

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NAURAIS E SINTÉTICOS
BIOATIVOS

GISELY MARIA FREIRE ABÍLIO DE CASTRO

**PREPARAÇÃO DE DERIVADOS DA CAULERPINA E AVALIAÇÃO
DOS SEUS EFEITOS CITOTÓXICOS E MICROBIOLÓGICOS**

**JOÃO PESSOA - PB
2017**

GISELY MARIA FREIRE ABÍLIO DE CASTRO

**PREPARAÇÃO DE DERIVADOS DA CAULERPINA E AVALIAÇÃO
DOS SEUS EFEITOS CITOTÓXICOS E MICROBIOLÓGICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do
Centro de Ciências da Saúde da Universidade
Federal da Paraíba, em cumprimento as exigências
para a obtenção do título de Doutor em Produtos
Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de
concentração: Farmacoquímica

Orientadora: Profa. Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos

Co-Orientador: Prof. Dr. Kristerson Reinaldo de Luna Freire

JOÃO PESSOA-PB

2017

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C355p Castro, Gisely Maria Freire Abílio de.
Preparação de derivados da caulerpina e avaliação dos
seus efeitos citotóxicos e microbiológicos / Gisely
Maria Freire Abílio de Castro. - João Pessoa, 2017.
229 f. : il.

Orientação: Bárbara Viviana de Oliveira Santos.
Coorientação: Kristerson Reinaldo de Luna Freire.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Produtos naturais. 2. Derivados indólicos. 3.
Derivados da caulerpina - Efeitos citotóxicos. I.
Santos, Bárbara Viviana de Oliveira. II. Freire,
Kristerson Reinaldo de Luna. III. Título.

UFPB/BC

GISELY MARIA FREIRE ABÍLIO DE CASTRO

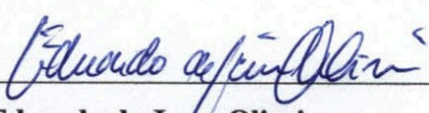
**PREPARAÇÃO DE DERIVADOS DA CAULERPINA E
AVALIAÇÃO DOS SEUS EFEITOS CITOTÓXICOS E
MICROBIOLÓGICOS**

Tese aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

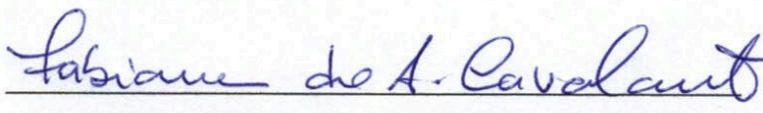
Profa. Dra. Bárbara Viviana Santos

Orientadora



Prof. Dr. Eduardo de Jesus Oliveira

Examinador Interno



Profa. Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante Oliveira

Examinador Interno



Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues

Examinador Externo



Prof. Dr. Celso Amorim Câmara

Examinador Externo

*Aos amores da minha vida, minhas filhas,
Maria Cecília e Laura.*

AGRADECIMENTOS

- À **Profa. Dra. Bárbara Santos** por todos os ensinamentos, apoio, incentivo e compreensão durante os quatro anos de execução deste trabalho;
- Ao Prof. **Dr. Kristerson Freire** pelos ensinamentos, dedicação, incentivo, amizade e por acreditar neste trabalho;
- Ao meu marido, Prof. **Dr. Ricardo Castro** pelo apoio e presença constante em todos os momentos da minha vida e por possibilitar e orientar as análises antifúngicas e estatísticas;
- Às minhas filhas, **Maria Cecília e Laura**. A presença de vocês faz de mim uma pessoa melhor a cada dia.
- Ao **Prof. Dr. Lindomar Pena** por possibilitar e orientar as avaliações de citotoxicidade e *screening* antiviral na Fundação Oswaldo Cruz – Pernambuco;
- À doutoranda **Daniele Mendes** por todos os ensinamentos, apoio e paciência ao auxiliar as análises realizadas na Fundação Oswaldo Cruz – Pernambuco;
- Ao **Prof. Dr. George Miranda**, por orientar e acompanhar as coletas de *Caulerpa racemosa*;
- Aos professores **Dr. Eduardo de Jesus Oliveira, Dra. Fabiana de Andrade Cavalcante Oliveira, Dr. Luis Cezar Rodrigues e ao Dr. Celso Amorim Câmara** pela disponibilidade em participar da banca examinadora e por todas as considerações realizadas que engrandeceram este trabalho.
- Aos membros da minha banca de qualificação **Prof. Dr. Luís Cesar Rodrigues, Prof. Dr. Marcus Tullius Scotti e a Profa. Dra. Fabiana Cavalcante**, por todas as correções e sugestões realizadas. À **Prof. Dra. Fabiana Cavalcante** agradeço especialmente por toda disponibilidade, gentileza e paciência ao me auxiliar nas análises estatísticas;
- À todos os **professores da Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos** por terem contriuiuído com o meu crescimento profissional;
- Aos funcionários do Núcleo de Caracterização e Análise, **Evandro, Alexsandro e Vicente** por toda gentileza em auxiliar as análises de Ressonância Magnética Nuclear ;
- Ao funcionário **Nonato** por toda gentileza e presteza com que sempre me atendeu;
- À todos os **funcionários da coordenação e secretaria da Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**;

- Aos **colegas de sala e de laboratório** pela companhia e apoio nas horas mais difíceis, especialmente **Jéssica Sousa**;
- À **Gabrielle Pereira** pela excelente companhia e amizade durante as Fundação Oswaldo Cruz – Pernambuco;
- Aos membros do Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal da Paraíba por permitirem o meu afastamento integral para cursar o doutorado;
- Aos **meus pais, irmão, familiares e amigos** pela torcida para que eu concluísse esta etapa e pelo auxílio cuidando das minhas filhas para que eu finalizasse este trabalho.
- Ao **INCTambtropic** pelo apoio técnico e financeiro;

RESUMO

ABÍLIO, Gisely Maria Freire. **Preparação de derivados da caulerpina e avaliação dos seus efeitos citotóxicos e microbiológicos**. 229 p. (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

Os produtos naturais desempenham um papel importante como fonte de substâncias utilizadas diretamente como agentes medicinais. Atualmente, destacam-se neste grupo os organismos marinhos, que representam uma fonte potencial de metabólitos secundários com diversas propriedades terapêuticas. Apesar do grande potencial, o recurso algológico dos oceanos ainda é pouco explorado na indústria farmacêutica. Neste contexto, e diante da grande diversidade de espécies marinhas encontradas no litoral nordestino, a literatura científica relata atividades farmacológicas inerentes ao extrato de algas marinhas do gênero *Caulerpa* Lamouroux, tais como antinocipativa, espasmolítica, antiviral, antimicrobiana, inseticida e citotóxica. Considerando que muitas das propriedades terapêuticas observadas para os extratos de espécies do gênero *Caulerpa* são relativas à caulerpina, componente majoritário deste gênero, e que as moléculas isoladas de fontes naturais ainda apresentam limitações, tais como baixa solubilidade ou instabilidade química, este estudo propôs a realização de modificações estruturais na molécula da caulerpina, visando-se avaliar o potencial antiviral e antifúngico das novas moléculas frente o vírus Herpes simples tipo 1 e cepas de *Candida* spp, respectivamente. Logo, realizaram-se reações de substituição na posição *N*-indólica por grupos alquil, benzil, alil, propargil e acetato de etil, mono- e disubstituídos, além da conversão em seus derivados ácidos, sendo possível a semi-síntese de 14 derivados, sendo 12 inéditos na literatura. Os derivados obtidos foram submetidos às análises de citotoxicidade e triagem de atividade antiviral frente ao vírus herpes simples tipo 1, ambas pelo método do microcultura do tetrazólito e antifúngica através da determinação das respectivas concentrações inibitória mínimas frente às cepas de *Candida* spp, utilizando-se a técnica de microdiluição. O ensaio de citotoxicidade demonstrou que o ácido caulerpínico (derivado 08) e o ácido *N*-etil substituído (derivado 10) apresentaram concentração citotóxica referente a 50% do efeito máximo de 1035,0 μ M e 1004,0 μ M respectivamente, valores significativamente ($p < 0,05$) superior à caulerpina. Durante a triagem que avaliou a inibição viral durante a infecção, verificou-se que apenas os ácidos *N*-substituídos pelos grupos metil e etil (derivados 09 e 10, respectivamente) forneceram percentual de inibição viral frente o vírus Herpes simples tipo 1 de 37,39% e 38,35%, respectivamente, valores significativamente superiores ($p < 0,05$) ao observado para a caulerpina (15%). Para o ensaio que investigou a atividade antiviral pós-infecção observou-se que os seguintes derivados apresentaram inibição viral superior a caulerpina (0%): ésteres da caulerpina *N*-substituídas pelos grupos etil – derivado 02- (28,66%); propargil – derivado 04- (28,05%); benzil – derivado 05 - (13,87%); ácidos da caulerpina *N*-etil – derivado 10 - (29,56%) e *N*-alil – derivado 11 - (14,78%). Dentre os derivados produzidos apenas a mistura da caulerpina *N*-metil (derivado 01) e caulerpina *N*-metil-*O*-etil (derivado 14) exibiu atividade antifúngica com concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima entre 7,8-125 μ g/mL. Este estudo possibilitou a produção de 12 derivados inéditos da caulerpina, dentre os quais 7 foram capazes de promover diminuição do efeito citotóxico do protótipo e aumento da atividade antiviral frente ao vírus Herpes humano tipo 1, bem como a produção de uma mistura de derivados com potente atividade antifúngica frente cepas de *Candida* spp.

Palavras chave: *Caulerpa*, derivados indólicos, química medicinal.

ABSTRACT

ABÍLIO, Gisely Maria Freire. **Preparation of derivatives caulerpine and evaluation of their cytotoxic and microbiological effects.** 229 p. (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

Natural products have played an important role as a source of substances directly used as medicinal agents. Among which, marine organisms constitute a potential source of secondary metabolites with diverse therapeutic properties. Nevertheless, despite the great potential the algological resource of the oceans remains little explored by the pharmaceutical industry. The northeastern coast of Brazil has a great diversity of marine species and some of which, such as *Caulerpa Lamouroux* algae extract, have been reported to have antinociceptive, spasmolytic, antiviral, antimicrobial, insecticidal, and cytotoxic properties. Several pharmacological attributes of *Caulerpa* spp. are due to the presence of caulerpine, the major component found in this genus. However, isolated molecules may present limitations, including low solubility or chemical instability. Hence, this study aimed to perform structural modifications of the caulerpine molecule, in order to evaluate their antiviral (anti-HSV-1) and antifungal (anti-*Candida* spp.) properties. Substitution reactions were carried out at the *N*-indolyl position by mono- and disubstituted alkyl, benzyl, allyl, propargyl and ethyl acetate groups, in addition to conversion to their acid derivatives. A total of 14 analogues were yielded, of which 12 are unpublished in the literature. The analogues were submitted to cytotoxicity analysis and screened for their antiviral activity against HSV-1, both by the tetrazolium method, and antifungal activity against *Candida* spp., by determining their minimum inhibitory concentrations. Caulerpinic acid and *N*-ethyl acid showed cytotoxic concentrations (50% of the maximum effect) of 1035.0 μ M and 1004.0 μ M, respectively, which were significantly ($P < 0.05$) higher than that of caulerpin. A screening was carried out to assess viral inhibition during infection. Only methyl and ethyl *N*-substituted acids (derivatives 9 e 10) inhibited HSV-1 by 37.39% and 38.35%, respectively, which was significantly greater ($p < 0.05$) than the inhibition caused by caulerpine (15%). As for post-infection antiviral activity, the following analogues showed superior inhibition over caulerpine (0%): esters of caulerpine *N*-substituted by ethyl – derivatives 02 - (28.66%); propargyl -derivatives 04 (28.05%); benzyl – derivatives 05 - (13.87%); and *N*-ethyl (29.56%) and *N*-allyl (14.78%) acids of caulerpine (derivatives 10 e 11, respectively). Among the produced analogues, only the mixture of *N*-methyl caulerpine – derivatives 01- and *N*-methyl-O-ethyl caulerpine – derivatives 14 - exhibited antifungal activity, with minimal inhibitory and fungicidal concentrations ranging between 7.8 and 125 μ g/mL. In this study, 12 novel caulerpine analogues were produced, of which 7 showed decreased cytotoxicity as compared to the prototype, as well as increased antiviral activity against human herpes virus type 1. Moreover, a mixture of analogues was found to have potent antifungal activity against *Candida* spp.

Key-words: *Caulerpa*, indole derivatives, medicinal chemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fármacos de origem marinha comercializados com atividade antitumoral.....	25
Figura 2: Principais substâncias isoladas do gênero <i>Caulerpa</i>	29
Figura 3: Estrutura da <i>Caulerpa racemosa</i> (SALTCORNER, 2016).....	30
Figura 4: Substâncias isoladas da espécie <i>Caulerpa racemosa</i> (LIU et al., 2013; YANG et al., 2014; YANG et al., 2015).	31
Figura 5: Estrutura do derivado indolquinolínico produzido por Zhao et al. (2015).	35
Figura 6: Estrutura química dos compostos sintetizados por Ye et al. (2015).	36
Figura 7: Núcleo indólico	36
Figura 8: Análise retrossintética utilizada como estratégia para a síntese da caulerpina e derivados realizada por Canché Chay et al., (2014).	37
Figura 9: Estrutura química de derivados da caulerpina (CANCHE CHAY et al., 2014)	38
Figura 10: Síntese do 6H-isoindol [2,1-a]indol-6-ona (HUANG et al., 2016).....	40
Figura 11: Estrutura química do aciclovir.	42
Figura 12: Estruturas químicas dos compostos (6) 8,10,18-trihidroxí-2,6-dolabelladieno e (7) 6-hidroxidichatona-4,14-diene-1,17-diol (ABRANTES et al., 2010).....	43
Figura 13: Estrutura química do composto (7) isolauraldeído	45
Figura 14: Estrutura do alcaloide bisindólico, caulerpina.	49
Figura 15: Equação geral de metilação 1.....	50
Figura 16: Equação geral de metilação 2.....	50
Figura 17: Proposta de mecanismo de metilação.	51
Figura 18: Estrutura química do derivado 01.	53
Figura 19: Equação geral de N-alquilação da caulerpina.	55
Figura 20: Mecanismo reacional de N-alquilação da caulerpina.	56
Figura 21: Estrutura química do derivado 02.	
Figura 22: Estrutura química do derivado 03.	61
Figura 23: Estrutura química do derivado 04.	64

Figura 24: Estrutura química do derivado 05.	67
Figura 25: Estrutura química do derivado 06.	71
Figura 26: Equação geral de hidrólise parcial da caulerpina.	71
Figura 27: Mecanismo reacional de hidrólise parcial da caulerpina.	72
Figura 28: Equação geral da reação de inserção mono indólica do grupo acetato de etila.	72
Figura 29: Mecanismo reacional da inserção mono indólica do grupo acetato de etila.	73
Figura 30: Estrutura química do derivado 07.	77
Figura 31: Equação geral de hidrólise da caulerpina e dos seus derivados <i>N</i> -substituídos.	80
Figura 32: Mecanismo reacional de hidrólise da caulerpina e dos seus derivados <i>N</i> -substituídos.	81
Figura 33: Estrutura química do derivado 08.	83
Figura 34: Estrutura do derivado 09.	85
Figura 35: Estrutura do derivado 10.	86
Figura 36: Estrutura do derivado 11.	88
Figura 37 : Estrutura do derivado 12.	90
Figura 38: Equação geral de transesterificação da Caulerpina e do derivado 01.	92
Figura 39: Mecanismo reacional de transesterificação da Caulerpina e do derivado 01.	93
Figura 40: Estrutura química do derivado 13.	95
Figura 41: Estrutura do derivado 14.	96
Figura 42: Estrutura dos componentes da mistura de derivados.	101
Figura 43: Estrutura do sais de tri(1-alkyl-indol-3-yl) metileno Lavrenov et al., (2010).	107
Figura 44: Porcentagem da viabilidade celular de células Vero em contato com HSV-1 tratadas com caulerpina e seus derivados durante o ensaio 1. Redução significativa da viabilidade celular (ANOVA, com pós-teste de Tukey, * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$; **** $p < 0,0001$ versus controle infectado e não tratado).	110
Figura 45: Porcentagem da viabilidade celular de células Vero em contato com HSV-1 tratadas com caulerpina e seus derivados durante o ensaio 2. Aumento significativo da	

viabilidade celular (ANOVA, com pós-teste de Tukey, * $p < 0,005$; ** $p < 0,0001$): grupos experimentais versus controle (infectado e não tratado).	112
Figura 46: Aspecto morfológico das células não infectadas por HSV-1 (A), infectadas e não tratadas (B) e infectadas e tratadas com aciclovir (C).	114
Figura 47: Estrutura da Caulerpina.....	125
Figura 48: Espectro de IV da caulerpina.	127
Figura 49: Espectro de RMN de ^1H do Caulerpina (200 MHz, CDCl_3).....	128
Figura 50: Expansão do espectro de RMN de ^1H do caulerpina (200 MHz, CDCl_3).....	129
Figura 51: Espectro de RMN de ^{13}C – APT da caulerpina (200 MHz, CDCl_3).....	130
Figura 52: Estrutura da Caulerpina <i>N</i> -metil (derivado 01).....	131
Figura 53: Espectro de IV do derivado 01.....	133
Figura 54: Espectro de RMN de ^1H do derivado (01) (200 MHz, CDCl_3).....	134
Figura 55: Espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (01) (200 MHz, CDCl_3).....	135
Figura 56: caulerpina <i>N</i> -substituída.....	136
Figura 57: Estrutura no derivado 02.	137
Figura 58: Espectro IV do derivado 02.	138
Figura 59: Espectro de RMN de ^1H do derivado (02) (500 MHz, CDCl_3).....	139
Figura 60: Espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (02) (500 MHz, CDCl_3).....	140
Figura 61: Espectro de HMBC do derivado (02) (500 MHz, CDCl_3).....	141
Figura 62: Estrutura no derivado 03.	142
Figura 63: Espectro IV do derivado 03.	143
Figura 64: Espectro de RMN de ^1H do derivado (03) (200 MHz, CDCl_3).....	144
Figura 65: Espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (03) (200 MHz, CDCl_3).....	145
Figura 66: Estrutura no derivado 04.	146
Figura 67: Espectro IV do derivado 04.	147
Figura 68: Espectro de RMN de ^1H do derivado (04) (500 MHz, CDCl_3).....	148

Figura 69: Espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (04) (500 MHz, CDCl_3).....	149
Figura 70: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (04) (500 MHz, CDCl_3).	150
Figura 71: Espectro COSY do derivado 04 (500 MHz, CDCl_3).	151
Figura 72: Espectro HMQC do derivado 04 (500 MHz, CDCl_3).....	152
Figura 73: Expansão do espectro HMQC do derivado 04 (500 MHz, CDCl_3).....	153
Figura 74: Espectro HMBC do derivado 04 (500 MHz, CDCl_3).	154
Figura 75: Estrutura no derivado 05.	155
Figura 76: Espectro IV do derivado 05.	156
Figura 77: Espectro de RMN de ^1H do derivado (05) (200 MHz, CDCl_3).....	157
Figura 78: Espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (05) (200 MHz, CDCl_3).....	158
Figura 79: Estrutura no derivado 07.	159
Figura 80: Espectro de RMN de ^1H do derivado (07) (500 MHz, CDCl_3).....	160
Figura 81: Espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (07) (500 MHz, CDCl_3).....	161
Figura 82: Expansão 1 do espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (07) (500 MHz, CDCl_3).	162
Figura 83: Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (07) (500 MHz, CDCl_3).	163
Figura 84: Espectro COSY do derivado 07 (500 MHz, CDCl_3).	164
Figura 85: Espectro HMQC do derivado 07 (500 MHz, CDCl_3).....	165
Figura 86: Espectro HMBC do derivado 07 (500 MHz, CDCl_3).	166
Figura 87: Estrutura do derivado 06.	167
Figura 88: Espectro de RMN de ^1H do derivado (06) (500 MHz, MeOD).	168
Figura 89: Espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (06) (500 MHz, MeOD).	169
Figura 90: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (06) (500 MHz, MeOD).	170
Figura 91: Espectro HMBC do derivado 06 (500 MHz, MeOD).....	171

Figura 92: Estrutura no derivado 08.	173
Figura 93: Espectro IV do derivado 08.	174
Figura 94: Espectro de RMN de ^1H do derivado (08) (200 MHz, MeOD).	175
Figura 95: Espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (08) (200 MHz, MeOD).	176
Figura 96: Estrutura no derivado 09.	177
Figura 97: Espectro IV da derivado 09.	178
Figura 98: Espectro de RMN de ^1H do derivado (09) (200 MHz, MeOD).	179
Figura 99: Espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (09) (200 MHz, MeOD).	180
Figura 100: Estrutura no derivado 10.	181
Figura 101: Espectro IV do derivado 10.	182
Figura 102: Espectro de RMN de ^1H do derivado (10) (200 MHz, MeOD).	183
Figura 103: Espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (10) (200 MHz, MeOD).	184
Figura 104: Espectro de HMBC do derivado (10) (500 MHz, MeOD).	185
Figura 105: Estrutura no derivado 11.	186
Figura 106: Espectro IV do derivado 11.	187
Figura 107: Espectro de RMN de ^1H do derivado (11) (200 MHz, MeOD).	188
Figura 108: Espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (11) (200 MHz, MeOD).	189
Figura 109: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (11) (200 MHz, MeOD).	190
Figura 110: Estrutura no derivado 12.	191
Figura 111: Espectro IV do derivado 12.	192
Figura 112: Espectro de RMN de ^1H do derivado (12) (200 MHz, MeOD).	193
Figura 113: Espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (12) (200 MHz, MeOD).	194
Figura 114: Espectro de HMBC do derivado (12) (500 MHz, MeOD).	195
Figura 115: Estrutura no derivado 13.	196
Figura 116: Espectro de RMN de ^1H do derivado (13) (200 MHz, CDCl_3).	198

Figura 117: Espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (13) (200 MHz, CDCl_3).....	199
Figura 118: Estrutura no derivado 14.	200
Figura 119: Espectro de RMN de ^1H do derivado (14) (200 MHz, CDCl_3).	201
Figura 120: Espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (14) (200 MHz, CDCl_3).	202
Figura 121: Estrutura dos componentes da mistura de derivados.	203
Figura 122: Espectro de RMN de ^1H da mistura de derivados (500 MHz, CDCl_3).	204
Figura 123: Espectro de RMN de ^{13}C – APT da mistura de derivados (500 MHz, CDCl_3).	205
Figura 124: Espectro de HMBC da mistura de derivados (500 MHz, CDCl_3).	206

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C da Caulerpina (δ , CDCl_3 , 200 MHz) com dados da literatura (δ , CDCl_3 , 150 MHz), (LORENZO, 2010).....	48
Tabela 2: Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C (δ , CDCl_3 , 200 MHz) do derivado 01 e da caulerpina.....	53
Tabela 3: Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C e HMBC (δ , CDCl_3 , 500 MHz) do derivado 02 e da caulerpina (δ , CDCl_3 , 200 MHz).....	58
Tabela 4: Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C (δ , CDCl_3 , 200 MHz) do derivado 03 e da caulerpina (δ , CDCl_3 , 200 MHz).	60
Tabela 5: Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C e HMBC (δ , CDCl_3 , 500 MHz) do derivado 04 e da caulerpina (δ , CDCl_3 , 200 MHz).....	63
Tabela 6: Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C (δ , CDCl_3 , 200 MHz) do derivado 05 e da caulerpina (δ , CDCl_3 , 200 MHz).	66
Tabela 7: Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C e HMBC (δ , MeOD_3 , 500 MHz) do derivado 06 e da caulerpina (δ , CDCl_3 , 200 MHz).....	69
Tabela 8: Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C e HMBC (δ , CDCl_3 , 500 MHz) do derivado 07 e da caulerpina (δ , CDCl_3 , 200 MHz).....	75
Tabela 9: Estrutura e rendimento dos derivados ésteres <i>N</i> -substituídos da caulerpina.....	78
Tabela 10: Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C (δ , MeOD_3 , 200 MHz) do derivado 08 e da caulerpina (δ , CDCl_3 , 200 MHz).	82
Tabela 11: Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C (δ , MeOD_3 , 200 MHz) do derivado 09 e da caulerpina (δ , CDCl_3 , 200 MHz).	84
Tabela 12: Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C (δ , MeOD_3 , 200 MHz) do derivado 10 e do derivado 02 (δ , CDCl_3 , 200 MHz).....	86
Tabela 13: Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C (δ , MeOD_3 , 200 MHz) do derivado 11 e do derivado 03 (δ , CDCl_3 , 200 MHz).....	87
Tabela 14: Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C (δ , MeOD_3 , 200 MHz) do derivado 12 e do derivado 05 (δ , CDCl_3 , 200 MHz).....	89
Tabela 15: Estrutura e rendimento dos do ácido caulerpínico e dos derivados ácidos da caulerpina <i>N</i> -substituída.	90
Tabela 16: Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C (δ , CDCl_3 , 200 MHz) do derivado 13 e dados RMN ^1H e ^{13}C (δ , CDCl_3 , 200 MHz) da literatura.....	94

Tabela 17: Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C (δ , CDCl_3 , 200 MHz) do derivado 01 e 14	96
Tabela 18: Estrutura e rendimento da caulerpina e derivado 01 transesterificado.....	97
Tabela 19: Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C e HMBC (δ , CDCl_3 , 500 MHz) da mistura de derivados e dos derivados 01 e 14 isoladamente (δ , CDCl_3 , 200 MHz).....	99
Tabela 20: Gráficos do efeito da caulerpina e seus derivados sobre a viabilidade celular.....	103
Tabela 21: Valores absolutos de E_{max} CC_{50} da caulerpina e seus derivados frente à células vero.	106
Tabela 22: Concentração (μM) da caulerpina e seus derivados utilizadas nos ensaios de triagem antiviral.....	109
Tabela 23: Valores absolutos do percentual de inibição obtido no ensaio 1 de triagem antiviral para a caulerpina e seus derivados.....	111
Tabela 24: Valores absolutos do percentual de inibição obtido no ensaio 2 de triagem antiviral para a caulerpina e seus derivados.....	113
Tabela 25: Concentrações Inibitórias Mínimas e Fungicidas Mínimas (CIM/CFM) da mistura dos análogos 1 e 14 da caulepeina sobre <i>Candida</i> spp. Os valores de CIM e CFM estão expressos em $\mu\text{g/mL}$	116
Tabela 26: Efeito da mistura (derivados 1 e 14 da caulerpina) sobre a <i>C. albicans</i> na presença ou ausência de um protetor osmótico (sorbitol 0,8 M), indicando um potencial efeito sobre biossíntese da parede celular.	117
Tabela 27: Índice de compostos isolados	121

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Classificação Taxonômica do gênero Caulerpa Lamouroux	27
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS – Síndrome de imunodeficiência adquirida

CBS – Central Bureau voor Schimmelcultures

CC₅₀ – Concentração citotóxica de uma substância capaz de promover 50% de seu efeito máximo

CFM – Concentração fungicida mínima

CIM – Concentração inibitória mínima

CLSI – Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais

CSD – Caldo Sabouroud dextrose

DMEM – Meio dubelco

DMF – Dimetilformamida

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EC₅₀ – Concentração capaz de promover 50% do efeito máximo

E_{max} – Efeito máximo

FBS – Soro fetal bovino

HSV-1 - Vírus herpes simples tipo 1

HSV-2 – Vírus herpes simples tipo 2

IL-1 α – Interleucina 1

IL-2 α – Interleucina 2

INCT – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia

IV – Infravermelho

LAT- Latência associada à transcrição

MAPK – Proteína cinase ativada por mitógeno

MRSA- *Safilococcus aureus* resistente a meticilina

MTT - Ensaio de captação do corante Tetrazolium

QSAR – Relação estrutura química atividade

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SAR – Relação Estrutura Atividade

TCT- Trifenil cloreto de tetrazólio

THF – Tetraidrofurano

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

VERO – Células renais de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*)

SÚMARIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1 Produtos naturais marinhos	24
2.1.1 <i>Caulerpa</i>	27
2.2 Modificação estrutural para otimização de atividade.....	32
2.3 Alcalóides e caulerpina.....	36
2.4 Introdução de grupos químicos no núcleo indólico	38
2.5 Vírus Herpes Simples e os produtos naturais marinhos.....	40
2.6 A microbiologia e os produtos naturais marinhos.....	43
3 OBJETIVOS	46
3.1 Objetivo geral	46
3.2 Objetivos específicos.....	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 Isolamento da caulerpina.....	47
4.1.1 Metilação da caulerpina.....	49
4.1.2 N-alquilação da caulerpina	54
4.1.2.1 Inerção do grupo etila – Derivado 02	56
4.1.2.2 Inserção do grupo alila – Derivado 03.....	59
4.1.2.3 Inserção do grupo propargila – Derivado 04	61
4.1.2.4 Inserção do grupo benzila – Derivado 05	64
4.1.2.5 Inserção do grupo 3,4,5 hidroxibenzil.....	67
4.1.2.6 Inserção monodólica do grupo acetato de etila – Derivado 07	72
4.1.3 Semi-síntese do Ácido caulerpínico e ácidos da caulerpina <i>N</i> -substituídas – Derivados 07, 08, 09, 10 e 11	79
4.1.4 Transesterificação da caulerpina e caulerpina <i>N</i> -metil.....	91
4.1.5 Mistura dos derivados 01 e 14.....	97
4.2 Ensaio de citotoxicidade.....	102
4.3 Triagem antiviral.....	108
4.3.1 Ensaio 1 (Tratamento e infecção).....	109
4.3.2 Ensaio 2 (Pós-tratamento)	111
4.3.3 Avaliação morfológica dos ensaios 1 e 2	113
4.4 Atividade antifúngica	115

5 CONCLUSÕES.....	119
6 MATERIAL E MÉTODOS	120
6.1 Levantamento bibliográfico.....	120
6.2 Semi-síntese.....	120
6.2.1 Considerações gerais	120
6.2.2 Índice de compostos isolados	121
6.2.3 Procedimentos experimentais	124
6.2.3.1 Coleta e obtenção do extrato bruto da <i>Caulerpia racemosa</i>	124
6.2.3.2 Isolamento da Caulerpina (6E, 13E)-dimetil 5,12- dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b`] diindol-6,13-dicarboxilato).....	125
6.2.3.3 N-alquilações da caulerpina.....	131
6.2.3.3.1 Caulerpina N-metil (6E, 13E)-dimetil 5,12- dimetil- 5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b`] diindol-6,13-dicarboxilato).....	131
6.2.3.3.2 Caulerpina N-etil, Caulerpina N-alil, Caulerpina N-propargil, Caulerpina N-benzil, Caulerpina mono N-acetato de etila.	136
6.2.3.3.2.1 Caulerpina N – etil – derivado 02 (6E, 13E)-dimetil 5,12- dietil- 5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b`] diindol-6,13-dicarboxilato)	137
6.2.3.3.2.2 Caulerpina N – alil – derivado 03 (6E, 13E)-dimetil 5,12- dialil- 5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b`] diindol-6,13-dicarboxilato)	142
6.2.3.3.2.3 Caulerpina N – propargil – derivado 04 (6E, 13E)-dimetil 5,12- di(prop-2-in-1-il)- 5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b`] diindol-6,13-dicarboxilato)	146
6.2.3.3.2.4 Caulerpina N – benzil – derivado 05 (6E, 13E)-dimetil 5,12- dibenzil- 5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b`] diindol-6,13-dicarboxilato)	155
6.2.3.3.2.5 Caulerpina mono N-acetato de etila – derivado 07 (6E, 13E)-dimetil 5-(2-oxibutil)- 5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b`] diindol-6,13-dicarboxilato)	159
6.2.3.3.2.6 Monoácido da caulerpina - derivado 06 (6E, 13E)-13-(metoxicarbonyl)-5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b`] diindol-6-ácido carboxílico).....	167
6.2.3.3.3 Ácido caulerpínico e ácidos das caulerpina N- substituídas.....	172
6.2.3.3.3.1 Ácido caulerpínico – Derivados 08 (6E, 13E)-5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b`] diindol-6,13-ácido dicarboxílico)	173
6.2.3.3.3.2 Ácido caulerpina N-metil – Derivados 09 (6E, 13E)-5,12- dimetil- 5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b`] diindol-6,13-ácido dicarboxílico).....	177
6.2.3.3.3.3 Ácido caulerpina N-etil – Derivados 10 (6E, 13E)-5,12- dietil- 5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b`] diindol-6,13-ácido dicarboxílico).....	181

6.2.3.3.3.4 Ácido caulerpina <i>N</i> -alil – Derivados 11 (6E, 13E)-5,12- dialil- 5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b`] diindol-6,13-ácido dicarboxílico).....	186
6.2.3.3.3.5 Ácido caulerpina <i>N</i> -benzil – Derivados 12 (6E, 13E)-5,12- dibenzil- 5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b`] diindol-6,13-ácido dicarboxílico).....	191
6.2.3.3.4 Transesterificação da caulerpina e da caulerpina <i>N</i> -metil.....	196
6.2.3.3.4.1 Caulerpina <i>O</i> -etil – Derivados 13 (6E, 13E)-dietil 5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b`] diindol-6,13-dicarboxilato).....	196
6.2.3.3.4.2 Caulerpina <i>N</i> -metil <i>O</i> -etil – Derivado 14 (6E, 13E)-dietil 5,12- dimetil- 5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b`] diindol-6,13-dicarboxilato)	200
6.2.3.3.5 Mistura de derivados	203
6.3 Ensaio de citotoxicidade	207
6.4 Triagem antiviral.	208
6.5 Atividade antifúngica	209
6.5.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	209
6.5.2 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)	210
6.5.3 Verificação do possível mecanismo de ação da substância sobre a parede celular fúngica – ensaio do sorbitol.....	210
7 REFERÊNCIAS	211

1 INTRODUÇÃO

Desde o primórdio da química, os produtos naturais caracterizam uma das fontes mais importantes de novas substâncias utilizadas diretamente como agentes medicinais (CHEUKA et al., 2017). Estes produtos fornecem modelos para modificações estruturais e otimização de propriedades farmacológicas e bioquímicas para o benefício em diversas áreas, entre elas, a produção de fármacos. Estima-se que 80% dos fármacos são produtos naturais ou foram desenvolvidos por síntese química planejada inspirada na natureza, sendo exemplos desta afirmativa o analgésico morfina, o antibiótico penicilina, o anticâncer paclitaxel, dentre outros (BARREIRO; BOLZANE, 2009; COSTA-LOTUFO; WILKE; JIMENEZ, 2009).

Neste contexto, os organismos terrestres (principalmente micro-organismos e plantas) são os responsáveis por quase a totalidade da disponibilidade de produtos naturais bioativos (NEWMAN; CRAGG, 2012), em detrimento dos organismos marinhos, que representam fonte potencial de metabólitos secundários e que poderão representar ligações úteis para modelos estruturais no desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos com relevante potencial terapêutico, como antitumorais (HANSEN; ANDERSEN, 2016), antiviróticos (GOGINENI; SCHINAZI; HAMANN, 2015), antifúngicos (EL-HOSSARY et al., 2017) e anti-inflamatórios (CHEUNG et al., 2016).

Nos últimos anos, o número de compostos orgânicos isolados de fontes marinhas tem sido surpreendente em decorrência das pesquisas realizadas por indústrias que objetivam o desenvolvimento de novos fármacos com propriedades terapêuticas oriundos do mar. Dentre estas empresas cita-se a PharmaMar, que conta com uma coleção de mais de 65.000 organismos marinhos, de onde já foram isoladas 700 novas estruturas químicas e descritas 30 novas famílias de substâncias. Na revisão anual publicada em 2015 sobre os produtos naturais marinhos, Blunt et al. (2015) relacionam mais de 1370 moléculas isoladas apenas no ano de 2014 em todo o mundo, publicados cerca de 450 artigos internacionais. A literatura menciona a existência 4 fármacos de origem marinha em uso clínico - como anticâncer [ara-C (Citarabina[®]) e trabectedina (Yondelis[®])], antiviral [ara-A (Vidarabina[®])] e analgésico neuropático [ziconotídeo (Prialt[®])] (COSTA-LOTUFO; WILKE; JIMENEZ, 2009).

Apesar do grande potencial, a pesquisa em ciências do mar no Brasil teve seu ápice através do incentivo pelo Programa Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia, que em 2010 através do edital MCT/CNPq/FNDCT N° 71/2010 criou quatro Institutos de Ciências do Mar, dentre eles o INCT de Ambientes Marinhos Tropicais que reúne algumas das principais

instituições de ensino e pesquisa da Região Norte e Nordeste do Brasil, que atuam na área temática e geográfica de abrangência do mesmo. O seu caráter interdisciplinar na qual integra várias áreas afins no âmbito da biotecnologia, estando envolvidos pesquisadores da área de química e farmacologia que se integraram com a finalidade de promover a coleta, identificação e isolamento de moléculas oriundas de componentes marinhos que poderão servir como modelos estruturais para síntese ou semi-síntese de moléculas orgânicas bioativas, que serão testadas pelo grande grupo de farmacólogos em suas diversas áreas de atuação no intuito de encontrar produtos que possam ser utilizadas na terapêutica.

Neste contexto, estudos realizados por pesquisadores da Universidade Federal da Paraíba e da Universidade Federal de Alagoas com espécies de *Caulerpa* Lamouroux, comprovaram a atividade antiinflamatória do extrato metanólico da *Caulerpa mexicana* *in vitro* e *in vivo* (BITENCOURT et al., 2011; BITENCOURT et al., 2015) e as atividades anti-inflamatória (SOUZA et al., 2009) e colite ulcerativa do extrato metanólico de *Caulerpa racemosa* (BITENCOURT et al., 2015), bem como descreveram as atividades antinoceptivas (SOUZA et al., 2009), espamolítica (CAVALCANTE-SILVA et al., 2013; CAVALCANTE-SILVA et al., 2016) e antiviral frente ao Vírus Herpes Simples tipo 1 (MACEDO et al., 2012) do alcaloide bis-indólico, a caulerpina, componente majoritário dessas espécies. Outros autores descreveram a atividade antimicrobiana, inseticida e citotóxica para extratos do gênero *Caulerpa* (SOUZA et al., 2008; YANG et. al., 2015).

Diante da variedade de propriedades farmacológicas apresentadas pela caulerpina, Canché Chay et al. (2014) descreveram a síntese desta molécula, partindo-se de soluções de moléculas indólicas e com rendimentos superiores ao observado em processos de extração e purificação de produtos naturais.

O amplo potencial farmacológico descrito para substâncias oriundas de organismos marinhos, demonstra que estas moléculas podem ser utilizadas visando a melhoria da qualidade da assistência médica, principalmente no que diz respeito ao tratamento dos pacientes portadores de doenças infecciosas causadas por vírus e fungos. Dentre as infecções virais mais prevalentes no mundo, citam-se as provocadas pelo Vírus Herpes Simples (HSV), um vírus DNA que, no Brasil, é responsável pelo aparecimento anual de 640 mil novos casos de herpes genital diagnosticados (CLEMENS, FARHAT, 2010). No âmbito das patologias causadas por fungos, dados epidemiológicos atuais impulsionam a realização de investigações para identificação de novas moléculas capazes de atuar contra essas infecções. Apesar da variedade de antifúngicos para profilaxia e tratamento de candidíase, verifica-se um aumento expressivo do número de casos de infecção, associado à ampliação de espécies de *Candida*

resistentes às drogas disponíveis (YILMAZ-KARADAQ et al., 2016; TSUI; KONG; JABRA-RIZK, 2016).

Apesar do comprovado histórico da utilização de produtos naturais, no tratamento de patologias e da sua incontestável complexidade e diversidade estrutural frente às estruturas sintéticas, as moléculas obtidas destas fontes ainda apresentam limitações, tais como baixa solubilidade ou instabilidade química. Esta observação impulsiona os profissionais da química a promoverem modificações estruturais nos fármacos buscando aumentar a solubilidade, potência, estabilidade e seletividade de fármacos protótipo (CHEN et al., 2015).

Diante do exposto e reconhecendo a importância do gênero *Caulerpa* no que tange a produção de constituintes químicos das mais variadas classes com potencial farmacológico, este estudo propôs a realização de modificações estruturais no componente majoritário da *Caulerpa racemosa*, a caulerpina, visando-se estabelecer quais regiões moleculares poderiam tolerar modulação estrutural e avaliar o potencial antiviral das novas moléculas frente o vírus HSV-1 e cepas de *Candida* spp, respectivamente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

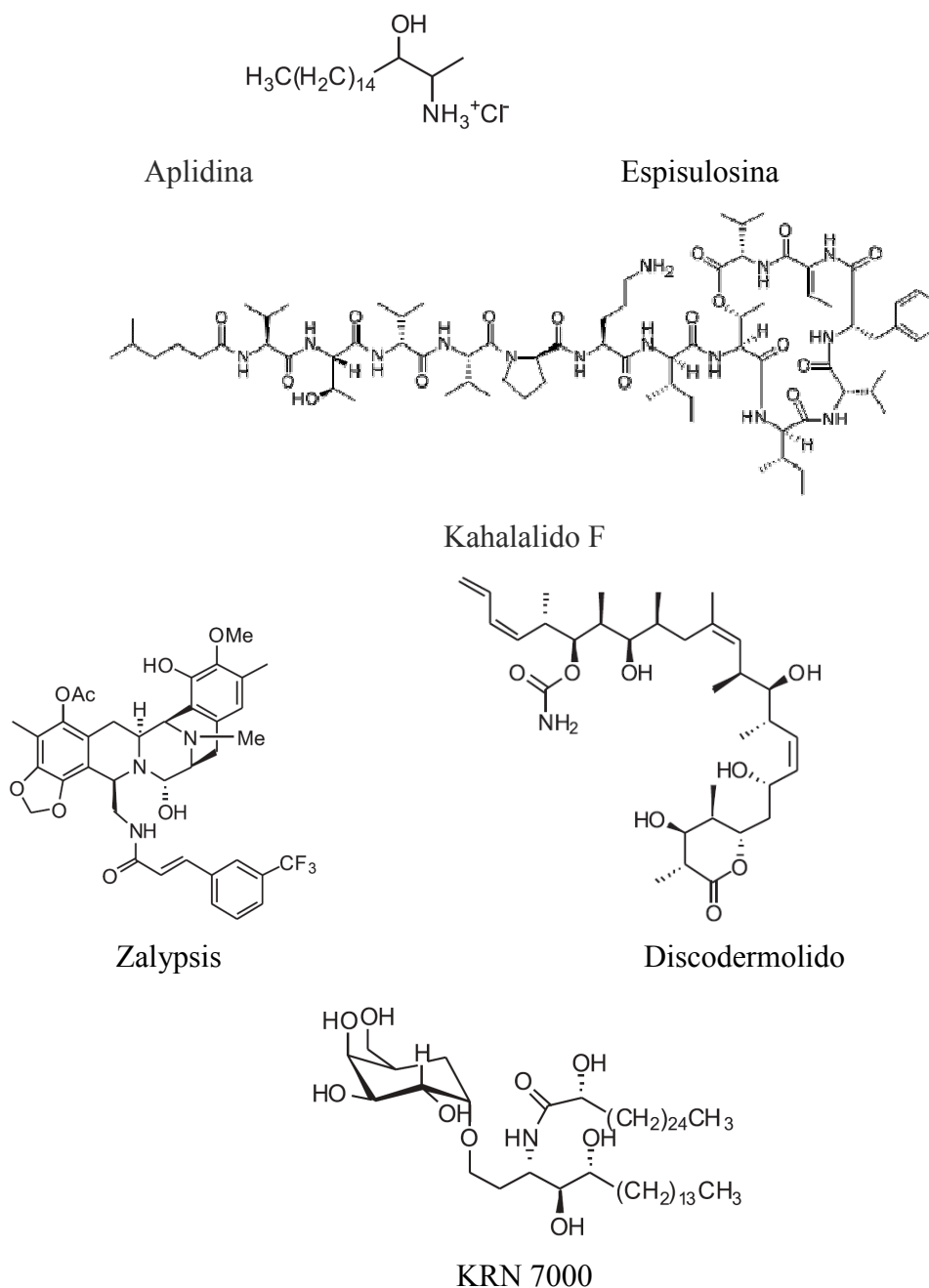
2.1 Produtos naturais marinhos

O oceano, um macro ambiente equilibrado, auto-suficiente e relativamente pouco explorado, causou efeito profundo na química de produtos naturais. Este ambiente tornou-se alvo de pesquisas e tem impulsionado o desenvolvimento de processos biotecnológicos para elucidação de moléculas potencialmente bioativas para fins terapêuticos (FELÍCIO et al., 2008; SILBER et al., 2016).

Apesar do reduzido número de fármacos de origem marinha, a diversidade química desses produtos associada à pluralidade dos alvos terapêuticos oferece perspectivas inovadoras na abordagem clínica de várias patologias. Atualmente, existe um número considerável de substâncias candidatas a fármacos em fase de testes não-clínicos e clínicos que podem reconhecer alguns alvos terapêuticos como canais iônicos, enzimas, microtúbulos, DNA, lisossomos, calmodulina, proteossomos, além de indução de estresse oxidativo e modulação do sistema imunológico, o que ressalta o potencial destas moléculas na cura de doenças. Desta forma, as conquistas e o progresso da pesquisa de produtos naturais marinhos já fazem honrado o seu lugar na indústria farmacêutica, e a promessa de fármacos de origem marinha tornou-se, definitivamente, realidade (COSTA-LOTUFO et al., 2009).

Costa-Lotufo et al. (2009) citam alguns fármacos de origem marinha atualmente comercializados com atividade antitumoral (Figura 1), tais como: aplidina, isolado da ascídia mediterrânea *Amplidium albicans*; kahalalido F, isolado do molusco *Elysia rufescens*; discodermolido isolado da esponja marinha *Discordemia dissoluta*; episulosina isolada do molusco *Mactromeris*; zalypsis isolada do molusco *Jorunna funebris* e KRN7000 isolado da esponja marinha *Agelas mauritanus*.

Figura 1: Fármacos de origem marinha comercializados com atividade antitumoral.



As macroalgas marinhas são encontradas em uma grande diversidade de espécies no extenso litoral brasileiro. Apesar do grande potencial, até o ano de 2006 pouco deste recurso havia sido explorado nas indústrias farmacêuticas. (BARBOSA-FILHO, 2006). No campo da pesquisa, uma diversidade de investigações que contemplam a descoberta de novas substâncias com potencial para o desenvolvimento de fármacos aponta a potencialidade da

ecologia marinha para esse campo de atuação. Estudos que envolvem efeito dos produtos marinhos de origem natural contra obesidade (WAN-LOY; SIEW-MOI, 2016), diabetes (LAURITANO; IANORA, 2016), câncer (CANALS et al., 2017; CHANG et al., 2017), bem como são observadas ação antimicrobiana, anti-inflamatória, analgésica, neuroprotetora (MALVE, 2016) e antiviral (MACEDO et al., 2012).

As algas, indivíduos da flora marinha, compreendem um agrupamento de organismos que têm muito pouca coisa em comum a não ser o fato de serem predominantemente aquáticas e desprovidas de um tecido constituído de células estéreis envolvendo os órgãos de reprodução e de um sistema diferenciado para condução de água. Por esta razão são grupos polifiléticos e não constituem uma categoria taxonômica definida, mas sim um amontoado de categorias díspares, tão diversas que chegam a ser classificadas em 2 ou 3 reinos diferentes, tradicionalmente conhecidos como Monera, Protista e Plantae, ou ainda com diferentes denominações em outros sistemas apoiados em dados de biologia molecular. Neste ambiente, as algas podem fazer parte dos bentos (indivíduos fixos no substrato) ou plâncton (indivíduos suspensos na água). A faixa litorânea que as algas bênticas habitam pode estar dividida em: supralitoral (faixa mais alta do litoral), mesolitoral (pode estar temporariamente descoberto nas marés-baixas) e infralitoral (faixa que nunca fica exposta ao ar) (HORTA, 2000).

Do ponto de vista bioquímico e fisiológico, as algas são similares em muitos aspectos às outras plantas, possuindo as mesmas vias bioquímicas básicas, possuem *clorofila a* como principal pigmento fotossintético e carotenoides (β -caroteno e fucoxantina), ficocianina e ficoeritrina como pigmentos acessórios. Ainda seus polissacarídeos e proteínas biossintetizados são comparáveis àqueles das plantas superiores (SOUTH; WHITTICK, 1987).

A literatura reconhece nove divisões de algas: Cyanobacteria, Glaucophyta, Euglenophyta, Cryptophyta, Haptophyta, Dinophyta (dinoflagelados), Ochrophyta (englobando as diatomáceas, algas pardas e outras), Rhodophyta (algas vermelhas) e Chlorophyta (algas verdes), as quais são classificadas utilizando-se critérios como estrutura celular, bioquímica, biologia molecular, pigmentos fotossintéticos, natureza química dos produtos de reserva e composição da parede celular, morfologia e ciclo de vida (GRAHAM; WILCOX, 2000).

2.1.1 *Caulerpa*

As algas verdes do gênero *Caulerpa* Lamouroux (Quadro 1) fazem parte da família Caulerpaceae e consistem em aproximadamente 60 espécies com grande variedade taxonômica, que habitam águas marinhas rasas em regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo (BRAYNER, PEREIRA, PEDROSA, 2008).

Quadro 1: Classificação Taxonômica do gênero *Caulerpa* Lamouroux (ALGAEBASE, 2016).

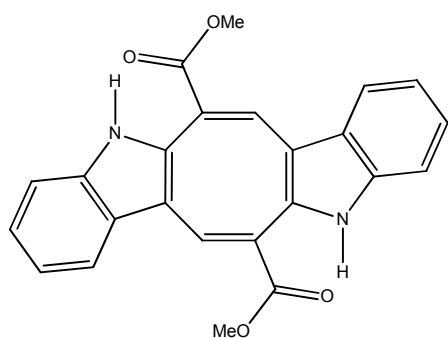
Reino	Plantae
Filo (Divisão)	Chlorophyta
Classe	Ulvophyceae
Ordem	Bryopsidales
Família	Caulerpaceae
Gênero	<i>Caulerpa</i> Lamouroux

O gênero *Caulerpa* produz várias classes de metabólitos secundários com potencial farmacológico, particularmente alcaloides bisindólicos e terpenoides, incluindo sesquiterpenos e diterpenoides com aldeídos e/ou acetatos álcoois como grupos funcionais. Estudos relatam uma ampla variedade de atividades biológicas para os compostos extraídos deste gênero, tais como, antimicrobiana, inseticida, ictiotóxica, anti-inflamatória, citotóxica (SOUSA et al., 2008; YANG et. al., 2015), antioxidante, antimutagênica e antiproliferativa (OSUNA-RUIZ et al., 2016).

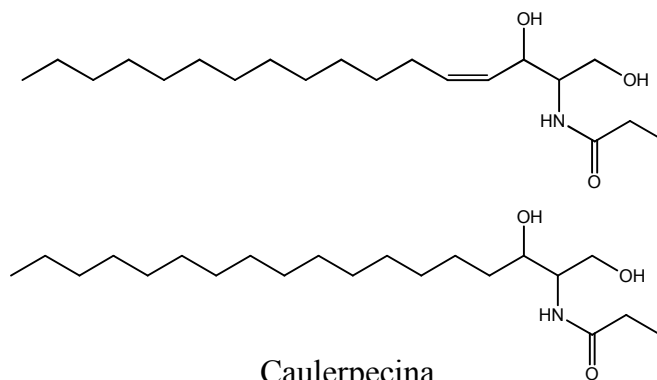
A caulerpina, alcaloide indólico, é a substância majoritária deste gênero tendo sido relatada em vinte espécies, entre elas a *C. ashmeadii*, *C. lamourouxii*, *C. lentillifera*, *C. mexicana* (SCHEWEDE et al., 1987), *C. peltata* (CAPON et al., 1983) *C. racemosa* (AYYAD; BADRIA, 1994), *C. sertularioides* (RAUB; CADERLINA; SCHWEDE, 1987; XU; CEN; ZENG, 1998). Estudos levaram ao isolamento do sesquiterpeno caulerpircina, uma mistura de homólogos de hidroxi-amidas e isolado da *C. ashmeadii*, *C. paspaloides*, *C. lentillifera*, *C. racemosa* var *Uvifera* e *C. sertularioides* (VEST et al., 1983; NIELSEN et al.,

1982), caulerpenina, metabólito majoritário da *Caulerpa taxifolia* (AMICO et al., 1978), flexilina (BLACKMAN; WELLS, 1978), e dos esteroides β -sistoterol e o colesterol, (ANJANEYULU et al., 1991; XU, CEN, ZENG, 1998; HANDLEY; BLACKMAN, 2001), o diterpeno trifarina, o ácido caulerpínico (PAUL; FENICAL, 1985) isolados de *Caulerpa mexicana*, e a caulersina purificadas da *C. serrulata* (Figura 2) (SU, et al., 1997).

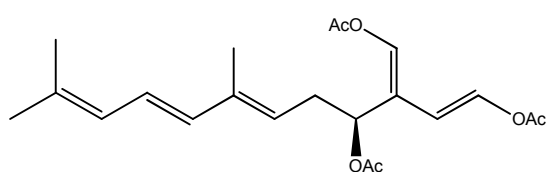
Figura 2: Principais substâncias isoladas do gênero *Caulerpa*.



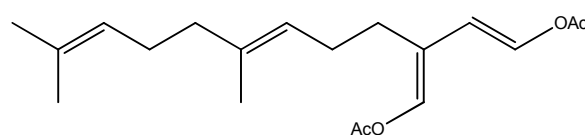
Caulerpina



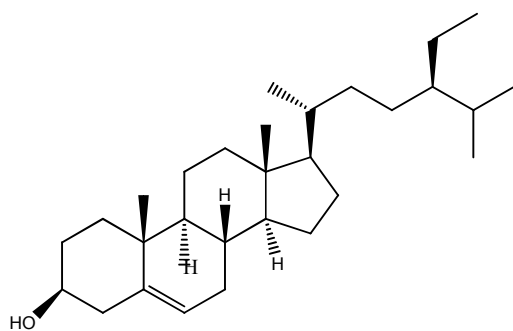
Caulerpecina



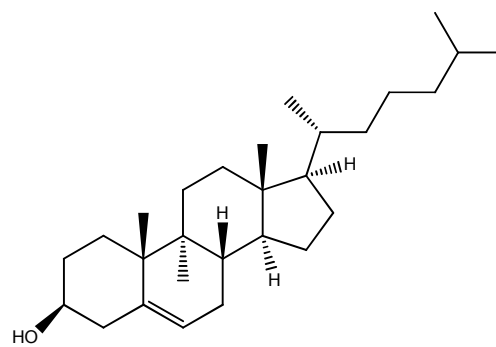
Caulerpenina



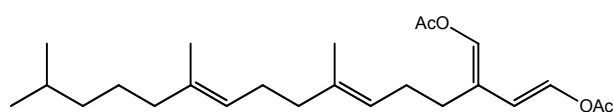
Flexilina



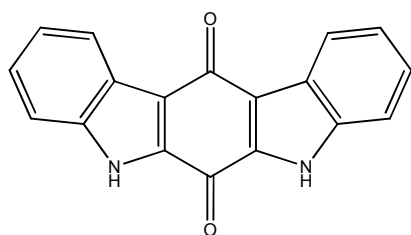
B-sitosterol



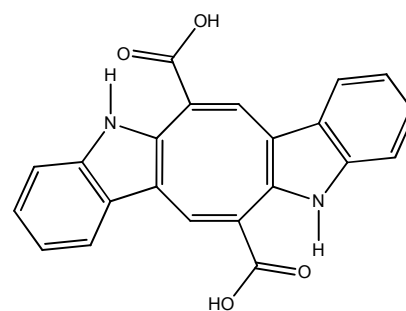
Colesterol



Trifarina



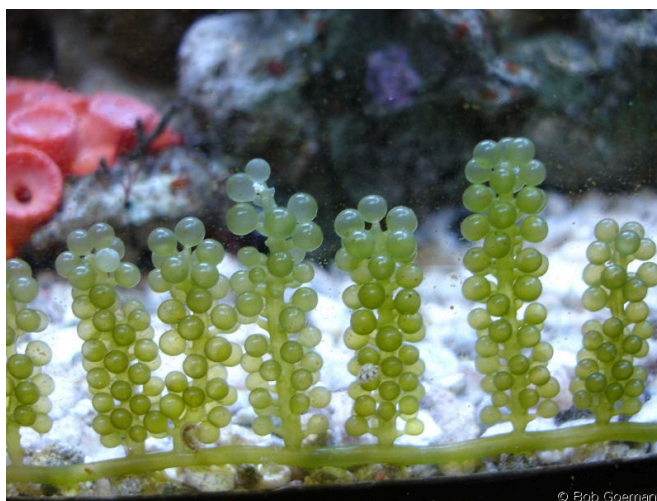
Caulersina



Ácido Caulerpinico

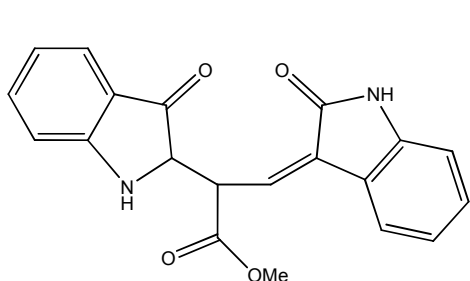
A *Caulerpa racemosa* (Forssk.) J. Agardh (Figura 3), popularmente conhecida como “uvas do mar”, é uma alga marinha verde, comestível e amplamente distribuída no litoral do nordeste brasileiro. Esta espécie caracteriza-se por estolão glabro cilíndrico, ramificado, com 1,5-2,5 mm de diâmetro e 1,9-4,7 cm de altura. Apresenta rizoides ramificados, ramos assimiladores constituídos por um eixo central, pouco ramificado com 2,3-3,6 mm de diâmetro, râmulo distribuídos irregularmente em torno do eixo, podendo estar dispostos de forma dística ou trística, sempre permitindo a visualização do eixo principal, desnudos na porção basal e acima cobertos por râmulo irregularmente distribuídos. São observados râmulo piriformes a subglobosos, pedúnculo subsésseis a curtos, ápices dilatados com 1,8-3,1 mm (BRAYNER; PEREIRA; PEDROSA, 2008).

Figura 3: Estrutura da *Caulerpa racemosa* (SALTCORNER, 2016).

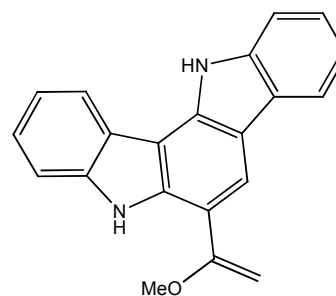


Estudos fitoquímicos sobre a alga verde *Caulerpa racemosa* culminaram no isolamento e identificação dos alcaloides bisindólicos racemosinas A-C, dois novos para xilenos prenilados, caulerprenois A e B (LIU et al., 2013; YANG et al., 2014), três diterpenoides, incluindo um par de epímeros, as lactonas diterpenoides racemobutenolidos A e B, 4'5'-dehidro-diodictionema A, um α tocoferoide, α tocoxilenoxi e um esteroide 28-oxostigmastino(23E) 3 β -hidroxi-stgmasta-5,23-dien-28-ona (Figura 4). Este mesmo estudo demonstrou ainda que os compostos 4'5'-dehidro-diodictionema A e 28-oxostigmastino(23E) 3 β -hidroxi-stgmasta-5,23-dien-28-ona inibem a proteína tirosina fosfatase, que compreende uma grande enzima sinalizadora que controla várias funções celulares (YANG et al., 2015)

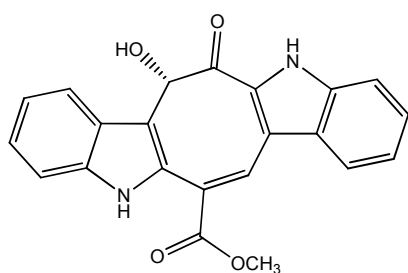
Figura 4: Substâncias isoladas da espécie *Caulerpa racemosa* (LIU et al., 2013; YANG et al., 2014; YANG et al., 2015).



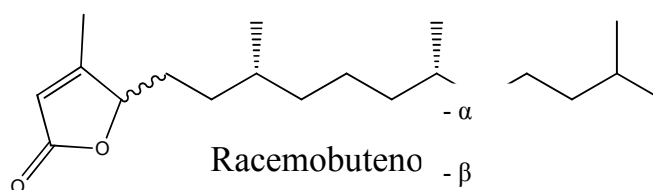
Racemosina A



Racemosina B

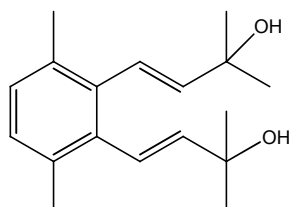


Racemosina C

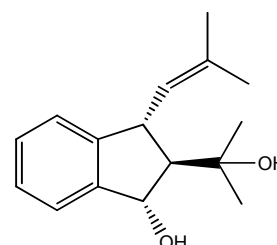


Racemobuteno - α
- β

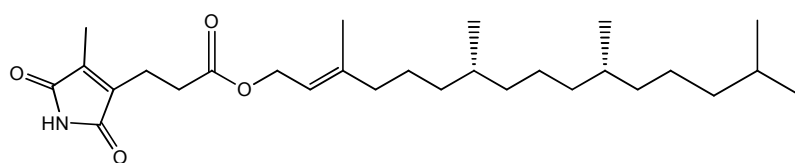
Racemobutenolido B



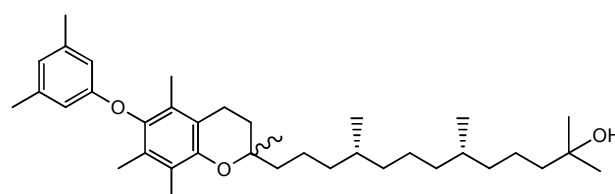
Caulerprenilol A



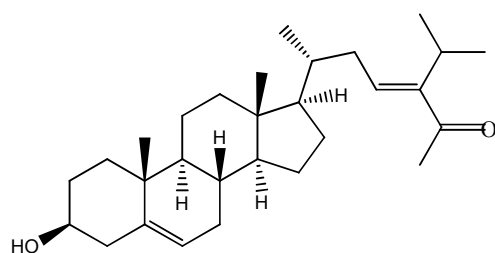
Caulerprenilol B



4'5'dehidro-diodictionema A



α tocoxilenoxi



28-oxostigmastino(23E) 3 -hidroxi-stgmasta-5,23-dien-28-ona

De acordo com estudos realizados por Liu et al. (2012) e Liu et al. (2013) a caulerclorina e as racemosinas A-C exibiram seletiva e moderada atividade antifúngica sobre as espécies *Candida glabrata* (537), *Trichophyton rubrum* (Cmccftla) e *Cryptococcus neoformans* (32609). A caulerclorina também demonstrou atividade sobre *Candida albicans* (SC5314), *Candida albicans* (Y0109), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Microsporium gypseum* (Cmccfmza) e *Aspergillus fumigatus* (07544). Além desta atividade, foi relatado para as racemosinas A-C e 3 β -hidroxi-stigmasta-5,23-dien-28-ona um potente efeito neuroprotetor contra danos em células SH-SY5Y induzidas por A β ₂₅₋₃₅ e significativa atividade inibidora contra PTP1B, respectivamente (YANG et al., 2014; YANG et al., 2015).

2.2 Modificação estrutural para otimização de atividade

Apesar do comprovado histórico da utilização de produtos naturais no tratamento de patologias e da sua incontestável diversidade estrutural, as moléculas obtidas destas fontes ainda apresentam limitações, tais como baixa solubilidade ou instabilidade química, o que torna evidente a necessidade da realização de mais estudos na área da química farmacêutica. Neste contexto, muitos pesquisadores se dedicam a identificação de moléculas protótipas, que correspondem aos compostos com atividade farmacológica útil, mas que ainda são portadoras de efeitos secundários indesejáveis que não podem ser negligenciado. Paralelamente, com o intuito de se obter moléculas mais ativas e mais seletivas para o seu alvo, outros cientistas se dedicam à modificação estrutural de componentes majoritários de plantas medicinais para otimização de atividades farmacológicas ou redução de efeitos indesejáveis, através de tecnologias químicas (síntese), biológicas (bioensaio e ADME- Tox) e computacionais (*softwares*) (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; PATRICK, 2013).

A modificação estrutural de moléculas extraídas de produtos naturais deve considerar suas propriedades farmacológicas, que definitivamente são indispensáveis, farmacocinéticas e toxicológicas. É necessário realizar modificações seletivas nos produtos naturais considerando as deficiências na estrutura, farmacologia, propriedades físico-químicas e farmacocinéticas, visando promover um aumento na potência e seletividade através da melhoria de propriedades como a solubilidade, distribuição, capacidade de ionização, etc, como também a redução de efeitos colaterais (CHEN et al., 2015).

