marinha, já que nas regiões mais estudadas se considera que as espécies descritas nesse habitat não superam 80% das existentes, e em outras regiões do mundo ele é consideravelmente menor (PALERMO, 2004).

Conhecidas e utilizadas desde a Antigüidade, as esponjas foram incluídas já no primeiro tratado sobre classificação de organismos, escrito em 350 a.C., na Grécia clássica por Aristóteles. Consideradas inicialmente como plantas, sua natureza animal só foi reconhecida no final do século XVIII. No entanto, os grandes naturalistas da época como Lammarck, Lineu e Cuvier classificavam as esponjas como Zoophyta (animais-plantas). A elevação de Porífera ao nível de Filo, sugerida por Huxley em 1875 e por Sollas em 1884, só foi aceita no início do século XX. Ainda assim, os debates a respeito de sua posição em relação aos protozoários e metazoários permaneceram até recentemente (SPONGE, 2007).

As propriedades terapêuticas das esponjas datam de séculos atrás, sendo improvável determinar quando e como foram descobertas, ao menos em face da atual falta de informações consistentes. Alguns registros históricos, porém, nos reportam à Grécia de Alexandre, o Grande. Como conquistador e estimulador do conhecimento grego que foi, ele costumava levar em suas comitivas sábios, filósofos e “homens da ciência”, sempre acompanhando seus exércitos nas viagens que realizava. O historiador romano Plínio, escreveu sobre os médicos de Alexandre e seu conhecimento sobre esponjas. Em seu relato, aqueles médicos usavam esponjas saturadas com iodo para estimular a coagulação do sangue, ou com extratos bioativos de plantas para anestesiá-los. Esponjas eram embebidas em vinho e colocadas no lado esquerdo do peito em caso de ataques cardíacos; também eram embebidas em urina para tratar mordidas de animais venenosos. Plínio recomendava o seu uso em todos os tipos de ferimentos, em fraturas ósseas, dores de estômago, doenças infecciosas e até como implantes após operações no peito (SIPKEMA et al., 2005).

Relatos do século XVIII falam de médicos da Ucrânia, Rússia e Polônia que usavam uma esponja, a qual chamavam de Badiaga, para tratar pacientes. O pó seco desta esponja era friccionado no peito ou costas de pacientes com doenças pulmonares. Depois foi descoberto que a Badiaga não se tratava de uma esponja, mas de uma mistura delas que variava

dependendo da região (SIPKEMA et al., 2005).

Pertencentes ao filo Porífera, as esponjas são animais bentônicos sésseis. São os animais multicelulares mais primitivos. Possuem uma fisiologia bastante simples na sua construção. Trata-se de organismos aquáticos – marinhos em sua maior parte, que, quando atingem a forma adulta, se encontram assentados sobre um substrato sólido em lugares que forneçam condições favoráveis ao seu crescimento, ainda que muitas em seu estado primário sejam móveis (PALERMO, 2004). Utilizam células flageladas chamadas coanócitos para promover a circulação da água através de um sistema de canais exclusivo do filo, chamado sistema aquífero, ao redor do qual seu corpo é construído. Na maioria dos livros de Zoologia é comum a descrição dos três tipos básicos de sistema aquífero: ascon, sicon e leucon. Esta corrente de água traz partículas orgânicas que são filtradas e digeridas. É geralmente sustentado por um esqueleto mineral formado por espículas, que são estruturas de sílica ou carbonato de cálcio cujo tamanho pode variar de poucos micrômetros a centímetros. Existem, no entanto, diversas variações. A definição simples que é geralmente mais aceita para este grupo é: "Animais filtradores e sedentários, que se utilizam de uma única camada de células flageladas para bombear água através de seu corpo" (LABPOR, 2007).

As esponjas não possuem tecidos típicos, como os encontrados em outros animais multicelulares, e suas células ainda retêm um alto grau de totipotência (capacidade de diferenciação celular) e independência. Apesar de serem animais capazes de alcançar grande porte, com mais de 1 metro de altura ou recobrir largas áreas de substrato, alguns dos seus processos orgânicos são por vezes mais semelhantes aos encontrados nos Protozoa (animais unicelulares) que nos Metazoa (animais multicelulares). Por serem facilmente encontradas em todos os ambientes marinhos – desde as zonas intermareais até profundidades oceânicas de 8500 m em mares tropicais ou polares, existem atualmente mais de 7000 espécies descritas por estudiosos ao longo dos séculos, embora acredita-se que esse número possa superar 15000 (PALERMO, 2004). Apesar de ocorrerem em todos os mares e em todas as profundidades, os litorais rochosos de áreas não poluídas abrigam faunas de esponjas particularmente ricas em metabólitos secundários (LABPOR, 2007).

Mesmo possuindo morfologia simples e baixo grau de organização, as esponjas apresentam uma enorme diversidade de formas e cores nas mais diferentes tonalidades (LABPOR, 2007). São classificadas do nível de ordem até espécie, principalmente por caracteres de importância sistemática, ou seja, reconhecimento de grupos de parentesco: a cor, a forma, a textura da superfície, a forma das aberturas inalantes e exalantes, a

consistência, o esqueleto e os tipos de espículas. Estes caracteres são muito importantes para a distinção a nível específico e devem ser obrigatoriamente anotados durante a coleta, pois freqüentemente se perdem após a fixação. Portanto, a fotografia submarina tem uma importância fundamental para a identificação das espécies de esponjas, já que é o único meio de preservar as características externas da esponja como elas eram em vida. Para que uma espécie de esponja seja identificada com segurança é necessário que se façam preparações do esqueleto e das espículas dissociadas em lâminas para análise microscópica (HOOPER, 2000).

A classificação do Filo Porífera é ainda hoje muito debatida, desde a definição das espécies até as relações entre as classes e subclasses. Os caracteres morfológicos e esqueléticos, insuficientes para um estudo filogenético amplo do grupo, vêm sendo complementados por uma diversidade cada vez maior de critérios alternativos (incluindo métodos bioquímicos, moleculares, embriológicos, histológicos e citológicos) para a taxonomia de Porífera (HOOPER, 2000).

Na natureza, a fauna de poríferos da costa Atlântica da América do Sul é uma das menos conhecidas do mundo, e a maior parte do conhecimento sobre a esponjofauna brasileira vêm de dragagens na plataforma continental, efetuadas por expedições estrangeiras (p.ex. navios "Challenger" e "Calypso") (LABPOR, 2007).

Das espécies da classe Demospongiae, conhecidas na Costa Brasileira, cerca de 73% (194/267) foram registradas por pesquisadores estrangeiros. As espécies litorais, de fácil acesso por mergulho livre, têm sido pouco estudadas, com coletas esparsas ao longo da costa. Recentemente, essa tendência vem se invertendo, e os poucos grupos de pesquisa dedicados ao estudo das esponjas marinhas do Brasil (coordenados por Beatriz Mothes e Rosária Barbosa na Fundação Zoobotânica de Porto Alegre; por Eduardo Hajdu e Guilherme Muricy no Museu Nacional, e por Solange Peixinho na Universidade Federal da Bahia) intensificam o estudo taxonômico das espécies litorais através de coletas por mergulho autônomo (LABPOR, 2007).

Portanto se considerarmos que dois terços da superfície terrestre está coberta pelos mares e oceanos, se abre um grande potencial para o descobrimento de novas substâncias farmacologicamente ativas, considerando que neste habitat vivem a grande maioria das espécies animais e vegetais do planeta.

Neste contexto, os estudos dos produtos naturais marinhos ganham novos desafios na necessidade de se expandir o conhecimento acerca de seus constituintes químicos e na busca de novos compostos farmacologicamente ativos que possam garantir uma melhor qualidade de vida para a sociedade.

An underwater photograph showing several tall, yellow, cylindrical sponges on a coral reef. The water is clear and blue, and other coral structures are visible in the background.

## **2. OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Contribuir com os estudos químico, biológico e quimiotaxonômico da esponja marinha *Aplysina fistularis*, encontrada no litoral paraibano.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Extrair, Isolar e purificar os metabólitos secundários encontrados na espécie *Aplysina fistularis* através de métodos cromatográficos;
- Identificar e caracterizar os constituintes químicos encontrados na *Aplysina fistularis* por métodos espectroscópicos;
- Fornecer os extratos, frações e substâncias isoladas de *Aplysina fistularis* para realização de testes de atividade biológica.

A horizontal band across the middle of the page features a background image of a coral reef. The image is semi-transparent, allowing the text to be clearly visible. The coral is primarily yellow and orange, with some blue and green hues in the background.

# **3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

#### **3.1. Considerações Gerais sobre Esponjas Marinhas**

Numerosos invertebrados marinhos vivem situações ecológicas similares às das plantas marinhas e terrestres. Ascídios, corais, esponjas e briozoários são sésseis e incapazes de se protegerem ativamente das ameaças do meio em que vivem (PALERMO, 2004).

As esponjas vivem em habitat de grande competição por espaço não só a nível físico, mas principalmente a nível químico, pela produção de diversas substâncias tóxicas, ou alelopáticas, que lhes permitem competir contra espécies concorrentes ou se proteger de predadores. Associam-se também com uma grande variedade de microorganismos, facilitando sua permanência no meio. Por estes motivos, o interesse farmacológico em seus compostos cresceu bastante nos últimos anos. Hoje é sabido que possuem um metabolismo secundário extremamente diversificado (LABPOR, 2007).

Como as esponjas são organismos sésseis, elas são mais dependentes de seus mecanismos protetores do que do ato de fuga ou da defesa ativa. Dependendo da influência de fatores de estresse a que são expostas, seguem estratégias alternativas. Em casos de fatores de estresse previsíveis ou constantes, os mecanismos de defesa constitutiva (como carapaças, ferrões ou acumulação constitutiva de metabólitos protetores) têm se desenvolvido normalmente. Contudo, se os impactos perturbadores mostram uma alta variabilidade espacial ou temporal, mecanismos de defesa facultativos têm se desenvolvido a seu favor. Esta última alternativa de defesa pode ser dividida em duas formas diferentes: defesas induzidas e defesas ativadas (THOMS et al., 2005).

‘Defesas induzidas’ tais como a biossíntese metabólica de defesa induzida (RODA, BALDWIN, 2003; THOMS et al., 2005) ou mutações morfológicas induzidas (LURLING, 2003; THOMS et al., 2005) são mecanismos lentos. Os fatores de indução abrangem a ação predatória (dano) ou o ataque causado por microorganismos nocivos. Após o ataque inicial, as prioridades de alocação de recursos no organismo atacado podem ser mudadas de crescimento para defesa. Algumas vezes levam semanas até que um efeito protetor ocorra (HAMMERSTROM et al., 1998; TAYLOR et al., 2002). Assim, não se pode esperar que este tipo de mecanismo dê uma resposta imediata, mas que preferivelmente prepare o organismo molestado para futuros ataques (THOMS et al., 2005).

Uma resposta mais rápida aos fatores de estresse é a transformação induzida por ataque dos compostos precursores inativos, armazenados no tecido do organismo atacado, desse modo, produzindo produtos de transformação que exibem uma pronunciada atividade defensiva. Paul e Van Alstyne (1992) descreveram este fenômeno como “defesa ativada” a fim de distingui-las da lenta defesa induzida. Tais mecanismos são rápidos (normalmente ocorrendo segundos após a lesão) para que se possa facilitar a imediata proteção contra o organismo agressor. Estas reações são normalmente catalisadas por enzimas que convertem os compostos armazenados inativos em produtos defensivos (THOMS et al., 2005).

No ambiente terrestre, reações de defesa ativada envolvendo transformações enzimáticas de precursores inativos são freqüentemente encontradas em plantas. Exemplos incluem glicosídeos cianogênicos que são transformados em HCN altamente tóxico (GLEADOW, WOODROW, 2002; THOMS et al., 2005), ou como na família Brassicaceae e plantas relacionadas em que glucosinolatos são clivados para formar tiocianetos, isotiocianetos ou isonitrilas (STOEWSAND, 1995; FAHEY et al., 2001). Em todos os exemplos relatados, os respectivos precursores são fisicamente separados por compartimentalização das enzimas de biotransformação. Logo após um choque mecânico, os compartimentos são destruídos, o que facilita a formação de substâncias protetoras à medida que as enzimas e substratos entram em contato (THOMS et al., 2005).

No ambiente marinho, exemplos de mecanismos de defesa química ativada também são encontrados. Ascídias, corais, esponjas e briozoários são incapazes de se protegerem ativamente por fuga ou ataque. Particularmente, as esponjas têm sido investigadas com relação aos seus metabólitos de defesa putativos. Nos últimos 30 anos, mais de 4000 metabólitos secundários foram isolados e descritos, muitos dos quais são biologicamente ativos. Em vários casos, estes metabólitos protegem os invertebrados contra os predadores, competidores por espaço ou contra microorganismos patogênicos (BECERRO et al., 1997; McCLINTOCK et al., 1997; THACKER et al., 1998; ENGEL et al., 2002; THOMS et al., 2005).

Reações de defesa química induzida também foram relatadas em esponjas. Porém, as defesas mais importantes são as de mecanismo químico ativado. Um exemplo para este mecanismo foi observado na *Aplysina aerophoba*. Esta esponja, assim como outras espécies da *Aplysina*, acumula alcalóides isoxazolinícos bromados em concentrações acima de 10 % do seu peso seco (AIELLO et al., 1995; CIMINIELLO et al., 1994 a, b, 1995, 1996 a, b, 1997,

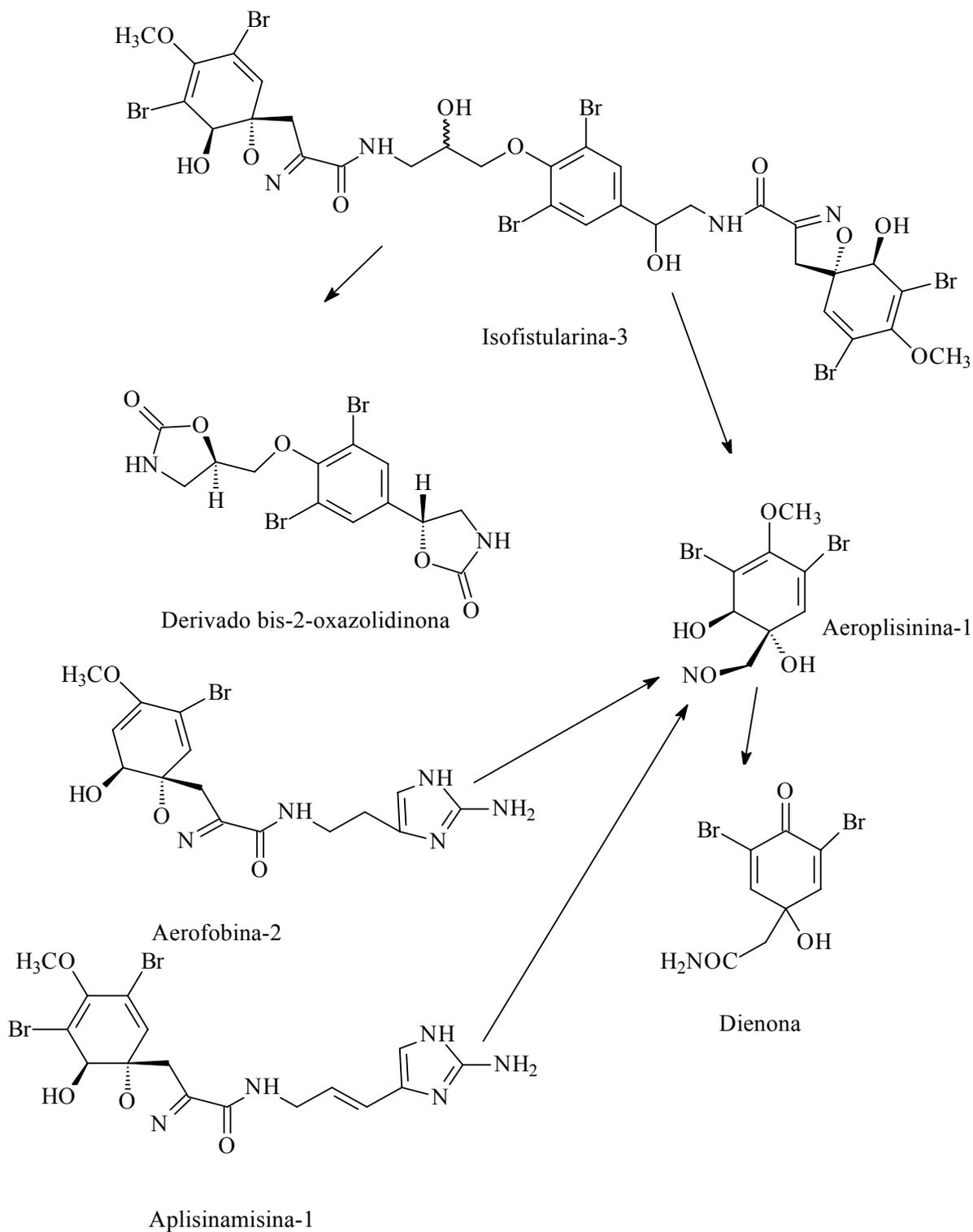
1999, 2000; THOMS et al., 2003; THOMS et al., 2005).

Uma revisão feita por Puyana e colaboradores em 2003, relata que, em um estudo realizado com a esponja *A. aerophoba*, uma série de metabólitos secundários bromados, de alto peso molecular, passaram por uma rápida transformação enzimática em resposta a lesões no tecido.

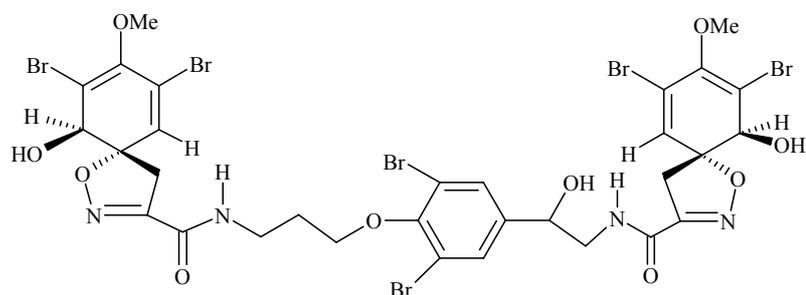
Outros experimentos com extratos brutos da *A. aerophoba* e de seis outras espécies de *Aplysina*, coletadas no Caribe e no Mar Mediterrâneo, revelaram que todas as espécies de *Aplysina* têm a capacidade de clivar alcalóides isoxazolínicos, gerando, então, aeroplisinina-1 (EBEL et al., 1997). Isso levou a conclusão que a clivagem observada de precursores isoxazolínicos é catalisada por enzimas presentes nas esponjas *Aplysina*. Ainda neste estudo foi concluído que as reações de clivagem consistem em duas etapas diferentes: na primeira, a degradação de alcalóides isoxazolínicos provoca um aumento da aeroplisinina-1 com grupo funcional  $\beta$ -hidroxinitrila, enquanto que na segunda etapa, este intermediário é convertido na dienona via hidrólise enol-éter e hidrólise parcial do grupo nitrila (ver figura 1, pág. 30) (THOMS et al., 2005).

Outra importante consideração a fazer sobre as esponjas é a respeito da diversidade de atividades biológicas dos compostos isolados a partir delas. Muitos dos derivados da bromotirosina, por exemplo, reagem biologicamente a diversos agentes. No caso da ordem Verongida, encontramos diversas espécies capazes de produzir compostos com atividades antimicrobiana, antibacteriana, citotóxica, antitumoral, dentre outras (SIPKEMA et al., 2005).

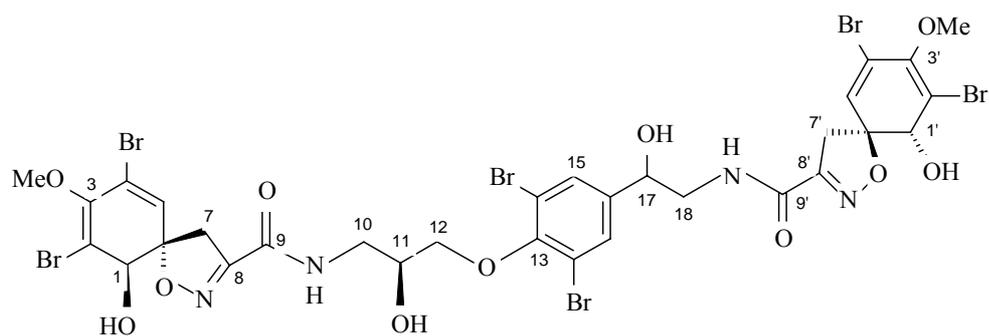
Os compostos 11-deoxifistularina-3 (derivado da bromo-tirosina), fistularina-3, aerotionina e 11-oxoaerotionina foram isolados da *A. fistularis insularis* (ver figura 2, pág. 31). Compagnone e colaboradores (1999) relataram que a 11-deoxifistularina-3 apresentou atividade citotóxica contra as linhagens celulares X-17, Hela, RD, Hep-2 e Lovo, com uma  $DL_{50}$  excedendo 50  $\mu\text{g/mL}$  e contra a MCF-7 (câncer de mama) com uma  $DL_{50}$  17  $\mu\text{g/mL}$ .



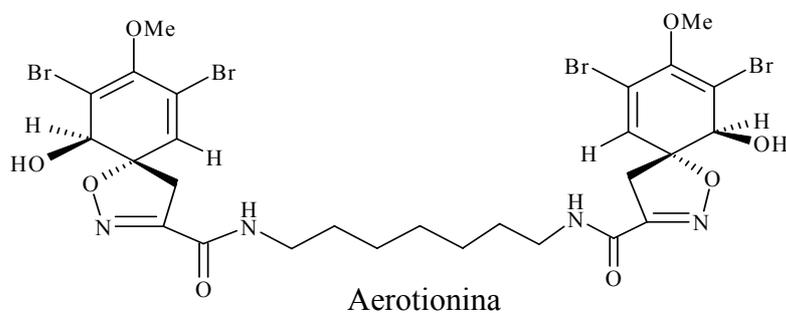
**FIGURA 1.** Bioconversão induzida por lesão dos alcalóides isoxazolínicos bromados no tecido da esponja *Aplysina aerophoba* ao ser atacada hostilmente.



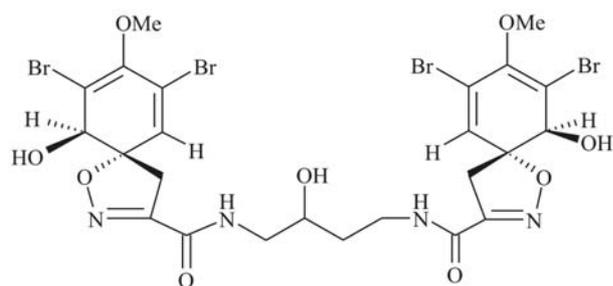
11-Deoxifistularina-3



Fistularina -3



Aerotionina



11-Oxo-aerotionina

**FIGURA 2.** Compostos derivados da bromo-tirosina isolados da *Aplysina fistularis insularis*.

Alcalóides bromados também foram isolados a partir da *A. aerophoba*: aerofobina-2, aplysinamisina-1, isofistularina-3, dienona e aeroplysinina-1, tendo estes dois últimos apresentado atividade citotóxica contra linhagens celulares de câncer (ver figura 1, pág. 30) (KOULMANN et al., 1996).

Os derivados da dibromo-tirosina, isolados da *A. caissara*, fistularina-3 e 11-hidroxiaerotionina, demonstraram atividade antibiótica moderada contra *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, entre várias outras linhagens de bactérias patogênicas (LIRA et al., 2006).

### 3.2. Considerações sobre a Família Aplysinidae

A família Aplysinidae pertencente à ordem Verongida é uma das mais abundantes na costa brasileira. Compreende esponjas tubulares, maciças ou ramosas com o esqueleto de fibras esponjosas, amareladas, formando um retículo de linhas poligonais sem um arranjo próximo da superfície das esponjas. Muitas das Aplysinas variam de amarelas a verdes, marrons ou roxas vivas e quando preservadas ou expostas ao ar, elas passam drasticamente para uma cor oxidativa notável, dando lugar a cores como marrom, roxo escuro, ou preto (ver figuras 3 e 4, págs. 32 e 33). Três valiosos gêneros dessa esponja são correntemente conhecidos na Família: *Aplysina* Nardo, 1834; *Verongula* Verrill, 1907; *Aiolochoira* Wiedenmayer, 1977 e suas espécies são principalmente encontradas nos mares Caribenho e Mediterrâneo. Todas as espécies do gênero *Verongula* estudadas bioquimicamente, possuem constituintes químicos típicos de derivados bromo-tirosina como metabólitos secundários (LABPOR, 2007).



**FIGURA 3.** *Aplysina fistularis* (por Eugene Weber © California Academy of Sciences, 2001).



**FIGURA 4.** *Aplysina archeri* (por Eugene Weber © California Academy of Sciences, 2001).

Esponjas da ordem Verongida incluindo *Verongula pseudoceratina*, *Ianthella* e *Psammaplysilla* foram intensivamente estudadas devido à presença de alcalóides com um ou mais resíduos de bromo-tirosina, onde muitos desses metabólitos são as fistularinas -1, -2 e -3 que mostram interessantes propriedades antibióticas e citotóxicas nas linhas de células X-17, Hela, RD, Hep-2 e Lovo. A presença desses derivados parece ser peculiar à ordem, usados como marcadores químicos para apoiar o trabalho taxonômico (COMPAGNONE, 1999).

### 3.2.1. Classificação Taxonômica da Esponja Marinha *Aplysina fistularis*

- **Reino:** Animalia
- **Filo:** Porífera
- **Classe:** Demospongiae
- **Ordem:** Verongida
- **Família:** Aplysinidae
- **Gênero:** *Aplysina*
- **Espécie:** *Aplysina fistularis*

É ainda atual o debate sobre a classificação das esponjas. O filo Porífera tem uma história filogenética bem controversa e uma taxonomia altamente problemática. Os sistemas de classificação das esponjas utilizam essencialmente as características do esqueleto e da forma e tamanho de seus elementos constituintes: as espículas e fibras esponginas. Ainda assim, a taxonomia clássica bem como as análises recentes apresentam dificuldades em

estabelecer formalmente homologias entre os elementos do esqueleto e a organização do esqueleto. As questões sobre a verdadeira natureza metazoa do filo porífera, assim como sua origem monofilica ou parafilica, as relações filogenéticas entre classes, ordens e famílias e o cosmopolitismo de inúmeras espécies com um simples esqueleto permanecem sem solução (BORCHIELLINI, 2000).

Devido às dificuldades encontradas na classificação taxonômica destes seres, existem poucos marcadores morfológicos confiáveis para se fazer uma reconstrução filogenética adequada. Atualmente são utilizados marcadores quimiotaxonômicos. Bom exemplo destes marcadores são os metabólitos secundários, que vêm se consolidando como uma alternativa ao antigo método das características morfológicas, porque eles aumentam em número todo ano e a complexidade estrutural das moléculas se apresenta como uma fonte promissora de novos elementos (ERPENBECK, VAN SOEST, 2006).

### 3.3. Considerações sobre o Gênero *Aplysina* e a Espécie *Aplysina fistularis*

O gênero *Aplysina* é um dos mais ricos da família Aplysinidae. Duas espécies são conhecidas no mar mediterrâneo, oito são atualmente reconhecidas no Caribe, três na costa Pacífica do México e oito na costa litorânea do Brasil. No mar Mediterrâneo são descritas duas espécies do gênero *Aplysina*: *A. aerophoba* (SCHMIDT, 1862) e *A. cavernicola* (VACELET 1959) (ver figura 5, pág. 35).

No Caribe, dentre as espécies reconhecidas, estão a *A. fistularis insularis*, *A. fistularis* forma *fulva*, *A. archeri*, *A. cauliformis* e a *A. lacunosa*. No Brasil, até o segundo semestre de 2007, eram oficialmente oito: *A. archeri* (HIGGIN, 1875), *A. caissara* (PINHEIRO, HAJDU, 2001), *A. capensis* (CARTER, 1881), *A. cauliformis* (CARTER, 1882), *A. fistularis* (ESPER, 1794), *A. fulva* (PALLAS, 1766), *A. lacunosa* (PALLAS, 1766) e a *A. pergamantacea* (HECHTEL, 1983). (PINHEIRO et al., 2007).

Os pesquisadores Ulisses Pinheiro, Eduardo Hajdu e Márcio Custódio (2007), descreveram recentemente oito novas espécies do gênero *Aplysina* no litoral brasileiro, perfazendo um total de quinze espécies para a costa brasileira. São elas: *A. alcicornis* sp.n., *A. cristagallus* sp.n., *A. lactuca* sp.n., *A. lingua* sp.n., *A. muricyana* sp.n., *A. orthoreticulata* sp.n., *A. pseudolacunosa* sp.n. e *A. solangeae* sp.n. Segundo eles, essas oito espécies são novas para a ciência. Essa afirmação se baseia em observações de populações em larga escala,

bem como em materiais coletados e preservados em coleções (PINHEIRO et al., 2007).



**FIGURA 5.** Localização geográfica das espécies de esponjas marinhas do gênero *Aplysina* (Mapa adaptado pela autora).

Espécies do gênero *Aplysina* são conhecidas por manter relações com vários microorganismos, incluindo cianobactérias, diversas bactérias heterotróficas e fungos marinhos. A presença de alcalóides isoxazolinícos nesses animais pode indicar uma reação de defesa, já que esses alcalóides agem impedindo a proliferação de microorganismos.

Thoms e colaboradores (2005) concluíram em seus estudos que, quando atacadas, as esponjas do gênero *Aplysina* bioconvertem seus alcalóides isoxazolinícos em compostos com pronunciada atividade antimicrobiana por meio de clivagem. Como exemplo destes compostos temos a dienona, utilizada como antibiótico na maricultura.

Estudos de bioatividade revelaram que a bioconversão dos alcalóides isoxazolinícos na *Aplysina* é paralelo ao aumento da atividade antibiótica e citotóxica (WEISS et al, 1996; THOMS, 2005).

O gênero *Aplysina*, assim como outros gêneros da ordem Verongida, destaca-se por suas características bioquímicas únicas. Elas têm carência de terpenos e possuem uma percentagem moderadamente alta de esteróides, geralmente com o esqueleto aplystano e, acima de tudo, produzem uma série de metabólitos bromados derivados da tirosina, sendo estes metabólitos considerados peculiares das espécies que pertencem a esta ordem. Outra

característica típica das esponjas da ordem Verongida é sua alta variabilidade fenotípica (CIMINIELLO et al., 1994a).

A *Aplysina fistularis* se apresenta sob duas formas: a *Aplysina forma fulva* (PALLAS, 1766) e a *Aplysina insularis* (DUCHAISSAING E MICHELOTTI, 1864). Ciminiello, em 1996, relata que elas possuem metabolismos totalmente diferentes e, de acordo com Pulitzer-Finali (1986), elas deveriam ser classificadas em duas espécies distintas. As duas espécies produzem bromo metabólitos como o 3,5-dibromo-1-hidroxi-4-oxo-2,5-ciclohexadieno-1-acetamida e a fistularina-3. Pensava-se que os metabólitos remanescentes eram completamente diferentes, por exemplo, a aerotionina, majoritária na *A. fulva*, enquanto totalmente ausente na *A. insularis* (ver figura 6, pág. 37) (CIMINIELLO et al., 1996a). Posteriormente, Compagnone e colaboradores (1999) estudaram a esponja *A. fistularis insularis* devido a relatos da presença de alcalóides com um ou mais resíduos de bromo-tirosina. Nesse estudo foram isolados, dentre outros compostos conhecidos a fistularina-3, a aerotionina (contrariando o estudo anterior de Ciminiello) a 11-oxoaerotionina e um novo metabólito: a 11-deoxifistularina, a partir do extrato MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> da esponja.

Relatos prévios da *Aplysina fistularis insularis* (família Aplysinidae) documentaram a presença de um grande número de metabólitos bromados interessantes: fistularinas, aerotioninas, ceratinaminas, aplysaminas, anamonianas, psammaplysinas, entre outros (ver figura 7, pág. 38) (THOMS et al., 2005).

Abaixo apresentamos um quadro com alguns compostos químicos isolados de algumas espécies de esponjas *Aplysina*.

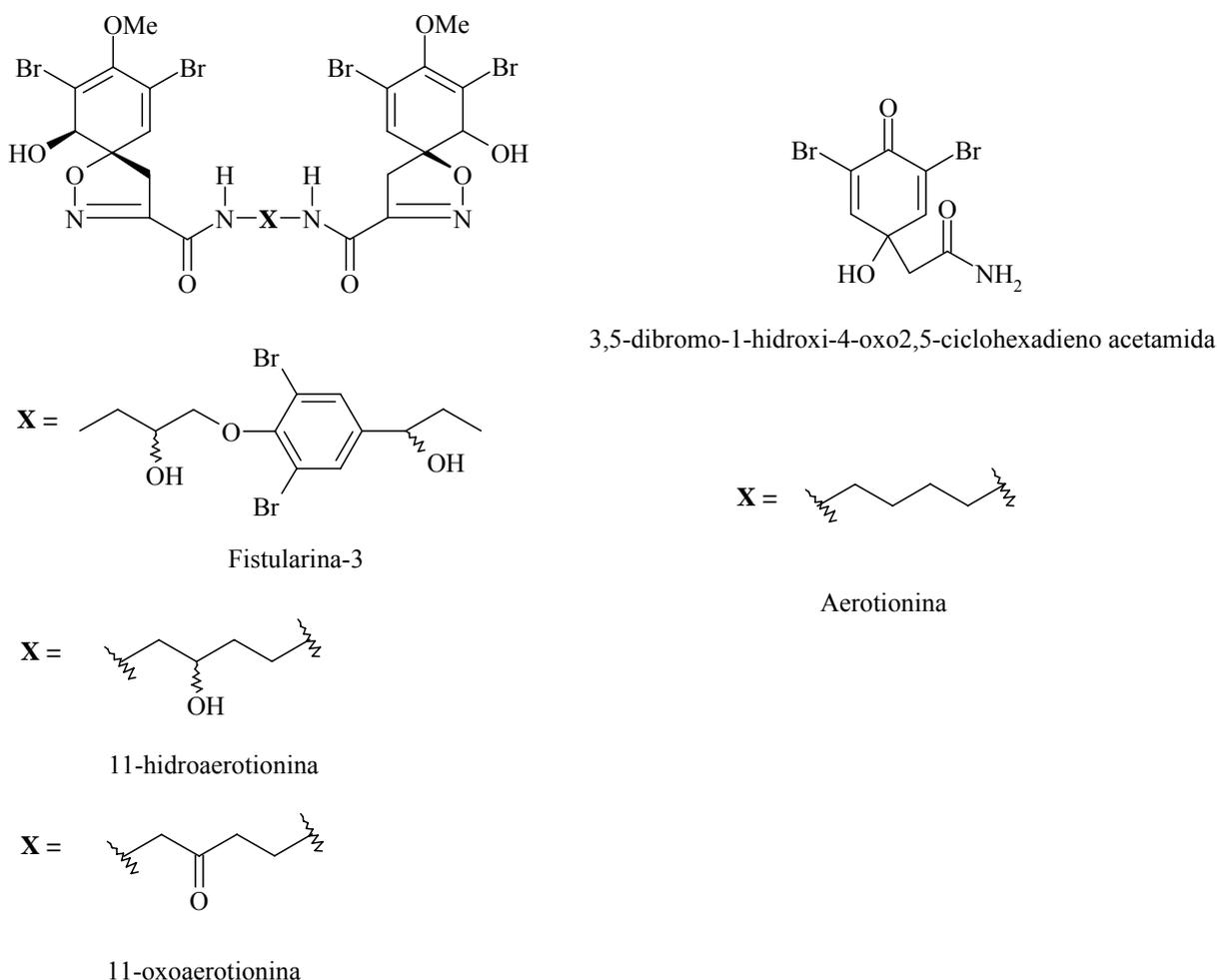
Espécie	Composto químico	Referência
<i>A. fistularis</i>	fistularina-1	GOPICHAND et al., 1979
<i>A. fistularis</i>	fistularina-2	GOPICHAND et al., 1979
<i>A. fistularis</i>	fistularina-3	GOPICHAND et al., 1979
<i>A. aerophoba</i>	Aeroplisinina-2	MAKARIEVA et al., 1981
<i>A. lacunosa</i>	11-oxoaerotionina	ACOSTA et al., 1992

*Continua*

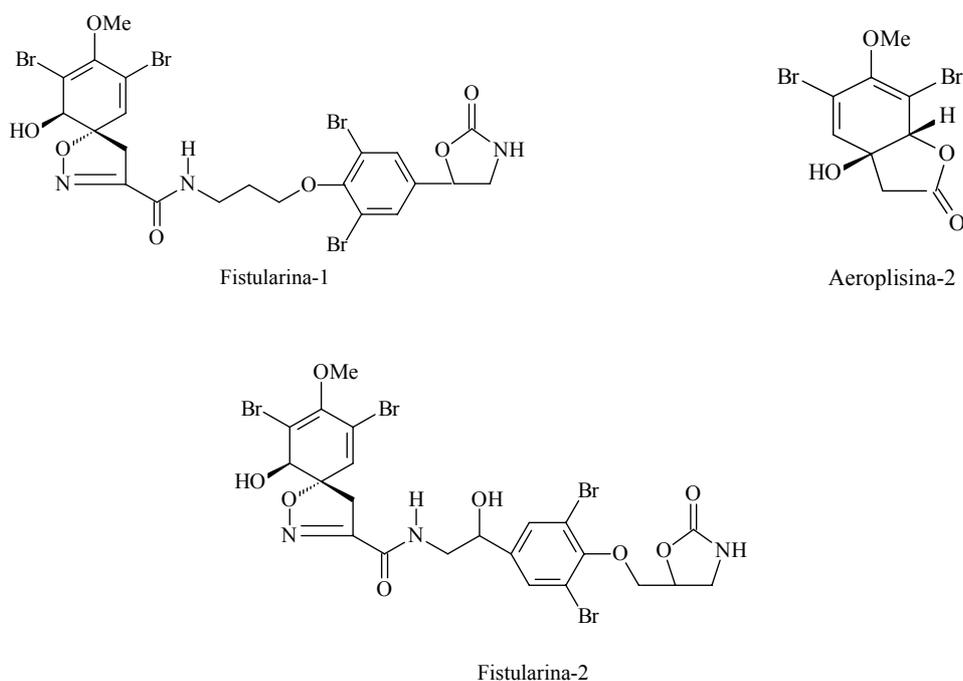
## Continuação

<i>P. durissima</i>	11-hidroxiaerotionina	KERNAN et al., 1990
<i>A. fistularis insularis</i>	11-deoxifistularina	COMPAGNONE et al., 1999
Desconhecido	dienona	MARINLIT et al., 2003
<i>A. fistularis insularis</i> e <i>Aplysina forma fulva</i>	3,5-dibromo-1-hidroxi-4-oxo-2,5-ciclohexadieno-1-acetamida e fistularina-3	CIMINIELLO et al., 1996a

**QUADRO 1.** Compostos isolados de algumas espécies de esponjas *Aplysina*.



**FIGURA 6.** Compostos presentes no gênero *Aplysina*, onde a 11-hidroxiaerotionina e 11-oxoaerotionina já foram isolados anteriormente.