A observação da estrutura química de uma molécula como determinante da sua ação fisiológica, ocorre em função da presença de grupos farmacofórico com subunidades estruturais e/ou grupos funcionais com perfis eletrônicos e estéricos que atuam em alvos

biológicos específicos, como um receptor ou uma enzima. Essa interação é essencial à atividade farmacológica e ocorre em decorrência de um reconhecimento molecular do fármaco com seu sítio de ação, de forma que haja uma complementaridade, inclusive espacial, entre ambos. Derivados estruturais desses fármacos são obtidos através de manipulação experimental e virtual mediante a inserção e/ou retirada de grupos que possam alterar o seu efeito farmacológico, suas propriedades farmacocinéticas e/ou farmacodinâmicas que sejam importantes para o alcance da resposta biológica desejada. No entanto, as mínimas variações na estrutura química podem alterar a potência da ação do fármaco (MONTANARI, 2011).

Muitas mudanças podem ser introduzidas em uma molécula, dependendo dos seus grupos reativos e dos objetivos da pesquisa. Alguns autores sugerem iniciar as modificações introduzindo grupos que confiram à molécula em estudo uma maior ou menor hidrofobicidade ou grupos doadores e/ou aceptores de elétrons, permitindo a avaliação das modificações através de métodos de correlação estrutura-atividade, que pode ser qualitativa ou quantitativa (SAR e QSAR). Deve-se considerar ainda, que compostos inativos para uma determinada ação farmacológica, quando submetidos a pequenas modificações estruturais podem revelar importantes efeitos biológicos (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

As informações acumuladas em estudos SAR possibilitam o estabelecimento de algumas generalizações sobre os efeitos biológicos gerados por específicas modificações estruturais.

1. *Introdução de grupos metilênicos.* A inserção de substituintes alquilo e esqueleto de carbono aumentam as dimensões das moléculas, assim como a sua lipofilicidade. Esta propriedade pode resultar em aumento no número de interações entre a molécula e regiões hidrofóbicas do sítio de ligação através das forças de Van der Waals, além do aumento da do transporte através das membranas biológicas, resultando no aumento da potência do fármaco. Além da potência, a própria atividade farmacológica do derivado pode sofrer alteração (PATRICK, 2013; ZHAO et al., 2015).
2. *Modificação do grau de instauração.* A introdução ou retirada de duplas ligações, pode favorecer o derivado a um melhor ajustamento na interação com o receptor. No entanto, se o fármaco insaturado estiver envolvido em ligações de van der Waals com uma superfície plana de um receptor, incapacitando o derivado de se aproximar adequadamente da superfície receptora, a saturação poderá enfraquecer tal interação culminando com a perda da atividade.
3. *Fechamento ou abertura de anel.* Modificação estrutural muito explorada por promover a modificação da potência farmacológica.

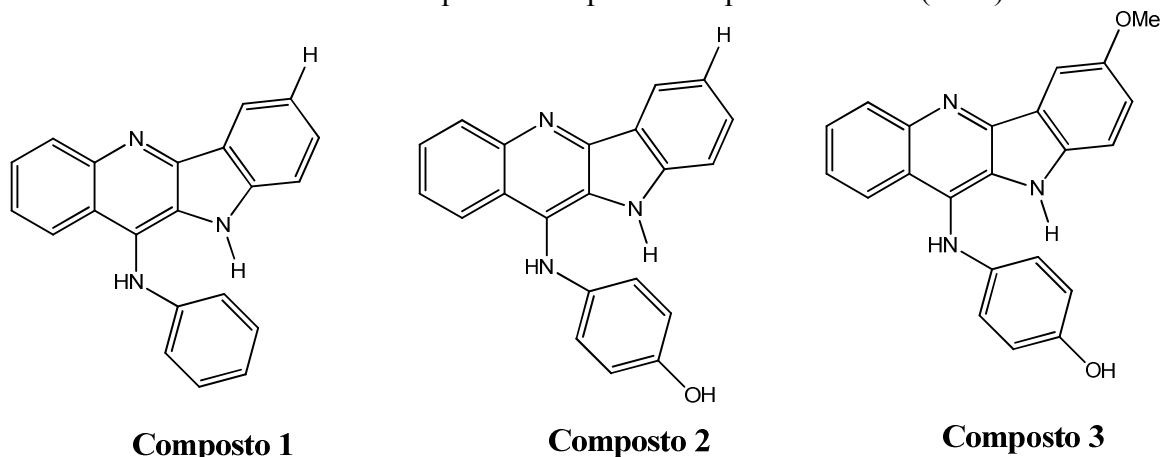
4. *Introdução ou retirada do anel.* O aumento das dimensões moleculares pela introdução de um anel pode ser extremamente útil quando no sítio receptor existe uma cavidade hidrofóbica passível de ser ocupada pelo anel, fortalecendo, assim, a energia de ligação e a seletividade do ligante (MONTANARI, 2011).
5. *Introdução de grupos substituintes.* Cada grupo funcional produz efeitos específicos na molécula. As propriedades eletrônicas do radical inserido refletem na forma e conformação da nova substância, produzindo compostos físico-quimicamente diferentes com distintas propriedades farmacodinâmicas, farmacocinéticas e toxicológicas. Grupos halogenados são quimicamente mais reativos, podendo provocar efeitos tóxicos ao alquilar uma grande variedade de macromoléculas, principalmente aminas de proteínas e ácidos nucleicos (PATRICK, 2013). A introdução de grupamentos metilas normalmente aumenta a lipofilicidade e reduz a solubilidade em água, enquanto a inserção de grupos hidroxila, geralmente diminuem a lipofilicidade e aumentam a solubilidade em água, além de possibilitar a formação de ligações de hidrogênio com o receptor. Compostos alifáticos contendo halogênios são mais reativos do que os aromáticos. A introdução de grupos básicos e ácidos em uma molécula produz derivados com menor solubilidade nos lipídeos e maior solubilidade em água, em decorrência da capacidade de formarem sais *in vivo*. Os grupos básicos mais explorados em fármacos são aminas, inclusive as cíclicas, amidinas e guanidinas. Os grupos ácidos mais usuais são o ácido carboxílico (-COOH) e o ácido sulfônico (-SO₃H) (MONTANARI, 2011).

Considerando que a maior parte dos medicamentos disponíveis para a terapêutica apresentam administração oral, fármacos com baixa solubilidade em água apresentarão baixa absorção e biodisponibilidade. Embora a tecnologia farmacêutica tenha desenvolvido mecanismos para a administração oral de fármacos lipossolúveis, este ainda é um problema a ser solucionado. A fim de aumentar a solubilidade das moléculas pode-se inserir nas estruturas químicas grupos ionizáveis ou polares (CHEN et al., 2015).

6. *Substituição de grupos substituintes por isósteros.* Isósteros são átomos, grupos de átomos, íons ou moléculas que compartilham a mesma valência e que têm semelhanças químicas ou físicas. O -SH, -NH₂ e -CH₃ são exemplos de isósteros de -OH, enquanto que -S-, -NH- e -CH₂- são isósteros de -O-. Derivados podem ser obtidos através de sutis substituições isostéricas, no entanto, estas novas moléculas não apresentam necessariamente a atividade biológica em questão, concluindo-se que os grupos substituintes que integram um fármaco são vitais para a interação do ligante com o receptor (PATRICK, 2013).

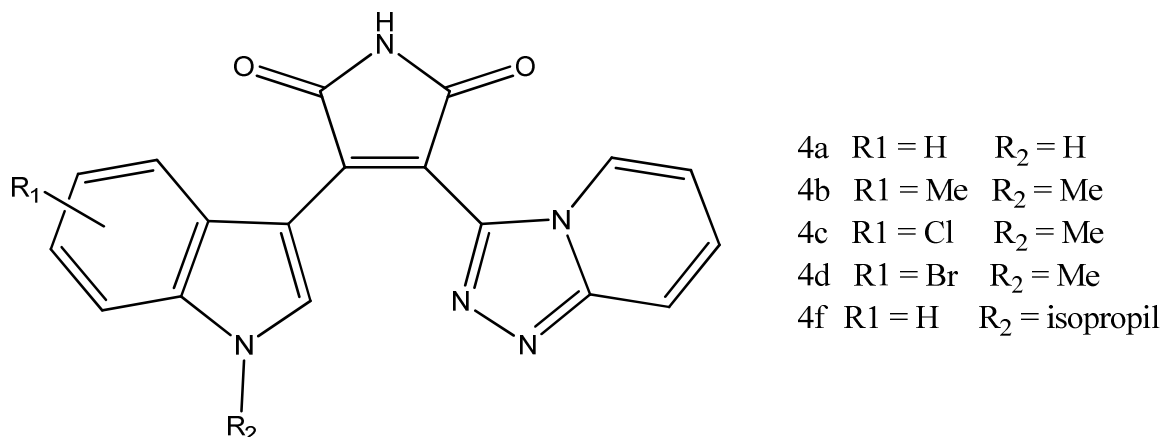
Zhao et al. (2015) ao estudarem a relação estrutura-atividade de derivados da molécula indol [3,2-b] quinolina (composto 1) contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) demonstraram que a inserção de grupo hidroxila (composto 2) altera as concentrações inibitórias mínimas frente às cepas OM481 e OM584, que no composto protótipo foi de 8 µg/mL e 16 µg/mL respectivamente, para de 4 µg/mL e 2 µg/mL. Em experimentos sequenciais observou-se que a adição do substituinte metoxila ao composto 2 produziu o composto 3 que apresentou CIM de 2 µg/ mL para ambas as cepas (Figura 5). Esse estudo evidenciou que a inserção de grupos metil e hidroxila afetam a atividade anti-MRSA.

Figura 5: Estrutura do derivado indolquinolínico produzido por Zhao et al. (2015).



Em um estudo realizado por Ye et al. (2015) foram sintetizados uma série de novos 3-([1,2,4]triazolo[4,3-a]pyridin-3-yl)-4-(indol-3-yl)-maleimidas (Figura 6). Os compostos 4b, 4c, 4d e 4f produzidos neste estudo demonstraram atividade inibitória mais potente e seletiva frente a GSK-3b, substrato da fosforilação em Ser396 em neurônios primários, quando comparados ao protótipo 4a, evidenciando que as substituições realizadas no núcleo indólico através da inserção de grupos metil e átomos de halogênios fortaleceram a atividade neuroprotetora.

Figura 6: Estrutura química dos compostos sintetizados por Ye et al. (2015).

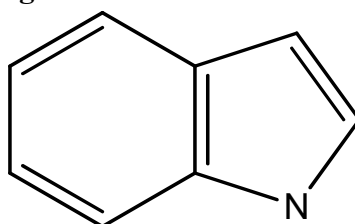


2.3 Alcalóides e caulerpina

Segundo a literatura a ausência de uma separação precisa entre alcaloides propriamente ditos e aminas complexas de ocorrência natural dificulta a definição de alcaloides. No entanto, Pelletier (1998) definiu alcaloides como uma substância orgânica de origem natural, cíclica, contendo um nitrogênio em um estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os organismos, predominantemente em angiospermas. Esta classe de compostos encontra-se dividida em: alcaloides verdadeiros possuem nitrogênio em cadeia cíclica e derivam de aminoácidos; protoalcaloides possuem nitrogênio em cadeia alifática e pseudoalcaloides, compostos nitrogenados com ou sem anéis que não são derivados de aminoácidos. A presença de alcaloides pode ser responsável por uma ampla gama de atividade biológica investigadas nos seres vivos, tais como, anticolinérgica, anti-hipertensiva, antitumoral, diurética, miorelaxante, antiviral, entre outras (SIMÕES et al., 2007)

Em decorrências das variadas rotas biossintéticas e das várias estruturas que possibilitam a formação dos alcalóides, estes compostos são divididos em várias classes, com variados tipos de núcleos, dentre estas cita-se os alcaloides indólicos (Figura 7), cuja origem está relacionada ao aminoácido L-triptofano (SIMÕES et al., 2007).

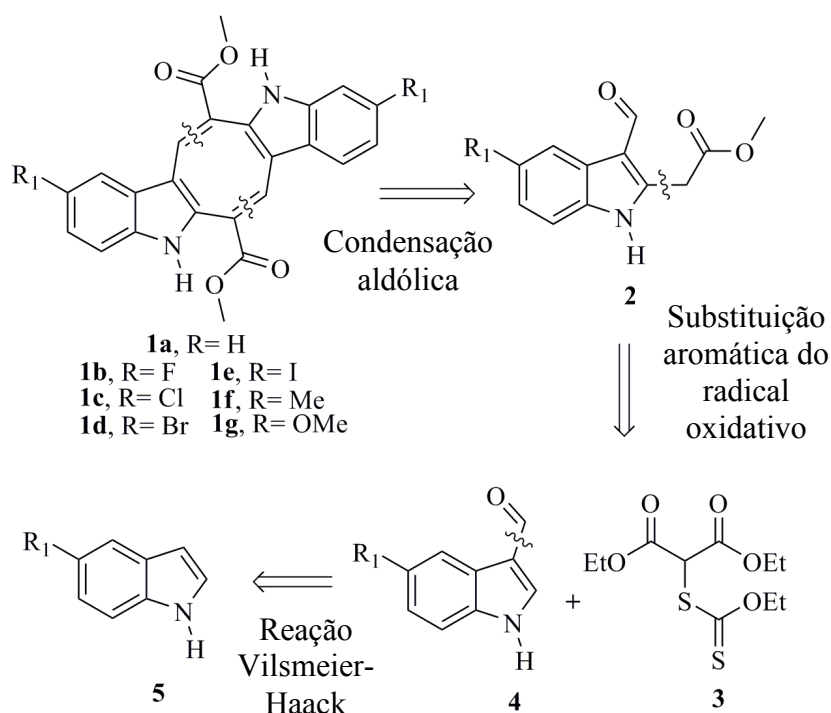
Figura 7: Núcleo indólico



A caulerpina, alcaloide indólico, é a substância majoritária do gênero *Caulerpa* tendo sido relatada em vinte espécies. Muitas das propriedades biológicas relatadas para os extratos de deste gênero deve-se a atividade da caulerpina (Figura 2). Macedo et al. (2012) descreveram este alcaloide indólico como um fármaco alternativo ao aciclovir durante o tratamento de infecções por HSV-1 através da inibição das fases alfa e beta do ciclo de replicação viral. Vários artigos científicos mencionam as propriedades farmacológicas da caulerpina tais como, atividade antiinflamatória (SOUZA et al., 2009; BITENCOURT et al., 2015), antinociceptiva (SOUZA et al., 2009), espasmolítica (CAVALCANTE-SILVA et al., 2013; CAVALCANTE-SILVA et al., 2016) e anti-tuberculose (CANCHÉ CHAY et al., 2014).

A Figura 8 demonstra a análise retrossintética da caulerpina e de alguns derivados que foi realizada por Canché Chay et al. (2014), partindo do indol e derivados, que sofreram uma etapa de formilação através da reação de Vilsmeier-Haack, seguida de uma etapa de substituição aromática oxidativa radicalar, seguida de descarboxilação e posterior condensação aldólica, na presença de dietilamina e piperidina, em refluxo, obtendo-se a caulerpina em um rendimento global de 11%.

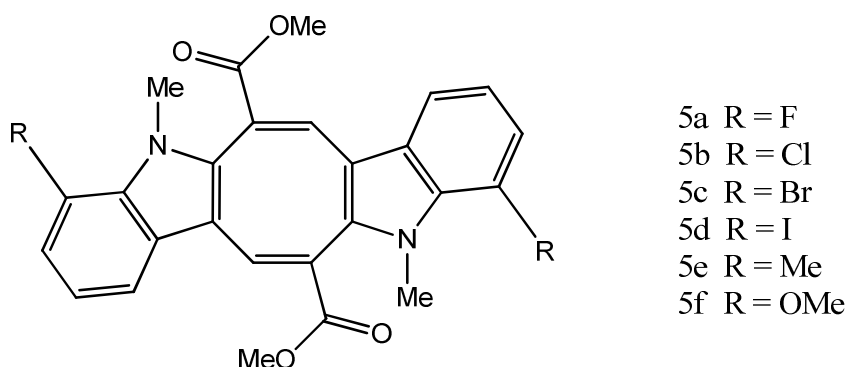
Figura 8: Análise retrossintética utilizada como estratégia para a síntese da caulerpina e derivados realizada por Canché Chay et al., (2014).



Visando avaliar a atividade anti-tuberculose de derivados estruturais da caulerpina, Canché Chay et al., (2014) descreveram metodologia para a síntese das moléculas 5a-5f

partindo de uma molécula indólica diferente da caulerpina (Figura 9). No entanto, apesar da atividade anti-tuberculose ter sido observada para a caulerpina esta atividade biológica não foi identificada para os derivados sintetizados.

Figura 9: Estrutura química de derivados da caulerpina (CANCHÉ CHAY et al., 2014)



2.4 Introdução de grupos químicos no núcleo indólico

Ao longo das últimas décadas, os compostos *N*-heterocíclicos contendo indol em suas estruturas receberam destaque por suas implicações nos campos da química, biologia e ciências de materiais (SARMIENTO et al., 2011). Os *N*-alquil-indols são os intermediários responsáveis pela grande versatilidade de utilização destas moléculas, no entanto, as vias disponíveis para a síntese destes intermediários ainda são limitadas (ZHAO et al., 2014).

Simultaneamente, vários estudos relatados na literatura ressaltam a necessidade de proteção do núcleo indólico (DE GRAW, KENNEDY, 1966; BOWMAN, EVANS, JONES, 1956; BERGAMAN, BACKVALL, 1972; KETCHA, GRIBBLE, 1985). Para este fim podem ser utilizados dois tipos de grupos protetores: grupos doadores de elétrons e grupos retiradores de elétrons. Apesar das metodologias tradicionalmente descritas para adição de grupos retiradores de elétrons exigir a participação de bases fortes como BuLi (SAULNIER, GRIBBLE, 1982; LIU, ZHANG, GAN, 1997), NaNH₂ (SOERENS et al., 1979) e NaH (SUNDBERG, RUSSELL, 1973) esses grupos são utilizados com maior frequência. Nestes casos, o núcleo indólico forma um ânion e reage como base ou nucleófilo com haletos de alquila, alcila e sulfonila. Para estruturas contendo núcleo indólico e grupos funcionais este processo pode ser limitado, devendo-se ter atenção especial para evitar a hidrólise (OTTONI, CRUZ, ALVES, 1998).

Entre a maioria dos grupos retiradores utilizados para proteger o indol estão sulfonil e acil. A ampla utilização destes grupos justifica-se por dois fatores: os reagentes necessários para gerá-los são comercialmente disponíveis, de baixo custo e removidos dos produtos reacionais com relativa facilidade. Embora os grupos doadores de elétrons tenham sido utilizados com menor frequência como protetores indólicos, o grupo benzil representa uma boa alternativa (OTTONI, CRUZ, ALVES, 1998).

As metodologias aplicadas para a proteção de núcleos indólicos, podem utilizar bases fortes ou sistemas de transferência de fase, contudo, ambos apresentam algumas limitações:

- O uso de bases fortes é restrito para substratos que apresentam grupos funcionais suscetíveis ao ataque nucleofílico.
- O processo de transferência de fase é dependente da acidez do substrato e não é adequado para reações de sulfonilação e acilação em decorrência da reversibilidade destas (OTTONI, CRUZ, ALVES, 1998).

Alguns autores relatam a eficiente utilização de bases mais fracas e/ou mais estáveis em substituição às bases muito fortes e instáveis para a adição de grupos protetores no grupo indol. Entre as bases menos fortes citam-se KOH, NaOH e trietilamina. (OTTONI, CRUZ, ALVES, 1998; ZHAO, et al., 2014). Após o tratamento com esses compostos segue-se a reação do sal resultante com um agente de alquilação em vários solventes, tais como, DMSO (dimetil sulfóxido), DMF (dimetil formamida) e THF (tetrahidrofurano) (ZHAO et al., 2014).

O desenvolvimento do protocolo para síntese de *N*-etil-carbazol utilizando o solvente polar aprótico DMF como meio reacional e utilizando agitação magnética convencional foi descrito por Wang et al. (1977), originado o produto desejado com 92,4% de rendimento após 10 horas.

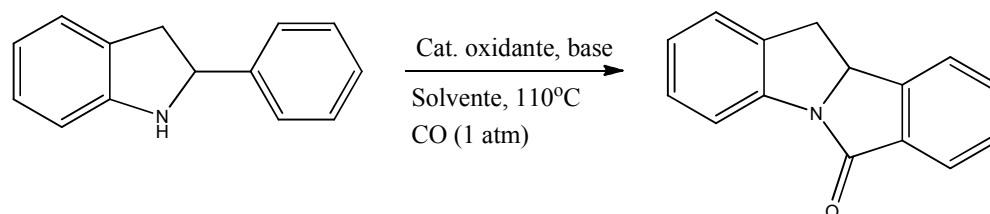
Visando pesquisar as melhores condições de reação e justificar o fato das reações de substituição nucleofílica serem fortemente dependentes da polaridade do meio, Zhao et al. (2011) testaram vários solventes polares tais como DMSO, PEG-400, THF, H₂O e três líquidos iônicos [*N*-etilpiridínio Tetrafluoroborato, tetrafluoroborato de *N*-butilpiridínio e tetrafluoroborato de *N*-(2-hidroxipropil)-piridínio] sob irradiação ultrassônica. Este estudo apresentou os seguintes resultados: PEG-400, THF, e três líquidos iônicos apresentaram comparativamente baixos rendimentos a longo tempo de reação; o produto não foi formado quando o solvente utilizado foi a água; DMSO forneceu rendimento de 99% e tempo reacional de 3 minutos. Estes autores investigaram adicionalmente a *N*-alquilação do indol utilizando vários haletos de alquila e observaram reações que se processam de forma suave e com altos rendimentos.

Segundo Hayat et al., (2001), a *N*-alquilação de heterocíclicos indólicos pode ser realizada com halogenatos de alquilo e CsF / Celite em acetonitrilo, no entanto, este método é limitado por baixos rendimentos ou por um longo tempo de reação. Outros estudos demonstram a *N*-alquilação de compostos heterocíclicos em líquido iônico com excelentes resultados, entretanto, o alto custo e a utilização destes líquidos representam o inconveniente do método (RUTHER et. al., 2009; LE et al., 2010).

A literatura relata a inserção do grupo 2-etil-hexil no nitrogênio indólico utilizando-se 4-nitrotolueno, fosfato de tri 2-etil-hexil, temperatura de 160°C durante 5 horas. Ao fim do processo obteve-se o produto *N*-2(2-etil-hexil) indol e indol com 38% e 50% de rendimento respectivamente (VYPRACHTICKY et al., 2012).

Huang et al., (2016), promoveram a eficiente síntese do 6H-isoindol [2,1-*a*]indol-6-ona (Figura 10) utilizando ródio como catalisador da carbonilação entre o N-H e o C-H do 2-arylindol com participação de monóxido de carbono. Esta reação de processa através da clivagem da ligação N-H e subsequente ruptura da ligação C-H.

Figura 10: Síntese do 6H-isoindol [2,1-*a*]indol-6-ona (HUANG et al., 2016).



2.5 Vírus Herpes Simples e os produtos naturais marinhos

Apesar de todo progresso da medicina a maioria das doenças infecciosas causadas por vírus continuam representando um risco à saúde pública para homens e animais. Este tipo de agente infeccioso multiplica-se, ou seja, produz energia e sintetiza suas macromoléculas, utilizando-se da atividade metabólica e das organelas da célula hospedeira (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014; TORTORA et al., 2005; TRABULSI, 2015;). Consistem de apenas um material genético, DNA ou RNA, acondicionado em um capsídeo de proteína, podendo ou não estar envolvido por uma membrana lipídica herdada das células hospedeiras, o envelope. O material nucléico proteico é denominado de nucleocapsídeo (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014; TRABULSI, 2015; VOYLES, 1993).

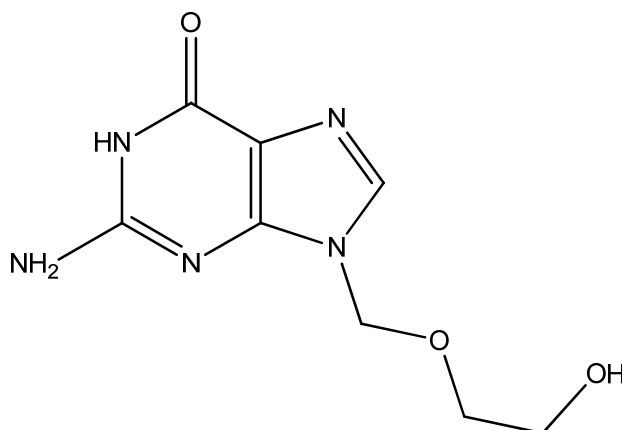
Os vírus têm a propriedade de reconhecer e de penetrar em células-alvo, considerando-se a especificidade dos receptores na superfície dessas células hospedeiras e dos próprios vírus (SPEAR, 2004). Denomina-se multiplicação viral todos os eventos que vão desde a penetração do genoma viral na célula até a liberação dos vírions, que compreendem uma fase inicial, com fixação do vírus à célula hospedeira, penetração e desnudamento (decapsidação) da partícula viral, e uma fase tardia que vai desde a síntese macromolecular até a montagem e liberação dos vírions (WHITE; FENNER, 1994).

Dentre as infecções virais mais prevalentes no mundo, citam-se as provocadas pelo Vírus Herpes Simples (HSV), um vírus DNA que, no Brasil, é responsável pelo aparecimento anual de 640 mil novos casos de herpes genital diagnosticados (CLEMENS, FARHAT, 2010). Esta patologia está associada a dois tipos de vírus, o tipo 1 (HSV-1), responsável pelo surgimento do herpes oral e o tipo 2 (HSV-2) associado ao herpes genital (CLEMENS, FARHAT, 2010).

Na primo-infecção, após invadir o corpo o HSV sofre replicação nas células situadas no sítio de entrada, mucosas ou solução de continuidade como pele, podendo ou não produzir lesões em forma de vesícula (WHITLEY; ROIZMAN, 2001). Segue-se a disseminação do vírus para as células nervosas adjacentes, onde o nucleosídeo é encaminhado ao núcleo, iniciando a fase latente. Nesta fase, o genoma viral está reprimido e parcialmente integrado ao DNA da célula, sendo que apenas algumas regiões específicas do genoma viral são transcritas, as chamadas regiões LAT. O vírus pode então ser ativado por vários estímulos, como estresse, febre, trauma, mudanças hormonais, radiação ultravioleta, etc (LUPI; PEREIRA JR., 2000). Após o estabelecimento da latência, a recorrência do HSV é conhecida com infecção recorrente (FIELDS et al., 2001). Durante o período da latência herpética, os vírus são inacessíveis ao sistema imune e aos medicamentos atualmente disponíveis (ROIZMAN; KNIPE, 2001).

Segundo Rang, Dale e Ritter, (2013) os medicamentos anti-HSV-1, disponíveis pela indústria farmacêutica, agem através de variados mecanismos de ação, no entanto os de maior aplicação clínica, tais como o aciclovir atuam sobre a polimerase viral nas fases de adsorção e penetração. O aciclovir (Figura 11) é um análogo da guanosina sem os grupos hidroxila nos carbonos 2' e 3'. Durante o seu mecanismo de ação o nucleosídeo é fosforilado por uma timidina quinase viral e, subsequencialmente, di e tri-fosforilado por enzimas celulares. Finalmente, quando a molécula é capturada pela DNA polimerase viral (complexo UL30/UL42) ocorre ruptura da formação da cadeia de DNA devido a ausência da 3'-OH (CHENG et. al., 1983; COEN, 1996; DE CLERCQ, 2004).

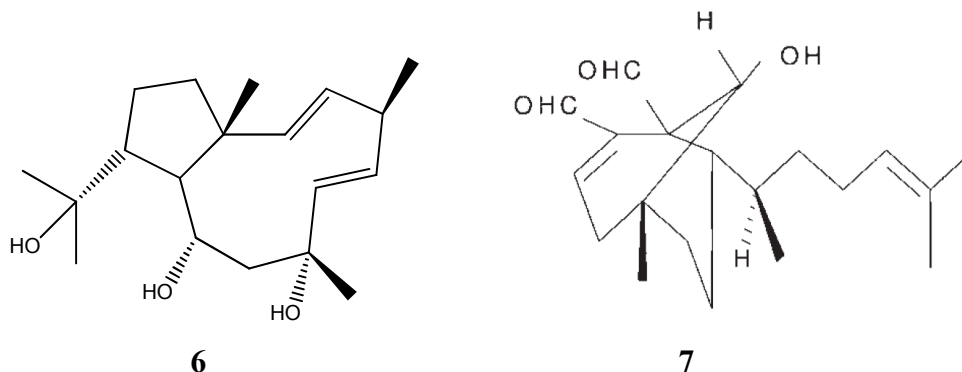
Figura 11: Estrutura química do aciclovir.



Segundo a literatura, além de agir sobre a polimerase viral, os fármacos que atuam diminuindo as taxas de infecção viral podem atuar inibindo a penetração viral nas células através da ligação, muitas vezes de caráter covalente, das moléculas com ação antiviral às glicoproteínas presentes no envelope viral, a exemplo das glicoproteínas gB ou gC, que medeiam a ligação micro-organismo à célula do hospedeiro (GESCHER et al., 2011).

Considerando que o uso contínuo dos medicamentos disponíveis promove a seleção de cepas resistentes e as suas relativas toxicidades diante de administrações prolongadas (KELLY et al., 2009), alguns extratos e compostos isolados obtidos de algas marinhas estão sendo considerados como promissores antivirais com atividade sobre o HSV-1. Harden et al. (2010) demonstraram que extratos das algas marinhas *Undaria pinnatifida*, *Splachnidium rugosum*, *Gigartina atropurpurea* e *Plocamium cartilagineum* possuem atividade antiviral contra HSV-1 e HSV-2 em ensaios padrão de laboratório. Esta série de compostos exibiu boa atividade quando adicionados durante ou após uma hora de infecção viral. Abrantes et al. (2010) relataram que a 8,10,18-trihidroxi-2,6-dolabelladieno e a 6-hidroxidichatona-4,14-diene-1,17-diol (Figura 12) inibem a replicação do HSV-1 de forma dose-dependente com valores de EC50 de 5,10 μ M e 5,90 μ M, respectivamente.

Figura 12: Estruturas químicas dos compostos (6) 8,10,18-trihidroxi-2,6-dolabelladieno e (7) 6-hidroxidichatona-4,14-diene-1,17-diol (ABRANTES et al. ,2010)



Macedo et al. (2012) observaram que a caulerpina apresenta-se como uma alternativa ao tratamento do HSV-1 com aciclovir. O teste de viabilidade celular, que determina concentração citotóxica para 50% de células Vero (CC_{50}) demonstrou que a caulerpina apresenta um promissor potencial para ser utilizada como um fármaco em células humanas, tendo apresentado uma CC_{50} 18% superior ao observado o aciclovir que foi utilizada como controle positivo. O ensaio de atividade antiviral mostrou que a caulerpina apresenta efeito semelhante ao aciclovir sobre HSV-1, com concentração que produz 50% do efeito desejado (EC_{50}) de 1,29 μ M para a caulerpina e 1,09 μ M para o aciclovir. Esses dados sugerem que a caulerpina possui índice de seletividade superior ao controle positivo.

Os efeitos exercidos de outros alcaloides, obtidos tantos de espécies vegetais marinhas quanto terrestres, a exemplo de berberina (obtido de *Coptidis rizoma*) e 4-metilaaptamina (obtido de *Aaptos aaptos*) são atribuídos aos seus potenciais de inibir a penetração do micro-organismo (HSV-1) nas células hospedeiras (CHIN et al., 2010; SOUZA et al., 2007).

2.6 A microbiologia e os produtos naturais marinhos

Dados epidemiológicos atuais referentes à frequência de infecções fúngicas e bacterianas, inclusive resistentes aos fármacos atualmente disponíveis, em âmbito hospitalar impulsionam a realização de investigações para identificação de novas moléculas capazes de atuar contra essas patologias.

Neste contexto, e considerando a ampla diversidade de efeitos biológicos relatados na literatura para os organismos marinhos, alguns autores avaliaram as propriedades antibacterianas e antifúngicas de extratos de algas marinhas. Segundo Selim et al. (2015),

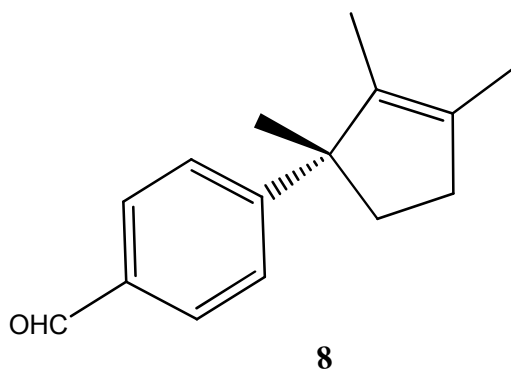
extratos das algas *Caulerpa prolifera* e *Hypnea esperi* apresentam potente atividade antibacteriana frente às bactérias Gram positivas *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* e variada atividade frente às bactérias Gram negativas.

Apesar da variedade de antifúngicos para profilaxia e tratamento de candidíase, verifica-se expressivo aumento do número de casos de infecção, associado à ampliação de espécies de *Candida* resistentes às drogas disponíveis (TORTORANO et al., 2006; PENNA et al., 2001). Desta forma, destacam-se leveduras do gênero *Candida*, a exemplo de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, por apresentarem importante plasticidade morfológica e expressão de fatores de virulência associados à formação de biofilmes, invasão do tecido do hospedeiro e adaptação ao ambiente (HENRIQUES et al., 2004; RAMAGE et al., 2005; THEIN et al., 2006).

Os mecanismos moleculares envolvidos com essa virulência estão relacionados à ativação da via de transdução de sinal MAP (*mitogen-activated protein*) cinase, onde respostas celulares envolvidas com crescimento invasivo, formação de parede celular, adaptação ao estresse osmótico e reprodução ocorrem mediante vias de sinalização intracelular como MKC1, Cek1/2 e HOG1 MAP cinase (MONGE et al., 2006), podendo outras vias serem utilizadas, como a da p38 MAPK (MULLER et al., 2007). Uma vez instalada a infecção, mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , IL-1 α e IL-2 α , são sintetizados e induzem a resposta inflamatória (OROZCO; ZHOU; FILLER, 2000). Além disso, a produção de enzimas extracelulares, como fosfolipases e proteinases, contribui para a virulência da *C. albicans*, por promoverem destruição dos tecidos do hospedeiro (MENEZES et al., 2005).

A candidíase geralmente está associada à imunossupressão, podendo representar a maior causa de mortalidade em indivíduos portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (SHAHAPUR et al., 2014), bem como em portadores de doenças malignas, especialmente hematológicas (TANG et al., 2014). A literatura científica relata os efeitos antifúngicos de dois novos para-xilenos prenilados isolados da alga verde *Caulerpa racemosa*, o caulerprenilol A e B visto que exibiram um largo espectro contra *Cândida glabrata* (537), *Trichophyton rubrum* (Cmccftla) e *Cryptococcus neoformans* (32609), com valores de CIM 80 entre 4 e 64 $\mu\text{g/mL}$ (LIU, et al., 2013). Neste contexto, Alarif et al. (2012) relataram também atividade antifúngica do isolauraldeído (Figura 13), substância isolada da alga vermelha *Laurencia obtusa*, contra a *Cândida albicans* (CIM de 70 $\mu\text{g/mL}$) demonstrando o potencial farmacológico das moléculas marinhas que poderão servir de novos protótipos candidatos a fármacos.

Figura 13: Estrutura química do composto (7) isolauraldeído



Considerando que a problemática das infecções antifúngicas é a limitação dos fármacos na resistência fúngica (ARENDRUP, 2013; MAUBON et al., 2014) e no alto custo dos tratamentos (ZILBERBERG, 2009), destaca-se a necessidade da descoberta de novas entidades químicas oriundas de produtos marinhos como prováveis líderes para o desenvolvimento de fármacos.

Nessas premissas, o presente trabalho situa-se no âmbito de uma linha de pesquisa do INCTAmbTropic que objetivou a semi-síntese e avaliação farmacológica de uma série de 14 compostos, derivados do alcaloide bis-indol. Os novos derivados sintetizados foram planejados a partir de modificações estruturais da caulerpina obtida da espécie marinha *Caulerpa racemosa* com o intuito de promover sua otimização em modelos antivirais e antifúngicos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar a preparação de derivados estruturais na caulerpina e avaliar o potencial antiviral e antifúngico das novas moléculas.

3.2 Objetivos específicos

- Isolar e purificar a caulerpina obtida do extrato da alga marinha *Caulerpa racemosa* que será utilizada como matéria-prima para a semi-síntese dos derivados;
- Inserir os grupos metil, etil, alil, propargil, benzil, 3,4,5-trimetoxi-benzil e acetato de etila no núcleo bis-indólico da caulerpina através de reações de *N*-substituições;
- Preparar e purificar os derivados ácidos dos derivados *N*-substituídos obtidos a partir da caulerpina;
- Obter derivados da caulerpina a partir de reações de transesterificação do seu éster;
- Caracterizar estruturalmente os compostos sintetizados através dos métodos espectrométricos convencionais: Infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C e ^1H (RMN ^{13}C e ^1H);
- Avaliação do potencial citotóxico dos derivados produzidos;
- Investigar o potencial antiviral de 14 novos derivados da caulerpina em modelos de HSV-1 bem como avaliar seus potenciais antifúngicos frente às cepas de *Candida* spp;

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento da caulerpina.

Visto o potencial terapêutico da caulerpina, decidiu-se realizar modificações estruturais no seu núcleo indólico, a fim de obterem-se moléculas com maior espectro farmacológico e menor efeito citotóxico. Para tanto, procedeu-se a extração e isolamento da caulerpina da alga *Caulerpa racemosa*, sob a forma de cristais vermelhos solúveis em diclorometano, correspondente a 7% do extrato bruto. Sua estrutura foi elucidada através da análise dos espectros gerados pela análise de infravermelho (IV), RMN ^1H e ^{13}C , em comparação com os dados encontrados na literatura.

No espectro de IV observou-se a presença da absorção correspondente ao estiramento N-H em 3382 cm^{-1} , os sinais em 2925 cm^{-1} e 2852 cm^{-1} correspondentes a estiramentos tipo C-H sp^3 , absorção em 1265 cm^{-1} referente ao estiramento C-O e sinal em 1687 cm^{-1} corresponde ao estiramento C=O, relacionado à presença de carbonila de éster (Figura 48, página 127). Pavia et al. (2010) relata o valor-base normal para as vibrações de estiramento C=O de éster como 1735 cm^{-1} . No entanto, este mesmo autor, descreve que a presença de uma dupla ligação C=C conjugada a um grupo carbonila resulta no deslocamento dos elétrons π nas ligações C=C e C=O, que promove o aparecimento de um híbrido de ressonância onde estas duplas passam a ser ligações simples. O aumento no caráter de ligação simples diminui as constantes de força das duplas ligações, resultando na diminuição da frequência de absorção da dupla ligação da carbonila e da dupla ligação. Para as carbonilas observa-se diminuição de 25 a 45 cm^{-1} na frequência do valor base, justificando o surgimento do sinal da carbonila em 1687 cm^{-1} neste estudo.

O espectro de RMN ^1H (Tabela 1, Figuras 49, página 128 e Figura 50 página 129) apresenta quatro sinais com δ_{H} entre 7,1 e 7,43 característicos de núcleo aromático. A expansão do espectro evidencia a presença de dois dupletos largos, com deslocamentos de δ_{H} 7,43 (1H) e 7,30 (1H) e dois duplos tripletos, um em δ_{H} 7,20 (1H) e outro em δ_{H} 7,11 (1H), indicando a presença de anel aromático dissustituído em *orto*. O singlete observado no espectro com δ_{H} 9,21 sugere a presença de nitrogênio de núcleo indólico, característico da classe dos alcaloides (ANJANEYULU; PRAKASHI; MALLAVADHANI, 1991; ANJANEYULU et al., 1992). Analisando-se o espectro de RMN ^1H , observou-se ainda, a presença de dois singletos, um em δ_{H} 8,06, correspondente ao carbono metínico do ciclooctatetraeno, e outro em δ_{H} 3,90 (s, 3H) característico de metoxila (LORENZO, 2010).

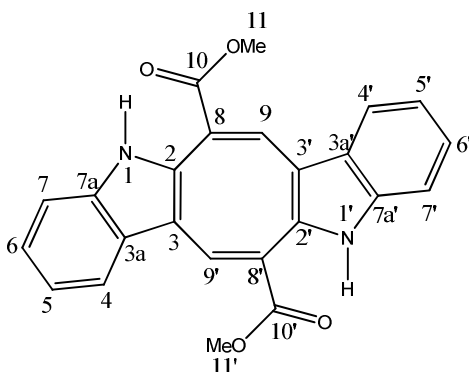
A análise espectral do RMN ^{13}C -APT (Tabela 1, Figura 51, página 130) revela 12 sinais, sendo seis para carbono não hidrogenados e seis para carbonos metínicos ou metílicos. A presença de anel aromático na estrutura torna-se evidente pela presença de sinais entre δ_{C} 111,66 e 123,51, característicos de carbonos monohidrogenados. Observou-se um sinal em δ_{C} 52,68 característico de metoxila, confirmando a presença deste grupo como visualizado no espectro de RMN ^1H e um sinal em δ_{C} 166,80 correspondente a uma carbonila de éster (PAVIA, 2012).

Diante dos resultados obtidos foi possível identificar a molécula isolada do extrato de *Caulerpa racemosa* como o alcaloide bisindólico caulerpina (Figura 14) já isolada anteriormente em várias espécies de *Caulerpa* (LORENZO, 2010).

Tabela 1: Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C da Caulerpina (δ , CDCl_3 , 200 MHz) com dados da literatura (δ , CDCl_3 , 150 MHz), (LORENZO, 2010).

	Molécula analisada		Caulerpina (LORENZO, 2010)	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
N	9,1 (s, 1H)	---	9,2 (s, 1H)	---
2/2'	--	133,0	---	132,8
3/3'	--	112,6	---	112,4
3a/3a'	--	128,3	---	128,1
4/4'	7,43 (dl, 1H)	118,4	7,41 (dl, 1H)	118,0
5/5'	7,1 (dt, 1H)	120,8	7,07 (dt, 1H)	120,7
6/6'	7,20 (dt, 1H)	123,5	7,17 (dt, 1H)	123,3
7/7'	7,31 (dl, 1H)	111,7	7,29 (dl, 1H)	111,5
7a/7a'	---	137,8	---	137,7
8/8'	---	125,6	---	125,6
9/9'	8,06 (s, 1H)	142,9	8,04 (s, 1H)	142,9
10/10'	---	166,8	---	166,6
11/11'	3,90 (s, 3H)	52,7	3,88 (s, 1H)	52,6

Figura 14: Estrutura do alcaloide bisindólico, caulerpina.



4.1.1 Metilação da caulerpina

A metilação dos núcelos indólicos da caulerpina foram irealizadas visando aumentar as dimensões da molécula, assim como a sua lipofilicidade e consequentemente ampliar a sua permeabilidade através das membranas biológicas, resultando no aumento da potência da Caulerpina (MONTANARI, 2011).

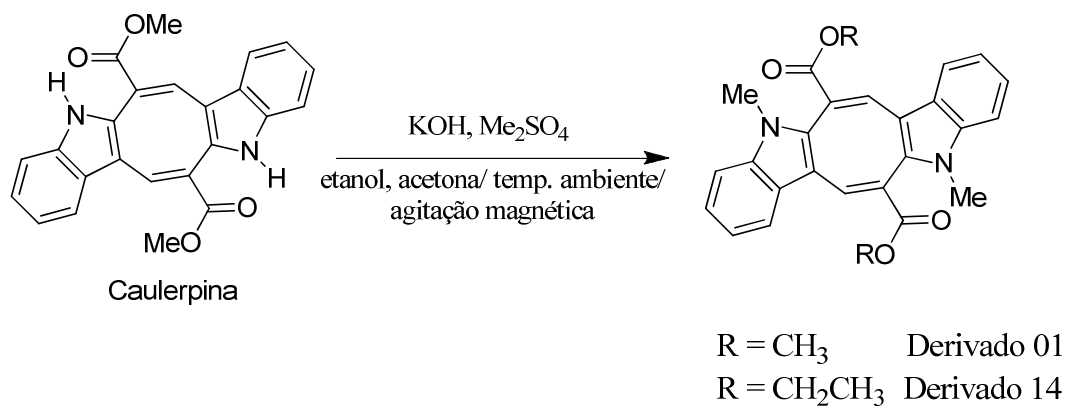
A literatura relata vários exemplos de produtos naturais metilados com reconhecida atividade farmacológica, tais como nicotina (alcaloide piridínico); adrenalina, mescalina, morfina e tubocurarina (alcaloides tirosínicos); efedrina e pseudoefedrina (alcaloides fenilalanínicos); as vitaminas B1, B2 e B5; alguns alcaloides tropânicos como a cocaína e atropina; e produtos mais complexos como o paclitaxel, testosterona e progesterona (BARREIRO; FRAGA, 2014).

Kümmerle (2009) promoveu a síntese de 11 novos compostos pertencentes à classe das *N*-metil *N*-acildrazonas, evidenciando a importância do uso de grupos metil na identificação de novos candidatos a fármacos antiinflamatórios e analgésicos.

Considerando que a utilização de bases fortes como BuLi, NaNH₂, e NaH , tradicionalmente utilizadas para a inserção de grupos protetores no grupo indol (KETCHA, GRIBLE, 1985; SALNIER, GRIBLE, 1982; LIU et al., 1997; SOERENS et al. 1979) não é indicada para estruturas que apresentem grupos funcionais, como a caulerpina, em decorrência do risco de reações paralelas, e que bases como KOH, NaOH e trietilamnina foram empregadas com sucesso por Ottoni, Cruz, Alves, (1998) na inserção de grupo metila no núcleo indólico, utilizamos a metodologia descrita por esses autores para a metilação da caulerpina, empregando a base com maior rendimento neste processo, o KOH.

A obtenção do derivado 01 ocorreu através de reações de *N*-metilação do indol utilizando como solventes o etanol (reação 1 – Figura 15) e o metanol (reação 2 - Figura 16).

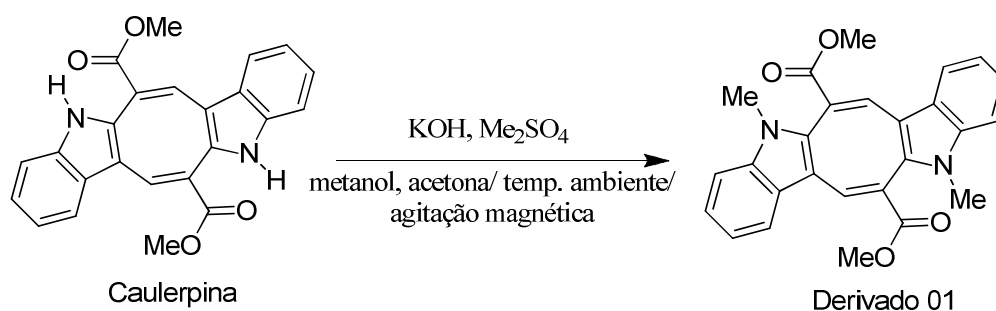
Figura 15: Equação geral de metilação 1.



Ao fim da reação de metilação 01 observou-se a formação dos derivados isolados 01 e 14, com 11,5% e 10,3% de rendimento respectivamente, indicando que dois mecanismos de reação ocorreram simultaneamente, a *N*-metilação do indol e a transesterificação do éster da caulerpina (mecanismo descrito para o derivado 14, Figura 41, página 96). Adicionalmente obteve-se uma mistura dos derivados 01 e 14.

Visando obter-se o derivado 01 em maior quantidade realizamos uma segunda reação substituindo-se o etanol por metanol, gerando o derivado 01 com 64% de rendimento.

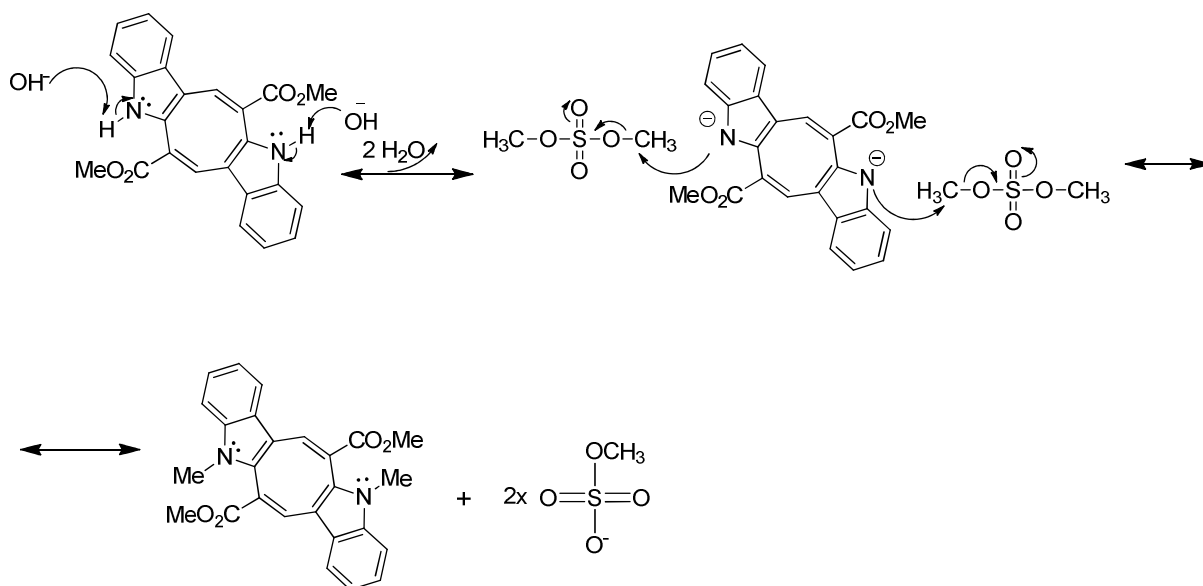
Figura 16: Equação geral de metilação 2.



Neste caso o hidróxido de potássio atua como uma base de Bronsted, retirando o próton diretamente ligado ao nitrogênio, consequentemente o núcleo indólico transforma-se em

um ânion amideto que reage como nucleófilo (OTTONI, CRUZ, ALVES, 1998). Em uma segunda etapa o nucleófilo ataca os carbonos da molécula Me_2SO_4 , gerando simultaneamente a formação do produto *N*-metilado e do grupo abandonador SO_4^{-2} ou $\text{CH}_3\text{SO}_4^{-1}$, através do mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular ($\text{S}_{\text{N}}2$), em 1 hora. Durante esta etapa o nucleófilo se aproxima pelo lado diretamente oposto ao grupo abandonador $\text{CH}_3\text{SO}_4^{-1}$, induzindo a formação de um estado de transição único com a participação das duas espécies. À medida que a reação progride, a ligação entre o nucleófilo e o átomo de carbono se estabelece e a ligação entre o átomo de carbono e o grupo abandonador se quebra, formando o produto (Figura 17) (CLAYDEN, 2001).

Figura 17: Proposta de mecanismo de metilação.



O mecanismo reacional para a reação 02 é idêntico ao descrito para a reação 01. O maior rendimento observado para o derivado 01 deve-se ao uso de metanol em substituição ao etanol impedindo que a caulerpina fosse utilizada como substrato para a produção do derivado 14.

O derivado 01 apresentou-se na forma de cristais vermelho-alaranjados, solúveis em diclorometano, a qual foi identificada através de análise espectral dos dados de infravermelho (IV) e RMN ^1H e ^{13}C em comparação com a caulerpina.

A formação do derivado metilado foi verificada pela análise do espectro de absorção na região do IV (Figura 53, página 133). Nesta análise, apesar da presença de um sinal em 3437 cm^{-1} , que coincide com a região de N-H ($3500 - 3300\text{ cm}^{-1}$), a forma larga da banda observada

não corresponde á estrutura fina correspondente ao estiramento de N-H observado na análise de infravermelho da caulerpina, mas ao sinal de O-H , cuja região de absorção se sobrepõe a região de N-H. Esta observação sugere a ausência do grupo do grupo N-H na amostra e a presença de resíduos de água. Assim como na análise de infravermelho realizada para a caulerpina, foi verificado para este derivado sinais correspondentes a estiramentos tipo C-H sp^3 , C-O e C=O.

O espectro de RMN ^1H (Tabela 2, Figura 54, página 134), do derivado 01 mostrou-se semelhante ao da caulerpina, no entanto, observa-se a ausência do sinal em δ_H 9,21 (s, 1H) característico de hidrogênio ligado a nitrogênio de núcleo indólico e o surgimento de um sinal δ_H 3,46 (s, 3H) compatível com grupo metílico ligado a nitrogênio de grupo aromático (PAVIA, 2012), indicando que houve substituição do átomo de hidrogênio ligado ao nitrogênio pelo grupo metílico.

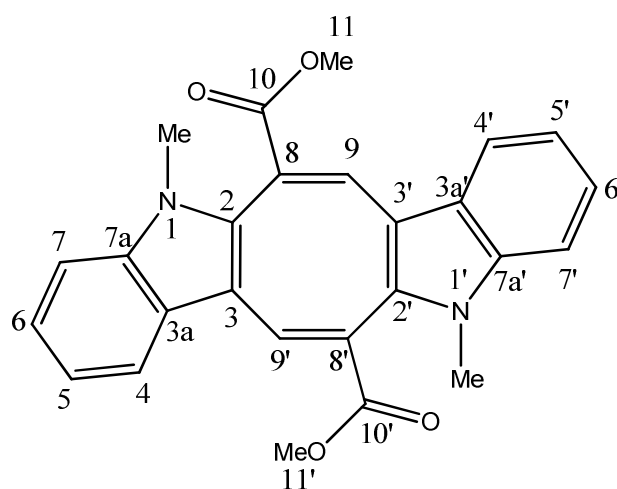
No experimento de RMN ^{13}C -APT (Tabela 2, Figura 55, página 135), observou-se 13 sinais correspondentes a 13 átomos de carbonos. Destes, seis correspondem a carbonos quaternários, cinco a carbonos terciários e dois a carbonos primários. A semelhança do espectro de RMN ^{13}C do derivado 01 com o da caulerpina e o aparecimento de um sinal em δ_C 30,93 característico de grupo metílico permitiram determinar o derivado 1.

Na Tabela 2 estão compilados os deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C . Esses dados juntamente com o IV, permitiram a identificação da molécula obtida através de semi-síntese da caulerpina como sendo (6*E*, 13*E*)-dimetil 5,12- dimetil- 5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b'] diindol-6,13-dicarboxilato) com fórmula molecular $C_{26}H_{22}N_2O_4$ e peso molecular de 426,46g/mol (Figura 18).

Tabela 2: Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C (δ , CDCl_3 , 200 MHz) do derivado 01 e da caulerpina.

	Derivado 01		Caulerpina	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
N	----	---	9,1 (s, 1H)	---
2/2'	--	134,6	--	133,0
3/3'	--	112,9	--	112,6
3a/3a'	--	126,6	--	128,3
4/4'	7,54 (dl, 1H)	118,8	7,43 (dl, 1H)	118,4
5/5'	7,12 (dt, 1H)	120,5	7,11 (dt, 1H)	120,8
6/6'	7,15 (dt, 1H)	123,0	7,20 (dt, 1H)	123,5
7/7'	7,23 (dl, 1H)	109,9	7,31 (dl, 1H)	111,7
7a/7a'	---	138,6	---	137,8
8/8'	---	125,4	---	125,6
9/9'	8,49 (s, 1H)	144,6	8,06 (s, 1H)	142,9
10/10'	---	166,4	---	166,8
11/11'	3,81 (s, 3H)	52,5	3,90 (s, 3H)	52,7
12/12'	3,46 (s, 3H)	30,9	---	---

Figura 18: Estrutura química do derivado 01.



4.1.2 N-alquilação da caulerpina

A inserção de grupos alquila como substituinte do hidrogênio ligado ao nitrogênio indólico foi proposta a fim de obtermos derivados da caulerpina com diferentes propriedades físico-químicas que possibilitassem a formação de derivados com menores efeitos citotóxicos e propriedades farmacológicas ampliadas.

A introdução de grupos metilênicos em estruturas químicas de moléculas protótipas aumenta as suas dimensões, assim como a sua lipofilicidade. Tendo-se observado um aumento da potência das propriedades terapêuticas, acredita-se que a introdução destes grupos promove a passagem através das membranas biológicas. Inversamente, uma diminuição da resposta biológica pode resultar da redução da solubilidade em água, dificultando a distribuição dos derivados na biofase e a sua passagem nas referidas membranas. Paralelamente, introdução de grupos com ligações duplas favorece o seu ajustamento com o respectivo receptor, enquanto a inserção de anéis possibilita o aumento das dimensões moleculares, propriedade útil para sítios receptores onde existe uma cavidade hidrofóbica passível de ser ocupada pelo anel (MONTANARI, 2011).

Em um estudo realizado por Ding et al. (2014) à beberina, composto majoritário de um produto natural, foram inseridos separadamente grupos alquila de 4, 8 e 12 carbonos saturados utilizando haletos de alquila e THF. Os derivados obtidos foram submetidos ao ensaio do MTT em linhagens celulares Hep G2 onde se evidenciou que o derivado gerado a partir de um grupo alquil de 8 carbonos apresentou CC_{50} 36 vezes inferior ao observado para a beberina. O aumento da citotoxicidade deste derivado sugeriu a sua utilização como uma potente droga cancerígena.

Segundo Yang et al. (2016) a baixa especificidade da luteolina para as suas atividades farmacológicas pode ser melhorada através da elaboração racional de derivados. Com este intuito, os autores promoveram a inserção do grupo benzil no anel B da luteolina utilizando solução de tribrometo de bromo em diclorometano obtendo-se o 2-benzil-luteína e o 3-benzil-luteína com 34% e 30% de rendimento respectivamente. As novas moléculas demonstraram aumento de IC_{50} de mais de 50% em células de leucemia humana HL-60 para o teste do MTT, enquanto que a inibição da proteína Bcl-2, relacionada ao crescimento de células tumorais passou de 46% para 93% e 96% respectivamente.

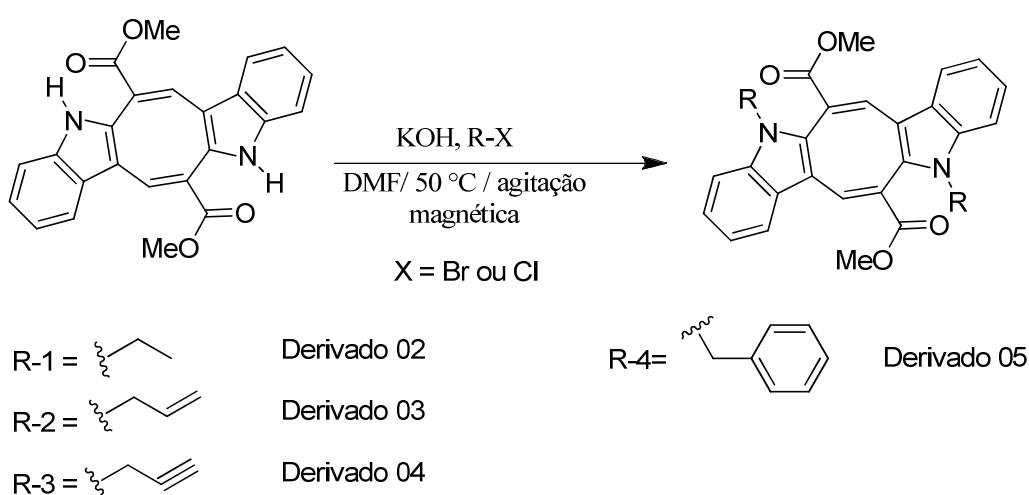
Para inserção do grupo alquil etano no núcleo indólico da caulerpina testamos a mesma metodologia utilizada para a inserção do grupo metil, com participação do solvente metanol (tentativa 01) na qual observamos a formação do derivado 02 com rendimento de

20%. Este rendimento pode ser justificado no fato do metanol ser um solvente prótico que possui um átomo de hidrogênio ligado a um átomo de um elemento fortemente eletronegativo (oxigênio) e, portanto, pode estabelecer interações intermoleculares do tipo ligações de hidrogênio com os nucleófilos. No entanto, para que um nucleófilo reaja, é necessário que este se livre de algumas moléculas solventes, pois ele precisa se aproximar do carbono que carrega o grupo abandonador (CLAIDEN, 2001).

Considerando que solventes apróticos, tais como DMSO e DMF, facilitam as reações de S_N2 , procedeu-se o tratamento da caulerpina com KOH, bromoetano e DMSO (tentativa 02). Paralelamente, esta reação foi montada novamente utilizando-se DMF (tentativa 03) como solvente em substituição ao DMSO (ZHAO et al., 2014). O derivado 02 foi formado com rendimentos de 50 e 81,5% respectivamente para as tentativas 02 e 03. Este resultado diverge do observado por Zhao et al.,(2014), que relata para reações de indol com bromoetano em DMSO e DMF rendimentos similares de 99 e 98%, respectivamente. Esta divergência justifica-se pela complexidade da molécula da caulerpina frente à molécula isolada de indol.

Considerando os bons resultados obtidos na inserção do grupo etil no nitrogênio indólico da caulerpina utilizando-se a metodologia descrita por Zhao et al. (2014) utilizando-se DMF como solvente, adotamos esta metodologia para a inserção dos grupos alil, porpargil, benzil (Figura 19).

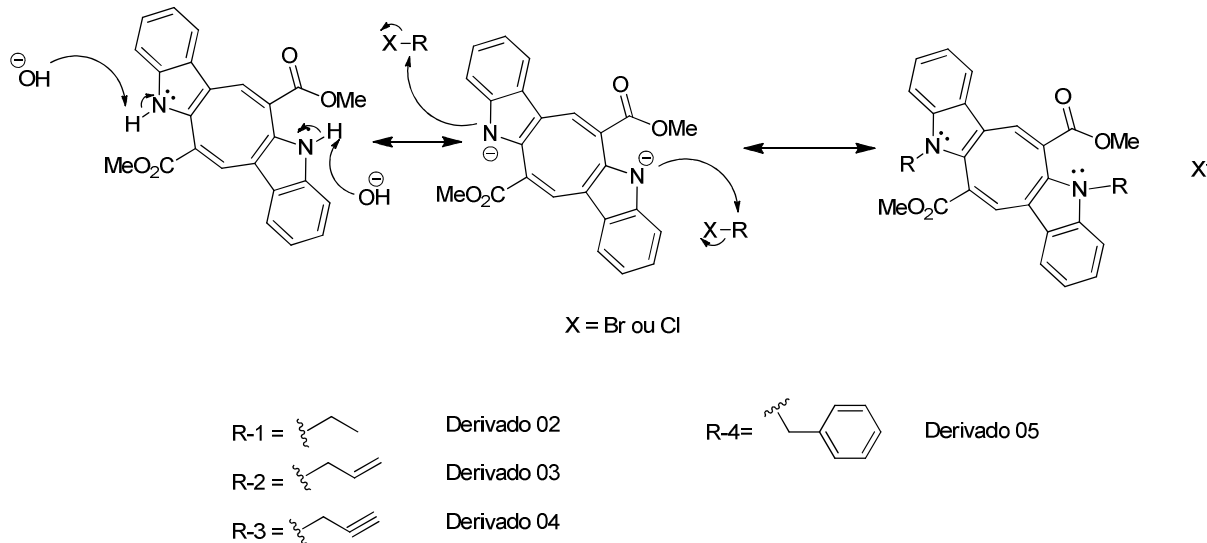
Figura 19: Equação geral de N-alquilação da caulerpina.



O mecanismo reacional para as inserções bis indólicas de grupos *N*-alquil encontra-se descrito na Figura 20 e é semelhante ao explanado para a reação de metilação, onde o

hidróxido de potássio atua como uma base de Bronsted, aceitando o próton diretamente ligado ao nitrogênio, transformando a caulerpina em um nucleófilo que promove uma substituição nucleofílica S_N2 com os haletos de alquila utilizados (CLAYDEN, 2001).

Figura 20: Mecanismo reacional de N-alquilação da caulerpina.



4.1.2.1 Inerção do grupo etila – Derivado 02

Após a tentativa 3 derivado 02 foi obtido com 81,5% de rendimento e apresentou-se na forma de cristais alaranjados, solúveis em diclorometano, o qual foi identificado através de análise espectral dos dados de infravermelho e RMN ^1H e ^{13}C e técnicas bidimensionais em comparação com os dados da caulerpina.

O espectro de IV (Figura 58, página 138) revela a presença de sinais característicos de $\text{C-H } sp^3$ (2948 cm^{-1}), C=O (1705 cm^{-1}), C-O (1243 cm^{-1}), C=C (1619 cm^{-1}) semelhante ao espectro da caulerpina. Verificou-se ainda, o desaparecimento do sinal fino entre $3500\text{-}3300 \text{ cm}^{-1}$ relativo ao grupo N-H e o surgimento de um sinal em 1555 cm^{-1} referente ao estiramento de CH_2 sugerindo a substituição do hidrogênio diretamente ligado ao núcleo indólico pelo grupo etil. (PAVIA, 2012).

O espectro de RMN ^1H do derivado 02 (Tabela 3, Figura 59, página 139) apresenta-se semelhante ao da caulerpina, no qual se observa sinais característicos hidrogênios aromático, hidrogênio de carbono metínico ligado a carbono não hidrogenado e de hidrogênio de

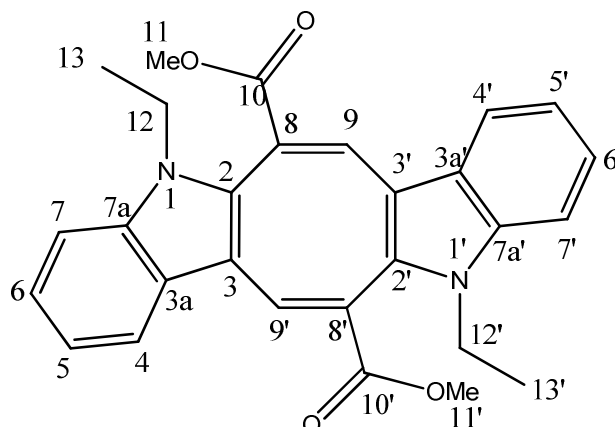
metoxila. Análise detalhada desse espectro observou a ausência do sinal em δ_H 9,21 (s, 1H) característico de hidrogênio ligado a nitrogênio de núcleo indólico e o surgimento de sinais em δ_H 4,01 e δ_H 3,80 (m, 2H) compatível com hidrogênios metileno diretamente ligado a átomo de nitrogênio de grupo aromático, além do sinal em δ_H 1,17 (t, 3H) referente ao grupo metílico ligado ao metileno. Estas observações sugerem que houve substituição do átomo de hidrogênio ligado ao nitrogênio pelo grupo etila.

O ensaio de RMN ^{13}C -APT (Tabela 3, Figura 60, página 140) revelou a presença de 14 sinais de átomos de carbono, destes, 12 apresentaram deslocamentos semelhantes ao observado no RMN ^{13}C -APT da caulerpina. O espectro aponta a presença de mais dois carbonos na estrutura, um com deslocamento químico em δ_C 39,2, característico de grupo metileno e outro em δ_C 14,8 referente ao grupo metila (PAVIA, 2012), dados esses corroborando com os dados observados no RMN ^1H .

A análise bidimensional do HMBC (Tabela 3, Figura 61, página 141) que mostra as correlações dos hidrogênios metilênicos δ_H 4,01 e δ_H 3,80 com os carbonos 2/2' e 7a/7a' a três ligações confirma a presença do grupo etil ligado ao nitrogênio indólico (Tabela 3). Os dados espectrais permitiram a identificação da molécula obtida através de semi-síntese da caulerpina como sendo (6*E*, 13*E*)-dimetil 5,12- dietil- 5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b'] diindol-6,13-dicarboxilato) com fórmula molecular $\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4$ e peso molecular de 454,52g/mol (Figura 21).

Tabela 3: Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C e HMBC (δ , CDCl_3 , 500 MHz) do derivado 02 e da caulerpina (δ , CDCl_3 , 200 MHz).

	Derivado 04					Caulerpina	
	RMN ^{13}C e ^1H		HMBC			RMN ^{13}C e ^1H	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	$^4J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
N	---	----				---	9,21 (s, 1H)
2/2'	134,0	--		2H – 12		133,0	--
3/3'	113,2	--		H-4; H-9		112,6	--
3a/3a'	126,9	--	H-4	H-5;H-7;		128,3	--
4/4'	118,8	7,51(dl, 1H)	H-5	H-6		118,4	7,43 (dl, 1H)
5/5'	120,4	7,09 (dt, 1H)	H-4; H-6	H-7		120,8	7,11 (dt, 1H)
6/6'	122,7	7,19 (dt, 1H)	H-5; H-7	H-4		123,5	7,20 (dt, 1H)
7/7'	110,5	7,26 (dl, 1H)	H-6	H-5		111,7	7,31 (dl, 1H)
7a/7a'	137,5	---	H-7	H-4;H-6; 2H-12;		137,8	---
8/8'	126,1	---	H-9		1H – 12	125,6	---
9/9'	144,3	8,44 (s, 1H)				142,9	8,06 (s, 1H)
10/10'	166,8	---	H-9; 3H-11			166,8	---
11/11'	52,6	3,80 (s, 3H)				52,7	3,90 (s, 3H)
12/12'	39,2	4.01 (m, 1H)	3H-13			---	---
		3,80 (m, 1H)				---	---
13/13'	14,8	1,17 (t, 3H)	1,172 (t, 3H)	2H-12			

Figura 21: Estrutura química do derivado 02.

4.1.2. 2 Inserção do grupo alila – Derivado 03

O derivado 03 foi obtido com 82,5% de rendimento e apresentou-se na forma de cristais amarelos, solúveis em diclorometano, o qual foi identificado através de análise espectral dos dados de infravermelho, RMN ^1H e ^{13}C em comparação com os dados da caulerpina.

O espectro de IV (Figura 63, página 143) revela a presença de sinais característicos de C-H sp^3 (2948 cm^{-1}), C=O (1715 cm^{-1}), C-O (1234 cm^{-1}) e C=C (1619 cm^{-1}) semelhante ao espectro da caulerpina. Verificou-se ainda, o desaparecimento do sinal fino entre $3500\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$ relativo ao grupo N-H e o surgimento do sinal em 3051 cm^{-1} referente estiramento C-H sp^2 e outro em 1555 cm^{-1} compatível com grupo CH_2 , sugerindo a substituição do hidrogênio diretamente ligado ao núcleo indólico pelo grupo alila. (PAVIA, 2010).

A análise de RMN ^1H do derivado 03 (Tabela 4, Figura 64, página 144) revelou várias semelhanças com a Caulerpina: sinais característicos de núcleo aromático, de carbono metínico ligado a carbono não hydrogenado e de metoxila. No espectro de RMN ^1H observou-se a ausência do sinal em $\delta_{\text{H}} 9,21$ (s, 1H) característico de hidrogênio ligado a nitrogênio de núcleo indólico e o surgimento dos seguintes sinais: $\delta_{\text{H}} 4,93$ (t, 2H) referente ao grupo CH_2 diretamente ligado ao nitrogênio indólico; $\delta_{\text{H}} 5,73$ (m, 1H) e $\delta_{\text{H}} 4,47$ (ddd, 2H) correspondentes a CH e CH_2 da dupla, respectivamente (PAVIA, 2010). Estas observações sugerem que houve substituição do átomo de hidrogênio ligado ao nitrogênio pelo grupo alila.

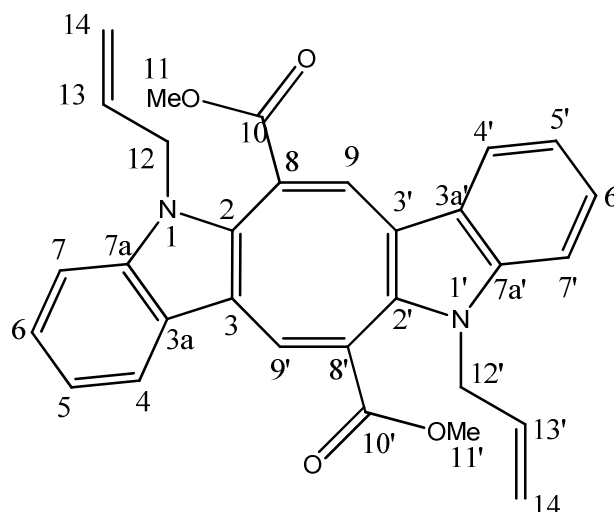
O ensaio de RMN ^{13}C -APT (Tabela 4, Figura 65, página 145) demonstra a presença de 15 sinais de átomos de carbono, destes, 12 apresentaram perfil semelhante ao observado no RMN

^{13}C -APT da caulerpina. O espectro aponta a presença de mais três carbonos na estrutura com os seguintes deslocamentos: δ_{C} 47,1 referente a carbono de CH_2 de sp^3 ; δ_{C} 132,9 e δ_{C} 117,1 que correspondem a CH e CH_2 de sp^2 respectivamente (PAVIA, 2010), confirmando o observado no RMN ^1H .

Os dados espectrais permitiram a identificação da molécula obtida através de semi-síntese da caulerpina como sendo (6*E*, 13*E*)-dimetil 5,12- dialil- 5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b'] diindol-6,13-dicarboxilato) com fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4$ e peso molecular de 478,54g/mol (Figura 22).

Tabela 4: Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C (δ , CDCl_3 , 200 MHz) do derivado 03 e da caulerpina (δ , CDCl_3 , 200 MHz).

	Derivado 03		Caulerpina	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
N	----	---	9,21 (s, 1H)	---
2/2'	---	134,1	--	133,0
3/3'	---	113,5	--	112,6
3a/3a'	---	126,6	--	128,3
4/4'	7,49(dl, 1H)	118,4	7,43 (dl, 1H)	118,4
5/5'	7,12 (dt, 1H)	120,4	7,11 (dt, 1H)	120,8
6/6'	7,20 (dt, 1H)	122,9	7,20 (dt, 1H)	123,5
7/7'	7,23 (dl, 1H)	110,6	7,31 (dl, 1H)	111,7
7a/7a'	---	137,9	---	137,8
8/8'	---	126,0	---	125,6
9/9'	8,43 (s, 1H)	144,5	8,06 (s, 1H)	142,9
10/10'	---	166,5	---	166,8
11/11'	3,77 (s, 3H)	52,4	3,90 (s, 3H)	52,7
12/12'	4,93 (t, 2H)	47,1	---	---
13/13'	5,73 (m, 1H)	132,9	---	---
14/14'	4,47 (ddd, 2H)	117,1	---	---

Figura 22: Estrutura química do derivado 03.

4.1.2.3 Inserção do grupo propargila – Derivado 04

O derivado 04 foi obtido com 85% de rendimento e apresentou-se na forma de cristais amarelos, solúveis em diclorometano, o qual foi identificado através de análise espectral dos dados de infravermelho, RMN ^1H e ^{13}C unidimensionais e bidimensionais em comparação com os dados da culerpina.

O espectro de IV (Figura 67, página 147) revela a presença de sinais característicos de C-H sp^3 (2948 cm^{-1}), C=O (1711 cm^{-1}), C-O (1240 cm^{-1}) e C=C (1624 cm^{-1}) semelhante ao espectro da caulerpina. Verificou-se ainda, o desaparecimento do sinal fino entre $3500\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$ característico do grupo N-H e o surgimento do sinal em 3284 cm^{-1} compatível com C-H de sp , 1550 cm^{-1} referente ao estiramento de CH_2 e sinal em 2100 cm^{-1} característico de $\text{C}\equiv\text{C}$. (PAVIA, 2010).

O espectro de RMN ^1H (Tabela 5, Figura 68, página 148), do derivado 04 apresenta-se semelhante ao da caulerpina, observando-se sinais característicos de núcleo aromático, de carbono metínico ligado a carbono não hidrogenado e de metoxila. Esta análise evidenciou a ausência do sinal em $\delta_{\text{H}} 9,21$ (s, 1H) característico de hidrogênio ligado a nitrogênio de núcleo indólico e o surgimento de um sinal $\delta_{\text{H}} 4,59$ (m, 2H) compatível com grupo metileno diretamente ligado a nitrogênio de grupo aromático e a carbono quaternário, e um sinal em $\delta_{\text{H}} 2,20$ (s, 1H) referente ao grupo metino de carbono sp (PAVIA, 2010).

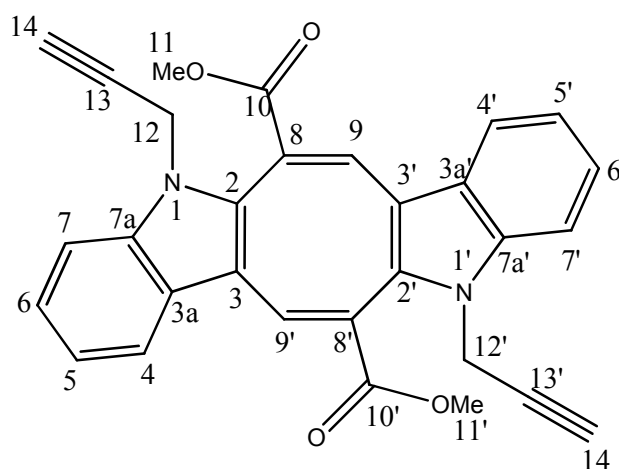
O experimento de RMN ^{13}C -APT (Tabela 5, Figura 69, página 149 e Figura 70, página 150) forneceu um espectro no qual se visualizam 15 sinais, sendo 12 picos semelhante aos

observados para a caulerpina. Verifica-se ainda o surgimento de 3 novos picos com deslocamentos de δ_C 34,4, δ_C 73,1 e δ_C 77,7. Os dois primeiros deslocamentos são referentes aos grupos metileno ligado diretamente ao nitrogênio indólico e ao carbono quaternários de *sp*. O sinal em δ_C 77,7 apesar de estar na parte superior do espectro é referente ao carbono metino de *sp* (PAVIA, 2010). Esta afirmação foi confirmada pela análise de HMQC (Figuras 72 e 73, página 152 e 153) onde se visualiza o acoplamento direto do sinal em δ_H 2,20 com o sinal em δ_C 77,7 e através do espectro de HMBC (Figura 74, página 154) que evidencia os acoplamentos de C-12 e C12' com os hidrogênios dos carbonos 2/2', 7a/7a', 13/13' e 14/14' conforme demonstrado na Tabela 05.

As observações do Infravermelho, RMN uni e bidimensionais sugerem que houve substituição do hidrogênio ligado diretamente ao nitrogênio indólico pelo grupo propargil possibilitando a identificação da molécula obtida através de semi-síntese da caulerpina como sendo (6*E*, 13*E*)-dimetil 5,12- di(prop-2-in-1-il)- 5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b'] diindol-6,13-dicarboxilato) com fórmula molecular $C_{30}H_{22}N_2O_4$ e peso molecular de 474,51g/mol (Figura 23).

Tabela 5: Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C e HMBC (δ , CDCl_3 , 500 MHz) do derivado 04 e da caulerpina (δ , CDCl_3 , 200 MHz).

	Derivado 04				Caulerpina	
	RMN ^{13}C e ^1H		HMBC		RMN ^{13}C e ^1H	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
N	---	---			---	9,21 (s, 1H)
2/2'	133,6	---		2H-12/12'	133,0	--
3/3'	114,2	---	H-9/9'	H-4/4'	112,6	--
3a/3a'	126,9	---	H-4/4'	H-5/5'; H-7/7'; H-9/9'	128,3	--
4/4'	118,9	7,51 (dl, 1H)	H-5/5'	H-6/6'	118,4	7,43 (dl, 1H)
5/5'	120,6	7,14 (td, 1H)	H-4/4'; H-5/5'	H-7/7'	120,8	7,11 (dt, 1H)
6/6'	123,5	7,24 (td, 1H)	H-5/5'; H-7/7'	H-4/4'	123,5	7,20 (dt, 1H)
7/7'	110,4	7,41 (dl, 1H)	H-6/6'	H-5/5'	111,7	7,31 (dl, 1H)
7a/7a'	137,6	---	H-7/7'	H-4/4'; H-6/6'; 2H-12/12'	137,8	---
8/8'	125,9	---	H-9/9'		125,6	---
9/9'	145,6	8,46 (s, 1H)			142,9	8,06 (s, 1H)
10/10'	166,5	---		H-9; 3H-11	166,8	---
11/11'	52,1	3,80 (s, 3H)			52,7	3,90 (s, 3H)
12/12'	34,4	4,59 (m, 2H)	3H-9/9'		---	---
13/13'	73,1	---	2H-12/12'; H-14/14'		---	---
14/14'	77,7	2,20 (s, 1H)		2H-12/12'	---	---

Figura 23: Estrutura química do derivado 04.

4.1.2.4 Inserção do grupo benzila – Derivado 05

O derivado 05 foi obtido com 99,25% de rendimento e apresentou-se na forma de cristais amarelos, solúveis em diclorometano, o qual foi identificado através de análise espectral dos dados de infravermelho, RMN ^1H e ^{13}C unidimensionais em comparação com os dados encontrados na literatura.

O espectro de IV (Figura 76, página 156) revela a presença de sinais característicos de $\text{C-H } sp^3$ (2948 cm^{-1}), C=O (1691 cm^{-1}), C-O (1244 cm^{-1}), C=C (1617 cm^{-1}) semelhante ao espectro da caulerpina. Verificou-se ainda, o desaparecimento do sinal fino entre $3500\text{-}3300 \text{ cm}^{-1}$ relativo ao grupo N-H e o surgimento de um sinal em 1555 cm^{-1} referente ao estiramento de CH_2 , sugerindo a substituição do hidrogênio diretamente ligado ao núcleo indólico por grupo CH_2 -R. (PAVIA, 2010).

O espectro de RMN ^1H do derivado 05 (Tabela 6, Figura 77, página 157) apresenta-se semelhante ao da caulerpina, no qual, verificou-se a ausência do singlete referente ao hidrogênio ligado ao nitrogênio indólico e a presença de sinais característicos de carbono metínico ligado a carbono não hydrogenado e de núcleo aromático. No entanto, para a região de aromático observou-se mais três sinais com deslocamento em $\delta_{\text{H}} 7,13$ (2H), $\delta_{\text{H}} 6,73$ (2H) e $\delta_{\text{H}} 6,71$ (1H), referentes aos hidrogênios de posição orto, meta e para do grupo benzil. Esta análise demonstrou ainda a presença de sinal em $\delta_{\text{H}} 5,10$ (m, 2H) compatível com grupo metileno diretamente ligado ao nitrogênio indólico. Estas observações sugerem que o grupo

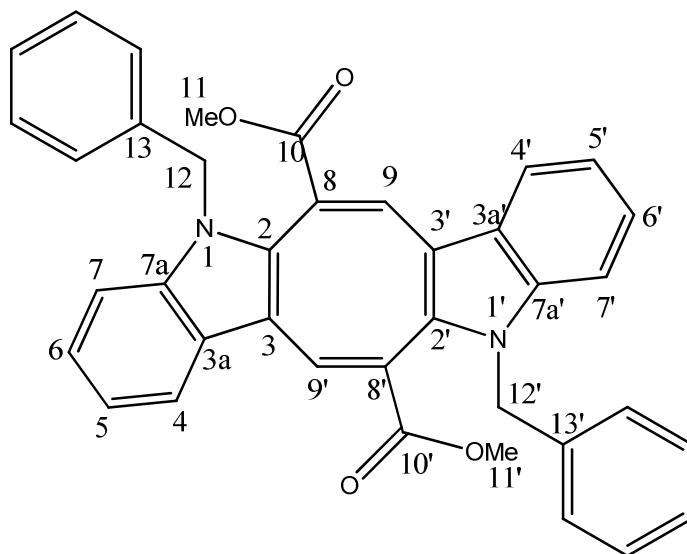
metileno está diretamente ligado ao nitrogênio do indol substituindo o hidrogênio característico.

O espectro de RMN ^{13}C -APT do derivado 05 (Tabela 6, Figura 78, página 158) permite a identificação de 17 sinais. Destes, 12 são observados com deslocamentos semelhantes aos verificados para a caulerpina, tornando evidente o surgimento dos seguintes sinais: δ_{C} 48,1 referente ao grupo metileno ligado diretamente ao nitrogênio indólico; δ_{C} 138,0 compatível com carbono quaternário aromático; δ_{C} 128,5, δ_{C} 127,3 e δ_{C} 126,8 que correspondem ao grupo CH de aromático (PAVIA, 2010). Os dados obtidos na análise de RMN ^{13}C -APT do derivado 05 atesta os resultados do RMN ^1H .

Os dados espectrais permitiram a identificação da molécula obtida através de semi-síntese da caulerpina como sendo (6*E*, 13*E*)-dimetil 5,12- dibenzil- 5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b'] diindol-6,13-dicarboxilato) com fórmula molecular $\text{C}_{38}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_4$ e peso molecular de 578,66g/mol (Figura 24).

Tabela 6: Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C (δ , CDCl_3 , 200 MHz) do derivado 05 e da caulerpina (δ , CDCl_3 , 200 MHz).

	Derivado 05		Caulerpina	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
N	---	---	9,21 (s, 1H)	---
2/2'	---	134,4	--	133,0
3/3'	---	114,1	--	112,6
3a/3a'	---	126,8	--	128,3
4/4'	7,35 (dl, 1H)	119,4	7,43 (dl, 1H)	118,4
5/5'	6,95 (m, 1H)	120,6	7,11 (dt, 1H)	120,8
6/6'	7,05 (m, 1H)	123,2	7,20 (dt, 1H)	123,5
7/7'	7,31 (dl, 1H)	110,6	7,31 (dl, 1H)	111,7
7a/7a'	---	136,9	---	137,8
8/8'	---	126,6	---	125,6
9/9'	8,45 (dl, 1H)	144,9	8,06 (s, 1H)	142,9
10/10'	---	166,3	---	166,8
11/11'	3,66 (s, 3H)	52,4	3,90 (s, 3H)	52,7
12/12'	5,10 (m, 2H)	48,1	---	---
13/13'	---	138,0	---	---
C orto	7,13 (2H)	128,5	---	---
C meta	6,73 (2H)	127,3	---	---
C para	6,71 (1H)	126,2	---	---

Figura 24: Estrutura química do derivado 05.

4.1.2.5 Inserção do grupo 3,4,5 hidroxibenzil

Ao final da reação que utilizou a caulerpina e o cloreto de 3,4,5-trimetoxibenzil utilizando-se a metodologia descrita por Zhao et al. (2014) utilizando-se DMF como solvente, não observou-se a formação do produto esperado (caulerpina *N*-3,4,5 hidroxibenzil). No entanto, observou-se a formação de um subproduto (derivado 06) com 32,23 % de rendimento que se apresentou na forma de cristais escuros, solúveis em metanol, o qual foi submetido a análise espectral dos dados de RMN ^1H e ^{13}C unidimensionais e bidimensionais em comparação com os dados da caulerpina.

Apesar do espectro de RMN ^1H do derivado 06 (Tabela 7, Figura 88, página 168) ser semelhante ao da caulerpina, observam-se 2 sinais de hidrogênio de carbono metínico ligado a carbono não hidrogenado e picos característicos de núcleo aromático integrando para o dobro de hidrogênios, quando comparados aos da caulerpina. Esta duplicidade de sinais indica que a estrutura da caulerpina perdeu a simetria e tornou-se assimétrica, portanto teremos substituintes diferentes nos seus núcleos indólicos ou nos seus grupamentos ésteres. Este experimento também evidenciou a não duplicidade do sinal referente ao hidrogênio de metoxila, indicando a existência de um único grupo metoxila na estrutura, e o surgimento de um sinal δ_{H} 4,80 (s) (PAVIA, 2012).

Ao comparar-se o experimento de RMN ^{13}C -APT do derivado 06 (Tabela 7, Figuras 89 e 90, páginas 169 e 170) com o espectro da caulerpina observa-se que com exceção dos sinais referentes à carbonila (δ_{C} 168,4) e a metoxila (δ_{C} 53,0), todos os outros picos apresentam-se duplicados, confirmando a ausência de simetria evidenciada na análise de RMN ^1H desta amostra.

A análise bidimensional do HMBC (tabela 7, Figura 91, página 171) demonstra a existência de duas carbonilas com deslocamentos em δ_{C} 168,4 (C-10) e 166,8 (C-10'), que se correlacionam com H-9 e H-9' respectivamente. No entanto, apenas o C-10' demonstra acoplamento a $^3J_{\text{CH}}$ com 3H-11', sugerindo que o derivado 06 apresenta apenas um éster metílico.

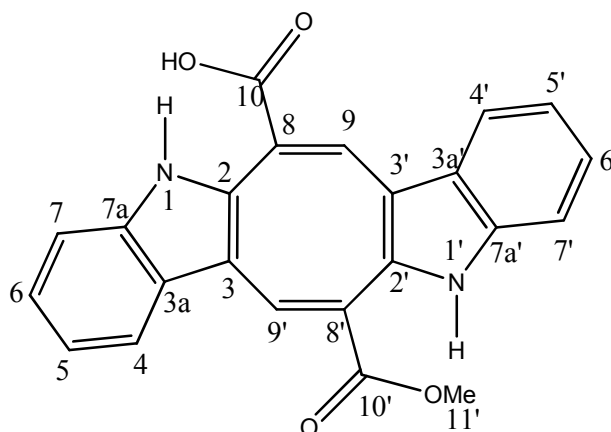
A avaliação dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C unidimensionais e bidimensionais permitiram a identificação do análogo 06 como sendo (6*E*, 13*E*)-13-(metoxicarbonyl)-5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b'] diindol-6-ácido carboxílico) com fórmula molecular $\text{C}_{23}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$ e peso molecular de 384,38g/mol (Figura 25).

Tabela 7: Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C e HMBC (δ , MeDO, 500 MHz) do derivado 06 e da caulerpina (δ , CDCl_3 , 200 MHz).

	Derivado 06				Caulerpina	
	RMN ^{13}C e ^1H		HMBC		RMN ^{13}C e ^1H	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
N	---	---			---	9,21 (s, 1H)
2	135,3	---	H-9		133,0	--
3	113,5	---		H-4	112,6	--
3 a	129,3	---		H-5; H-7	128,3	--
4	118,9	7,41 (dl, 1H)	H-5	H-6	118,4	7,43 (dl, 1H)
5	121,3	7,02 (dt, 1H)	H-4; H-6	H-7	120,8	7,12 (dt, 1H)
6	123,8	7,10 (dt, 1H)	H-5; H-7	H-4	123,5	7,20 (dt, 1H)
7	112,7	7,30 (dl, 1H)	H-6	H-5	111,7	7,31 (dl, 1H)
7 a	139,5	---	H-7	H-4; H-6;	137,8	---
8	126,9	---	H-9		125,6	---
9	143,9	8,21 (s, 1H)			142,9	8,06 (s, 1H)
10	168,4	---		H-9	166,8	---
11	---	---			52,7	3,90 (s, 3H)
OH	---	4,81 (s)	2H-14		---	---

N	---	---			---	9,21 (s, 1H)
2'	134,01	---	H-1'; H-9'		133,0	--
3'	112,9	---		H-1'; H-4'	112,6	--
3a'	129,2	---		H-1'; H-5'; H-7'	128,3	--
4'	118,7	7,41 (dl, 1H)	H-5'	H-6'	118,4	7,43 (dl, 1H)
5'	121,1	7,02 (dt, 1H)	H-4'; H-6'	H-7'	120,8	7,12 (dt, 1H)
6'	123,8	7,10 (dt, 1H)	H-5'; H-7'	H-4'	123,5	7,20 (dt, 1H)
7'	112,6	7,30 (dl, 1H)	H-6'	H-5'	111,7	7,31 (dl, 1H)
7a'	139,4	---	H-1'; H-7	H-4; H-6	137,8	---
8'	129,9	---	H-9'		125,6	---
9'	143,9	8,17 (s, 1H)			142,9	8,06 (s, 1H)
10'	166,8*	---		H-9'; 3H-11'	166,8	---
11'	53,0	3,86 (s, 3H)			52,7	3,90 (s, 3H)
OH	---	---			---	

*deslocamento visível apenas na análise de HMBC (500 MHz, MeOD).

Figura 25: Estrutura química do derivado 06.

O monoácido da caulerpina foi obtido como produto de hidrólise de apenas um dos grupamentos éster do protótipo em meio básico, através de uma reação de adição nucleofílica-eliminação na respectiva carbonila. (Figuras 26 e 27). Considerando que o carbono da carbonila atua como um grupo fortemente eletrofílico e a capacidade do átomo de oxigênio da carbonila de aceitar um par de elétrons da dupla ligação, o mecanismo reacional justifica-se através da formação de um intermediário tetraédrico após a adição do ânion hidroxila no carbono carbonílico. O intermediário formado normalmente elimina o grupo acila, promovendo a regeneração da ligação dupla do carbono-oxigênio e estabelecendo o grupo funcional ácido carboxílico (CLAYDEN, 2001).

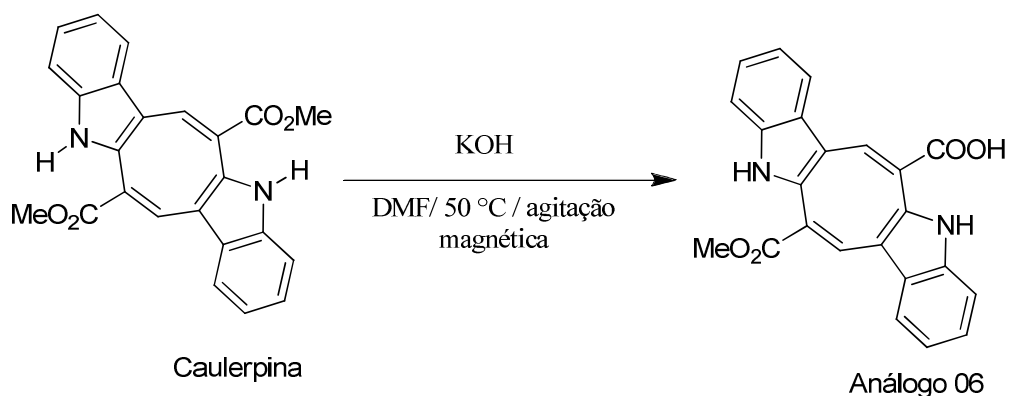
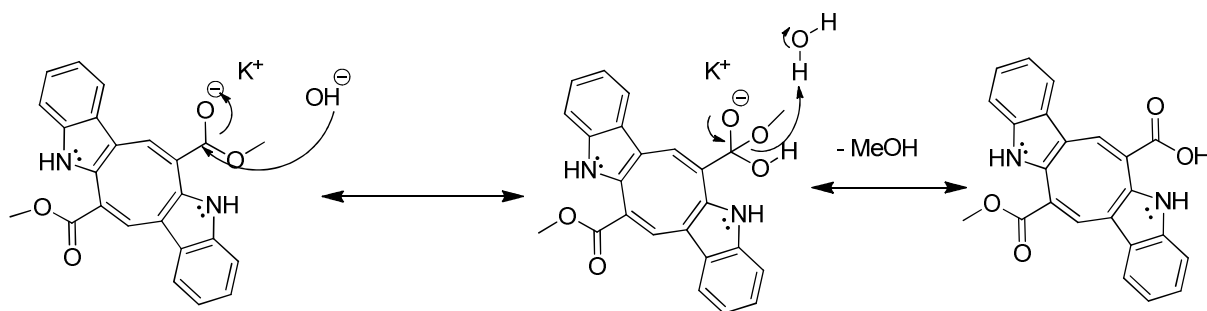
Figura 26: Equação geral de hidrólise parcial da caulerpina.

Figura 27: Mecanismo reacional de hidrólise parcial da caulerpina.

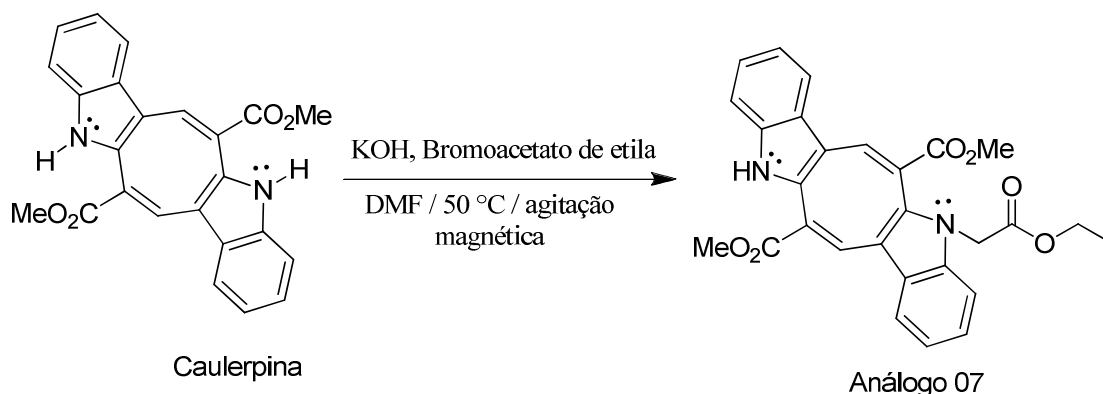


4.1.2.6 Inserção mono indólica do grupo acetato de etila – Derivado 07

Segundo Montanari (2011), a inserção de grupos funcionais à estrutura química de moléculas protótipas resultam na formação de derivados com diferentes propriedades físico-químicas, as quais refletem em modificações das propriedades farmacodinâmicas, farmacocinéticas e toxicológicas.

A fim de avaliar as modificações nas propriedades físico-químicas derivadas da inserção de novos grupos funcionais a estrutura da caulerpina procedeu-se a reação desta com bromoacetato de etila através da metodologia proposta por Zhao et al. (2014) (Figura 28).

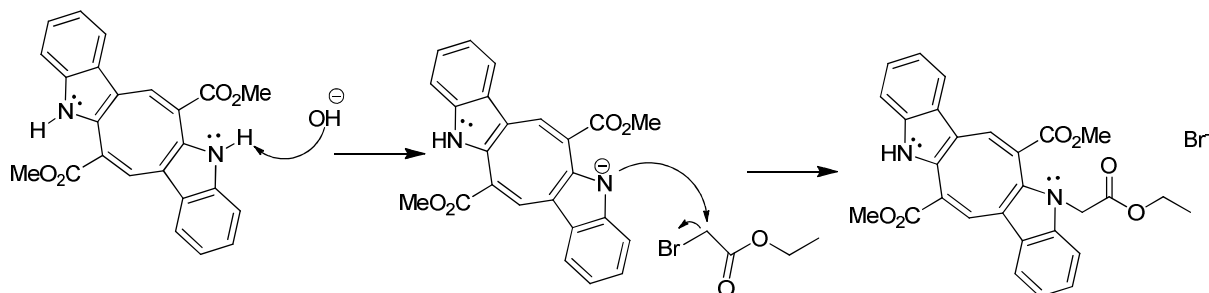
Figura 28: Equação geral da reação de inserção mono indólica do grupo acetato de etila.



O mecanismo reacional para a inserção mono indólica do grupo acetato de etila é semelhante ao explanado para as reações de metilação e *N*-alquilação, onde o hidróxido de potássio atua como uma base de Bronsted, aceitando o próton diretamente ligado ao

nitrogênio, transformando a caulerpina em um nucleófilo que promove uma substituição nucleofílica S_N2 com os haletos de alquila utilizados. (Figura 29) (CLAYDEN, 2001).

Figura 29: Mecanismo reacional da inserção mono indólica do grupo acetato de etila.



O derivado 07 foi obtido com 13,67% de rendimento e apresentou-se na forma de sólido alaranjado, solúveis em diclorometano, o qual foi identificado através de análise espectral dos dados de RMN ^1H e ^{13}C unidimensionais e bidimensionais em comparação com os dados encontrados na literatura.

O espectro de RMN ^1H do derivado 07 (Tabela 8, Figura 80, página 160) apresenta sinais duplicados para o núcleo aromático, carbono metínico ligado a carbono não hidrogenado e metoxila. No entanto, observa-se um único singlete em δ_{H} 9,11 característico de hidrogênio diretamente ligado a nitrogênio indólico que integra para um hidrogênio, sugerindo que apenas um dos núcleos indólicos da caulerpina apresenta hidrogênio ligado ao nitrogênio. A duplicação dos sinais norteadores da caulerpina indica que a molécula obtida como produto desta reação não é simétrica, apontando que houve substituição do hidrogênio de apenas um núcleo indólico da estrutura da caulerpina. A análise de RMN ^1H também evidencia o aparecimento de sinais em δ_{H} 0,97 (t, 3H) referente a grupo metila, δ_{H} 4,00 (m, 2H) característico de metileno e dois sinais, um em δ_{H} 4,65 (m, 1H) e outro em δ_{H} 4,48 (m, 1H), ambos compatíveis com grupo CH_2 que apresenta cada um de seus hidrogênios em um ambiente químico diferente, esta observação é idêntica à citada para o derivado 03 (PAVIA, 2010).

O experimento de RMN ^{13}C -APT do derivado 07 (Tabela 8, Figuras 81, 82 e 83, páginas 161, 162 e 163) forneceu um espectro a partir do qual, verificamos a presença de 12 sinais duplicados referentes aos carbonos da estrutura da caulerpina. Adicionalmente foi constatado a presença de mais 4 sinais únicos: δ_{C} 167,9 para carbonila, δ_{H} 45,93 e δ_{H} 13,80 para grupos metilenos e δ_{H} 13,80 para grupo metil.

Estas observações sugerem a substituição do hidrogênio de apenas um núcleo indólico da caulerpina pelo grupo acetato de etila. Com o intuito de confirmação da estrutura sugerida procedeu-se as análises de COSY, HMQC e HMBC do derivado 07 (Figuras 84, 85 e 86, páginas 164, 165 e 166).

O espectro de HMBC (Figura 86, página 166) demonstra os seguintes acoplamentos: $^2J_{CH}$ dos carbonos 2' e 7' com o H-1'; $^3J_{CH}$ dos carbonos 3' e 3a' com o H-1'; $^3J_{CH}$ 2 e 7a com 2H-12 (Tabela 08). As análises de RMN bidimensional confirmam as observações obtidas dos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C -APT.

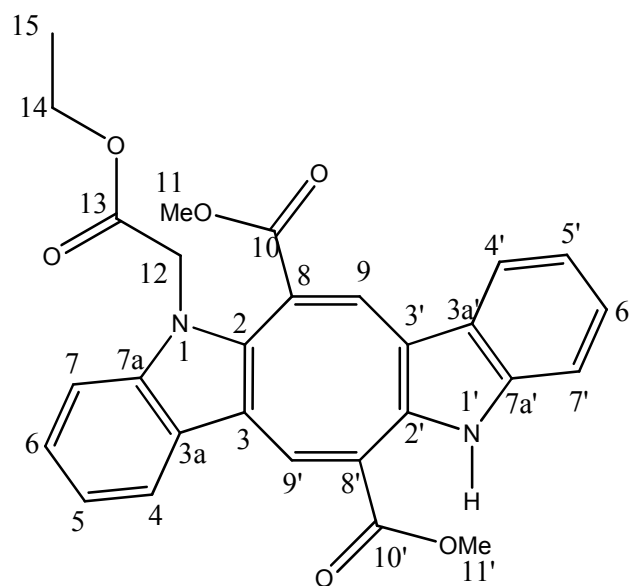
A avaliação dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C unidimensionais e bidimensionais permitiram a identificação do análogo 07 como sendo (6*E*, 13*E*)-dimetil-5,12-dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b'] diindol-6,13-dicarboxilato) com fórmula molecular $C_{28}H_{24}N_2O_4$ e peso molecular de 484,50g/mol (Figura 30).

Tabela 8: Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C e HMBC (δ , CDCl_3 , 500 MHz) do derivado 07 e da caulerpina (δ , CDCl_3 , 200 MHz).

	Derivado 07				Caulerpina	
	RMN ^{13}C e ^1H		HMBC		RMN ^{13}C e ^1H	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
N	---	---			---	9,21 (s, 1H)
2	134,1	---	H-9	2H-12	133,0	--
3	113,6	---		H-4	112,6	--
3 a	127,6	---		H-5; H-7	128,3	--
4	118,8	7,45 (dl, 1H)	H-5	H-6	118,4	7,43 (dl, 1H)
5	120,7	7,11 (dt, 1H)	H-4; H-6	H-7	120,8	7,11 (dt, 1H)
6	123,6	7,17 (dt, 1H)	H-5; H-7	H-4	123,5	7,20 (dt, 1H)
7	111,5	7,28 (dl, 1H)	H-6	H-5	111,6	7,31 (dl, 1H)
7 a	138,8	---	H-7	H-4; H-6; 2H-12	137,8	---
8	126,4	---	H-9		125,6	---
9	146,3	8,33 (s, 1H)			142,9	8,06 (s, 1H)
10	166,8	---		3H-15	166,8	---
11	52,6	3,88 (s, 3H)			52,7	3,90 (s, 3H)
12	45,9	4,65 (m, 1H)			---	---
		4,48 (m, 1H)			---	---

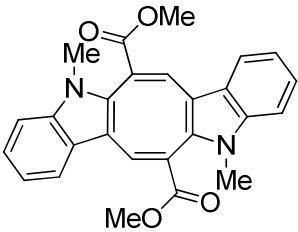
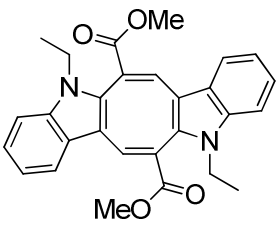
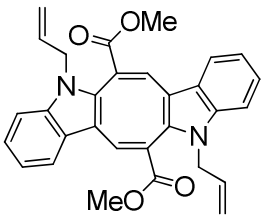
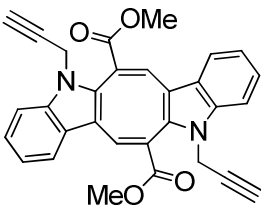
13	167,9	---	2H-12	2H-14	---	---
14	61,5	4,00 (m, 2H)	3H-15		---	---
15	13,8	0,974 (t, 3H)	2H-14		---	---
N	----	9,11 (s, 1H)			---	9,21 (s, 1H)
2'	132,2	---	H-1'; H-9'		133,0	--
3'	113,3	---		H-1'; H-4'	112,6	--
3a'	126,8	---		H-1'; H-5'; H-7'	128,3	--
4'	118,4	7,43 (dl, 1H)	H-5'	H-6'	118,4	7,43 (dl, 1H)
5'	120,6	7,08 (dt, 1H)	H-4'; H-6'	H-7'	120,8	7,11 (dt, 1H)
6'	123,2	7,16 (dt, 1H)	H-5'; H-7'	H-4'	123,5	7,20 (dt, 1H)
7'	110,1	7,21 (dl, 1H)	H-6'	H-5'	111,6	7,31 (dl, 1H)
7a'	137,3	---	H-1'; H-7	H-4; H-6	137,8	---
8'	124,8	---	H-9'		125,6	---
9'	141,5	8,15 (s, 1H)			142,9	8,06 (s, 1H)
10'	165,9	---		3H-15'	166,8	---
11'	52,3	3,76 (s, 3H)			52,7	3,90 (s, 3H)

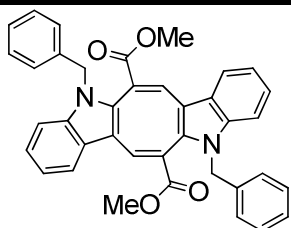
Figura 30: Estrutura química do derivado 07.



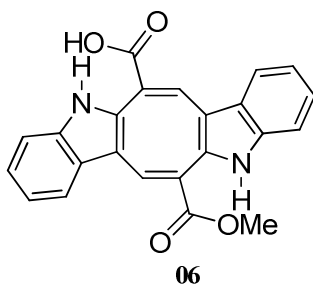
Os rendimentos dos derivados ésteres *N*-substituídos da caulerpina estão relatados na Tabela 9, onde observamos que o produto obtido com o maior rendimento foi o derivado 05 com 99,25%.

Tabela 9: Estrutura e rendimento dos derivados ésteres *N*-substituídos da caulerpina

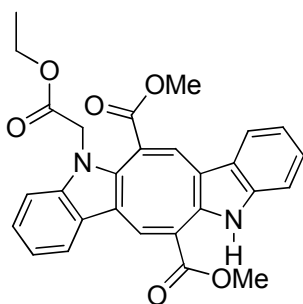
Derivados purificados	Rendimento
 01 Caulerpina N-metil	Tentativa 1: 11,5% Tentativa 2: 64%
 02 Caulerpina N-etil	Tentativa 1: 20% Tentativa 2: 50% Tentativa 3: 81,5%
 03 Caulerpina N-alil	82,5%
 04 Caulerpina N-propargil	85%



99,25%

05**Caulerpina N-benzil**

32,23%

06**Mono ácido caulerpínico**

13,63%

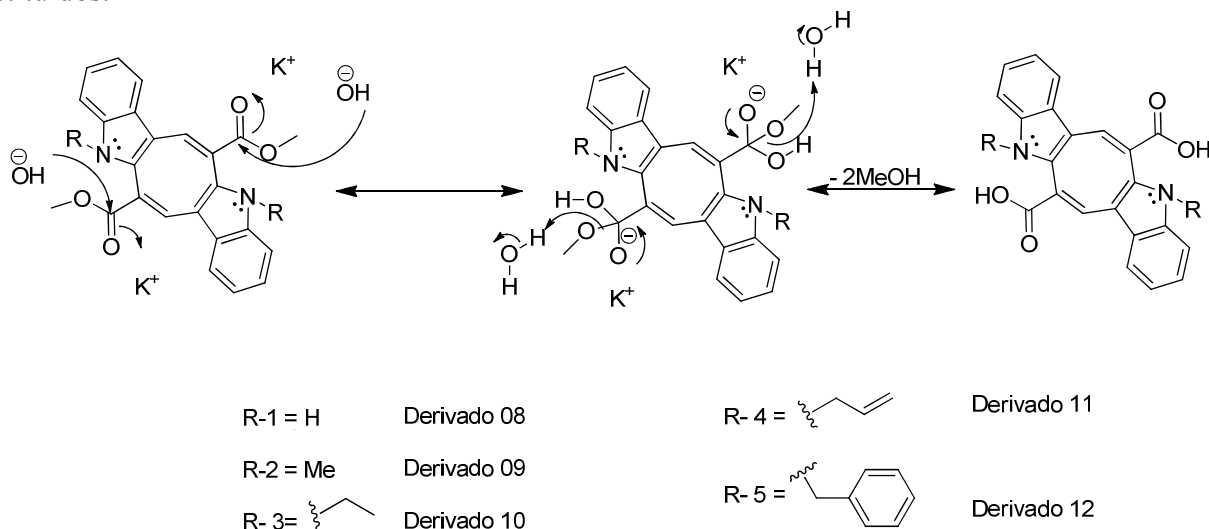
07**Caulerpina mono N-acetato de etila**

4.1.3 Semi-síntese do Ácido caulerpínico e ácidos das caulerpina *N*-substituídas – Derivados 07, 08, 09, 10 e 11

A introdução de grupos ácidos na estrutura química de moléculas protótipo produz derivados com maior solubilidade em água, em decorrência da capacidade dos ácidos de formarem sais *in vitro* à medida que a acidez na estrutura aumenta. Usualmente os grupos ácidos mais explorados são o ácido carboxílico e o ácido sulfônico. A introdução de grupos -COOH favorece a velocidade da eliminação renal (MONTANARI, 2011).

Zhao et al., (2015) ao estudar a relação estrutura atividade de derivados da molécula contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina demonstraram que a inserção de grupo

Figura 32: Mecanismo reacional de hidrólise da caulerpina e dos seus derivados *N*-substituídos.



Os ácidos obtidos como derivados da caulerpina foram obtidos com os seguintes rendimentos e apresentaram-se da seguinte forma: derivado 08, como sólido preto; derivados 09 e 10, como cristais alaranjados; derivados 11 e 12, como cristais amarelos. Todos os ácidos sintetizados apresentam-se solúveis em metanol e foram identificados através de análise espectral dos dados de infravermelho, RMN ^1H e em comparação com os dados encontrados dos respectivos ésteres.

A análise de infravermelho dos ácidos derivados da caulerpina (Figuras 93, 97, 101, 106 e 111, páginas 174, 178, 182, 187 e 192) evidencia sinais semelhantes às moléculas que lhes deram origem. No entanto, para todos os ácidos observou-se a ausência do sinal em 2948 cm^{-1} referente ao C-H sp^3 do éster e o surgimento de um sinal largo entre 3400 e 2400 cm^{-1} característico de hidroxila de ácido carboxílico, sugerindo que houve hidrólise do éster (PAVIA, 2012).

Os resultados das análises de RMN ^1H e RMN ^{13}C -APT dos derivados 08, 09, 10, 11 e 12 (Tabela 10, 11, 12, 13 e 14, Figuras 94, 95, 98, 99, 102, 103, 107, 108, 109, 112, 113, páginas 175, 176, 179, 180, 183, 184, 188, 189, 190, 193 e 194) demonstraram, para cada amostra, perfil espectral semelhante aos das moléculas que lhes originaram. Nos espectros RMN ^1H observou-se a ausência dos sinais com deslocamento entre $\delta_{\text{H}} 3,60$ e $4,90$ (s, 3H) característico de metoxila de éster e o surgimento de sinais entre $\delta_{\text{H}} 3,40$ e $\delta_{\text{H}} 3,90$ (s) compatível com hidroxila de ácido carboxílico, sugerindo a ocorrência da hidrólise da caulerpina e formação do produto ácido. O espectro de RMN ^{13}C -APT confirma as observações do RMN ^1H ao evidenciar a ausência dos sinais entre $\delta_{\text{C}} 52,4$ e $52,7$ referentes às metoxilas de éster.

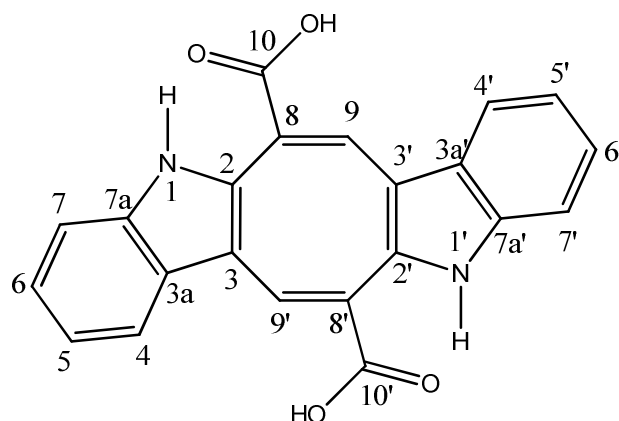
As carbonilas (C-10 e 10') de éster dos derivados 10 e 12, C- 8/8' do derivado 10 e C-3a/3a' do derivado 12 não ficaram visíveis no RMN ^{13}C -APT, 200 MHz em MeOD, no entanto a análise de HMBC (500 MHz) destas amostras evidenciou deslocamentos em δ_{C} 168,2 e 128,0 para o derivado 10 e em δ_{C} 167,8 e 128,2 para o derivado 12 (Figuras 104, página 185 e Figura 114, página 195, respectivamente). Provavelmente o tempo de análise destas amostra no RMN ^{13}C -APT, 200 MHz foi insuficiente para permitir o relaxamento da carbonila e dos carbonos 8/8' e 3a/3a'.

Os dados espectrais permitiram a identificação do derivado 08 como sendo (6*E*, 13*E*)-5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b'] diindol-6,13-ácido dicarboxílico) com fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4$ e peso molecular de 370,36 g/mol (Figura 33).

Tabela 10: Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C (δ , MeOD_3 , 200 MHz) do derivado 08 e da caulerpina (δ , CDCl_3 , 200 MHz).

	Ácido da Caulerpina (Derivado 08)		Caulerpina	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
N	---	---	9,21 (s, 1H)	---
2/2'	---	134,3	--	133,0
3/3'	---	112,7	--	112,6
3a/3a'	---	128,9	--	128,3
4/4'	7,37 (dl, 1H)	118,4	7,43 (dl, 1H)	118,4
5/5'	7,09 (dt, 1H)	120,8	7,11 (dt, 1H)	120,8
6/6'	7,01 (dt, 1H)	123,6	7,20 (dt, 1H)	123,5
7/7'	7,28 (dl, 1H)	112,3	7,31 (dl, 1H)	111,7
7a/7a'	---	139,1	---	137,8
8/8'	---	127,3	---	125,6
9/9'	8,21 (s, 1H)	143,7	8,06 (s, 1H)	142,9
10/10'	---	169,3	---	166,8
11/11'	---	---	3,90 (s, 3H)	52,7
OH	4,89 (s)	---	---	---

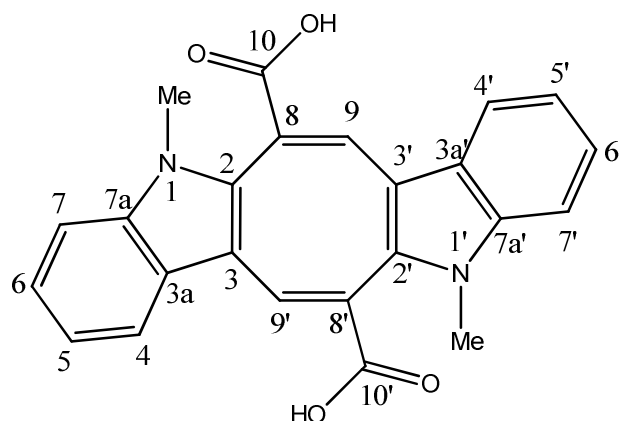
Figura 33: Estrutura química do derivado 08.



Os dados espectrais permitiram a identificação do derivado 09 como sendo (6*E*, 13*E*)-5,12- dimetil- 5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b'] diindol-6,13-ácido dicarboxílico com fórmula molecular $C_{24}H_{18}N_2O_4$ e peso molecular de 398,41g/mol (Figura 34).

Tabela 11: Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C (δ , MeOD_3 , 200 MHz) do derivado 09 e da caulerpina (δ , CDCl_3 , 200 MHz).

	Ácido da caulerpina N-metil (Ánálogo 09)		Caulerpina N-metil (Ánálogo 01)	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
N	---	---	----	---
2/2'	---	144,3	--	134,6
3/3'	---	121,5	--	112,9
3a/3a'	---	135,9	--	126,6
4/4'	7,49 (dl, 1H)	127,8	7,54 (dl, 1H)	118,8
5/5'	7,09 (dt, 1H)	129,7	7,12 (dt, 1H)	120,5
6/6'	7,20 (dt, 1H)	132,1	7,15 (dt, 1H)	123,0
7/7'	7,40 (dl, 1H)	119,9	7,23 (dl, 1H)	109,9
7a/7a'	---	147,5	---	138,6
8/8'	---	135,3	---	125,4
9/9'	8,33 (s, 1H)	152,0	8,49 (s, 1H)	144,6
10/10'	---	175,9	---	166,4
11/11'	---	---	3,81 (s, 3H)	52,5
12/12'	3,451 (s)	40,2	3,456 (s, 3H)	30,9
OH	3,451 (s)	---	---	---

Figura 34: Estrutura do derivado 09.

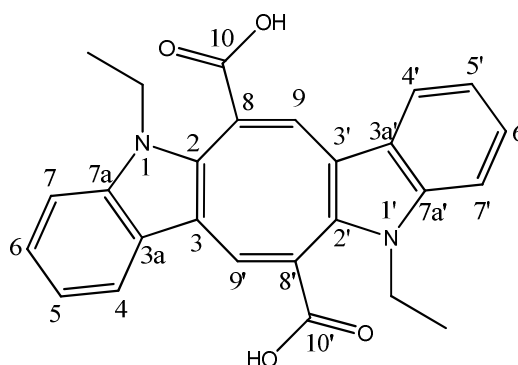
Os dados espectrais permitiram a identificação do derivado 10 como sendo (6*E*, 13*E*)-5,12- dietil- 5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b'] diindol-6,13-ácido dicarboxílico) com fórmula molecular $C_{26}H_{22}N_2O_4$ e peso molecular de 426,46g/mol (Figura 35).

Tabela 12: Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C (δ , MeOD_3 , 200 MHz) do derivado 10 e do derivado 02 (δ , CDCl_3 , 200 MHz).

	Ácido caulerpina N-etil		Caulerpina N-etil	
	Derivado 10		Derivado 02	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
2/2'	---	135,3	--	134,0
3/3'	---	114,4	--	113,2
3a/3a'	---	128,0*	--	126,9
4/4'	7,45 (dl, 1H)	119,1	7,51(dl, 1H)	118,8
5/5'	7,01 (dt, 1H)	121,1	7,10 (dt, 1H)	120,4
6/6'	7,15 (dt, 1H)	123,6	7,19 (dt, 1H)	122,7
7/7'	7,27 (dl, 1H)	111,0	7,26 (dl, 1H)	110,5
7a/7a'	---	136,7	---	137,5
8/8'	---	126,6	---	126,1
9/9'	8,41 (s, 1H)	144,1	8,44 (s, 1H)	144,4
10/10'	---	168,2*	---	166,8
11/11'	---	---	3,80 (s, 3H)	52,6
12/12'	4,06 (m, 1H)	40,0	4,01 (m, 1H)	39,2
	3,87 (m, 1H)		3,79 (m, 1H)	
13/13'	1,07 (t, 3H)	15,1	1,17 (t, 3H)	14,8
OH	4,95 (s)	---	---	---

*deslocamento visível apenas na análise de HMBC (500 MHz, MeOD).

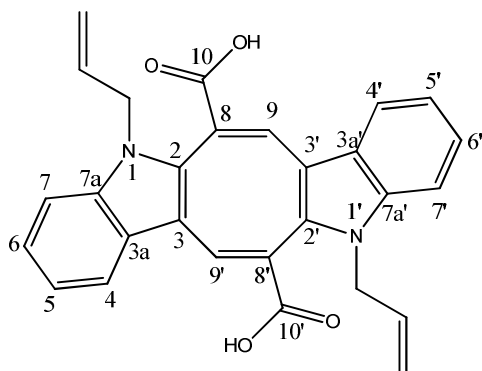
Figura 35: Estrutura do derivado 10.



Os dados espectrais permitiram a identificação do derivado 11 como sendo (6*E*, 13*E*)-5,12- dialil- 5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b'] diindol-6,13-ácido dicarboxílico) com fórmula molecular C₂₈H₂₂N₂O₄ e peso molecular de 450,49g/mol (Figura 36).

Tabela 13: Dados comparativos de RMN ¹H e ¹³C (δ, MeOD₃, 200 MHz) do derivado 11 e do derivado 03 (δ, CDCl₃, 200 MHz).

	Ácido caulerpina N-alil		Caulerpina N-alil	
	Derivado 11		Derivado 03	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
2/2'	---	135,6	---	134,1
3/3'	---	115,0	---	113,5
3a/3a'	---	128,4	---	126,6
4/4'	7,43 (dl, 1H)	119,7	7,49(dl, 1H)	118,4
5/5'	7,07 (dt, 1H)	121,3	7,12 (dt, 1H)	120,4
6/6'	7,15 (dt, 1H)	123,8	7,20 (dt, 1H)	122,9
7/7'	7,26 (dl, 1H)	111,5	7,23 (dl, 1H)	110,6
7a/7a'	---	139,3	---	137,9
8/8'	---	127,8	---	126,1
9/9'	8,40 (s, 1H)	144,5	8,43 (s, 1H)	144,5
10/10'	---	169,2	---	166,4
11/11'	---	---	3,77 (s, 3H)	52,4
12/12'	4,93 (s)	47,4	4,93 (t, 2H)	47,1
13/13'	5,70 (m, 1H)	134,4	5,73 (m, 1H)	132,9
14/14'	4,57 (m, 2H)	116,5	4,47 (ddd, 2H)	117,1
OH	4,93 (s)	---	---	---

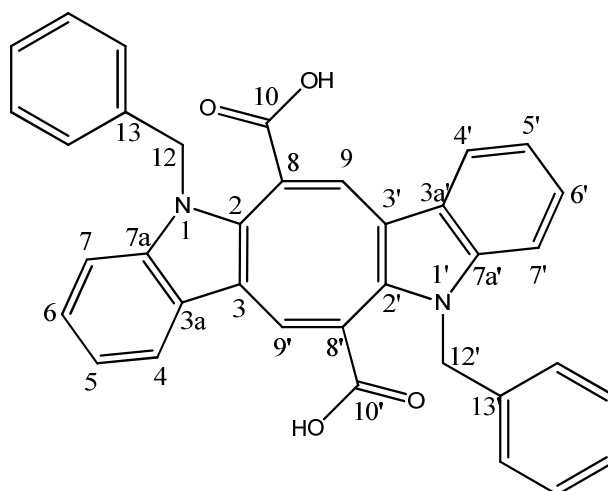
Figura 36: Estrutura do derivado 11.

Os dados espectrais permitiram a identificação do derivado 12 como sendo (6*E*, 13*E*)-5,12- dibenzil- 5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b'] diindol-6,13-ácido dicarboxílico) com fórmula molecular C₃₆H₂₆N₂O₄ e peso molecular de 550,60 g/mol (Figura 37).

Tabela 14: Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C (δ , MeOD_3 , 200 MHz) do derivado 12 e do derivado 05 (δ , CDCl_3 , 200 MHz).

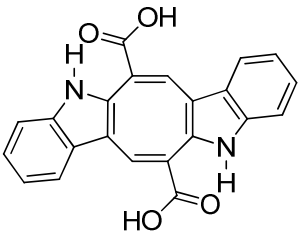
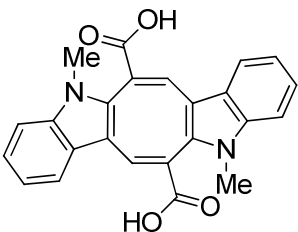
	Ácido caulerpina N-benzil		Caulerpina N-benzil	
	Derivado 12		Derivado 05	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
2/2'	---	135,9	---	134,4
3/3'	---	115,6	---	114,1
3a/3a'	---	128,8	---	126,8
4/4'	7,11 (m)	119,8	6,72 (dl)	119,4
5/5'	7,11 (m)	121,3	7,05 (m, 1H)	120,6
6/6'	7,11 (m)	123,8	7,33 (dt, 1H)	123,2
7/7'	7,11 (m)	111,4	6,72 (dl)	110,6
7a/7a'	---	138,6	---	136,9
8/8'	---	128,2*	---	126,6
9/9'	8,422 (s, 1H)	144,9	8,45 (dl, 1H)	144,9
10/10'	---	167,8*	---	166,4
11/11'	---	---	3,66 (s, 3H)	52,4
12/12'	5,22 (t, 2H)	30,7	5,10 (m, 2H)	48,1
13/13'	---	139,1	---	138,0
C orto	6,40 (t, 2H)	129,2	7,13 (dt, 2H)	128,6
C meta	6,56 (dl, 2H)	127,8	6,72 (dl)	127,3
C para	6,73 (t, 1H)	126,9	6,95 (m, 1H)	126,2
OH	3,66 (s)	---	---	---

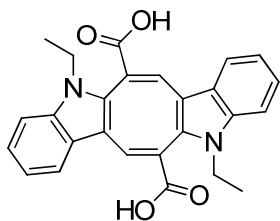
*deslocamento visível apenas na análise de HMBC (500 MHz, MeOD).

Figura 37 : Estrutura do derivado 12.

Os rendimentos dos derivados ácidos *N*-substituídos da caulerpina estão relatados na Tabela 15, onde observamos que o produtos obtido com o maior rendimento foi o derivado 08 com 79%.

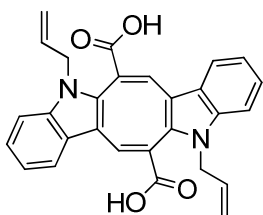
Tabela 15: Estrutura e rendimento dos do ácido caulerpínico e dos derivados ácidos da caulerpina *N*-substituída.

Derivados purificados	Rendimento
 08 Ácido caulerpínico	79%
 09 Ácido caulerpina N-metil	62%



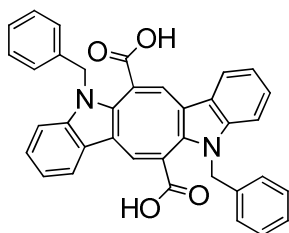
58,8%

10**Ácido caulerpina N-etil**



76%

11**Ácido da ccaulerpina N-alil**



50,63%

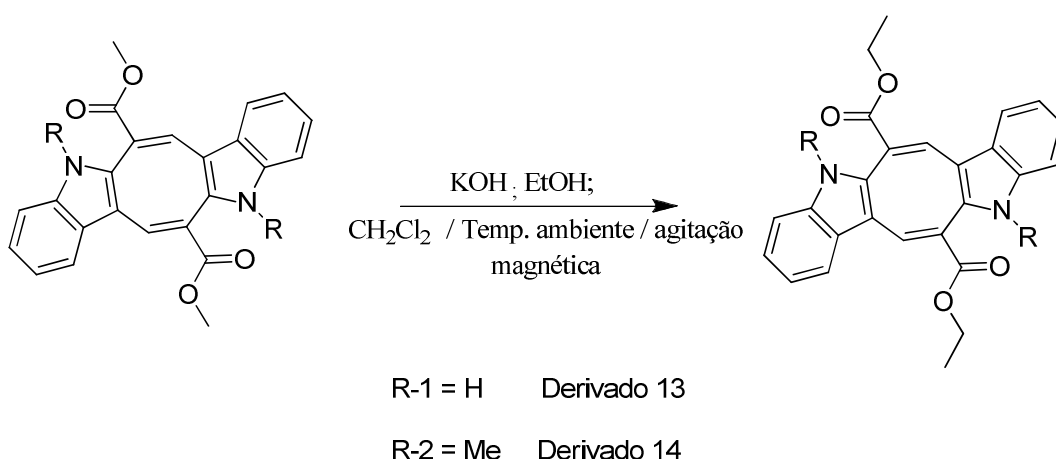
12**Ácido da caulerpina N-benzil**

4.1.4 Transesterificação da caulerpina e caulerpina *N*- metil

A fim de obtermos moléculas com o grupo etil no éster da caulerpina que possibilitassem o aumento do caráter lipofílico e potencializar a ação farmacológica da caulerpina, procederam-se reações de transesterificação partindo da caulerpina e da caulerpina *N*-metil (Figuras 15, 16 e 18, páginas 50 e 53). O derivado 13 foi obtido com rendimento de 11,5% como produto secundário durante a reação para a obtenção do derivado 01 utilizando-se etanol como solvente. Com o intuito de produzir o derivado 13 com maior rendimento, procede-se a reação de transesterificação utilizando o derivado 01 como substrato (Figura 38). Para esta tentativa o produto desejado foi purificado com 42% de rendimento.