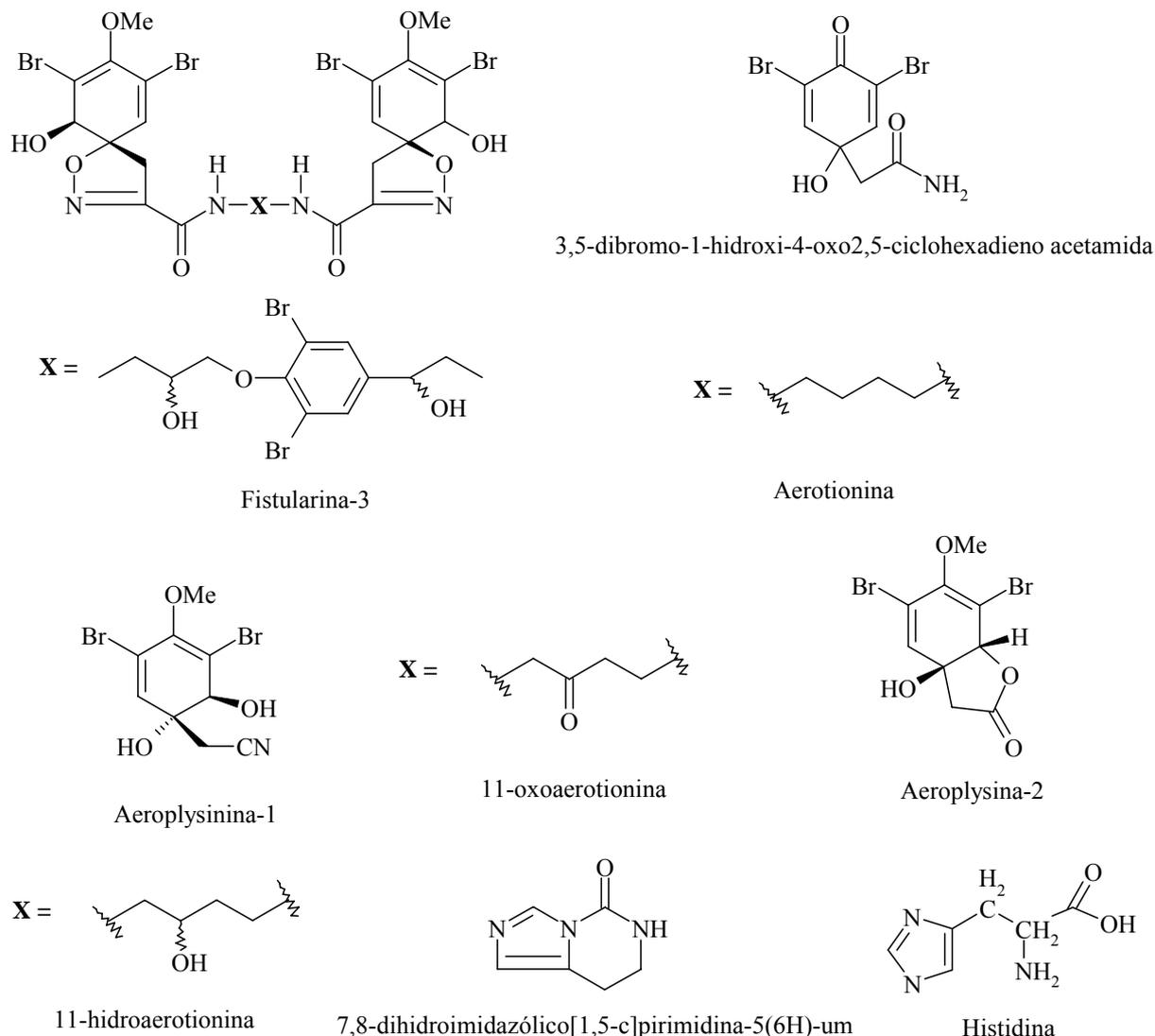
**FIGURA 7.** Alguns metabólitos bromo-derivados encontrados na espécie *Aplysina fistularis insularis*.

### 3.3.1. Características Marinhas da *Aplysina fistularis*

A espécie *Aplysina fistularis* é caracterizada pela cor amarelo-marrom em vida (ver figura 8, pág. 39), sua textura é macia, endurecendo quando preservada em álcool. Possui membros sólidos com cerca de 30 cm de comprimento e de 5 a 15 mm de diâmetro. Esses membros são menos cilíndricos nas extremidades, que vão diminuindo, e se dividem dicotomicamente, podendo formar protuberâncias, produzindo outras ao entrar em contato com ela. Seu esqueleto é rico em fibras que, às vezes, formam uma rede de linhas longas (mais de 2 por 5 mm) e redondas. A espessura da fibra é de 60-100 ângstrons, seu organismo ocupa de 60% a 80% do total de seu diâmetro. Uma análise detalhada dos extratos dos compostos produzidos pela *Aplysina fistularis* levam a mais onze derivados de bromo-tirosina e um composto próximo à histidina (ver figura 9, pág. 40) (CIMINIELLO et al., 1996a).



**FIGURA 8.** *Aplysina fistularis* (por Eugene Weber © California Academy of Sciences, 2001).



**FIGURA 9.** Compostos produzidos pela *Aplysina fistularis* derivados da bromo-tirosina e um composto próximo à histidina.

### 3.4. Aspectos Químicos das Esponjas Marinhas

#### 3.4.1. Alcalóides Encontrados em Esponjas Marinhas

Os metabólitos secundários são uma peça importante na busca pelo desenvolvimento de novas drogas. As pesquisas de extração desses compostos para estudos são realizadas geralmente com plantas, bactérias, fungos e diversos seres marinhos (esponjas, algas, corais, caracóis, etc). Os metabólitos secundários que possuem maior interesse para o homem, se

enquadram em várias categorias, como os alcalóides, terpenóides, glicosídeos, fenóis, entre outros, visto que estas classes de metabólitos já ofereceram substâncias com potencial terapêutico (SIMÕES, 2004).

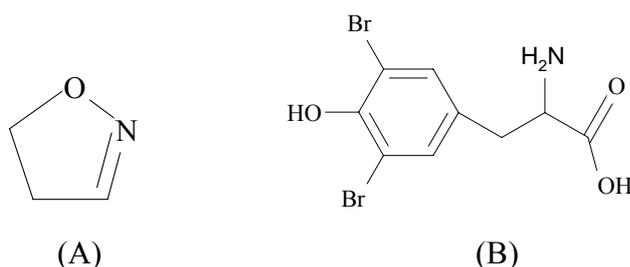
Os alcalóides são encontrados em diversos organismos. Enquanto alguns são considerados venenosos, outros são usados pela medicina como analgésicos ou anestésicos, particularmente a morfina e a codeína. São encontrados em plantas, animais e fungos (SIMÕES, 2004). Assim como outros produtos naturais, os alcalóides são utilizados no tratamento de inúmeras doenças e como ferramentas para a descoberta de novas drogas. (ALMEIDA, 2007).

Alcalóides (termo lingüisticamente derivado da palavra árabe *al-quali*, denominação vulgar da planta da qual a soda foi originalmente obtida) são compostos nitrogenados, farmacologicamente ativos e são encontrados predominantemente nas angiospermas. Em sua grande maioria, possuem caráter alcalino. Uma definição clara e precisa para essa classe de substâncias esbarra numa série de dificuldades, devido à ausência de uma distinção exata entre alcalóides propriamente ditos e aminas complexas de ocorrência natural. Na tentativa de contornar estes problemas, Pelletier (1988) formulou a seguinte definição: um alcalóide seria uma substância orgânica, de origem natural, cíclica, contendo um nitrogênio em um estado de oxidação negativa e cuja distribuição é limitada entre organismos vivos. Essa definição englobaria todos os compostos que foram considerados até o momento como sendo alcalóides, mas excluiria compostos nitrogenados tais como: aminas simples, aminoácidos, peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos, nucleotídeos, porfirinas, vitaminas e compostos nitro e nitrosos. Outras definições foram elaboradas por diferentes pesquisadores, contudo, até o presente, nenhuma se mostrou completamente abrangente. Como as atuais estruturas e origens biogénéticas dos alcalóides tornaram-se mais claras, o conceito de ser derivado de aminoácido foi adicionado (HENRIQUES et al., 2004).

Os alcalóides contendo um átomo de nitrogênio em um anel heterocíclico são chamados de alcalóides verdadeiros e são classificados de acordo com o sistema anelar presente na molécula. As substâncias com o átomo de nitrogênio não-pertencente a um sistema heterocíclico são denominadas de protoalcalóides. Compostos nitrogenados com e sem anéis heterocíclicos que não são derivados de aminoácidos são chamados de pseudoalcalóides (HENRIQUES et al., 2004).

A ordem Verongida possui esponjas que produzem diversos alcalóides isoxazolinícos.

Estes alcalóides apresentam uma estrutura típica com um anel pentacíclico contendo dois heteroátomos inseridos no anel: um oxigênio ligado a um nitrogênio (ver figura 10, pág. 42) (CIMINIELLO et al., 1994 a).



**FIGURA 10.** Núcleo isoxazolínico (A) encontrado nos alcalóides de esponjas da ordem Verongida; resíduo de bromo-tirosina (B).

É possível que esses alcalóides isoxazolínicos possuam halogênios em sua estrutura, já que o ambiente marinho possui uma alta concentração dos íons haletos, os quais têm uma média de 19000 mg/L para  $\text{Cl}^-$ , 65 mg/L para  $\text{Br}^-$ , e 0,06 mg/L para  $\text{I}^-$  e  $\text{IO}_3^-$ , fazendo com que a esponja insira esses íons em seu metabolismo (FENICAL, 1975). Geralmente essas esponjas incorporam resíduos de bromo-tirosina na sua biossíntese sendo inseridos nos seus alcalóides, cuja síntese se dá pela conversão da fenilalanina em tirosina (CARNEY, RINEHART, 1995).

O número de alcalóides derivados de plantas caracterizados era aproximadamente 1000 em 1950, e em 1973, cerca de 3300 estruturas haviam sido elucidadas. Com os avanços das técnicas espectroscópicas, uma análise do banco de dados Natural Products Alert Database – NAPRALERT, em 1995 indicou 26900 estruturas de alcalóides conhecidas de uma variedade de fontes (plantas, fungos, organismos marinhos, mamíferos, etc) de aproximadamente 150000 produtos naturais caracterizados (CORDELL et al., 2001).

Segundo Cordell (2001), o número total de alcalóides derivados de plantas é 21120. É importante perceber que enquanto os alcalóides de plantas compreendem cerca de 15,6 % dos produtos naturais conhecidos, eles constituem quase 50 % dos produtos naturais derivados de plantas de significância farmacêutica e biológica (CORDELL et al., 2001).

Dos 21120 alcalóides derivados de plantas, 2291 foram avaliados num único bioensaio e, somente 1995 foram avaliados dentre 2 e 5 bioensaios. Ainda, apenas 167 alcalóides foram testados em 20 ou mais bioensaios *in vitro* ou *in vivo*. Assim, mais de um terço (35,9 %) dos

alcalóides examinados biologicamente em 20 ou mais ensaios são farmacologicamente ativos. Torna-se aparente o vasto potencial para a descoberta de drogas quando se percebe que 76,4 % dos alcalóides ainda necessitam de avaliação num ensaio biológico (CORDELL et al., 2001).

É importante ressaltar que, se comparados com as acetogeninas, os terpenóides e os fenilpropanóides, os alcalóides apresentam uma maior diversidade de esqueletos estruturais. Assim, os 135500 produtos naturais derivados de plantas representam cerca de 5750 dos esqueletos totais. Ainda, os alcalóides derivados de plantas, os quais somam 21120 estruturas (15,6 %), possuem 32,5 % (1872) do total de esqueletos estruturais. Isto se traduz numa maior diversidade de unidade farmacofórica e, portanto, em uma probabilidade maior de que uma resposta biológica será mostrada contra uma maior variedade de sítios moleculares. Foram demonstrados três aspectos acerca do potencial dos alcalóides para prover agentes farmacêuticos e biológicos no futuro: primeiro, que a grande maioria dos alcalóides conhecidos foram avaliados biologicamente de forma precária, segundo, que existem várias plantas contendo alcalóides que permanecem sem investigação química e biológica, e terceiro, vários alcalóides derivados de outras fontes como fungos, organismos marinhos e mamíferos permanecem sem estudos (CORDELL et al., 2001).

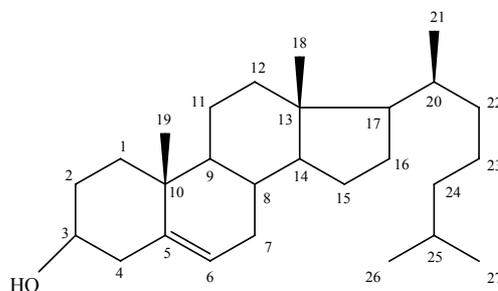
### **3.4.2. Importância Química dos Esteróides em Esponjas Marinhas**

Nas décadas de 1970 e 1980 foram examinados muitos esteróides, evidenciando a presença de uma enorme variedade destes compostos em esponjas. Tais exames demonstraram que as esponjas possuíam uma série maior de esteróides em relação a todos os outros organismos combinados. Elas representam um dos grupos animais mais antigos e, algumas delas, contém, talvez, a maior diversidade de esteróides. Os esteróides isolados de esponjas são, às vezes, misturas muito complexas de compostos, muitos dos quais não têm um correspondente no ambiente terrestre (DJERASSI, SILVA, 1991; AIELLO et al., 1999; SANTALOVA et al., 2004).

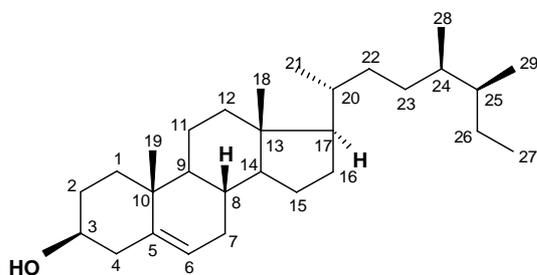
As esponjas ocupam uma posição preeminente no universo de organismos no que se refere à produção de esteróides incomuns. Para se ter uma idéia, o número de esteróides polares isolados de esponjas, no final de 2002, era de 250 (SARMA et al., 2005). Alguns acreditam que as esponjas marinhas podem vir a ser a fonte mais diversa e sem precedentes

biogeneticamente de esteróides não-convencionais em todo o reino animal (AIELLO et al., 1999).

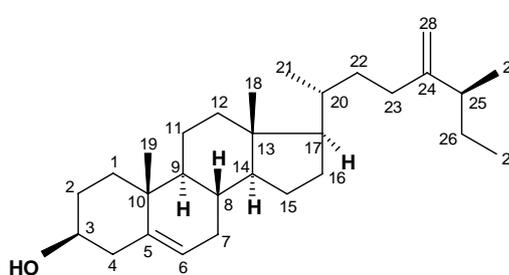
O esteróides comuns, ou convencionais, tem os núcleos  $3\beta$ -hidroxi- $\Delta^5$  (ou  $\Delta^0$ )-colestano (ver figura 11, pág. 44) e uma cadeia lateral  $C_8$ - $C_{10}$ . Há mais de 200 destes esteróides, ocorrendo em organismos marinhos como misturas complexas inseparáveis e sua identificação é normalmente feita por meio de CG-EM. Os esteróides incomuns, ou não-convencionais, possuem uma ou ambas das seguintes características: (1) Cadeias laterais de  $C_0$  a  $C_{12}$  envolvendo perda ou adição de átomos de carbono em outras posições que não  $C_{24}$ ; (2) oxigenação (múltipla) dos núcleos e/ou da cadeia lateral (ver figura 12, pág. 45) (SARMA et al., 2005; YAN, GUO, 2005).



Colestano (a)

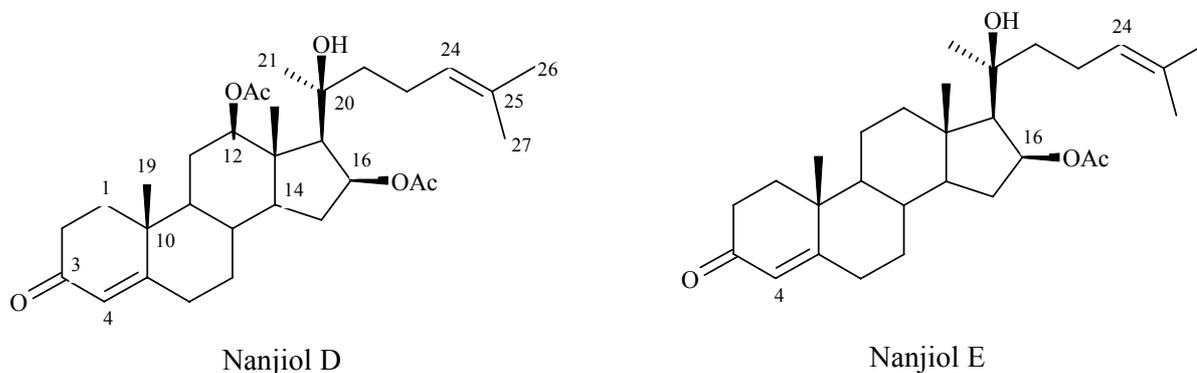


Aplysterol (b)



24,28-Didehidroaplysterol (c)

**FIGURA 11.** Alguns esteróides comuns isolados de esponjas marinhas.



**FIGURA 12.** Alguns esteróides incomuns isolados de organismos marinhos.

Muitos dos novos esteróides contendo um grupo oxigenado extra e uma cadeia lateral modificada por alquilações/dealquilações foram reportados em esponjas marinhas. Em algumas poucas espécies, os esteróides são os componentes majoritários, únicos, de seus extratos. Exemplos típicos são o aplysterol e o 24-28-didehidroaplysterol (ver figura 11 b e c, pág. 44), os primeiros esteróides com um grupo metila no C<sub>26</sub>, os quais foram considerados os principais esteróides das esponjas do gênero *Aplysina* (Verongida), entre outros (SARMA et al., 2005).

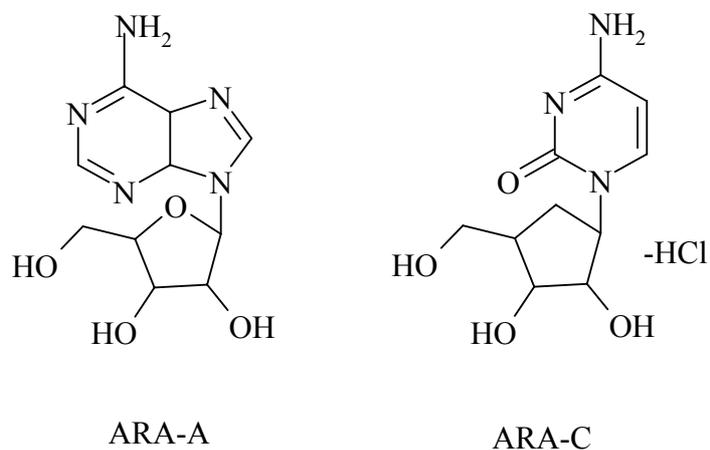
Até o presente, várias revisões sobre as estruturas e a distribuição dos esteróides de invertebrados marinhos – dentre os quais as esponjas – foram publicadas. A vasta literatura acerca do tema demonstra que as esponjas continuam a ser uma fonte rica em esteróides (AIELLO et al., 1999).

### 3.5. Atividade Biológica de Esponjas Marinhas

Em vista de seu potencial de produção de novos compostos de interesse, as esponjas têm sido um dos organismos mais estudados do ponto de vista químico. Nos últimos 20 anos, centenas de substâncias foram isoladas a partir de esponjas, muitas das quais já foram identificadas e apresentam fortes atividades biológicas e farmacológicas como, por exemplo, extratos com alta percentagem de atividade antitumoral, chegando a superar os 10% (LABPOR, 2007). As moléculas produzidas por esponjas apresentam várias outras atividades biológicas: antibacteriana, anticoagulante, antifúngica, antiinflamatória, antimalária,

antiplaquetária, antituberculose, antiviral, imunossupressora e neurosupressora (ERPENBACK, VAN SOEST, 2006).

Os pesquisadores Bergmann e Feeney, no início dos anos 1950, descobriram os nucleosídeos spongotimidina e spongouridina na esponja marinha *Cryptothetia crypta*. Estes nucleosídeos foram a base da síntese da Ara-C, o primeiro agente derivado marinho anticancerígeno, e a droga antiviral Ara-A (ver figura 13, pág. 46) (PROKSCH et al., 2002). Hoje, o Ara-C é utilizado em tratamentos de rotina para pacientes com leucemia e linfoma. Um de seus derivados também foi aprovado para uso em pacientes com câncer no pâncreas, no pulmão e no peito (SIPKEMA et al., 2005).



**FIGURA 13.** Estruturas químicas do Ara-A e Ara-C.

Assim como esses nucleosídeos, vários outros compostos das esponjas foram descritos por outros pesquisadores, tais como: alcalóides, terpenos, esteróides, peptídeos cíclicos, peróxidos, etc. Muito desta produção científica encontra-se no MarinLit (banco de dados neozelandês sobre literatura marinha da Universidade de Canterbury) que, até 2002, contabilizava mais de 15000 produtos marinhos descritos.

Abaixo apresentamos vários quadros (pág. 47-54) elaborados por Sipkema, com alguns produtos derivados de esponjas marinhas com propriedades antiinflamatórias, antitumorais, imunossupressoras, neurosupressoras, relaxantes musculares, antivirais, antimaláricas, entres outras (SIPKEMA et al., 2005):

Composto	Classe do composto	Espécie/Ordem	Modo de ação	Referência
Manoalide	Sesterterpenóide ciclohexano	<i>Luffariella variabilis</i> /Dictyoceratida	Inibidor de fosfolipase A <sub>2</sub>	BENNET et al., 1987
Ácido Dysidotrônico	Sesquiterpenóide drimano	<i>Dysidea sp.</i> / Dendroceratida	Inibidor de fosfolipase A <sub>2</sub>	GIANNINI et al., 2000
Ircinin-1 e -2	Sesterterpenóide acíclico	<i>Ircinia oros</i> / Dictyoceratida	Inibidor de fosfolipase A <sub>2</sub>	CIMINOE et al., 1972
Petrosaspongiolides M-R	Sesterterpenóide xeilantano	<i>Petrosaspongia nigra</i> / Dictyoceratida	Inibidor de fosfolipase A <sub>2</sub>	RANDAZZO et al., 1998a
Espongíginas A-D	Alcalóide piridinium	<i>Spongia sp.</i> / Dictyoceratida	Inibidor de fosfolipase A <sub>2</sub>	DE MARINO et al., 2000
Topsentina	Alcalóide Bis-indólico	<i>Topsentia genitrix</i> / Halichondrida	Inibidor de fosfolipase A <sub>2</sub>	JACOBS et al., 1994
Scalaradial	Sesterterpeno escalarano	<i>Cacospongia scalaris</i> / Dictyoceratida	Inibidor de fosfolipase A <sub>2</sub>	DE CARVALHO, JACOBS, 1991
Cacospongiolide B	Sesterterpeno lactona	<i>Fasciospongia cavernosa</i> / Dictyoceratida	Inibidor de fosfolipase A <sub>2</sub>	GARCIA PASTOR et al., 1999
Jaspaquinol	Benzenóide diterpeno	<i>Jaspis splendens</i> / Astrophorida	Inibidor de lipoxigenase	CARROLL et al., 2001
Ácido Subersico	Benzenóide diterpeno	<i>Suberea sp.</i> / Verongida	Inibidor de lipoxigenase	CARROLL et al., 2001

**QUADRO 2.** Produtos derivados de esponjas com propriedades antiinflamatórias.

Composto	Classe do composto	Espécie/Ordem	Modo de ação	Referência
BRS1	Lipídio poli-insaturado diamino- dihidroxi	Esponja calcárea	Inibidor da proteína quinase C	WILLIS, DE VRIES, 1997
Isoaaptamina	Alcalóide benzonaftiridina	<i>Aaptos aaptos</i> / Hadromerida	Inibidor da proteína quinase C	FEDOREEV et al., 1989

*Continua*

Continuação				
Debromohymenialdisine	Alcalóide pirrole-guanidina, derivado da prenilhidroquinona	<i>Hymeniacidonaldis/ Halichondrida Sarcotragus sp./ Dictyoceratida</i>	Inibidor da proteína quinase C	KITAGAWA et al., 1983
		<i>Sarcotragus sp./ Dictyoceratida</i>	Inibidor A1, 3-fucosiltransferase	WAKIMOTO et al., 1999
Adociasulfatos	Hidroquinonas triterpenóides	<i>Haliclona (aka Adocia) sp./ Haplosclerida</i>	Inibidores da proteína motora Quinesin	BLACKBURN et al., 1999
Discodermolida	Lactona tetraene linear	<i>Discodermia dissolute/ Lithistida</i>	Estabilização de microtúbulos	TER HAAR et al., 1996
Laulimalida	Lactona macrocíclica	<i>Cacospongia mycofljiensis/ Dictyoceratida</i>	Estabilização de microtúbulos	MOOBERRY et al., 1999
Pelorusideo A	Lactona macrocíclica	<i>Mycdle hentschett/ Poecilosclerida</i>	Estabilização de microtúbulos	HOOD et al., 2002
Hemiasterlin	Tripeptídeo incomum	<i>Auletta sp./ Halichondrida</i>	Estabilização de microtúbulos	ANDERSON et al., 1997
Dictiostatina	Lactona macrocíclica	<i>Corallistidae sp./ Lithistida</i>	Estabilização de microtúbulos	ISBRUCKER et al., 2003
Espongistatina 1	Bis(espiroacetal) macrolídeos	<i>Spongia sp./ Dictyoceratida</i>	Inibidor de polimerização de tubulina	BAI et al., 1993
Halicondrina B	Poliéter macrolídeo	e.g., <i>Halichondria okadai/ Halichondrida</i>	Inibidor de polimerização de tubulina	HIRATA, UEMURA, 1986; BAI et al., 1991
Arenastatina A	Lactano/ lactona macrocíclica	<i>Dysidea arenaria/ Dendroceratida</i>	Inibidor de polimerização de tubulina	KOISO et al., 1996
Latrunculina A	Tiazole macrolídeo	<i>Latrunculia magnified/ Poecilosclerida</i>	Despolimerização de actina	KASHMAN et al., 1980; COUE et al., 1987
Swinholide A	Lactona macrocíclica	<i>Theonella swinhoei/ Lithistida</i>	Despolimerização de actina	BUBB et al., 1995

Continua

Continuação				
Micalolídeo B	Oxazole macrolídeos	<i>Mycale</i> <i>sp./Poecilosclerida</i>	Despolimerização de actina	FUSETANI et al., 1989; SAITO et al., 1994
Jaspamide	Lactano/ lactona macrocíclica	<i>Hemiastrella minor/</i>		
Neofimmedina	Alcalóide piridoacridíneo	<i>Xestospongia cf</i> <i>carbonaria/</i> Haplosclerida	Inibidor de topoisomerase II	DE GUZMAN et al., 1999
Ácido helênico	Alquilfenol	<i>Plakinastrella sp./</i> Homosclerophorida	Inibidor de topoisomerase II	JUAGDAN et al., 1995
Naamina D	Alcalóide imidazólico	<i>Leucetta cf.</i> <i>chagosensis/</i> Calcinea	Inibidor de sintetase de óxido nítrico	DUNBAR et al., 2000
Agelasfina (KRN7000)	$\alpha$ -Galactosilcera- mida	<i>Agelas mauritanus/</i> Agelasida	Ativador de célula NKT	SHIMOSAKA, 2002
Agosterol A	Esterol	<i>Spongia</i> <i>sp./Dictyoceratida</i>	Resistência de drogas reversas de células dançantes	AOKI et al., 1998
Salicilihalameda A	Salicilato macrolídeo	<i>Haliclona</i> <i>sp./Haplosclerida</i>	Inibidor de v- ATPase	ERICKSON et al., 1997
Condropsina A e B	Macrolídeo lactano	<i>Chondropsis</i> <i>sp./Poecilosclerida</i>	Inibidor de v- ATPase	CANTRELL et al., 2000; BOWMAN et al., 2003
Esteróides 6- hidroximino-4-en-3- ona	Esteróide oximado	<i>Cinachyrella</i> <i>sp./Spirophorida</i>	Inibidor de aromatase	HOLLAND et al., 1992
Crambescidins 1-4	Derivado Pentacíclico de guanidina	<i>Crambe</i> <i>crambe/Poeciloscle-</i> <i>rida</i>	Bloqueador do canal Ca <sup>2+</sup>	JARES-ERIJMAN et al., 1991; BERLINCK et al., 1993
Haligramidas A e B	Peptídeo cíclico	<i>Haliclona</i> <i>nigra/Haplosclerida</i>	Desconhecido	RASHID et al., 2000
Discorhabdina D	Alcalóide fundido pirrolofenantroli- na	<i>Latrunculia</i> <i>brevis/Poeciloscleri-</i> <i>da; Prianos</i> <i>sp./Haplosclerida</i>	Desconhecido	PERRY et al., 1988

Continua

Continuação				
Calistatina A	Poliquetídeo	<i>Callyspongia truncata</i> /Haplosclerida	Desconhecido	Kobayashi et al., 1997
Tedanólídeo	Lactona macrocíclica	<i>Tedania ignis</i> /Poecilosclerida	Desconhecido	Schmitz et al., 1984
Glaciasterol A e B	9, 11-Secosterol	<i>Aplysilla glacialis</i> /Dendroceratida	Desconhecido	Pika et al., 1992
Axinellins A e B	Peptídeo cíclico	<i>Axinella carter</i> /Halichondrida	Desconhecido	Randazzo et al., 1998b
Incrustasterol A e B	Esterol	<i>Dysidea incrustans</i> /Dendroceratida	Desconhecido	Casapullo et al., 1995

**QUADRO 3.** Produtos derivados de esponjas marinhas com propriedades antitumorais.

Composto	Classe do composto	Espécie/Ordem	Modo de ação	Referência
Simplexídeos	Glicolípídeo	<i>Plakortis simplex</i> /Homosclerophorida	Inibidor de proliferação da célula T	COSTANTINO et al., 1999
Esteróides polioxigenados	Esterol	<i>Dysidea sp.</i> /Dendroceratida	Inibidor de IL-8	LEONE et al., 2000
Contignasterol	Esterol oxigenado	<i>Petrosia contignata</i> /Haplosclerida	Inibidor de liberação de histamina	TAKEI et al., 1994; BRAMLEY et al., 1995
Xestobergsterol A e B	Esterol pentacíclico	<i>Xestospongia berquistia</i> /Haplosclerida	Inibidor de liberação de histamina	SHOJI et al., 1992
Taurodispaçamida A	Alcalóide pirroleimidazólico	<i>Agelas oroides</i> /Agelasida	Inibidor de IL-2	FATTORUSSO, TAGLIALATELA-SCAFATI, 2000
Pateamina A	Tiazole macrolídeo	<i>Mycale sp.</i> /Poecilosclerida	Inibidor de IL-2	NORTHCOTE et al., 1991

**QUADRO 4.** Produtos imunossupressores derivados de esponjas marinhas.

Composto	Classe do composto	Espécie/Ordem	Modo de ação	Referência
Cicloteonamida A	Pentapeptídeo cíclico	<i>Theonella sp./</i> Lithistida	Inibidor da protease de serina	MARYANOFF et al., 1993
Erilosídeo F	Dissacarídeo penasterol	<i>Eryltus formosus/</i> Astrophorida	Antagonista do receptor de trombina	STEAD et al., 2000
Haliclorina	Aza-poliquetídeo cíclico	<i>Halichondria okadai/</i> Halichondrida	Inibidor de VCAM-1	ARIMOTO et al., 1998

**QUADRO 5.** Alguns produtos derivados de esponjas marinhas que afetam doenças relacionadas ao sangue.

Composto	Classe do composto	Espécie/Ordem	Modo de ação	Referência
Ácido calispongínico	Poliacetileno	<i>Callyspongia</i> <i>truncata/</i> Haplosclerida	Inibidor de $\alpha$ -glucosidase	NAKAO et al., 2002
Dysiherbaine	Aminoácido incomum	<i>Dysidea herbacea/</i> Dendroceratida	Antagonista de receptor glutamato	SAKAI et al., 1997
Keramadina	Alcalóide pirrol- guanidina	<i>Agelas sp. /</i> Agelasida	Antagonista de receptor serotonérgico	NAKAMURA et al., 1984
1-Metil-isoguanosina	Nucleosídeo análogo	<i>Tedania digitata /</i> Poecilosclerida	Desconhecido (relaxante muscular, antialérgico)	QUINN et al., 1980
Xestospongina C	Bis-oxaquinolizidina macrocíclica	<i>Xestospongia sp./</i> Haplosclerida	Inibidor de IP3	DE SMET et al., 1999
Oquinonelina B	Furano- sesterterpenóide	<i>Spongionella sp./</i> Dendroceratida	Desconhecido (relaxante muscular)	KATO et al., 1986
Bromotopsentina	Alcalóide bis-indole	<i>Spongosorites sp./</i> Halichondrida	Antagonista de receptor $\alpha$ 1-Adrenérgico	PHIFE et al., 1996

Continua

Continuação				
Penaresidina A	Alcalóide azetidina	<i>Penares sp./</i> Astrophorida	Inibidor de ATPase actomiosina	KOBAYASHI et al., 1991
S1319	Derivado de benzotiazol	<i>Dysidea sp./</i> Dendroceratida	Desconhecido (antiasmático, Relaxamento uterino)	SUZUKI et al., 1999

**QUADRO 6.** Neurosupressores e relaxantes musculares derivados de esponjas marinhas.

Composto	Classe do composto	Espécie/Ordem	Atividade	Referência
Dragmacidina F	Alcalóide indólico	<i>Halicortex sp./?</i>	Antiviral	CUTIGNANO et al., 2000
Papuamidas C e D	Peptídeo cíclico	<i>Theonella mirabilis,</i> <i>T. swinhoei/Lithistida</i>	Antiviral (HIV-1)	FORD et al., 1999
Mololipídeos	Lipídeo tiramínico	Verongida	Antiviral (HIV-1)	ROSS et al., 2000
Haplosamatos A e B	Esteróide sulfatado	<i>Xestospongia sp./</i> Haplosclerida	Antiviral (inibidor de integrase HIV-1)	QURESHI, FAULKNER, 1999
Hamigeran B	Macrolídeos Fenólicos	<i>Hamigera</i> <i>tarangaensis/</i> Poecilosclerida	Antiviral (herpes e polio)	WELLINGTON et al., 2000
Weinbersterol A e B	Esteróide sulfatado	<i>Petrosia weinbergi/</i> Haplosclerida	Antiviral (leucemia felina, gripe do rato, halo do rato)	SUN et al., 1991
Variolina B	Alcalóide piridopirrolpirimidina	<i>Kirkpatrickia</i> <i>varialosa/</i> Poecilosclerida	Antiviral	PERRY et al., 1994
Avarol	Hidroquinona, sesquiterpenóide	<i>Dysidea avara/</i> Dendroceratida	Inibidor tRNA glutamina supressora UAG	MULLER et al., 1987, MULLER et al., 1991

Continua

<i>Continuação</i>				
2-5A	2', 5'	Várias esponjas	Mediador de interferon	KELVE et al., 2003
	oligonucleotídeos associados			
Henoxazole A	Bisoxazole	<i>Polyfibrospongia sp./</i> Dictyoceratida	Antiviral	ICHIBA et al., 1991

**QUADRO 7.** Produtos antivirais derivados de esponjas marinhas.

Composto	Classe do composto	Espécie/Ordem	Referência
Axisonitrila-3	Isocianídeo sesquiterpenóide	<i>Acanthella klethra/</i> Halichondrida	ANGERHOFER et al., 1992
Manzamina A	Alcalóide manzamina, Isocianatos diterpenos, isotiocianatos e isonitrilas, endoperóxidos norditerpenóides e norsesiterpenóides	Ex.: <i>Haliclona sp./</i> Haplosclerida <i>Cymbastela hooperi/</i> Halichondrida <i>Diacarnus levii/</i> Poecilosclerida	ANG et al., 2001 KONIG et al., 1996 D'AMBROSIO et al., 1998
Kalihinol A	Diterpenóide kalienano contendo isonitrilas	<i>Acanthella sp./</i> Halichondrida	MIYAOKA et al., 1998

**QUADRO 8.** Produtos antimaláricos derivados de esponjas marinhas.

Composto	Classe do composto	Espécie/Ordem	Atividade	Referência
Discoderminas B, C e D	Peptídeo cíclico	<i>Discodermia</i> <i>kiiensis/</i> Lithistida	Antibacteriana	MATSUNAGA et al., 1985
Sulfatos topsentiasteróides A-E	Esterol sulfatado	<i>Topsentia sp./</i> Halichondrida	Antibacteriana/ antifúngica (D e E)	FUSETANI et al., 1994
Arenosclerinas A, B e C	Alcalóide alquilpiperidina	<i>Arenosclera</i> <i>brasiliensis/</i> Haplosclerida	Antibacteriana	TORRES et al., 2002
Axinelaminas B-D	alcalóide imidazólico	<i>Axinella sp./</i> Halichondrida	Antibacteriana	URBAN et al., 1999

*Continua*

Continuação				
Acantosterol I e J	Esterol sulfatado	<i>Acanthodendrilla</i> <i>sp./</i> Dendroceratida	Antifúngica	TSUKAMOTO et al., 1998
Oceanapisídeo	Glicosídeo bis-amino-hidroxi-lipídio	<i>Oceanapia</i> <i>phillipensis/</i> Haplosclerida	Antifúngica	NICOLAS et al., 1999
Espongistatina	Lactona macrolídeo poliéter	<i>Hyrtios erecta/</i> Dictyoceratida	Antifúngica	PETTIT et al., 1998
Leucascandrolídeo A	Macrolídeo poliéter contendo oxazole	<i>Leucascandra</i> <i>caveolata/</i> Calcarea	Antifúngica	D_AMBROSIO et al., 1996

**QUADRO 9.** Produtos antimicrobianos e antifúngicos derivados de esponjas marinhas.

Composto	Classe do composto	Espécie/Ordem	Referência
Kalihineno X	Isocianoterpenóide	<i>Acanthella cavernosa/</i> Halichondrida	OKINO et al., 1995
Kalihipirano B	Isocianoterpenóide	<i>Acanthella cavernosa/</i> Halichondrida	OKINO et al., 1996
10 $\beta$ -Formarnidokalihinol	Isocianoterpenóide	<i>Acanthella cavernosa/</i> Halichondrida	HIROTA et al., 1996
Pseudoceratidina 2	Derivado de espermidina contendo dibromopirrole	<i>Pseudoceratina</i> <i>purpurea/</i> Verongida	TSUKAMOTO et al., 1996b
Ceratinamida A e B	Derivado de bromotirosina	<i>Pseudoceratina</i> <i>purpurea/</i> Verongida	TSUKAMOTO et al., 1996a
ceramida C22	Ceramida	<i>Haliclona koremella/</i> Haplosclerida	HATTORI et al., 1998
Formosida	Glicosídeo estriterpeno, Diperóxido esterol	<i>Erylus formosus/</i> Astrophorida <i>Lendenfeldia</i> <i>chondrodes /</i> Dictyoceratida	KUBANEK et al., 2002 SERA et al., 1999
Axinissimidas	Sesquiterpenos diclorídeos carbonamidas	<i>Axinyssa</i> <i>sp./</i> Halichondrida	HIROTA et al., 1998

**QUADRO 10.** Produtos antiincrustantes derivados de esponjas marinhas.

### 3.5.1. Atividade Antimicrobiana

Bactérias e outros microorganismos são encontrados em todo ambiente marinho. Eles são taxonomicamente diversos, biologicamente ativos e colonizam todos os habitats marinhos, dos mais profundos oceanos aos mais rasos estuários, bem como os recifes de corais. Organismos bentônicos marinhos, como as esponjas e os corais, são frequentemente colonizados por bactérias. É fato conhecido que as esponjas abrigam uma diversidade de microorganismos. Em alguns casos, mais de 50 % do peso da esponja foi atribuído às bactérias simbióticas. Algumas dessas bactérias podem ser patogênicas para esponjas e corais, causando necrose de tecidos em esponjas e várias doenças em corais. Por outro lado, elas podem servir como simbioses benéficas ou associados benignos (KELMAN, 2004).

Assim, as esponjas e corais precisam ter a habilidade de regular as bactérias que encontram, de resistir a colonizações microbianas e à invasão de potenciais patógenos para prevenir possíveis efeitos nocivos. Um método eficaz de combater ataques microbianos é por defesas químicas. Devido à riqueza química única das esponjas e suas potenciais atividades farmacológicas, elas têm sido muito exploradas na tentativa de se obter novas substâncias antibióticas ou antimicrobianas (KELMAN, 2004).

Atividades antimicrobianas vêm sendo extensivamente relatadas para diversos grupos de organismos marinhos, dentre os quais esponjas, briozoários, ascídias e corais (KELMAN, 2004). McClintock e Gauthier (1992) observaram que a atividade antimicrobiana das esponjas tem sido bastante examinada quanto à latitude. Por volta de 1970 acreditava-se que a atividade antimicrobiana era significativamente maior em espécies de regiões tropicais. Bergquist e Bedford (1978) contradisseram essa opinião quando mostraram uma percentagem maior dessa atividade em esponjas temperadas da Nova Zelândia. A partir de então, diversos grupos de pesquisa reportaram atividades antimicrobianas de extratos de esponjas marinhas em diferentes regiões geográficas.

Alguns dos vários antibióticos isolados foram: a plakortina, da esponja caribenha *Plakortis halichondrioides* (HIGGS e FAULKNER, 1978), a psammaplina A, da esponja *Psammaplysilla sp.* e a manoalide, da *Luffariella variabilis*. Estes e outros antibióticos isolados das esponjas marinhas foram testados com patógenos humanos ou bactérias marinhas sem relevância ecológica aparente com elas, assim como, com bactérias retiradas do meio natural da esponja alvo do estudo (KELMAN, 2004).

Como já citado, as espécies do gênero *Aplysina* produzem substâncias com diferentes propriedades bioativas. A *Aplysina fistularis*, além de possuir propriedades antipredatórias e antiincrustantes, possui também propriedades antimicrobianas, o que a torna potencialmente promissora para o desenvolvimento de novas substâncias (BETANCOURT-LOZANO et al., 1998).

Quando se considera o surgimento da resistência dos microorganismos contra os antibióticos, um dos principais problemas para a saúde humana e para o ambiente, faz-se necessário buscar novas alternativas de fármacos que possam ser utilizados no tratamento dessas infecções ou adaptar as drogas já existentes para que elas voltem a ter ação (ALMEIDA, 2007). Nesse contexto, numerosas pesquisas sobre a atividade antimicrobiana de organismos marinhos, especificamente as esponjas marinhas, contra bactérias, fungos e protozoários têm sido realizadas, e as esponjas marinhas podem ser empregadas como fonte de novos agentes antimicrobianos.

An underwater photograph showing several large, yellow, porous sponges on a seabed. The water is clear and blue, and the lighting is bright, highlighting the texture of the sponges.

## **4. PARTE EXPERIMENTAL**

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1. Coleta do Material Marinho

A esponja *Aplysina fistularis* foi coletada nos Canyons no município de João Pessoa, Estado da Paraíba, em dezembro de 2005 e dezembro de 2006. Possuindo as seguintes referências geográficas medidas por GPS (Sistema de Posicionamento Global) do local exato da coleta: Canyons 07°02'S 34° 34'W com profundidade de 40 metros no Litoral de João Pessoa com temperatura da água em torno de 27 °C. O material marinho, cerca de 17 kg, foi identificado pelo zoólogo e Pesquisador Dr. Ulisses Pinheiro, no Laboratório de Invertebrados Marinhos, Departamento de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESBA. As espécies das esponjas marinhas foram tombadas na Coleção de Invertebrados Marinhos “Paulo Yang”, Departamento de Sistemática e Ecologia – UFPB sob os códigos Tombo 63 e Tombo 65, que tem como curadora a Prof<sup>a</sup>. Carmem San Miguel Alonso da UFPB.

As esponjas apresentaram mudança de coloração de amarelo para marrom escuro e liberação de pigmento azulado (ver figuras 14, 15 e 16, págs. 58 e 59).



**FIGURA 14.** *Aplysina fistularis* após a coleta, mostrando seu comprimento (João Guilherme Barreto de Marchi, 2006).



**FIGURA 15.** Base da esponja *A. fistularis* (João Guilherme Barreto de Marchi, 2006).



**FIGURA 16.** Ápice da esponja *A. fistularis* (João Guilherme Barreto de Marchi, 2006).

#### 4.2. Processamento da Esponja *Aplysina fistularis*

As esponjas foram dessecadas em estufa com ar circulante à temperatura média de 40 °C durante 3 a 4 dias. Após secagem, o material marinho foi submetido a um processo de pulverização em moinho mecânico, obtendo-se 1700 g de pó seco, o que correspondeu a 10 % do material coletado.

#### 4.3. Métodos Cromatográficos Utilizados no Estudo Químico

- Na cromatografia de adsorção em coluna (CC) foi utilizado Sephadex LH-20, da Biofarmacia, de partículas com dimensões entre 0,063 – 0,200 mm; também óxido de alumínio 90 da MERCK. O comprimento e o diâmetro das colunas variaram de acordo com as quantidades das amostras e as quantidades de Sephadex e óxido de alumínio a serem utilizados.
- Nas análises através de Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA), e Preparativa (CCDP) foi usada sílica gel PF<sub>254</sub>, ART 7749 da MERCK, e placas de vidro (20x20 e 10x10). Estas foram preparadas com uma suspensão de sílica, obtida com água destilada e em seguida distribuída sobre a placa de vidro através de um espalhador mecânico (do tipo “quick fit”).

- As revelações das substâncias nas CCD analíticas foram executadas por exposição das placas à lâmpada de irradiação ultravioleta em aparelho Mineralight, modelo UVGL-58, com dois comprimentos de onda (254 e 366 nm) e/ou pela pulverização com o reagente anisaldeído sulfúrico ou Dragendorff (tetraiodobismutato de potássio). Também foi utilizado como revelador, câmara saturada com vapores de iodo. O grau de pureza das substâncias foi evidenciado por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), determinando-se a pureza quando observada uma única mancha após revelação, em pelo menos três tipos de sistemas de eluição diferentes; como também pela variação do ponto de fusão das substâncias (o critério de pureza adotado é que a diferença entre o ponto de fusão final e o ponto de fusão inicial não seja maior que 3 °C).
- Como fase móvel foram usados os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, isoladamente ou em misturas binárias em gradientes de concentração.

#### 4.4. Métodos Espectrométricos Utilizados para Análise dos Constituintes Químicos

- Os espectros na região do Infravermelho (IV) foram registrados em pastilha de KBr, em espectrofotômetro marca BOMEM, modelo MB 100.
- Os espectros de Massas foram realizados num espectrômetro de massas Q-TOF (Micromass, Manchester, UK) com análise por ESI-MS. As condições gerais foram: temperatura da fonte 100 °C, voltagem do capilar 3.0 KV e voltagem do cone 35 V. A inserção da amostra foi realizada com uma bomba seringa com fluxo de 10uL/min.
- Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  (RMN de  $^1\text{H}$ ) e Ressonância Magnética Nuclear de  $^{13}\text{C}$  (RMN de  $^{13}\text{C}$ ) uni e bidimensionais foram obtidos em espectrômetro Bruker NMR (DRX 500), operando na frequência do hidrogênio a 500 MHz e na do carbono-13 a 125 MHz. Também foram obtidos espectros em espectrômetro VARIAN MERCURY 200 MHz operando na frequência do hidrogênio a 200 MHz e do carbono-13 a 50 MHz e VARIAN MERCURY 500 MHz, operando na frequência do hidrogênio a 500 MHz e do carbono-13 a 125 MHz. As amostras para análise foram preparadas dissolvendo-se pequena quantidade das mesmas em solventes deuterados da

Cambridge Isotope Laboratories (CIL) ( $\text{CDCl}_3$ , MeOD). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram referenciados para RMN de  $^1\text{H}$  pelos picos característicos dos hidrogênios pertencentes às frações não deuteradas destes solventes em relação ao TMS: clorofórmio ( $\delta_{\text{H}} = 7,24$ ) e MeOD ( $\delta_{\text{H}} = 3,00$ ). Para os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , em relação ao TMS foram utilizados: clorofórmio ( $\delta_{\text{C}} = 77,0$ ) e MeOD ( $\delta_{\text{C}} = 49,0$ ).

- As multiplicidades das bandas de RMN de  $^1\text{H}$  foram indicadas segundo as convenções: *s* (simpleto), *d* (duplete), *dd* (duplo duplete), *t* (triplete), *q* (quarteto) e *m* (multiplete).

#### 4.5. Determinação do Ponto de Fusão

- O ponto de fusão das amostras foi determinado em aparelho digital de ponto de fusão, marca Microquímica, modelo MQAPF-302, com temperatura que varia de 0-350°C. O valor obtido não foi corrigido.

#### 4.6. Obtenção do Extrato Etanólico Bruto (EEB) das Esponjas *Aplysina fistularis*

O material marinho seco e pulverizado (17 kg) foi submetido à maceração exaustiva com etanol (EtOH) a 95 %, em um recipiente de aço inoxidável. Foram feitas três extrações num intervalo de 72 horas entre elas. A solução etanólica obtida foi filtrada, fazendo-se em seguida a evaporação do solvente com o auxílio de um rotavapor a uma temperatura média de 50 °C. Após esse processo de evaporação do solvente, obteve-se o extrato etanólico bruto (EEB), que pesou 283 g (16,65 % em relação ao peso seco da esponja). Separou-se uma parte desse extrato (30 g) para testes farmacológicos e outra parte (3,0 g) para screening químico.

#### 4.7. Avaliação Química Preliminar dos Constituintes Químicos Encontrados no EEB da Esponja Marinha *Aplysina fistularis* (Screening Químico)

Esta triagem procura sistematizar, ou rastrear os principais grupos de constituintes químicos que compõem um extrato. É uma análise rápida através de reagentes de coloração ou precipitação que revelam a presença ou ausência de metabólitos secundários presentes no extrato. A triagem química preliminar foi realizada com o extrato etanólico bruto, e os

resultados encontram-se sumarizados na Tabela 1. Após análise realizou-se uma marcha para alcalóides.

**Tabela 1.** Dados referentes à triagem química realizada com o extrato etanólico bruto das esponjas marinhas *Aplysina fistularis*.

Grupos Químicos	Testes Aplicados	Resultados
Alcalóides	Bouchardat	++
	Mayer	+
	Dragendorff	++
	Ácido sílico-tungstico	++
Esteróides	0,12	++ +
	0,25	+++
	0,50	+++
Taninos	Gelatina 0,5%	
	0,5	-
	1,0	-
	2,0	-
	Cloreto férrico 2%	
	0,5	-
	1,0	-
2,0	-	
Flavonóides	Fita de Magnésio	-
	Fluorescência	+++
Saponinas	Hemolítico	Não realizado
	Teste de Espuma	+

Nos resultados dos testes foram utilizadas as seguintes convenções:

- (-) Reação negativa
- (+) Reação fracamente positiva
- (++) Reação positiva
- (+++) Reação fortemente positiva

## **4.8. Marcha Sistemática para Extração de Alcalóides da Esponja *Aplysina fistularis***

### **4.8.1. Marcha sistemática para extração dos Alcalóides Terciários Totais (FATT)**

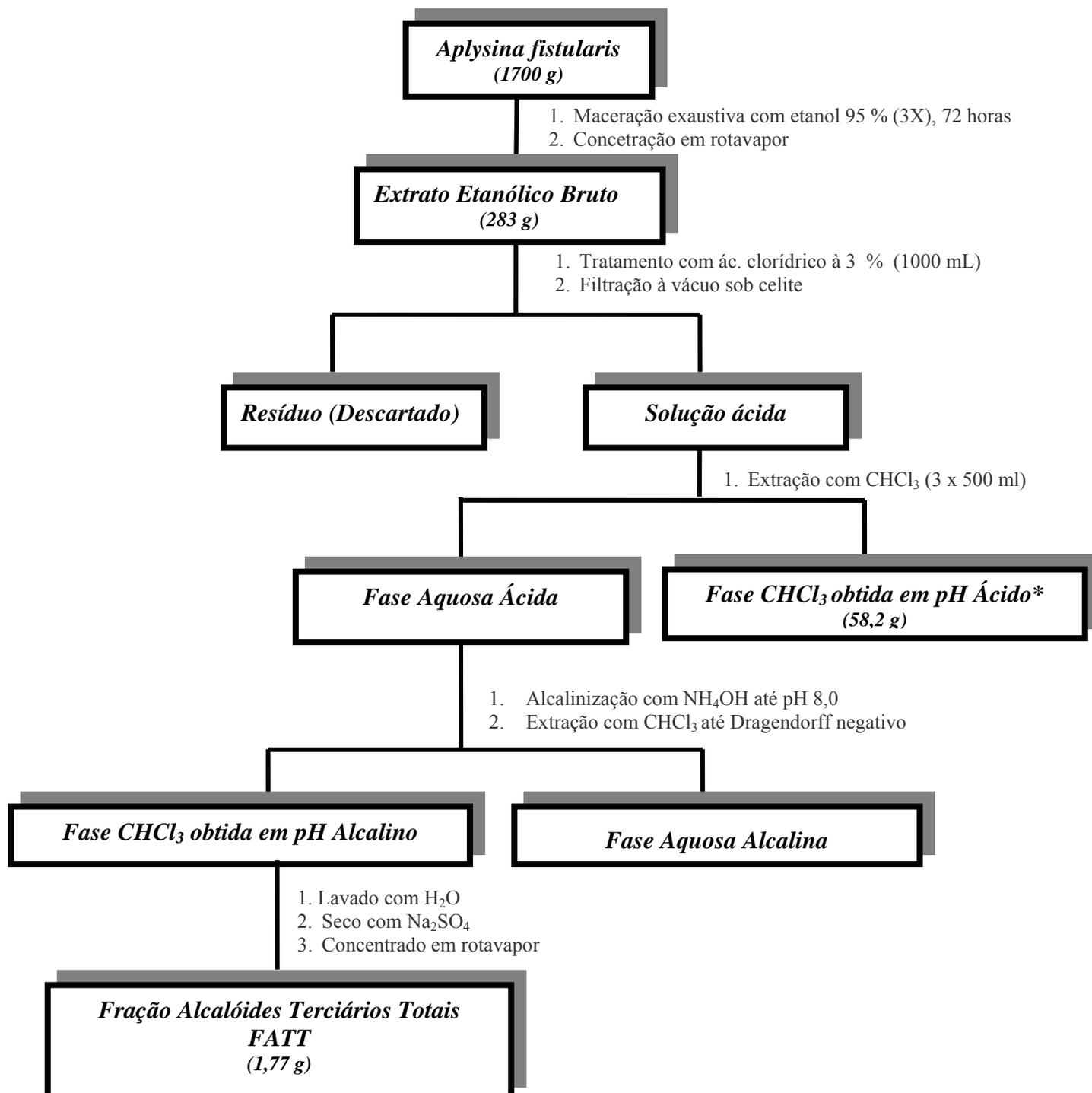
O EEB foi acidificado com uma solução de ácido clorídrico 3 % (1000 mL) sob agitação mecânica durante 60 minutos, a frio e, em seguida, foi filtrado sobre celite a vácuo, fornecendo um resíduo e uma solução ácida. Durante o processo de filtração da solução ácida observou-se dificuldade na sua filtração. Esta solução ácida foi submetida a tratamento com clorofórmio (3 x 500 mL) em ampola de separação. A fase clorofórmica obtida em pH ácido foi lavada com água e seca com sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), em seguida, foi filtrada, e o solvente evaporado em rotavapor, resultando na fase  $\text{CHCl}_3$  ácida (58,2 g), que foi reservada para estudos posteriores. A fase aquosa ácida foi basificada a frio com hidróxido de amônio até pH 8 e em seguida, foi submetida à extração em ampola de separação com clorofórmio até mostrar reação negativa com o reagente de Dragendorff. Posteriormente, foi lavada com água e seca com sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtrada, e o solvente evaporado em rotavapor a 50 °C. Após esse procedimento, obteve-se a fração de alcalóides terciários totais (FATT), que pesou 1,77 g. A marcha para a extração de alcalóides terciários está sumarizada no Fluxograma 1 (pág. 64).

### **4.8.2. Marcha sistemática para extração dos Alcalóides Quaternários Totais (FAQT)**

A fase aquosa básica foi tratada depois de ter sido detectado a presença de alcalóides com reação positiva para alcalóides com o reagente de Dragendorff e Mayer. A fase aquosa foi reacidificada com ácido clorídrico até pH 3 e tratada com uma solução de ácido pícrico a 1 % (1 g para uma solução de 100 mL) por 24 horas, formando um precipitado. Após a filtração, o precipitado foi redissolvido em metanol (500 mL), tratado com carvão ativado (aproximadamente 2 g) e filtrado sob celite, sendo o volume deste filtrado reduzido em rotavapor a 50 % do seu volume total e, em seguida, foi deixado em repouso por 24 horas no congelador formando um precipitado que foi, então, solubilizado em metanol e tratado com resina de troca iônica de cloro [Amberlite IRA 400 (Cl<sup>-</sup>)] por 24 horas. A solução obtida foi filtrada e concentrada em rotavapor, fornecendo um resíduo, que correspondeu à fração dos alcalóides quaternários totais (FAQT), pesando 0,276 g. A marcha para extração de alcalóides

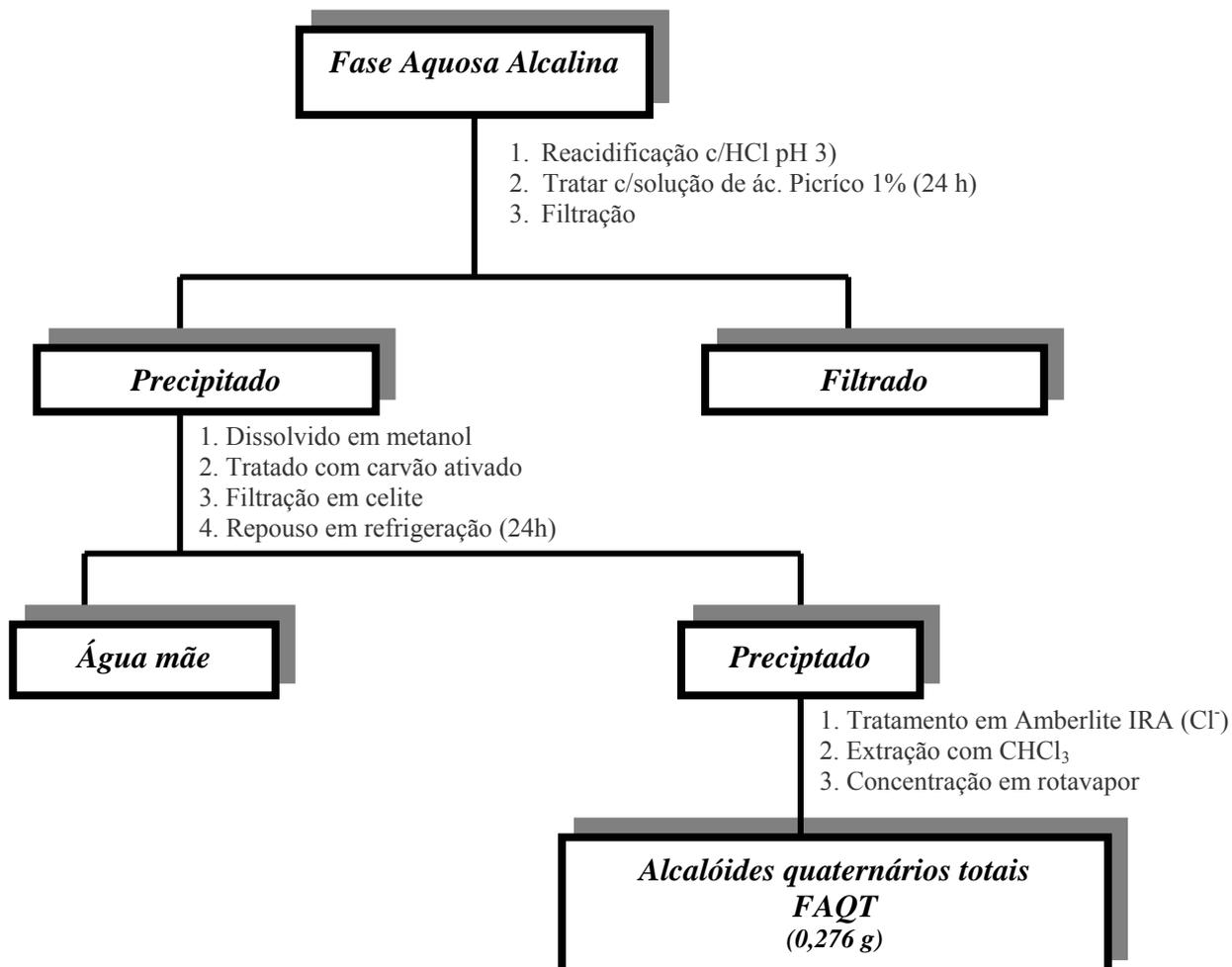
quaternários está sumarizada no Fluxograma 2 (pág.65).

**Fluxograma 1.** Marcha sistemática clássica para extração de alcalóides terciários da esponja *Aplysina fistularis*.



\* Reservada para estudos posteriores

**Fluxograma 2.** Marcha sistemática clássica para extração de alcalóides quaternários das esponjas *Aplysina fistularis*.



#### 4.9. Fracionamento Cromatográfico

##### 4.9.1. Fracionamento Cromatográfico da Fração de Alcalóides Quaternários Totais (FAQT) da Espécie *Aplysina fistularis*

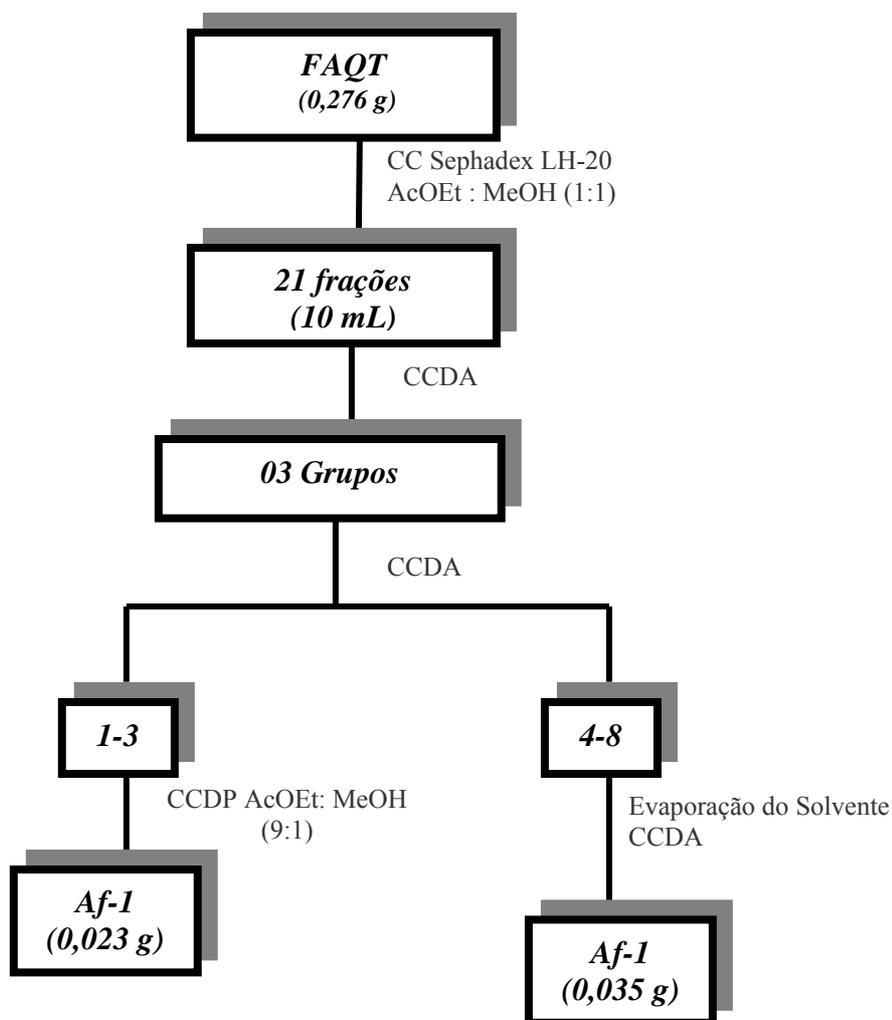
A FAQT (0,276 g) foi submetida à cromatografia em coluna (CC) em Sephadex LH-20 e como solvente, foi utilizada a mistura binária de acetato de etila e metanol, na proporção de 1:1. Foram coletadas 21 frações de 10 mL cada.

As frações foram monitoradas através de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) utilizando diversos sistemas de solventes e reunidas de acordo com seus  $R_{fs}$ , após

visualização em luz ultravioleta e borrifadas posteriormente com reagente de Dragendorff. Essas frações foram reunidas, em 3 grupos: 1-3, 4-8, 9-21.

A fração 1-3 foi purificada através de cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) usando-se como eluente a mistura binária acetato de etila e metanol, na proporção 9:1, e forneceu um composto codificado como **Af-1**. A fração 4-8, após evaporação do solvente, forneceu um composto que foi codificado como **Af-2**. Após análise em CCDA e obtenção dos dados espectrais, o composto **Af-2** tratava-se do mesmo composto **Af-1**. O esquema geral para o isolamento dessa substância é mostrado no Fluxograma 3, abaixo.

**Fluxograma 3.** Esquema geral para o isolamento e purificação dos constituintes químicos da fração de alcalóides quaternários totais das esponjas *Aplysina fistularis*.



#### 4.9.2. Fracionamento Cromatográfico da Fração de Alcalóides Terciários Totais (FATT) da Espécie *Aplysina fistularis*

A FATT (1,77 g) foi submetida à cromatografia em coluna (CC) usando-se óxido de alumínio neutro como fase estacionária e como eluentes, os solventes hexano individualmente ou em misturas binárias com clorofórmio, clorofórmio individualmente ou em misturas binárias com metanol, em gradiente crescente de polaridade. Foram coletadas 165 frações de 100 mL cada, e os resultados obtidos após fracionamento, são fornecidos no Tabela 2, abaixo:

**Tabela 2.** Dados do fracionamento cromatográfico da fração de alcalóides terciários totais da esponja *Aplysina fistularis*

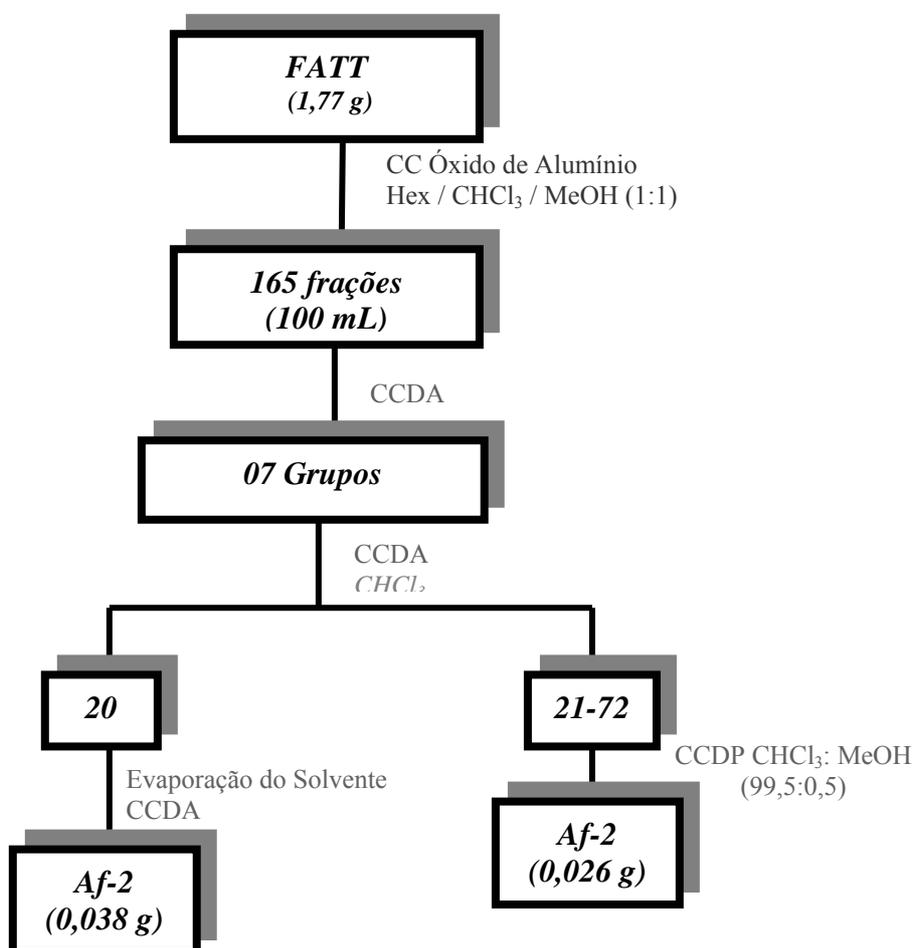
Frações	Solventes
1-6	Hexano (100)
7-14	Hex : CHCl <sub>3</sub> (80 : 20)
15-30	Hex : CHCl <sub>3</sub> (50 : 50)
31-43	Hex : CHCl <sub>3</sub> (25 : 75)
44-68	CHCl <sub>3</sub> (100)
69-77	CHCl <sub>3</sub> : MeOH (99,5 : 0,5)
78-87	CHCl <sub>3</sub> : MeOH (99 : 1)
88-116	CHCl <sub>3</sub> : MeOH (97 : 3)
117-135	CHCl <sub>3</sub> : MeOH (95 : 5)
136-140	CHCl <sub>3</sub> : MeOH (90 : 10)
141-151	CHCl <sub>3</sub> : MeOH (80 : 20)
152-165	CHCl <sub>3</sub> : MeOH (70 : 30)

As 165 frações foram monitoradas através de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) em diversos sistemas de solventes e reunidas de acordo com os seus R<sub>f</sub>s, após visualização na luz ultravioleta, em 7 grupos como mostrado a seguir:

1-14	15-19	20	21-72
73-100	101-141	142-165	

Estas frações reunidas foram monitoradas através de CCDA e reveladas com Iodo. A fração 21-72 foi purificada através de cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) usando-se como eluente a mistura binária clorofórmio e metanol, na proporção 99,5 : 0,5, e forneceu um composto codificado como **Af-2**. A fração 20, após evaporação do solvente, forneceu um composto que foi codificado como **Af-3**. Após análise em CCDA e obtenção dos dados espectrais, o composto **Af-3** tratava-se do mesmo composto **Af-2**. O esquema geral para o isolamento dessas substâncias é mostrado no fluxograma 4, abaixo.

**Fluxograma 4.** Esquema geral para o isolamento e purificação dos constituintes químicos encontrados na fração de alcalóides terciários totais das esponjas *Aplysina fistularis*.



## 4.10. Teste de Atividade Biológica

### 4.10.1. Avaliação da atividade antimicrobiana do EEB da espécie *Aplysina fistularis*

#### *Local de Trabalho*

Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba – UFPB, no período de 5 a 19 de novembro de 2007.

#### *Microorganismos*

Para os ensaios microbiológicos, foram selecionadas quatro cepas de bactérias: *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923), *S. aureus* (ATCC-13150), *S. epidermidis* (ATCC-12228), bactérias Gram-positivas e *Escherichia coli* (ATCC-11105), bactéria Gram-negativa; e quatro cepas fúngicas: *Candida albicans* (ATCC-13803), *C. albicans* (ATCC-76615), fungos leveduriformes, *Trichophyton rubrum* (ATCC-1683) e *Aspergillus flavus* (LM-247), fungos filamentosos. As cepas de bactérias e de fungos foram adquiridos no Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo-SP, da Universidade Federal da Paraíba-PB e do Instituto Aldolfo Lutz de São Paulo. As cepas foram mantidas em ágar Muller-Hinton (bactérias) e ágar Sabourand dextrose (fungos) a 35-37 °C e à temperatura ambiente (28-30 °C), e a 4 °C (em geladeira).

#### *Meios de cultura*

Os meios de cultura utilizados nos ensaios microbiológicos foram agar Müller-Hinton (Merck) para bactérias e agar Sabouraud dextrose-ASD (Difco) para fungos. Os mesmos foram preparados e usados conforme as instruções dos fabricantes.

### ***Ensaio de atividade antimicrobiana***

O extrato etanólico bruto (EEB) foi testado na concentração de 10 mg/mL (10.000 µg/mL) e solubilizado em dimetilsulfóxido (Merck), numa concentração de 4 % para não interferir na biologia dos microrganismos.

O ensaio de atividade antimicrobiana do extrato de *Aplysina fistularis* foi realizado através da técnica de difusão meio em sólido (CLEELAND; SQUIRES, 1991; BAWER et al, 1966), utilizando-se discos de papel de filtro Blank (CECON/SP). Em placas de Petri (90 x 15mm/ Cralisp), descartáveis e estéreis, foi colocado 1mL da suspensão de cada microrganismo teste. As suspensões foram preparadas em solução fisiológica (0,9 %) estéril, conforme o tubo 0,5 da Escala Mc Farland, para conter, aproximadamente,  $10^6$  UFC/mL.

Os ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana foram realizados conforme os protocolos de BAWER e colaboradores, 1966; CLEELAND, SQUIRES, 1991 e HADACECK, GREEGER, 2000.

Em seguida, foi adicionado, respectivamente, 21 mL de agar Müller-Hinton e agar Sabouraud fundido a 45-50 °C e homogeneizado lentamente, para os ensaios com bactérias e fungos leveduriformes e filamentosos. Após solidificação do meio de cultura, discos de papel de filtro (CECON/SP) foram embebidos com 20 µL do extrato etanólico bruto solubilizado. Os mesmos foram colocados sobre os meios de cultura contidos nas placas de Petri adicionados da suspensão de cada microrganismo.

Foram feitos controles para cada microrganismo com antimicrobiano padrão cloranfenicol a 30 µg/mL (bactérias) e cetoconazol a 50 µg/mL (fungos). Todo o sistema de ensaio foi incubado à 35-37 °C por 24-48 horas para bactérias e leveduras e à temperatura ambiente (28-30 °C) por 7-14 dias para os fungos filamentosos. Os resultados são considerados positivos quando o produto testado produzir inibição sobre o crescimento microbiano formando halo de inibição igual ou superior a 10 mm de diâmetro, (WONG-LEUNG, 1988).

An underwater photograph of a coral reef. The scene is dominated by several large, yellow, porous sponges of various shapes and sizes. The water is clear and blue, with some other coral and smaller sponges visible in the background. The lighting is bright, suggesting a shallow depth.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Determinação Estrutural de Af-1

O composto codificado como Af-1 foi obtido na forma de um sólido amorfo, amarelo, não sendo possível determinar o ponto de fusão.

O espectro de absorção na região do infravermelho (Fig. 20, pág 78) revelou: presença de bandas de absorção em 3003, 2976, 2938, 2862, 2816  $\text{cm}^{-1}$ , associadas à deformação axial C-H saturado; uma banda em 2335  $\text{cm}^{-1}$ , associada à deformação axial de NC-H de amina quaternária, bandas na região de 1300-1100  $\text{cm}^{-1}$  indicativas da presença de fenóis ou éteres aromáticos; uma banda intensa em 1259  $\text{cm}^{-1}$  indicativa da presença de éteres arílicos; bandas de absorção na região de 1591-1412  $\text{cm}^{-1}$  indicativas da presença de deformação axial C=C de anel aromático, bem como uma banda em 3426  $\text{cm}^{-1}$ , sugerindo a presença de grupamento OH na molécula (referente provavelmente a presença de água na amostra) (SILVERSTEIN et al.; 2007; PAVIA et al.; 2001).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT (Fig. 21, pág. 79) (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ), revelou a presença de 10 linhas espectrais. Destes, seis sinais foram observados em campo blindado e quatro sinais assinalados em campo desblindado. Pelos valores de deslocamento químico observamos, que dos 10 carbonos, três são referentes a carbonos não-hidrogenados ( $\delta_{\text{C}}$  154,90; 136,32; 119,38), C-3/C-3', C-2/C-2' e C-4/C-4' respectivamente, um referente a carbono metínico  $\text{sp}^2$  aromático C-5/C-5' ( $\delta_{\text{C}}$  134,80) e dois referentes a carbonos metilênicos ( $\delta_{\text{C}}$  67,80 – carbono ligado a um heteroátomo, N  $\delta_{\text{C}}$  28,98), C-7/C-7' e C-6/C-6' respectivamente, três carbonos metílicos em ( $\delta_{\text{C}}$  53,96; 53,93; 53,91) de grupamento N-metil ( $^+\text{NMe}_3$ ). Também foi observado um sinal de carbono metílico em  $\delta_{\text{C}}$  61,25 referente a carbono de metoxila, localizado em posição estericamente impedida. Os valores de deslocamento químico em  $\delta_{\text{C}}$  154,90; 136,32; 119,38 vistos no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , são compatíveis com a presença de carbonos aromáticos oxigenados. O deslocamento químico do sinal correspondente ao grupo metoxílico ( $\delta_{\text{C}}$  61,25) indicou a sua localização em posição estericamente impedida, sugerindo a presença de um substituinte na posição vizinha (C-4/C-4') com o  $\delta_{\text{C}}$  119,38. A ausência da quarta ligação para o C-4/C4' sugeriu que essa estrutura poderia estar ligada a um elemento haleto, já que o meio marinho é rico nestes íons. Porém, isto não seria possível, já que o espectro na região de IV não registrou bandas de absorções

características desses elementos. Então observamos que esta estrutura poderia ser simétrica com C e H equivalentes, tendo seus sinais sobrepostos no espectro de RMN, proposta que atende aos resultados fornecidos pelos espectros 1D e 2D de RMN, conforme sumarizado na Tabela 3 (pág. 75).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (Fig. 23, pág. 81) mostrou três simpletos, um em  $\delta_{\text{H}}$  7,64, que foi atribuído ao hidrogênio H-5/H-5', outro em  $\delta_{\text{H}}$  3,23 integrando para nove hidrogênios, que foi atribuído ao grupo N-metila ( $^+\text{NMe}_3$ ), e outro em  $\delta_{\text{H}}$  3,85 com integral para três, referente a hidrogênios de metoxila. Além disso, observou-se também dois multipletos em  $\delta_{\text{H}}$  3,12 e 3,58 integrando para dois hidrogênios cada, que foram atribuídos aos hidrogênios H-6/H-6' e H-7/H-7' respectivamente.

No espectro bidimensional de correlação homonuclear  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY (Fig. 24, pág. 82) observou-se a correlação entre os hidrogênios ligados aos carbonos metínicos em  $\delta_{\text{H}}$  3,12 e em  $\delta_{\text{H}}$  3,58 permitindo assim o assinalamento dos dois hidrogênios da posição seis (2H-6/2H-6') e os dois hidrogênios da posição sete (2H-7/2H-7').

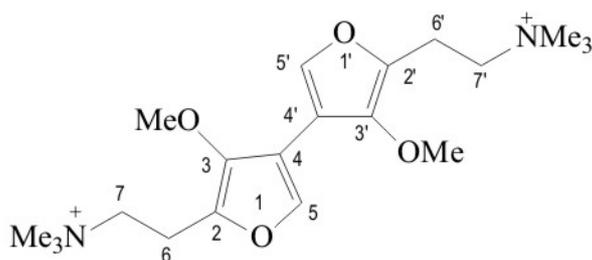
O espectro de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC  $^nJ_{\text{CH}}$  ( $n=1$ ) (Fig. 25, pág. 83) permitiram a correlação dos valores dos sinais dos hidrogênios com os seus respectivos carbonos.