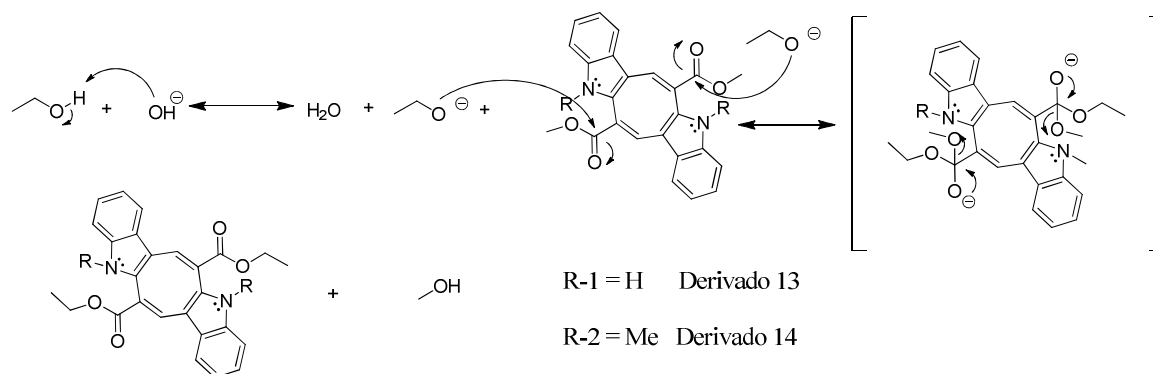
Apesar do derivado 13 ter sido anteriormente sintetizado por (SOUSA, 2016), que realizou a produção desta molécula com o objetivo de se obter um derivado com substituição etílica no éster e sem substituição indólica para fins comparativos com o derivado 12. No entanto, (SOUSA, 2016) produziu o derivado 13 com 70% de rendimento através de uma hidrólise básica da caulerpina, seguindo-se a esterificação do ácido gerado, enquanto o presente trabalho realizou uma transesterificação resultando em um produto com 60% de rendimento. A metodologia utilizada neste estudo apresenta vantagens frente a descrita na literatura por permitir a obtenção do derivado 13 através de uma única reação a partir da caulerpina, proporcionando maior agilidade no processo laboratorial ao evitar múltiplas extrações e purificações.

Figura 38: Equação geral de transesterificação da Caulerpina e do derivado 01.



O mecanismo reacional de transesterificação da caulerpina e do derivado 01, está demonstrado na Figura 39 e inicia-se quando a hidroxila da base aceita um hidrogênio da hidroxila do etanol comportando-se como uma base de Bronsted. Sequencialmente, o ânion formado promove um ataque nucleofílico à carbonila do éster da caulerpina. Considerando que o carbono da carbonila atua como um grupo fortemente eletrofílico e a capacidade do átomo de oxigênio da carbonila de aceitar um par de elétrons da dupla ligação, o mecanismo reacional justifica-se através da formação de um intermediário tetraédrico após a adição do grupo $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ no carbono carbonílico. O intermediário formado tende a eliminar o grupo metoxila, promovendo a regeneração da ligação dupla do carbono-oxigênio e restabelecendo o grupo funcional éster.

Figura 39: Mecanismo reacional de transesterificação da Caulerpina e do derivado 01.



Os derivados 13 e 14 apresentaram-se na forma de cristais vermelho-alaranjados, solúveis em diclorometano, os quais foram identificados através de análise espectral dos dados RMN ^1H e ^{13}C unidimensionais em comparação com os dados encontrados na literatura.

Os espectros de RMN ^1H do derivado 13 e 14 (Tabelas 16 e 17, Figuras 116 e 119, páginas 198 e 201) apresentaram-se semelhantes aos das moléculas que lhes deram origem, caulerpina e caulerpina *N*-metil (derivado 01) respectivamente. Para as duas amostras foi verificado a ausência do sinal com deslocamento entre δ_H 3,40 e 3,90 (s,3H) referente a metoxila do éster presente nas moléculas de origem e o surgimento de picos entre δ_H 4,00 e 4,50 (2H) e de um tripleto entre δ_H 1,00 e 1,40 (3H). Segundo Pavia (2012), hidrogênios de metileno diretamente ligado ao oxigênio de ésteres apresentam deslocamento entre 3,50 e 4,80 ppm, enquanto que grupos metila são frequentemente reconhecidos como um pico isolado e agudo, um dubleto ou um tripleto na região entre 0,70 e 1,30 ppm. Estas observações sugerem que houve substituição do grupo metil diretamente liga ao oxigênio do grupo éster pelo grupo etil nos dois derivados.

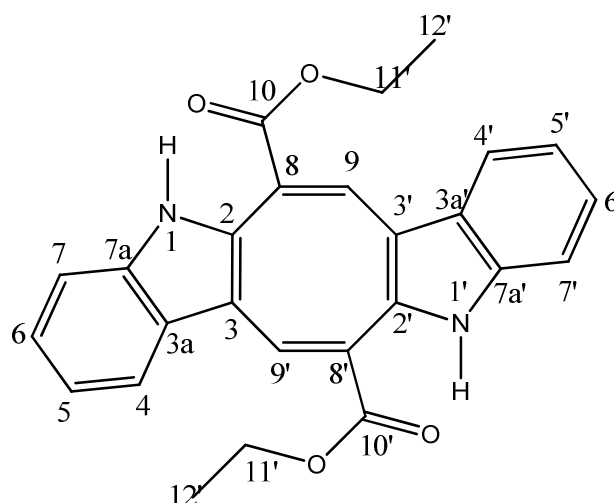
A análise de RMN ^{13}C -APT dos derivados 13 e 14 (Tabelas 16 e 17, Figuras 117 e 120, páginas 199 e 202) permitiu a identificação de picos semelhantes à caulerpina e a caulerpina *N*-metil. Este experimento tornou evidente par cada amostra a ausência do sinal característico de carbono de metoxila em δ_C 52,5 -52,7 e o surgimento de picos em δ_C 56,5 - 61,5 e δ_C 9,4 - 14,6, correspondentes a carbono metilênico e metílico respectivamente (PAVIA, 2012). A análise de RMN ^{13}C -APT do derivado 02 e 03 atestam os resultados do RMN ^1H .

Os dados espectrais do derivado 13 permitiram a identificação da molécula obtida através de semi-síntese da caulerpina como sendo (6*E*, 13*E*)-dietil 5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b'] diindol-6,13-dicarboxilato) com fórmula molecular $C_{26}H_{22}N_2O_4$ e peso molecular de 426,46 g/mol (Figura 40).

Tabela 16: Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C (δ , CDCl_3 , 200 MHz) do derivado 13 e dados RMN ^1H e ^{13}C (δ , CDCl_3 , 200 MHz) da literatura.

	Derivado 13		Caulerpina O - etil (SOUSA, 2016)	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
N	9,23 (s, 1H)	---	9,23 (s, 1H)	---
2/2'	---	128,1	---	133,1
3/3'	---	107,5	---	112,4
3a/3a'	---	123,7	---	125,8
4/4'	7,41 (dl, 1H)	112,9	7,41 (dl, 1H)	118,0
5/5'	7,01 (dl, 1H)	115,7	7,01 (dl, 1H)	120,7
6/6'	7,16 (dl, 1H)	118,6	7,16 (dl, 1H)	123,4
7/7'	7,28 (dl 1H)	106,6	7,28 (dl 1H)	112,4
7a/7a'	---	132,8	---	137,8
8/8'	---	120,9	---	128,3
9/9'	8,02 (s, 1H)	137,5	8,02 (s, 1H)	142,5
10/10'	---	161,4	---	166,4
11/11'	4,34 (q, 2H)	56,7	4,37 (m, 2H)	61,7
12/12'	1,40 (t, 3H)	9,4	1,1 (t, 3H)	14,4

Figura 40: Estrutura química do derivado 13.

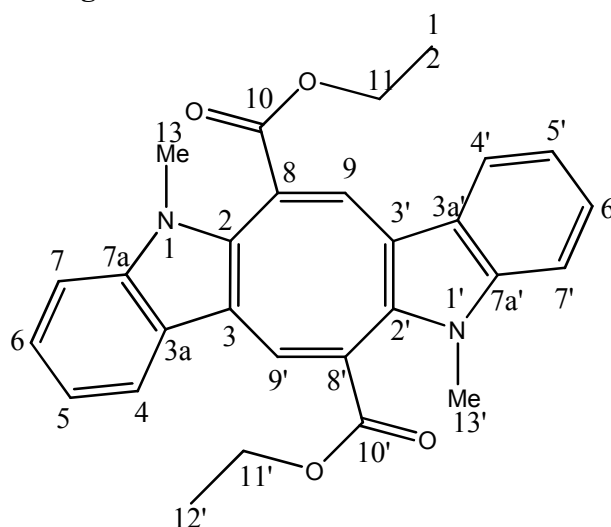


Os dados espectrais do derivado 14 permitiram a identificação da molécula obtida através de semi-síntese da caulerpina -N - metil como sendo (6*E*, 13*E*)-dietil 5,12- dimetil- 5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b'] diindol-6,13-dicarboxilato) com fórmula molecular $C_{28}H_{26}N_2O_4$ e peso molecular de 454,52 g/mol (Figura 41).

Tabela 17: Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C (δ , CDCl_3 , 200 MHz) do derivado 01 e 14

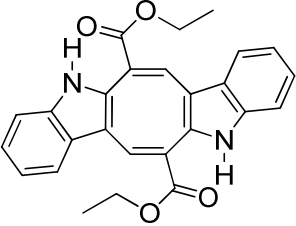
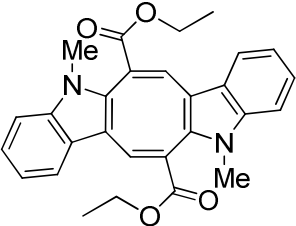
	Derivado 14		Caulerpina N-metil (derivado 01)	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
2/2'	---	134,8	--	134,6
3/3'	---	113,0	--	113,0
3a/3a'	---	126,7	--	126,6
4/4'	7,52 (dl, 1H)	119,1	7,54 (dl, 1H)	118,8
5/5'	7,10 (dl, 1H)	120,4	7,12 (dt, 1H)	120,5
6/6'	7,14 (dl, 1H)	122,9	7,15 (dt, 1H)	123,0
7/7'	7,21 (dl 1H)	109,9	7,23 (dl, 1H)	109,9
7a/7a'	---	138,7	---	138,6
8/8'	---	125,8	---	125,4
9/9'	8,45 (s, 1H)	144,4	8,49 (s, 1H)	144,6
10/10'	---	166,0	---	166,4
11/11'	4,28 (m, 2H)	61,5	---	---
12/12'	1,30 (t, 3H)	14,6	---	---
13/13'	3,45 (s, 3H)	31,0	3,81 (s, 3H)	52,5

Figura 41: Estrutura do derivado 14.



Os rendimentos dos derivados caulerpina *O*-etil e caulerpina *N*-metil *O*-etil estão relatados na Tabela 18, onde observamos que o produtos obtido com o maior rendimento foi o derivado 14 com 42%.

Tabela 18: Estrutura e rendimento da caulerpina e derivado 01 transesterificado.

Derivados purificados	Rendimento
 13 Caulerpina <i>O</i>-etil	33,14%
 14 Caulerpina <i>N</i>-metil <i>O</i>-etil	42%

4.1.5 Mistura dos derivados 01 e 14

A mistura dos derivados 01 e 14 foi obtida durante a reação de metilação da caulerpina utilizando-se etanol como solvente (Figura 15, página 50) e apresentou-se na forma de cristais vermelho-alaranjados, solúveis em diclorometano, a qual teve seus componentes identificados através de análise espectral dos de RMN ^1H e ^{13}C unidimensionais em comparação com os dados isolados dos derivados 01 e 14.

Os espectros de RMN ^1H da mistura (Tabela 19, Figura 122, página 204) apresentaram-se semelhantes ao da caulerpina, verificando-se a presença de sinais com δ_{H} entre 7,1 e 7,43 (6H) característicos de núcleo aromático, um singlete em 8,46 (s, 1,43H) correspondente ao carbono metínico do ciclooctatetraeno. No entanto, observa-se a ausência do sinal em δ_{H} 9,21

(s, 1H) característico de hidrogênio ligado a nitrogênio de núcleo indólico e a presença de um singlete em 3,46 (s, 4,3H) referente ao grupo metila, sugerindo que houve substituição do átomo de hidrogênio ligado ao nitrogênio pelo grupo metílico (PAVIA, 2012). Esta análise evidenciou ainda a presença de 2 múltiplos 4,34 e 4,25 (m, 2,8H) característico de CH₂, um singletos em 3,81 (s, 0,78) metoxila e um tripleto em 1,31 (3,98H) referente a grupo metila.

A análise de RMN ¹³C-APT da mistura dos derivados (Tabelas 19, Figura 123, página 205) permitiu a identificação de picos semelhantes à caulerpina N-metil (derivado 01) e a caulerpina N-metil-O-etil (derivado 14). Este experimento tornou evidente, além dos sinais referentes ao núcleo aromático indólico e do ciclooctatetraeno, a presença de dois picos referentes a duas carbonilas com deslocamento em δ_C 166,0 e 166,5, e de um sinal de CH₂ em δ_C 61,5, e três sinais de CH₃ com deslocamentos em, δ_C 52,5, 31,0 e 14,6. (PAVIA, 2012).

A análise bidimensional do HMBC (Tabela 19, Figura 124, página 206) demonstra os seguintes que para o derivado 14 presente na mistura os C-10/10' correlacionam-se com H-9/9' e 2H-12/12' a ³J_{CH}, enquanto que o derivado 01 presente na mistura apresenta acoplamentos a ³J_{CH} dos C-10/10' com H- 9/9' e 3H-14/14'.

As observações feitas a partir dos espectros de RMN ¹³C-APT, HMBC juntamente com a análise das integrais fornecidas no RMN ¹H permitem afirmar que a mistura obtida é formada pelos derivados 01 e 14 (Figura 42) na proporção de 1:4 respectivamente.

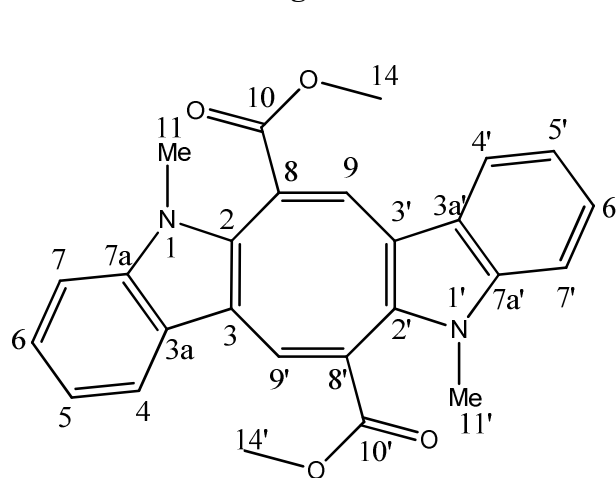
Tabela 19: Dados comparativos de RMN ^1H e ^{13}C e HMBC (δ , CDCl_3 , 500 MHz) da mistura de derivados e dos derivados 01 e 14 isoladamente (δ , CDCl_3 , 200 MHz).

	Derivado 14 na mistura				Derivado 14 isolado	
	RMN ^{13}C e ^1H		HMBC		RMN ^{13}C e ^1H	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
N	---	----			---	---
2/2'	134,8	---	H-1/1'; H-9/9'	3H-11/11'	134,8	---
3/3'	113,1	---		H-1/1'; H-4/4'	113,0	---
3a/3a'	126,7	---		H-1/1'; H-5/5'; H-7/7'	126,7	---
4/4'	118,8	7,53	H-5/5'	H-6/6'	119,1	7,52 (dl, 1H)
5/5'	120,4	7,12	H-4/4'; H-6/6'	H-7/7'	120,4	7,10 (dl, 1H)
6/6'	122,9	7,22	H-5/5'; H-7/7'	H-4/4'	122,9	7,14 (dl, 1H)
7/7'	109,9	7,24	H-6/6'	H-5/5'	109,9	7,21 (dl 1H)
7a/7a'	138,7	---	H-1/1'; H-7/7'	H-4/4'; H-6/6'; 3H-11/11'	138,7	---
8/8'	126,0	---	H-9/9'		125,8	---
9/9'	144,4	8,46			144,4	8,45 (s, 1H)
10/10'	166,0	---		H-9/9'; 2H-12/12'	166,0	---
11/11'	31,0	3,46 (s)			31,00	3,45 (s)

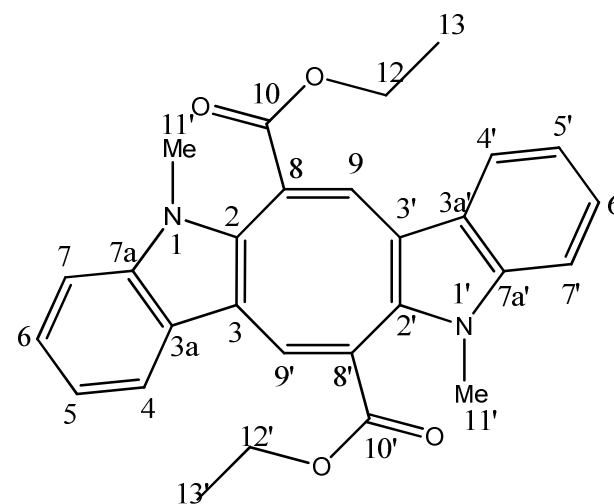
12/12'	61,5	4,34; 4,25		3H-13/13'	61,50	4,28 (m)
13/13'	14,6	1,31 (t)		2H-12/12'	14,59	1,30 (t)
Derivado 01 na mistura				Derivado 01 isolado		
	RMN ^{13}C e ^1H		HMBC		RMN ^{13}C e ^1H	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
N	---	---			---	---
2/2'	134,8	---	H-1/1'; H-9/9'	3H-11/11'	134,6	---
3/3'	109,9	---		H-1/1'; H-4/4'	112,9	---
3a/3a'	126,7	---		H-1/1'; H-5/5'; H-7/7'	126,6	---
4/4'	118,8	7,53	H-5/5'	H-6/6'	118,8	7,54 (dl, 1H)
5/5'	120,4	7,12	H-4/4'; H-6/6'	H-7/7'	120,5	7,12 (dl, 1H)
6/6'	122,9	7,22	H-5/5'; H-7/7'	H-4/4'	123,0	7,15 (dl, 1H)
7/7'	109,0	7,24	H-6/6'	H-5/5'	109,9	7,23 (dl 1H)
7a/7a'	138,7	---	H-1/1'; H-7/7'	H-4/4'; H-6/6'; 3H- 11/11'	138,6	---
8/8'	126,0	---	H-9/9'		125,4	---

9/9'	144,7	8,46 (s)		144,6	8,49 (s,1H)
10/10'	166,5	---	H-9/9'; 3H-14/14'	166,4	---
11/11'	31,0	3,86 (s)		30,9	3,46 (s, 3H)
14/14'	52,5	3,81 (s)		52,5	---

Figura 42: Estrutura dos componentes da mistura de derivados.



Análogo 01



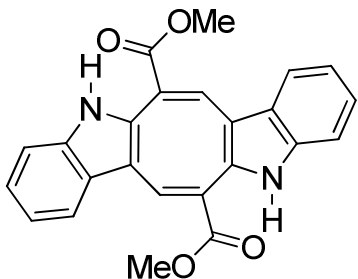
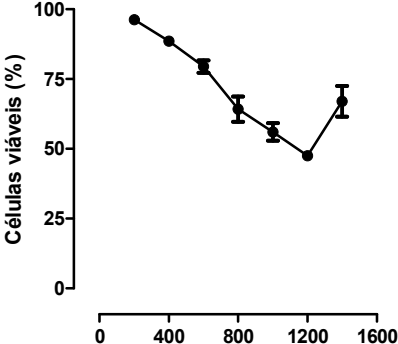
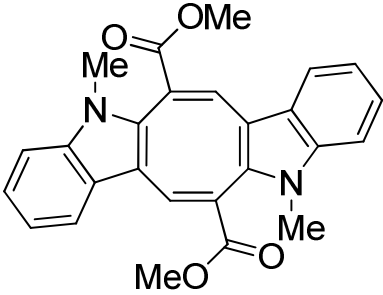
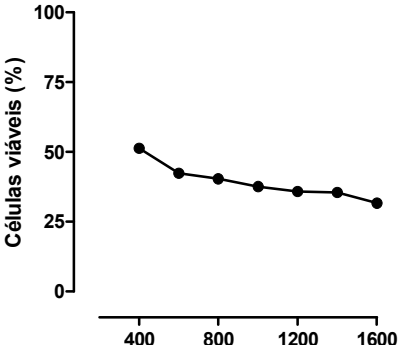
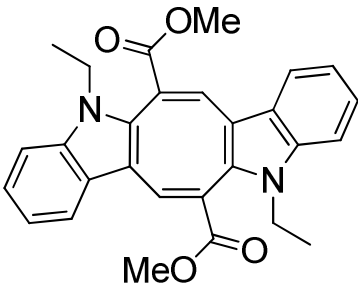
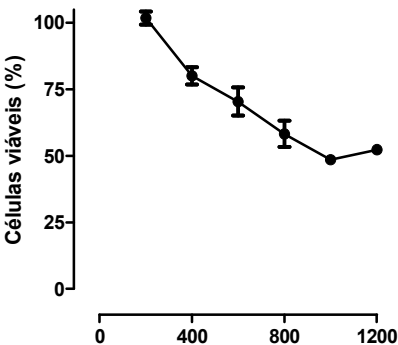
Análogo 14

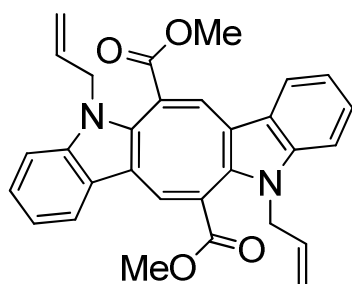
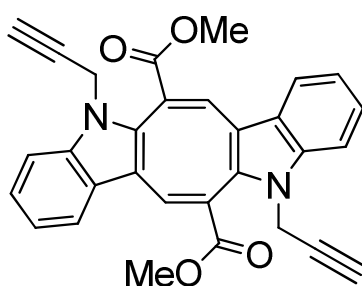
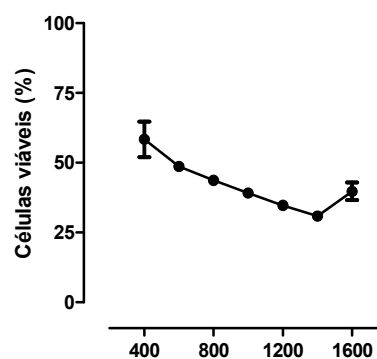
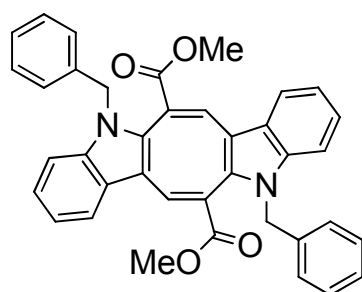
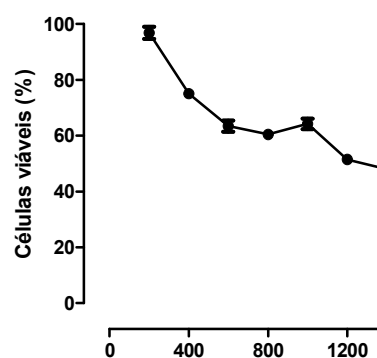
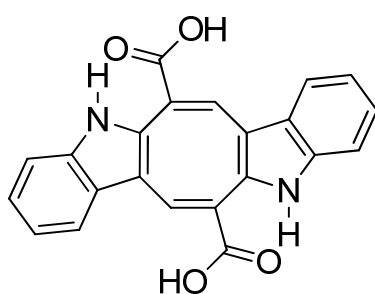
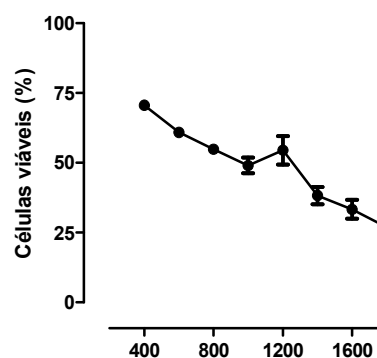
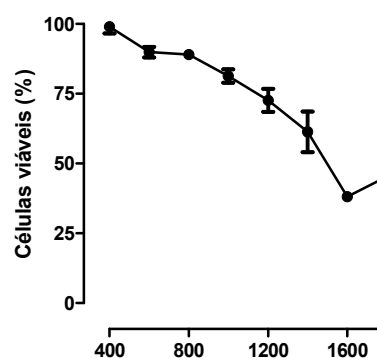
4.2 Ensaio de citotoxicidade

Considerando que os testes de viabilidade celular são fundamentais para se determinar a citotoxicidade de novas moléculas nos estágios iniciais de desenvolvimento de fármacos (PUTNAM et al., 2002), e que a caulerpina mostra-se muito promissora como um fármaco potencial para células humanas (MACEDO et al., 2012). Este estudo buscou determinar as concentrações dos derivados capazes de promover a lise de 50% das células Vero (CC₅₀) e comparar estes valores com os obtidos para a caulerpina através do ensaio de MTT .

A Tabela 20 apresenta as curvas concentração-resposta obtidas ao fim do ensaio de MTT para a caulerpina e seus derivados nas concentrações testadas. Os pontos utilizados nestes gráficos permitiram calcular através da análise de regressão não linear do programa GraphPad Prism Versão 5.01, o efeito máximo (E_{max}), caracterizado pelo maior percentual de mortalidade celular observado, e a concentração citotóxica capaz de promover 50% do efeito máximo (CC₅₀) para a caulerpina e seus derivados. Os valores absolutos de E_{max} e CC₅₀ estão descritos na Tabela 21.

Tabela 20: Gráficos do efeito da caulerpina e seus derivados sobre a viabilidade celular.

Caulerpina e Derivados	Curvas concentração-resposta																
 Caulerpina	 <table border="1"> <thead> <tr> <th>Concentração (μg/mL)</th> <th>Células viáveis (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>200</td><td>98</td></tr> <tr><td>400</td><td>90</td></tr> <tr><td>600</td><td>80</td></tr> <tr><td>800</td><td>65</td></tr> <tr><td>1000</td><td>58</td></tr> <tr><td>1200</td><td>48</td></tr> <tr><td>1400</td><td>68</td></tr> </tbody> </table>	Concentração (μg/mL)	Células viáveis (%)	200	98	400	90	600	80	800	65	1000	58	1200	48	1400	68
Concentração (μg/mL)	Células viáveis (%)																
200	98																
400	90																
600	80																
800	65																
1000	58																
1200	48																
1400	68																
 01 Caulerpina N-metil	 <table border="1"> <thead> <tr> <th>Concentração (μg/mL)</th> <th>Células viáveis (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>400</td><td>52</td></tr> <tr><td>600</td><td>42</td></tr> <tr><td>800</td><td>40</td></tr> <tr><td>1000</td><td>38</td></tr> <tr><td>1200</td><td>36</td></tr> <tr><td>1400</td><td>35</td></tr> <tr><td>1600</td><td>32</td></tr> </tbody> </table>	Concentração (μg/mL)	Células viáveis (%)	400	52	600	42	800	40	1000	38	1200	36	1400	35	1600	32
Concentração (μg/mL)	Células viáveis (%)																
400	52																
600	42																
800	40																
1000	38																
1200	36																
1400	35																
1600	32																
 02 Caulerpina N-etil	 <table border="1"> <thead> <tr> <th>Concentração (μg/mL)</th> <th>Células viáveis (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>200</td><td>100</td></tr> <tr><td>400</td><td>80</td></tr> <tr><td>600</td><td>68</td></tr> <tr><td>800</td><td>58</td></tr> <tr><td>1000</td><td>50</td></tr> <tr><td>1200</td><td>52</td></tr> </tbody> </table>	Concentração (μg/mL)	Células viáveis (%)	200	100	400	80	600	68	800	58	1000	50	1200	52		
Concentração (μg/mL)	Células viáveis (%)																
200	100																
400	80																
600	68																
800	58																
1000	50																
1200	52																

**03****Caulerpina N-alil****04****Caulerpina N-propargil****05****Caulerpina N-benzil****08****Ácido caulerpínico**

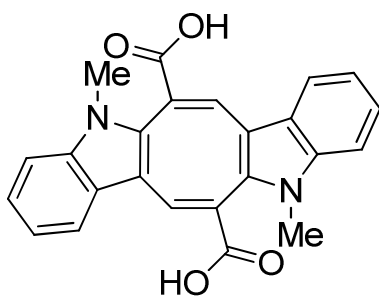
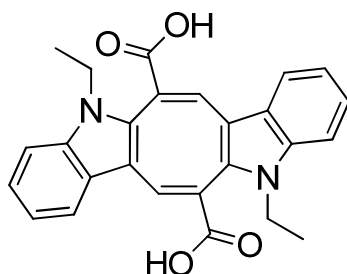
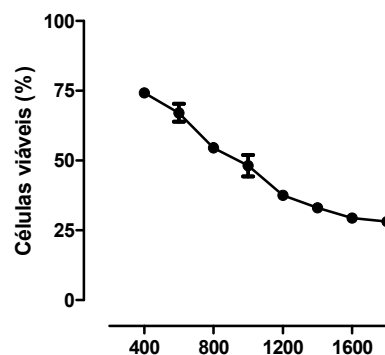
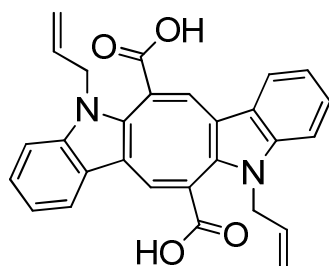
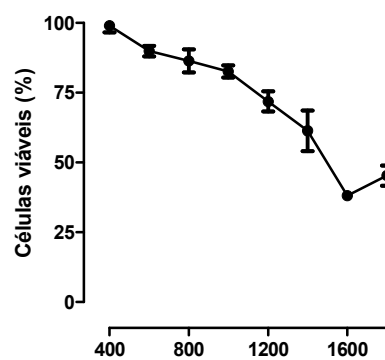
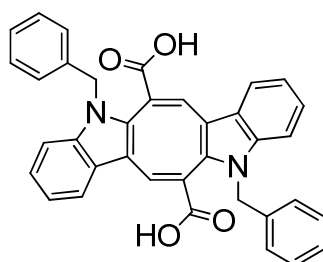
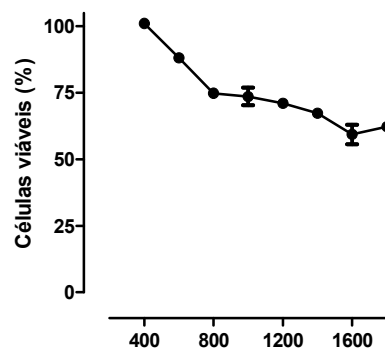
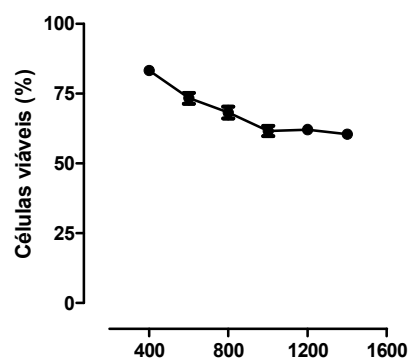
**09****Ácido da caulerpina N-metil****10****Ácido da caulerpina N-etil****11****Ácido da caulerpina N-alil****12****Ácido da caulerpina N-benzil**

Tabela 21: Valores absolutos de $E_{\max}$ CC_{50} da caulerpina e seus derivados frente à células vero.

Amostras	$E_{\max}(\%)$	$CC_{50} (\mu M)$
Caulerpina	$52,7 \pm 1,8^b$	$687,9 \pm 35,2^A$
Derivado 01	$68,4 \pm 0,2^c$	$524,1 \pm 19,3^A$
Derivado 02	$51,5 \pm 0,9^b$	$547,6 \pm 38,8^A$
Derivado 03	$70,1 \pm 1,1^c$	$628,2 \pm 69,8^A$
Derivado 04	$52,1 \pm 0,9^b$	$496,1 \pm 16,8^A$
Derivado 05	$74,1 \pm 1,8^c$	$891,0 \pm 87,8^A$
Derivado 08	$62,6 \pm 0,7^c$	$1035,0 \pm 62,4^B$
Derivado 09	$71,8 \pm 0,3^c$	$678,7 \pm 38,3^A$
Derivado 10	$62,7 \pm 0,8^c$	$1004,0 \pm 41,6^B$
Derivado 11	$44,5 \pm 1,3^a$	$663,9 \pm 55,3^A$
Derivado 12	$41,0 \pm 1,2^a$	$494 \pm 51,4^A$

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam uma diferença significativa entre os derivados (ANOVA $p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam uma diferença significativa entre os derivados.

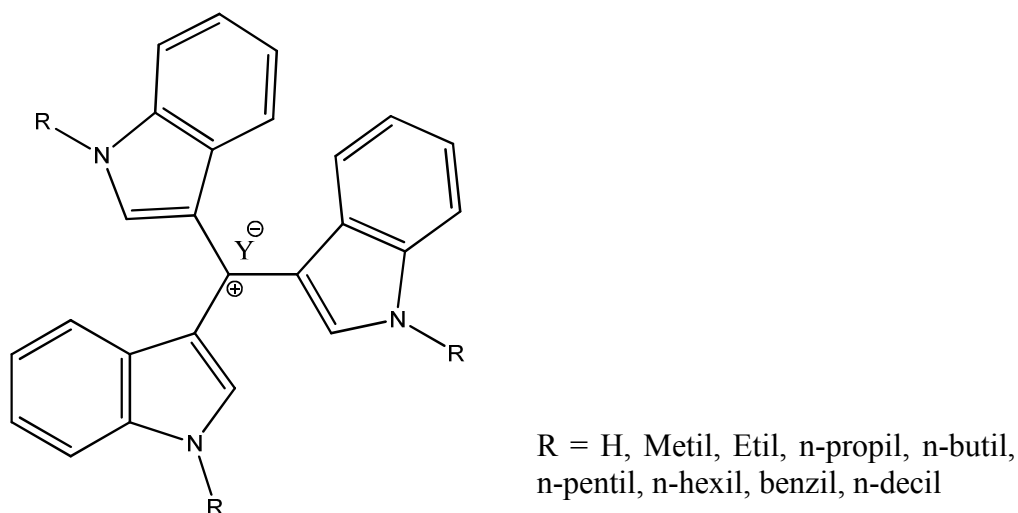
O presente estudo encontrou uma CC_{50} para a caulerpina de $687,9 \pm 35,2 \mu M$, no entanto, achados descritos por Macedo et al. (2012), observaram um valor CC_{50} de $1176 \mu M$ para esta molécula. A diferença de valores verificadas nestes estudos justifica-se pelas diferenças metodológicas empregadas durante o cálculo dos valores de CC_{50} , o presente trabalho utilizou-se de análise de regressão não linear estipulando-se o $E_{\max}$ e $E_{\min}$, enquanto o Macedo et al. (2012) utilizou-se da equação da reta produzida por regressão linear para calcular por extrapolação o valor de CC_{50} da caulerpina. Segundo a literatura o extrato bruto obtido da *Caulerpa racemosa*, espécie vegetal manipulada para extração da caulerpina utilizada nesta pesquisa, apresentou CC_{50} de $178,6 \mu g/mL$ quando avaliado sobre células de hepatoma de origem humana (KOISHI et al., 2012).

O cálculo dos valores de $E_{\max}$ dos derivados 01, 02, 03, 05, 08, 09, 10, 11 e 12 evidencia que os derivados ácidos 11 e 12 apresentam efeito máximo significativamente inferior ($p < 0,05$) à caulerpina, sugerindo que presença simultânea do grupo ácido e dos grupos mais volumosos (alil e benzil) como substituintes no indol atuam atenuando a eficiência citotóxica. Adicionalmente verificou-se que os derivados 01, 03, 04, 08, 09 e 10 fornecem valores de $E_{\max}$ significativamente superiores à caulerpina ($p < 0,05$).

A análise dos valores de CC_{50} evidencia que os derivados ácidos 08 e 10 apresentaram citotoxicidade inferior a caulerpina ($p < 0,05$). A menor citotoxicidade observada para esses derivados pode estar relacionada às suas características de hidrofilicidade. Este teste demonstra que a inserção de grupos lipofílicos com diferentes números de carbonos, de duplas ligações e de grupos aromáticos não se relaciona a potência citotóxica observada em células Vero.

Lavrenov et al. (2010) ao realizaram ensaio citotóxico de sais de tri(1-alkil-indol-3il) metileno (Figura 43) sobre células humanas de carcinoma de colon HCT116 e de leucemia K526 utilizando-se a metodologia do teste do MTT, observaram que em ambas as linhagens celulares a média de CC_{50} diminui progressivamente com o aumento do número de carbonos até o radical com 5 carbonos, sugerindo que o número de carbonos substituintes no nitrogênio indólico está relacionado a maior potência citotóxica. A depender do tipo celular utilizado durante o ensaio de MTT as moléculas que tiveram grupos substituídos com maior número de carbonos poderão apresentar maior ou menor citotoxicidade, em virtude das diferentes células apresentarem sítios receptores de variados tamanhos (MONTANARI, 2011).

Figura 43: Estrutura do sais de tri(1-alkil-indol-3il) metileno Lavrenov et al., (2010).



A investigação do efeito citotóxico da caulerpina sobre células humanas tem sido objeto de interesse de investigações prévias com a finalidade de direcionar o uso dessa molécula no tratamento para o câncer. Tal efeito tem sido atribuído a sua capacidade de alterar a função mitocondrial, inibindo seletivamente o complexo respiratório II e

promovendo, conseqüentemente, hipóxia celular, que está intimamente relacionada ao baixo índice proliferativo (FERRAMOSCA et al., 2016). Do ponto de vista molecular, Yu et al. (2017) demonstraram que a caulerpina é capaz de, em células de cancro colorretal, inibir a fosforilação oxidativa, por intervenção na via de sinalização celular que envolve a participação de AMPK α 1 e minimizando, assim, a proliferação celular.

Esses mecanismos podem explicar o efeito citotóxico da caulerpina e reforçam a importância de elucidação de derivados com diferentes capacidades citotóxicas, uma vez que sua aplicação clínica determinará o efeito desejado. Neste estudo, ao se vislumbrar um possível efeito antiviral e antifúngico, derivados da caulerpina com menor efeito citotóxico sobre células humanas são esperados. Entretanto, estudos futuros podem ser realizados para avaliação dos efeitos produzidos pelos derivados da caulerpina sobre células de diferentes tipos de câncer.

4.3 Triagem antiviral

Apesar de a indústria farmacêutica disponibilizar diversos fármacos com propriedades anti-HSV-1, tais como aciclovir, ganciclovir, valaciclovir e foscarnet, cerca de 80% da população adulta humana está infectada com este vírus. Considerando que o uso contínuo das drogas disponíveis promove a seleção de cepas resistentes e as suas relativas toxicidades diante de administrações prolongadas (KELLY et al., 2009; MACEDO et al., 2012) estabeleceram a caulerpina como um fármaco anti-HSV-1 ($CC_{50} = 1167 \mu M$) ao inibir as fases alfa e beta do ciclo de reprodução do microorganismo, apresentando potencialidade semelhantes ao aciclovir ($CC_{50} = 960 \mu M$).

A fim de analisar a atividade antiviral sobre infecções de HSV-1 realizou-se o ensaio 1, no qual avaliou-se a capacidade das amostras de debelar a infecção quando as amostras são postas em contato com as células no mesmo momento que o vírus, e paralelamente procedeu-se o ensaio 2, no qual analisou-se a capacidade das amostras em debelar uma infecção por HSV-1 já instalada. Para a realização destes ensaios utilizou-se para cada amostra concentrações que permitiram no mínimo 75% de viabilidade celular. Os valores absolutos empregados neste teste estão expostos na Tabela 22 e foram calculados mediante consulta aos gráficos dose-repostas. Considerando que as curvas dose-respostas dos derivados 01 e 03, expressam percentual máximo de viabilidade celular inferior a 75% essas amostras foram excluídas dos testes de triagem antiviral.

Tabela 22: Concentração (μM) da caulerpina e seus derivados utilizadas nos ensaios de triagem antiviral.

Amostras	Concentração (μM)
Caulerpina	542,6
Derivado 01	---
Derivado 02	469,4
Derivado 03	---
Derivado 04	388,0
Derivado 05	241,3
Derivado 08	1007,0
Derivado 09	139,0
Derivado 10	873,1
Derivado 11	910,3
Derivado 12	665,1

4.3.1 Ensaio 1 (Tratamento e infecção)

Para a análise quantitativa, realizada a partir do método do MTT, triagem antiviral tratamento e infecção (ensaio 1) foi observado que a caulerpina e os derivados 2, 4, 5, 9, 10, 11, 12, bem como o aciclovir, foram capazes de promover maior viabilidade das células Vero infectadas com o vírus HSV-1, quando comparado com o grupo sem tratamento ($p < 0,05$), evidenciado efeito antiviral dessas moléculas. A análise estatística dos resultados obtidos do ensaio 1 evidenciou que os derivados 09 (ácido *N*-metil substituído) e 10 (ácido *N*-etil-substituído) apresentaram valores de viabilidade celular frente às células vero superiores aos observados para a caulerpina ($p < 0,05$), sugerindo que nos derivados a presença do grupo funcional ácido carboxílico aumenta a atividade anti-HSV-1 do protótipo. Esses resultados estão apresentados na Figura 44.

O percentual de inibição do vírus HSV-1 promovido pela caulerpina e seus derivados foi calculado segundo metodologia descrita por Cheng et al. (2013) e está expresso na Tabela 23. Apenas as moléculas com taxa de inibição superior a 50 % foram consideradas como drogas com potencial atividade anti-HSV-1. Para os ensaios realizados apenas o aciclovir foi considerado como potencial droga anti-HSV-1, com taxa de inibição de 57,88%. No entanto,

derivados 09 e 10, apresentaram taxas 37,39% e 38,35% respectivamente, configurando um aumento superior a 2 vezes ao observado para o protótipo caulerpina (15,32%).

Figura 44: Porcentagem da viabilidade celular de células Vero em contato com HSV-1 tratadas com caulerpina e seus derivados durante o ensaio 1. Redução significativa da viabilidade celular (ANOVA, com pós-teste de Tukey, $*p < 0,05$; $**p < 0,005$; $***p < 0,0005$; $****p < 0,0001$ versus controle infectado e não tratado)

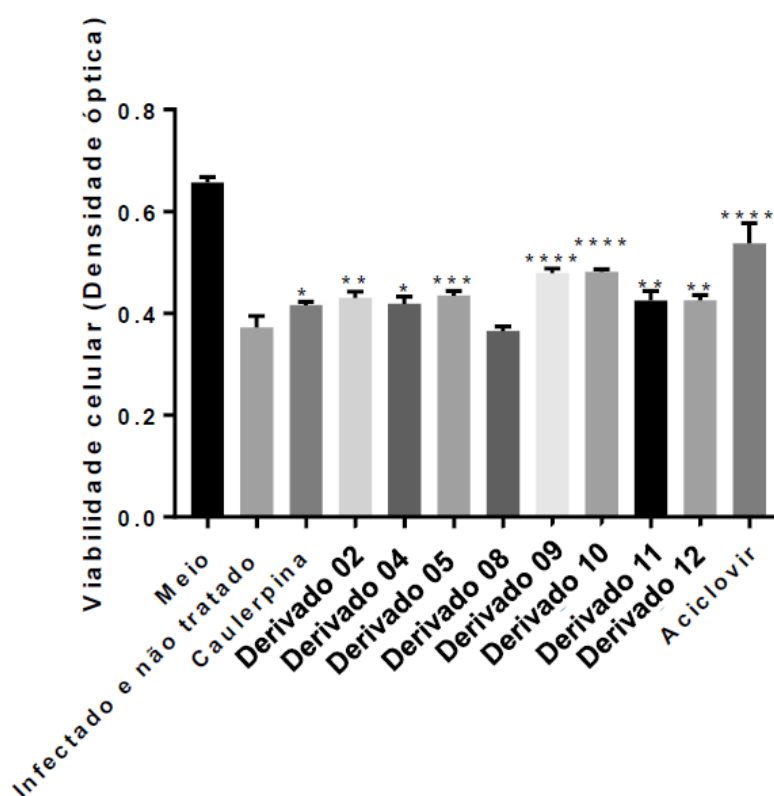


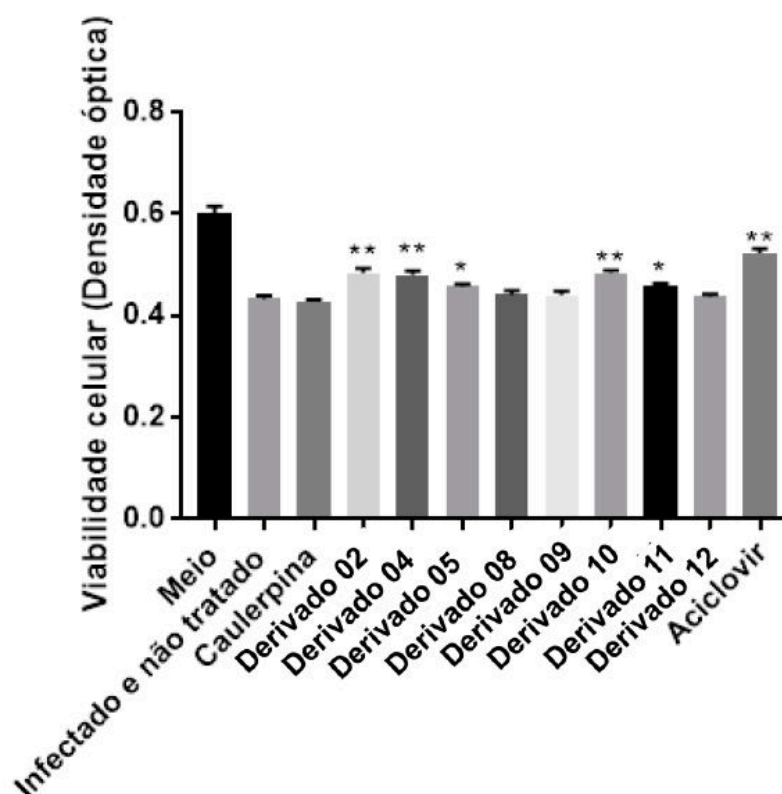
Tabela 23: Valores absolutos do percentual de inibição obtido no ensaio 1 de triagem antiviral para a caulerpina e seus derivados.

Amostras	% de inibição
Caulerpina	15,32
Aciclovir	57,88
Derivado 02	20,23
Derivado 04	16,20
Derivado 05	21,98
Derivado 08	0
Derivado 09	37,39
Derivado 10	38,35
Derivado 11	18,56
Derivado 12	18,65

4.3.2 Ensaio 2 (Pós-tratamento)

Para a avaliação da ação da caulerpina e de seus derivados para debelar uma infecção por HSV-1 já instalada nas células vero, procedeu-se o ensaio 2 (pós-tratamento), onde as substâncias testes foram adicionadas as células após a incubação destas com HSV-1 por uma hora. Neste experimento evidenciou-se que os seus derivados 02, 04, 05, 10, 11 e aciclovir promoveram um aumento significativo da viabilidade celular em comparação com o grupo sem tratamento e a caulerpina ($p < 0,005$), evidenciando efeito antiviral pós-tratamento dessas moléculas superior ao do protótipo. Esses resultados estão apresentados na Figura 45 e na tabela 24.

Figura 45: Porcentagem da viabilidade celular de células Vero em contato com HSV-1 tratadas com caulerpina e seus derivados durante o ensaio 2. Aumento significativo da viabilidade celular (ANOVA, com pós-teste de Tukey, $*p < 0,005$; $**p < 0,0001$): grupos experimentais versus controle (infectado e não tratado).



O percentual de inibição do vírus HSV-1 durante o ensaio 2 promovido pela caulerpina e seus derivados foi calculado segundo metodologia descrita por Cheng et al. (2013). Para os ensaios realizados apenas o aciclovir apresentou percentual de inibição do HSV-1 compatível com molécula com atividade potencial frente ao HSV-1 (52,59%). No entanto, derivados 02, 04 e 10, apresentaram taxas de 28,66%, 28,05% e 29,56% respectivamente, configurando uma inibição superior ao observado para o protótipo caulerpina (0%).

Tabela 24: Valores absolutos do percentual de inibição obtido no ensaio 2 de triagem antiviral para a caulerpina e seus derivados

Amostras	% de inibição
Caulerpina	0
Aciclovir	52,79
Derivado 02	28,66
Derivado 04	28,05
Derivado 05	13,87
Derivado 08	4,22
Derivado 09	3,32
Derivado 10	29,56
Derivado 11	14,78
Derivado 12	1,36

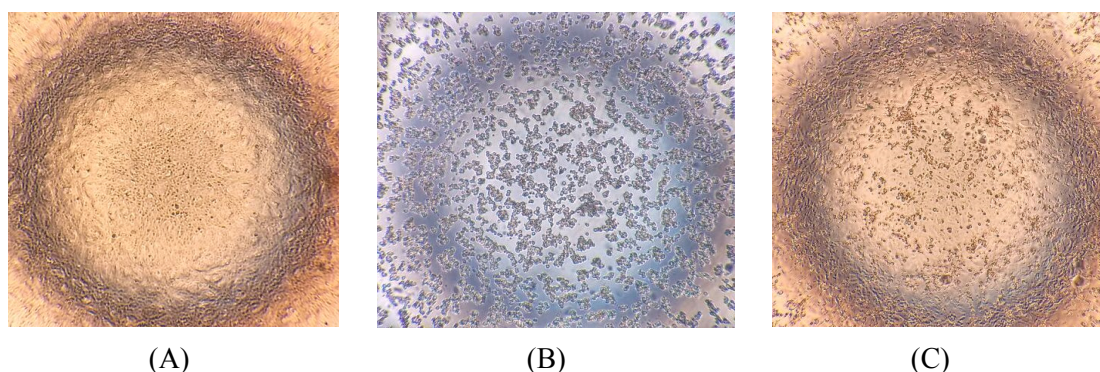
Dentre todas as moléculas testadas na triagem antiviral, apenas o derivado 10 (ácido *N*-substituído pelo grupo etil) permitiu viabilidade celular significativamente superior a caulerpina simultaneamente para os ensaios 1 (tratamento e infecção) e 2 (pós-tratamento), estabelecendo-se como o derivado mais promissor. Em ambos os casos, o derivado 10 demonstrou taxa de inibição viral superior a caulerpina. Esta observação sugere o estabelecimento do núcleo indólico e função éster da caulerpina como grupos farmacofóricos para a atividade anti-HSV-1. No entanto, esta hipótese deve ser avaliada através de estudos mais detalhados de relação estrutura-atividade.

4.3.3 Avaliação morfológica dos ensaios 1 e 2

Do ponto de vista morfológico, a avaliação da viabilidade celular ao microscópio eletrônico para os dois ensaios de triagem antiviral mostrou para meio celular aspecto regular para as células vero, com tapete formado com 90% de confluência. Para o controle positivo (presença de meio de cultura com células infectadas pelo vírus) foi observado pronunciado efeito citopático. Por definição, os efeitos citopáticos (CPE) são modificações irreversíveis causadas pela replicação viral nas células hospederias (VOYLES, 1993). Para células Vero submetidas á replicação de HSV-1, ocorre uma perda de adesão e as células adquirem uma aparência brilhante como resultado de processos citoplasmáticos gerados pela lise celular (RANG, 2013).

Para os poços tratados com aciclovir, observou-se menor efeito citopático, com manutenção da morfologia no tapete celular. Na análise deste parâmetro as amostras de caulerpina e seus derivados apresentaram aspecto semelhante ao observado no controle positivo, indicando que não houve inibição expressiva do HSV-1, conforme visualizado na Figura 46.

Figura 46: Aspecto morfológico das células não infectadas por HSV-1 (A), infectadas e não tratadas (B) e infectadas e tratadas com aciclovir (C).



Há escassez de investigações prévias que objetivaram avaliar o efeito antiviral da caulerpina. A hipótese de que esta molécula tenha efeito sobre vírus é sustentada por estudos anteriores que verificaram esta ação quando da avaliação de extratos de algas marinhas que contém a caulerpina na sua composição (SOARES ET AL., 2004). Ghosh et al. (2004) verificaram que uma fração de polissacarídeos sulfatados extraída da *Caulerpa racemosa* foi capaz de inibir em 50% a viabilidade dos vírus HSV-1 e HSV-2 resistentes ao aciclovir em concentrações em torno de 2,2 a 4,2 µg/mL.

O estudo desenvolvido por Macedo et al. (2012) demonstrou que a caulperina, em concentração de 1,29 µM (CC₅₀), é capaz de inibir o vírus HSV-1 após uma hora da infecção. Entretanto, os autores ressaltam que a caulerpina promove redução em 34% da replicação viral, não apresentando, portanto, atividade virucida. Seu efeito pode está relacionado aos processos de adesão e penetração do vírus nas células hospedeiras. Esses resultados corroboram aos achados desta pesquisa que demonstrou inibição parcial de HSV-1 quando as células são tratadas com caulerpina.

Na tentativa de elucidar a via pela qual o extrato bruto da *Caulerpa racemosa* atua sobre o vírus da dengue, Koihi et al. (2012) verificaram que o referido extrato obtido a partir da utilização de diclorometano/metanol (2:1), foi efetivo em reduzir de modo significativo a

internalização do vírus da dengue (DENV-1/FGA/89) em células de hepatoma de origem humana.

Visando avaliar a atividade anti-tuberculose de derivados estruturais da caulerpina, Canché Chay et al., (2014) inseriram os radicais metil e metoxila no carbono 7 (Figura 8, página 37) do núcleo indólico e observaram que apesar da atividade anti-tuberculose ter sido observada para a caulerpina esta atividade biológica não foi identificada para os derivados sintetizados.

Em um estudo realizado por Ye et al. (2015) foram sintetizados uma série de derivados indólicos a partir da inserção de grupos metil e átomos de halogênios como grupos substituintes. Os grupos adicionados promoveram atividade inibitória mais potente e seletiva frente à GSK-3b, substrato da fosforilação em Ser396 em neurônios primários, quando comparados ao protótipo, evidenciando que as substituições realizadas no núcleo indólico fortaleceram a atividade neuroprotetora.

4.4 Atividade antifúngica

O emergente surgimento de espécies fúngicas, especialmente do gênero *Candida*, resistentes aos fármacos atualmente disponíveis impulsiona a busca por novas moléculas capazes de controlar o crescimento desses micro-organismos (ARTINORI et al., 2016). Alinhado a isto, o crescente número de indivíduos em situação de imunocomprometimento, é responsável pela alta prevalência de candidíase, seja em países desenvolvidos ou em desenvolvimento. Neste estudo, espécies de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* foram testadas para avaliação do possível efeito antifúngico da caulerpina e de seus derivados.

C. albicans representa a principal espécie do gênero, considerando sua alta frequência nas infecções sistêmicas e superficiais, e seu potencial de virulência, expresso pela plasticidade morfológica e adaptativa, e expressão de genes envolvidos com processos de resistência (produção de proteinases, fosfolipases, bomba de efluxo e formação de biofilme, por exemplo) (SELLAM; WHITEWAY, 2016; MONGE et al., 2006). As espécies de *C. tropicalis* e *C. krusei* também tem se destacado no contexto da candidemia, uma vez que apresentam habilidades para elaboração de mecanismos de resistência aos antifúngicos e participam de processos de co-agregação microbiana para formação de biofilmes patogênicos (GROSSET et al., 2016; GOEL; MITTAL; CHAUDHARY, 2016).

Não foi evidenciado, neste estudo, efeito antifúngico da caulerpina e de seus derivados isolados produzidos sobre as espécies fúngicas ensaiadas. A hipótese de que essas moléculas possam exercer efeito sobre células fúngicas foi sustentada por estudos prévios que apontam atividade antibacteriana de extratos da *C. racemosa* e da caulerpina sobre espécies de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp. e *Salmonella* sp., (NAGAPPAN; VAIRAPPAN, 2014; VAIRAPPAN, 2004). Ressalta-se que para estas espécies bacterianas, foram encontrados Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) maiores que 5 mg/mL, valor superior ao máximo utilizado neste estudo (1 mg/mL), considerando que, para utilização clínica, deve-se evitar concentrações com elevado potencial para o desenvolvimento de reações tóxicas.

Entretanto, a mistura dos derivados 1 e 14 exibiram efeito antifúngico sobre as células fúngicas ensaiadas, conforme resultados expressos na Tabela 25.

Tabela 25: Concentrações Inibitórias Mínimas e Fungicidas Mínimas (CIM/CFM) da mistura dos análogos 1 e 14 da caulepeina sobre *Candida* spp. Os valores de CIM e CFM estão expressos em µg/mL.

Cepas	Mistura dos derivados 1 e 14			Nistatina		
	14					
	CIM	CFM	Razão CFM/CIM*	CIM	CFM	Razão CFM/CIM*
<i>C. albicans</i> CBS 562	7,8	7,8	1	0.4	0.8	2
<i>C. krusei</i> CBS 573	62,5	62,5	1	0.8	0.8	1
<i>C. tropicalis</i> CBS 94	125	125	1	0.4	0.4	1

*Razão CFM/CIM ≥ 4 indica atividade fungistática, ou < 4 atividade fungicida.

Estes resultados apontam para uma promissora via de disponibilização de novos agentes antifúngicos, considerando, especialmente, o valor de CIM observado, além de seu caráter fungicida, para cepas de *C. albicans*, considerada a espécie de levedura mais patogênica por sua habilidade de exibição de fatores de virulência e alta prevalência de ocorrência (SELLAM; WHITEWAY, 2016). Diante da ausência de padronização de critérios para classificação da atividade antimicrobiana de produtos naturais, as propostas apresentadas por Duarte et al. (2007), que consideram os mesmos com potente atividade inibitória sobre agentes microbianos quando apresentam CIM menor que 500 µg/mL, bem como as defendidas por Freires et al. (2015) que, a partir de uma revisão sistemática da literatura,

propõem a classificação de atividade muito forte quando $CIM \leq 100 \mu\text{g/mL}$. Dessa forma, os efeitos exibidos pela mistura dos derivados apontam para melhor elucidação a partir da realização de ensaios que considerem o efeito sinérgico dessa associação.

Nesse sentido, a compreensão acerca do possível mecanismo de ação dessa associação de moléculas (derivados 1 e 14) sobre células de *Candida* spp. fez-se necessário. Diante da presença do sorbitol, um protetor osmótico que minimiza o efeito de agentes químicos sobre a parede celular fúngica, verificou-se aumento da concentração necessária para inibição do crescimento celular, conforme apresentado na Tabela 26. Para a caspofungina, controle positivo deste experimento, foram observados valores de CIM <0.039 e $>5 \mu\text{g/mL}$ na ausência e presença do sorbitol (0.8 M), respectivamente, sobre cepas de *C. albicans* CBS 562. Ressalta-se que é reconhecido o efeito da caspofungina por interferência na via de biossíntese da parede celular fúngica.

Tabela 26: Efeito da mistura (derivados 1 e 14 da caulerpina) sobre a *C. albicans* na presença ou ausência de um protetor osmótico (sorbitol 0,8 M), indicando um potencial efeito sobre biossíntese da parede celular.

Concentrações da mistura ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Candida albicans</i> CBS 562	
	Sem sorbitol	Com sorbitol
250	-	-
125	-	-
62,5	-	-
31,25	-	+
15,62	-	+
7,81	-	+

+, crescimento fúngico; -, ausência de crescimento fúngico.

De acordo com estudos realizados por Liu et al. (2012) e Liu et al. (2013), a caulerclorina e as racemosinas A-C exibiram seletiva e moderada atividade antifúngica sobre as espécies *Candida glabrata* (537), *Trichophyton rubrum* (Cmccftla) e *Cryptococcus neoformans* (32609). A caulerclorina também demonstrou atividade sobre *Candida albicans* (SC5314), *Candida albicans* (Y0109), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Microsporium gypseum* (Cmccfmza) e *Aspergillus fumigatus* (07544).

Ríos et al. (2009) avaliaram o efeito antifúngico e antibacteriano de extratos de algas marinhas, incluindo espécies de *Caulerpa*, e verificaram que extratos etanólicos e

diclorometano apresentaram ação sobre *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*, e ausência de ação sobre *C. albicans*, corroborando aos achados deste estudo.

Zhao et al. (2015) ao estudarem a relação estrutura-atividade de derivados da molécula indol [3,2-b] quinolina (composto 1 – Figura 5, página 34) contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina demonstraram que a inserção de grupo hidroxila altera as concentrações inibitórias mínimas frente as cepas e OM584, que no composto protótipo foi de 8 e 16 µg/ mL respectivamente, para 4 µg/mL e 2 µg/mL, evidenciando que a inserção de grupos hidroxila afetam tal atividade farmacológica.

5 CONCLUSÕES

A partir da caulerpina, componente majoritário da alga *Caulerpa racemosa*, foi possível a semi-síntese de 14 derivados, sendo 12 inéditos na literatura. Dentre as moléculas identificadas citam-se 5 ésteres *N*-bissubstituídos pelos respectivos grupos metil, etil, alil, propargil e benzil e 1 derivado éster *N*-monosubstituído pelo grupo acetato de etila.

A caulerpina e os seus derivados ésteres *N*-substituídos serviram de material de partida para a obtenção dos seus respectivos ácidos, totalizando a semi-síntese do ácido caulerpínico e de outros 4 derivados ácidos *N*-bissubstituídos pelos respectivos grupos metil, etil, alil, e benzil e monoácido da caulerpina.

As reações de transesterificação produziram os derivados da caulerpina *O*-etil e da caulerpina *N*-metil *O*-etil.

A avaliação do potencial citotóxico dos derivados da caulerpina através da análise do MTT em células Vero demonstrou que o ácido caulerpínico e o ácido da caulerpina *N*-etil apresentaram menor potência citotóxica quando comparados à caulerpina.

O ensaio de triagem antiviral em células Vero revelou que a atividade antiviral da caulerpina frente ao vírus HSV-1 pode ser potencializada através da inserção de novos grupos químicos. Neste sentido, destacam-se como moléculas promissoras os ésteres da caulerpina *N*-etil, *N*-propargil, *N*-benzil e os ácidos da caulerpina *N*-etil e *N*-alil.

Dentre todos os derivados testados a mistura da caulerpina *N*-metil e caulerpina *N*-metil-*O*-etil exibiu potente atividade antifúngica frente cepas de *Candida* spp.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Levantamento bibliográfico

O levantamento bibliográfico foi realizado no decorrer de todo o curso, através de pesquisas no *Chemical Abstract*, anais de eventos nacionais e internacionais, além de pesquisas no Portal CAPES, *SciFinder*, entre outras fontes disponíveis.

6.2 Semi-síntese

6.2.1 Considerações gerais

Para executar as modificações estruturais da caulerpina, assim como a identificação da estrutura dos seus derivados, foram utilizados os Laboratórios de Fitoquímica das dependências do PgPNSB e LMCA – Laboratório Multi-Usuário de Caracterização e Análise - Central Analítica da UFPB, que dentre outros equipamentos, dispõe de RMN de 200 e 500 MHz, espectrômetro de massas e espectrômetro de infravermelho.

Em todos os procedimentos realizados foram empregados solventes e reagentes com pureza analítica e obtidos de fornecedores especializados, não havendo necessidade de prévia purificação.

A evolução das reações foram monitoradas através de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), utilizando-se cromatofolhas de alumínio recobertas com sílica-gel 60 F254 da Macherey-Nagel com espessura de 0,20 mm e com indicador de fluorescência. A revelação das substâncias, em análise, nas cromatofolhas analíticas foi obtida por exposição à luz ultravioleta em dois comprimentos de onda (254 e 366 nm).

As purificações e o isolamento dos produtos reacionais foram realizados por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), utilizando-se Sílica gel PF₂₅₄7749 (Merck) na espessura 1,0 mm suspensa em água destilada (1:2), distribuída sobre placas de vidro por meio de um cursor “Quick fit”, secas ao ar e ativas em estufa a 110 °C durante 2 horas. A revelação das substâncias em análise foram evidenciadas por exposição à luz ultravioleta em dois comprimentos de onda (254 e 366 nm).

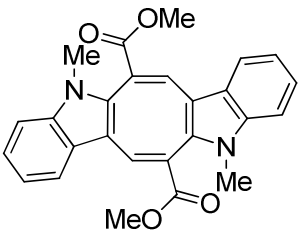
As análises de ressonância magnética nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) e de carbono (RMN de ^{13}C) foram realizados no Núcleo de Caracterização e análise da Universidade Federal da Paraíba (NUCAL/UFPB) em espectrômetro Bruker [200 MHz (^1H) e 500 MHz (^{13}C)]. As amostras foram dissolvidas em alíquotas de 0.6mL de solvente deuterado, clorofórmio (CDCl_3) ou metanol (CD_3OD), comercializados pelas companhias ACROS, Cambridge Isotope Laboratories, Merck ou Aldrich. O deslocamentos químicos (δ) dos sinais espectroscópicos são expressos em partes por milhão (ppm) e os valores das constantes de acoplamento (J) expressos em Hertz (Hz). Nos espectros de RMN de hidrogênio os picos centrais dos solventes foram referenciados em (δ 7,24) para o clorofórmio e em (δ 3,31) para o metanol. Para os espectros de RMN ^{13}C os picos norteadores dos solventes foram calibrados em (δ 77,23) para o clorofórmio e (δ 49,17) para o metanol. As multiplicidades dos sinais de hidrogênio nos espectros de RMN ^1H foram indicadas segundo a convenção: s (simpleto), d (duplete), dd (duplo duplete), t (triplete), q (quarteto), m (multiplete).