A posição dos grupos substituintes no esqueleto carbônico foi definida com base na observação do espectro HMBC. Foi observada duas correlações a duas ligações ( $^2J_{\text{CH}}$ ) dos dois hidrogênios na posição 6 (2H-6/2H-6') em  $\delta_{\text{H}}$  3,12 com o carbono C-2/C-2' ( $\delta_{\text{C}}$  136,32) e com o carbono C-7/C-7' ( $\delta_{\text{C}}$  67,86) (Fig. 26, pág. 84). Para o hidrogênio H-5/H-5' ( $\delta_{\text{H}}$  7,64) foram observadas as seguintes correlações: a duas ligações ( $^2J_{\text{CH}}$ ) com o carbono C-4/C-4' ( $\delta_{\text{C}}$  119,38), a três ligações ( $^3J_{\text{CH}}$ ) com os carbonos C-2/C-2' ( $\delta_{\text{C}}$  136,32), C-3/C-3' ( $\delta_{\text{C}}$  154,90) e C-4/C-4' ( $\delta_{\text{C}}$  119,38) e a quatro ligações ( $^4J_{\text{CH}}$ ) com os carbonos C-6/C-6' ( $\delta_{\text{C}}$  28,98) e C-5/C-5', confirmando que Af-1 tratava-se de um composto dimérico. Correlações heteronucleares (HMBC), também foram observadas para os dois hidrogênios na posição 7 (2H-7/2H-7'): a duas ligações ( $^2J_{\text{CH}}$ ) com o carbono C-6/C-6' ( $\delta_{\text{C}}$  28,98), a três ligações ( $^3J_{\text{CH}}$ ) com o carbono C-2/C-2' ( $\delta_{\text{C}}$  136,32) e com os carbonos das três N-metilas ( $\delta_{\text{C}}$  53,96; 53,93; 53,91). Outra correlação importante a  $^3J_{\text{CH}}$  foi observada entre o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  3,85 atribuído ao hidrogênio da metoxila e o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  154,90 atribuído ao C-3/C-3', corroborando com a localização da metoxila neste carbono. Uma correlação a  $^3J_{\text{CH}}$  entre o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  3,23 atribuídos aos hidrogênios do grupo N-metila ( $^+\text{NMe}_3$ ) com o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  67,80 identificado como sendo o

carbono C-7/C-7', foi observada. A localização do grupamento N-metila no carbono C-7/C-7' foi corroborada com a correlação espacial NOESY (Fig. 28, pág. 86) entre os sinais de  $2H-7/2H-7'$  em  $\delta_H$  3,58 com os sinais dos hidrogênios de  $Me_3N^+$  em  $\delta_H$  3,23. Outras correlações no espectro de HMBC podem ser vistas nas Figuras 26 e 29 (págs. 84 e 87).

A análise dos dados espectrais de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$  de Af-1 comparados com modelos da literatura (Mo-1, Mo-2 e Mo-3) (Fig. 17, pág. 75) e resultados obtidos através de análise envolvendo a utilização do programa ChemDraw Ultra (Chemical Structure Drawing Stantard) especializado em química (Fig. 18, pág. 76) permitiu identificar o composto Af-1 como sendo o alcalóide quaternário de nome químico 2-(3-metoxi-4-(3'-metoxi-2'-(trimetilamônio) etil) furan-2'-il)- furan-2-il)- N,N,N-trimetiletilamônio (aplysfistularina). Este alcalóide está sendo descrito pela primeira vez.

Os dados espectrais de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$  estão sumarizados na Tabela 3 (pág 75).

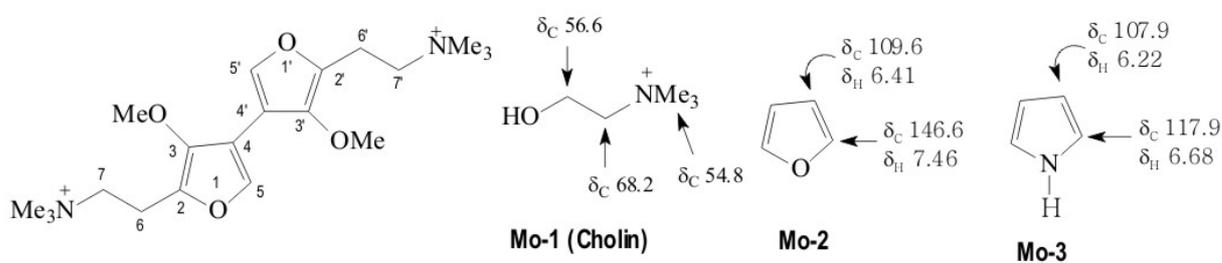


2-(3-metoxi-4-(3'-metoxi-2'-(trimetilamônio) etil) furan-2'-il)- furan-2-il)- N,N,N-trimetiletilamônio

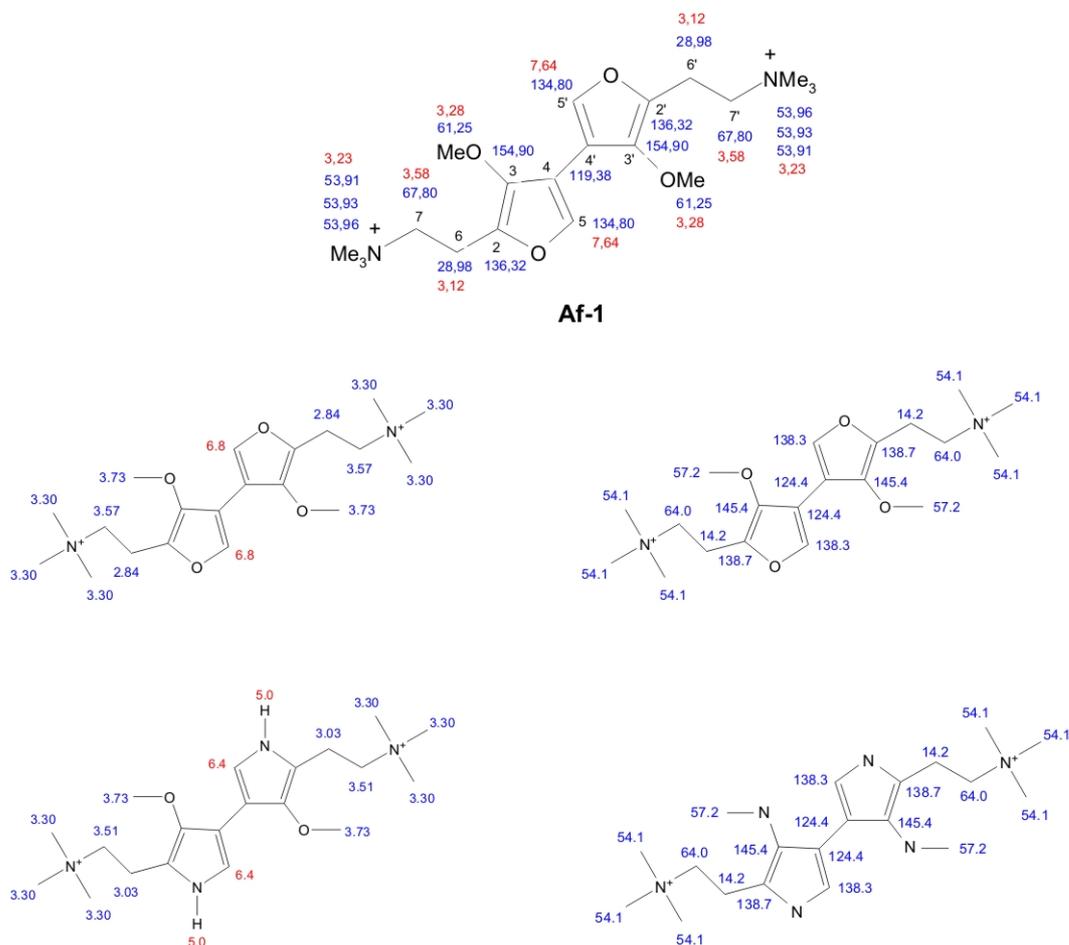
### **Aplysfistularina**

**Tabela 3.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (125MHz) para Af-1 em  $\text{CD}_3\text{OD}$  ( $\delta$  em ppm), incluindo os resultados dos experimentos 2D homonucleares (COSY e NOESY) e heteronucleares (n=1, HMQC; n=2, 3 e 4, HMBC)

	HMQC		HMBC			COSY	NOESY
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	$^4J_{\text{CH}}$		
<b>C</b>							
2/2'	136,32	-	2H-6/2H-6'	H-5/H-5'; 2H-7/2H-7'			
3/3'	154,90	-		H-5/H-5'; MeO-3/MeO-3'			
4/4'	119,38	-	H-5/H-5'	H-5/H-5'			
<b>CH</b>							
5/5'	134,80	7,64 (s)			H-5/H-5'		
<b>CH<sub>2</sub></b>							
6/6'	28,98	3,12 (m)	2H-7/2H-7'		H-5/H-5'	2H-7/2H-7'	
7/7'	67,80	3,58 (m)	2H-6/2H-6'	$\text{Me}_3\text{N}^+$		2H-6/2H-6'	$\text{Me}_3\text{N}^+$
<b>CH<sub>3</sub></b>							
$\text{Me}_3\text{N}^+$	53,96	3,23 (s)		2H-7/2H-7'			2H-7/2H-7'
	53,93	3,23 (s)					
	53,91	3,23 (s)					
MeO	61,25	3,85 (s)					
3/3'							



**FIGURA 17.** Análise comparativa com modelos da literatura (POUCHERT, BEHNKE, 1993).



**FIGURA 18.** Análise utilizando software programa ChemDraw Ultra (Chemical Structure Drawing Standard) especializado em química.

O espectro de massas obtido pela técnica de “electrospray” (Fig. 32, pág 90) revelou que as moléculas da substância já se encontravam ionizadas com a presença de duas cargas positivas localizadas nos átomos de nitrogênio. Neste caso, a molécula seria representada pela  $m/2z = 366/2 = 183$  após a correspondente separação no analisador eletrostático, que executou a separação dos íons com base na relação massa/carga. Já a presença de diversos grupos metílicos (seis ligados aos dois átomos de nitrogênio – três em cada e dois átomos de oxigênio – um em cada) justificou a racionalização mecanística proposta no esquema abaixo (Fig. 19, pág 77). Desta forma, estes argumentos permitiram admitir que o espectro de massas está de acordo com a proposta estrutural deduzida.

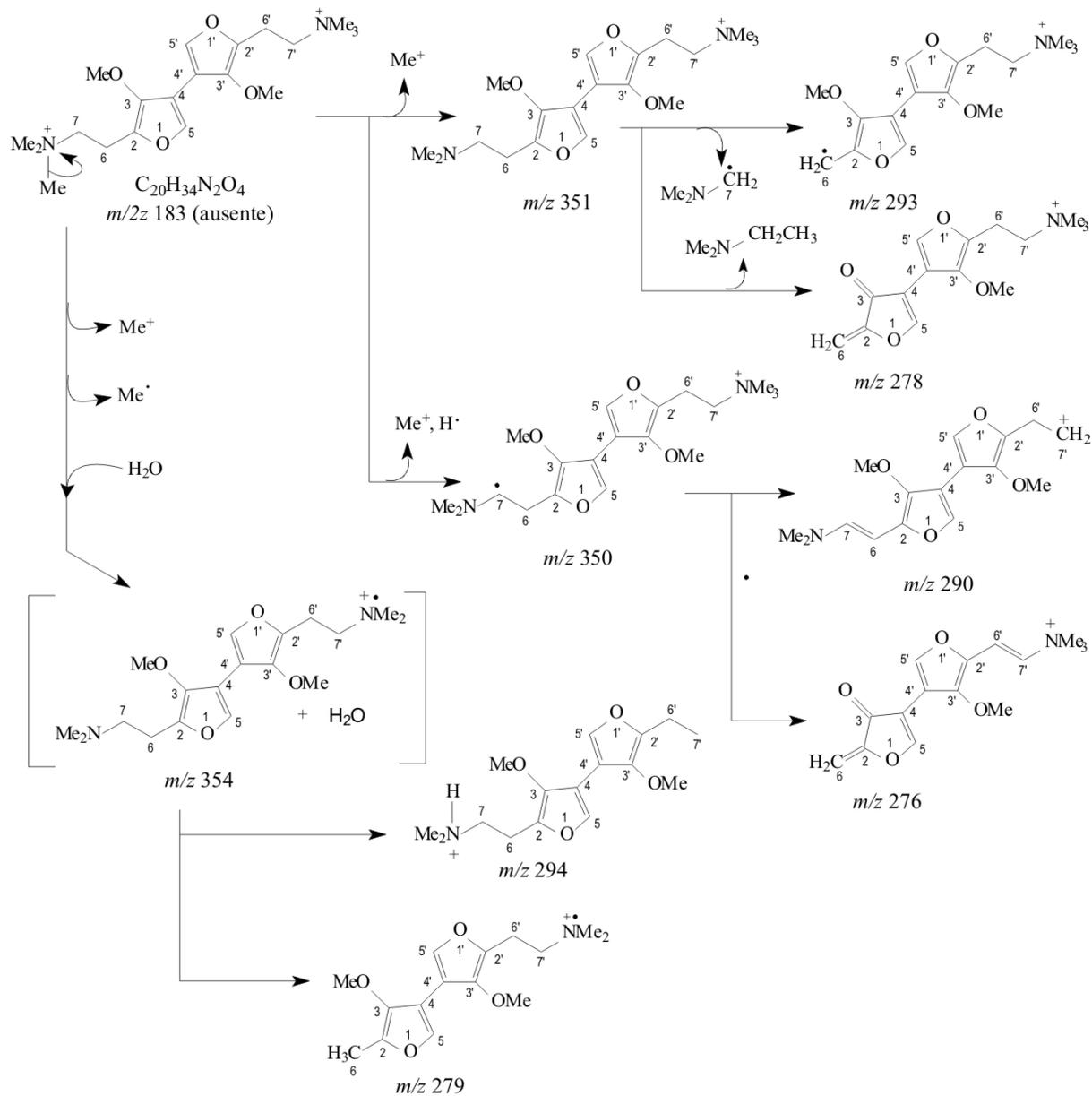


FIGURA 19. Racionalização mecânica proposta para a molécula de Aplysistularina.

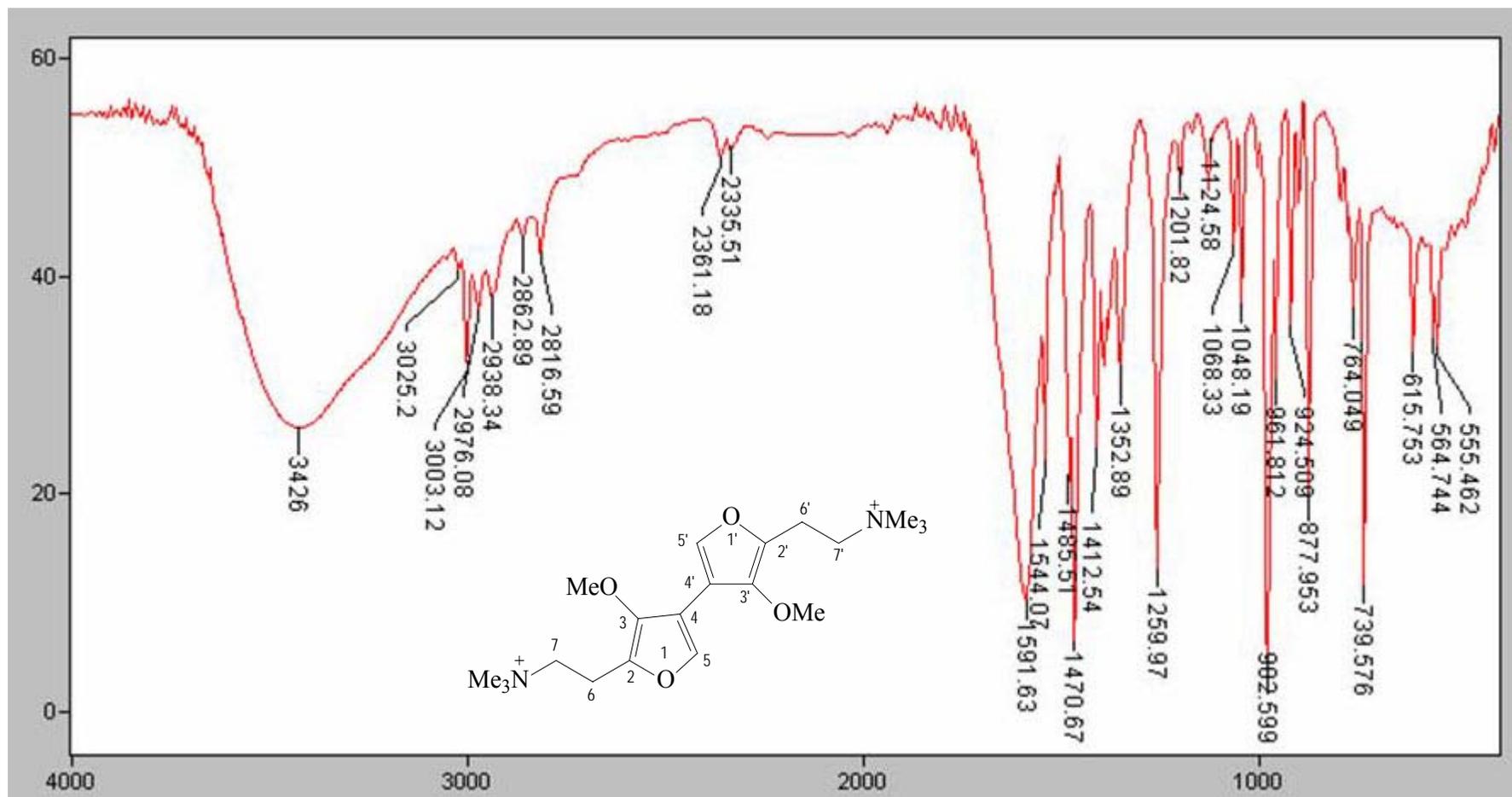


FIGURA 20. Espectro na região do IV de Af-1 (Pastilha de KBr, cm<sup>-1</sup>)

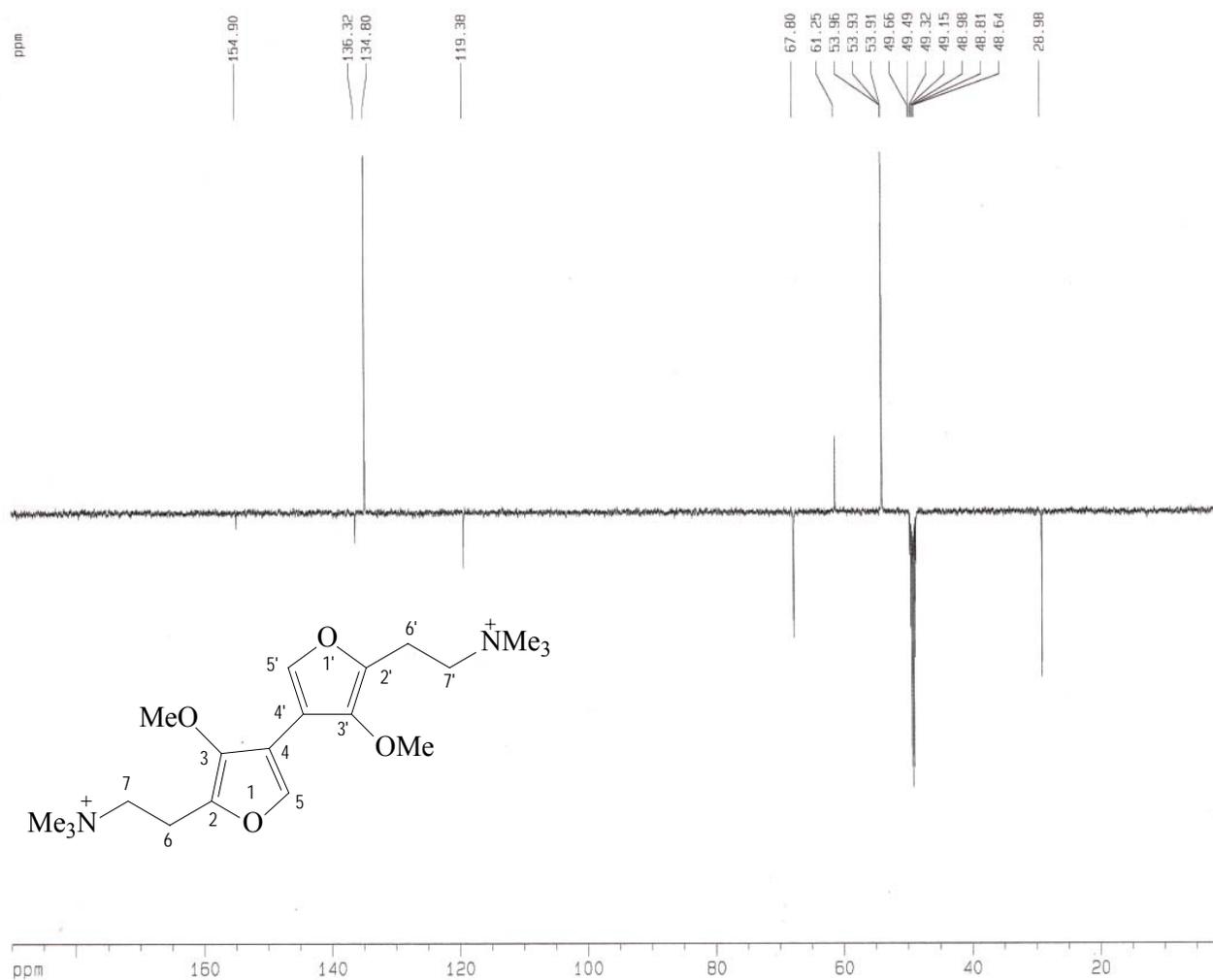
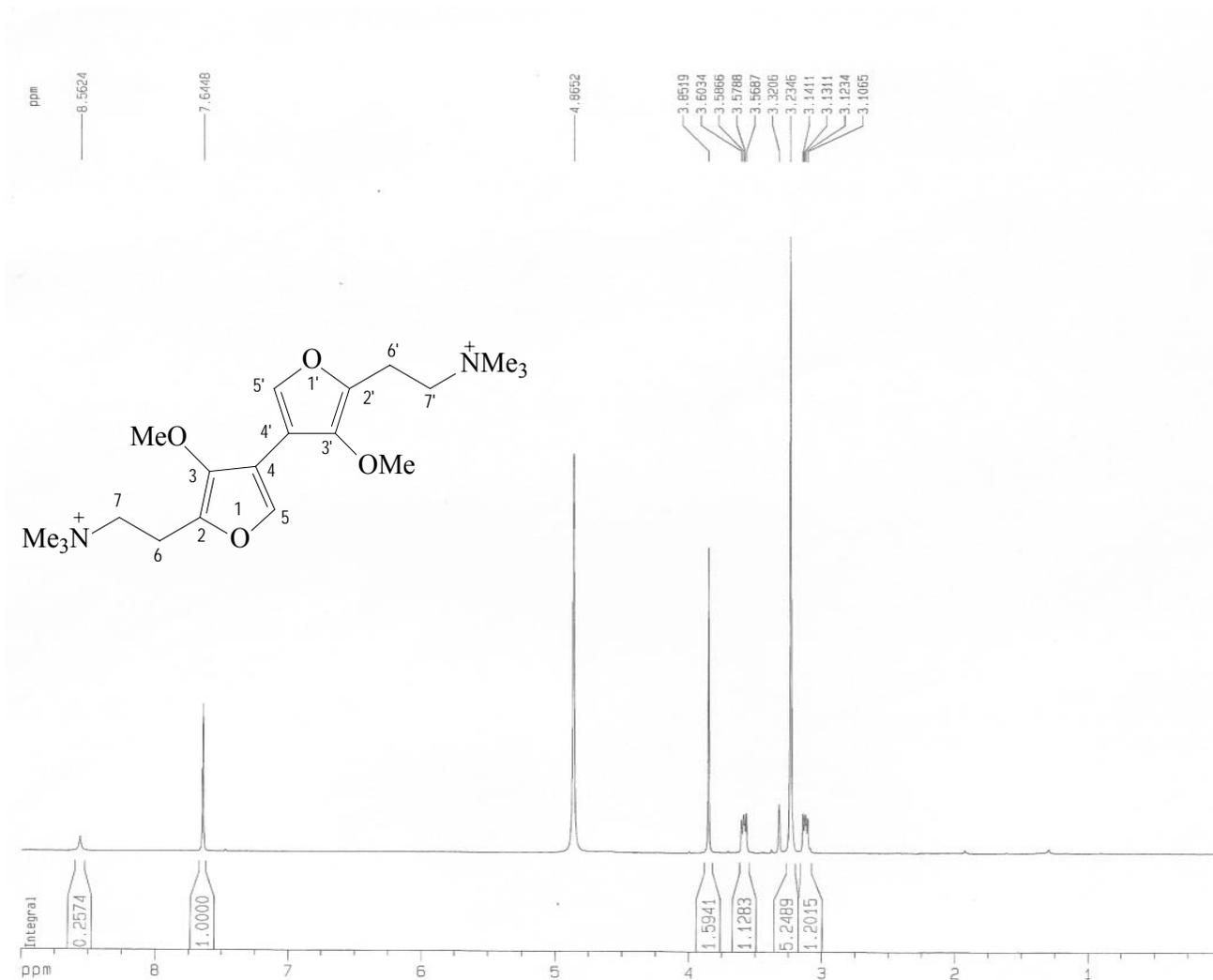


FIGURA 21. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ -APT de Af-1 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz)



**FIGURA 22.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de Af-1 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)

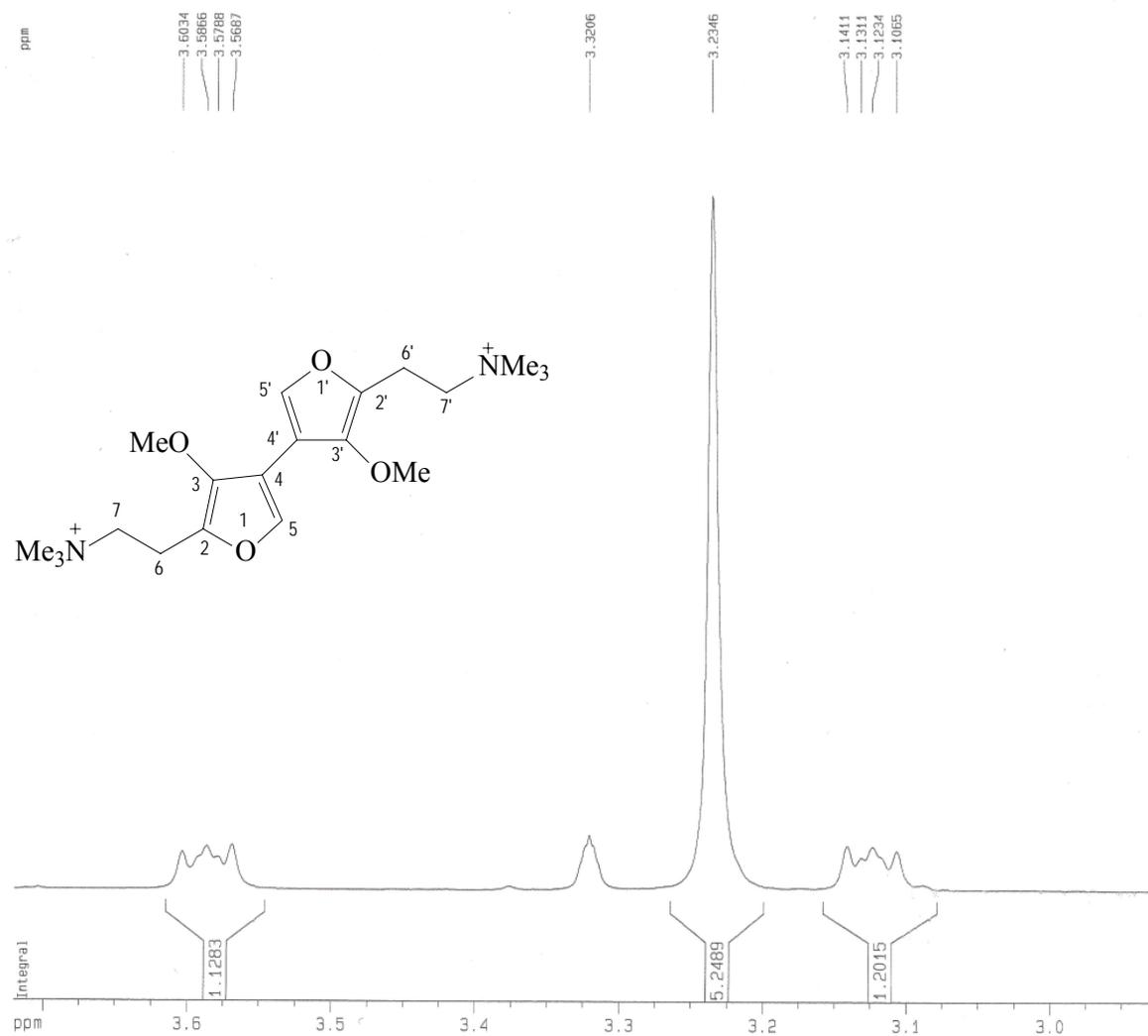
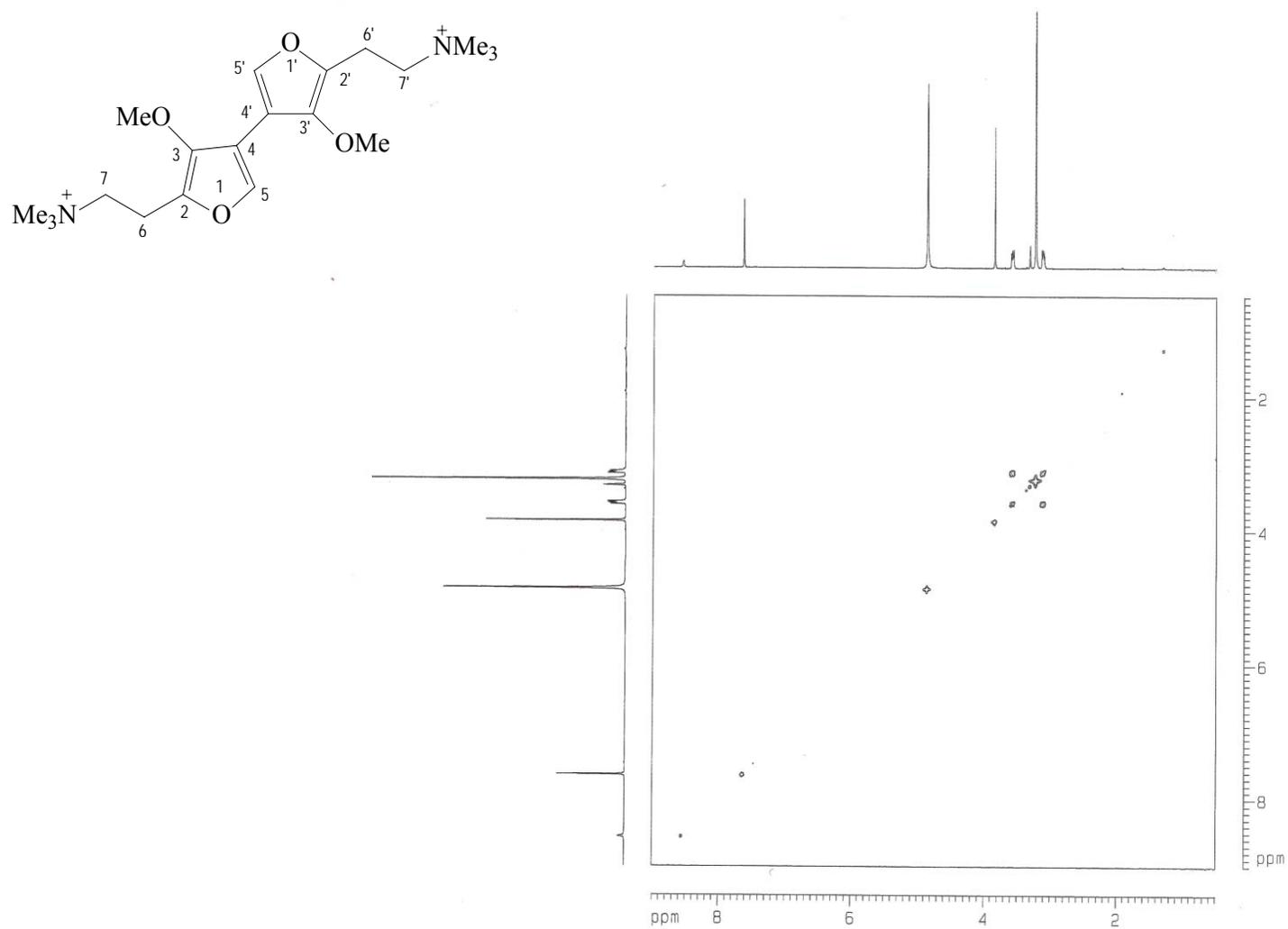


FIGURA 23. Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H na região de 3,0-3,6 de Af-1 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)



**FIGURA 24.** Espectro de correlação de  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de Af-1 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)

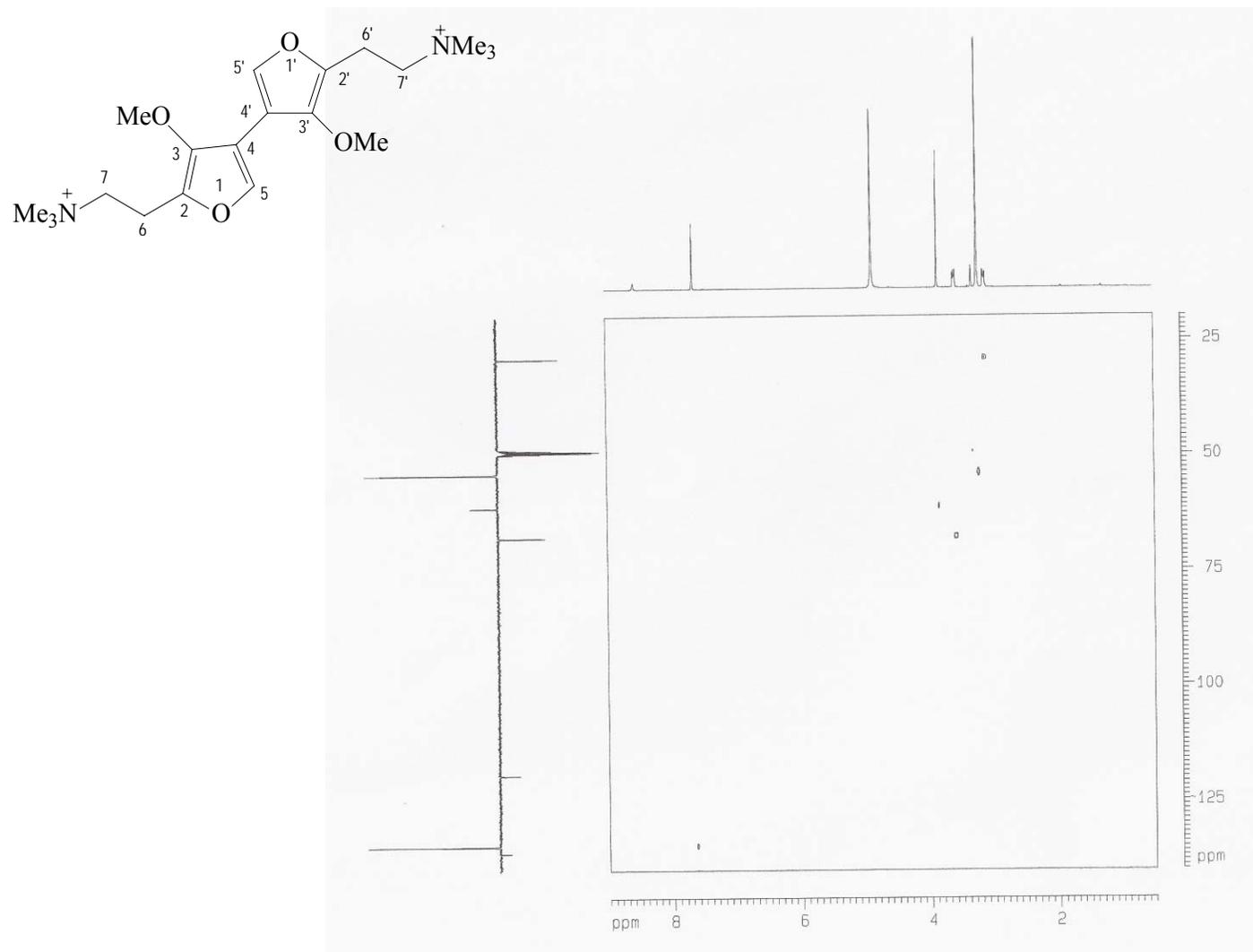
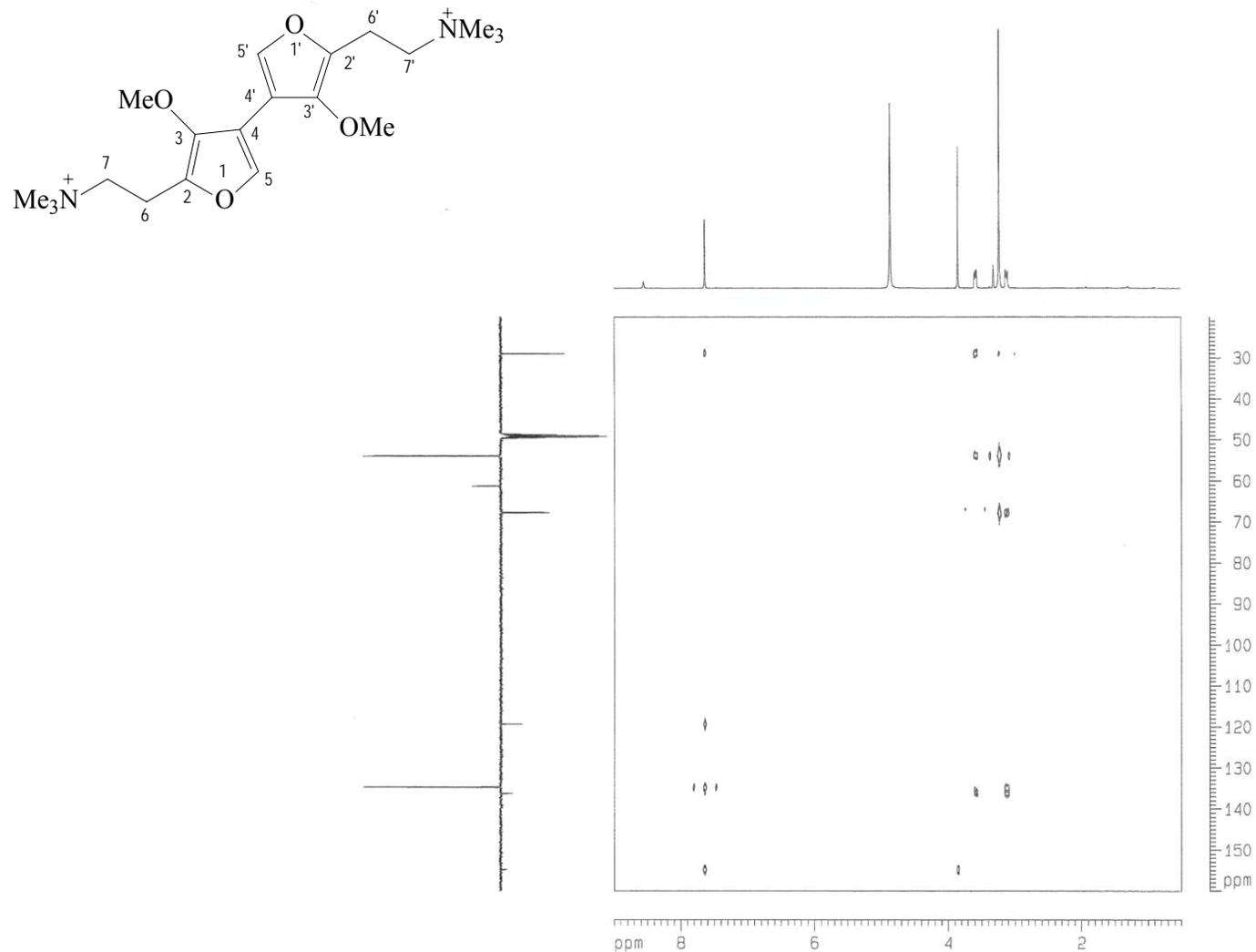
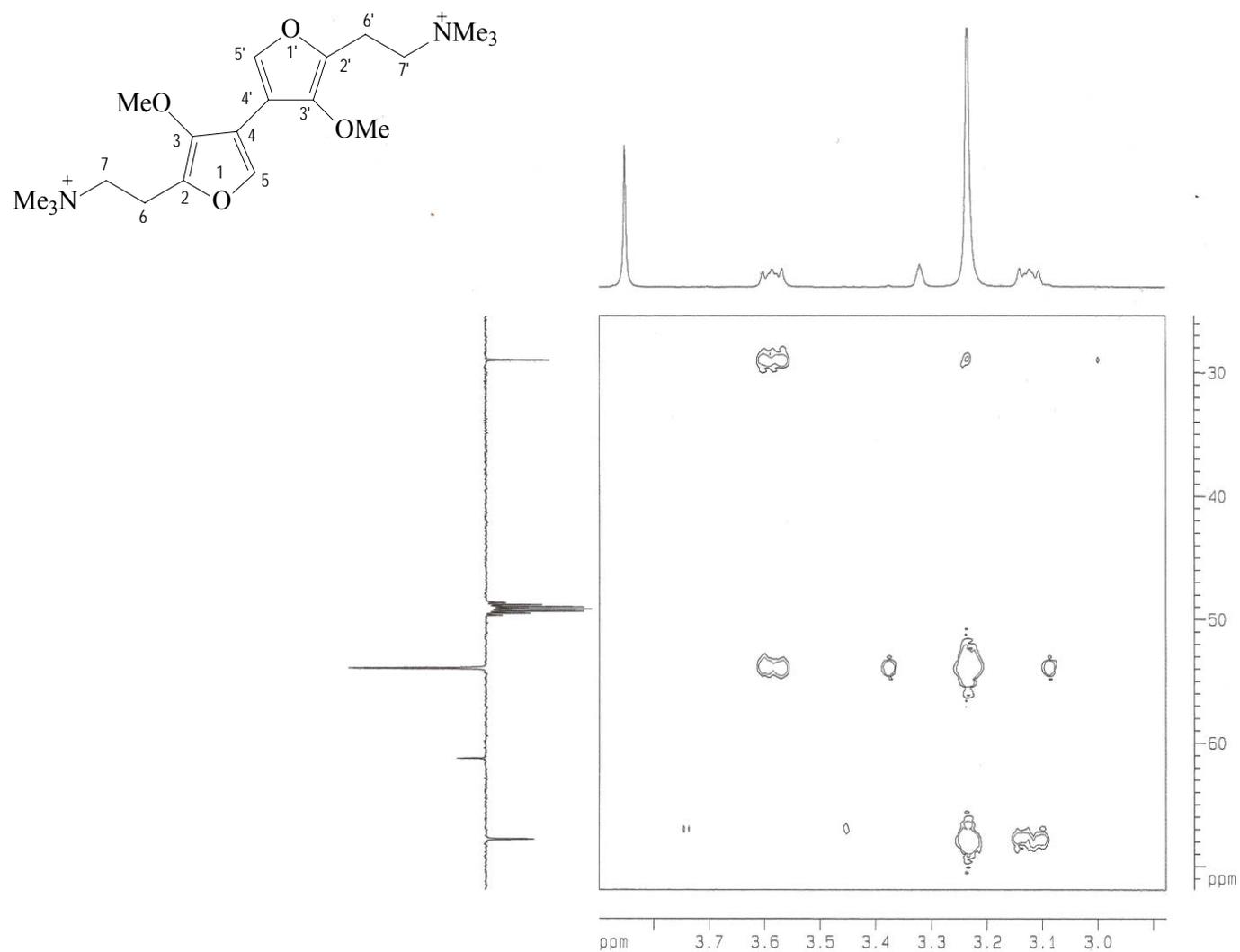


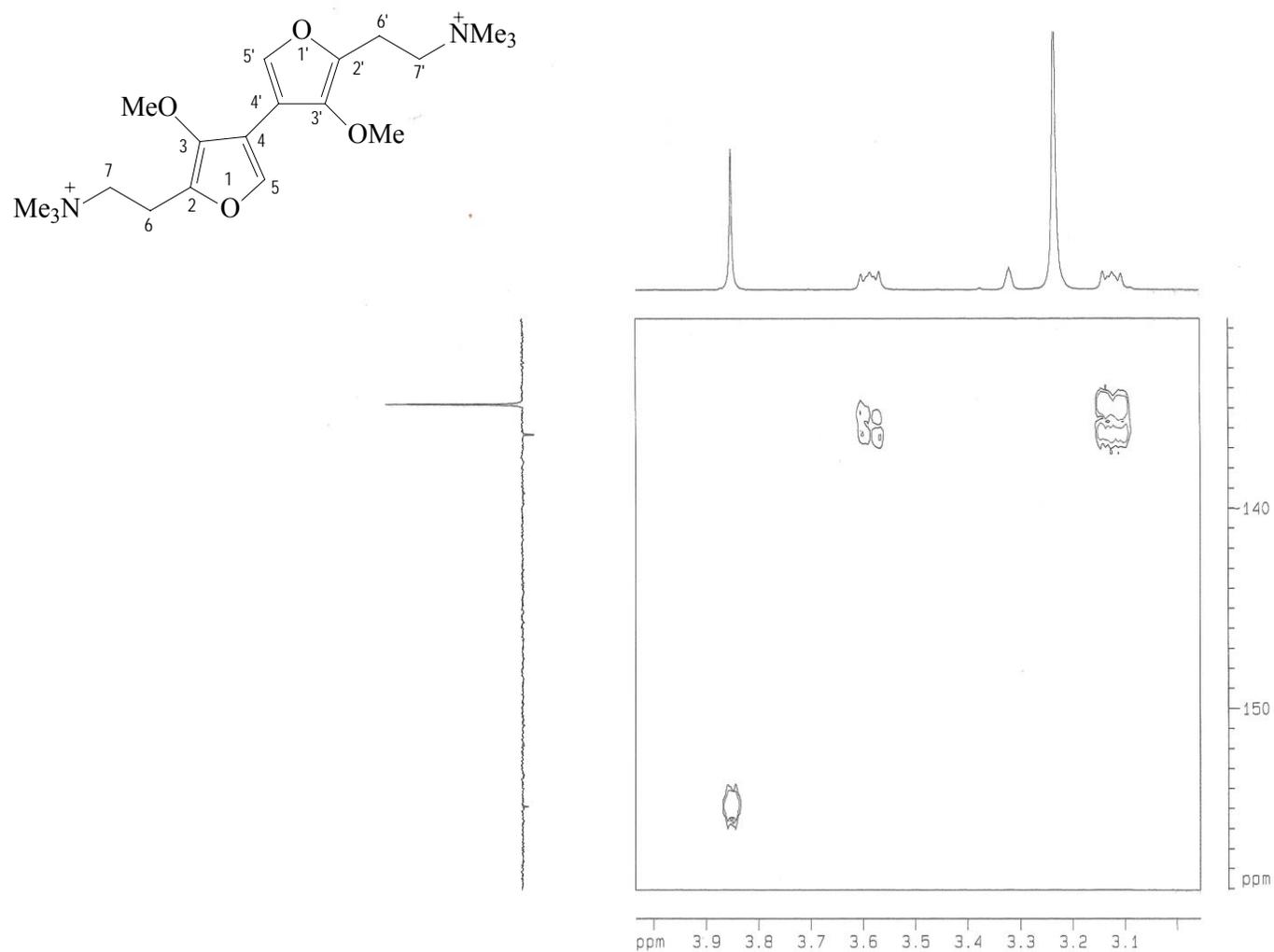
FIGURA 25. Espectro de correlação  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC de Af-1 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 e 125 MHz, respectivamente)



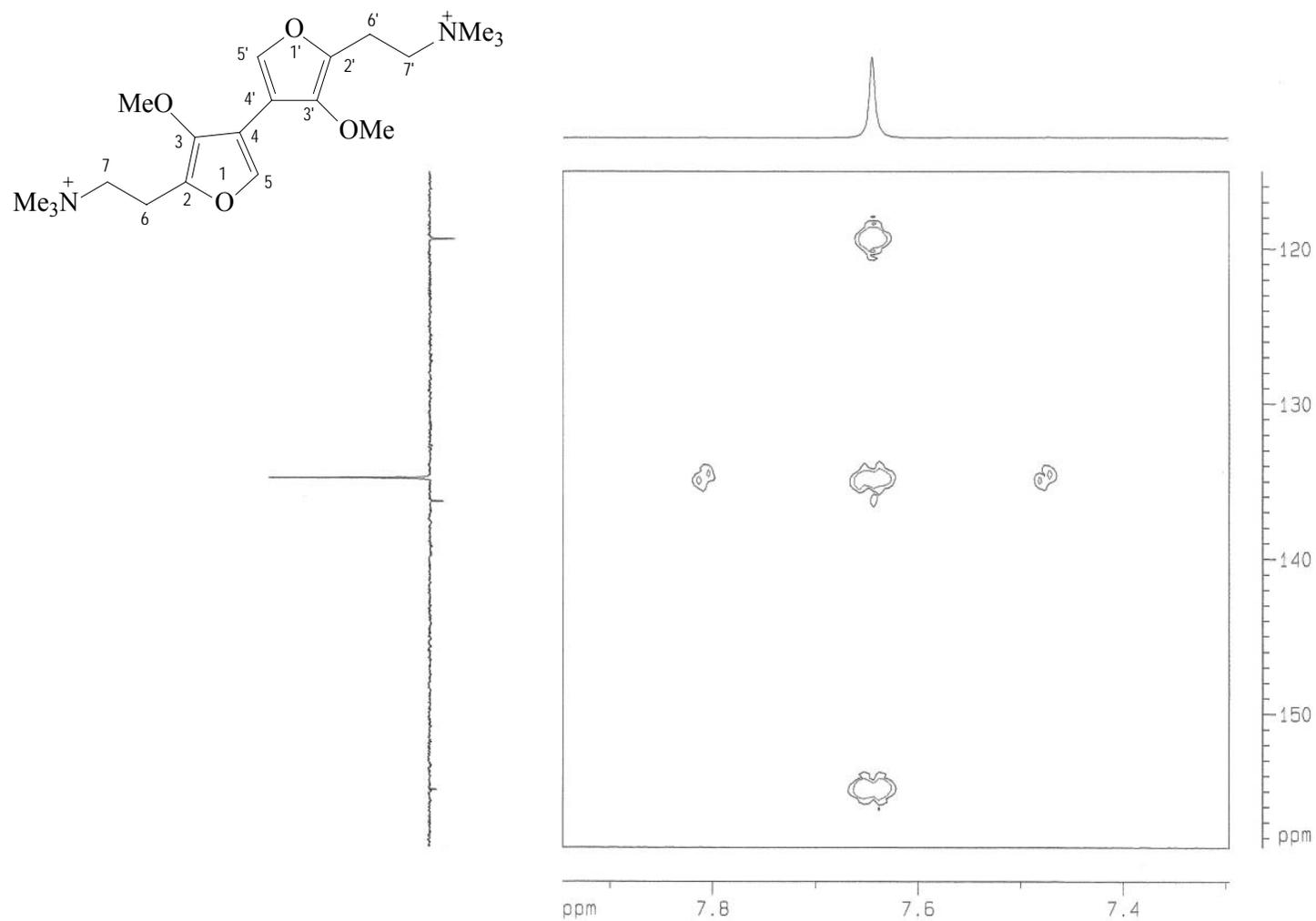
**FIGURA 26.** Espectro de correlação  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC de Af-1 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 e 125 MHz, respectivamente)



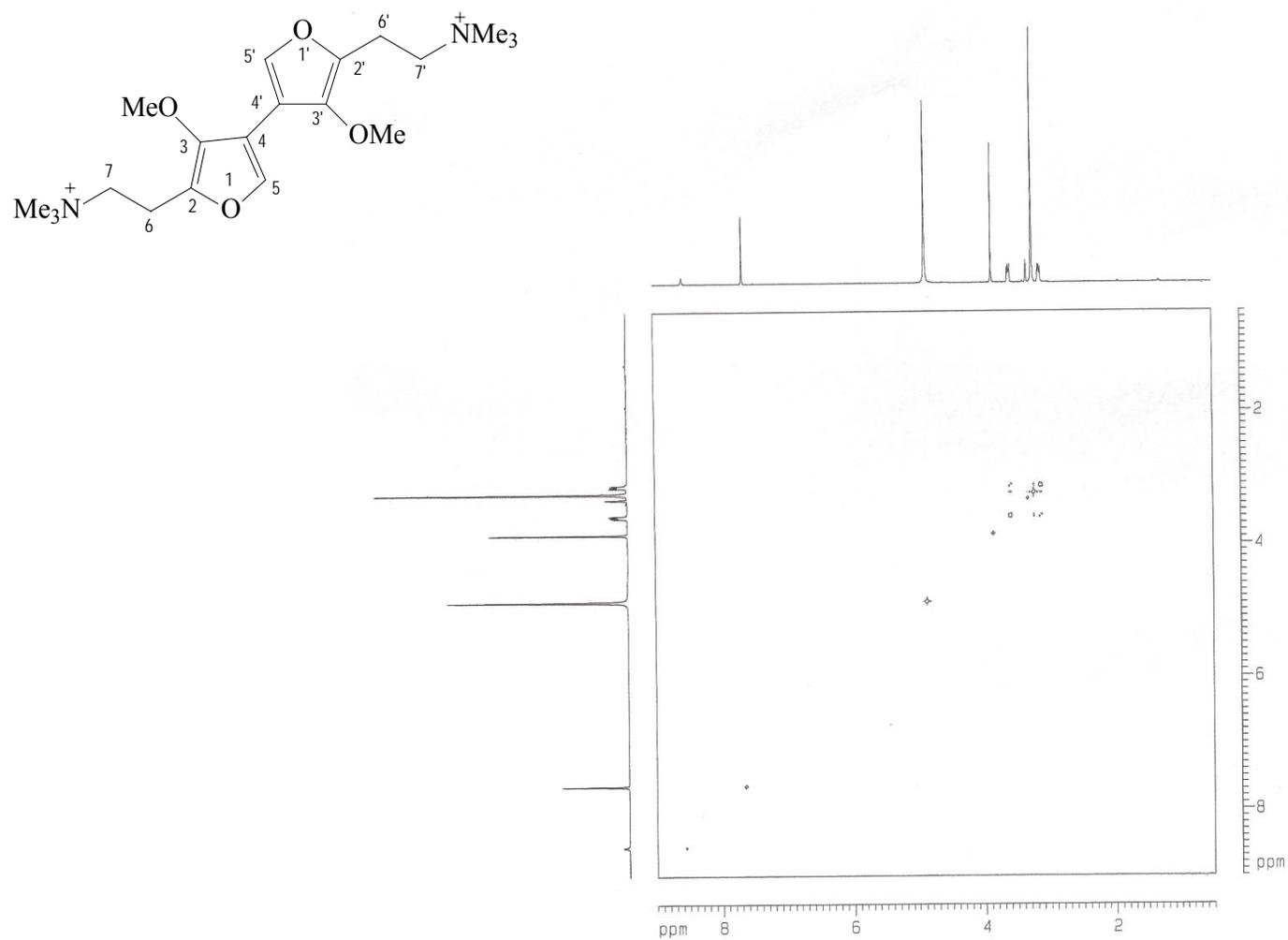
**FIGURA 27.** Expansão do espectro de correlação  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC de Af-1 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 e 125 MHz, respectivamente)



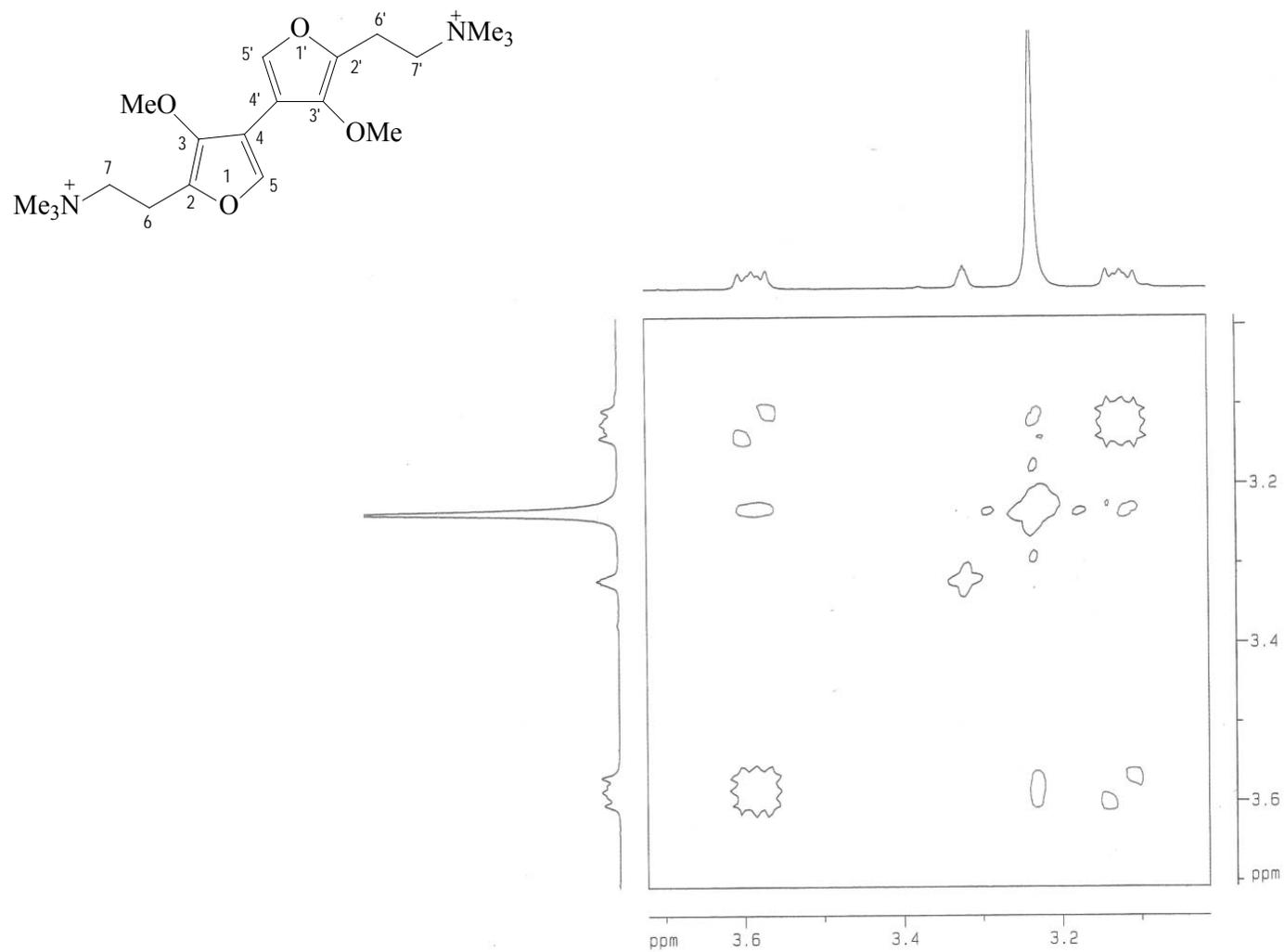
**FIGURA 28.** Expansão do espectro de correlação  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC de Af-1 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 e 125 MHz, respectivamente)



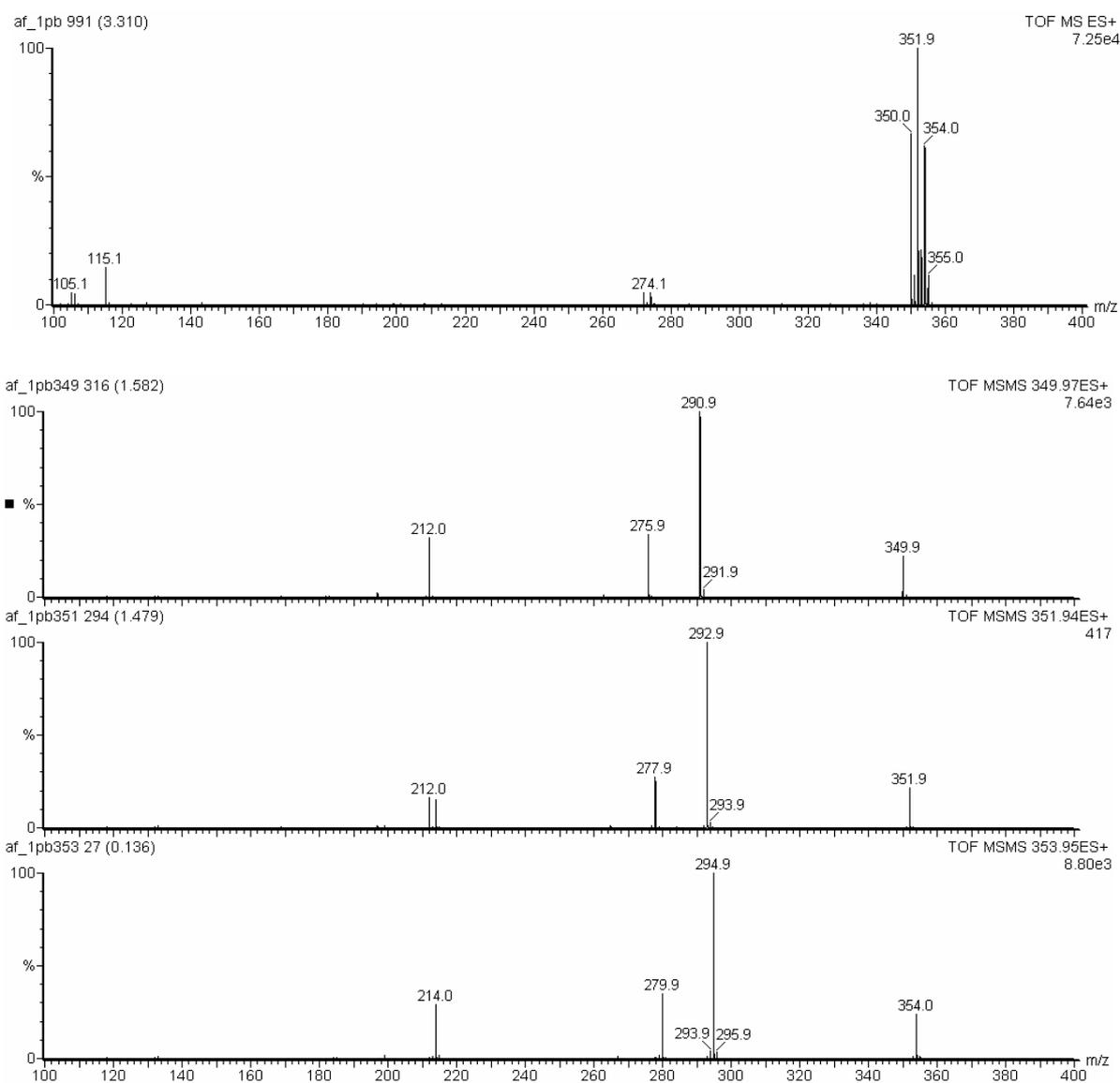
**FIGURA 29.** Expansão do espectro de correlação  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC de Af-1 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 e 125 MHz, respectivamente)



**FIGURA 30.** Espectro de correlação espacial <sup>1</sup>H x <sup>1</sup>H-NOESY de Af-1 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)



**FIGURA 31.** Expansão do espectro de correlação espacial <sup>1</sup>H x <sup>1</sup>H-NOESY de Af-1 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)



**FIGURA 32.** Espectro de massas de Af-1 (Electrospray – ESMS)

## 5.2. Determinação Estrutural de Af-2

O composto codificado como Af-2 foi obtido na forma de um sólido, amarelo, não sendo possível determinar o ponto de fusão, por se tratar de uma mistura.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Fig. 33, pág. 96) (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e suas expansões (Figs. 34 e 35, págs. 97 e 98) mostraram absorções simples e múltiplas na região entre  $\delta_{\text{H}}$  0,64 e  $\delta_{\text{H}}$  2,24 característicos de hidrogênio metílico e metilênico de carbono  $\text{sp}^3$  presentes em estruturas como triterpenos e esteróides (DE LUCA, 1972). Através da absorção em  $\delta_{\text{H}}$  3,45 (Fig. 34, pág. 97) pôde-se verificar a presença de um multipletto atribuído a hidrogênio oximetínico de núcleo esteroidal e/ou triterpênico (DE LUCA, 1972). O espectro ainda mostrou um dupletto em  $\delta_{\text{H}}$  5,32 característico de hidrogênio olefínico na posição 6 de esteróides marinhos (KELECOM, 1979).

Estes dados espectrais, feições dos espectros e comparações com dados da literatura possibilitaram sugerir que Af-2 possui o núcleo esteroidal (Tabela 4, pág. 94).

O conjunto de absorções entre  $\delta_{\text{C}}$  11,81 e  $\delta_{\text{C}}$  21,02 observadas no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT (Fig. 33, pág. 94) (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e suas expansões (Figs. 37 e 38, págs. 100 e 101) referentes a metilas de núcleo esteroidal fortaleceu a proposta feita pelo RMN de  $^1\text{H}$  de que Af-2 possuía este núcleo. O número de absorções referentes a carbonos (45 sinais) presentes no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e seus respectivos deslocamentos químicos (Tabela 4, pág. 94) permitiram propor que Af-2 era composta por duas substâncias esteroidais distintas que passaram a ser codificadas como Af-2a e Af-2b. Os sinais para carbonos  $\text{sp}^2$  metínicos em  $\delta_{\text{H}}$  121,63 e carbono não hidrogenado em  $\delta$  140,70 condizentes com dupla ligação nas posições 6 e 5 tanto para o Aplysterol como para o 24,28-Didehidroaplysterol, juntamente com as absorções em  $\delta_{\text{C}}$  156,64 e  $\delta_{\text{C}}$  106,04 pertinentes com os carbonos olefínicos (C-24 e C-28) do 24,28-Didehidroaplysterol fortaleceram a proposta de que Af-2 tratava-se de uma mistura de esteróides.

No espectro bidimensional de correlação homonuclear  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY (Figs. 44 e 45, pág. 107 e 108) observou-se a correlação entre os hidrogênios ligados ao carbono metínico C-3 em  $\delta_{\text{H}}$  3,48 e o carbono metilênico C-4 em  $\delta_{\text{H}}$  2,24 permitindo assim o assinalamento do hidrogênio da posição três (H-3) e os dois hidrogênios da posição quatro (2H-4).

O espectro de correlação heteronuclear de hidrogênio e carbono  $13, ^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC  $^nJ_{\text{CH}}$  ( $n=1$ ) (Figs. 39 e 40, págs. 102 e 103) permitiram a correlação dos valores dos sinais dos hidrogênios com os seus respectivos carbonos.

A posição dos grupos substituintes no esqueleto carbônico foi definida com base na observação do espectro HMBC. Foi observada duas correlações a duas ligações ( $^2J_{\text{CH}}$ ) dos hidrogênios na posição 4 (2H-4) em  $\delta_{\text{H}}$  2,24 com o carbono C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  140,71) e com o carbono C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  71,69), foi possível observar ainda três correlações a três ligações ( $^3J_{\text{CH}}$ ) dos dois hidrogênios na posição 4 (2H-4) em  $\delta_{\text{H}}$  2,24 com o carbono C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  121,64), com o C-10 ( $\delta_{\text{C}}$  36,44) e com o carbono C-2 ( $\delta_{\text{C}}$  31,55) (Figs. 41, 42 e 43, págs. 105,106 e 107). Para o hidrogênio H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  5,31) foram observadas as seguintes correlações: a duas ligações ( $^2J_{\text{CH}}$ ) com o carbono C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  31,92), a três ligações ( $^3J_{\text{CH}}$ ) com os carbonos C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  42,20), C-8 ( $\delta_{\text{C}}$  31,83) e C-10 ( $\delta_{\text{C}}$  36,44). Foi possível observar também as seguintes correlações para os hidrogênios H-7 ( $\delta_{\text{H}}$  1,97) a duas ligações ( $^2J_{\text{CH}}$ ) com o carbono C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  121,64) e a três ligações ( $^3J_{\text{CH}}$ ) com os carbonos C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  140,71) e C-9 ( $\delta_{\text{C}}$  50,07). Para os hidrogênios H-18 ( $\delta_{\text{H}}$  0,64) foram observadas as seguintes correlações: a duas ligações ( $^2J_{\text{CH}}$ ) com o carbono C-13 ( $\delta_{\text{C}}$  42,26), a três ligações ( $^3J_{\text{CH}}$ ) com os carbonos C-12 ( $\delta_{\text{C}}$  39,72) e C-14 ( $\delta_{\text{C}}$  56,71). Já para os hidrogênios H-19 ( $\delta_{\text{H}}$  0,97) foram observadas as seguintes correlações: a duas ligações ( $^2J_{\text{CH}}$ ) com o carbono C-10 ( $\delta_{\text{C}}$  36,44), a três ligações ( $^3J_{\text{CH}}$ ) com os carbonos C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  37,20), C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  140,71) e C-9 ( $\delta_{\text{C}}$  50,07). Para o hidrogênio H-21 ( $\delta_{\text{H}}$  0,86) foram observadas as seguintes correlações: a duas ligações ( $^2J_{\text{CH}}$ ) com o carbono C-20 ( $\delta_{\text{C}}$  35,82), a três ligações ( $^3J_{\text{CH}}$ ) com os carbonos C-17 ( $\delta_{\text{C}}$  56,07) e C-22 ( $\delta_{\text{C}}$  33,84). Ainda foram observadas para o hidrogênio H-25 ( $\delta_{\text{H}}$  1,94) as seguintes correlações: a duas ligações ( $^2J_{\text{CH}}$ ) com o carbono C-24 ( $\delta_{\text{C}}$  36,44) e com o carbono C-29 ( $\delta_{\text{C}}$  12,21), a três ligações ( $^3J_{\text{CH}}$ ) com os carbonos C-28 ( $\delta_{\text{C}}$  16,49). Para o 24,28-Didehidroaplysterol observamos ainda a seguinte correlação a três ligações ( $^3J_{\text{CH}}$ ) do H-28 ( $\delta_{\text{H}}$  4,66) com o carbonos C-25 ( $\delta_{\text{C}}$  40,47), confirmando que Af-2 tratava-se de uma mistura de dois esteróides, o aplysterol e o 24,28-didehidroaplysterol. As correlações espaciais NOESY (Figs. 46, 47 e 48, págs. 109, 110 e 111) entre os sinais de H-6 em  $\delta_{\text{H}}$  5,31 com os sinais dos hidrogênios H-4 em  $\delta_{\text{H}}$  2,24, entre os sinais de H-18 em  $\delta_{\text{H}}$  0,64 com os sinais dos hidrogênios H-11 em  $\delta_{\text{H}}$  1,43 e entre os sinais de H-19 em  $\delta_{\text{H}}$  0,97 com os sinais dos hidrogênios H-11 em  $\delta_{\text{H}}$  1,43, corroboraram com a mistura proposta. Outras correlações

no espectro de HMBC podem ser vistas nas Figuras 26, 27 e 29 (págs. 84, 85 e 87).

Comparações realizadas entre os dados espectrais de RMN de  $^{13}\text{C}$  de Af-2a e Af-2b com modelos da literatura (KELECOM, 1979) (Tabela 5, pág. 95) tornaram possível identificar Af-2 como sendo uma mistura de duas substâncias: o Aplysterol (Af-2a) e o 24,28-Didehidroaplysterol (Af-2b), cujas presenças são comuns em espécies marinhas, sendo descrita pela primeira vez na espécie *A. fistularis*.

**Tabela 4.** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (200 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (50 MHz) para Af-2a e Af-2b em  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta$  em ppm,  $J$  em parênteses em Hz)

	<b>Af-2a</b>		<b>Af-2b</b>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$
<b>C</b>				
5	140,70	-	140,70	-
10	36,44	-	36,44	-
13	42,26	-	42,64	-
24	-	-	156,64	-
<b>CH</b>				
3	71,69	3,48 ( <i>m</i> )	71,69	3,48 ( <i>m</i> )
6	121,63	5,31 ( <i>d</i> , 4,8)	121,63	5,32 ( <i>d</i> , 4,8)
8	31,83	0,93 ( <i>m</i> )	31,83	0,93 ( <i>m</i> )
9	50,07	-	50,07	-
14	56,70	-	56,70	-
17	56,07	-	55,90	-
20	35,82	-	35,82	-
24	37,43	-	-	-
25	39,79	1,94 ( <i>m</i> )	40,47	1,94 ( <i>m</i> )
<b>CH<sub>2</sub></b>				
1	37,20	-	37,20	-
2	31,86	2,24 ( <i>d</i> , 4,1)	31,55	2,24 ( <i>d</i> , 4,1)
4	42,20	2,24 ( <i>d</i> , 4,1)	42,20	2,24 ( <i>d</i> , 4,1)
7	31,92	1,97 ( <i>m</i> )	31,92	1,97 ( <i>m</i> )
11	21,02	1,43 ( <i>m</i> )	21,02	1,43 ( <i>m</i> )
12	39,72	-	39,90	-
15	24,24	-	24,24	-
16	28,19	-	28,13	-
22	33,83	-	33,67	-
23	28,94	-	29,68	-
26	25,70	0,89 ( <i>d</i> , 6,4)	26,12	0,89 ( <i>d</i> , 6,4)
28	-	-	106,04	4,65 ( <i>t</i> , 2,1)
<b>CH<sub>3</sub></b>				
18	11,99	0,64 ( <i>s</i> )	11,81	0,64 ( <i>s</i> )
19	19,35	0,97 ( <i>s</i> )	19,35	0,97 ( <i>s</i> )
21	18,66	0,86 ( <i>d</i> )	18,73	0,86 ( <i>d</i> )
27	15,85	0,79 ( <i>d</i> , 4,1)	19,95	0,79 ( <i>d</i> , 4,1)
28	16,49	-	-	-
29	12,20	-	12,40	-

**Tabela 5.** Comparação dos dados  $^{13}\text{C}$  (50 MHz) para Af-2a e Af-2b em  $\text{CDCl}_3$  com dados de  $^{13}\text{C}$  (50 MHz) para Aplysterol e 24,28-Didehidroaplysterol em  $\text{CDCl}_3$  encontrados na literatura ( $\delta$  em ppm) (KELECOM, 1979)

Carbonos	Aplysterol	Af-2a	24,28-Didehidroaplysterol	Af-2b
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{H}}$
<b>C</b>				
5	140,6	140,70	140,6	140,70
10	36,5	36,44	36,5	36,44
13	42,3	42,26	42,3	42,64
24	-	-	156,5	156,64
<b>CH</b>				
3	71,7	71,69	71,7	71,69
6	121,6	121,63	121,5	121,63
8	31,9	31,83	31,9	31,83
9	50,1	50,07	50,1	50,07
14	56,8	56,70	56,7	56,70
17	56,1	56,07	55,9	55,90
20	35,9	35,82	35,8	35,82
24	36,2	37,43	-	-
25	37,5	39,79	40,5	40,47
<b>CH<sub>2</sub></b>				
1	37,3	37,20	37,2	37,20
2	31,7	31,86	31,6	31,55
4	42,3	42,20	42,3	42,20
7	31,9	31,92	31,9	31,92
11	21,1	21,02	21,1	21,02
12	39,8	39,72	39,7	39,90
15	24,3	24,24	24,3	24,24
16	28,3	28,19	28,1	28,13
22	33,9	33,83	33,7	33,67
23	29,0	28,94	29,7	29,68
26	25,8	25,70	26,2	26,12
28	-	-	106,0	106,04
<b>CH<sub>3</sub></b>				
18	11,9	11,99	11,8	11,81
19	19,4	19,35	19,4	19,35
21	18,7	18,66	18,8	18,73
27	15,9	15,85	20,0	19,95
28	16,6	16,49	-	-
29	12,3	12,20	12,5	12,40