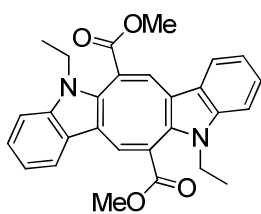
Os dados espectrais na região do infravermelho (IV) foram obtidos em aparelho de IRprestige-21 Shimadzu Fourier Transform-Infrared Spectrophotometer do laboratório de Tecnologia Farmacêutica – UFPB, utilizando de 1,00 a 3,00 mg de amostra em pastilhas de KBr, com frequência medida em cm^{-1} .

6.2.2 Índice de compostos isolados

A tabela 27 fornece foi introduzida a fim de facilitar a consulta da metodologia empregada na semi-síntese dos derivados da caulerpina produzidos neste estudo.

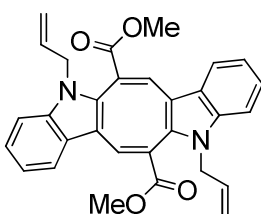
Tabela 27: Índice de compostos isolados

Derivados purificados	Página do procedimento experimental-espectros
 01 Caulerpina N-metil	131



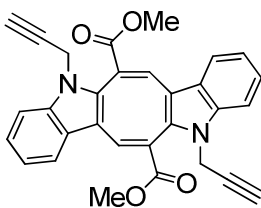
137

02**Caulerpina N-etil**



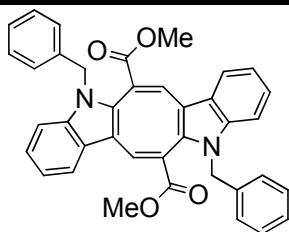
142

03**Caulerpina N- alil**



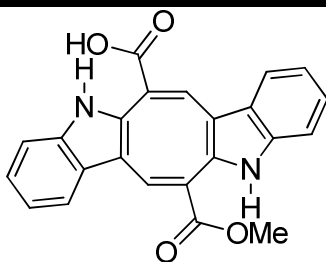
146

04**Caulerpina N-propargil**



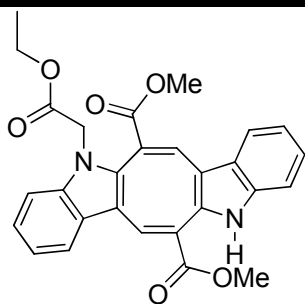
155

05**Caulerpina N-benzil**



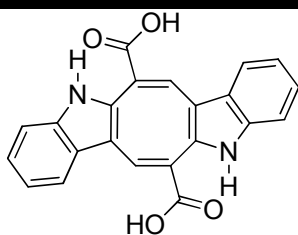
167

06**Mono ácido caulerínico**



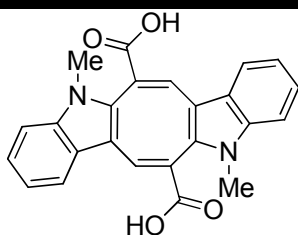
159

07**Caulerpina mono N-acetato de etila**



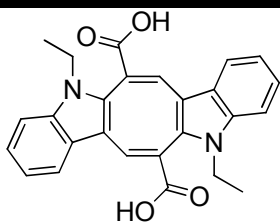
173

08**Ácido caulerpínico**



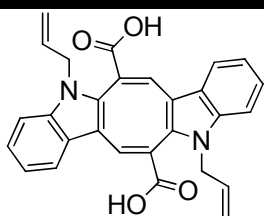
177

09**Ácido da caulerpina N-metil**



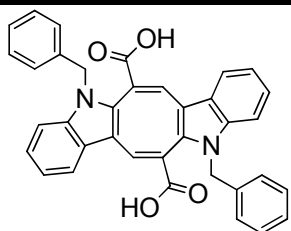
181

10**Ácido da caulerpina N-etil**



186

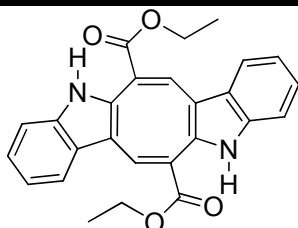
11**Ácido da caulerpina N-alil**



191

12

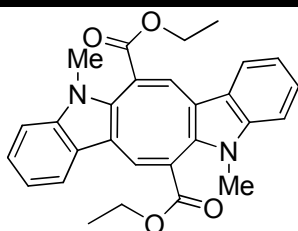
Ácido da caulerpina N-benzil



196

13

Caulerpina O-etil



200

14

Caulerpina N-metil O-etil

6.2.3 Procedimentos experimentais

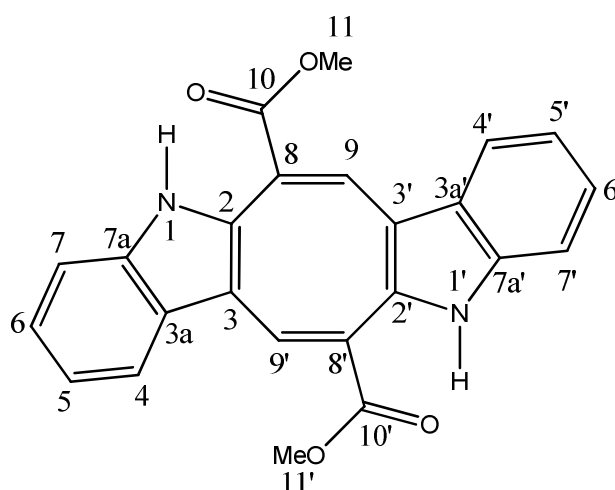
6.2.3.1 Coleta e obtenção do extrato bruto da *Caulerpa racemosa*

Amostras de *Caulerpa racemosa* foram coletadas em maiores quantidades no litoral da cidade Pitimbu, Paraíba, coordenadas 7°07'31''S; 34°49'25'' durante marés de sizígia (-0,2 a 2,0). A espécie foi coletada no dia 21 de abril de 2015 e identificada pelo Prof Dr. George Emmmanuel Cavalcanti de Miranda do Departamento de Biologia Molecular/CCEN/UFPB e uma exsicata foi depositada no herbário Prof^o Lauro Pires Xavier da UFPB com o número JPB 62814. O material coletado foi seco ao sol e posteriormente submetido à exaustiva

extração com etanol, seguindo-se a sua concentração em rotaevaporador, obtendo-se o respectivo extrato bruto.

6.2.3.2 Isolamento da Caulerpina (6E, 13E)-dimetil 5,12- dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b'] diindol-6,13-dicarboxilato)

Figura 47: Estrutura da Caulerpina.



A purificação da caulerpina Figura 47 foi realizada segundo a metodologia de Lira (2013) com modificações. Nesta etapa o extrato bruto etanólico da *Caulerpa racemosa* foi submetido a cromatografia de adsorção em coluna aberta (CC), utilizando sílica gel da Merck ou da Vetec ($\emptyset$ μ m 63-200) como fase estacionária e como eluentes os solventes hexano e diclorometano, com a seguinte ordem de eluição: hexano puro; hexano : dicloro (1:1); hexano : dicloro (8:2) e diclorometano puro. As frações foram concentradas em evaporador rotativo e reunidas de acordo com o seu perfil cromatográfico comparado ao perfil do padrão da caulerpina após Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) e análise em lâmpada ultravioleta. Ao fim do procedimento obteve-se a caulerpina pura, na forma de um sólido avermelhado, com 7% de rendimento.

IV (KBr, $n_{\max}$): 3382, 3032, 3054, 2997, 2952, 2927, 2852, 1687, 1630, 1612, 1459, 1443, 1416, 1323, 1265, 1202, 1176, 1056, 767, 730, 613, 596 cm^{-1} .

^1H RMN (200 MHz, CD_3OD) δ 9,21 (s, 1H); 8,06 (s, 1H); 7,43 (dl, 1H); 7,31 (dl, 1H); 7,20 (dt, 1H); 7,12 (dt, 1H); 3,90 (s, 3H).

^{13}C RMN (200 MHz, CD_3OD) δ 166,8; 142,9; 137,8; 133,0; 128,3; 125,6; 123,5; 120,9; 118,4; 112,6; 111,7; 52,7.

Figura 48: Espectro de IV da caulerpina.

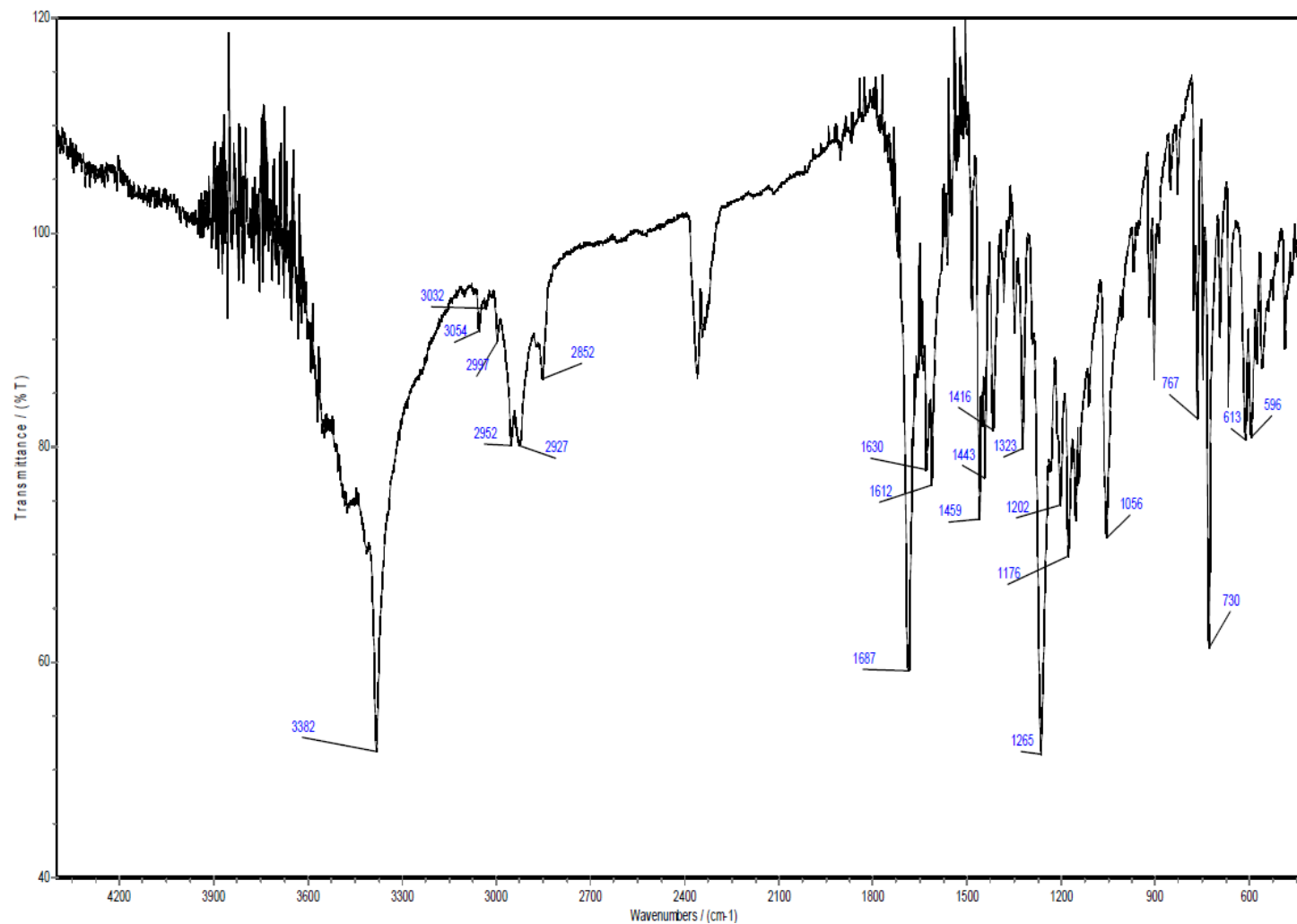


Figura 49: Espectro de RMN de ^1H do Caulerpina (200 MHz, CDCl_3).

CLP-1hJessica
CLP-Jessica
Op. Evandro
17/03/15

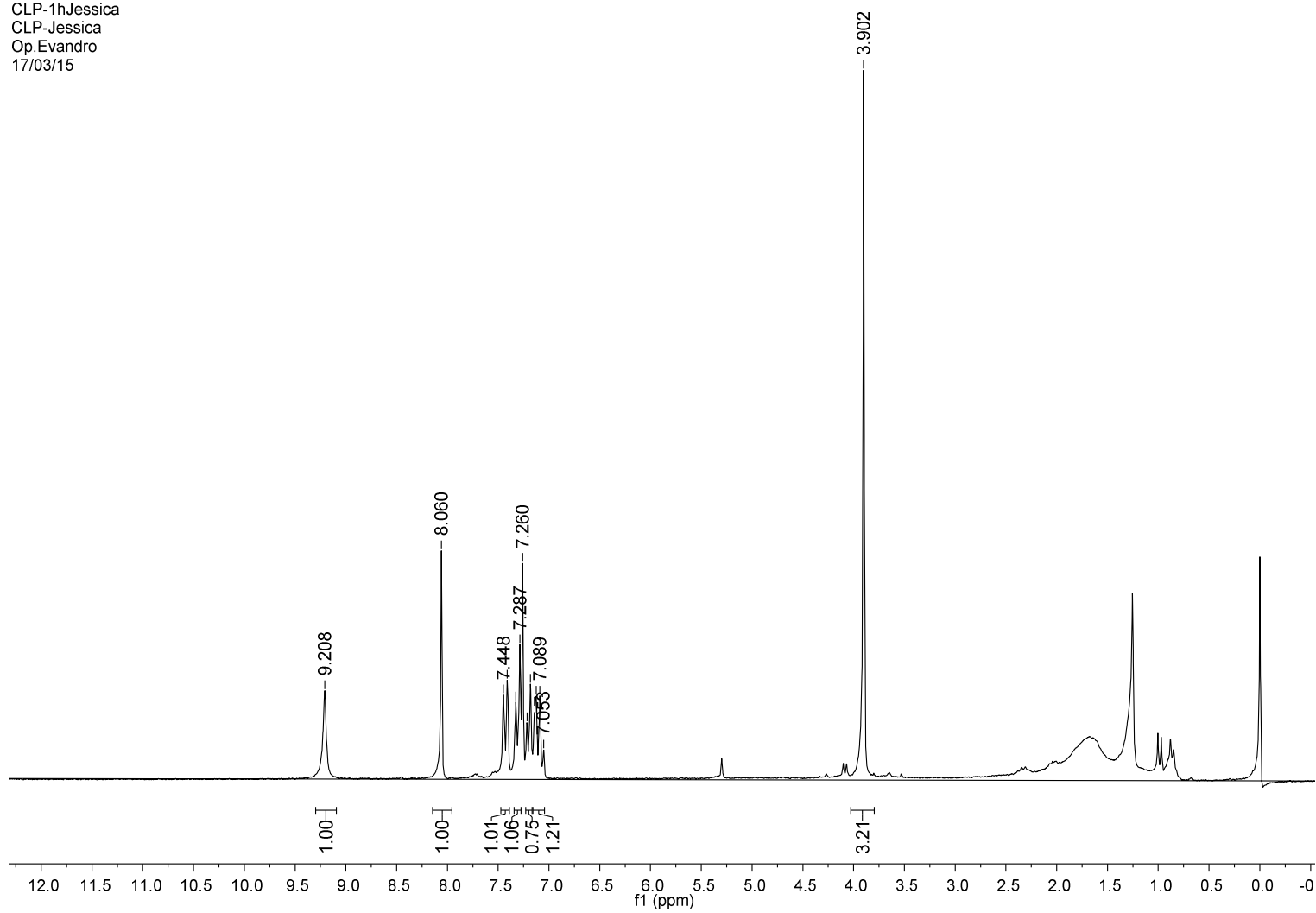


Figura 50: Expansão do espectro de RMN de ^1H do caulerpina (200 MHz, CDCl_3).

CLP-1hJessica
CLP-Jessica
Op.Evandro
17/03/15

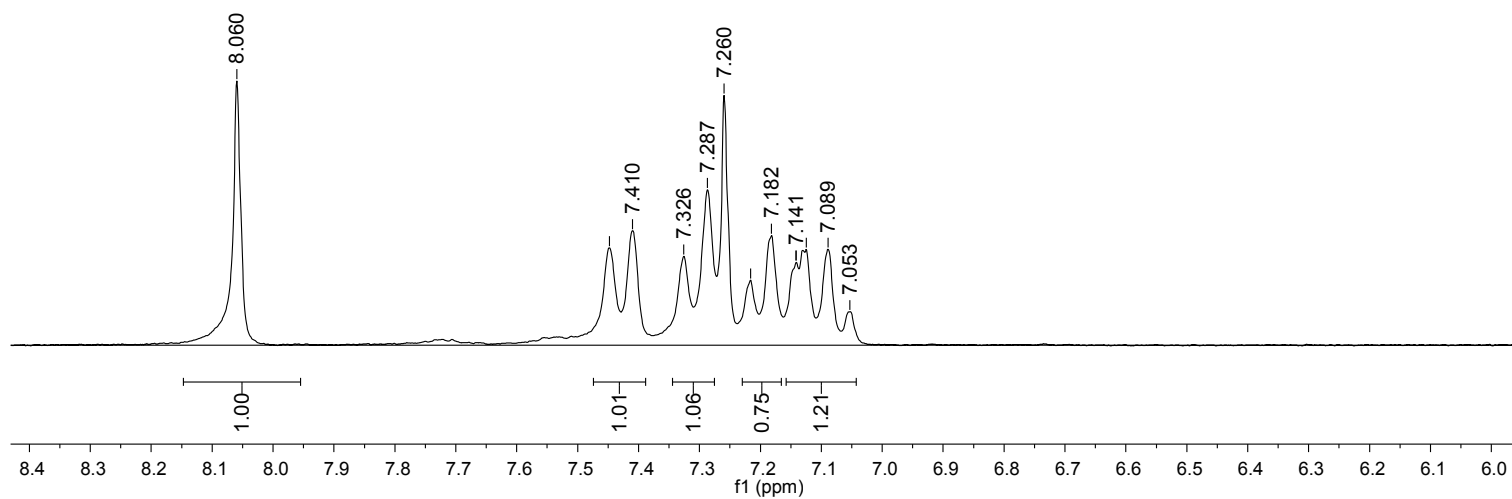
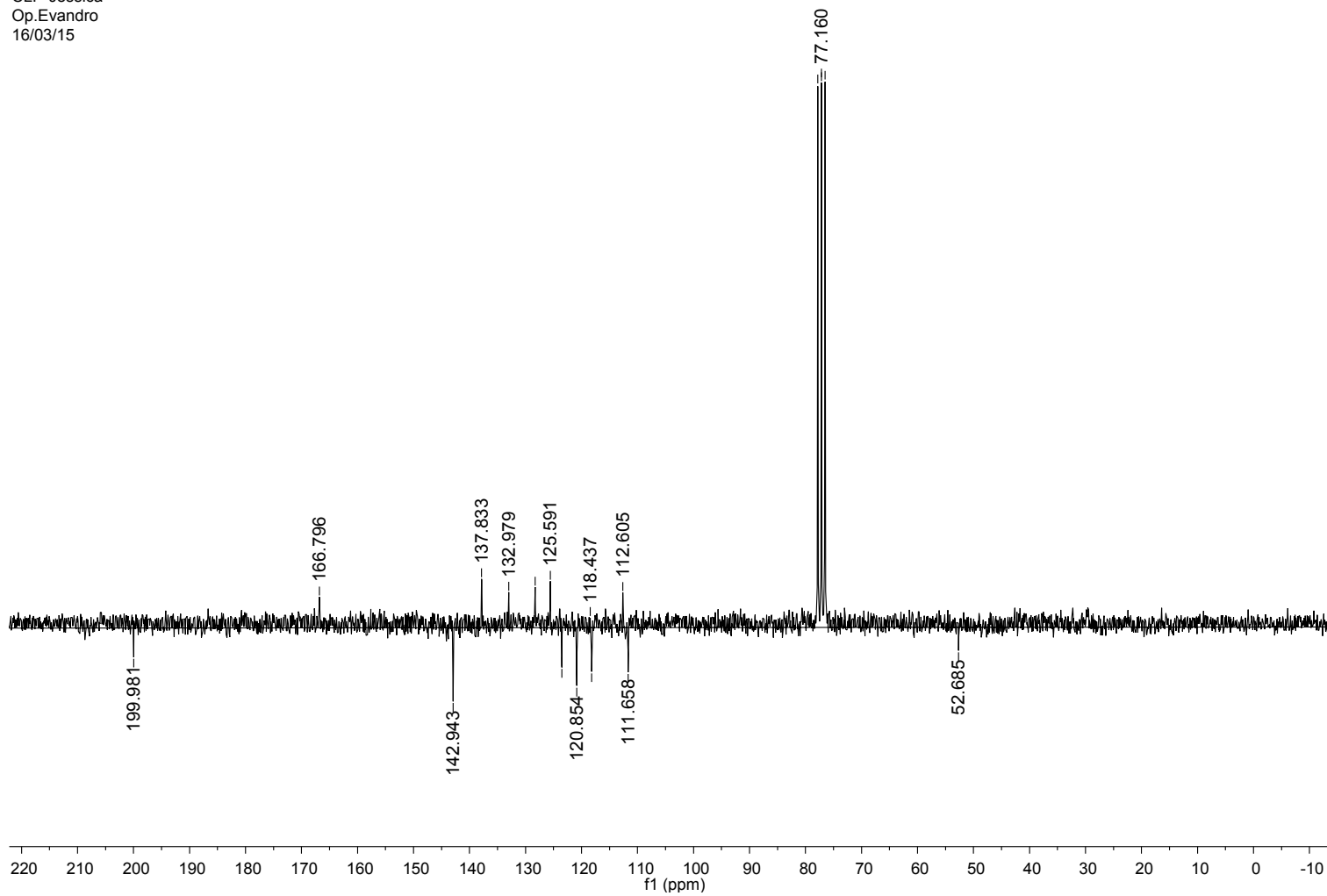


Figura 51: Espectro de RMN de ^{13}C – APT da caulerpina (200 MHz, CDCl_3).

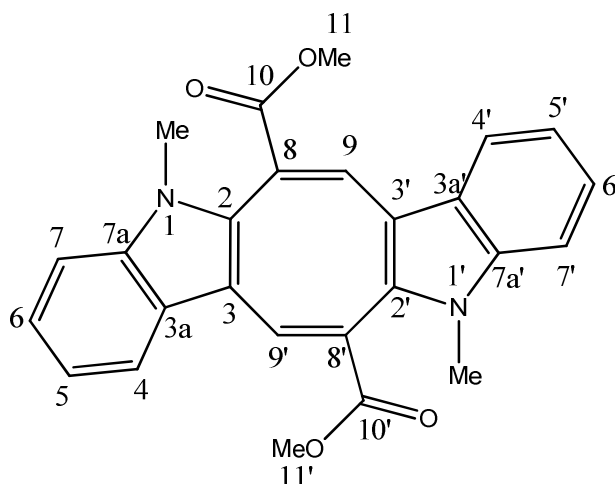
CLP-aptJessica
CLP-Jessica
Op.Evandro
16/03/15



6.2.3.3 N-alquilações da caulerpina

6.2.3.3.1 Caulerpina *N*-metil (6E, 13E)-dimetil 5,12- dimetil- 5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b'] diindol-6,13-dicarboxilato).

Figura 52: Estrutura da Caulerpina *N*-metil (derivado 01).



Tentativa 1: foi adicionado KOH triturado (0,52 mmol, 29,17mg) a uma solução de caulerpina (0,2 mmol, 80mg) em etanol (10 mL) a temperatura ambiente e misturados até completa solubilização dos reagentes. Sequencialmente, o etanol foi completamente removido em rotaevaporador e foram adicionados 10 mL de acetona e MeSO₄ (0,6 mmol, 0,06mL). Após 3 horas a reação entrou em equilíbrio (OTTONI, et al., 1998). Após a extração dos solventes em rotaevaporados procedeu-se a extração dos produtos da reação através de partição líquido-líquido utilizando-se 20mL de H₂O e duas lavagens de 20mL de CH₂Cl₂. A fração orgânica foi adicionado excesso de sulfato de sódio anidro e seguida a filtração com papel de filtro. Afim de se obter os produtos reacionais isolados procedeu-se uma cromatografia em camada delgada preparativa com hexano:acetato 8:2 como sistema de eluição.

Ao fim do experimento obtivemos o produto desejado, o derivado 01 (Figura 52) com 11,5% de rendimento.

Tentativa 2: substituiu-se o metanol utilizado como solvente na tentativa 1 por etanol na mesma quantidade. Todos os outros passos da tentativa dois, incluindo extração e purificação foram idênticos aos descritos para a tentativa um. Para esta reação foi obtido um único produto, o derivado 01, com rendimento de 64%.

IV (KBr, $n_{\max}$): 3437, 3058, 2992, 2948, 1718, 1708, 1631, 1550, 1466, 1434, 1384, 1318, 1253, 1227, 1203, 1067, 1041, 908, 845, 734, 580 cm^{-1} .

^1H RMN (200 MHz, CD_3OD) δ 8,49 (s, 1H); 7,54 (dl, 1H); 7,23 (dl, 1H); 7,16 (dt, 1H); 7,12 (dt, 1H); 3,81 (s, 3H), 3,46 (s, 3H).

^{13}C RMN (200 MHz, CD_3OD) δ 166,4, 144,6, 138,6, 134,6, 126,6, 125,4, 123,0, 120,5, 118,8, 112,9, 52,5, 30,9.

Figura 53: Espectro de IV do derivado 01.

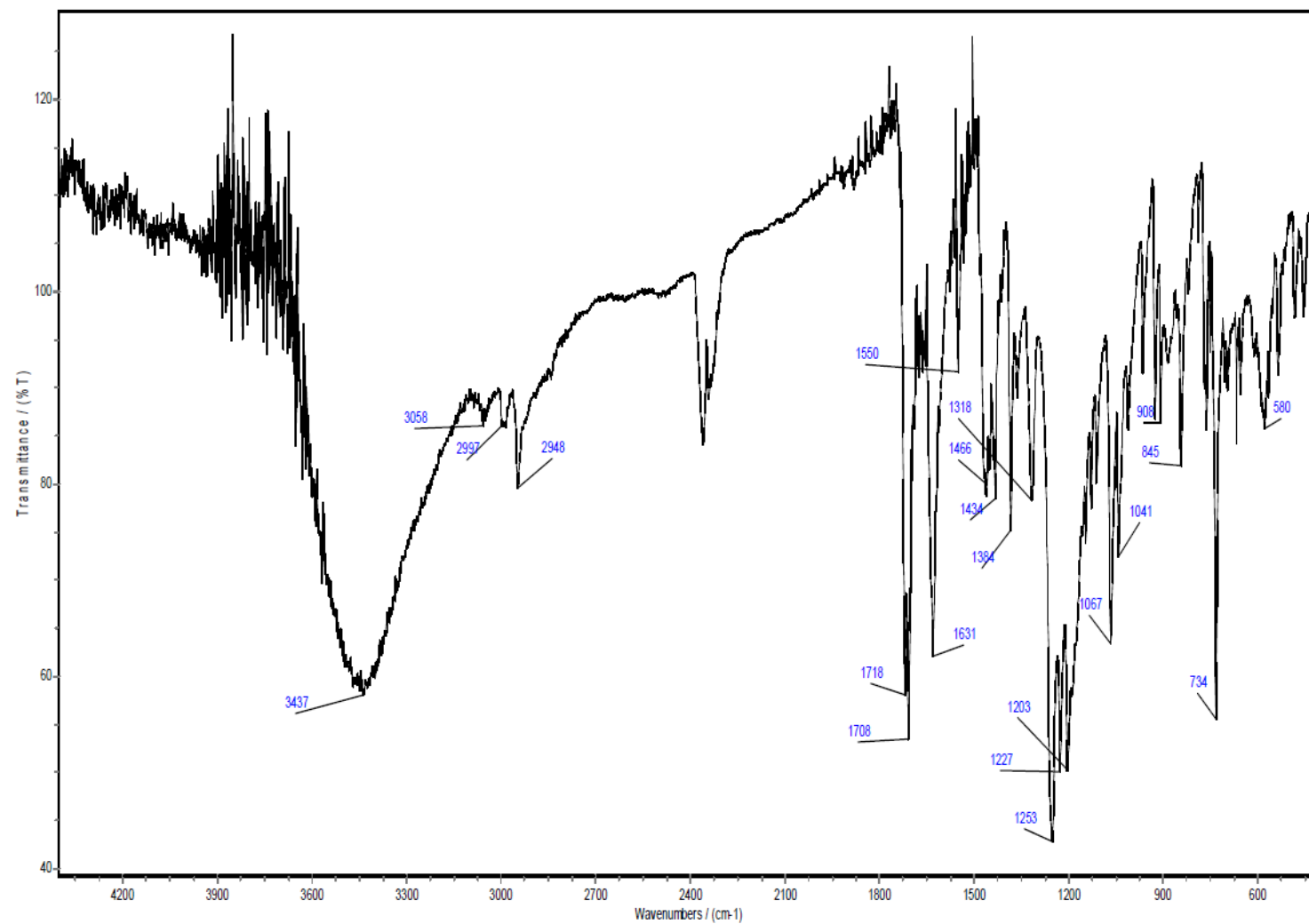


Figura 54: Espectro de RMN de ^1H do derivado (01) (200 MHz, CDCl_3).

M2P1-1hGisely
M2P1-Gisely
Op.Evandro
18/05/15

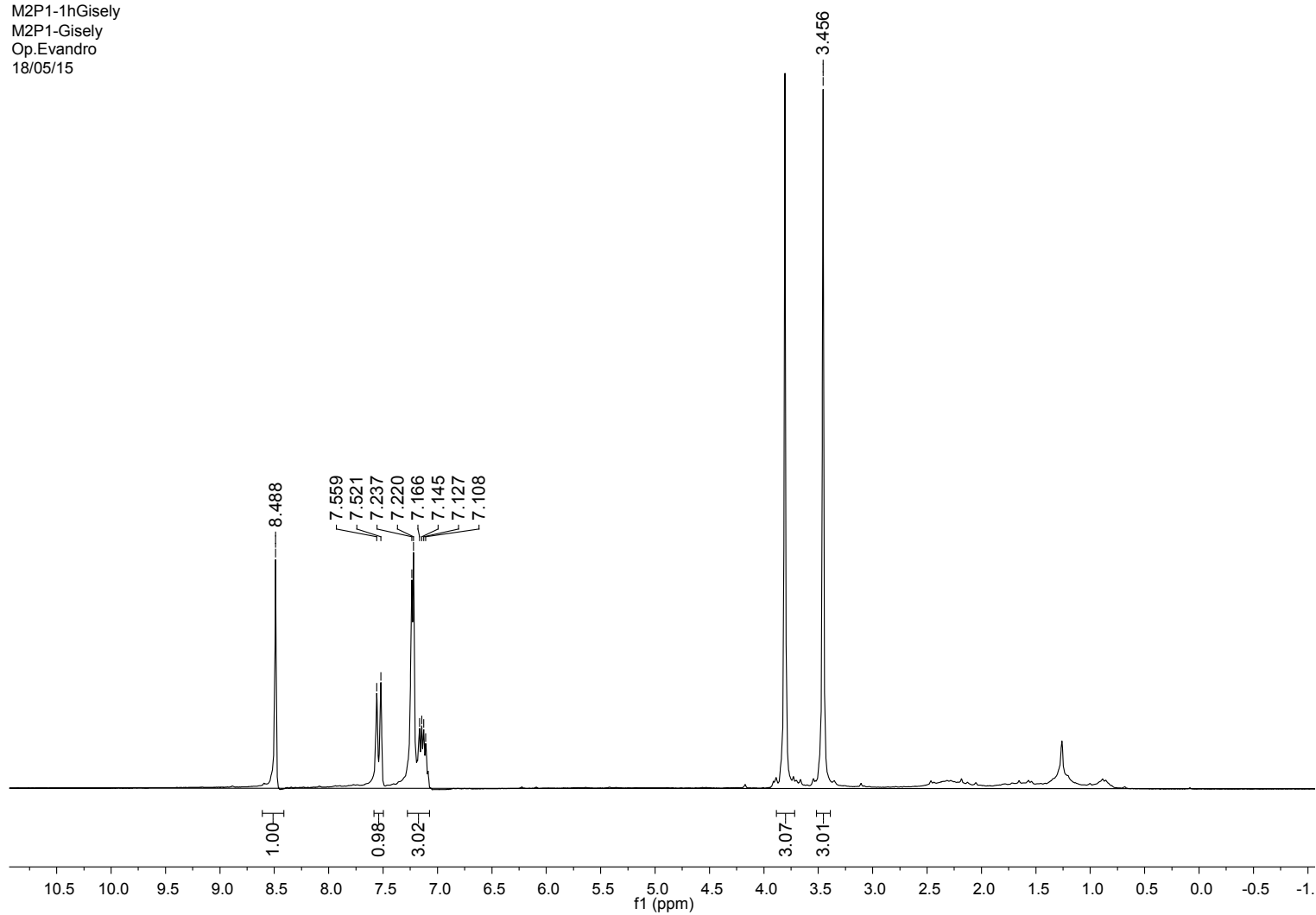
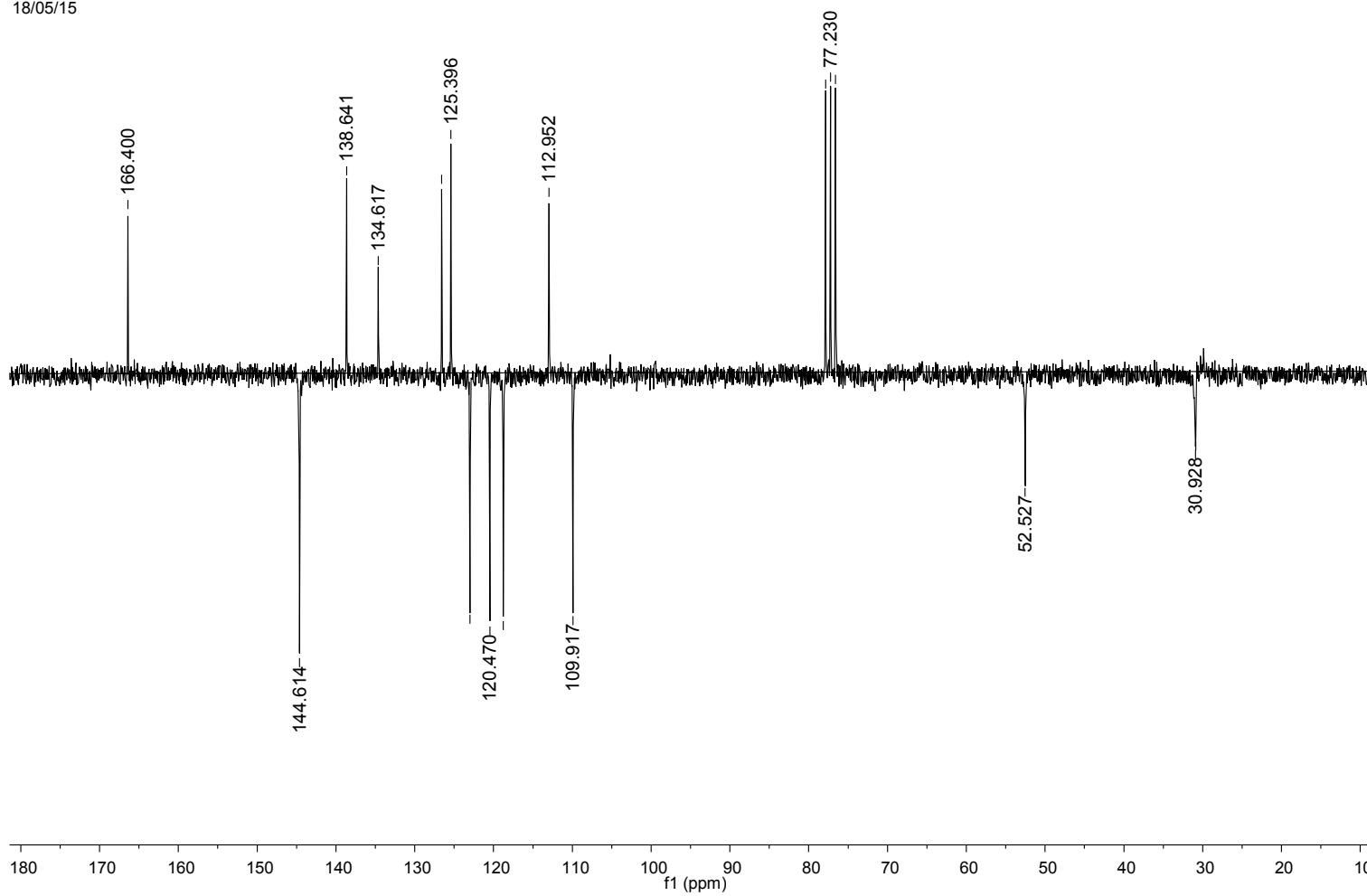


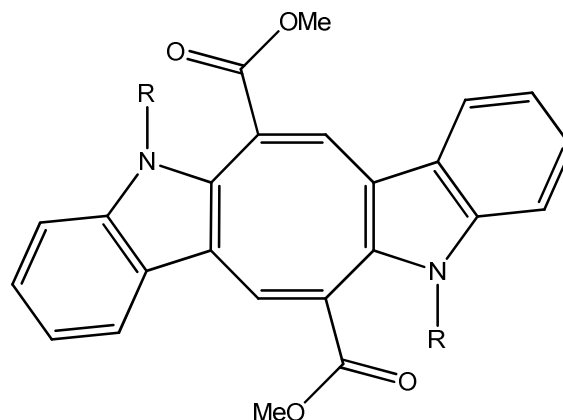
Figura 55: Espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (01) (200 MHz, CDCl_3).

M2P1-aptGisely
M2P1-Gisely
Op.Evandro
18/05/15



6.2.3.3.2 Caulerpina *N*-etil, Caulerpina *N*-alil, Caulerpina *N*-propargil, Caulerpina *N*-benzil, Caulerpina mono *N*-acetato de etila.

Figura 56: caulerpina *N*-substituída.

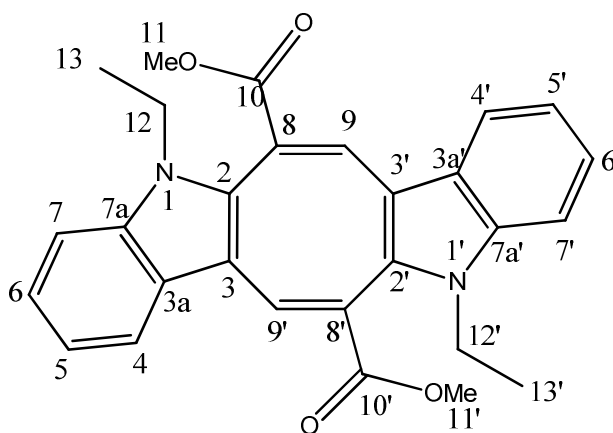


Metodologia geral para a adição dos grupos etil, alil, propargil, benzil, 3,4,5 hidroxibenzil e acetato de etila (Figura 56): para cada reação foi preparada uma solução de caulerpina (0,1 mmol, 40mg) em Dimetilformamida - DMF (2mL), a qual foram adicionadas KOH (0,4 mmol, 23mg) e um tipo de haleto de alquila. Os haletos de alquila adicionados foram o bromoetano- C_2H_5Br , (0,3 mmol, 0,022mL), brometo de alila – C_3H_5Br (0,3 mmol, 0,026mL), brometo de propargila - C_3H_3Br (0,3 mmol, 0,026 mL), cloreto de benzila - C_7H_7Cl (0,3 mmol, 0,035 mL), 3,4,5-trimetoxi-benzil (0,3 mmol, 65mg) e bromoacetato de etila (0,3 mmol, 0,033 mL). Cada mistura foi submetida à agitação a 50 °C. As reações foram estabilizadas após 2 horas. Após a evaporação do solvente em rotaevaporado, procedeu-se a extração dos produtos da reação através de partição líquido-líquido utilizando-se 20mL de H_2O e duas lavagens de 20mL de acetato de etila. As frações orgânicas de cada reação foram adicionados excesso de sulfato de sódio anidro e seguida a filtração com papel de filtro. Afim de se obter os produtos reacionais isolados procedeu-se cromatografia em camada delgada preparativa com hexano:acetato 8:2 como sistema de eluição (ZHAO et al.,2014).

Após a aplicação das técnicas de purificação ao produto reacional obtivemos como produtos principais das reações as seguintes moléculas com os seguintes rendimentos: derivado 02 (Figura 57), 81,75%; derivado 03 (Figura 62), 82,5%; derivado 04 (Figura 66), 85%; derivado 05 (Figura 75), 99,25%, e derivado 07(Figura 79) , 13,67 %.

6.2.3.3.2.1 Caulerpina *N* – etil – derivado 02 (6E, 13E)-dimetil 5,12- dietil- 5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b`] diindol-6,13-dicarboxilato)

Figura 57: Estrutura no derivado 02.



IV (KBr, $n_{\max}$): 3419, 3048, 3015, 2996, 2948, 2932, 2890, 1705, 1619, 1551, 1465, 1430, 1319, 1243, 1193, 1066, 1044, 917, 765, 740, 690 cm^{-1} .

^1H RMN (500 MHz, CD_3OD) δ 8,44 (s, 1H); 7,51 (dl, 1H); 7,26 (dl, 1H); 7,19 (dt, 1H); 7,10 (dt, 1H); 4,01 (m, 1H); 3,80 (m, 1H); 3,80 (s, 3H); 1,17 (t, 3H).

^{13}C RMN (500 MHz, CD_3OD) δ 166,8; 144,3; 137,5; 134,0; 126,9; 126,1; 122,7; 120,4; 118,8; 113,2; 110,5; 52,6; 39,2; 14,8.

Figura 58: Espectro IV do derivado 02.

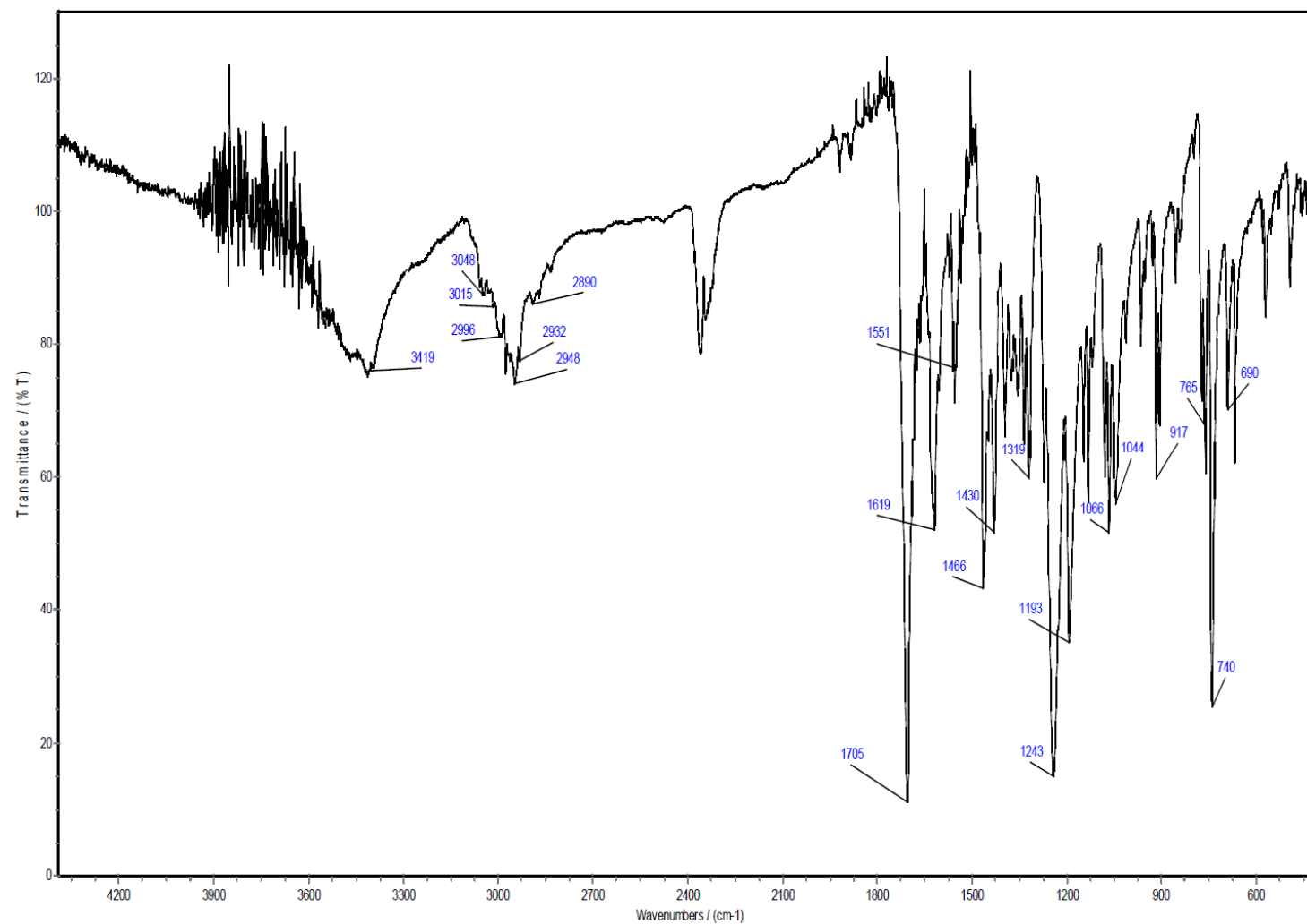


Figura 59: Espectro de RMN de ^1H do derivado (02) (500 MHz, CDCl_3).

Bromoetano-1hGisely
Bromoetano-Gisely
Op.Evandro
05/10/15

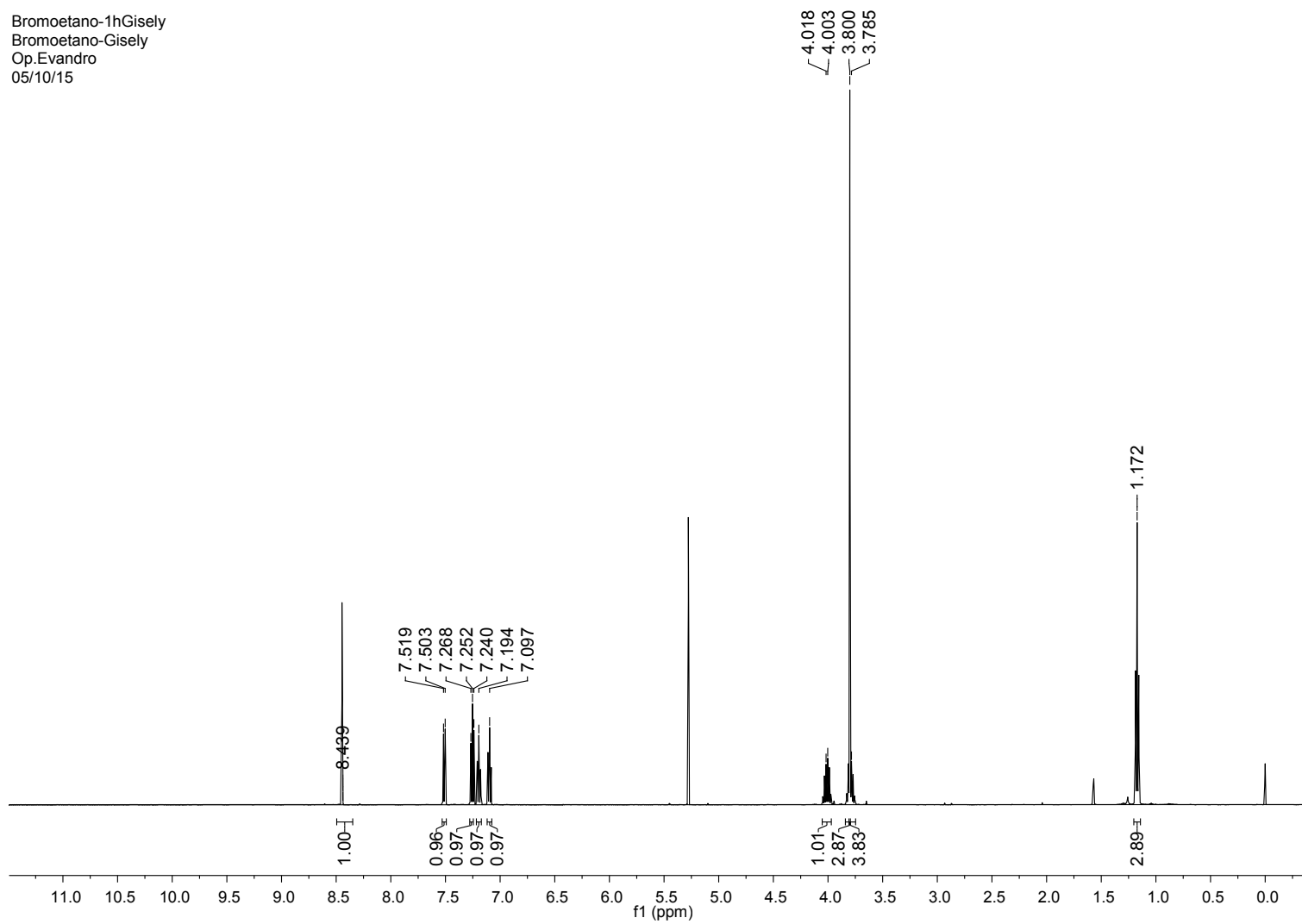


Figura 60: Espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (02) (500 MHz, CDCl_3).

Bromoetano-aptGisely
Bromoetano-Gisely
Op.Evandro
05/10/15

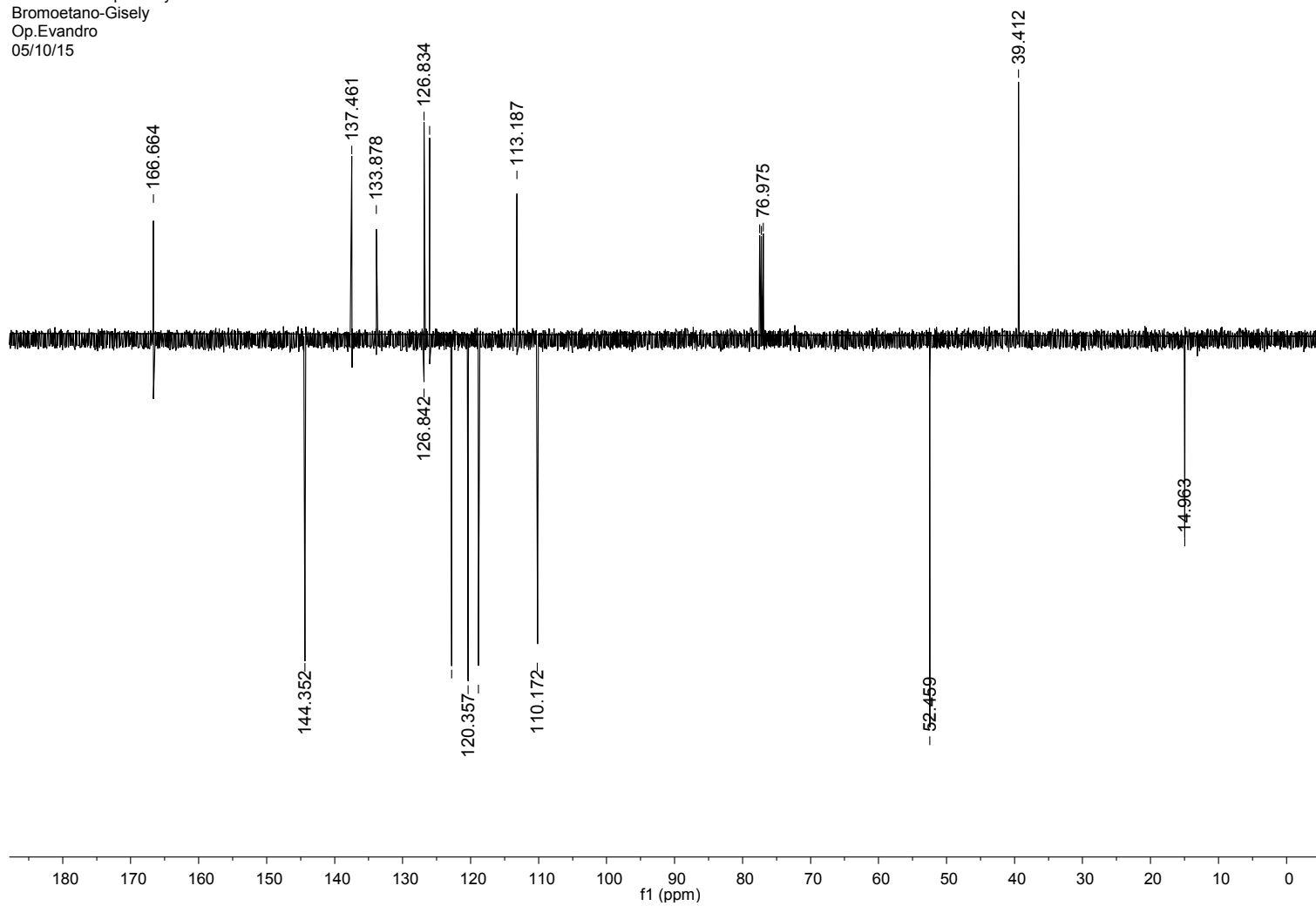
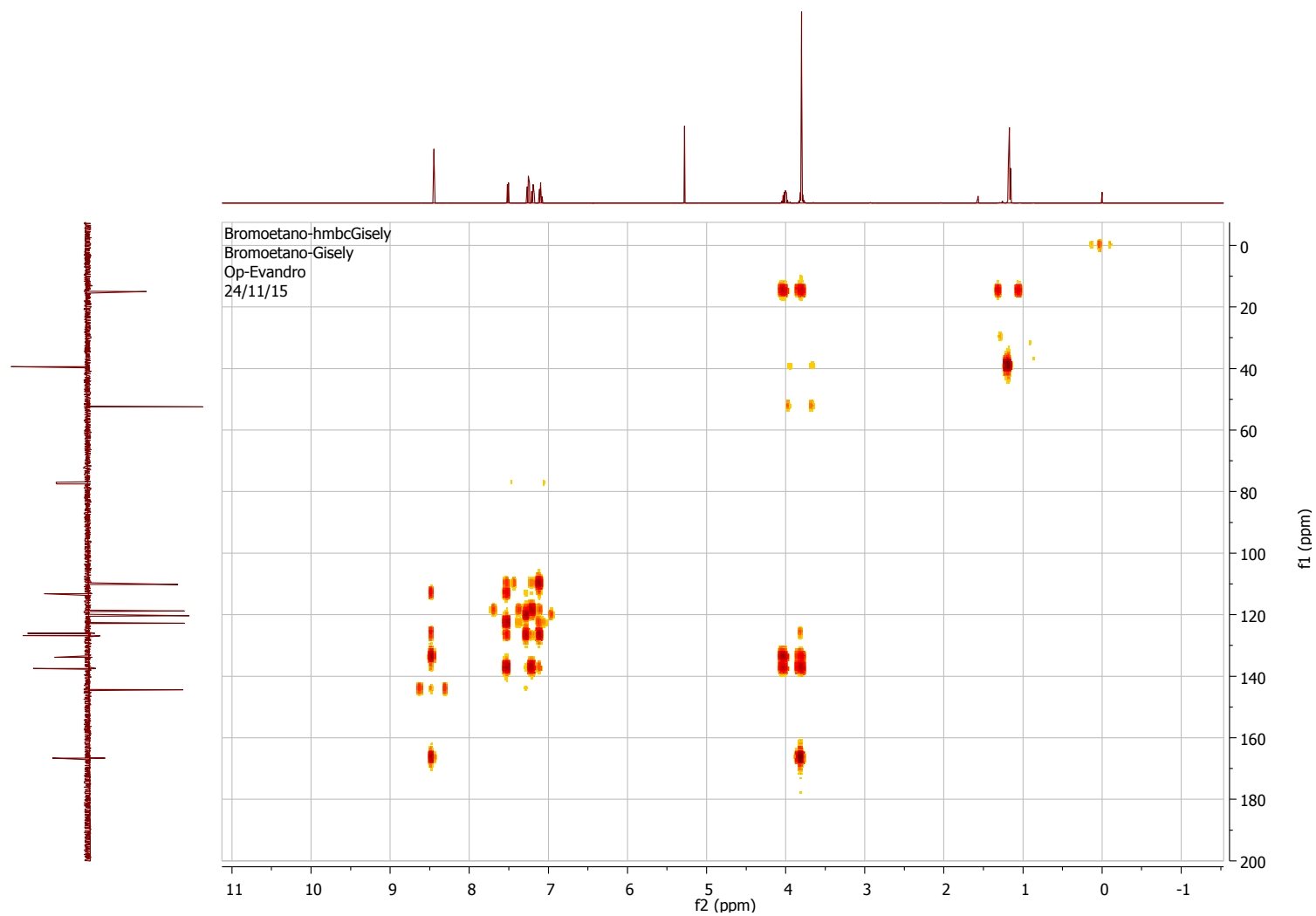
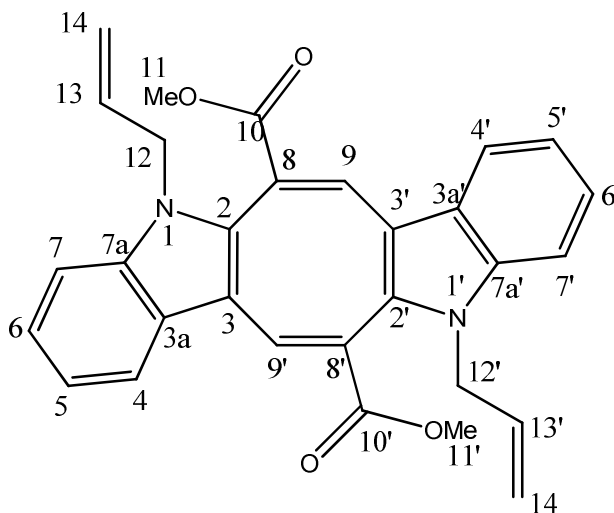


Figura 61: Espectro de HMBC do derivado (02) (500 MHz, CDCl_3).



6.2.3.3.2 Caulerpina *N* – alil – derivado 03 (6E, 13E)-dimetil 5,12- dialil- 5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b`] diindol-6,13-dicarboxilato)

Figura 62: Estrutura no derivado 03.



IV (KBr, $n_{\max}$): 3416, 3051, 3000, 2948, 2927, 1715, 1702, 1619, 1555, 1461, 1371, 1312, 1259, 1234, 1191, 1065, 1037, 917, 750, 739, 724 cm^{-1} .

^1H RMN (200 MHz, CD_3OD) δ 8,44 (s, 1H); 7,49 (dl, 1H); 7,23 (dl, 1H); 7,20 (dt, 1H); 7,12 (dt, 1H); 5,73 (m, 1H); 4,93 (t, 2H); 4,47 (ddd, 2H); 3,77 (s, 3H).

^{13}C RMN (200 MHz, CD_3OD) δ 166,4; 144,5; 137,9; 134,1; 132,9; 126,6; 126,0; 122,9; 120,4; 118,4; 117,1; 113,5; 110,6; 52,4; 47,1.

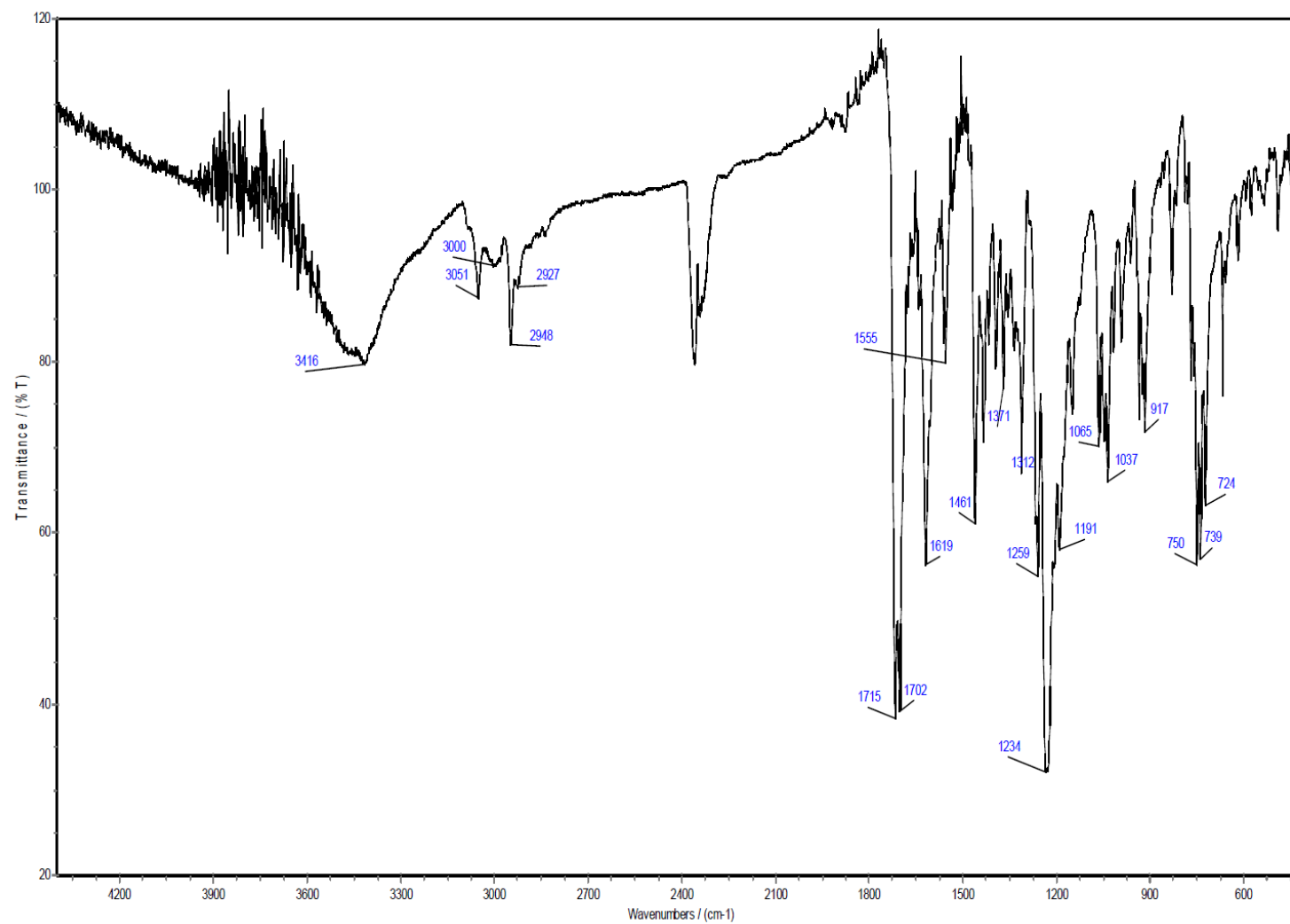
Figura 63: Espectro IV do derivado 03.

Figura 64: Espectro de RMN de ^1H do derivado (03) (200 MHz, CDCl_3).