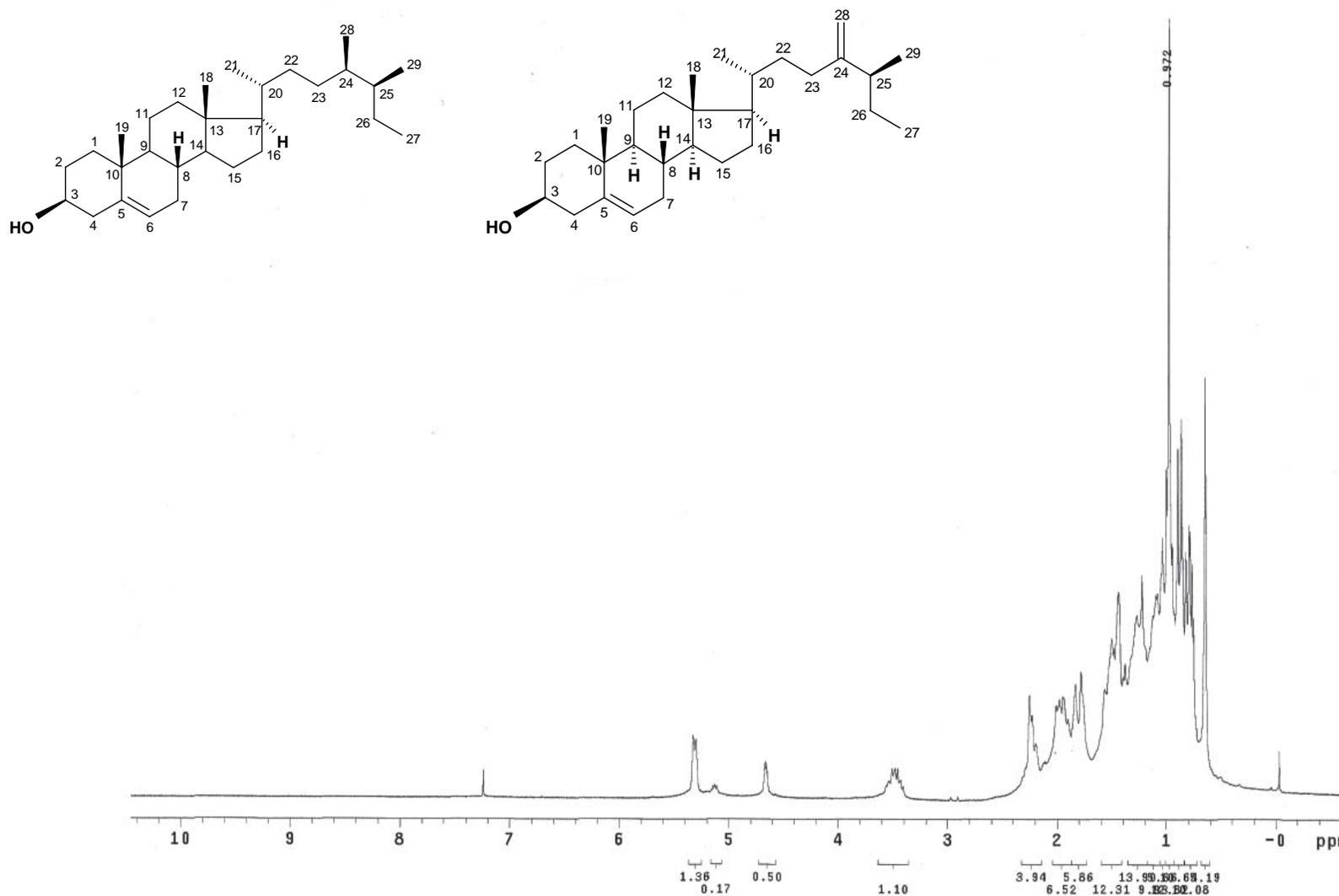
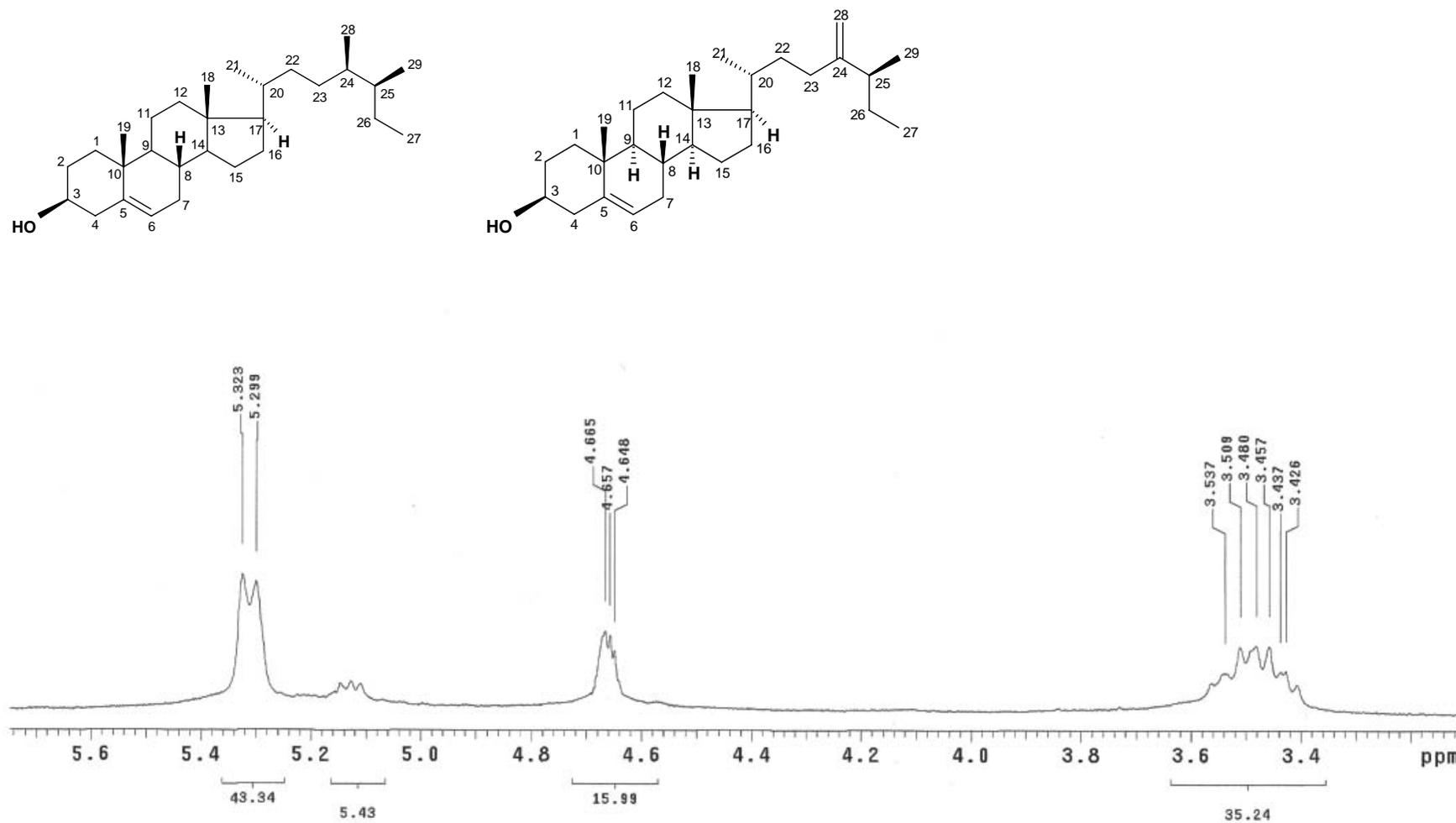


FIGURA 33. Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de Af-2a e Af-2b (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)



**FIGURA 34.** Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup>H na região de 3,4-5,6 de Af-2a e Af-2b (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)

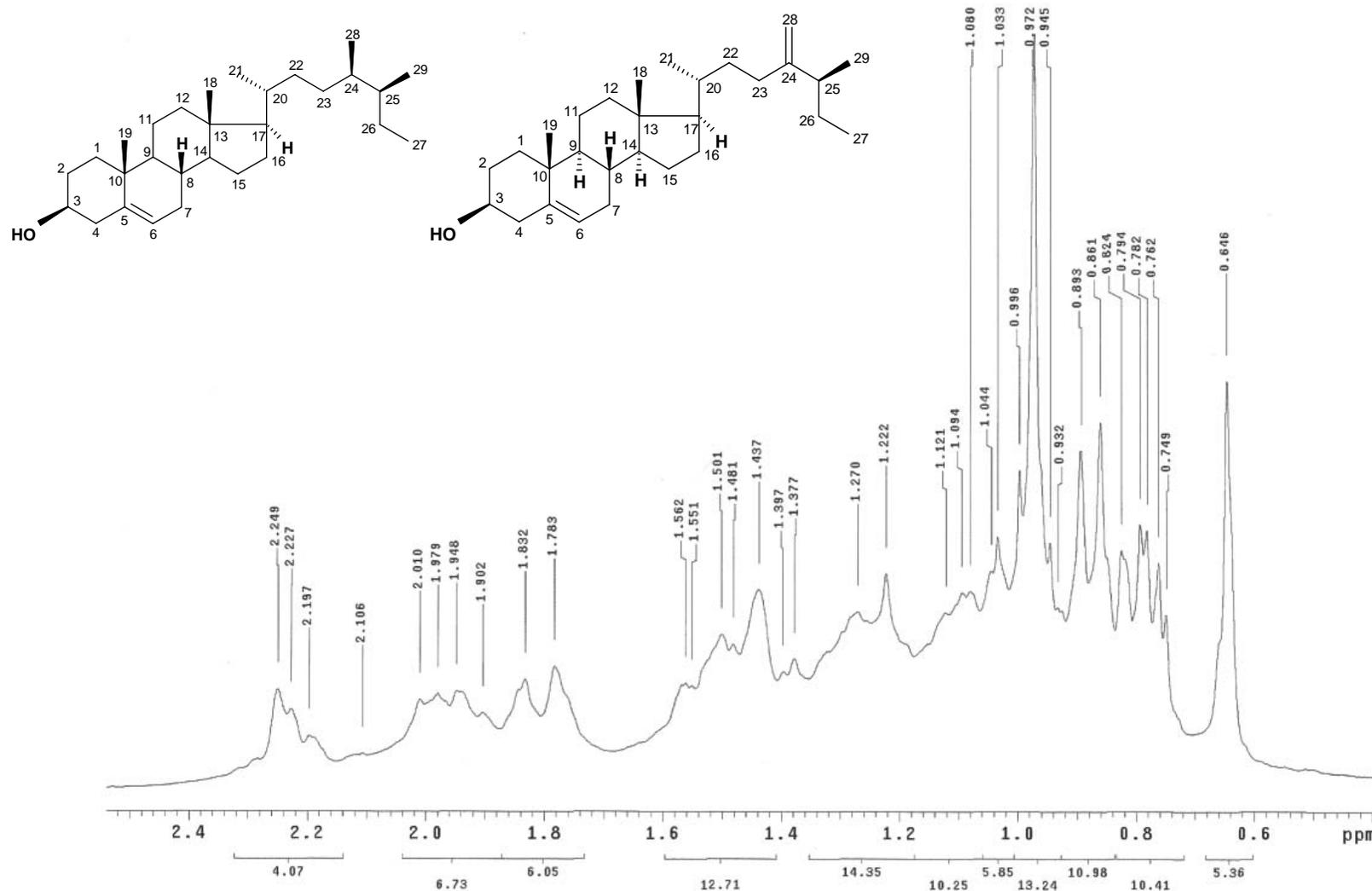


FIGURA 35. Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup>H na região de 0,6-2,4 de Af-2a e Af-2b (CDCl<sub>3</sub>, 200 MHz)

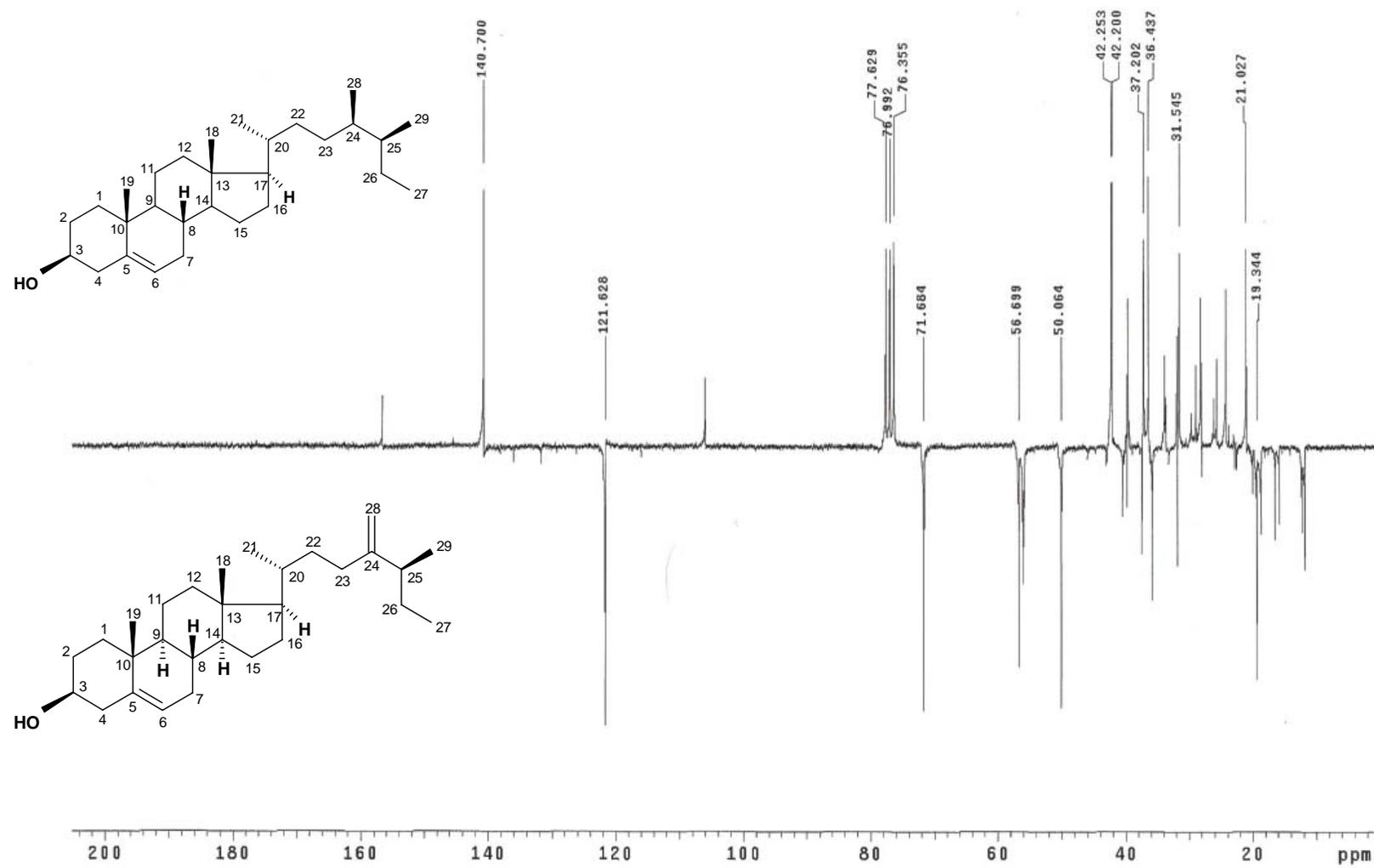


FIGURA 36. Espectro de RMN de <sup>13</sup>C-APT de Af-2a e Af-2b (CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz)

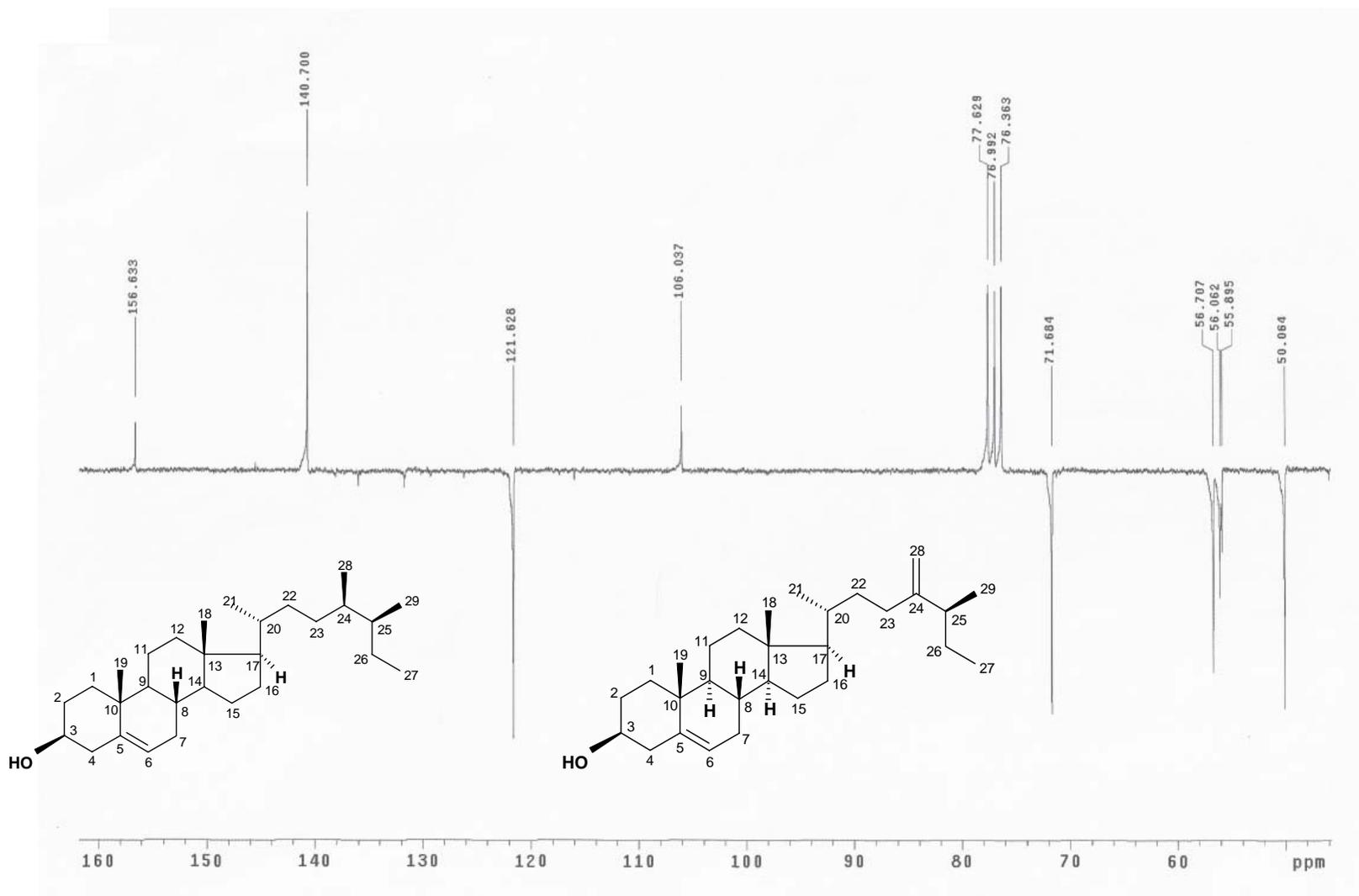


FIGURA 37. Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT na região de 50-160 de Af-2a e Af-2b ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)

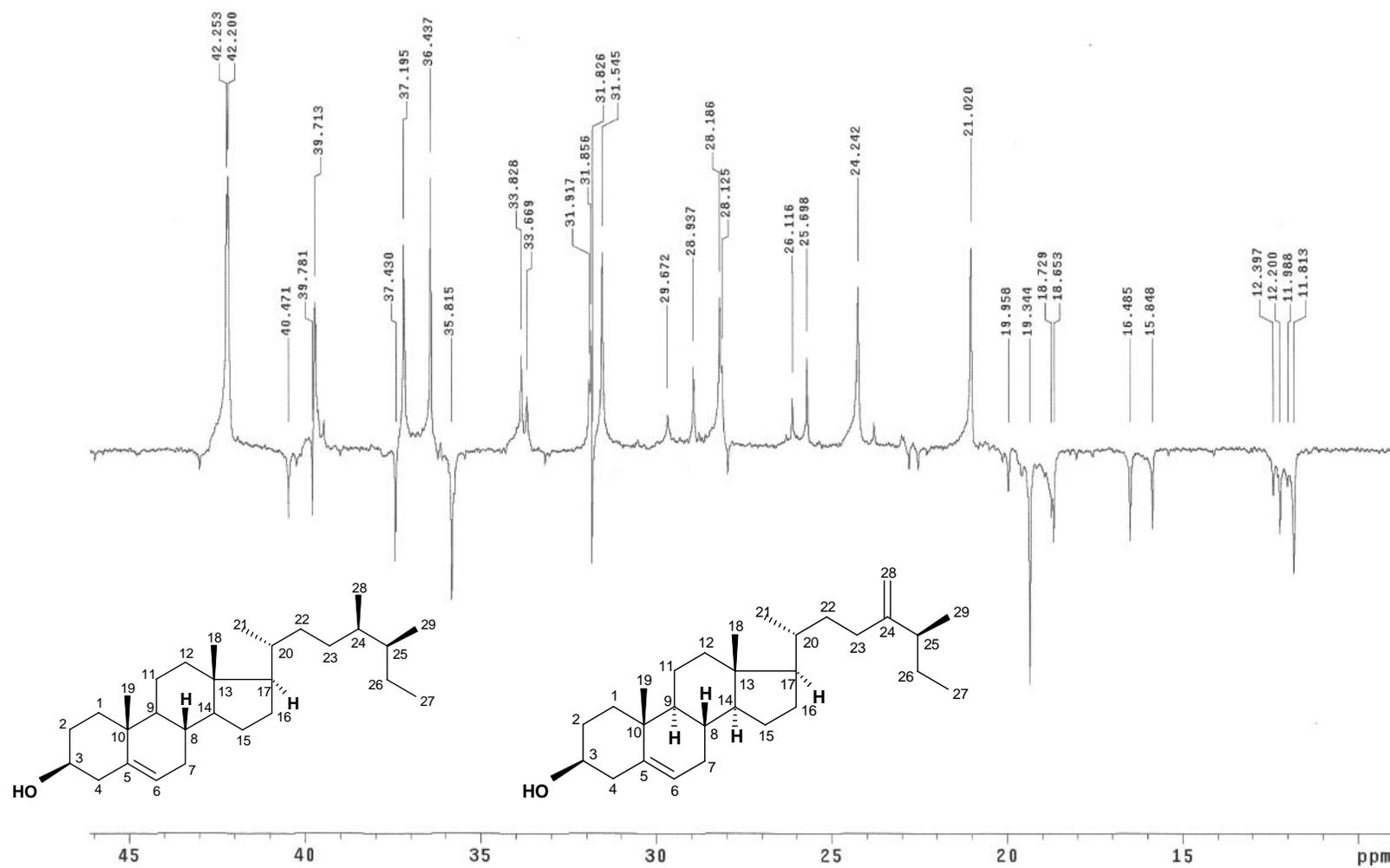
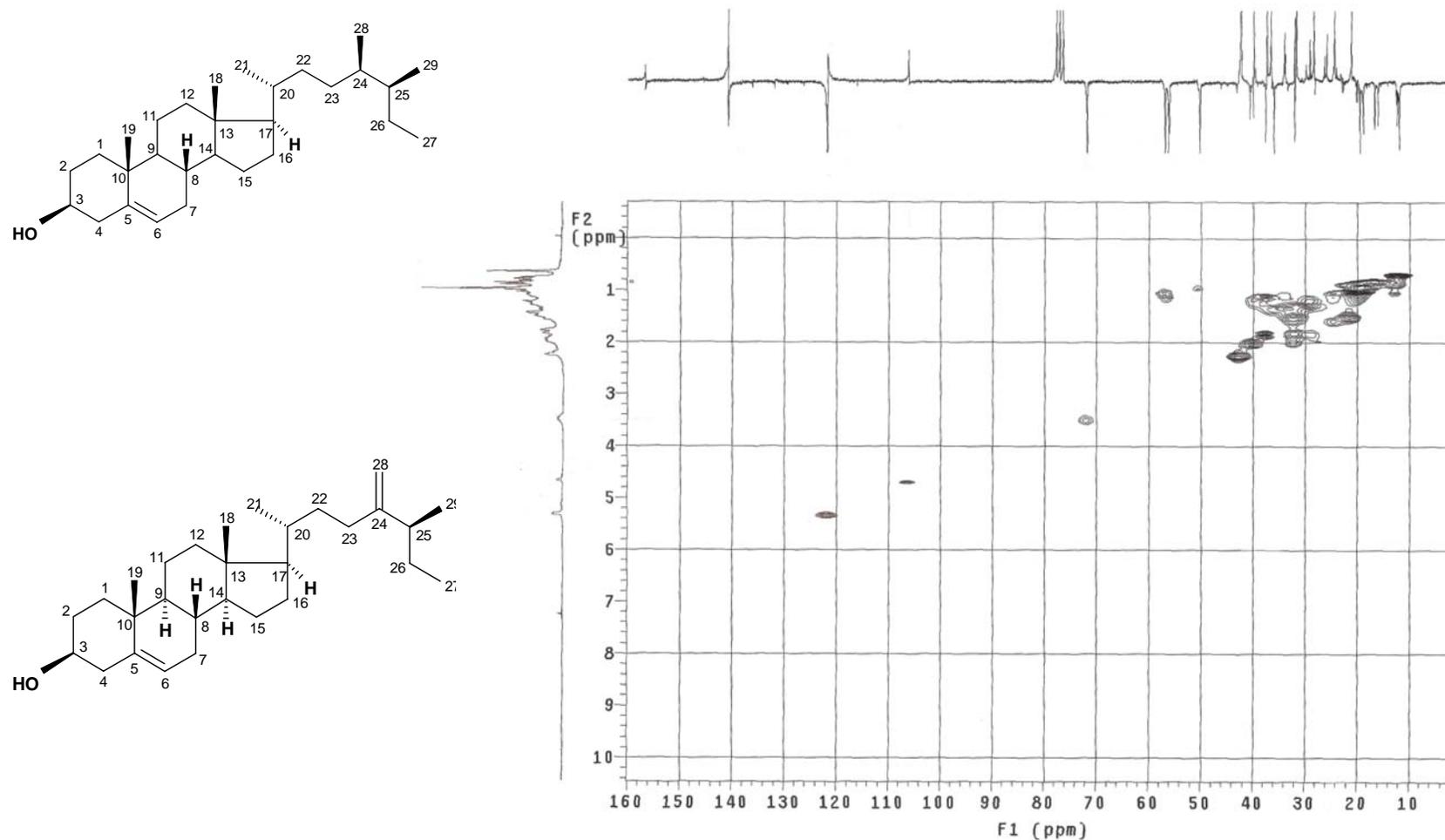
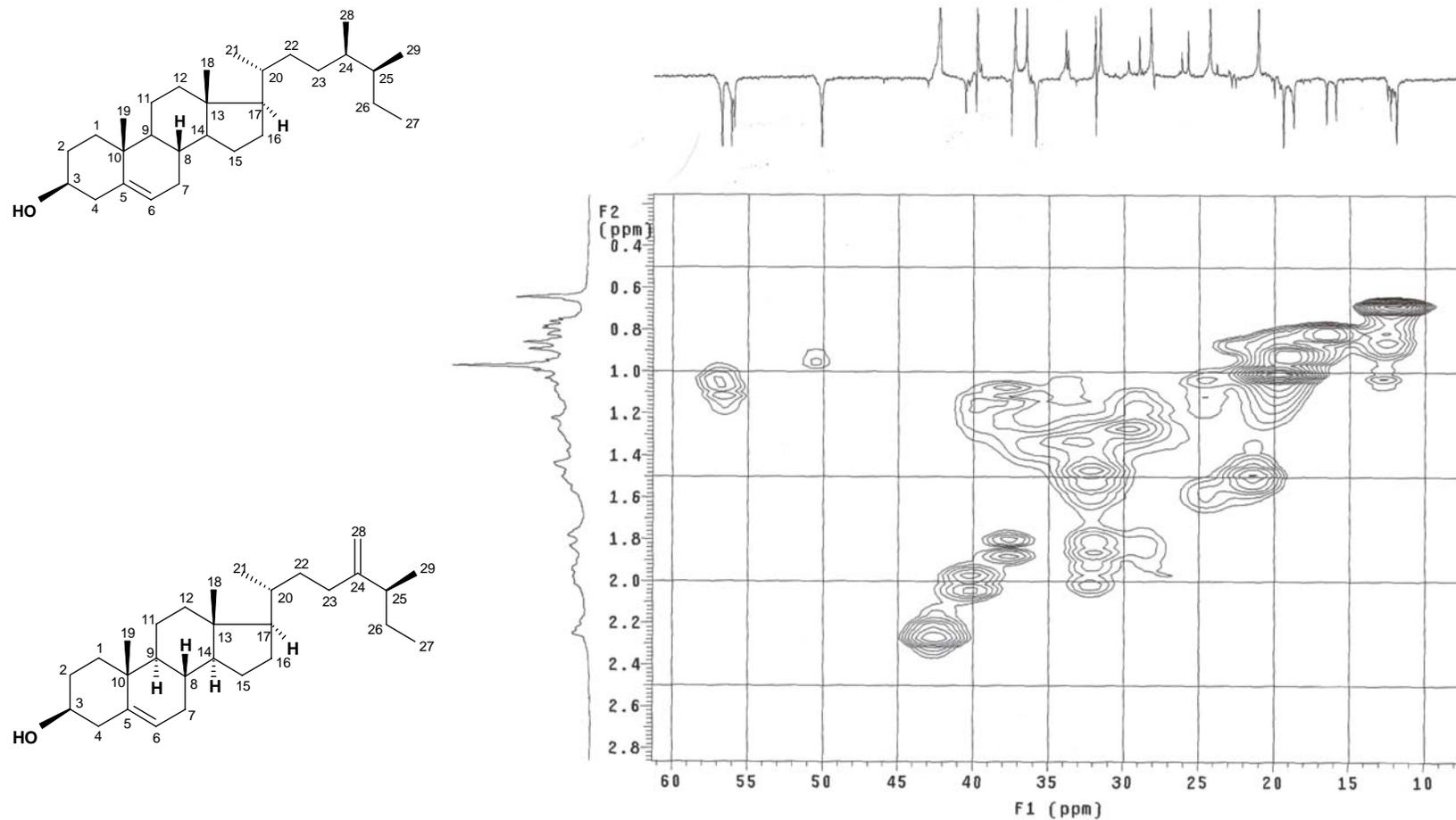


FIGURA 38. Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ -APT na região de 11-45 de Af-2a e Af-2b ( $\text{CDCl}_3$ , 50 MHz)



**FIGURA 39.** Espectro de correlação de <sup>1</sup>H x <sup>13</sup>C-HMQC de Af-2a e Af-2b (CDCl<sub>3</sub>, 200 e 50 MHz, respectivamente)



**FIGURA 40.** Expansão do espectro de correlação de  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMQC na região de 0,4-2,8 x 10-60 de Af-2a e Af-2b ( $\text{CDCl}_3$ , 200 e 500 MHz, respectivamente)

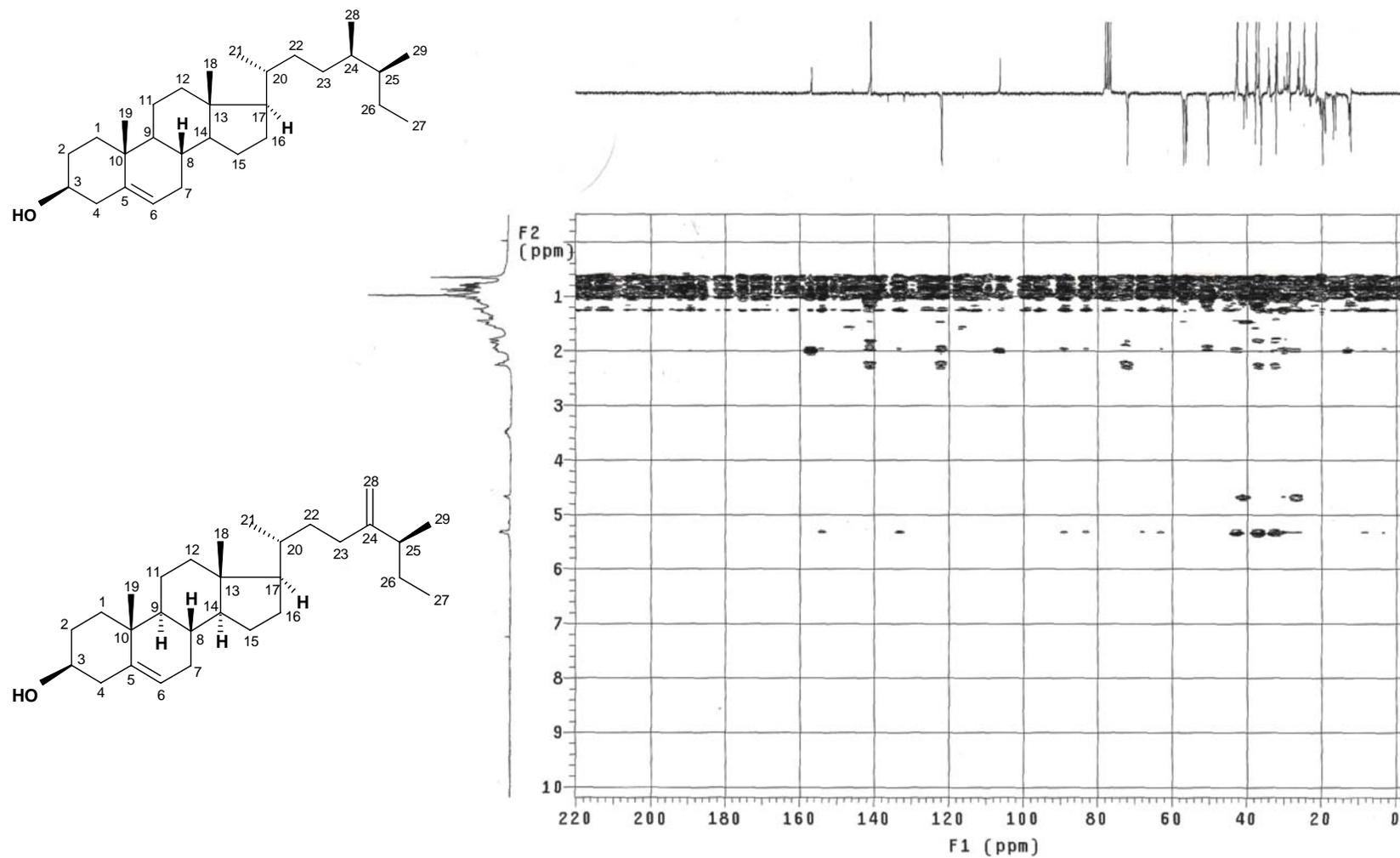
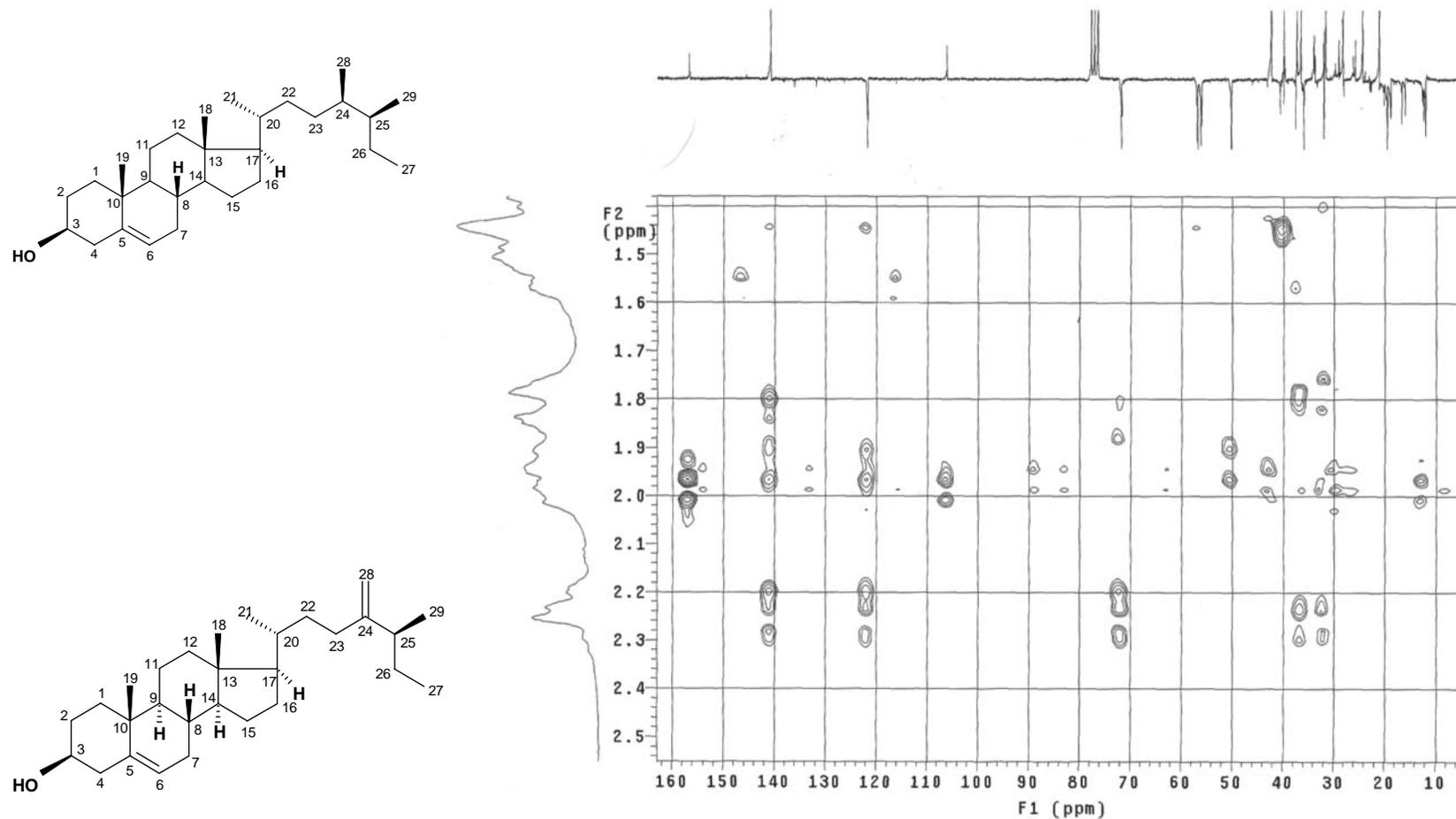
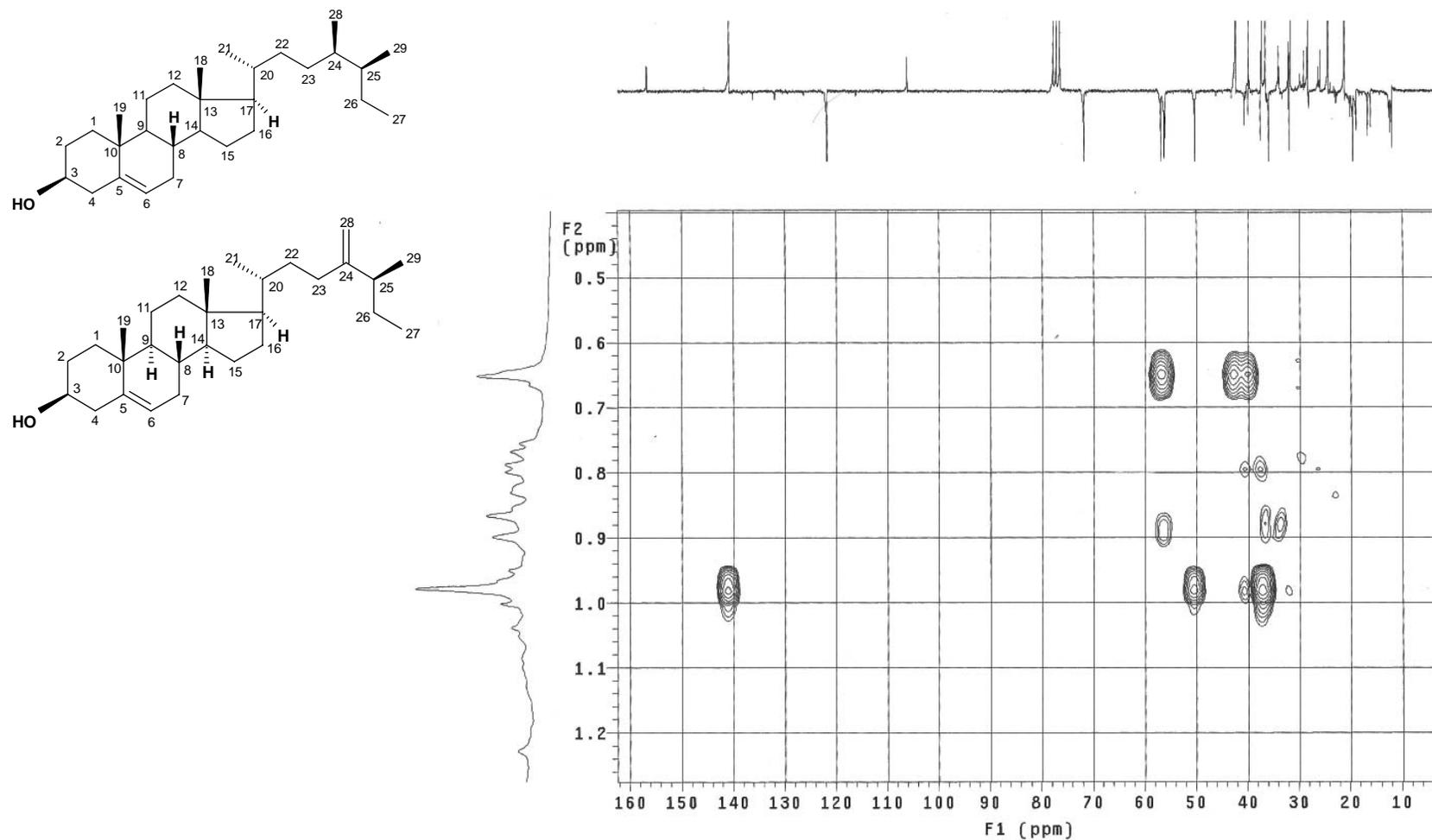


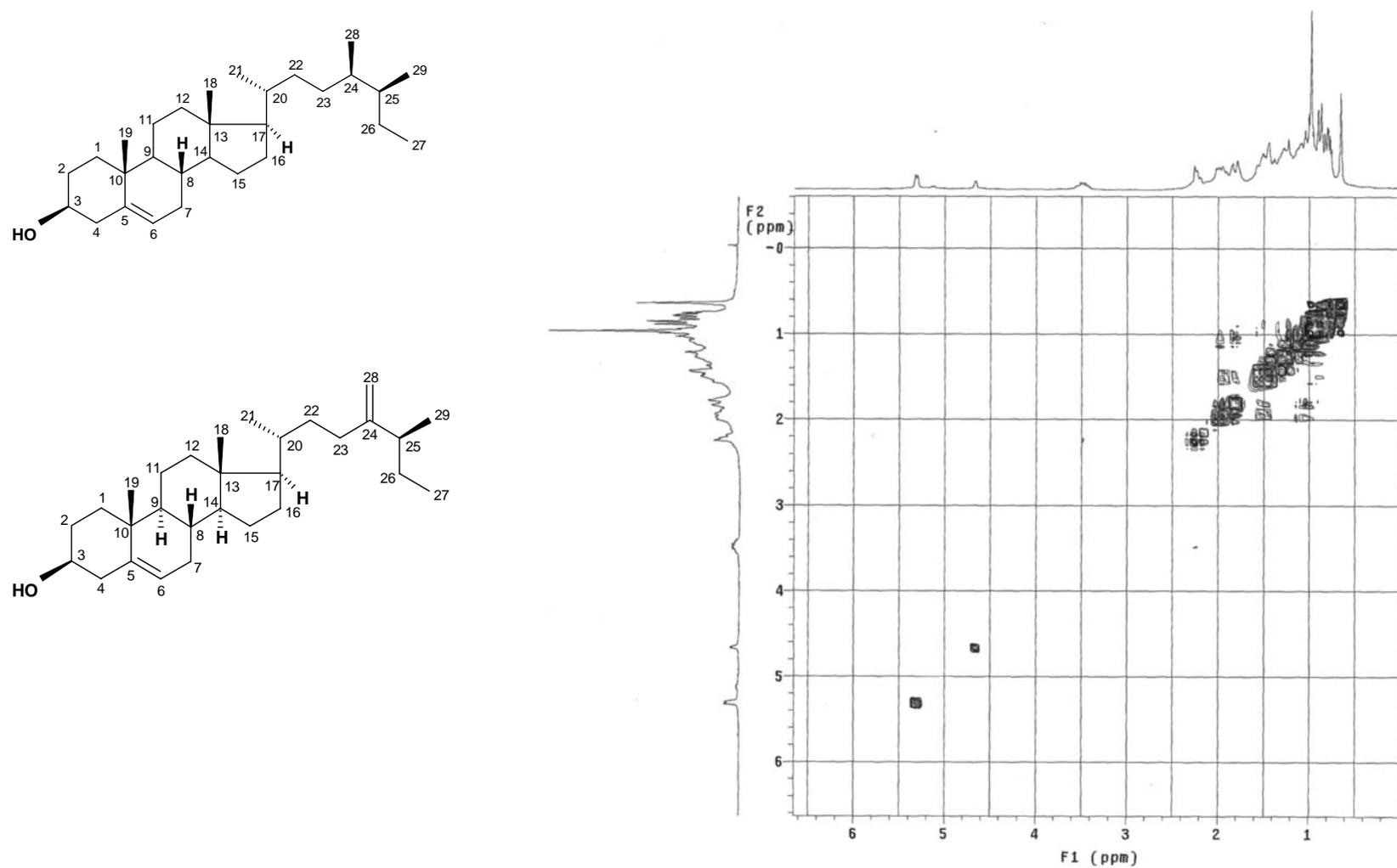
FIGURA 41. Espectro de correlação de  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC de Af-2a e Af-2b ( $\text{CDCl}_3$ , 200 e 50 MHz, respectivamente)



**FIGURA 42.** Expansão do espectro de correlação de  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ -HMBC na região de 1,5-2,5 x 10-160 de Af-2a e Af-2b ( $\text{CDCl}_3$ , 200 e 50 MHz, respectivamente)



**FIGURA 43.** Expansão do espectro de correlação de <sup>1</sup>H x <sup>13</sup>C-HMBC na região de 0,5-1,2 x 100-160 de Af-2a e Af-2b (CDCl<sub>3</sub>, 200 e 50 MHz, respectivamente)



**FIGURA 44.** Espectro de correlação de  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de Af-2a e Af-2b ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)

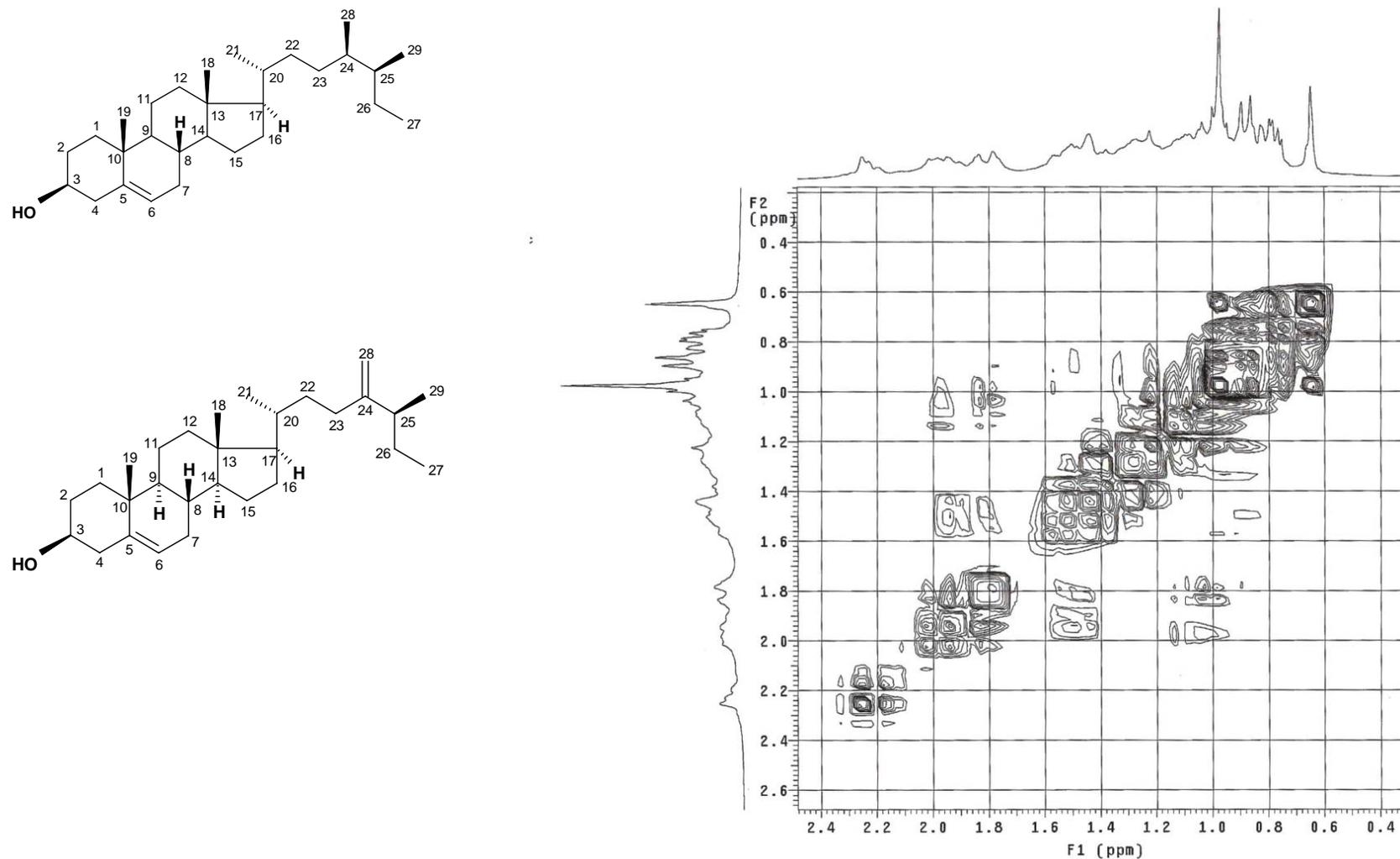
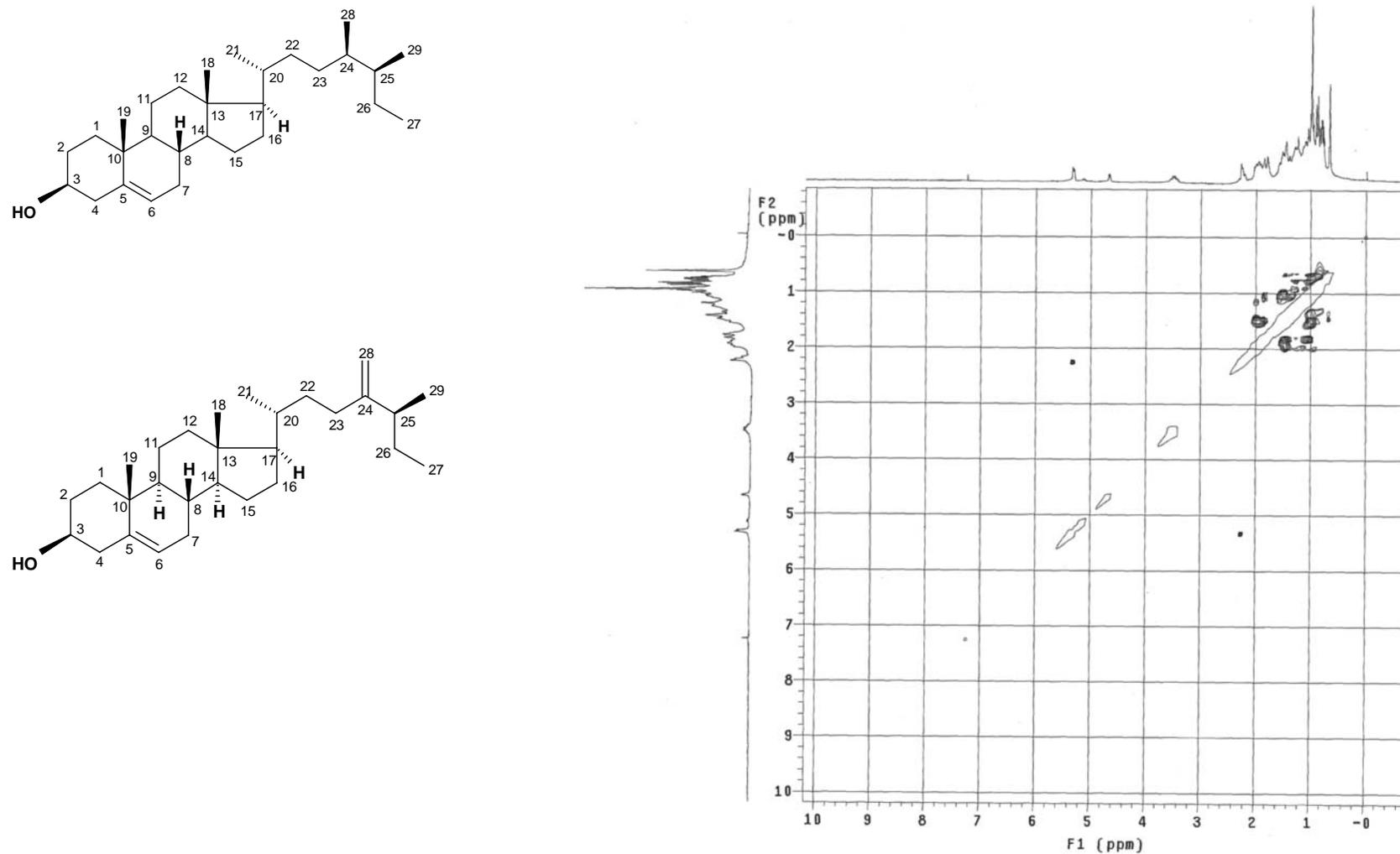


FIGURA 45. Expansão do espectro de correlação de  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -COSY de Af-2a e Af-2b ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)



**FIGURA 46.** Espectro de correlação espacial  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -NOESY de Af-2a e Af-2b ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)

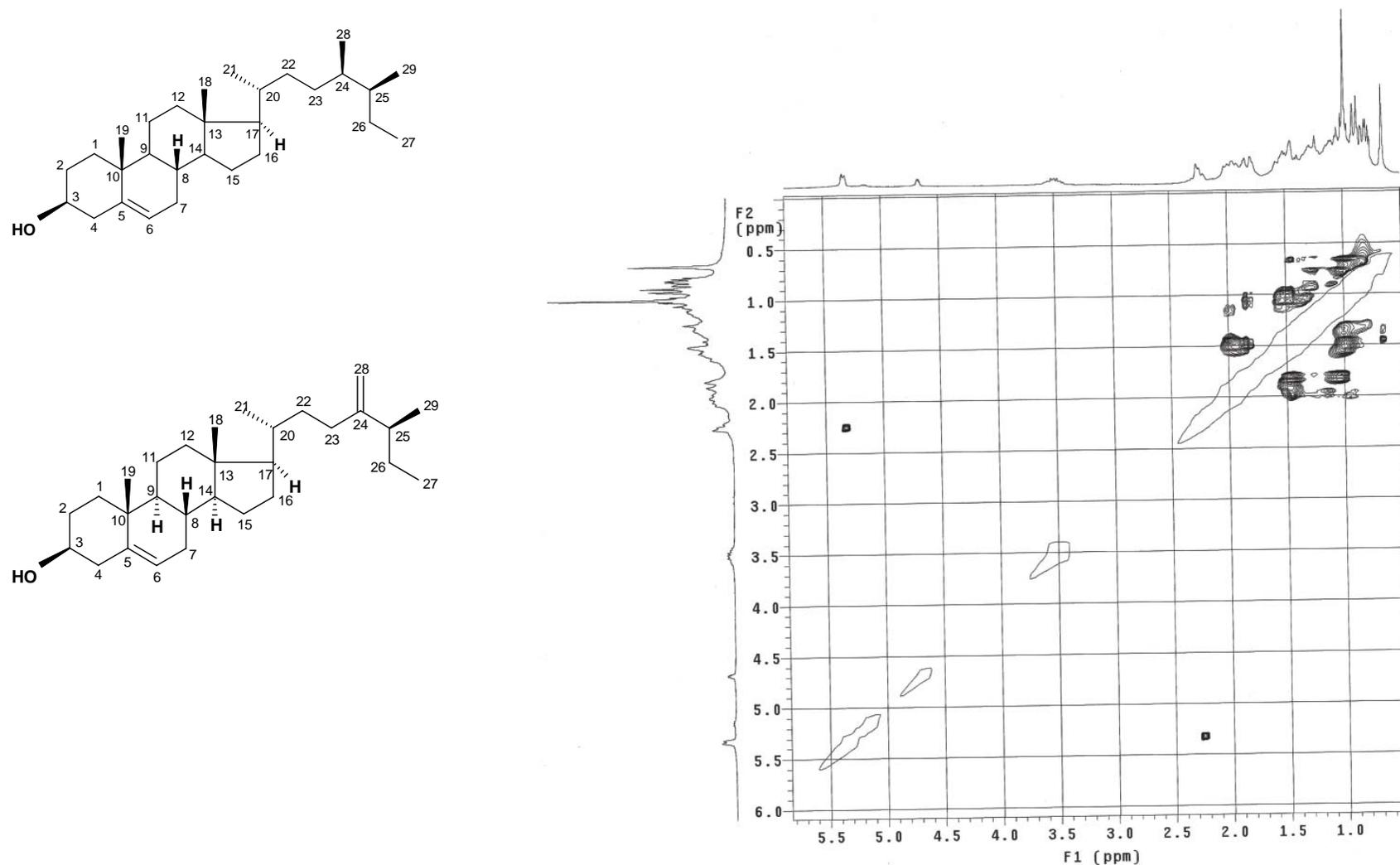
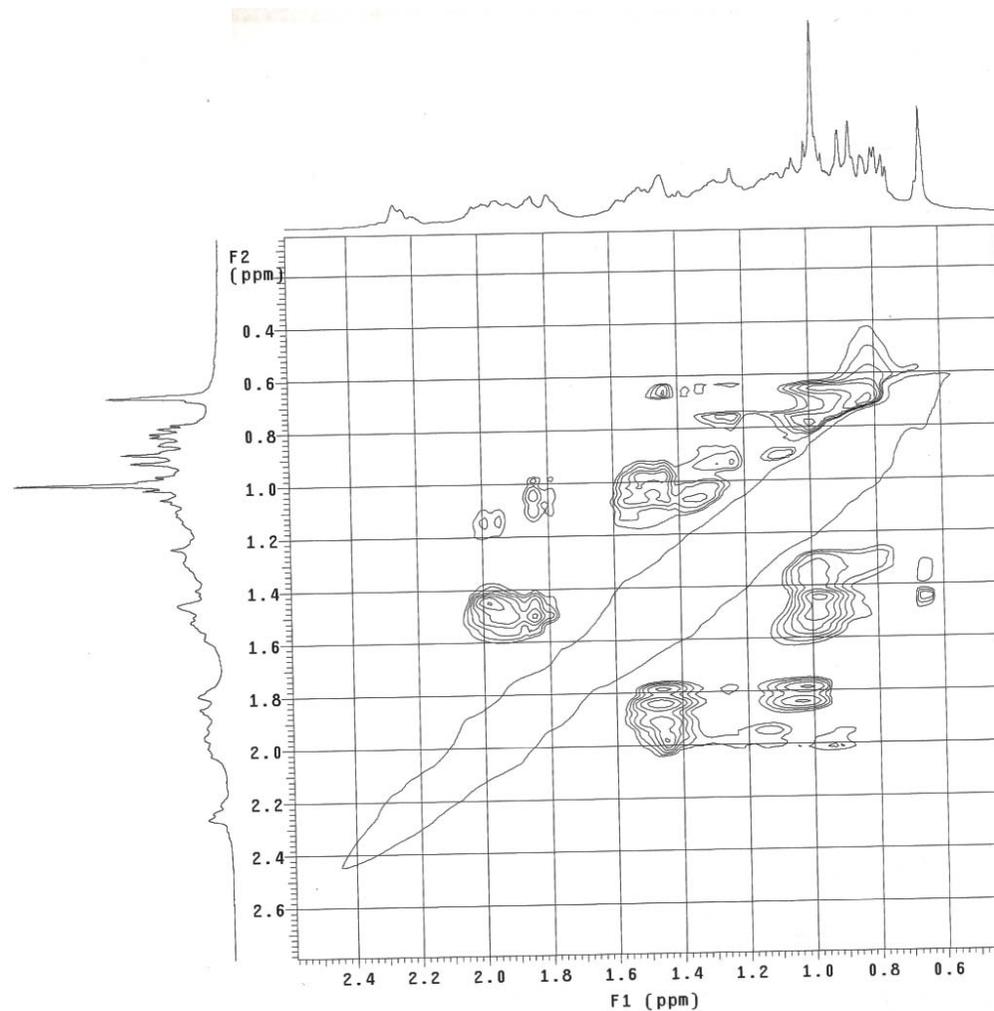
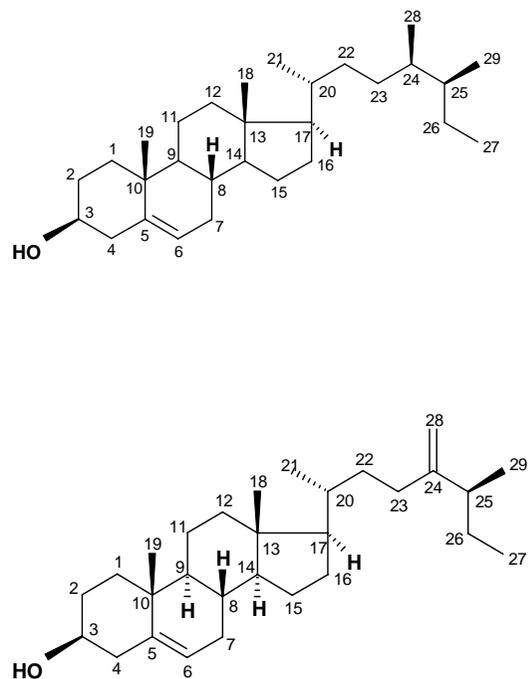


FIGURA 47. Expansão do espectro de correlação espacial  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -NOESY na região de 0,5-6 x 1-5,5 de Af-2a e Af-2b ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)



**FIGURA 48.** Expansão do espectro de correlação espacial  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ -NOESY na região de 0,4-2,6 x 0,6-2,4 de Af-2a e Af-2b ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz)

### 5.3. Teste de Atividade Biológica

#### 5.3.1. Avaliação da Atividade antimicrobiana do EEB da Esponja *Aplysina fistularis*

O extrato etanólico bruto da esponja marinha *Aplysina fistularis* foi testado contra oito microorganismos patogênicos, sendo quatro cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923), *S. aureus* (ATCC-13150), *S. epidermidis* (ATCC-12228), bactérias Gram-positivas e *Escherichia coli* (ATCC-11105), bactéria Gram-negativa; e quatro cepas fúngicas: *Candida albicans* (ATCC-13803), *C. albicans* (ATCC-76615), fungos leveduriformes, *Trichophyton rubrum* (ATCC-1683) e *Aspergillus flavus* (LM-247), fungos filamentosos, através do método de difusão em meio sólido.

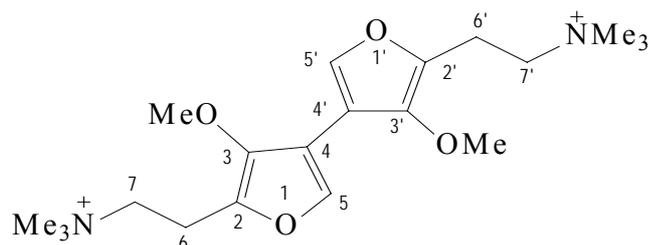
Os resultados dos ensaios de atividade antimicrobiana do EEB, não apresentaram atividade inibitória sobre o crescimento das espécies bacterianas e fúngicas testadas. Houve crescimento dos microorganismos por toda a superfície do meio (similar ao controle de crescimento microbiano) e ausência de halos de inibição quando comparados aos controles cloranfenicol (18 mm) e cetoconazol (20 mm).



## **6. CONSTANTES FÍSICAS E DADOS ESPECTROMÉTRICOS DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS**

## 6. Constantes Físicas e Dados Espectrométricos das Substâncias Isoladas

### 6.1. Af-1: Identificada como Aplysfistularina



**Nome químico:** 2-(3-metoxi-4-(3'-metoxi-2'-(trimetilamônio) etil) furan-2'-il)- furan-2-il)-N,N,N-trimetiletilamônio.

**F.M.:** C<sub>20</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>

**P.M.:** 366 u.m.a

**Ponto de fusão:** Não foi possível determinar

**Aspecto:** Sólido amarelo amorfo

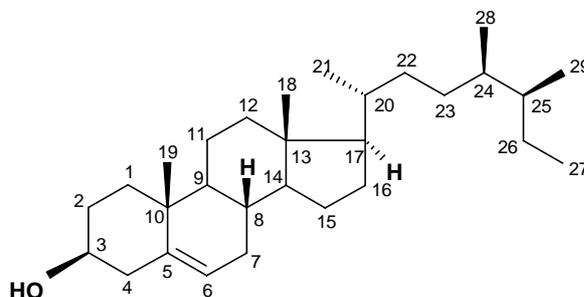
**Solubilidade:** Metanol

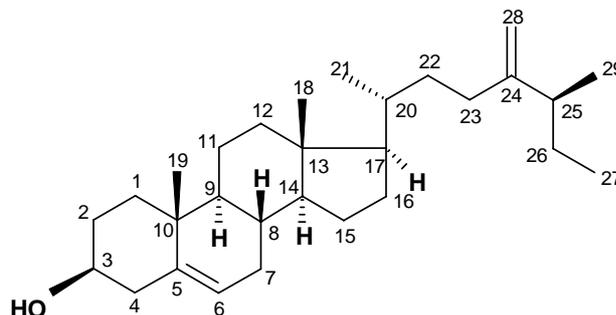
**Espectrometria na região do IV; KBr (cm<sup>-1</sup>):** 3003, 2976, 2938, 2862, 2816 cm<sup>-1</sup>, 2335 1300-1100, 1259, 1440-1600 cm<sup>-1</sup>, 3426 cm<sup>-1</sup>

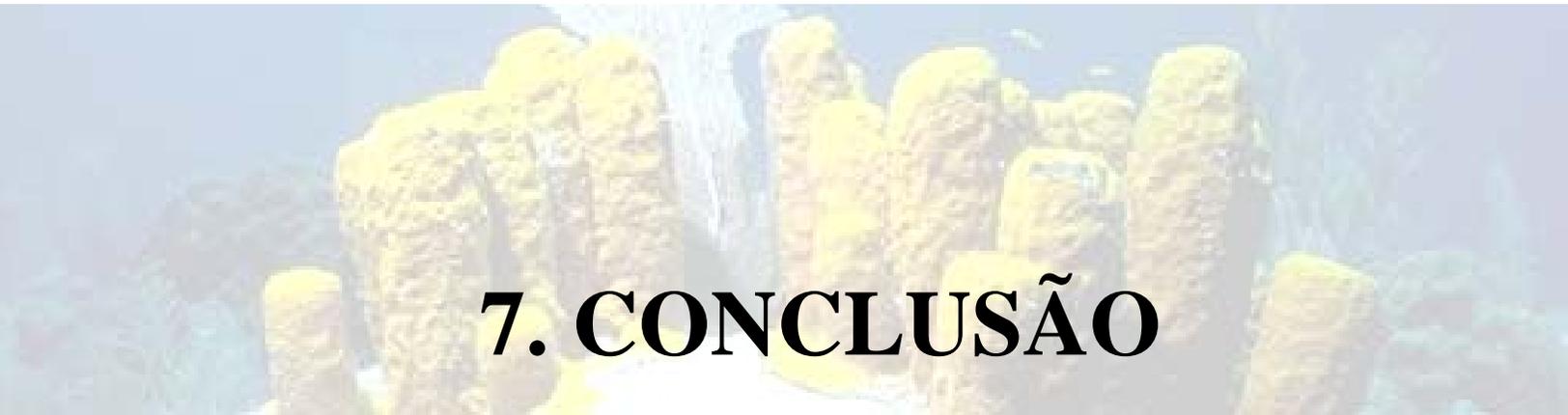
**Espectrometria de RMN de <sup>1</sup>H ( 500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ<sub>H</sub> 7,64 (*s*, CH-5/5'); 3,12 (*m*, CH<sub>2</sub>-6/6'); 3,58 (*m*, CH<sub>2</sub>-7/7'); 3,23 (*s*, MeN<sup>+</sup>); 3,85 (*s*, MeO)

**Espectrometria de RMN de <sup>13</sup>C ( 125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):** δ<sub>C</sub> 136,32 (C-2/2'); 154,90 (C-3/3'); 119,38 (C-4/4'); 134,80 (C-5/5'); 28,98 (C-6/6'); 67,80 (C-7/7'); 53,96 (Me<sub>3</sub>N<sup>+</sup>); 53,93 (Me<sub>3</sub>N<sup>+</sup>); 53,91 (Me<sub>3</sub>N<sup>+</sup>); 61,35 (MeO)

**Espectrometria de Massa (Electrospray - ESMS):** *m/z* 183 (ausente); *m/z* 354; *m/z* 294; *m/z* 279; *m/z* 351; *m/z* 293; *m/z* 278; *m/z* 350; *m/z* 290; *m/z* 296

**6.2. Af-2a:** Identificada como Aplysterol**F.M.:** C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O**P.M.:** 414 u.m.a**Aspecto:** Sólido branco amorfo**Solubilidade:** Clorofórmio**Espectrometria de RMN de <sup>1</sup>H ( 200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ<sub>H</sub> 3,48 (*m*, CH-3); 5,31 (*d*, *J* = 4,8 Hz, CH-6); 0,93 (*m*, CH-8); 1,94 (*m*, CH-25); 2,24 (*d*, *J* = 4,1 Hz, CH-2/4); 1,97 (*m*, CH<sub>2</sub>-7); 1,43 (*m*, CH<sub>2</sub>-11); 0,89 (*d*, *J* = 6,4 Hz, CH-6); 0,64 (*s*, CH<sub>3</sub>-18); 0,97 (*s*, CH<sub>3</sub>-19); 0,86 (*d*, CH<sub>3</sub>-21); 0,79 (*d*, *J* = 4 Hz, CH<sub>3</sub>-27)**Espectrometria de RMN de <sup>13</sup>C ( 50 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ<sub>C</sub> 140,70 (C-5); 36,44 (C-10); 42,26 (C-13); 71,69 (CH-3); 121,63 (CH-6); 31,83 (CH-8); 50,07 (CH-9); 56,70 (CH-14); 56,07 (CH-17); 35,82 (CH-20); 37,43 (CH-24); 39,78 (CH-25); 37,20 (CH<sub>2</sub>-1); 31,86 (CH<sub>2</sub>-2); 42,20 (CH<sub>2</sub>-4); 31,92 (CH<sub>2</sub>-7); 21,02 (CH<sub>2</sub>-11); 39,72 (CH<sub>2</sub>-12); 24,24 (CH<sub>2</sub>-15); 28,19 (CH<sub>2</sub>-16); 33,83 (CH<sub>2</sub>-22); 28,94 (CH<sub>2</sub>-23); 25,70 (CH<sub>2</sub>-26); 11,99 (CH<sub>3</sub>-18); 19,35 (CH<sub>3</sub>-19); 18,66 (CH<sub>3</sub>-21); 15,85 (CH<sub>3</sub>-27); 16,49 (CH<sub>3</sub>-28); 12,20 (CH<sub>3</sub>-29)

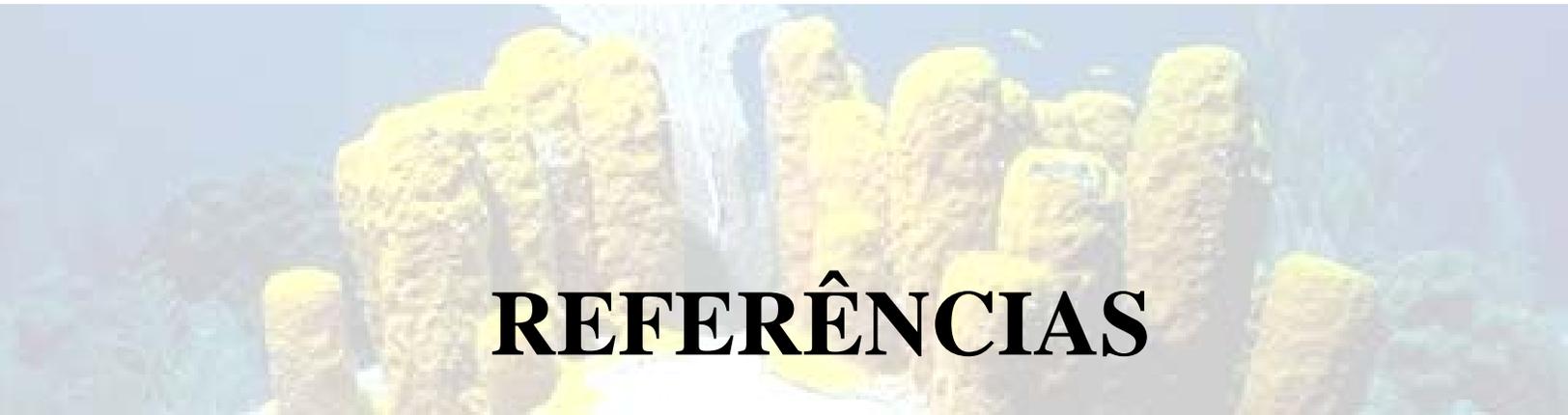
**6.3. Af-2b:** Identificada como 24,28-Didehidroaplysterol**F.M.:** C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>O**P.M.:** 412 u.m.a**Aspecto:** Sólido branco amorfo**Solubilidade:** Clorofórmio**Espectrometria de RMN de <sup>1</sup>H ( 200 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ<sub>H</sub> 3,48 (*m*, CH-3); 5,32 (*d*, *J* = 4,8 Hz, CH-6); 0,93 (*m*, CH-8); 1,94 (*m*, CH-25); 2,24 (*d*, *J* = 4 Hz, CH-2/4); 1,97 (*m*, CH<sub>2</sub>-7); 1,43 (*m*, CH<sub>2</sub>-11); 0,89 (*d*, *J* = 6,4 Hz, CH-6); 4,65 (*t*, *J* = 2 Hz, CH<sub>2</sub>-28) 0,64 (*s*, CH<sub>3</sub>-18); 0,97 (*s*, CH<sub>3</sub>-19); 0,86 (*d*, CH<sub>3</sub>-21); 0,79 (*d*, *J* = 4 Hz, CH<sub>3</sub>-27)**Espectrometria de RMN de <sup>13</sup>C ( 50 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ<sub>C</sub> 140,70 (C-5); 36,44 (C-10); 42,26 (C-13); 156,64 (C-24); 71,69 (CH-3); 121,63 (CH-6); 31,83 (CH-8); 50,07 (CH-9); 56,70 (CH-14); 56,07 (CH-17); 35,82 (CH-20); 39,78 (CH-25); 37,20 (CH<sub>2</sub>-1); 31,86 (CH<sub>2</sub>-2); 42,20 (CH<sub>2</sub>-4); 31,92 (CH<sub>2</sub>-7); 21,02 (CH<sub>2</sub>-11); 39,72 (CH<sub>2</sub>-12); 24,24 (CH<sub>2</sub>-15); 28,19 (CH<sub>2</sub>-16); 33,83 (CH<sub>2</sub>-22); 28,94 (CH<sub>2</sub>-23); 25,70 (CH<sub>2</sub>-26); 106,0(CH<sub>2</sub>-28); 11,99 (CH<sub>3</sub>-18); 19,35 (CH<sub>3</sub>-19); 18,66 (CH<sub>3</sub>-21); 15,85 (CH<sub>3</sub>-27); 12,20 (CH<sub>3</sub>-29)

An underwater photograph showing several tall, yellow, cylindrical sponges on a seabed. The water is clear and blue, with some green seaweed visible in the background. The sponges are the central focus of the image.

## **7. CONCLUSÃO**

## 7. CONCLUSÃO

- Através de métodos cromatográficos usuais, técnicas espectrométricas de massas e técnicas espectroscópicas de IV, RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  uni e bidimensionais em conjunto com os dados da literatura foi possível isolar e identificar três constituintes químicos das esponjas marinhas *Aplysina fistularis*: Um alcalóide quaternário (Aplysfistularina) e uma mistura de esteróides (Aplysterol e 24,28-Didehidroaplystetol).
- O alcalóide quaternário aplysfistularina está sendo descrito pela primeira vez na literatura, contribuindo assim, para o enriquecimento quimiotaxonômico da família Aplysinidae.
- A mistura de esteróides aplysterol e 24,28-didehidroaplysterol estão sendo descritas pela primeira vez na espécie *A. fistularis*.
- Os resultados dos ensaios de atividade antimicrobiana do EEB, não apresentaram atividade inibitória sobre o crescimento das espécies bacterianas e fúngicas testadas.
- Este trabalho é de grande importância no âmbito da química de Produtos Naturais por se tratar do primeiro estudo químico envolvendo a espécie marinha *Aplysina fistularis*, realizado pelo Laboratório de Tecnologia Farmacêutica – LTF, viabilizando uma nova linha de pesquisa. Assim, este trabalho deu uma contribuição ao estudo químico, antimicrobiano e antifúngico da esponja marinha *Aplysina fistularis*.

An underwater photograph showing several large, yellow, cylindrical sponges on a seabed. The water is clear and blue, and the sponges are the central focus of the image. The word 'REFERÊNCIAS' is overlaid in bold black text across the middle of the image.

# **REFERÊNCIAS**

**REFERÊNCIAS**

ACOSTA, A. L., RODRÍGUEZ, A. D. 11-oxoaerotherionin: a cytotoxic antitumor bromotyrosine-derived alkaloid from the caribbean marine sponge *Aplysina lacunose*. **Journal of Natural Products**. 55 (7): 1007-1012, 1992.

AIELLO, A., FATTORUSSO, E., MENNA, M., PANSINI, M. Chemistry of Verongida sponges. 5. Brominated metabolites from the Caribbean sponge *Pseudoceratina sp.* **Biochemical Systematics and Ecology**. 23: 377–381, 1995.

AIELLO, A., FATTORUSSO, E., MENNA, M. Steroids from sponges: Recent reports. **Steroids**. 64: 687–714, 1999.

ALMEIDA, J. R. G. S. **Avaliação química e biológica de espécies das famílias Annonaceae (*Duguetia gardneriana* Mart. e *Duguetia moricadiana* Mart.) e Fabaceae (*Diploptropis ferruginea* Benth. e *Bowdichia virgilidiana* Kunt.)** Tese defendida e aprovada no Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Laboratório de Tecnologia Farmacêutica “Prof. Delby Fernandes de Medeiros”/ UFPB- 2007.

ANDERSON, H. J., COLEMAN, J. E., ANDERSEN, R. J., ROBERGE, M. Cytotoxic peptides hemiasterlin, hemiasterlin A and hemiasterlin B induce mitotic arrest and abnormal spindle formation. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**. 39: 223–226, 1997.

ANG, K. K. H., HOLMES, M. J., KARA, U. A. K. Immunemediated parasite clearance in mice infected with *Plasmodium berghei* following treatment with manzamine A. **Parasitology Research**. 87: 715–721, 2001.

ANGERHOFER, C. K., PEZZUTO, J. M., KONIG, G. M., WRIGHT, A. D., STICHTER, O. Antimalarial activity of sesquiterpenes from the marine sponge *Acanthella klethra*. **Journal of Natural Products**. 55: 1787–1789, 1992.

AOKI, S., YOSHIOKA, Y., MIYAMOTO, Y., HIGUCHI, K., SETIAWAN, A., MURAKAMI, N., CHEN, Z-S., SUMIZAWA, T., AKIYAMA, S-I., KOBAYASHI, M. Agosterol A, a novel polyhydroxylated sterol acetate reversing multidrug resistance from a marine sponge *Spongia sp.* **Tetrahedron Letters**. 39: 6303–6306, 1998.

ARIMOTO, H., HAYAKAWA, I., KURAMOTO, M., UEMURA, D. Absolute stereochemistry of halichlorine; a potent inhibitor of VCAM-1 induction. **Tetrahedron Letters**. 39: 861–862, 1998.

ARVELO, F., PIÑA, I. C., MERENTES, E. 11-Deoxyfistularin-3, a New Cytotoxic Metabolite from the Caribbean Sponge *Aplysina fistularis insularis*. **Journal of Natural Products**. 6: 1443-1444, 1999.

BAI, R. L., PAULL, K. D., HERALD, C. L., MALSPEIS, L., PETTIT, G. R., HAMEL, E. Halichondrin B and homohalichondrin B, marine natural products binding in the vinca domain of tubulin: discovery of tubulin-based mechanism of action by analysis of differential cytotoxicity data. **Journal of Biological Chemistry**. 266: 15882–15889, 1991.

BAI, R., CICHACZ, Z. A., HERALD, C. L., PETTIT, G. R., HAMEL, E. Spongistatin 1, a highly cytotoxic, sponge-derived, marine natural product that inhibits mitosis, microtubule assembly, and the binding of vinblastine to tubulin. **Molecular Pharmacology**. 44: 757–766, 1993.

BAWER, A. W., KIRBY, W. M., SHERRIS, S. C., TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardezid single disk method. **The American Journal of Pathology**. 45: 493-496, 1966.

BECERRO, M. A., TURON, X., URIZ, M. J. Multiple functions for secondary metabolites in encrusting marine invertebrates. **Journal of Chemical Ecology**. 23: 1527-1547, 1997.

BENNET, C. F., MONG, S., CLARK, M. A., KRUSE, L. J., CROOKE, S. T. Differential effects of manoalide on secreted intracellular phospholipases. **Biochemical Pharmacology**. 36: 2079–2086, 1987.