P2M1-1hGisely
P2M1-Gisely
Op-Evandro
09/09/15

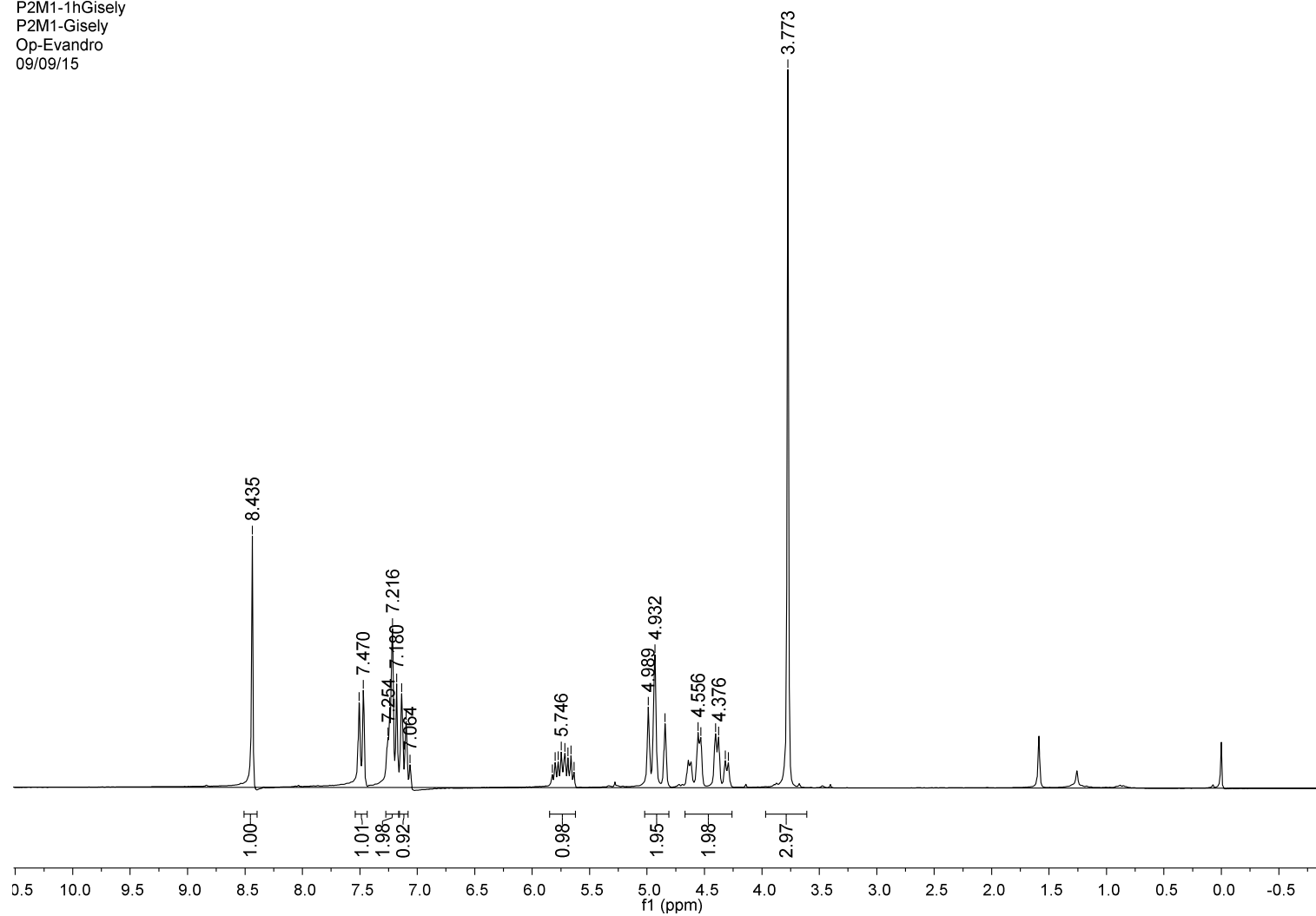
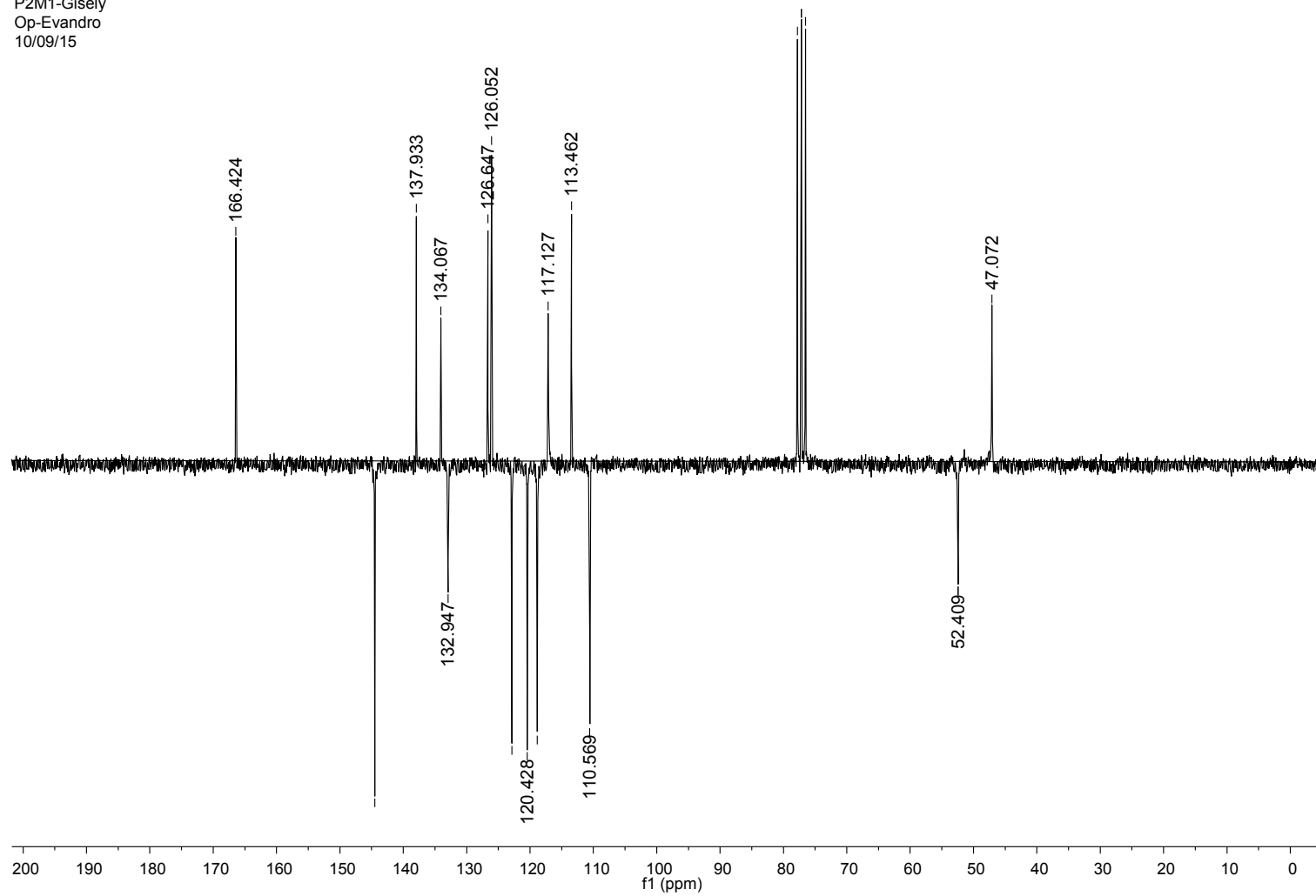


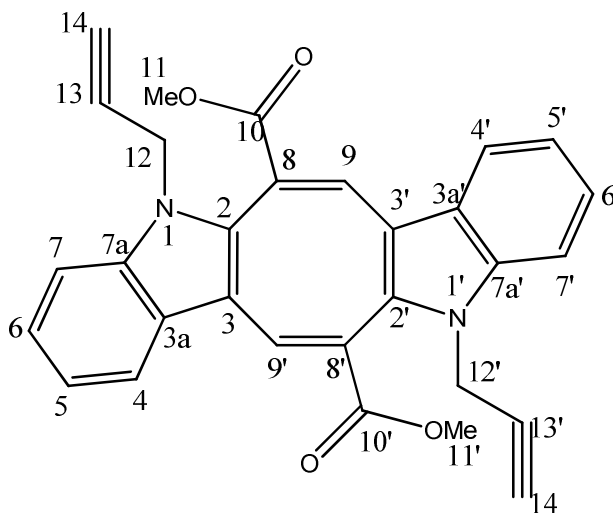
Figura 65: Espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (03) (200 MHz, CDCl_3).

P2M1-aptGisely
P2M1-Gisely
Op-Evandro
10/09/15



6.2.3.3.2.3 Caulerpina *N* – propargil – derivado 04 (6E, 13E)-dimetil 5,12- di(prop-2-in-1-il)- 5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b`] diindol-6,13-dicarboxilato)

Figura 66: Estrutura no derivado 04.



IV (KBr, $n_{\max}$): 3475, 3416, 3284, 3057, 2948, 2923, 2849, 2100 1711, 1624, 1550, 1462, 1433, 1388, 1333, 1315, 1266, 1240, 1194, 1071, 1043, 741, 662 cm^{-1} .

^1H RMN (500 MHz, CD_3OD) δ 8,46 (s, 1H); 7,51 (dl, 1H); 7,41 (dl, 1H); 7,24 (dt, 1H); 7,14 (dt, 1H); 4,59 ((m, 2H); 3,80 (s, 3H); 2,20 (s, 1H).

^{13}C RMN (500 MHz, CD_3OD) δ 166,5; 145,6; 137,6; 133,6; 126,9; 125,9; 123,5; 120,6; 118,9; 114,2; 110,4; 77,7; 73,1; 52,1; 34,4.

Figura 67: Espectro IV do derivado 04.

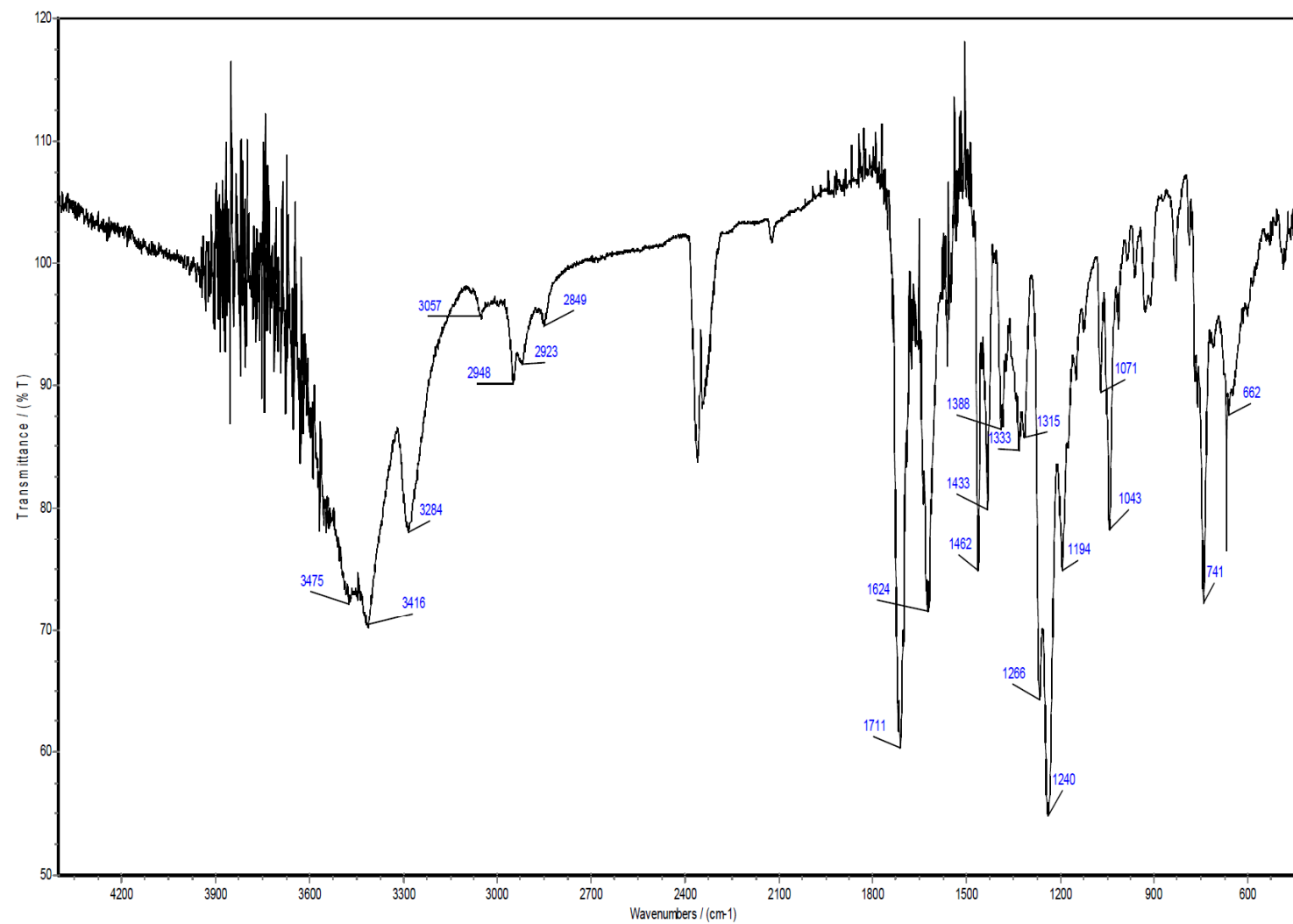


Figura 68: Espectro de RMN de ^1H do derivado (04) (500 MHz, CDCl_3).

CLPP_P1_1hGisely
CLPP_P1_Gisely
op. Alessandro
02/09/2016

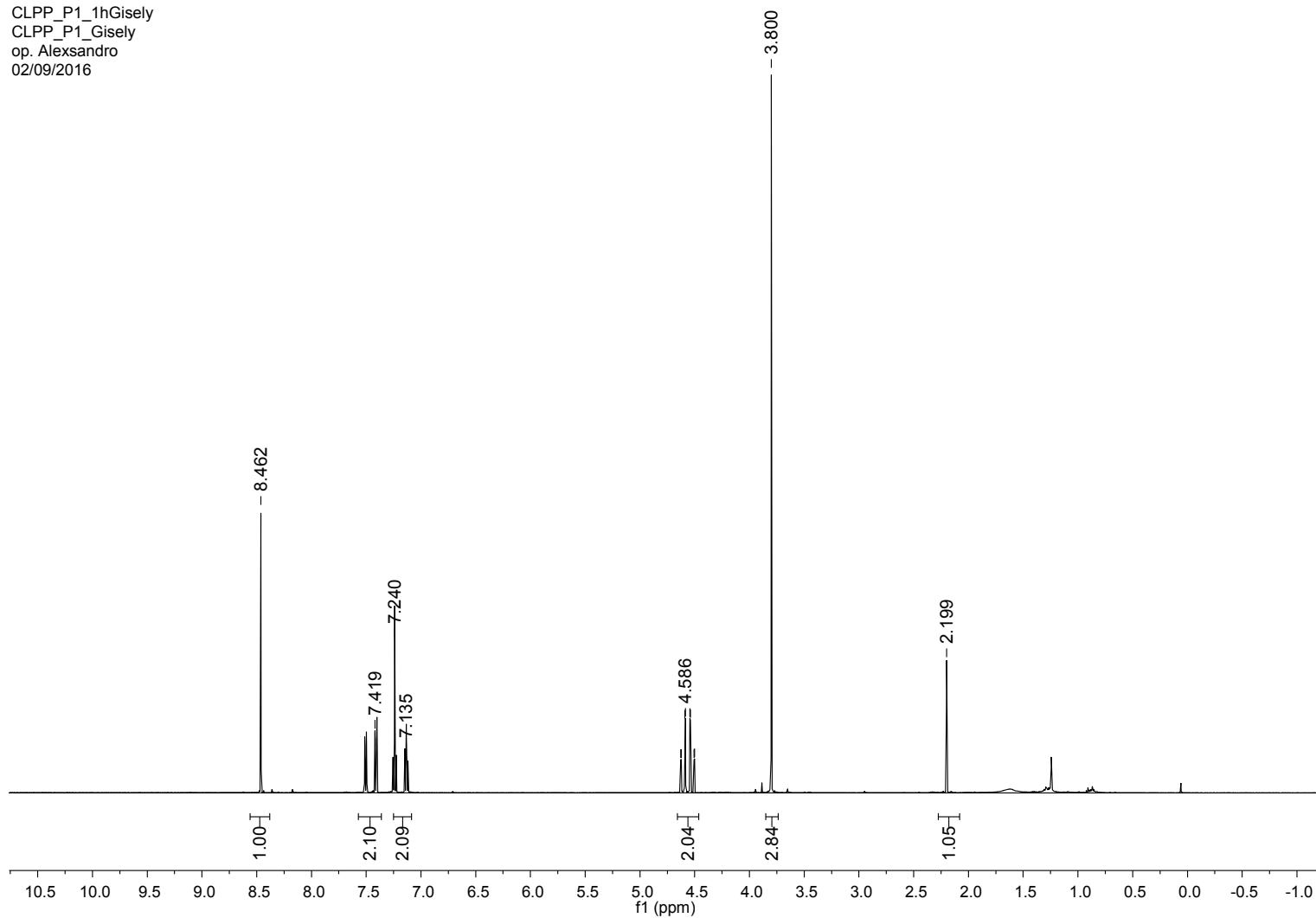


Figura 69: Espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (04) (500 MHz, CDCl_3).

CLPP_P1_apGisely
CLPP_P1_Gisely
op Alexandro
01/09/2016

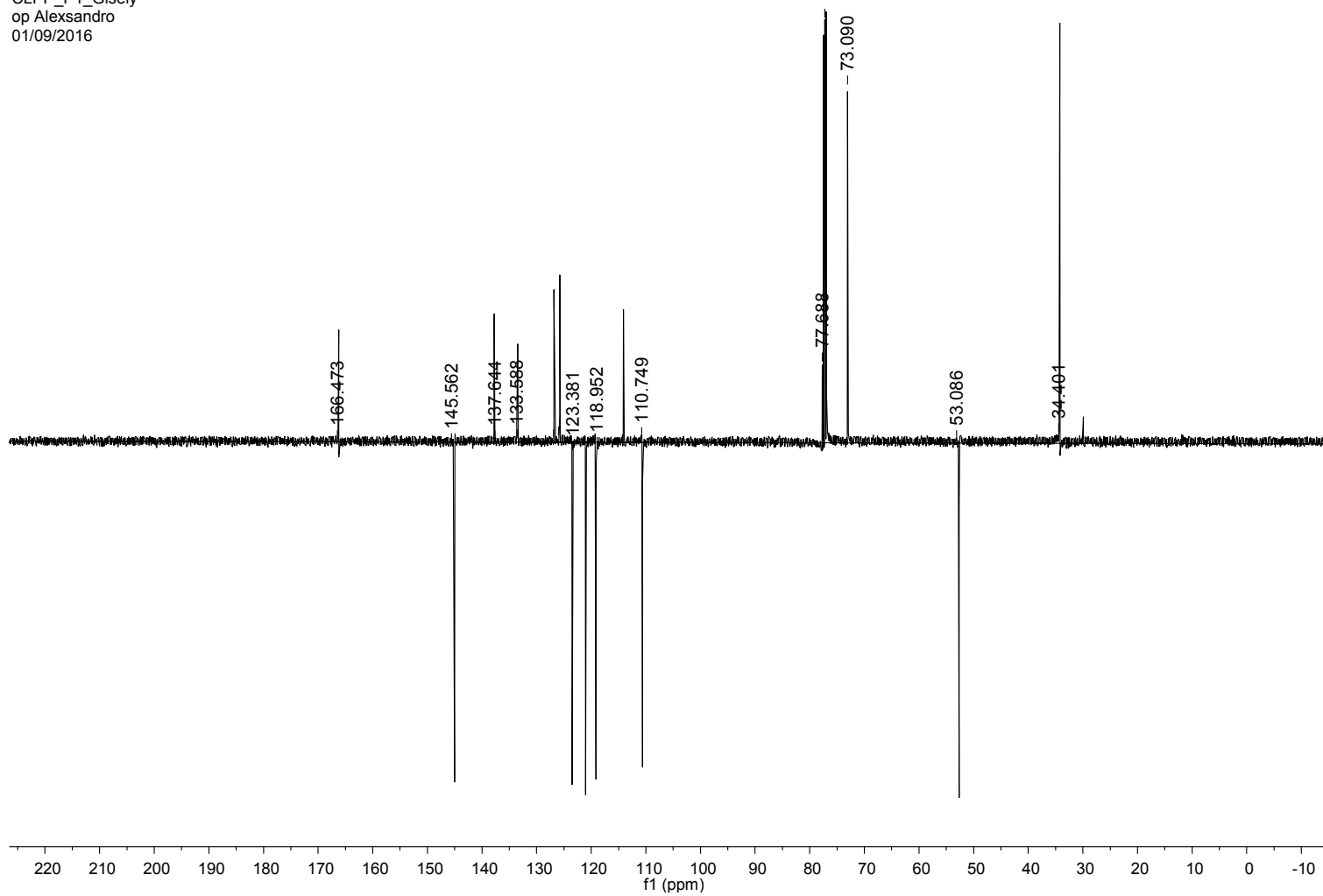


Figura 70: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (04) (500 MHz, CDCl_3).

CLPP_P1_apGisely
CLPP_P1_Gisely
op Alexandro
01/09/2016

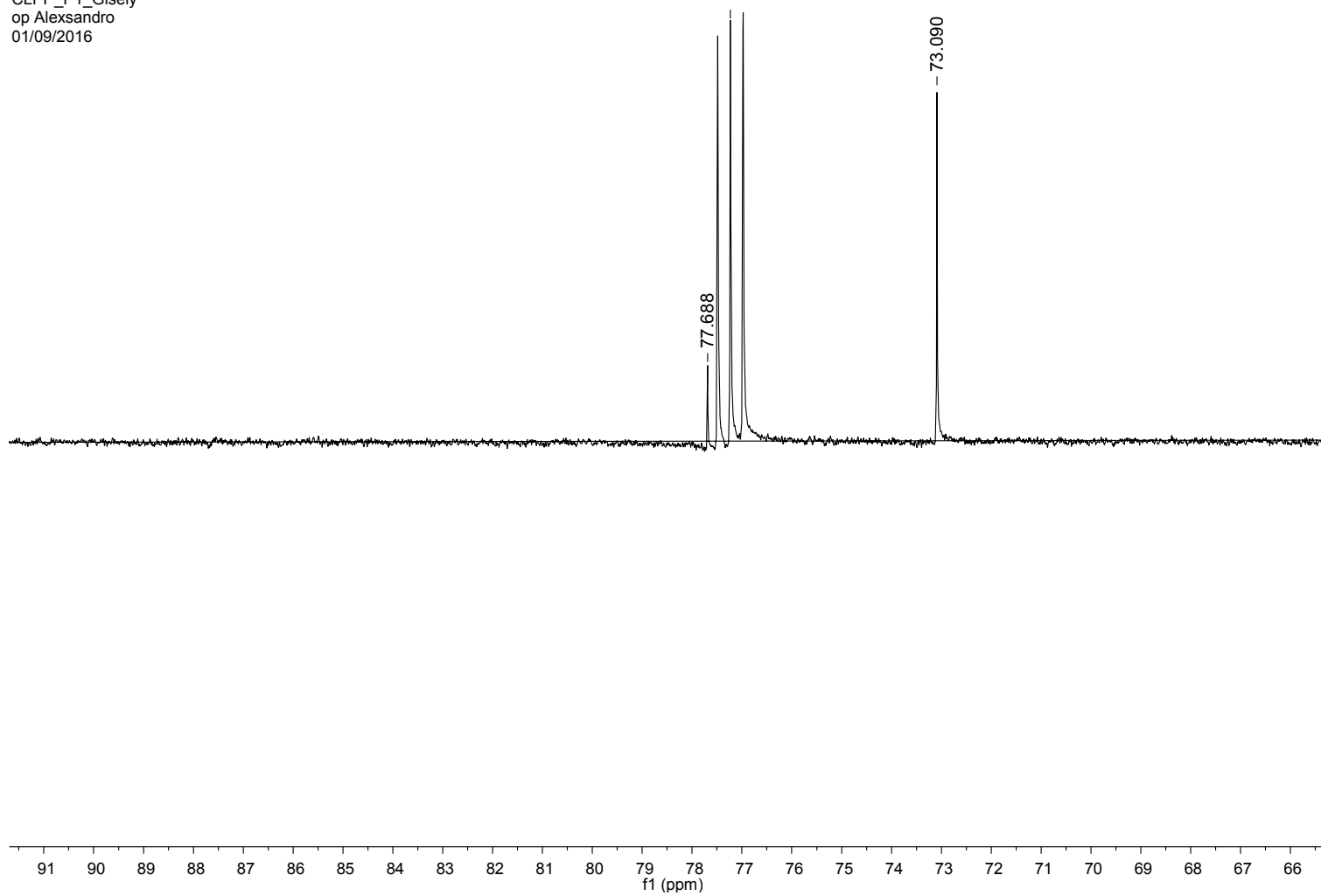


Figura 71: Espectro COSY do derivado 04 (500 MHz, CDCl_3).

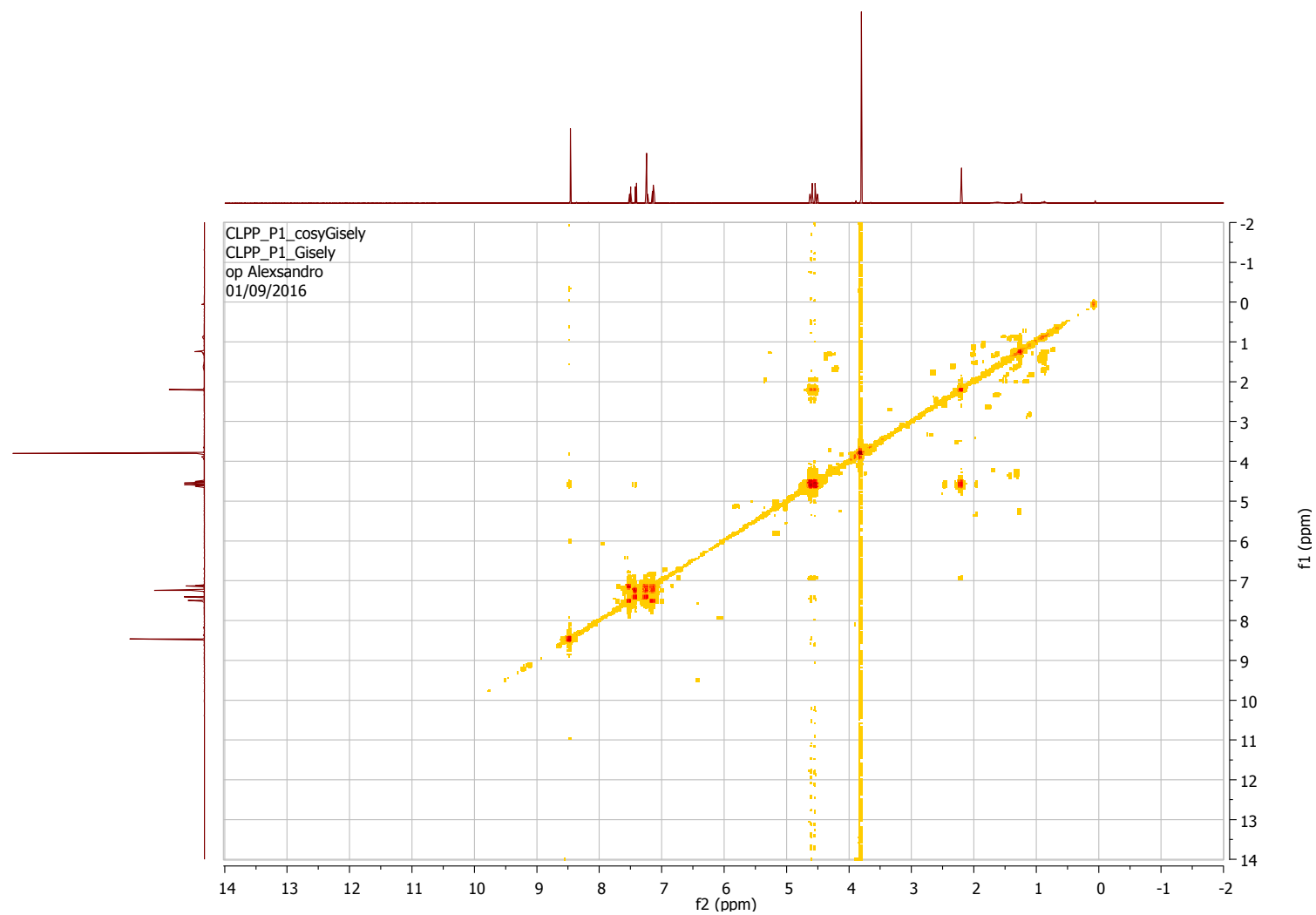


Figura 72: Espectro HMQC do derivado 04 (500 MHz, CDCl_3).

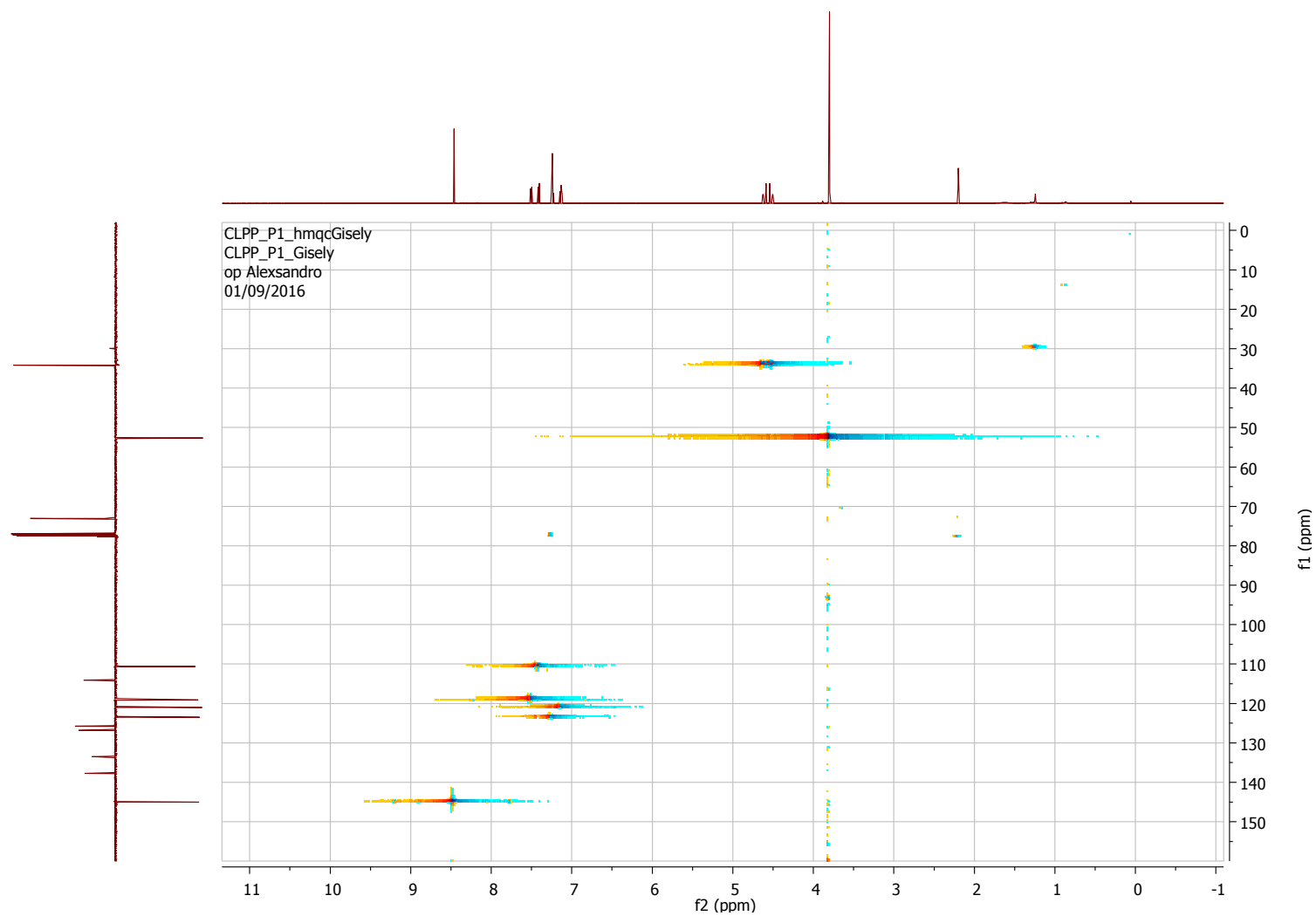


Figura 73: Expansão do espectro HMQC do derivado 04 (500 MHz, CDCl_3).

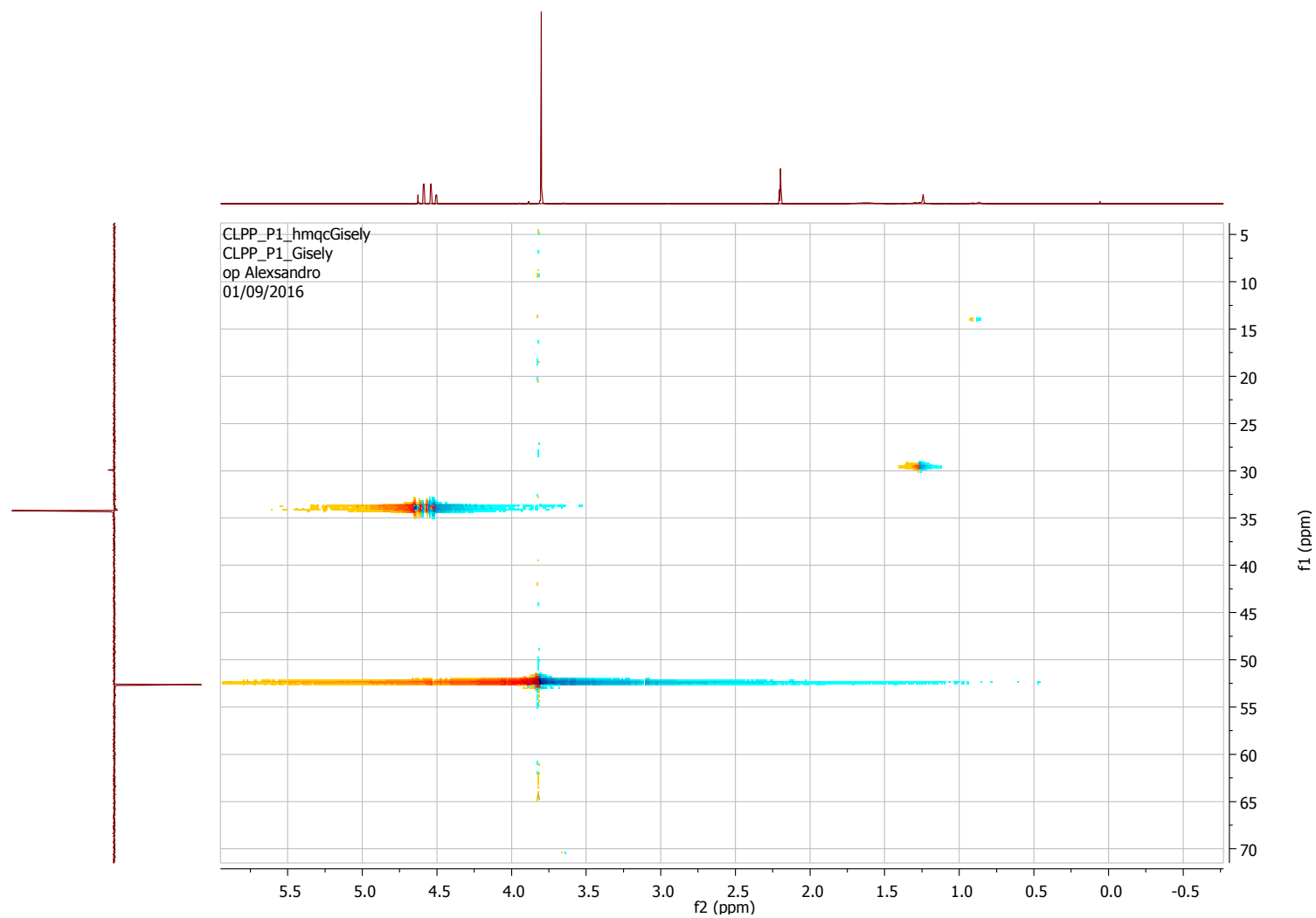
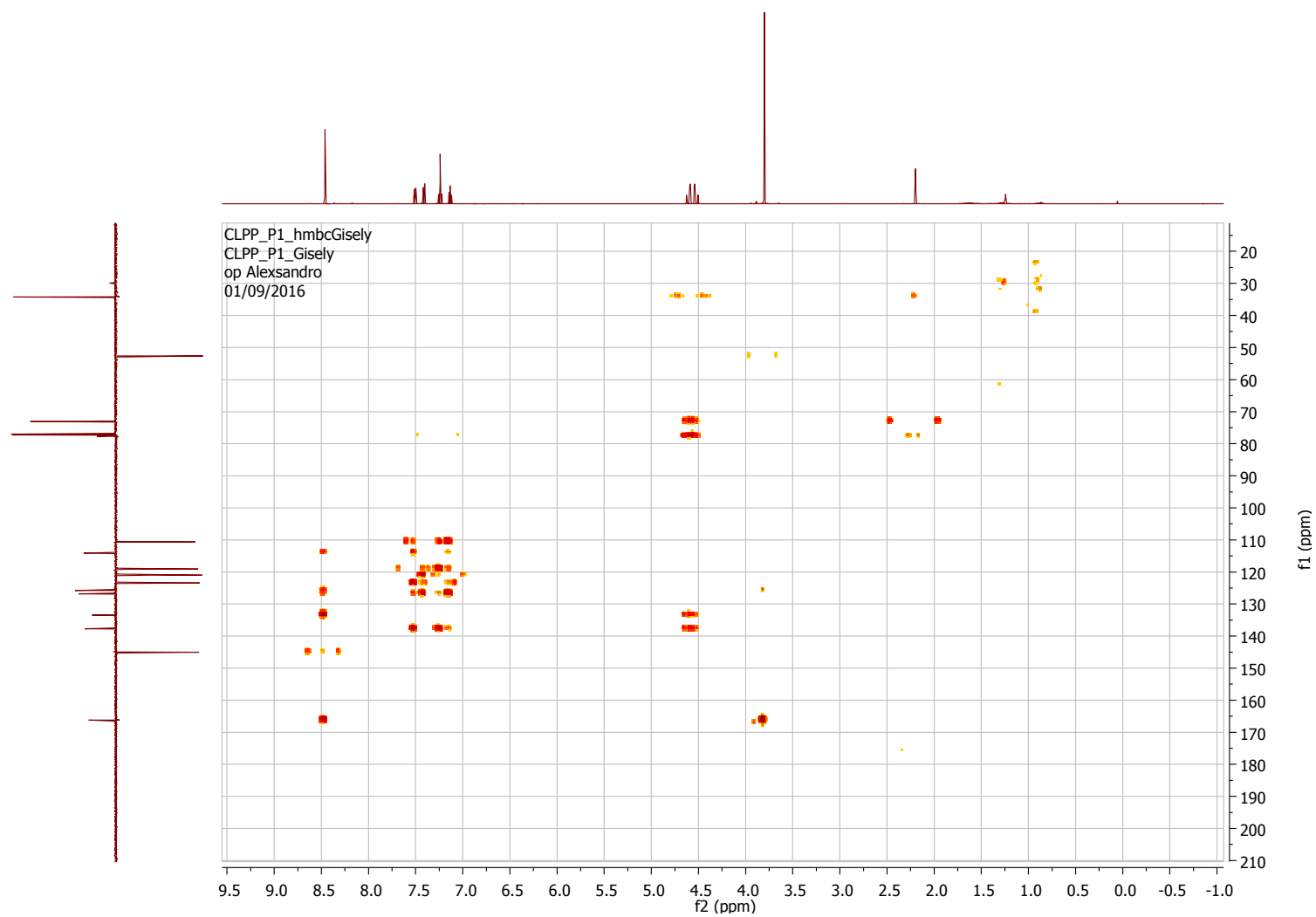
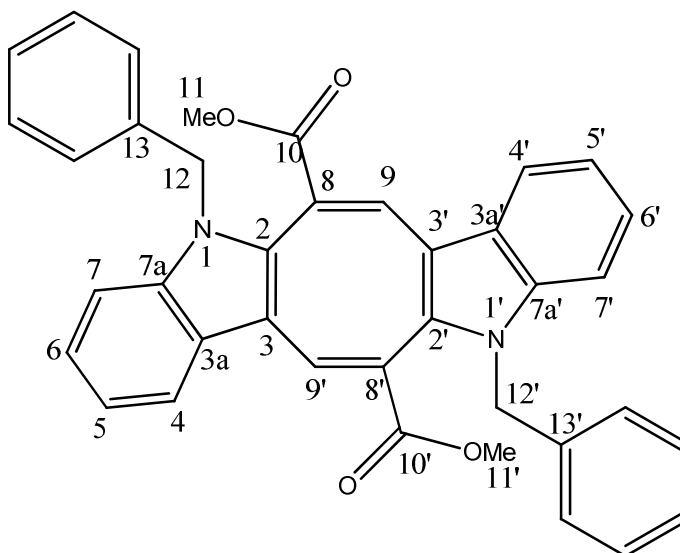


Figura 74: Espectro HMBC do derivado 04 (500 MHz, CDCl_3).



6.2.3.3.2.4 Caulerpina *N* – benzil – derivado 05 (6E, 13E)-dimetil 5,12- dibenzil- 5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b`] diindol-6,13-dicarboxilato)

Figura 75: Estrutura no derivado 05.



IV (KBr, $n_{\max}$): 3474, 3415, 3058, 3032, 2948, 1691, 1617, 1550, 1463, 1428, 1263, 1244, 1190, 1069, 1051, 914, 768, 737, 707, 668, 613 cm^{-1} .

^1H RMN (200 MHz, CD_3OD) δ 8,45 (s, 1H); 7,35 (dl, 1H); 7,31 (dl, 1H); 7,05 (dt, 1H); 6,95 (dt, 1H); 5,10 (m, 2H); 3,66 (s, 3H).

^{13}C RMN (200 MHz, CD_3OD) δ 166,3; 144,9; 138,0; 136,9; 134,4; 128,5; 127,3; 126,8; 126,6; 126,2; 123,2; 120,6; 119,4; 114,1; 110,6; 52,4; 48,1.

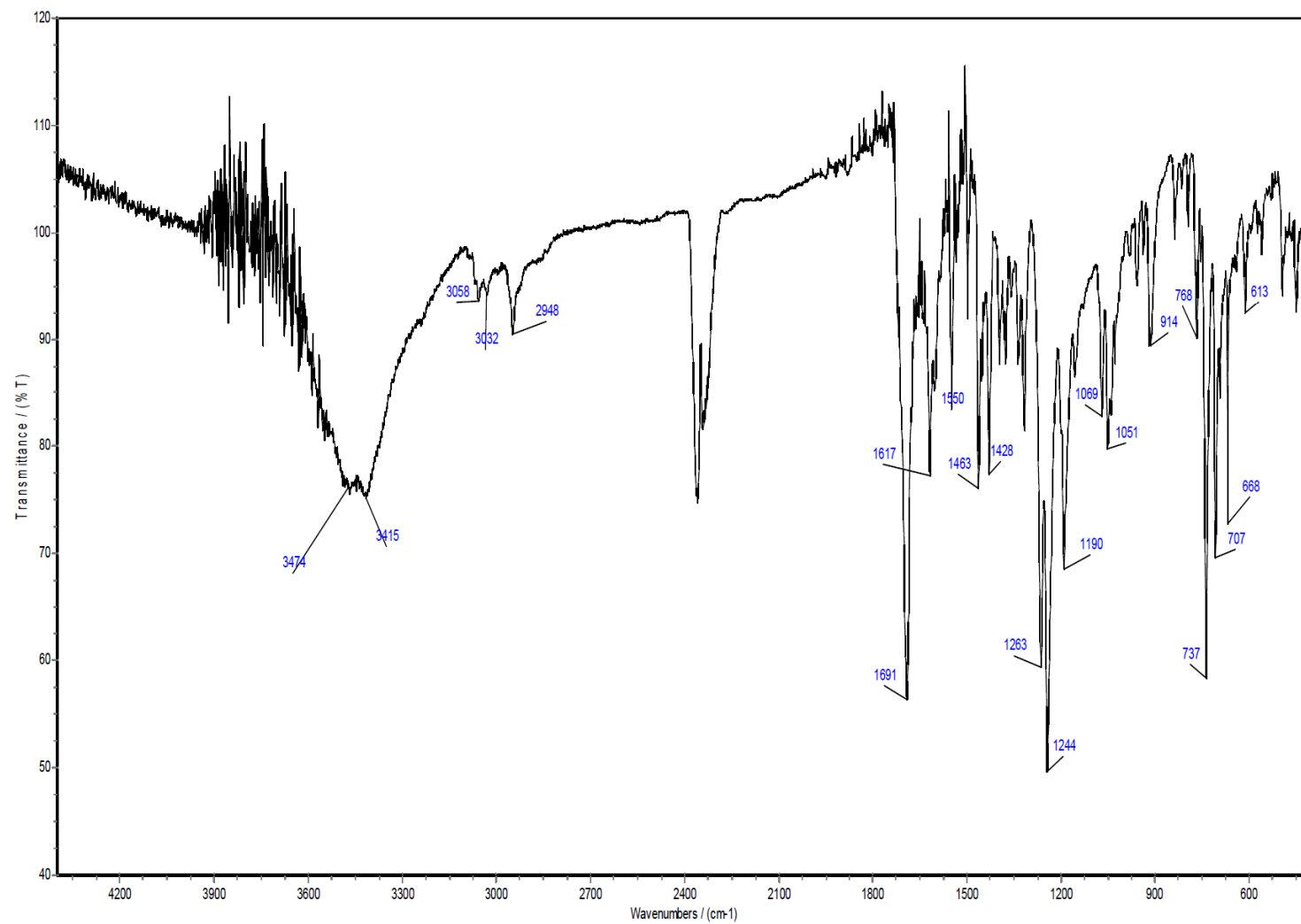
Figura 76: Espectro IV do derivado 05.

Figura 77: Espectro de RMN de ^1H do derivado (05) (200 MHz, CDCl_3).

Cl-Benzila-1hGisely
Cl-Benzila-Gisely
Op.Evandro
18/11/15

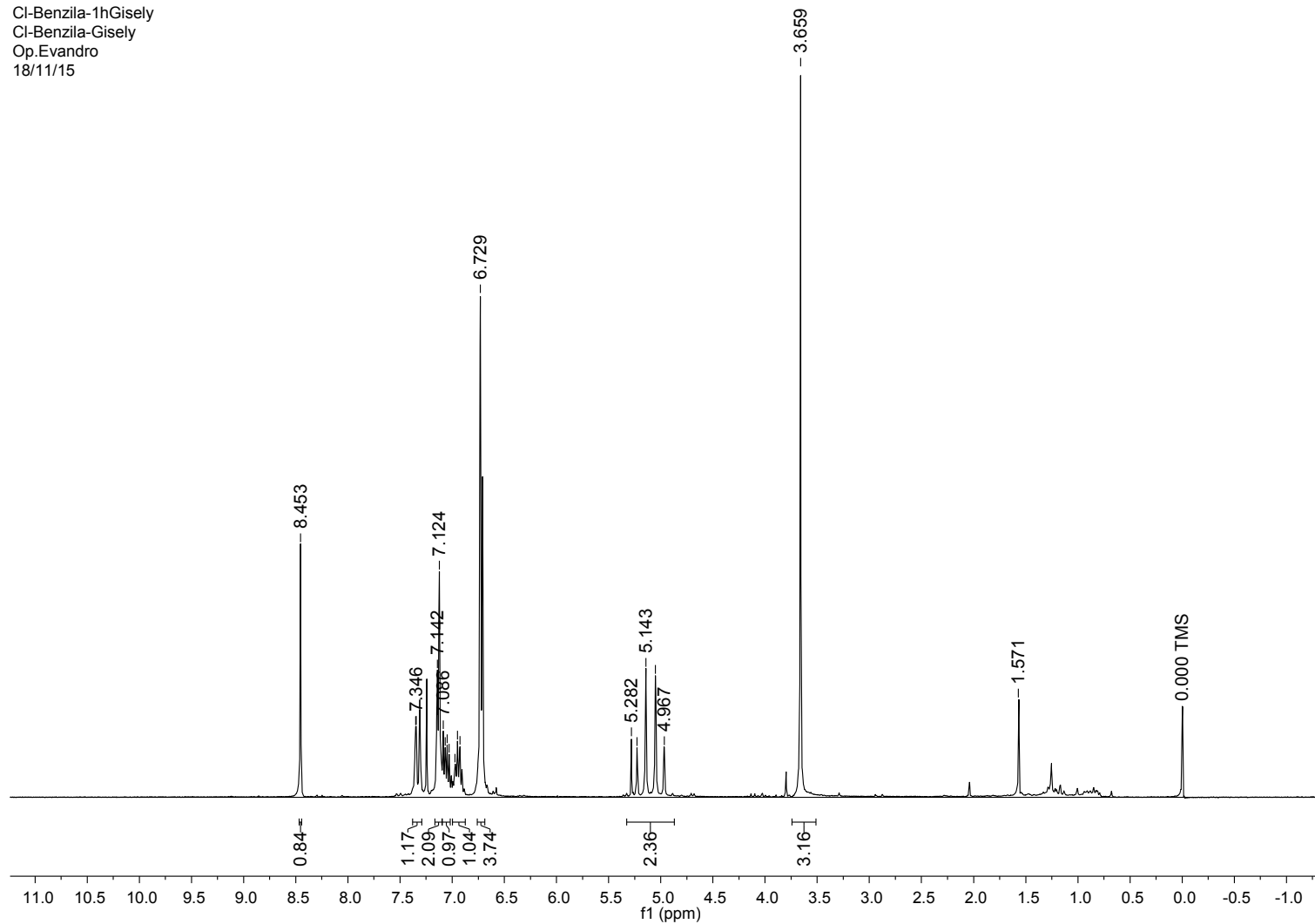
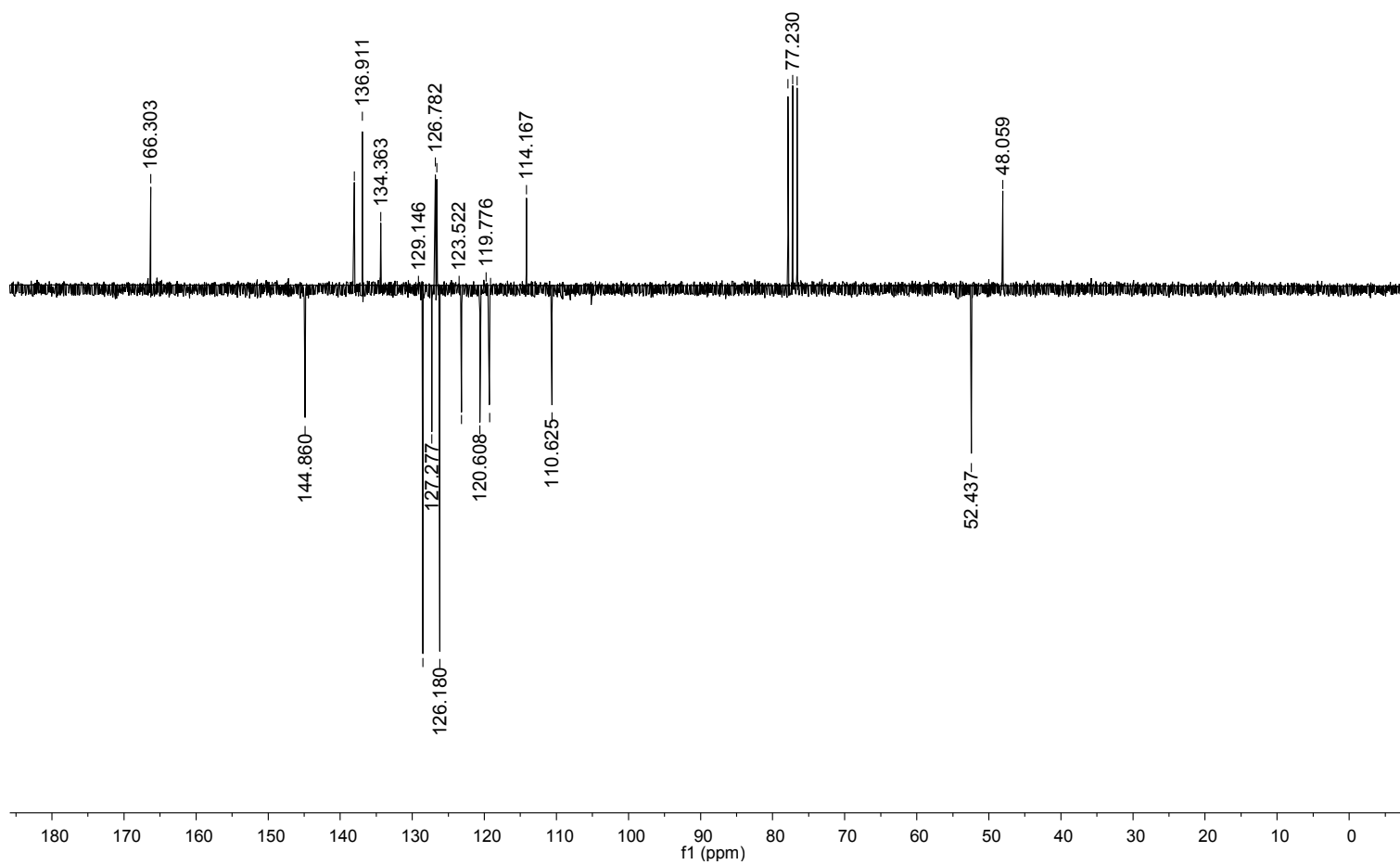


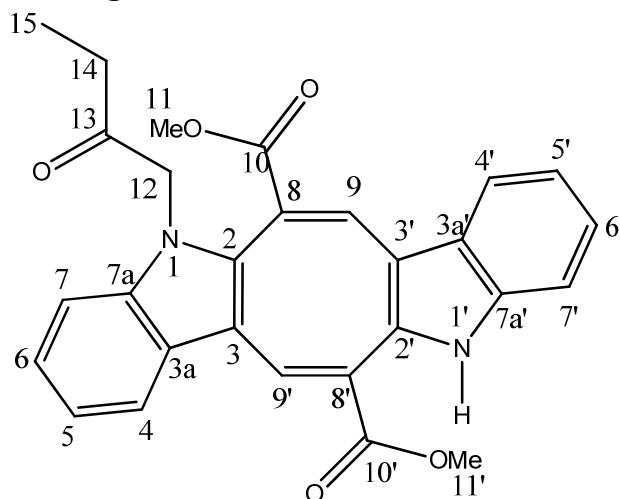
Figura 78: Espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (05) (200 MHz, CDCl_3).

Cl-Benzila-aptGisely
Cl-Benzila-Gisely
Op.Evandro
18/11/15



6.2.3.3.2.5 Caulerpina mono *N*-acetato de etila – derivado 07 (6*E*, 13*E*)-dimetil 5-(2-oxibutil)- 5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b'] diindol-6,13-dicarboxilato)

Figura 79: Estrutura no derivado 07.



¹H RMN (500 MHz, CD₃OD) δ 9,11 (s, 1H); 8,35 (s, 1H); 8,17 (s, 1H); 7,45 (dl, 1H); 7,43 (dl, 1H); 7,28 (dl, 1H); 7,21 (dl, 1H); 7,17 (dt, 1H); 7,16 (dt, 1H); 7,11 (dt, 1); 7,08 (dt, 1H); 4,65 (m, 1H); 4,48 (m, 1H); 4,00 (m, 2H); 3,88 (s, 3H); 3,76 (s, 3H); 0,97 (t, 3H).

¹³C RMN (500 MHz, CD₃OD) δ 167,9; 166,8; 165,9; 146,3; 141,5; 138,8; 137,3; 134,1; 132,2; 127,6; 126,8; 126,3; 124,8; 123,2; 120,8; 120,6; 118,8; 118,4; 113,6; 113,3; 111,5; 110,1; 61,5; 52,6; 52,3; 45,9; 13,8.

Figura 80: Espectro de RMN de ^1H do derivado (07) (500 MHz, CDCl_3).

CLPAC-1hGisely
CLPAC-Gisely
Op-Evandro
26/09/16

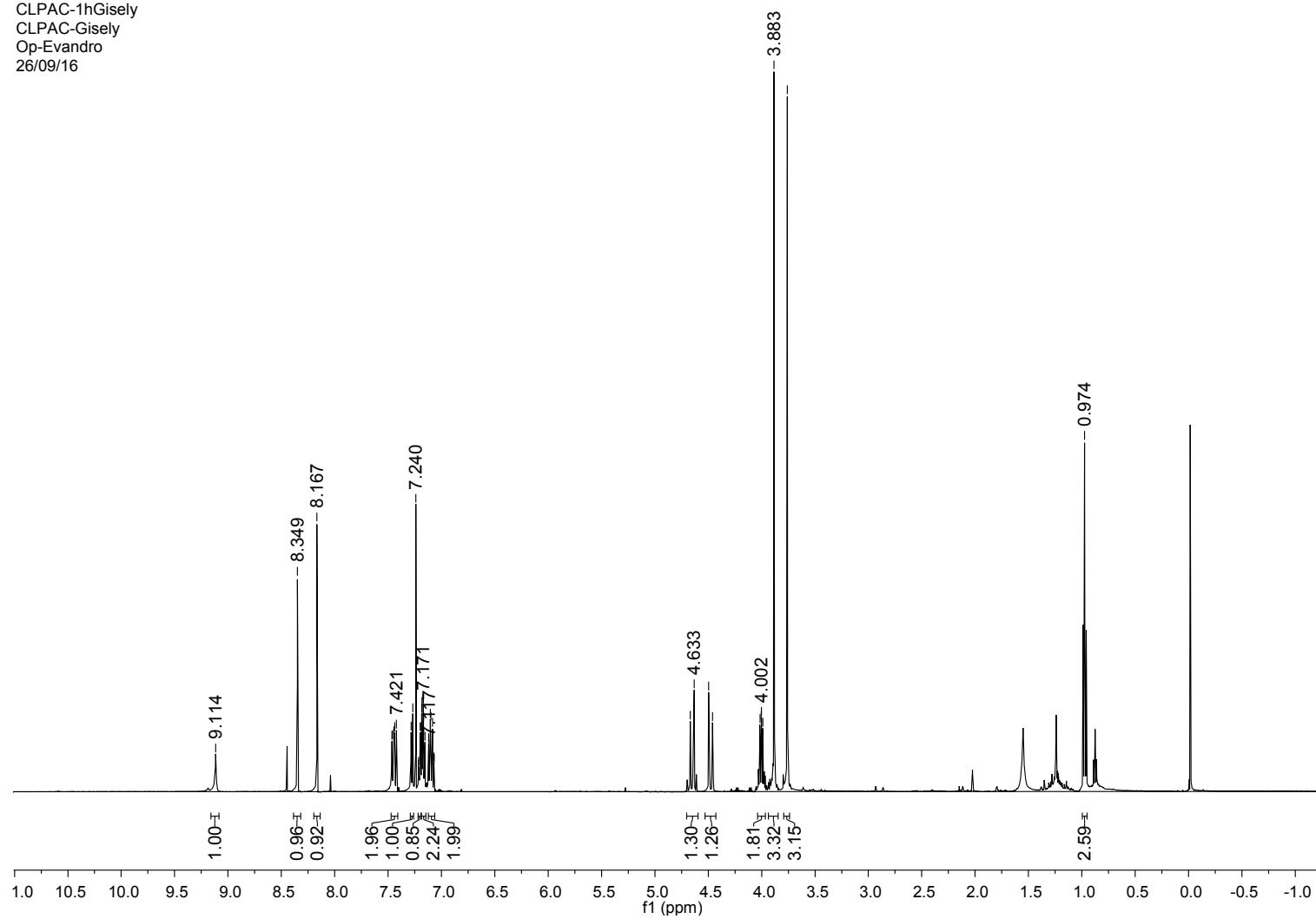


Figura 81: Espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (07) (500 MHz, CDCl_3).

CLPAC-aptGisely
CLPAC-Gisely
Op-Evandro
26/09/16

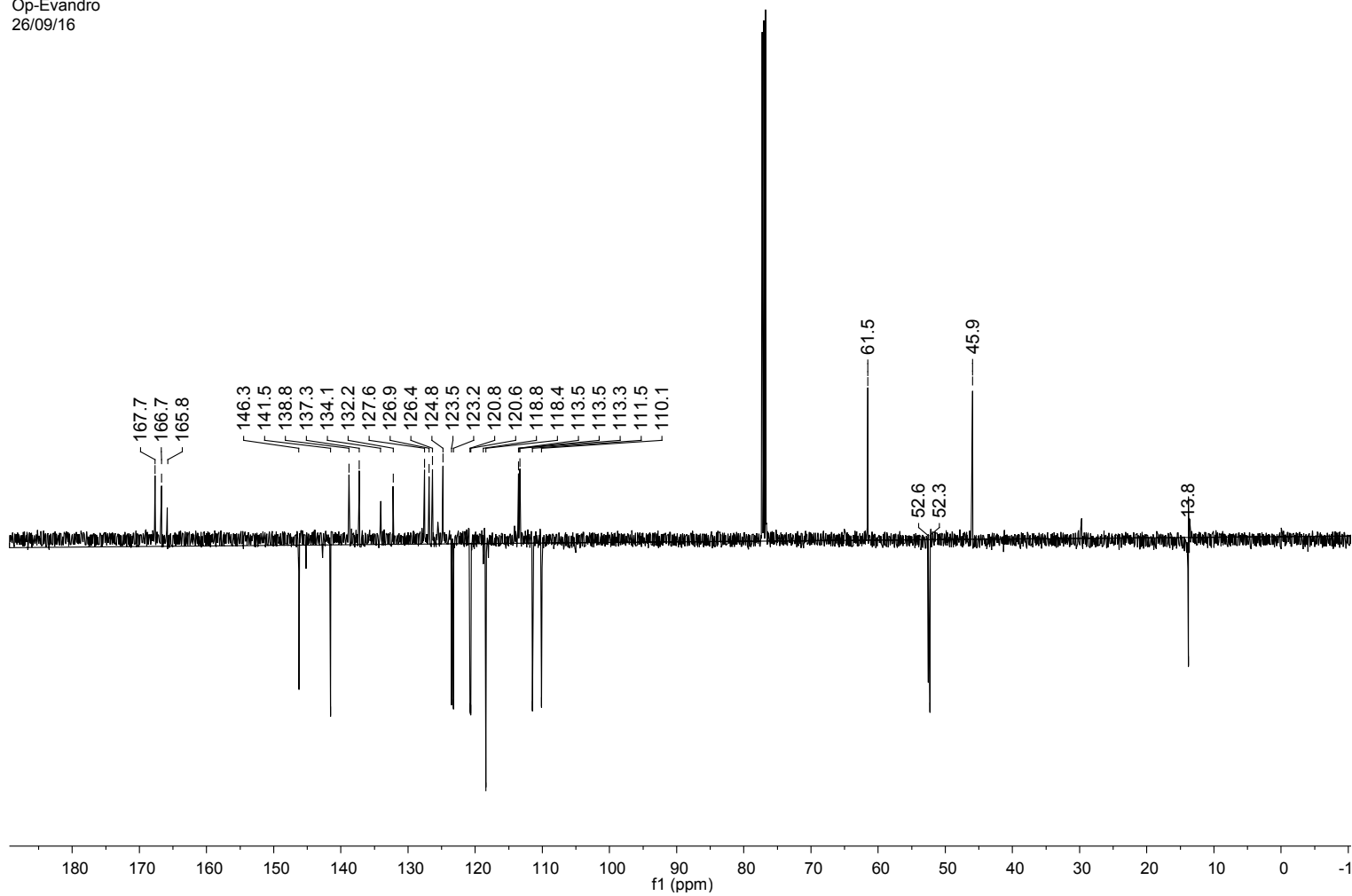


Figura 82: Expansão 1 do espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (07) (500 MHz, CDCl_3).

CLPAC-aptGisely
CLPAC-Gisely
Op-Evandro
26/09/16

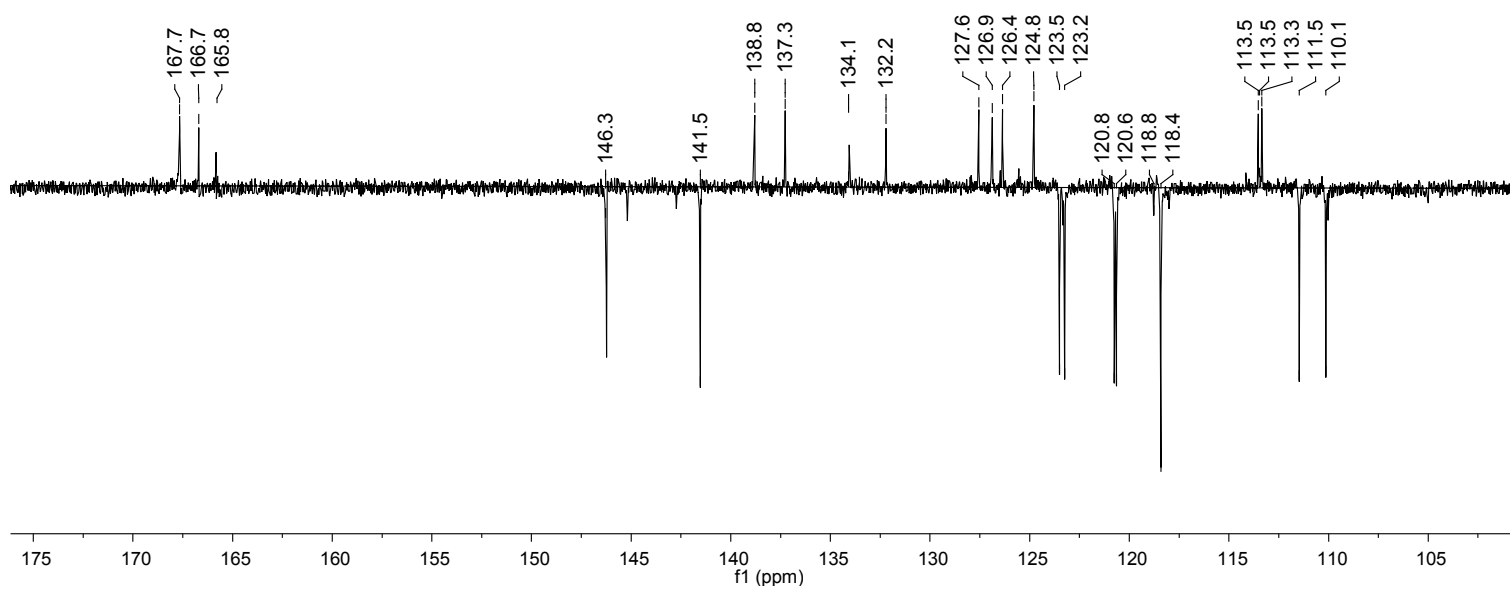


Figura 83: Expansão 2 do espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (07) (500 MHz, CDCl_3).