BERGMANN, W., FEENEY, R. J. Contributions to the study of marine products, 32: the nucleosides of sponges, I. **Journal of Organic Chemistry**. 16, 981–987, 1951.

BERGQUIST, P. R., BEDFORD, J. J. The incidence of antibacterial activity in marine Demospongiae; systematic and geographic considerations. **Marine Biology**. 46 (3): 215-221, 1978.

BERLINCK, R. G. S., BRAEKMAN, J. C., DALOZE, D., BRUNO, I., RICCIO, R., FERRI, S., SPAMPINATO, S., SPERONI, E. Polycyclic guanidine alkaloids from the marine sponge *Crambe crambe* and Ca<sup>++</sup> channel blocker activity of crambescidin 816. **Journal of Natural Products**. 56: 1007–1015, 1993.

BETANCOURT-LOZANO, M., GONZÁLEZ-FARIAS, F., GONZÁLEZ-ACOSTA, B., GARCÍA-GASCA, A., BASTIDA-ZAVALA, J. R. Variation of antimicrobial activity of the sponge *Aplysina fistularis* (Pallas, 1766) and its relation to associated fauna. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 223: 1-18, 1998.

BLACKBURN, C. L., HOPMANN, C., SAKOWICZ, R., BERDELIS, M. S., GOLDSTEIN, L. S. B., FAULKNER, D. J. Adociasulfates 1–6, inhibitors of kinesin motor proteins from the sponge *Haliclona* (aka *Adocia*) sp. **Journal of Organic Chemistry**. 64: 5565–5570, 1999.

BORCHIPELLINI, C., CHOMBARD, C., LAFAY, B., BOURY-ESNAULT, N. Molecular systematics of sponges (Porifera). **Hydrobiologia**. 420: 15-27, 2000.

BOWMAN, E. J., GUSTAFSON, K. R., BOWMAN, B. J., BOYD, M. R. Identification of a new chondropsin class of antitumor compound that selectively inhibits V-ATPases. **Journal of Biological Chemistry**. 278: 44147–44152, 2003.

BRAMLEY, A. M., LANGLANDS, J. M., JONES, A. K., BURGOYNE, D. L., LI, Y., ANDERSEN, R. J., SALARI, H. Effects of IZP-94005 (contignasterol) on antigen-induced bronchial responsiveness in ovalbumin-sensitized guinea-pigs. **British Journal of Pharmacology**. 115: 1433–1438, 1995.

BUBB, M. R., SPECTOR, I., BERSHADSKY, A. D., KORN, E. D. Swinholid A is a microfilament disrupting marine toxin that stabilizes actin dimers and severs actin filaments. **Journal of Biological Chemistry**. 270: 3463–3466, 1995.

CANTRELL, C. L., GUSTAFSON, K. R., CECERE, M. R., PANNELL, L. K., BOYD, M. R. Chondropsins A and B: novel tumor cell growth-inhibitory macrolide lactams from the marine sponge *Chondropsis sp.* **Journal of the American Chemical Society**. 122: 8825–8829, 2000.

CARNEY, J. R., RINEHART, K. L. Biosynthesis of brominated tyrosine metabolites by *Aplysina fistularis*. **Journal of Natural Products**. 58: 971-985, 1995.

CARROLL, J., JOHNSON, E. N., EBEL, R., HARTMAN, M. S., HOLMAN, T. R., CREWS, P. Probing sponge-derived terpenoids for human 15-L-lipoxygenase inhibitors. **Journal of Organic Chemistry**. 66: 6847–6851, 2001.

CASAPULLO, A, MINALE, L., ZOLLO, F. New cytotoxic polyoxygenated steroids from the sponge *Dysidea incrustans*. **Tetrahedron Letters**. 36: 2669–2672, 1995.

CLEENLAND, R., SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials “in vitro” and in experimental animal infection. In: LORIAN, V. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. New York: Williams and Wilkins, 1991.

CIMINIELLO, P. CONSTANTINO, V., FATTORUSSO, E., MAGNO, S., MANGONI, A. Chemistry of Verongida sponges. 2. Constituents of the Caribbean sponge *Aplysina fistularis forma fulva*. **Journal of Natural Products**. 57: 705–712, 1994a.

CIMINIELLO, P. FATTORUSSO, E., MAGNO, S. Chemistry of Verongida sponges. 3. Constituents of a Caribbean Verongula sp. **Journal of Natural Products**. 57: 1564–1569, 1994b.

CIMINIELLO, P., FATTORUSSO, E., MAGNO, S., PANSINI, M. Chemistry of Verongida sponges. 4. Comparison of the secondary metabolite composition of several specimens of *Pseudoceratina crassa*. **Journal of Natural Products**. 58: 689–696, 1995.

CIMINIELLO, P., FATTORUSSO, E., MAGNO, S., PANSINI, M. Chemistry of Verongida sponges. 6. Comparison of the secondary metabolic composition of *Aplysina insularis* and *Aplysina fulva*. **Biochemical Systematics and Ecology** 24: 105–107, 1996a.

CIMINIELLO, P. DELL' AVERSANO, C., FATTORUSSO, E., MAGNO, S. Chemistry of Verongida sponges. 7. Bromocompounds from the Caribbean sponge *Aplysina archeri*. **Tetrahedron**. 52: 9863–9868, 1996b.

CIMINIELLO, P., FATTORUSSO, E., FORINO, M., MAGNO, S. Chemistry of Verongida sponges. 8. Bromocompounds from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. **Tetrahedron**. 53: 6565–6572, 1997.

CIMINIELLO, P., DELL' AVERSANO, C., FATTORUSSO, E., MAGNO, S., PANSINI, M. Chemistry of Verongida sponges. 9. Secondary metabolite composition of the Caribbean sponge *Aplysina cauliformis*. **Journal of Natural Products**. 62: 590–593, 1999.

CIMINIELLO, P., DELL' AVERSANO, C., FATTORUSSO, E., MAGNO, S., PANSINI, M. Chemistry of Verongida sponges. 10. Secondary metabolite composition of the Caribbean sponge *Verongula gigantea*. **Journal of Natural Products**. 63: 263–266, 2000.

CIMINO, G., DE STEFANO, S., MINALE, L., FATTORUSSO, E. Ircinin 1 and 2, linear sesterterpenes from the marine sponge *Ircinia oros*. **Tetrahedron**. 28: 333–341, 1972.

COMPAGNONE, R. S., AVILA, R., SUÁREZ, A. I., ABRAMS, O. V., RANGEL, H. R.,

CORDELL, G. A., QUINN-BEATTIE, M. L., FARNSWORTH, N. R. The Potential of Alkaloids in drug Discovery. **Phytherapy Research**. 15: 183-205, 2001.

COSTANTINO, V., FATTORUSSO, E., MANGONI, A., DI ROSA, M., IANARO, A. Glycolipids from sponges, VII: simplexides, novel immunosuppressive glycolipids from the Caribbean sponge *Plakortis simplex*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**. 9: 271–276, 1999.

COUE, M., BRENNER, S. L., SPECTOR, I., KORN, E. D. Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. **FEBS Letters**. 213: 316–318, 1987.

CUTIGNANO, A., BIFULCO, G., BRUNO, I., CASAPULLO, A., GOMEZ-PALOMA, L., RICCIO, R. Dragmacidin F: a new antiviral bromoindole alkaloid from the Mediterranean sponge *Halicortex sp.* **Tetrahedron**. 56: 3743–3748, 2000.

D'AMBROSIO, M., GUERRIERO, A., DEBITUS, C., PIETRA, F. Leucascandrolide A, a new type of macrolide: the first powerfully bioactive metabolite of calcareous sponges (*Leucascandra caveolata*, a new genus from the coral sea). **Helvetica Chimica Acta**. 79: 51–60, 1996.

D'AMBROSIO, M., GUERRIERO, A., DEHARO, E., DEBITUS, C., MUNOZ, V., PIETRA, F. New types of potentially antimalarial agents: epidioxy-substituted norditerpene and norsesterpenes from the marine sponge *Diacarnuslevii*. **Helvetica Chimica Acta**. 81: 1285–1292, 1998.

DE CARVALHO, M. S., JACOBS, R. S. Two-step inactivation of bee venom phospholipase A<sup>2</sup> by scalaradial. **Biochemical Pharmacology**. 42: 1621–1626, 1991.

DE GUZMAN, F. S., CARTE, B., TROUPE, N., FAULKNER, D. J., HARPER, M. K., CONCEPTION, G. P., MANGALINDAN, G. C., MATSUMOTO, S. S., BARROWS, L. R., IRELAND, C. M. Neoamphimedine: a new pyridoacridine topoisomerase II inhibitor which catenates DNA. **Jornal of Organic Chemistry**. 64:1400–1402, 1999.

DE LUCA, P., DE ROSA, M., MINALE, L., SODANO, G. Marine sterols with a new pattern of side-chain alkylation from the sponge *Aplysina* (=Verongida) *aerophoba*. **Journal of Chemistry Society Perkins Transactions I.** 2132-2135, 1972.

DE MARINO, S., IORIZZI, M., ZOLLO, F., DEBITUS, C., MENOUE, J. L., OSPINA, L. F., ALCARAZ, M. J., PAYA, M. New pyridinium alkaloids from a marine sponge of the genus *Spongia* with a human phospholipase A2 inhibitor profile. **Journal of Natural Products.** 63: 322–326, 2000.

DE SMET, P., PARYS, J. B., CALLEWAERT, G., WEIDEMA, A. F., HILL, E., DE SMEDT, H., ERNEUX, C., SORRENTINO, V., MISSIAEN, L. Xestospongins C is an equally potent inhibitor of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor and the endoplasmic-reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  pumps. **Cell Calcium.** 26: 9–13, 1999.

DJERASSI, C., SILVA, C. J. Sponge Sterols: Origin and Biosynthesis. **Accounts of Chemical Research.** 24: 371-378, 1991.

DUNBAR, D. C., RIMOLDI, J. M., CLARK, A. M., KELLY, M., HAMANN, M. T. Anti-cryptococcal and nitric oxide synthase inhibitory imidazole alkaloids from the calcareous sponge *Leucetta cf. chagosensis*. **Tetrahedron.** 56: 8795–8798, 2000.

EBEL, R., BREZINGER, M., KUNZE, A., GROSS, H. J., PROKSCH, P. Wound activation of protoxins in marine sponge *Aplysina aerophoba*. **Journal of Chemical Ecology.** 23: 1451-1462, 1997.

ENGEL, S., JENSEN, P. R., FENICAL, W. Chemical ecology of marine microbial defense. **Journal of Chemical Ecology.** 28: 1971–1985, 2002.

ERICKSON, K. L., BEUTLER, J. A., CARDELLINA, J. H. II, BOYD, M. R. Salicylilalamides A and B, novel cytotoxic macrolides from the marine sponge *Haliclona sp.* **Journal of Organic Chemistry.** 62: 8188–8192, 1997.

ERPENBACK, D., VAN SOEST, R. W. M. Status and perspective of sponge chemosystematics. **Marine Biotechnology**. 9: 2-19, 2006.

FAHEY, J. W., ZALCMANN, A. T., TALALAY, P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. **Phytochemistry**. 56: 5–51, 2001.

FATTORUSSO, E., TAGLIALATELA-SCAFATI, O. Two novel pyrrole-imidazole alkaloids from the Mediterranean sponge *Agelas oroides*. **Tetrahedron Letters**. 41: 9917–9922, 2000.

FEDOREEV, S. A., PROKOFEVA, N. G., DENISENKO, V. A., REBACHUK, N. M. Cytotoxic activity of aaptamines from suberitid marine sponges. **Pharmaceutical Chemistry Journal**. 22: 615–618, 1989.

FENICAL, W. Halogenation in the Rhodophyta, a review. **Journal of Phycology**. 11: 245-259, 1975.

FORD, P. W., GUSTAFSON, K. R., McKEE, T. C., SHIGEMATSU, N., MAURIZI, L. K., PANNELL, L. K., WILLIAMS, D. E., DE SILVA, E. D., LASSOTA, P., ALIEN, T. M., VAN SOEST, R., ANDERSEN, R. J., BOYD, M. R. Papuamides A–D, HIV-inhibitory and cytotoxic depsipeptides from the sponges *Theonella mirabilis* and *Theonella swinhoei* collected in Papua New Guinea. **Journal of the American Chemical Society**. 121: 5899–5909, 1999.

FUSETANI, N., TAKAHASHI, M., MATSUNAGA, S. Topsentiasterol sulfates, antimicrobial sterol sulfates possessing novel side chains, from a marine sponge, *Topsentia* sp. **Tetrahedron**. 50: 7765–7770, 1994.

FUSETANI, N., YASUMURO, K., MATSUNAGA, S., HASHIMOTO, K. Mycalolides A–C, hybrid macrolides of ulapualides and halichondramide, from a sponge of the genus *Mycale*. **Tetrahedron Letters**. 30: 2809-2812, 1989.

GARCIA PASTOR, P., DE ROSA, S., DE GIULIO, A., PAYÁ, M., ALCARAZ, M. J. Modulation of acute and chronic inflammatory processes by cacospongionolide B, a novel inhibitor of human synovial phospholipase A<sub>2</sub>. **British Journal of Pharmacology**. 126: 301–311, 1999.

GIANNINI, C., DEBITUS, C., POSADAS, I., PAYA, M., D'AURIA, M. V. Dysidotronic acid, a new and selective human phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from the sponge *Dysidea* sp. **Tetrahedron Lett.** 41: 3257–3260, 2000.

GLEADOW, R. M., WOODROW, I. E. Constraints on effectiveness of cyanogenic glycosides in herbivore defense. **Journal of Chemical Ecology**. 28: 1301–1313, 2002.

GOPICHAND, Y., SCHMITZ, F. J. Marine natural products: Fistularin-1, -2, and -3 from the sponge *Aplysina fistularis forma fulva*. **Tetrahedron Letters**. 41: 3921-3924, 1979.

HADACECK, F., GREEGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analysis**: 11: 137-147, 2000.

HAMMERSTROM, K., DETHIER, M. N., DUGGINS, D. O. Rapid phlorotannin induction and relaxation in five Washington kelps. **Marine Ecology Progress Series** 165: 293–305, 1998.

HATTORI, T., ADACHI, K., SHIZURI, Y. New ceramide from marine sponge *Haliclona koremella* and related compounds as antifouling substances against macroalgae. **Journal of Natural Products**. 61: 823–826, 1998.

HENRIQUES, A. T. LIMBERGER, R. P., KERBER, V. A., MORENO, P. R. H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5<sup>a</sup> ed. rev. ampl. Editora da UFSC, 2004.

HIGGS, M. D., FAULKNER, D. J. Plakortin, an antibiotic from *Plakortis halichondrioides*. **The Journal of Organic Chemistry**. 43 (18): 3454-3457, 1978.

HIRATA, Y., UEMURA, D. Halichondrins – antitumor polyether macrolides from a marine sponge. **Pure and Applied Chemistry**. 58: 701–710, 1986.

HIROTA, H., TOMONO, Y., FUSETANI, N. Terpenoids with antifouling activity against barnacle larvae from the marine sponge *Acanthella cavernosa*. **Tetrahedron**. 52: 2359–2368, 1996.

HIROTA, H., OKINO, T., YOSHIMURA, E., FUSETANI, N. Five new antifouling sesquiterpenes from two marine sponges of the genus *Axinyssa* and the nudibranch *Phyllidia pustulosa*. **Tetrahedron**. 54: 1397–1398, 1998.

HOLLAND, H. L., KUMARESAN, S., TAN, L., NJAR, V. C. O. Synthesis of 6-hydroximino-3-oxo steroids, a new class of aromatase inhibitor. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions**. 1: 585–587, 1992.

HOOD, K. A., WEST, L. M., ROUWÉ, B., NORTHOCOTE, P. T., BERRIDGE, M. V., WAKEFIELD, S. J., MILLER, J. H. Peloruside A, a novel antimetabolic agent with paclitaxel-like microtubule-stabilizing activity. **Cancer Research**. 62: 3356–3360, 2002.

HOOPER, J. Sponguide: Guide to sponge collection and identification, 2000.

ICHIBA, T., YOSHIDA, W. Y., SCHEUER, P. J., HIGA, T. Hennoxazoles, bioactive bisoxazoles from a marine sponge. **Journal of the American Chemistry Society**. 113: 3173–3174, 1991.

ISBRUCKER, R. A., CUMMINS, J., POMPONI, S. A., LONGLEY, R. E., WRIGHT, A. E. Tubulin polymerizing activity of dictyostatin 1, a polyketide of marine sponge origin. **Biochemical Pharmacology**. 66: 75–82, 2003.

JACOBS, R. S., KOEHN, F. E., GUNASEKERA, S. P. Topsentin, a unique phosphatase A<sup>2</sup> inhibitor (Abstract). Presented at the Japan–US Seminar on Bioorganic Marine Chemistry, 1994.

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

JUAGDAN, E. G., KALINDINDI, R. S., SCHEUER, P. J., KELLY-BORGES, M. Elenic acid, an inhibitor of topoisomerase II, from a sponge, *Plakinastrella* sp. **Tetrahedron Letters**. 36: 2905–2908, 1995.

KASHMAN, Y., GROWEISS, A., SHMUELI, U. Latruncutin, a new 2-thiazolidinone macrolide from the marine sponge *Latrunculia magnifica*. **Tetrahedron Letters**. 21: 3629–3632, 1980.

KATO, Y., FUSEYANI, N., MATSUNAGA, S., HASHIMOTO, K. Okinonellins A and B, two novel furanosesterterpenes, which inhibit cell division of fertilized starfish eggs, from the marine sponge *Spongionella* sp. **Experientia**. 42: 1299–1300, 1986.

KELECOM, A., KANNENGISSER, G. J., BAKER, P. M. Chemical constituents of *Verongida* sponges. III – Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance of Aplysterol and 24,28-Didehydroaplysterol. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 51 (4): 643-645, 1979.

KELMAN, D. Antimicrobial activity of sponges and corals. In: ROSENBERG, E. & LOYA, Y. **Coral Health and Disease**. Springer, 488 pp, 2004.

KELVE, M., KUUSKALU, A., LOPP, A., REINTAMM, T. Sponge (2',5')oligoadenylate synthetase activity in the whole sponge organism and in a primary cell culture. **Journal of Biotechnology**. 100: 177–180, 2003.

KERNAN, M. R., CAMBIE, R. C. Chemistry of sponges, 7. 11,19-dideoxyfistularin 3 and 11-hydroxyaerotionin, bromotyrosine derivatives from *Pseudoceratina durissima*. **Journal of Natural Products**. 53 (3): 615-622, 1990.

KITAGAWA, I., KOBAYASHI, M., KITANAKA, K., KIDO, M., KYOGOKU. Marine natural products, XII: on the chemical constituents of the Okinawan marine sponge *Hymeniacidon aldis*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. 31: 2321–2328, 1983.

KOBAYASHI, J., CHENG, J. F., ISHIBASHI, M., WALCHLI, M. R., YAMAMURA, S., OHIZUMI, Y. Penaresidin A and B, two novel azetidone alkaloids with potent actomyosin ATPase activating activity from the Okinawan marine sponge *Penares sp.* **Journal of Chemistry Society Perkin Transactions**. 1: 1135–1138, 1991.

KOBAYASHI, M., HIGUCHI, K., MURAKAMI, N., TAJIMA, H., AOKI, S. Callystatin A, a potent cytotoxic polyketide from the marine sponge *Callyspongia truncata*. **Tetrahedron Letters**. 38: 2859–2862, 1997.

KOISO, Y., MORITA, K., KOBAYASHI, M., WANG, W., OHYABU, N., IWASAKI, S. Effects of arenastatin A and its synthetic analogs on microtubule assembly. **Chemico-Biological Interactions**. 102: 183–191, 1996.

KONIG, G. M., WRIGHT, A. D., ANGERHOFER, C. K. Novel potent antimalarial diterpene isocyanates, isothiocyanates, and isonitriles from the tropical marine sponge *Cymbastela hooperi*. **Journal of Organic Chemistry**. 61: 3259–3267, 1996.

KOULMANN, A., PROKSCH, P., EBEL, R., BEEKMAN, A. C., van UDEN, W., KONINGS, A. W. T., PEDERSEN, J. A., PRAS, N., WOERDENBAG, H. J. Cytotoxicity and mode of action of aeroplysinin-1 and related dienone from the sponge *Aplysina aerophoba*. **Journal of Natural Products**. 59: 591–594, 1996.

KUBANEK, J., WHALEN, K. E., ENGEL, S., KELLY, S. R., HENKEL, T. P., FENICAL, W., PAWFIK, J. R. Multiple defensive roles for triterpene glycosides from two Caribbean sponges. **Oecologia**. 1: 125–136, 2002.

LABPOR. Laboratório de Porífera do Museu Nacional. Disponível no endereço: <http://acd.ufrj.br/labpor/1-Esponjas/Esponjas.htm>. Acesso em: 13/02/2007.

LEONE, P. A., REDBURN, J., HOOPER, J. N. A., QUINN, R. J. Polyoxygenated *Dysidea* sterols that inhibit the binding of [ $^{125}$ I] IL-8 to the human recombinant IL-8 receptor type A. **Journal of Natural Products**. 63: 694–697, 2000.

LIRA, T. O., BERLINCK, R. G. S., NASCIMENTO, G. G. F., HAJDU, E., Further dibromotyrosine-derived metabolites from the marine sponge *Aplysina caissara*. **Journal of Brazilian Chemical Society**. 17 (7): 1233-1240, 2006.

LURLING, M. The effect of substances from different zooplankton species and sh on the induction of defensive morphology in the green alga *Scenedesmus obliquus*. **Journal of Plankton Research**. 25: 979–989, 2003.

MAKARIEVA, T. N., STONIK, V. A., ALCOLADO, P., ELYAKOV, Y. B. Comparative study of the halogenated tyrosine derivatives from Demospongiae (Porifera). **Comparative Biochemistry and Physiology**. 1981.

MARINLIT. Banco de dados sobre literatura marinha produzido e mantido pelo Departamento de Química, University of Canterbury, Nova Zelândia. Versão Outubro 2003.

MARYANOFF, B. E., QIU, X., PADMANABHAN, K. P., TULINSKY, A., ALMOND, H. R., ANDRADE-GORDON, P., GRECO, M. N., KAUFFMAN, J. A., NICOLAOU LIU, K. C. A., BRUNGS, P. H., FUSETANI, N. Molecular basis for the inhibition of human  $\alpha$ -thrombin by the macrocyclic peptide cyclotheonamide A. **The Proceedings of the National Academy of Sciences (US)**. 90: 8048–8052, 1993.

MATSUNAGA, S., FUSETANI, N., KONOSU, S. Bioactive marine metabolites, VII: structures of discodermins B, C, and D, antimicrobial peptides from the marine sponge *Discodermia kiiensis*. **Tetrahedron Letters**. 26: 855–856, 1985.

McCLINTOCK, J. B., GAUTHIER, J. J. Antimicrobial activity of Antarctic sponges. **Antarctic Science**. 4 (2): 179-183, 1992.

McCLINTOCK, J. B., SWENSON, D., TRAPIDO-ROSENTHAL, H., BANGHART, L. Ichthyodeterrent properties of lipophilic extracts from Bermudian sponges. **Journal of Chemical Ecology**. 23: 607–1620, 1997.

MIYAOKA, H., SHIMOMURA, M., KIMURA, H., YAMADA, Y., KIM H-S., WATAYA, Y. Antimalarial activity of kalahinol A and new relative diterpenoids from the Okinawan sponge, *Acanthella* sp. **Tetrahedron**. 54: 13467–13474, 1998.

MOOBERRY, S. L., TIEN, G., HERNANDEZ, A. H., PLUBRUKARN, A., DAVIDSON, B. S. Laulimalide and isolaulimalide, new paclitaxel-like microtubule-stabilizing agents. **Cancer Research**. 59: 653–660, 1999.

MULLER, W. E. G., SOBEL, C., DIEHL-SEIFERT, B., MAIDHOF, A., SCHRODER, H. C. Influence of the antileukemic and anti-human immunodeficiency virus agent avarol on selected immune responses *in vitro* and *in vivo*. **Biochemical Pharmacology**. 36: 1489–1494, 1987.

MULLER, W. E. G., SCHRODER, H. C. Cell biological aspects of HIV-1 infection: effects of the anti-HIV-1 agent avarol. **International Journal of Sports Medicine**. 12: S43–S49, 1991.

NAKAMURA, H., OHIZUMI, Y., KABOYASHI, J. Keramadine, a novel antagonist of serotonergic receptors isolated from the Okinawan sea sponge *Agelas* sp. **Tetrahedron Letters**. 25: 2475–2478, 1984.

NAKAO, Y., UEHARA, T., MATSUNAGA, S., FUSEYANI, N., VAN SOEST, R. W. M., MATSUNAGA, S. Callyspongynic acid, a polyacetylenic acid which inhibits  $\alpha$ -glucosidase, from the marine sponge *Callyspongia truncata*. **Journal of Natural Products**. 65: 922–924, 2002.

NICOLAS, G. M., HONG, T. W., MOLINSKI, T. F., LERCH, M. L., CANCELLA, M. T., LEBRILLA, C. B. Oceanapiside, an antifungal bis- $\alpha,\omega$ -amino alcohol glycoside from the

- marine sponge *Oceanapia phillipensis*. **Journal of Natural Products**. 62: 1678–1681, 1999.
- NORTHCOTE, P. T., BLUNT, J. W., MUNRO, M. H. G. Pateamine: a potent cytotoxin from the New Zealand marine sponge, *Mycale* sp. **Tetrahedron Letters**. 32: 6411–6414, 1991.
- OKINO, T., YOSHIMURA, E., HIROTA, H., FUSETANI, N. Antifouling kalihinenes from the marine sponge *Acanthella cavernosa*. **Tetrahedron Letters**. 36: 8637–8640, 1995.
- OKINO, T., YOSHIMURA, E., HIROTA, H., FUSETANI, N. New antifouling kalihipyranes from the marine sponge *Acanthella cavernosa*. **Journal of Natural Products**. 59: 1081–1083, 1996.
- PALERMO, J. A. Productos naturales de origen marina. In: SIMÕES et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5<sup>a</sup> ed. rev. ampl. Editora da UFSC, 2004.
- PAUL, V. J., VAN ALSTYNE, K. L. Activation of chemical defenses in the tropical green algae *Halimeda* spp. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 160:191–203, 1992.
- PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S. **Introduction to spectroscopy**. 2. ed. Washington: Saunders College Publishing, 2001.
- PELLETIER, S. W. **Alkaloids chemical and biological perspectives**. Vol 1-6. New York: Willey, 1983-1988.
- PERRY, N. B., BLUNT, J. W., MUNRO, M. H. G., HIGA, T., SAKAI, R. Discorhabdin D an antitumor alkaloid from the sponges *Latrunculia brevis* and *Prianos* sp. **Journal of Organic Chemistry**. 53: 4127–4128, 1988.
- PERRY, N. B., ETTOUATI, L., LITAUDON, M., BLUNT, J. W., MUNRO, M. H. G. Alkaloids from the antarctic sponge *Kirkpatrickia variolosa*, part 1: variolin B, a new antitumour and antiviral compound. **Tetrahedron**. 50: 3987–3992, 1994.

PETTIT, R. K., McALLISTER, S. C., PETTIT, G. R., HERALD, C. L., JOHNSON, J. M., CICHACZ, Z. A. Abroad-spectrum antifungal from the marine sponge *Hyrtios erecta*. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 9: 147–152, 1998.

PHIFE, D. W., RAMOS, R. A., FENG, M., KING, I., GUNASEKERA, S. P., WRIGHT, A., PATEL, M., PACHTER, J. A., COVAL, S. J. Marine sponge bis(indole) alkaloids that displace ligand binding to  $\alpha$ 1-adrenergic receptors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**. 6: 2103–2106, 1996.

PIKA, J., TISCHLER, M., ANDERSEN, R. J. Glaciasterols A and B, 9,11-secosteroids from the marine sponge *Aplysilla glacialis*. **Canadian Journal of Chemistry**. 70: 1506–1510, 1992.

PINHEIRO, U. S., HAJDU, E., CUSTÓDIO, M. R. *Aplysina* Nardo (Porifera, Verongida, Aplysinidae) from the Brazilian coast with description of eight new species. **Zootaxa**. 1609: 1-51, 2007.

POUCHERT, C. J., BEHNKE, J. The Aldrich library of  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  FT NMR spectra. 1<sup>a</sup> ed. **Aldrich Chemical Company, Inc.** 1: 616C (Mo-1), 3: 14A (Mo-2), 3: 1A (Mo-3), 1993.

PROKSCH, P., EDRADA, R. A., EBEL, R. Drugs from the seas – Current status and microbiological implications. **Applied Microbiology and Technology**. 59: 125-134, 2002.

PULITZER-FINALI, G. A collection of West Indian demospongiae (porifera). In appendix, a list of the Demospongiae hitherto recorded from the West Indies. **Annais del Museo Civico di Storia Naturale di Genova**. 86: 65-218, 1986.

PUYANA, M., FENICAL, W., PAWLIK, J. R. Are there activated chemical defenses in sponges of the genus *Aplysina* from the Caribbean? **Marine Ecology Progress Series**. 246: 127-135, 2003.

QUINN, R. J., GREGSON, R. P., COOK, A. F., BARTLETT, A. F. Isolation and synthesis of 1-methylisoguanisine, a potent pharmacologically active constituent from the marine sponge *Tedania digitata*. **Tetrahedron Letters**. 21: 567–568, 1980.

QURESHI, A., FAULKNER, D. J. Haplosamates A and B: new steroidal sulfamate esters from two haplosclerid sponges. **Tetrahedron**. 55: 8323–8330, 1999.

RANDAZZO, A., DEBITUS, C., MINALE, L., PASTOR, P. G., ALCARAZ, M. J., PAYA, M., GOMEZ-PALOMA, L. Petrosaspongiolides M-R: new potent and selective phospholipase A2 inhibitors from the New Caledonian marine sponge *Petrosaspongia nigra*. **Journal of Natural Products**. 61: 571–575, 1998a.

RANDAZZO, A., DAL PIAZ, F., ORRU, S., DEBITUS C., ROUSSAKIS, C., PUCCI, P., GOMEZ-PALOMA, L. Axinellins A and B: new proline-containing antiproliferative cyclopeptides from the Vanuatu sponge *Axinella carteri*. **European Journal of Organic Chemistry**. 11: 2659–2665, 1998b.

RASHID, M. A., GUSTAFSON, K. R., BOSWELL, J. L., BOYD, M. R. Haligramides A and B, two new cytotoxic hexapeptides from the marine sponge *Haliclona nigra*. **Journal of Natural Products**. 63: 956–959, 2000.

RODA, A. L., BALDWIN, I. T. Molecular technology reveals how the induced direct defenses of plants work. **Basic and Applied Ecology**. 4: 15–26, 2003.

ROSS, S. A., WEETE, J. D., SCHINAZI, R. F., WIRTZ, S. S., THARNISH, P., SCHEUER, P. J., HAMANN, M. T. Mololipids, a new series of anti-HIV bromotyramine-derived compounds from a sponge of the order Verongida. **Journal of Natural Products**. 63: 501–503, 2000.

SAITO, S., WATABE, S., OZAKI, H., FUSETANI, N., KARAKI, H. Mycalolide, a novel actin depolymerizing agent. **Journal of Biological Chemistry**. 269: 29710–29714, 1994.

SAKAI, R., KAMIYA, H., MURATA, M., SHIMAMOTO, K. A new neurotoxic amino acid from the Micronesian marine sponge *Dysidea herbacea*. **Journal of the American Chemical Society**. 119: 4112–116, 1997.

SANTALOVA, E. A., MAKARIEVA, T. N., GORSHKOVA, I. A., DMITRENOK, A. S., KRASOKHIN, V. B., STONIK, V. A. Sterols from six marine sponges. **Biochemical Systematics and Ecology**. 32: 153-167, 2004.

SARMA, N. S., KRISHNA, M. S. R., RAO, S. R. Sterol Ring System Oxidation Pattern in Marine Sponges. **Marine Drugs**. 3: 84-111, 2005.

SCHMITZ, F. J., GUNASEKERA, S. P., YALAMANCHILI, G., HOSSAIN, M. B., VAN DER HELM, D. Tedanolide: a potent cytotoxic macrolide from the Caribbean sponge *Tedania ignis*. **Journal of the American Chemical Society**. 106: 7251–7252, 1984.

SERA, Y., ADACHI, K., SHIZURI, Y. A new epidioxy sterol as an antifouling substance from a Palauan marine sponge, *Lendenfeldia chondrodes*. **Journal of Natural Products**. 62: 152–154, 1999.

SHIMOSAKA, A. Role of NKT cells and  $\alpha$ -galactosyl ceramide. **International Journal of Hematology**. 76: 277–279, 2002.

SHOJI, N., UMEYAMA, A., SHIN, K., TAKEDA, K., ARIHARA, S., KOBAYASHI, J., TAKEI, M. Two unique pentacyclic steroids with *cis* C/D ring junction from *Xestospongia bergquistia* Fromont, powerful inhibitors of histamine release. **Journal of Organic Chemistry**. 57: 2996–2997, 1992.

SILVERSTEIN, R. M., BASSLER, G. P. C., MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

SIMÕES, et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5<sup>a</sup> ed. rev. ampl. Editora da UFSC, 2004.

SIPKEMA, D., FRANSSSEN, M. C. R., OSINGA, R., TRAMPER, J., WIJFFELS, R. H. Marine Sponges as Pharmacy. **Marine Biotechnology**. 7: 142-162, 2005.

SPONGE. Disponível no endereço: <http://www.encyclopaediabrittanica.com/>. Acesso em: 13/02/2007.

STEAD, P., HISCOX, S., ROBINSON, P. S., PIKE, N. B., SIDEBOTTOM, P.J., ROBERTS, A. D., TAYLOR, N. L., WRIGHT, A. E., POMPONI, S. A., LANGLEY, D. Eryloside F, a novel penasterol disaccharide possessing potent thrombin receptor antagonist activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**. 10: 661– 664, 2000.

STOEWSAND, G. S. Bioactive organosulfur phytochemicals in Brassica oleracea vegetables—a review. **Food and Chemical Toxicology**. 33: 537–543, 1995.

SUN, H. H., CROSS, S. S., GUNASEKERA, M., KOEHN, F. E. Weinbersteroldisulfates A and B, antiviral steroid sulfates from the sponge *Petrosia weinbergi*. **Tetrahedron**. 47: 1185–1190, 1991.

SUZUKI, H., SHINDO, K., UENO, A., MIURA, T., TAKEI, M., SAKAKIBARA, M., FUKAMACHI, H., TANAKA, J., HIGA, T. S1319: A novel  $\beta$ 2-adrenoceptor agonist from a marine sponge *Dysidea* sp. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**. 9: 1361–1364, 1999.

TAKEI, M., BURGOYNE, D. L., ANDERSEN, R. J. Effect of contignasterol on histamine release induced by anti-immunoglobulin E from rat peritoneal mast cells. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. 83: 1234–1235, 1994.

TAYLOR, R. B., SOTKA, E., HAY, M. E. Tissue-specific induction of herbivore resistance: Seaweed response to amphipod grazing. **Oecologia**. 132: 68–76, 2002.

TER HAAR, E., KOWALSKI, R. J., HAMEL, E., LIN, C. M., LONGLEY, R. E., GUNASEKERA, S. P., ROSENKRANZ, H. S., DAY, B. W. Discodermolide, a cytotoxic

marine agent that stabilizes microtubules more potently than taxol. **Biochemistry**. 35: 243–250, 1996.

THACKER, R. W., BECERRO, M. A., LUMBANG, W. A., PAUL, V. J. Allelopathic interactions between sponges on a tropical reef. **Ecology** 79: 1740–1750, 1998.

THOMS, C., EBEL, R., HENTSCHEL, U., PROKSCH, P. Sequestration of dietary alkaloids by the spongivorous marine mollusc *Tylodina perversa*. **Zeitschrift Naturforschung**. 58 (5-6): 426-32, 2003.

THOMS, C., EBEL, R., PROKSCH, P. Activated Chemical Defense in *Aplysina* Sponges Revisited. **Journal of Chemical Ecology**. 32(1): 97-123, 2005.

TORRES, Y. R., BERLINCK, R. G. S., NASCIMENTO, G. G. F., FORTIER, S. C., PESSOA, C., DE MORAES, M. O. Antibacterial activity against resistant bacteria and cytotoxicity of four alkaloid toxins isolated from the marine sponge *Arenosclera brasiliensis*. **Toxicon**. 40: 885–891, 2002.

TSUKAMOTO, S., KATO, H., HIROTA, H., FUSETANI, N. Ceratinamides A and B: new antifouling dibromotyrosine derivatives from the marine sponge *Pseudoceratina purpurea*. **Tetrahedron**. 52: 8181–4186, 1996a.

TSUKAMOTO, S., KATO, H., HIROTA, H., FUSETANI, N. Pseudoceratidine: a new antifouling spermidine derivative from the marine sponge *Pseudoceratina purpurea*. **Tetrahedron Letters**. 37: 1439–1440, 1996b.

TSUKAMOTO, S., MATSUNAGA, S., FUSETANI, N., VAN SOEST, R. W. M. Acanthosterol sulfates A–J: ten new antifungal steroidal sulfates from a marine sponge *Acanthodendrilla* sp. **Journal of Natural Products**. 61: 1374–1378, 1998.

URBAN, S., DE ALMEIDA LEONE, P., CARROLL, A. R., FECHNER, G. A., SMITH, J., HOOPER, J. N. A., QUINN, R. J. Axinellamines A–D, novel imidazo-azolo-imidazole

alkaloids from the Australian marine sponge *Axinell asp.* **Journal of Organic Chemistry.** 64: 731–735, 1999.

WAKIMOTO, T., MARUYAMA, A., MATSUNAGA, S., FUSETANI, N., SHINODA, K., MURPHY, P. T. Octa- and nona-prenylhydroquinone sulfates, inhibitors of  $\alpha$ 1,3-fucosyltransferase VII, from an Australian marine sponge *Sarcotragus sp.* **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters.** 9: 727–730, 1999.

WEISS, B., EBEL, R., ELBRACHTER, M., KIRCHNER, M., PROKSCH, P. Defense metabolites from the marine sponge *Verongia aerophoba.* **Biochemical Systematics and Ecology.** 24: 1–12, 1996.

WELLINGTON, K. D., CAMBIE, R. C., RUTLEDGE, P. S., BERGQUIST, P. R. Chemistry of sponges, 19: Novel bioactive metabolites from *Hamigera tarangaensis.* **Journal of Natural Products.** 63: 79–85, 2000.

WILLIS, R. H., DE VRIES, D. J. BRS1, a C30 bis-amino, bis-hydroxy polyunsaturated lipid from an Australian calcareous sponge that inhibits protein kinase C. **Toxicon.** 35: 1125–1129, 1997.

WONG-LEUNG, Y. L. Antibacterial activities of some Hong-Kong plants used in Chinese medicine. **Fitoterapia.** 69 (1): 11-16, 1988.

YAN, X. H., GUO, Y. W. Nanjiols D and E, two new uncommon steroids from the Chinese soft coral *Nephthea bayeri.* **Chinese Chemical Letters.** 16 (3): 356-358, 2005.

L768 i Lira, Narlize Silva

Isolamento e identificação dos constituintes químicos da esponja marinha *Aplysina fistularis* / Narlize Silva Lira.- João Pessoa, 2008.

140 p.

Orientadora: Celidarque da Silva Dias  
Dissertação (Mestrado) CCEN/UFPB.

1. Esponja Marinha – Produtos Naturais
2. *Aplysina fistularis* – Produtos Naturais

UFPB/BC

CDU: 547.9 (043)

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)