CLPAC-aptGisely
CLPAC-Gisely
Op-Evandro
26/09/16

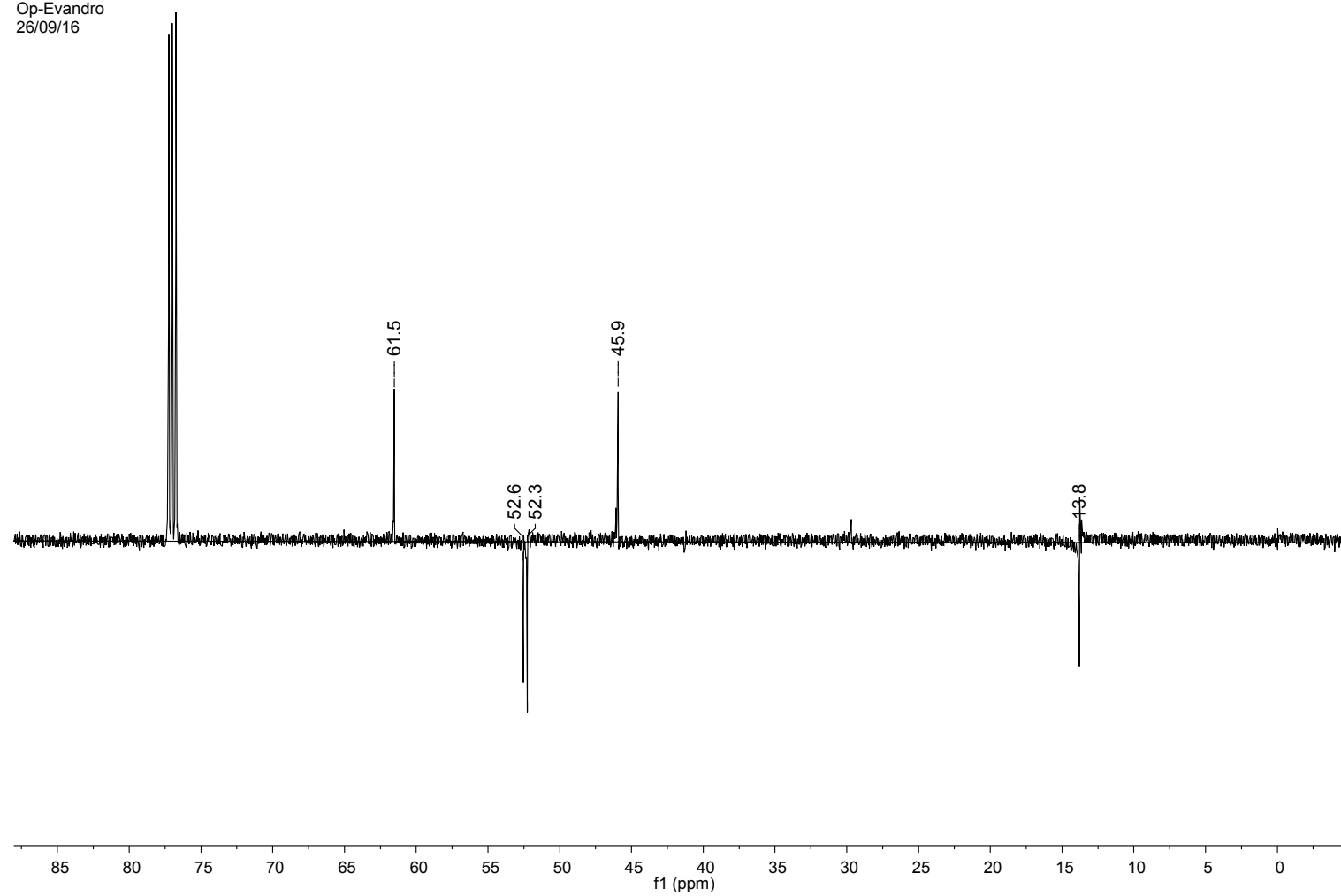


Figura 84: Espectro COSY do derivado 07 (500 MHz, CDCl_3).

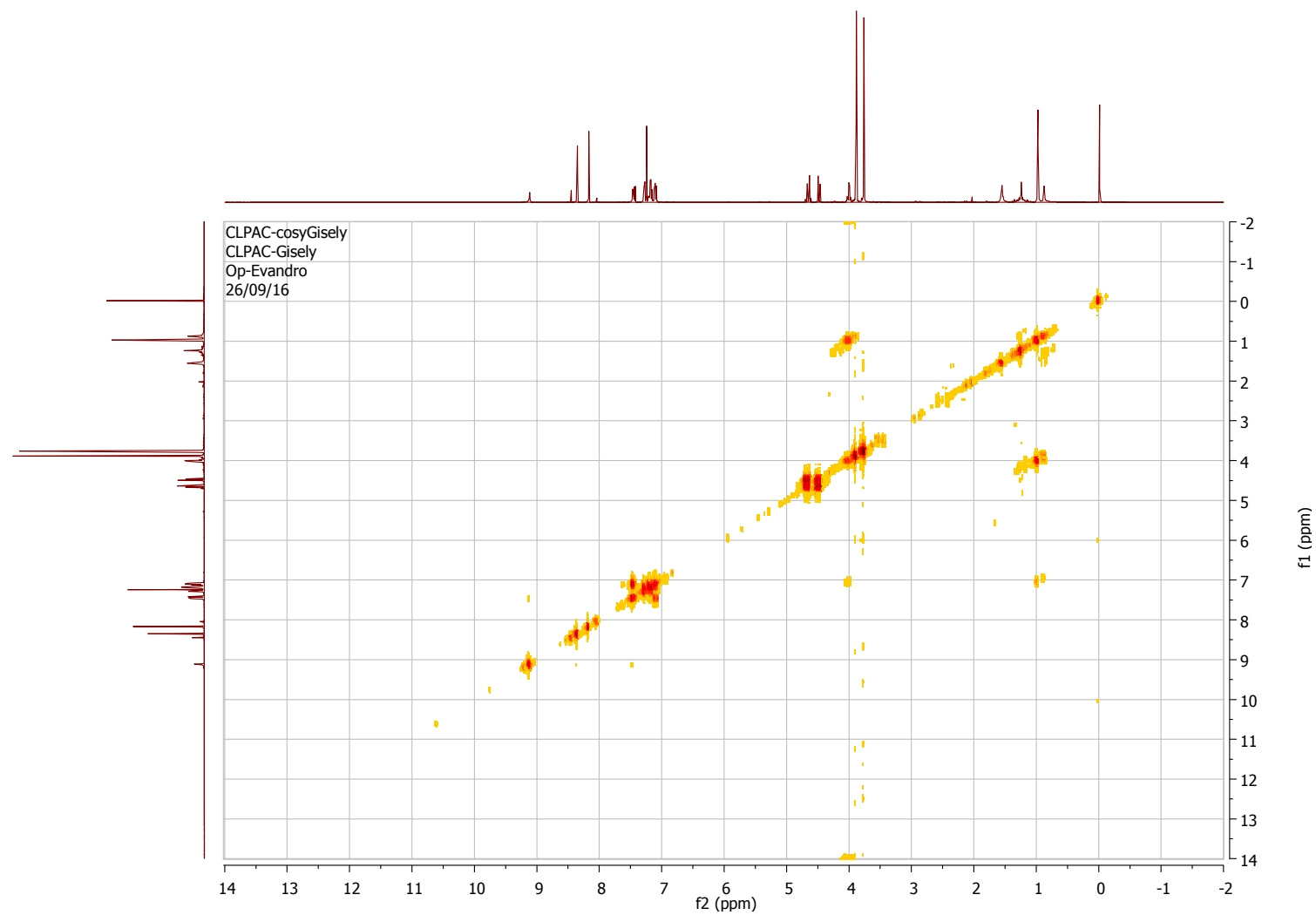


Figura 85: Espectro HMQC do derivado 07 (500 MHz, CDCl_3).

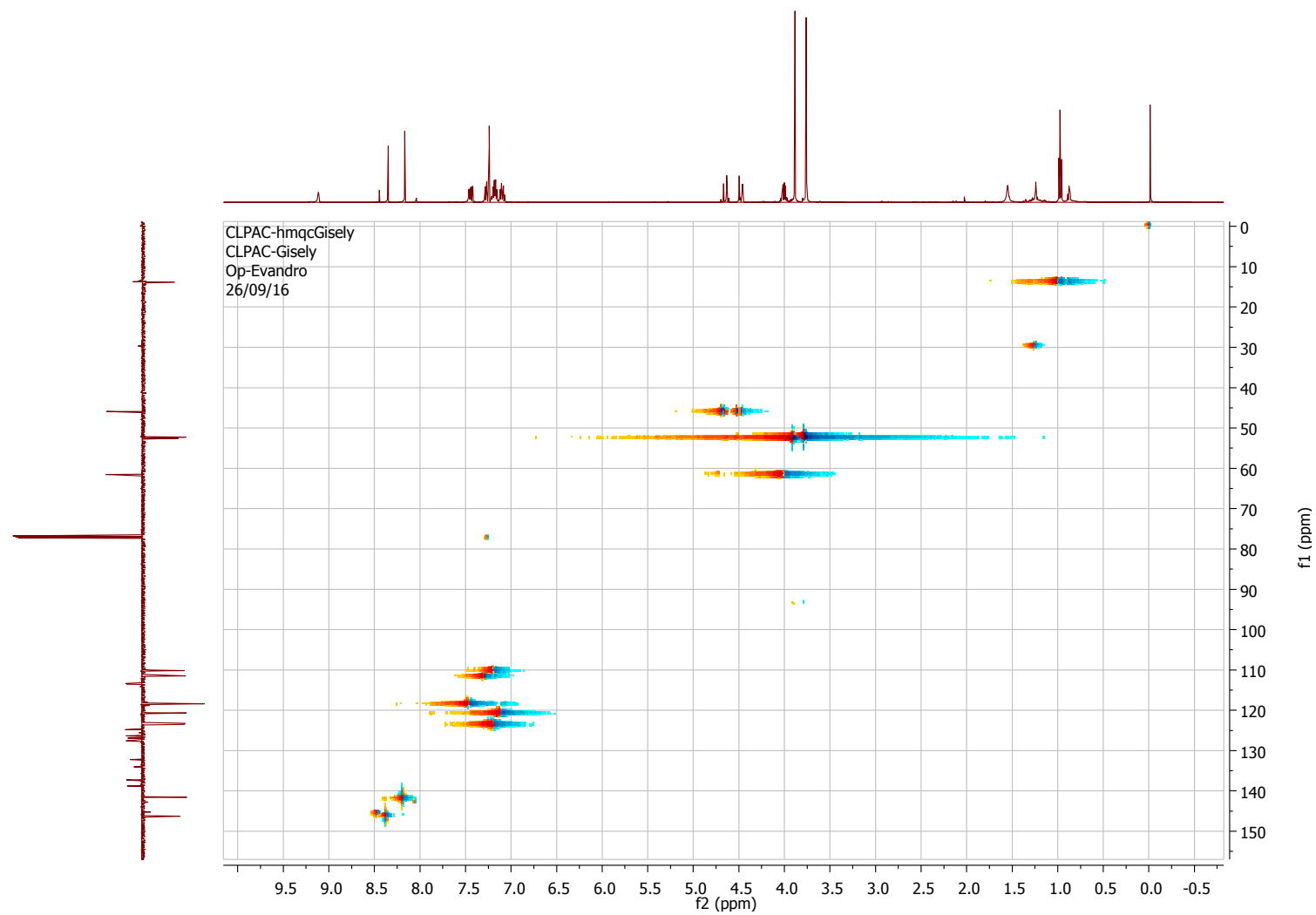
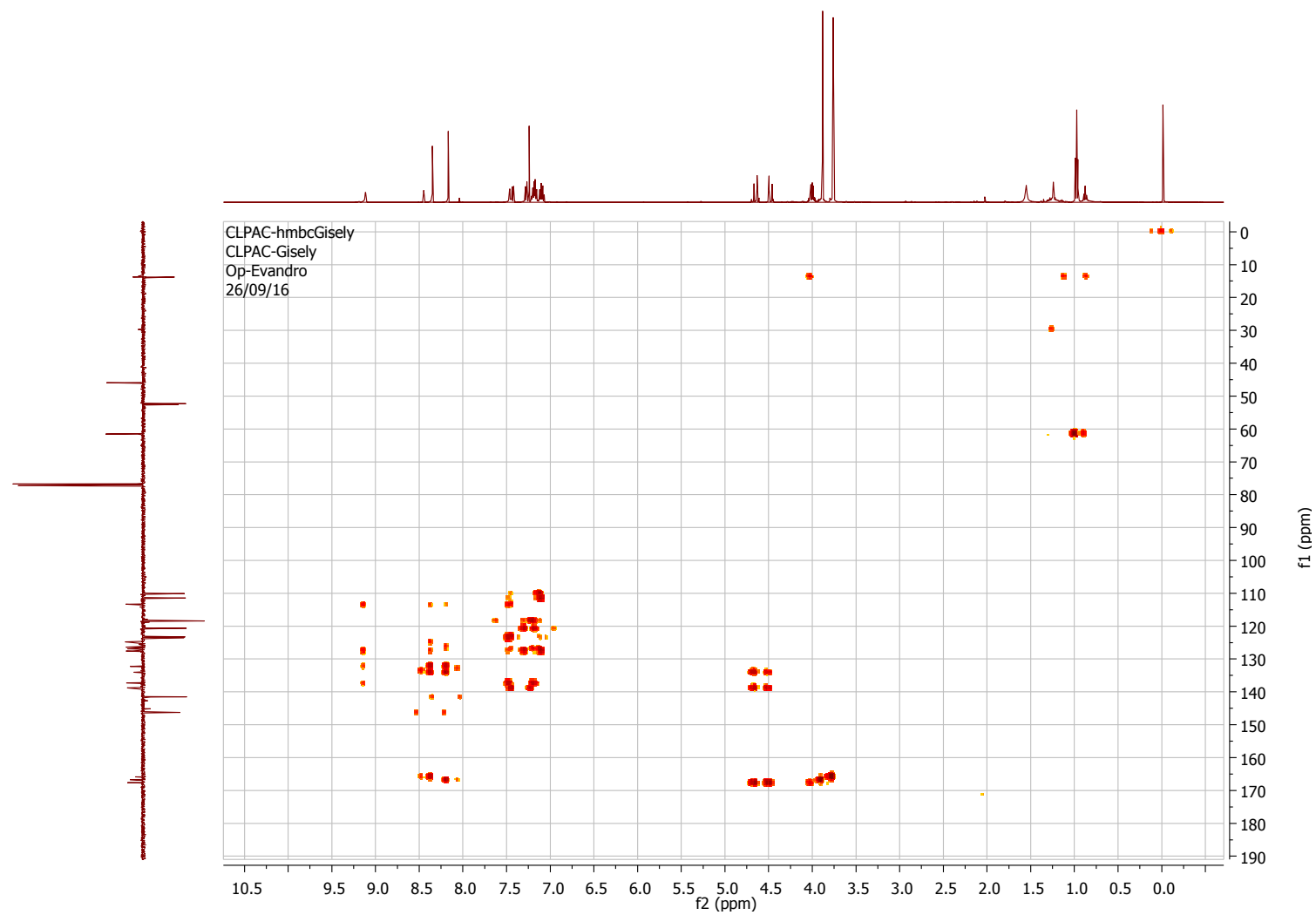
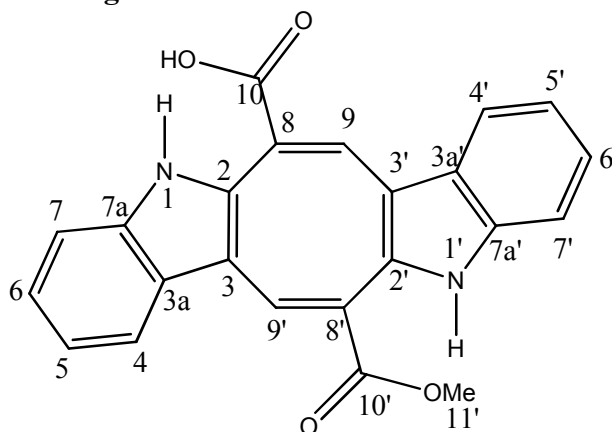


Figura 86: Espectro HMBC do derivado 07 (500 MHz, CDCl_3).



6.2.3.2.6 Monoácido da caulerpina - derivado 06 (6*E*, 13*E*)-13-(metoxicarbonyl)-5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b'] diíndol-6-ácido carboxílico)

Figura 87: Estrutura do derivado 06.



O monoácido da caulerpina (Figura 87) foi obtido como subproduto da reação preparada segundo a seguinte metodologia: foi preparada uma solução de caulerpina (0,1 mmol, 40 mg) em Dimetilformamida - DMF (2 mL), a qual foi adicionada KOH (0,4 mmol, 23 mg) e 3,4,5-trimetoxi-benzil (0,3 mmol, 65 mg). A mistura foi submetida à agitação a 50 °C. As reações foram estabilizadas após 2 horas. A extração do produto da reação foi realizada através de partição líquido-líquido utilizando-se 20 mL de H₂O e duas lavagens de 20 mL de acetato de etila. As frações orgânicas de cada reação foram adicionados excesso de sulfato de sódio anidro e seguida a filtração com papel de filtro. Afim de se obter os produtos reacionais isolados procedeu-se cromatografia em camada delgada preparativa com hexano:acetato 8:2 como sistema de eluição (ZHAO et al.,2014).

Após a aplicação das técnicas de purificação ao produto reacional obtivemos o derivado 06 com rendimento de 32,23 %.

¹H RMN (500 MHz, MeDO) δ 8,21 (s,1H); 8,17 (s,1H); 7,41 (dl, 1H); 7,30 (dl, 1H); 7,10 (dt, 1H); 7,02 (dt, 1H); 4,81 (s); 3,89 (s,3H);

¹³C RMN (500 MHz, MeDO) δ δ 168,4; 166,8; 143,9; 139,5; 139,4; 135,3; 134,01; 129,3; 129,2; 129,9; 126,9; 123,8; 121,3; 121,1; 118,9; 118,7; 113,5; 112,9; 112,7; 112,6; 53,0.

Figura 88: Espectro de RMN de ^1H do derivado (06) (500 MHz, MeOD).

CLPBS_1hGisely
CLPBS_Gisely
Op Alexandro
07/02/2017

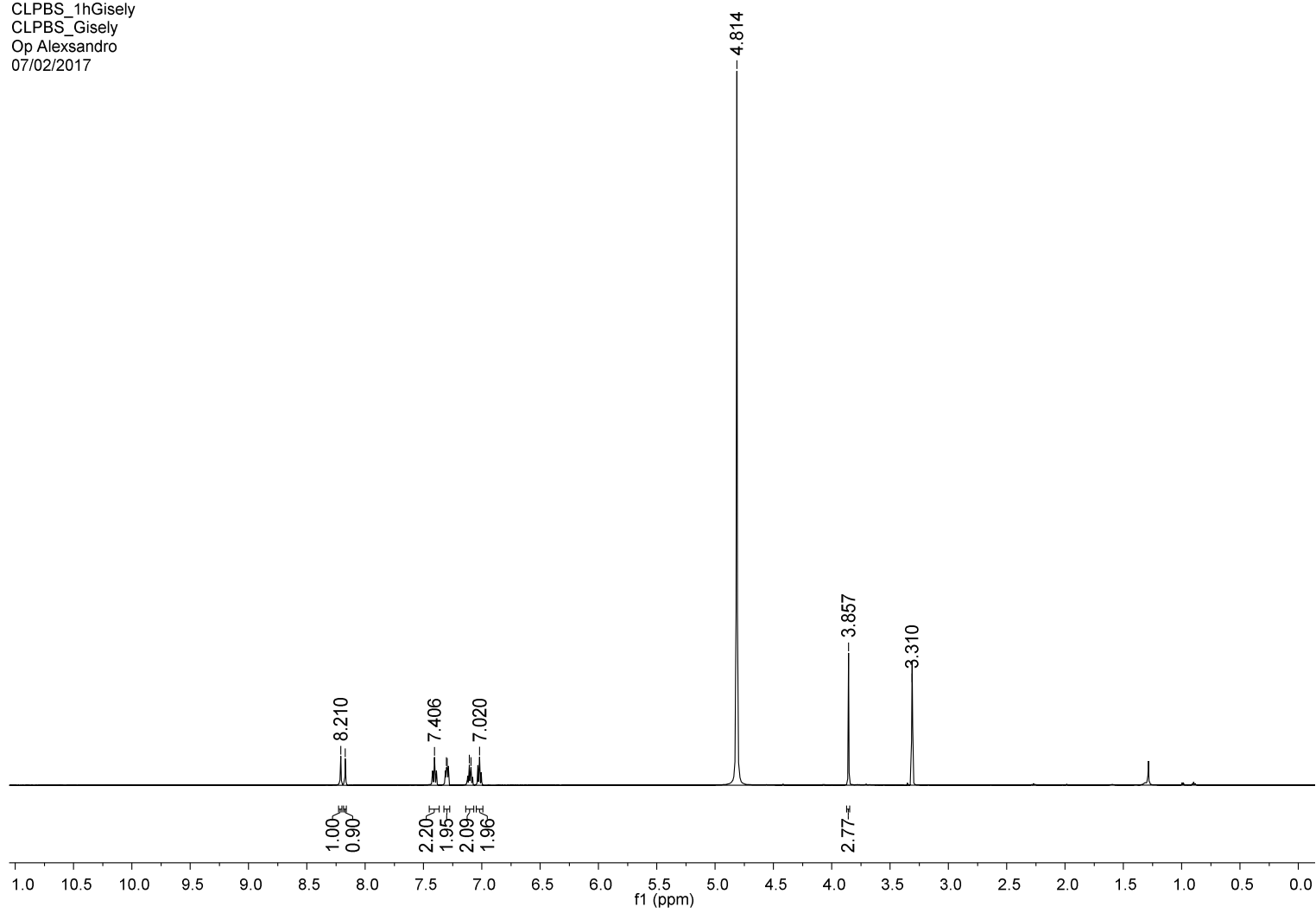


Figura 89: Espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (06) (500 MHz, MeOD).

CLPBS_apGisely
CLPBS_Gisely
Op Alexandro
07/02/2017

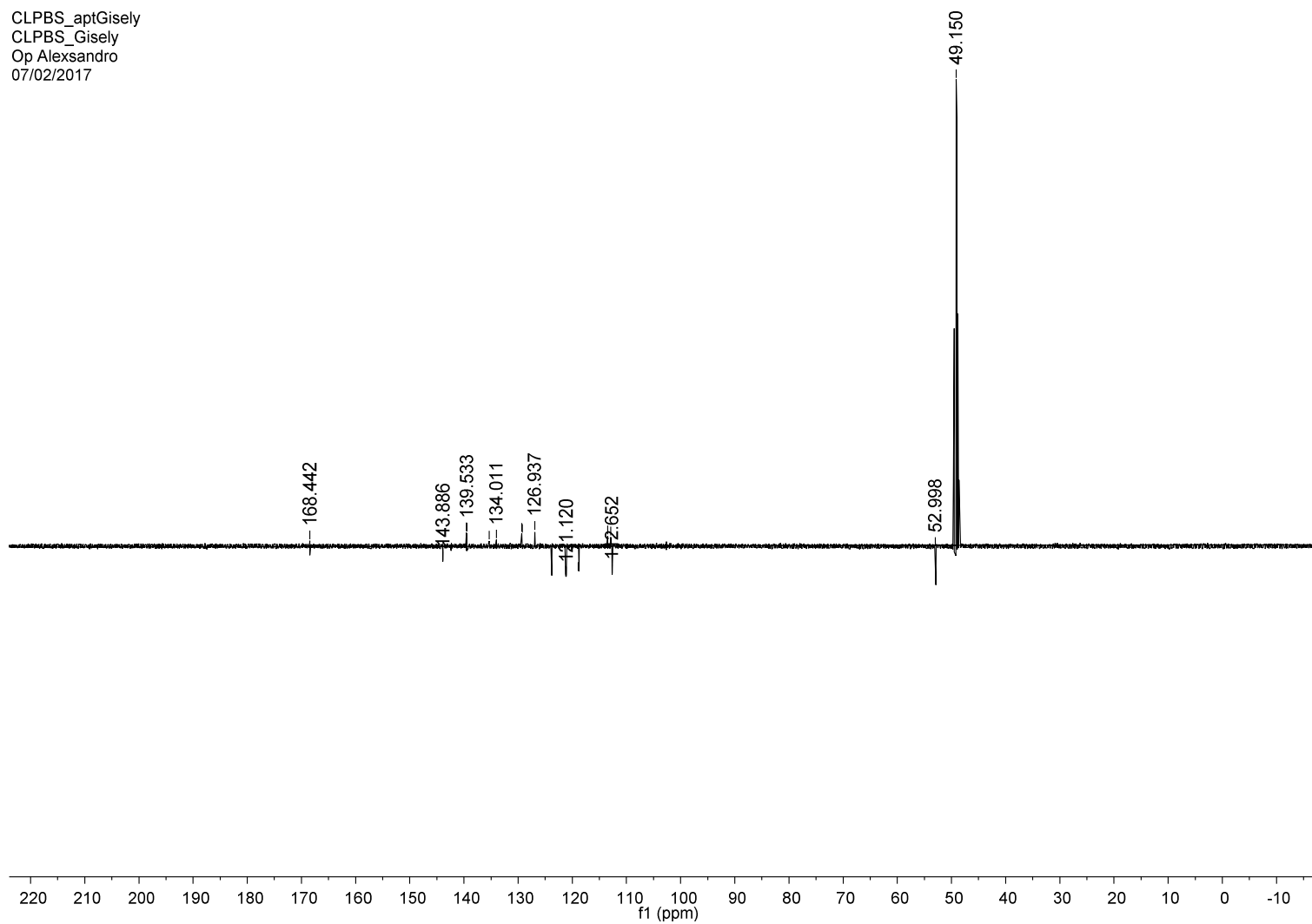


Figura 90: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (06) (500 MHz, MeOD).

CLPBS_apGisely
CLPBS_Gisely
Op Alexandro
07/02/2017

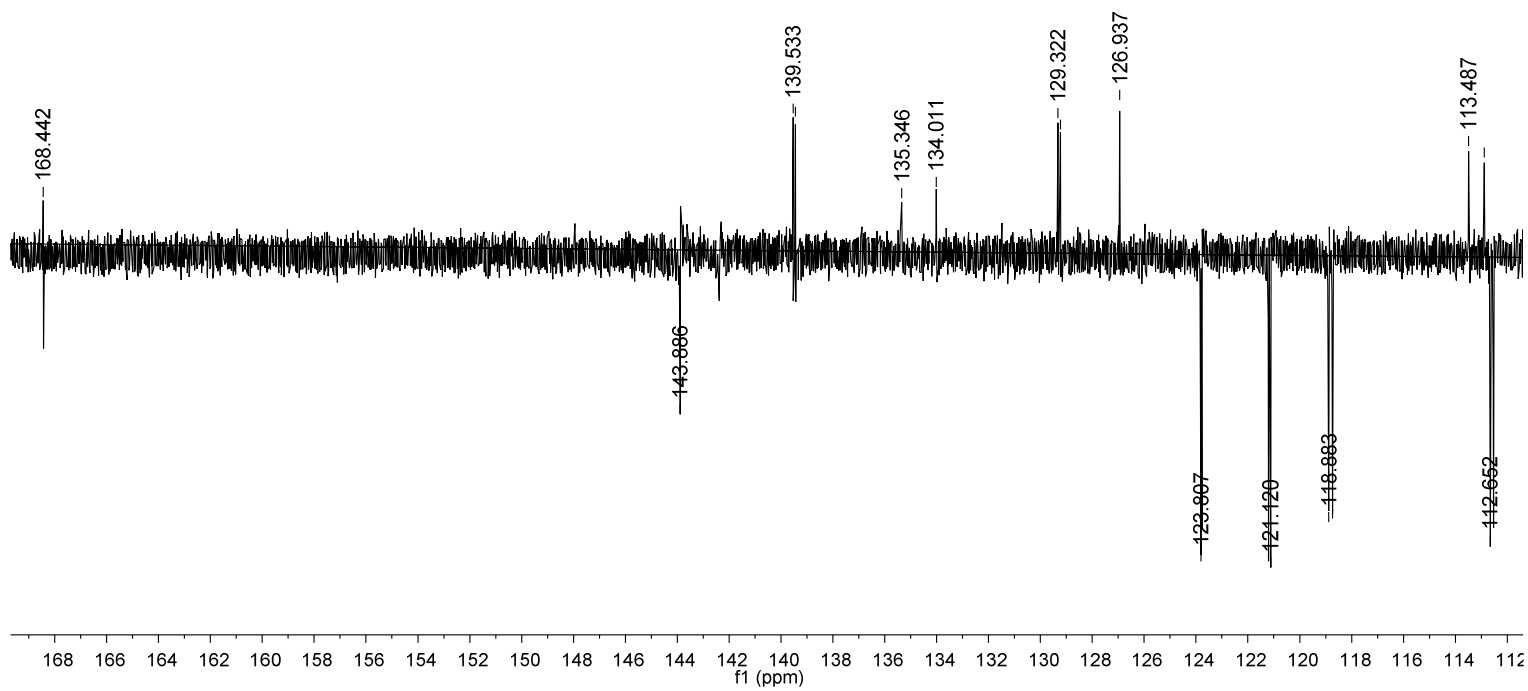
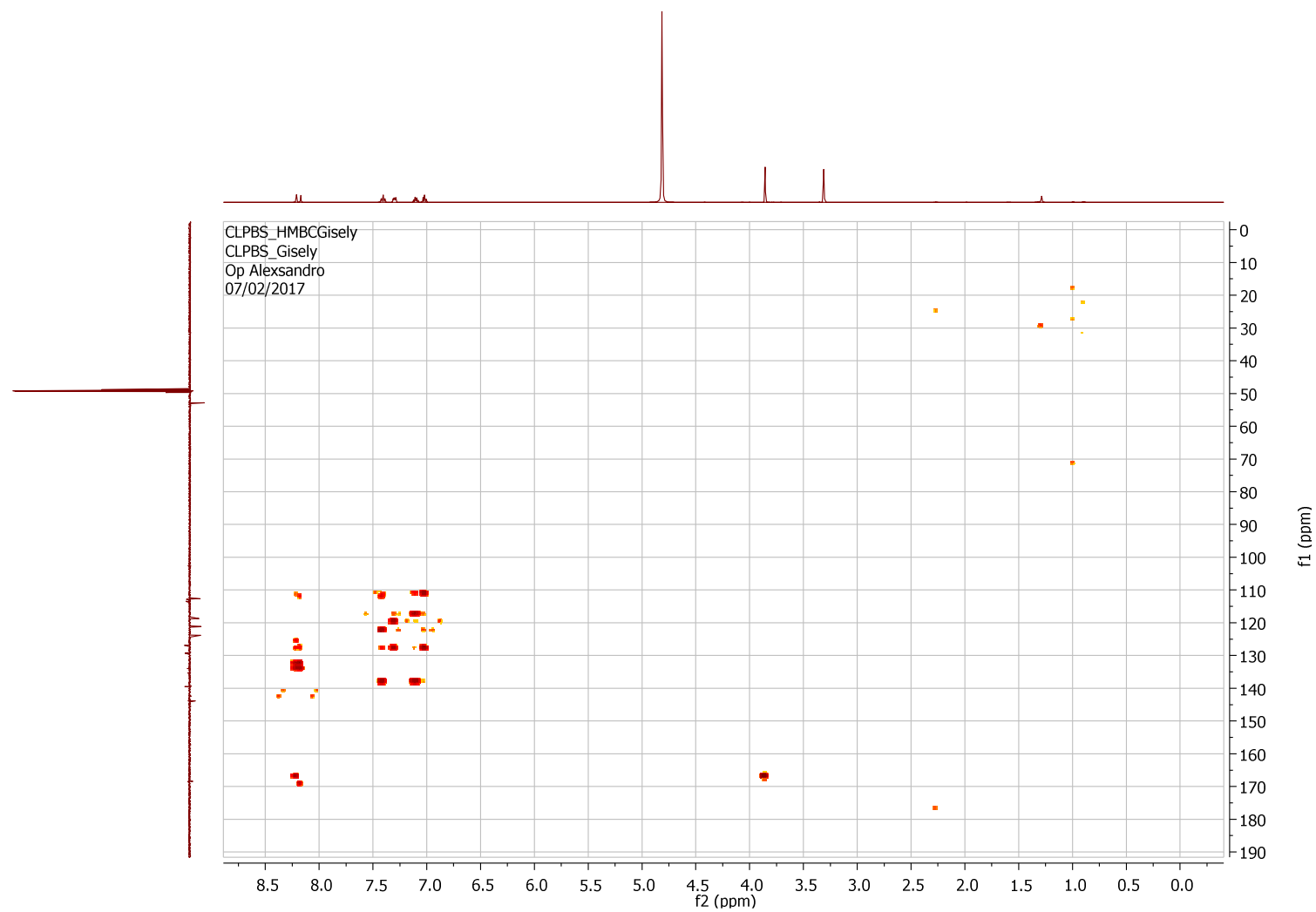


Figura 91: Espectro HMBC do derivado 06 (500 MHz, MeOD).



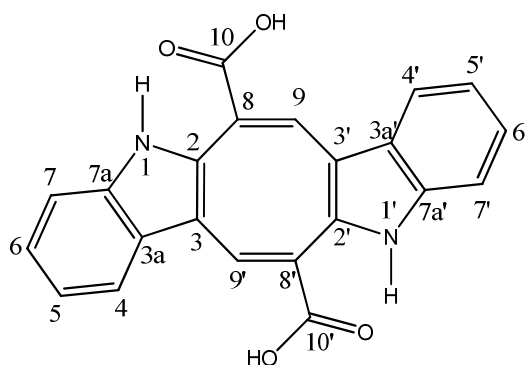
6.2.3.3.3 Ácido caulerpínico e ácidos das caulerpina *N*- substituídas

Metodologia geral para a obtenção dos derivados ácidos: os ácidos da caulerpina e das caulerpinas *N*-substituídas foram obtidos utilizando a metodologia proposta por Amarante et al. (2011), a qual descreve que deve-se preparar uma solução de caulerpina (0,1 mmol, 40 mg), caulerpina *N*-substituídas (caulerpina *N*-etil (0,094 mmol, 40 mg), caulerpina *N*-alil (0,091 mmol, 40 mg), caulerpina *N*-propargil (0,092 mmol, 40 mg), caulerpina *N*-benzil (0,081 mmol, 40 mg)) em acetonitrila:H₂O 8:2 (10 mL) e adiciona-se KOH (1,43 mmol, 80 mg para a caulerpina, caulerpina *N*-etil, *N*-alil e *N*-propargil) e KOH (1,29 mmol, 72,37 mg para a caulerpina *N*-benzil. Cada mistura foi submetida a agitação a 70 °C sob refluxo. As reações foram estabilizadas após 2 horas. Após a evaporação do solvente em rotaevaporado, procedeu-se a extração dos produtos da reação através de partição líquido-líquido utilizando-se 20 mL de HCl 1 mol. L⁻¹ e duas lavagens de 20mL de acetato de etila. As frações orgânicas de cada reação foram adicionados excesso de sulfato de sódio anidro e seguida a filtração com papel de filtro. Afim de se obter os produtos reacionais isolados procedeu-se cromatografia em camada delgada preparativa com MeOH:CH₂Cl₂ 1:1 como sistema de eluição. Durante a extração dos produtos isolados da sílica utilizada na CCDP foi utilizado CH₂Cl₂ : MeOH : ácido fórmico 90:9:1.

As moléculas isoladas resultantes destas reações apresentaram os seguintes rendimento: derivado 08 (Figura 92), 79% derivado 09 (Figura 96), 58,8%, derivado 10 (Figura 100), 76%, derivado 11 (Figura 105), 64,86% e derivado 12 (Figura, 110), 50,63%.

6.2.3.3.1 Ácido caulerpínico – Derivados 08 (6E, 13E)-5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-b'] diindol-6,13-ácido dicarboxílico)

Figura 92: Estrutura no derivado 08.



IV (KBr, $n_{\max}$): 3408, 3058, 3035, 2968, 2924, 2620, 2503, 1650, 1611, 1406, 1385, 1259, 1238, 1150, 7017, 755, 723, 611, 548 cm^{-1} .

^1H RMN (200 MHz, MeOD) δ 8,21 (s, 1H); 7,37 (dl, 1H); 7,28 (dl, 1H); 7,08 (dt, 1H); 7,01 (dt, 1H); 4,90 (s).

^{13}C RMN (200 MHz, MeOD) δ 169,3; 143,7; 139,1; 134,3; 128,9; 127,3; 123,6; 120,8; 118,4; 112,7; 112,2.

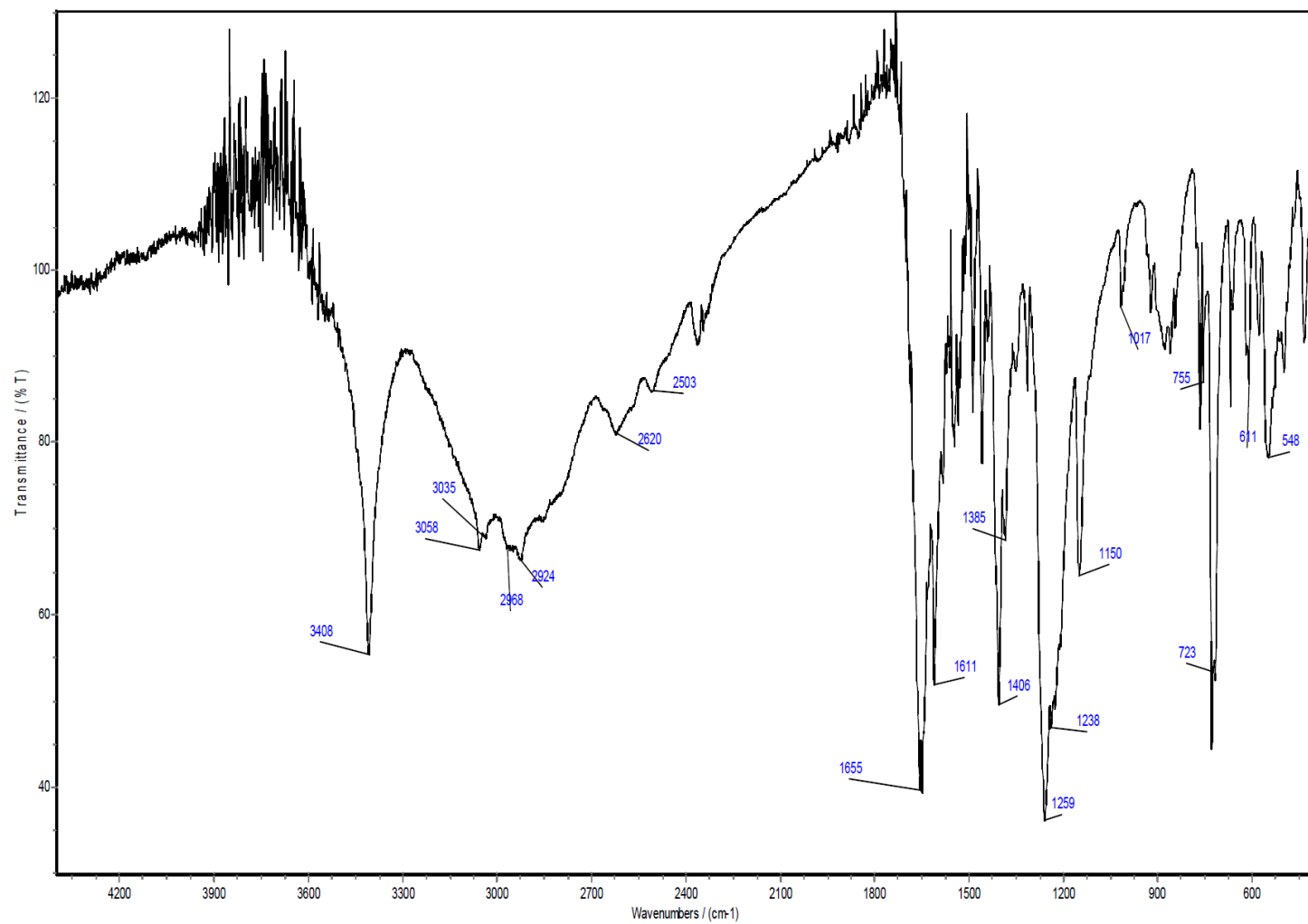
Figura 93: Espectro IV do derivado 08.

Figura 94: Espectro de RMN de ^1H do derivado (08) (200 MHz, MeOD).

Acido-1hJessica
Acido-Jessica
Op.Evandro
16/03/15

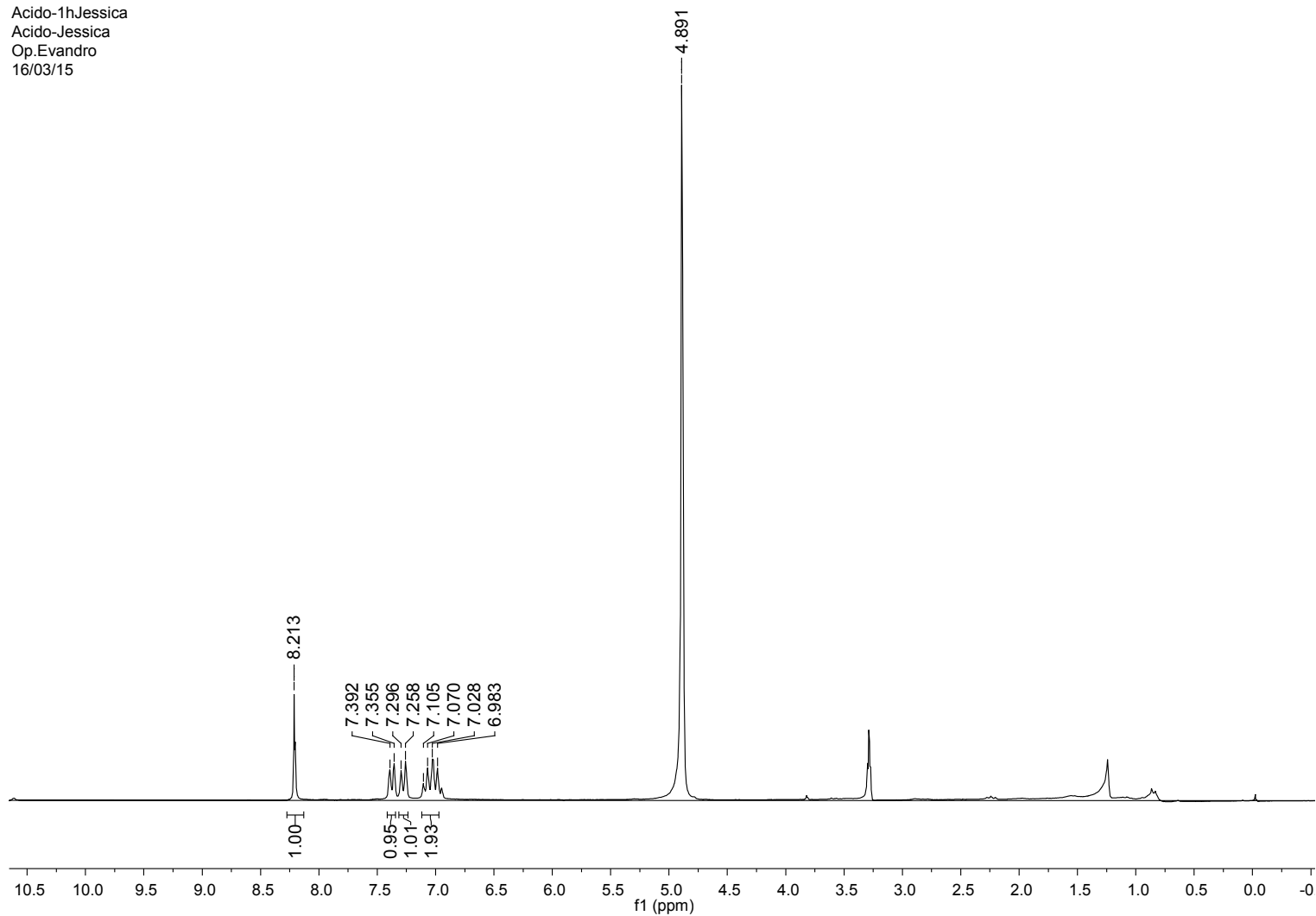
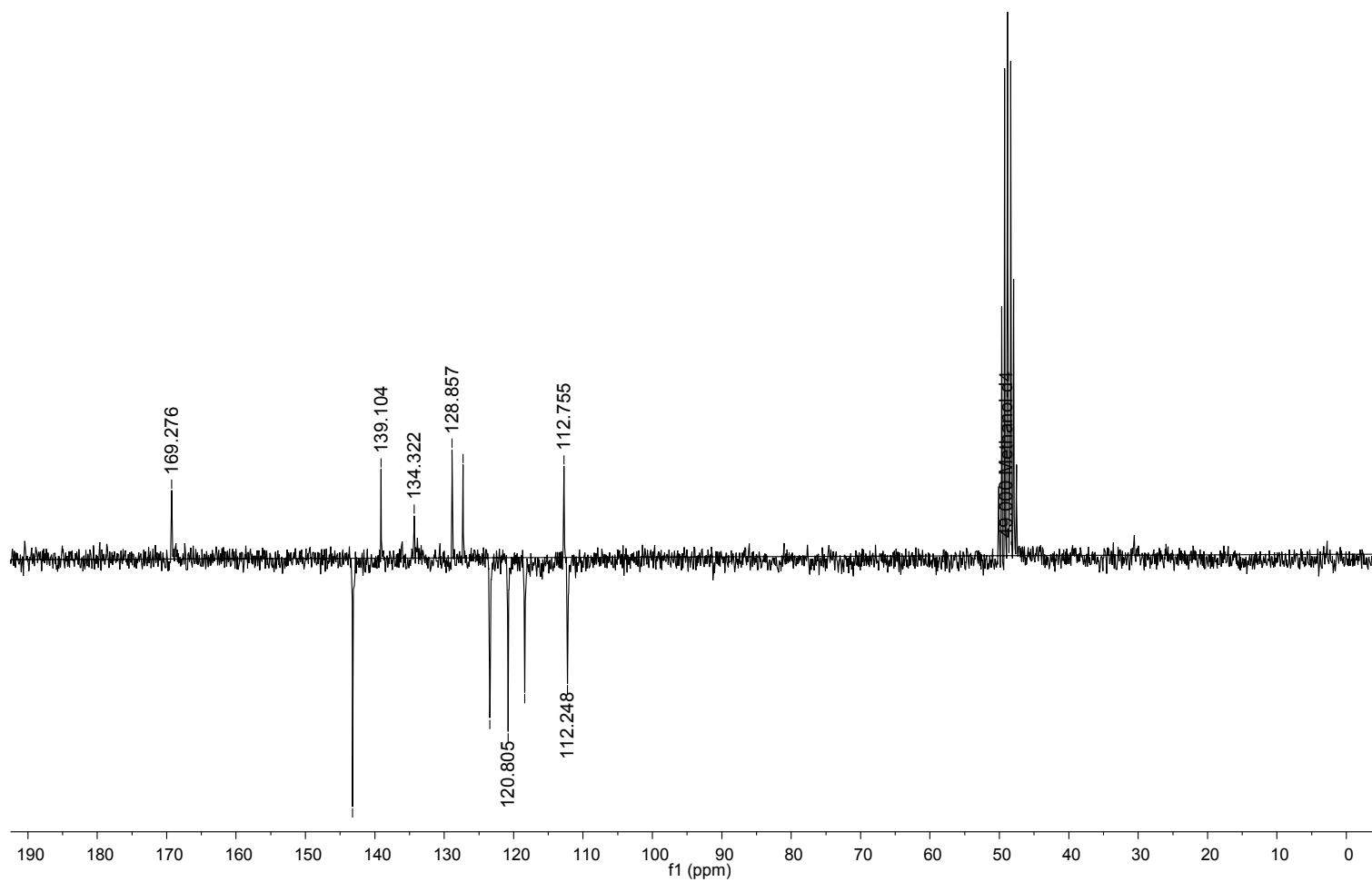


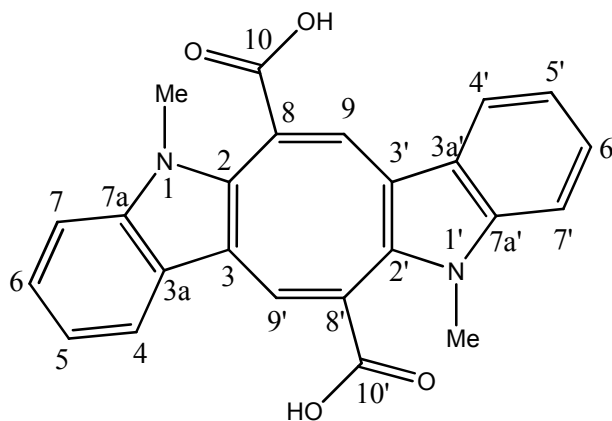
Figura 95: Espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (08) (200 MHz, MeOD).

Acido-aptJessica
Acido-Jessica
Op.Evandro
16/03/15



6.2.3.3.2 Ácido caulerpina *N*-metil – Derivados 09 (6*E*, 13*E*)-5,12- dimetil- 5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-*b'*] diíndol-6,13-ácido dicarboxílico)

Figura 96: Estrutura no derivado 09.



IV (KBr, $n_{\max}$): 3416, 3050, 2940, 1885, 1880, 1624, 1554, 1488, 1376, 1317, 1250, 1221, 1220, 1129, 1110, 930, 844, 742, 730, 701, 662 cm^{-1} .

^1H RMN (200 MHz, MeOD) δ 8,33 (s, 1H); 7,49 (dl, 1H); 7,40 (dl, 1H); 7,20 (dt, 1H); 7,09 (dt, 1H); 3,45 (s).

^{13}C RMN (200 MHz, MeOD) δ 175,9; 152,0; 147,5; 144,3; 135,9; 135,3; 132,1; 129,7; 127,8; 121,5; 119,9; 40,2.

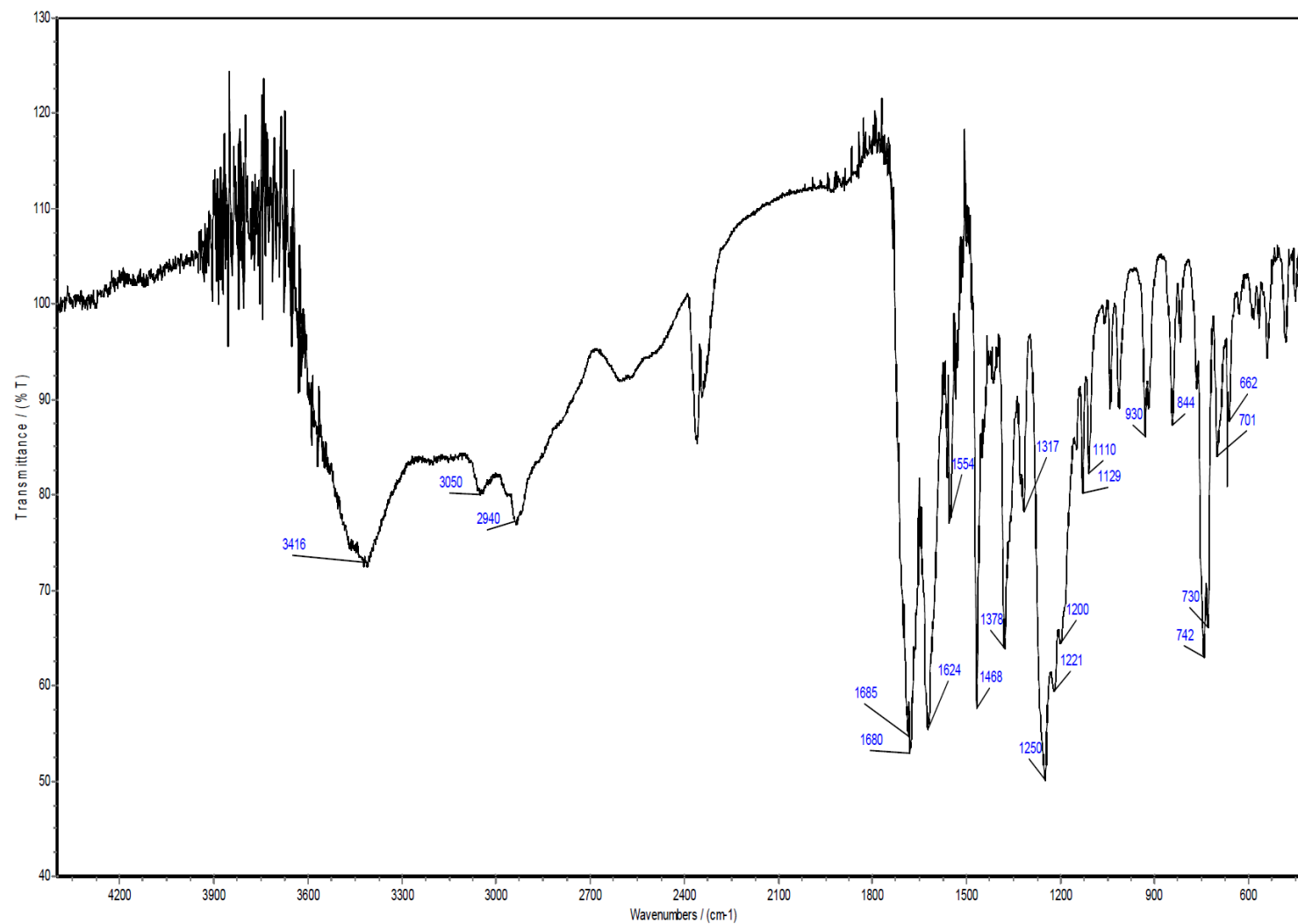
Figura 97: Espectro IV da derivado 09.

Figura 98: Espectro de RMN de ^1H do derivado (09) (200 MHz, MeOD).

ACLPM-1hGisely
ACLPM-Gisely
Op-Evandro
19/08/15

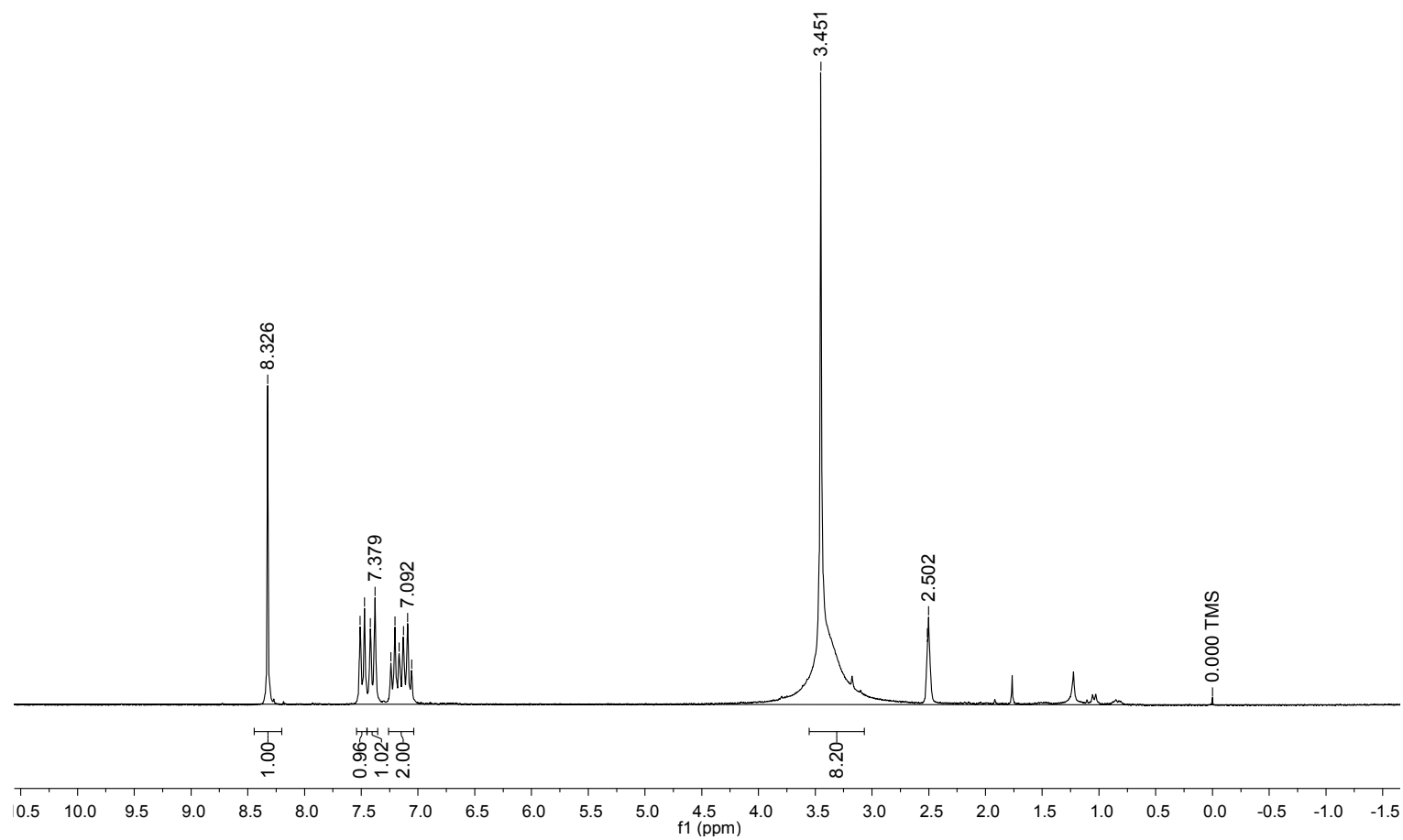
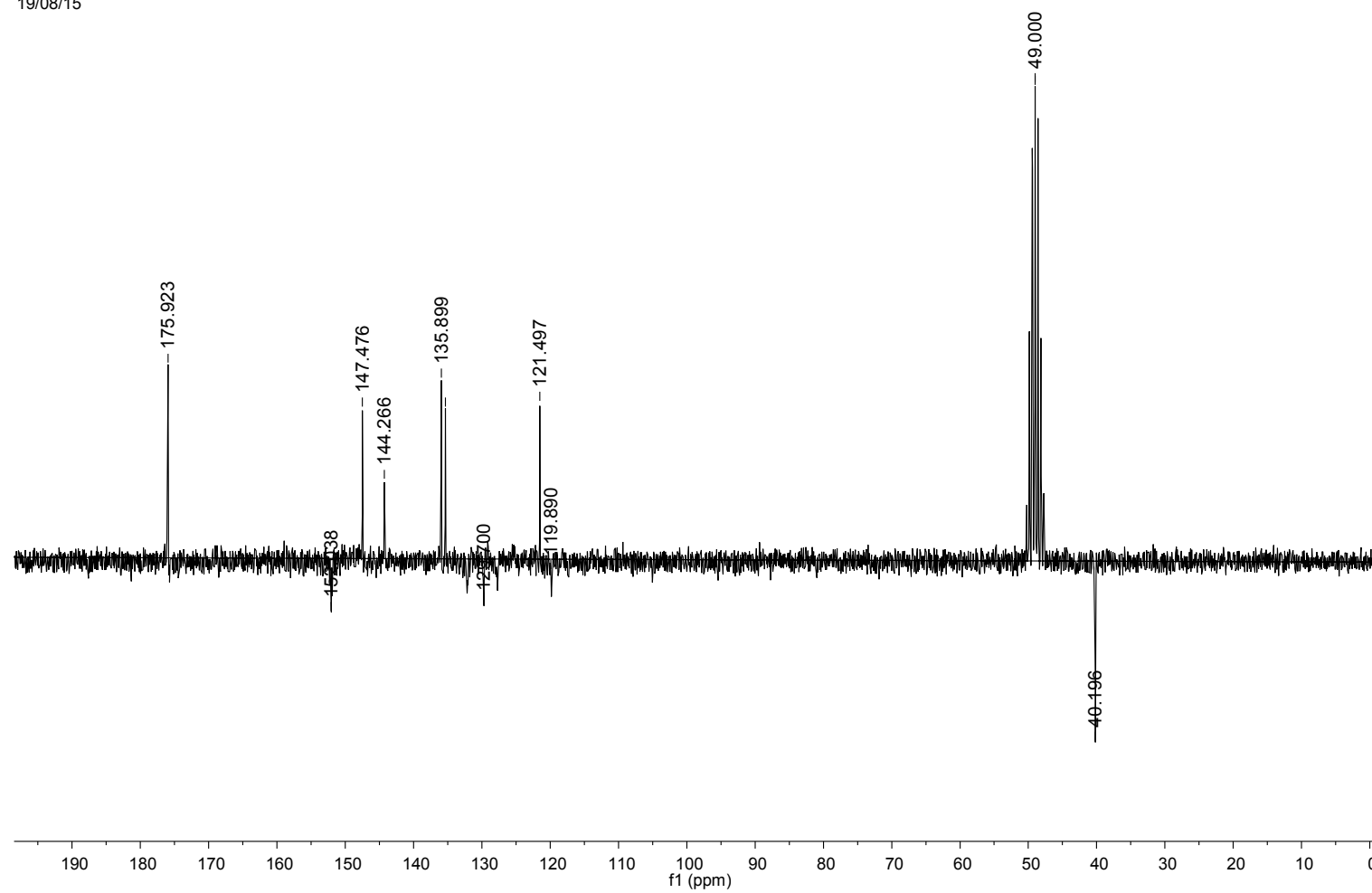


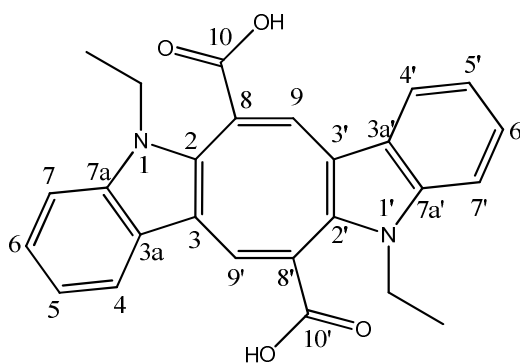
Figura 99: Espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (09) (200 MHz, MeOD).

ACLPM-aptGisely
ACLPM-Gisely
Op-Evandro
19/08/15



6.2.3.3.3 Ácido caulerpina *N*-etil – Derivados 10 (6*E*, 13*E*)-5,12- dietil- 5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-*b'*] diindol-6,13-ácido dicarboxílico)

Figura 100: Estrutura no derivado 10.



IV (KBr, $n_{\max}$): 3411, 3125, 3057, 2975, 2933, 2595, 1704, 1676, 1629, 1618, 1550, 1460, 1383, 1371, 1355, 1232, 1212, 1132, 747, 730, 700, 687, 536 cm^{-1} .

^1H RMN (200 MHz, CD_3OD) δ 8,41 (s, 1H); 7,45 (dl, 1H); 7,28 (dl, 1H); 7,15 (dt, 1H); 7,01 (dt, 1H); 4,95 (s); 4,06 (m, 1H); 3,87 (m, 1H); 1,07 (t, 3H).

^{13}C RMN (200 MHz, CD_3OD) δ 168,2; 144,1; 136,7; 135,3; 128,0; 126,6; 124,0; 123,6; 121,1; 119,1; 114,4; 111,0; 40,0; 15,1.

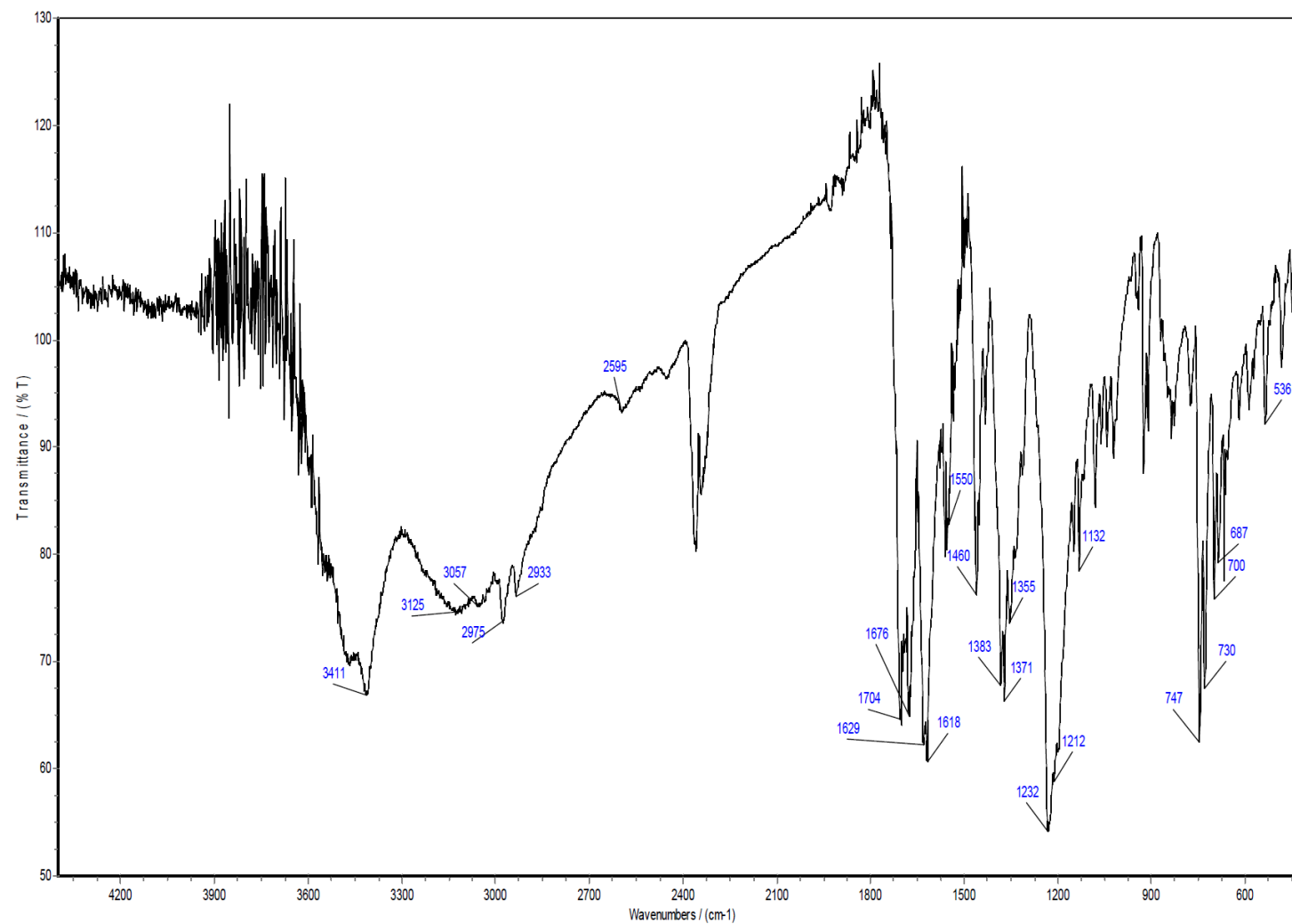
Figura 101: Espectro IV do derivado 10.

Figura 102: Espectro de RMN de ^1H do derivado (10) (200 MHz, MeOD).

ACL P-N-Et-1hGisely
ACL P-N-Et-Gisely
Op-Evandro
19/06/16

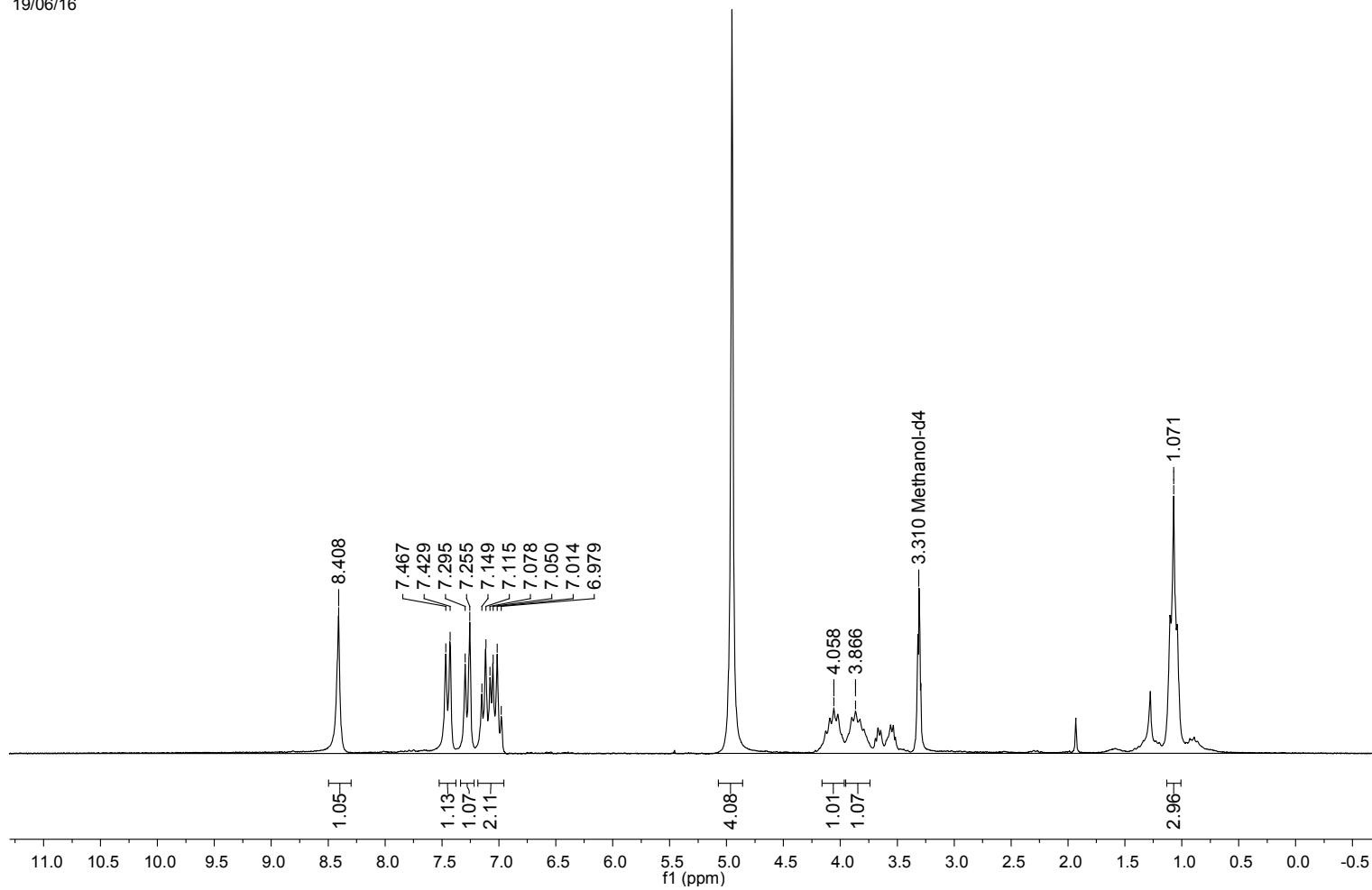


Figura 103: Espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (10) (200 MHz, MeOD).

ACL P-N-Et-aptGisely
ACL P-N-Et-Gisely
Op-Evandro
19/06/16

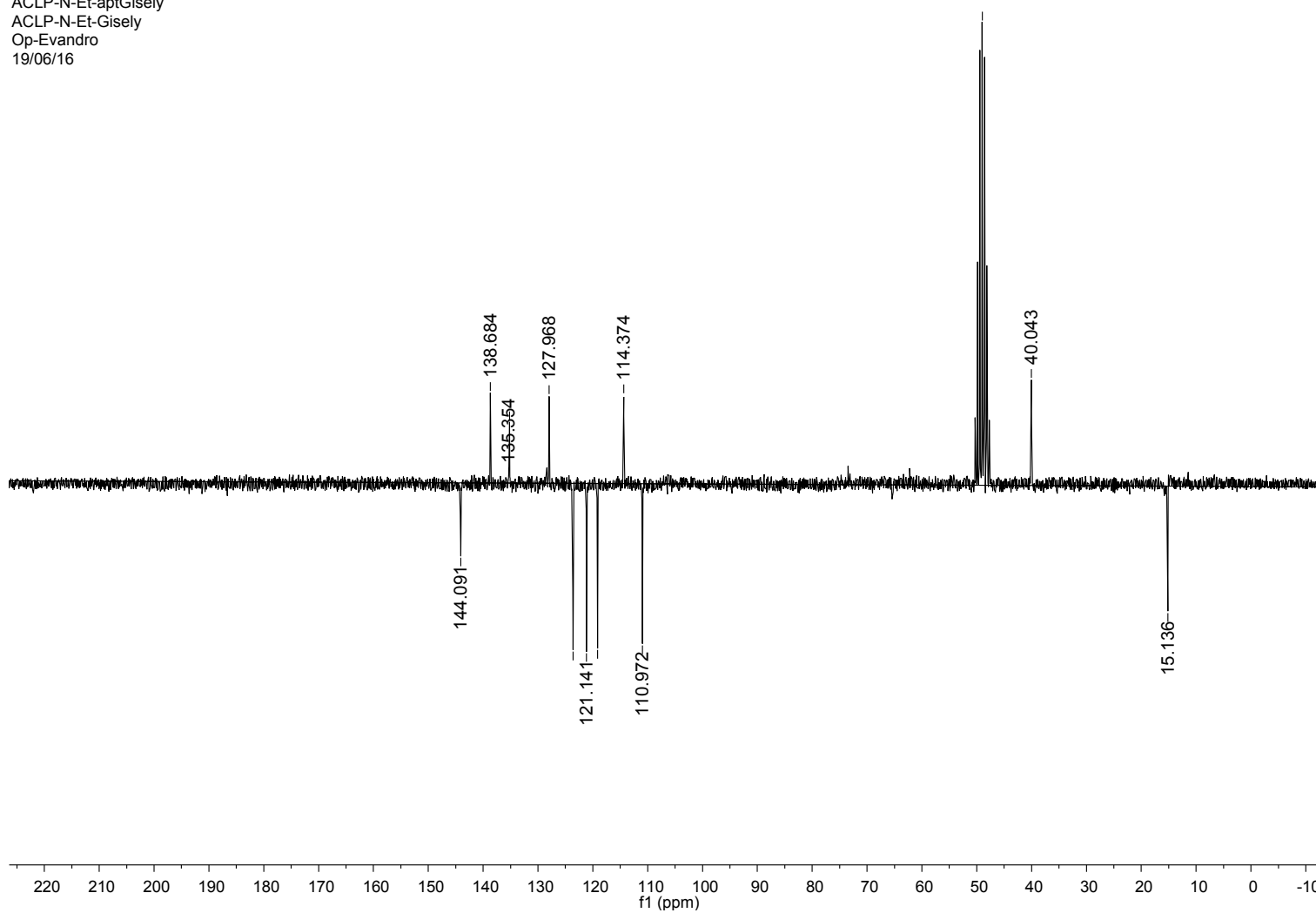
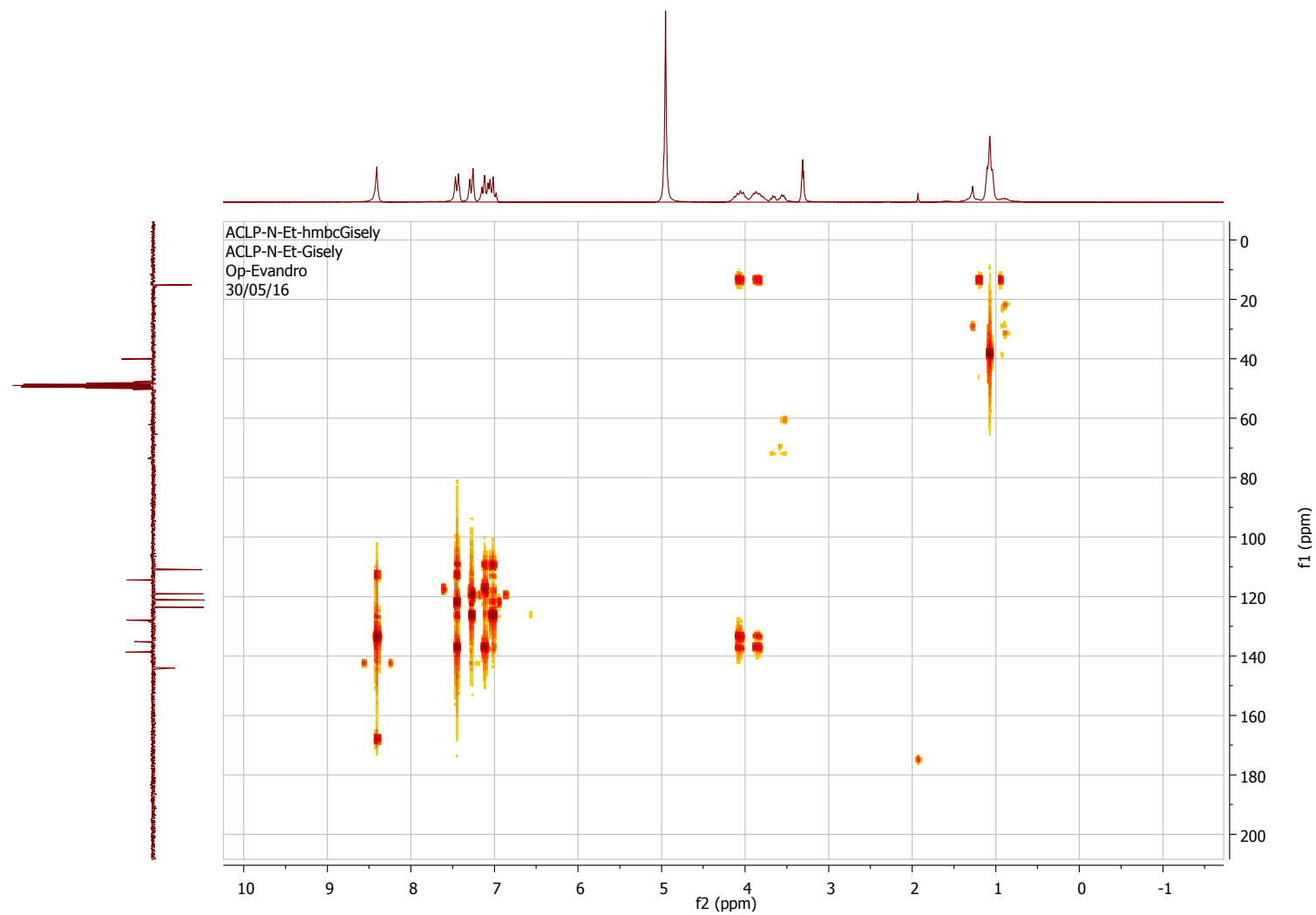
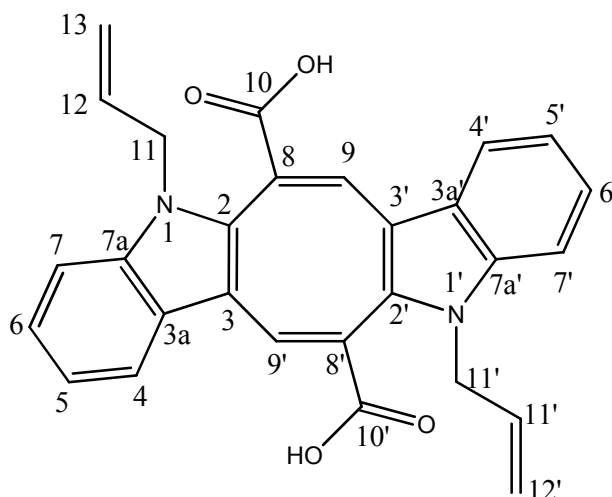


Figura 104: Espectro de HMBC do derivado (10) (500 MHz, MeOD).



6.2.3.3.4 Ácido caulerpina *N*-alil – Derivados 11 (6*E*, 13*E*)-5,12- dialil- 5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-*b'*] diindol-6,13-ácido dicarboxílico)

Figura 105: Estrutura no derivado 11.



IV (KBr, $n_{\max}$): 3468, 3412, 3077, 3056, 2980, 2927, 1690, 1677, 1619, 1461, 1384, 1265, 1237, 1199, 1014, 990, 921, 833, 822, 738, 662 cm^{-1} .

^1H RMN (200 MHz, MeOD) δ 8,40 (s, 1H); 7,43 (dl, 1H); 7,26 (dl, 1H); 7,15 (dt, 1H); 7,07 (dt, 1H); 5,70 (m, 1H); 4,93 (s); 4,57 (m, 2H).

^{13}C RMN (200 MHz, MeOD) δ 169,2; 144,5; 139,3; 135,6; 134,4; 128,4; 127,5; 115,0; 111,5; 47,4.

Figura 106: Espectro IV do derivado 11.

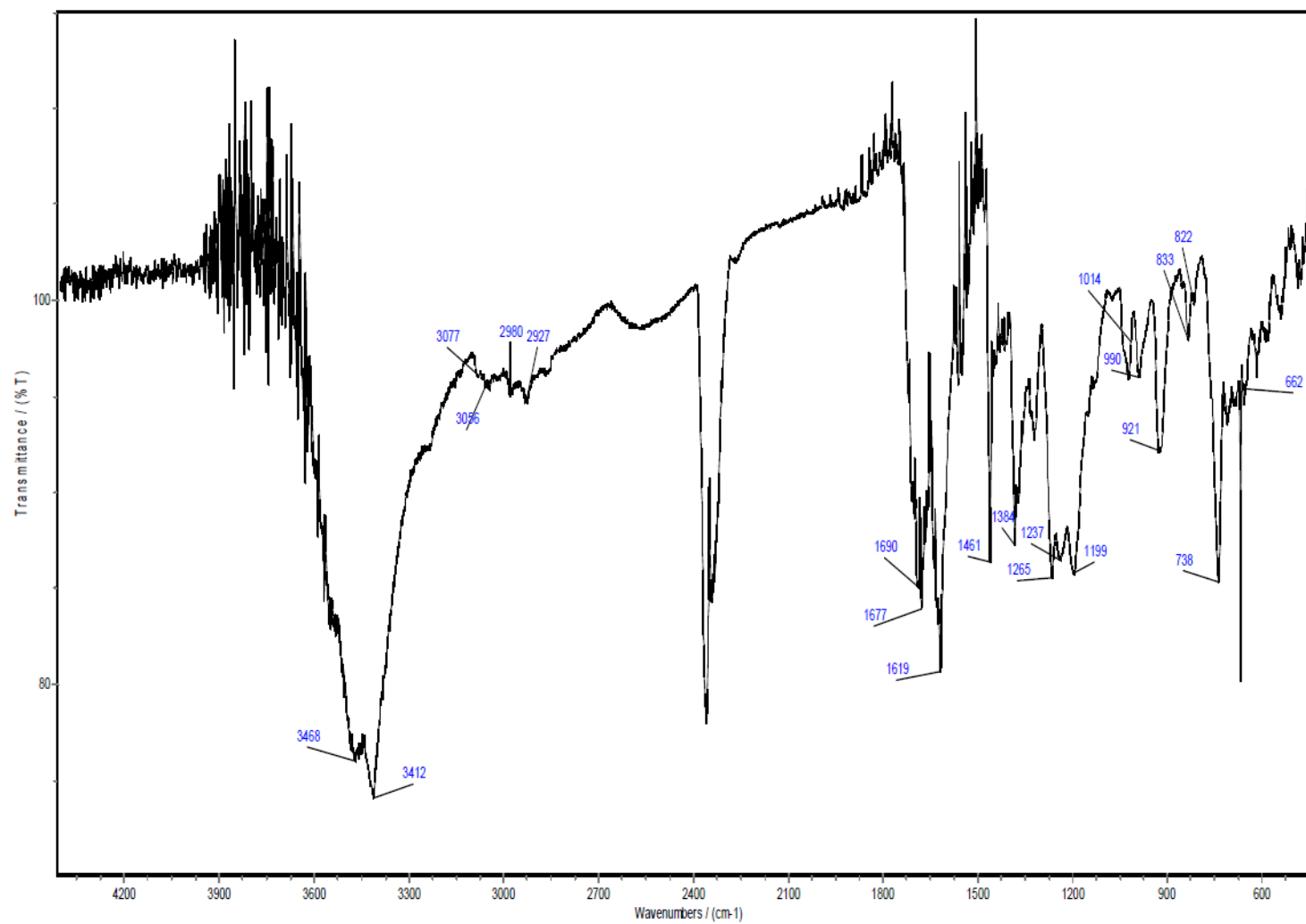


Figura 107: Espectro de RMN de ^1H do derivado (11) (200 MHz, MeOD).

ACLPA-1hGisely
ACLPA-Gisely
Op-Evandro
30/06/16

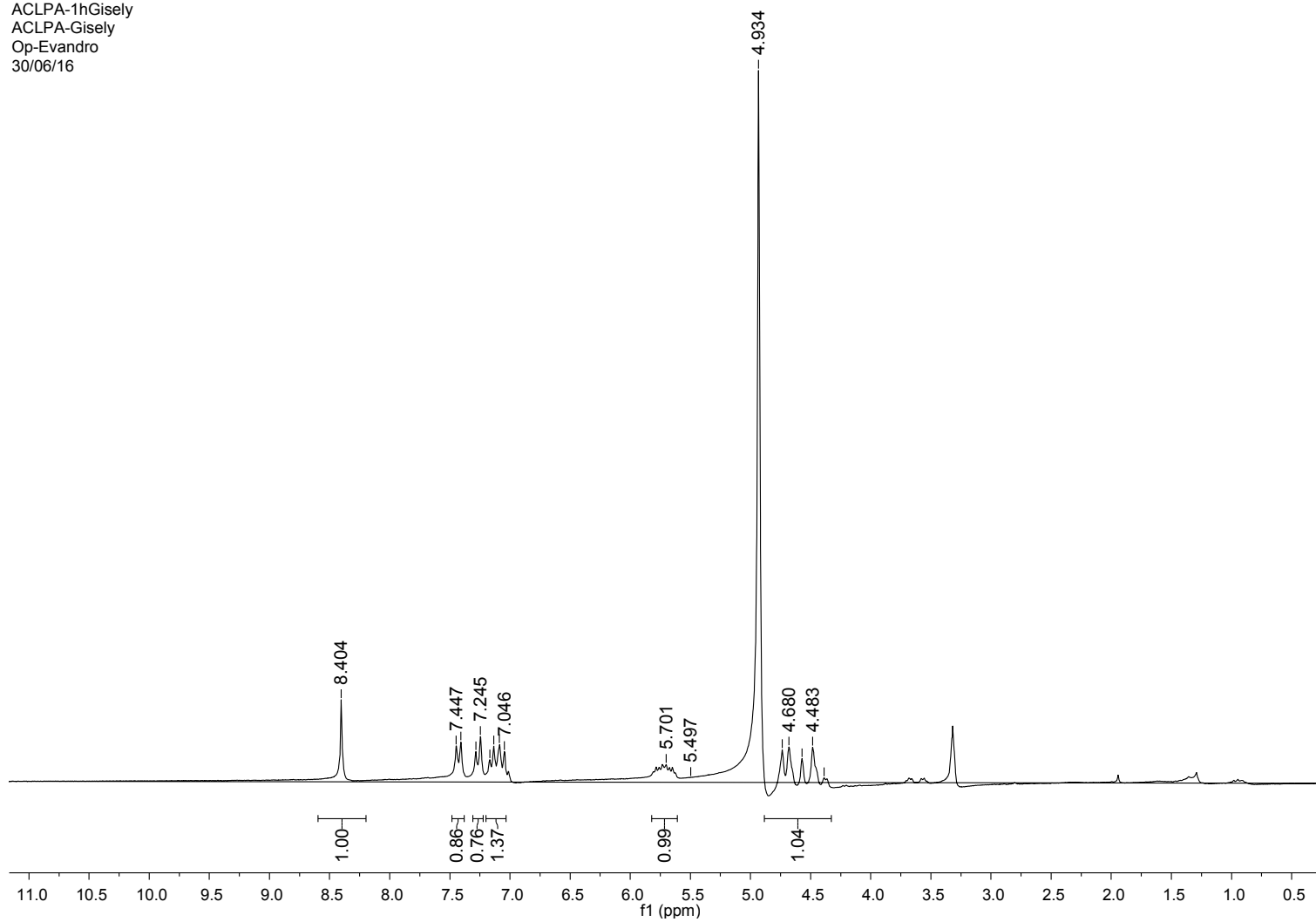


Figura 108: Espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (11) (200 MHz, MeOD).

ACLPA-aptGisely
ACLPA-Gisely
Op-Evandro
30/06/16

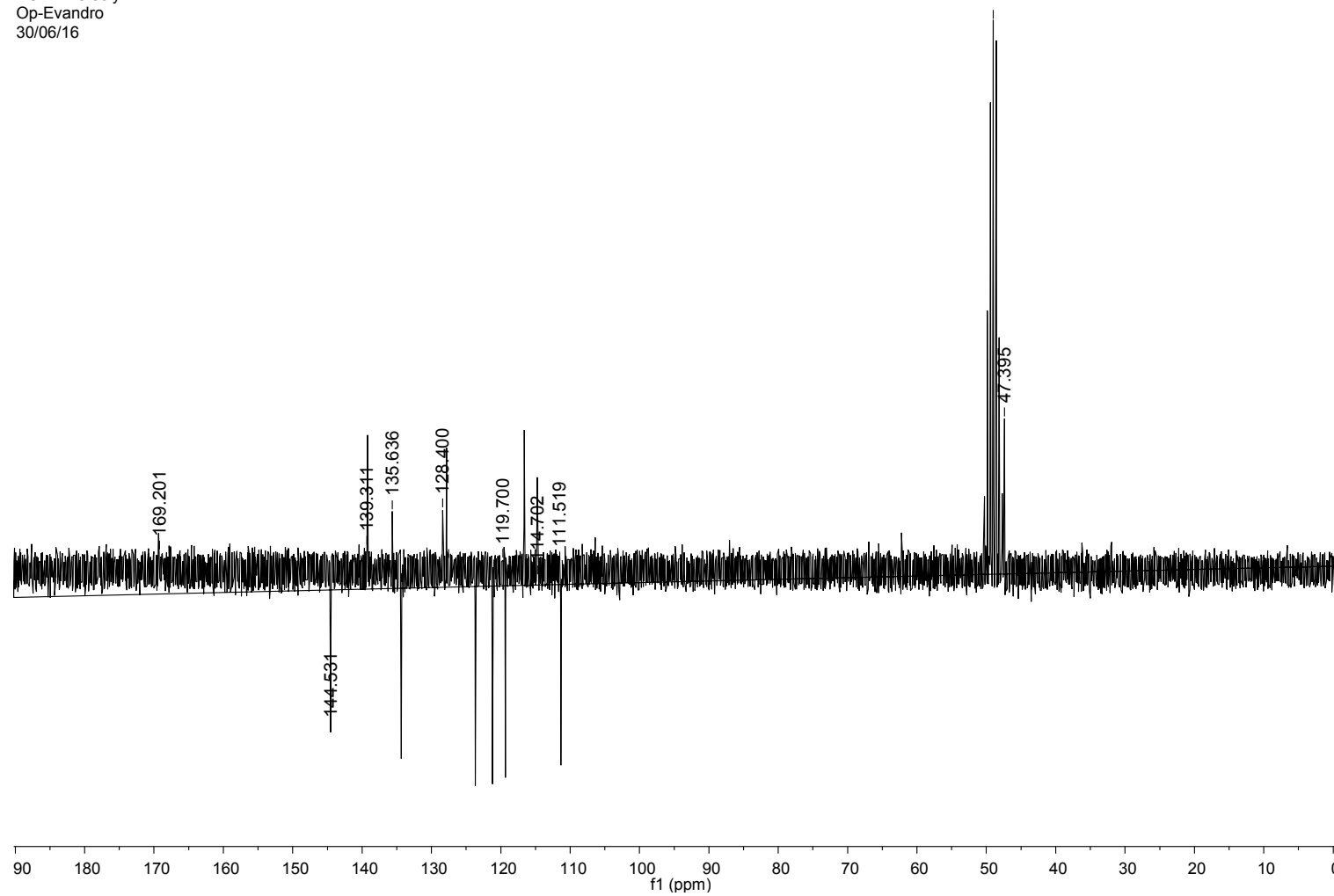
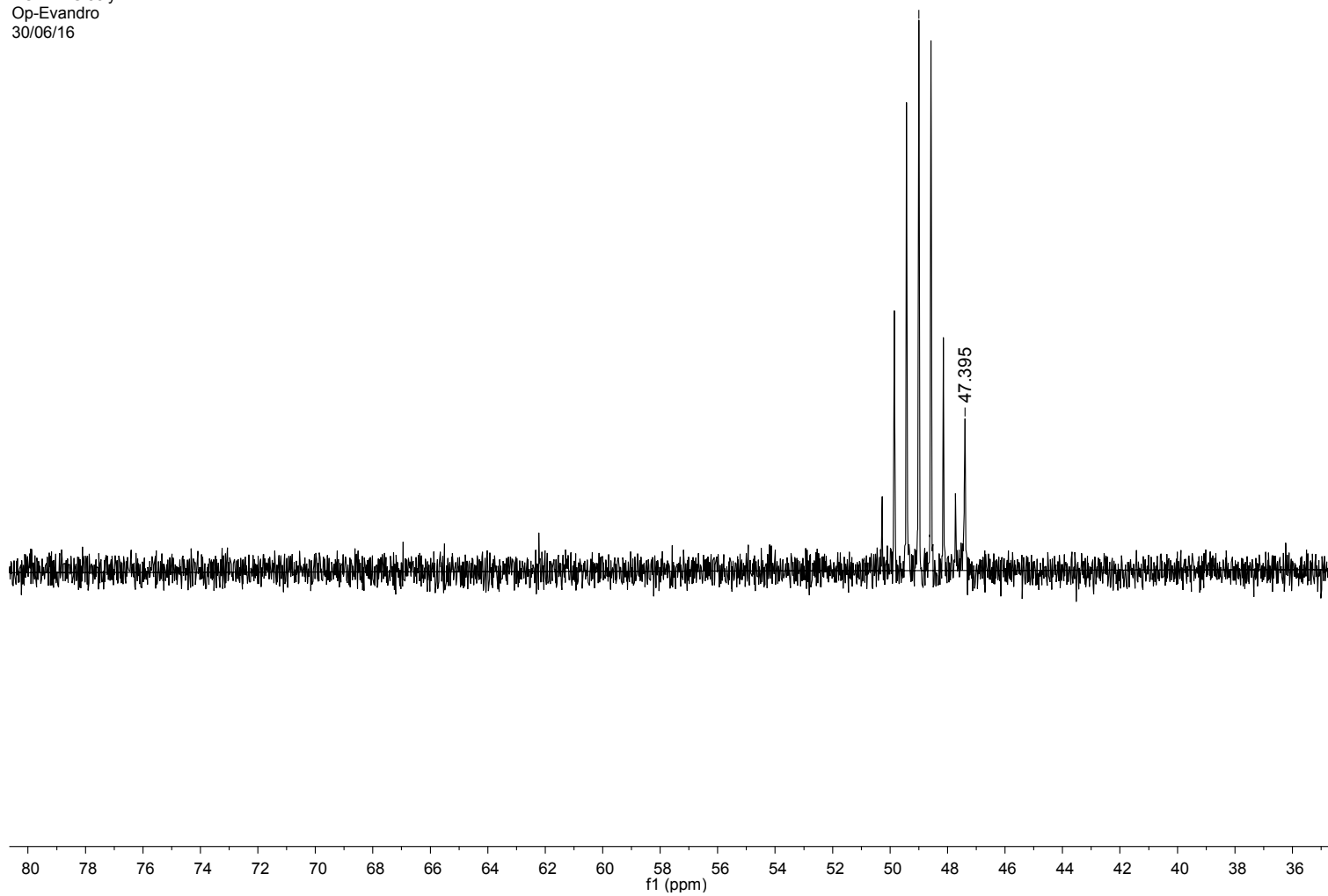


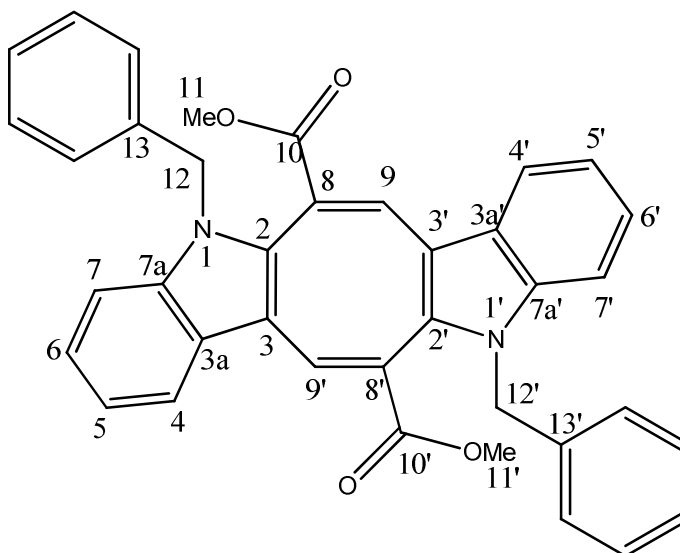
Figura 109: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (11) (200 MHz, MeOD).

ACLPA-aptGisely
ACLPA-Gisely
Op-Evandro
30/06/16



6.2.3.3.5 Ácido caulerpina *N*-benzil – Derivados 12 (6*E*, 13*E*)-5,12- dibenzil- 5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-*b'*] diíndol-6,13-ácido dicarboxílico)

Figura 110: Estrutura no derivado 12.



IV (KBr, $n_{\max}$): 3415, 3086, 3060, 3028, 2943, 2865, 1701, 1663, 1619, 1560, 1462, 1370, 1333, 1261, 1200, 1185, 1027, 926, 831, 744, 727, 692, 607, 581 cm^{-1} .

^1H RMN (200 MHz, MeOD) δ 8,42 (s, 1H); 7,11 (m); 6,73 (t, 1H); 6,56 (dl, 2H); 6,40 (t, 2H); 5,22 (t, 2H); 3,66 (s).

^{13}C RMN (200 MHz, MeOD) δ 167,8; 144,9; 139,1; 138,6; 135,9; 129,1; 128,2; 128,8; 127,8; 126,9; 121,3; 119,8; 115,6; 111,4; 30,7.

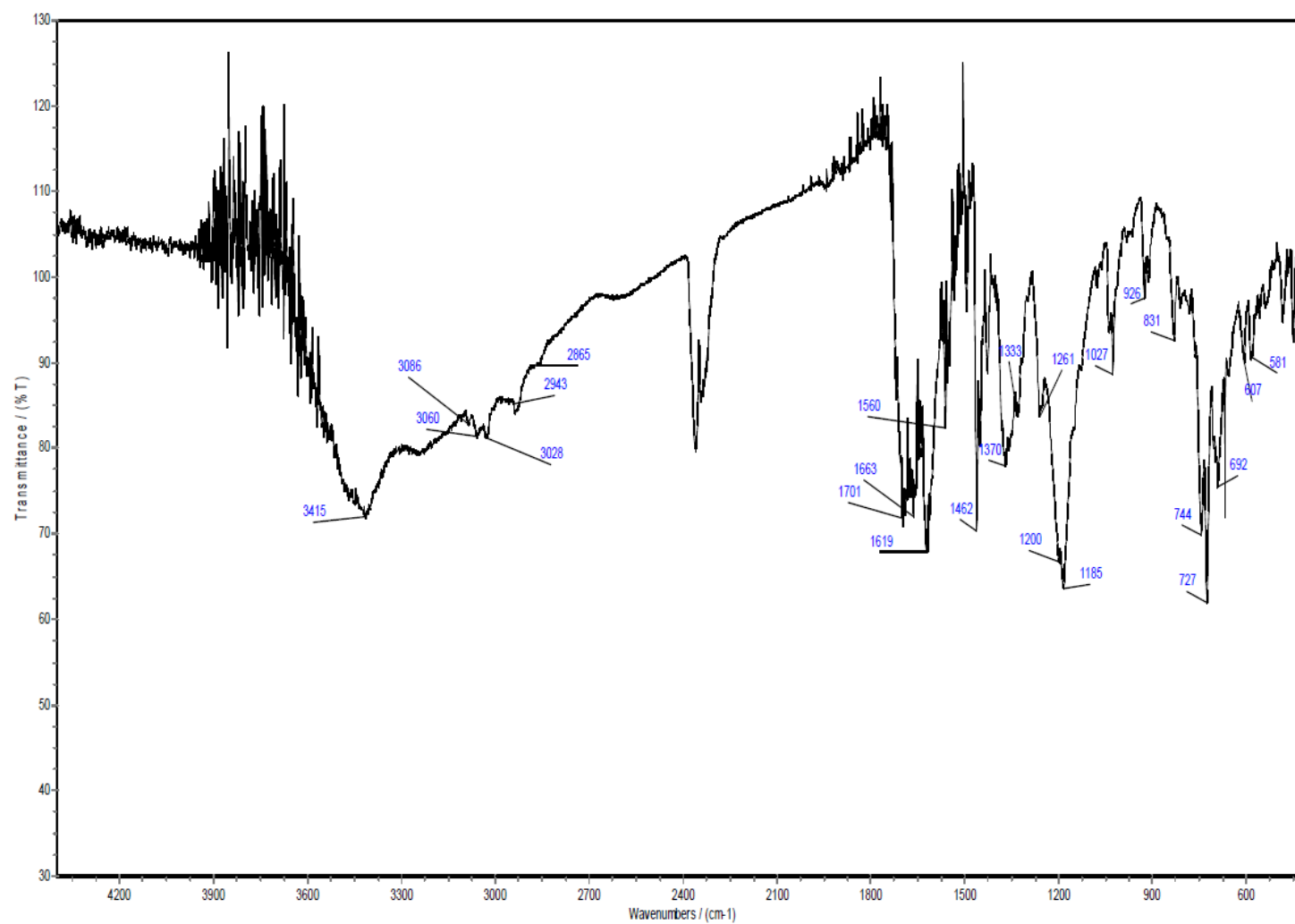
Figura 111: Espectro IV do derivado 12.

Figura 112: Espectro de RMN de ^1H do derivado (12) (200 MHz, MeOD).

ACLP-PB-1hGisely
ACLP-P3-Gisely
Op-Evandro
19/06/16

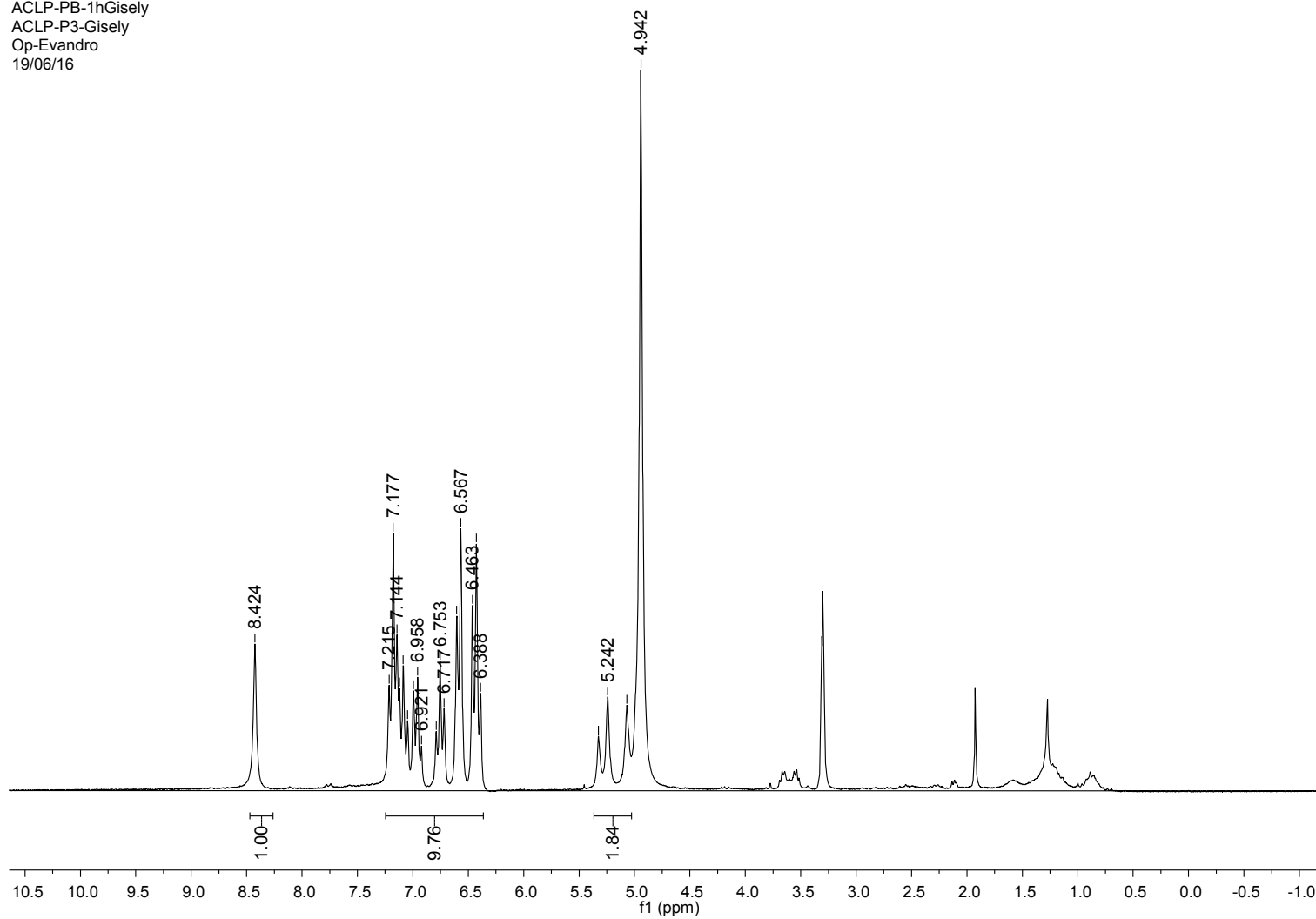


Figura 113: Espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (12) (200 MHz, MeOD).

ACLP-PB-aptGisely
ACLP-P3-Gisely
Op-Evandro
19/06/16

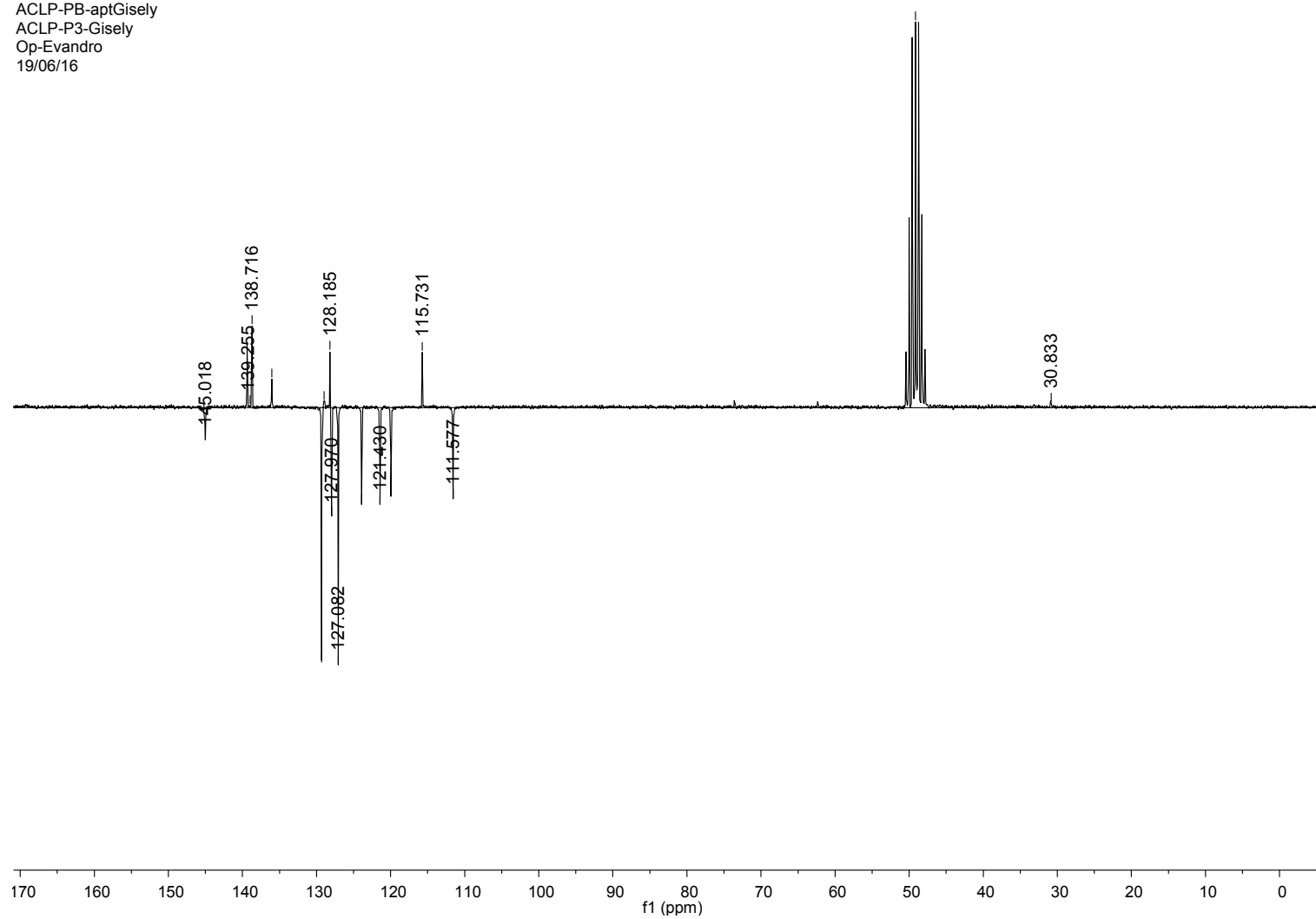
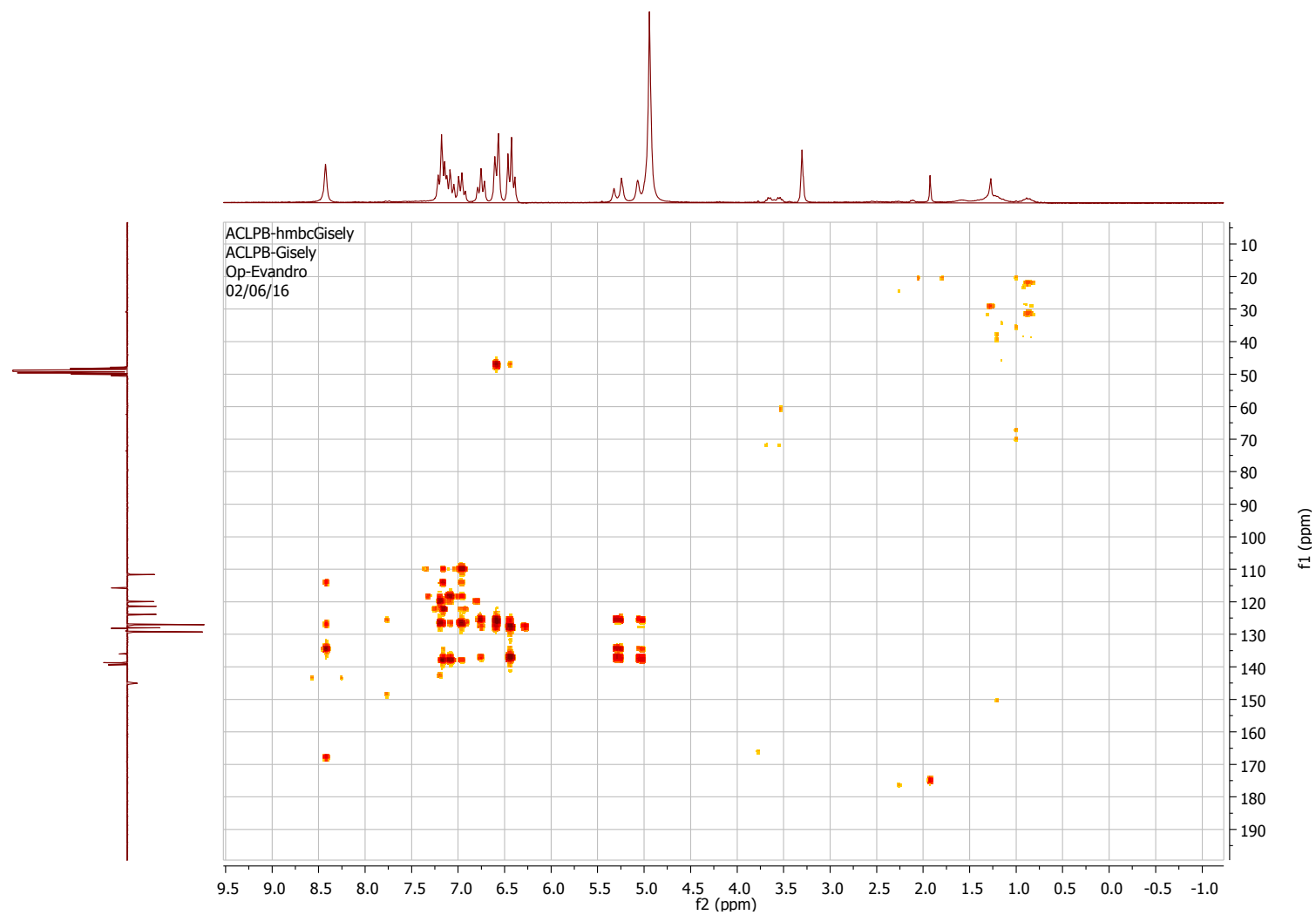


Figura 114: Espectro de HMBC do derivado (12) (500 MHz, MeOD).



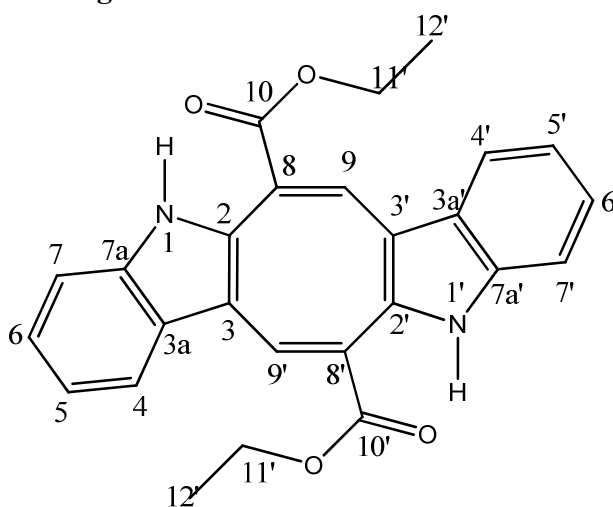
6.2.3.3.4 Transesterificação da caulerpina e da caulerpina *N*-metil

Para soluções individuais de caulerpina (0,075 mmol, 35 mg) e de caulerpina *N*-metil (0,075 mmol, 46 mg) em CH_2Cl_2 (2 mL) foi adicionado etanol absoluto (1,72 mmol, 2 gotas) sob agitação em temperatura ambiente. A solução permaneceu nesta condição por 30 minutos. Em seguida, foi adicionou-se KOH triturado (0,20 mmol, 11 mg) a temperatura foi elevada até 40 °C. Após uma hora a reação atingiu o equilíbrio e o produto foi seco em rotaevaporador. A extração dos produtos da reação foi realizada através de partição líquido-líquido utilizando-se 20 mL de ácido acético 1 mol.L⁻¹ e duas lavagens de 20 mL de acetato de etila. A fração orgânica foi adicionado excesso de sulfato de sódio anidro e seguida a filtração com papel de filtro. Com o intuito de se obter o produto formado isolado realizou-se uma cromatografia em camada delgada preparativa com hexano:acetato 8:2 como sistema de eluição.

As moléculas isoladas resultantes destas reações apresentaram rendimento de 33,14% para o derivado 13 (Figura 115), originado a partir da caulerpina e de 42% para o derivado 14 (Figura 118), que originou-se da caulerpina *N*-metil.

6.2.3.3.4.1 Caulerpina *O*-etil – Derivados 13 (6*E*, 13*E*)-dietil 5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-*b'*] diíndol-6,13-dicarboxilato)

Figura 115: Estrutura no derivado 13.



¹H RMN (200 MHz, CD₃OD) δ 9,27 (s, 1H); 7,41 (dl, 1H); 7,28 (dl, 1H); 7,16 (dt, 1H); 7,01 (dt, 1H); 4,34 (q, 2H); 1,40 (t, 3H).

^{13}C RMN (200 MHz, CD_3OD) δ 161,4; 137,5; 132,8; 128,1; 123,7; 120,9; 118,6; 115,7; 112,9; 107,5; 106,6; 56,7; 9,4.

Figura 116: Espectro de RMN de ^1H do derivado (13) (200 MHz, CDCl_3).

CLPE-1-1hGisely
CLPE-1-Gisely
Op-Evandro
11/09/15

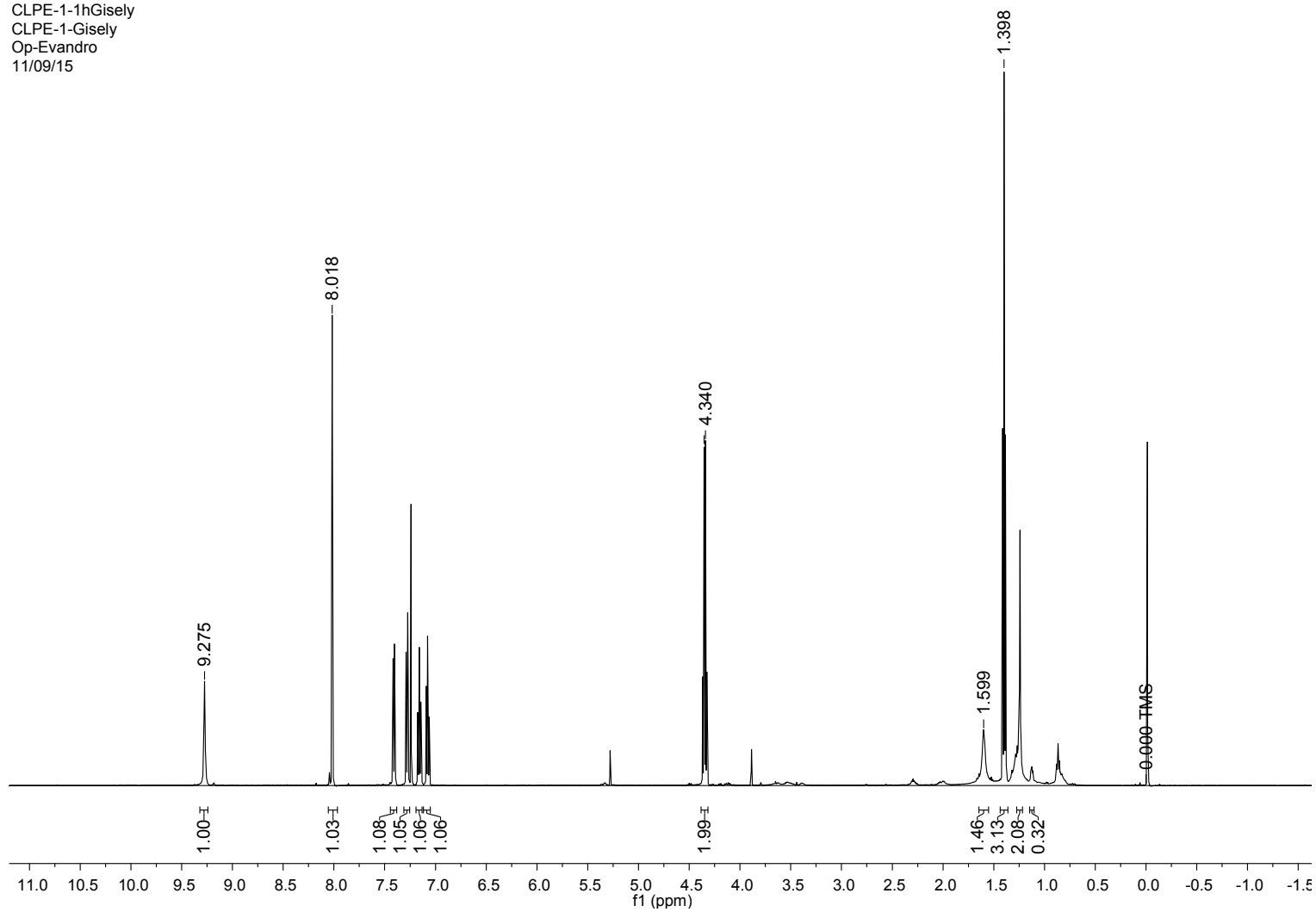
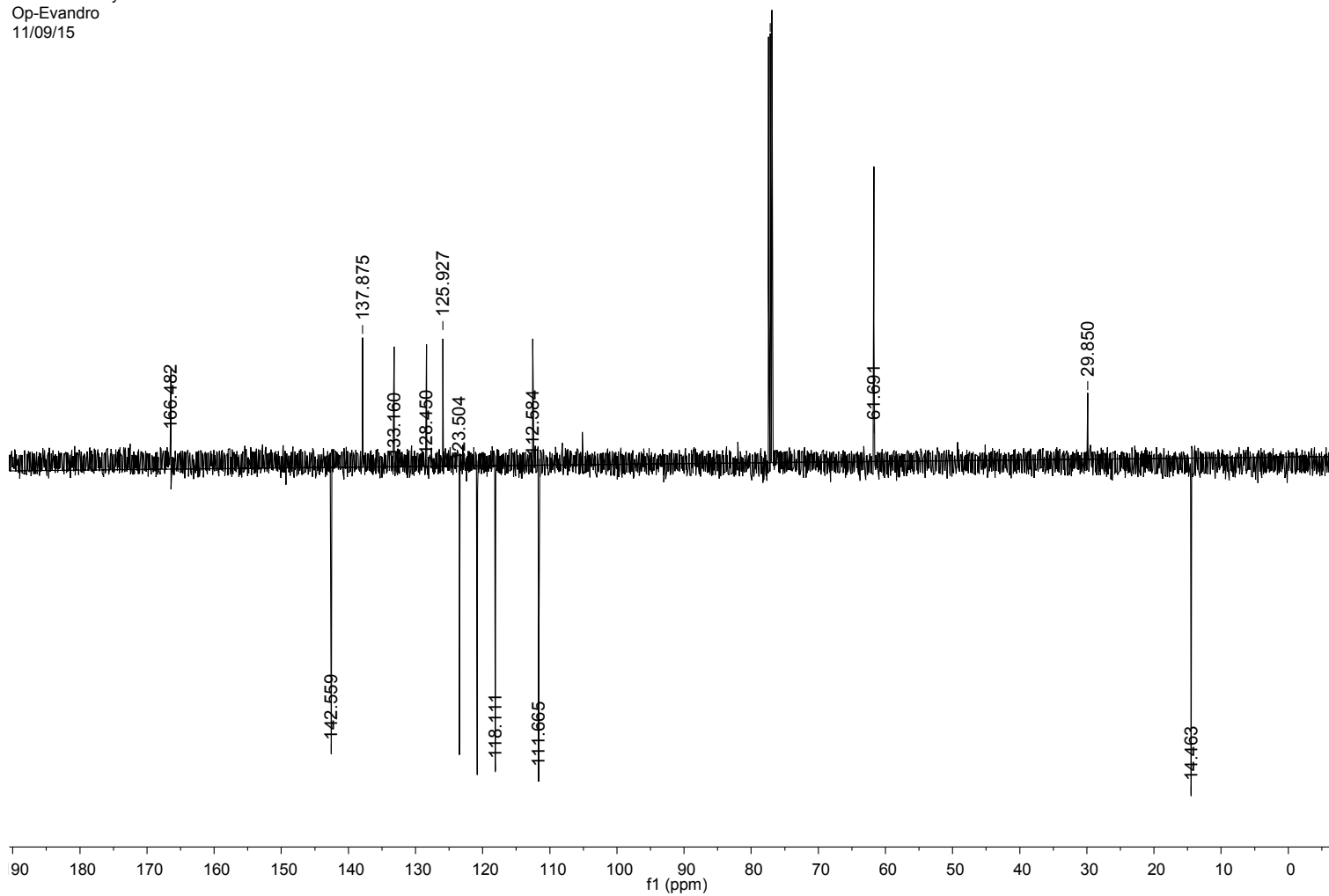


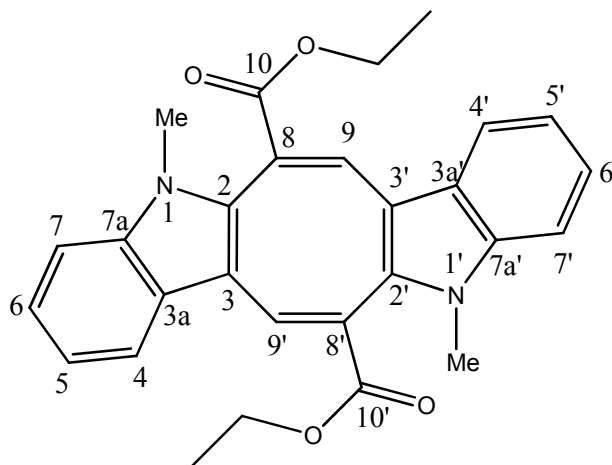
Figura 117: Espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (13) (200 MHz, CDCl_3).

CLPE-1-aptGisely
CLPE-1-Gisely
Op-Evandro
11/09/15



6.2.3.3.4.2 Caulerpina *N*-metil *O*-etil – Derivado 14 (6*E*, 13*E*)-dietil 5,12- dimetil- 5,12 dihidrocicloocta [1,2 b: 5, 6-*b'*] diindol-6,13-dicarboxilato)

Figura 118: Estrutura no derivado 14.



¹H RMN (200 MHz, CD₃OD) δ 8,45 (s,1H); 7,52 (dl, 1H); 7,21 (dl, 1H); 7,14 (dl, 1H); 7,10 (dl, 1H); 4,28 (m, 2H); 3,45 (s, 3H); 1,30 (t,3H).

¹³C RMN (200 MHz, CD₃OD) δ 166,0; 144,4; 138,7; 134,8; 126,7; 125,8; 122,9; 120,8; 119,1; 113,0; 109,9; 61,5; 31,0; 15,0.

Figura 119: Espectro de RMN de ^1H do derivado (14) (200 MHz, CDCl_3).

M1P3-1hGisely
M1P3-Gisely
Op.Evandro
18/05/15

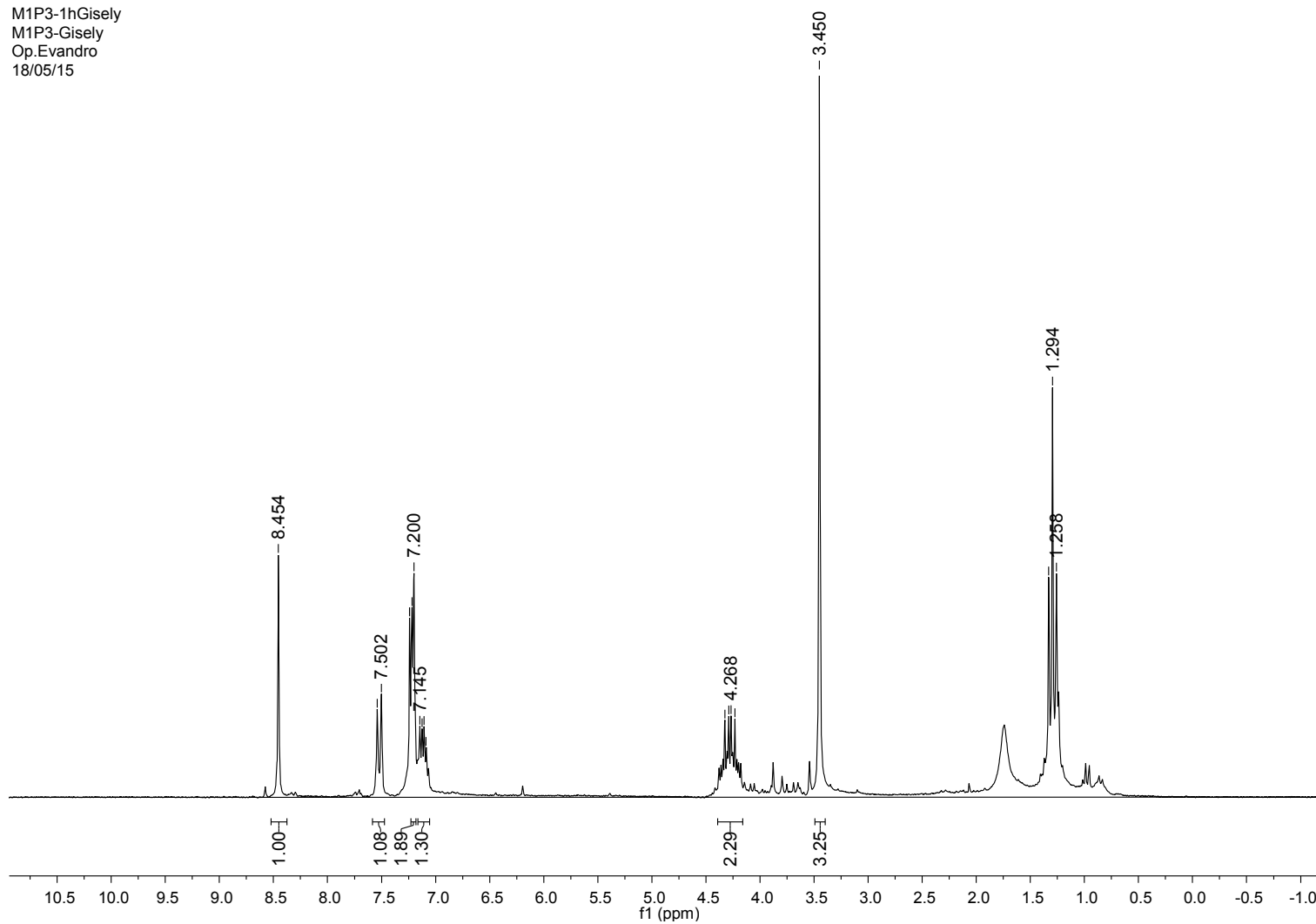
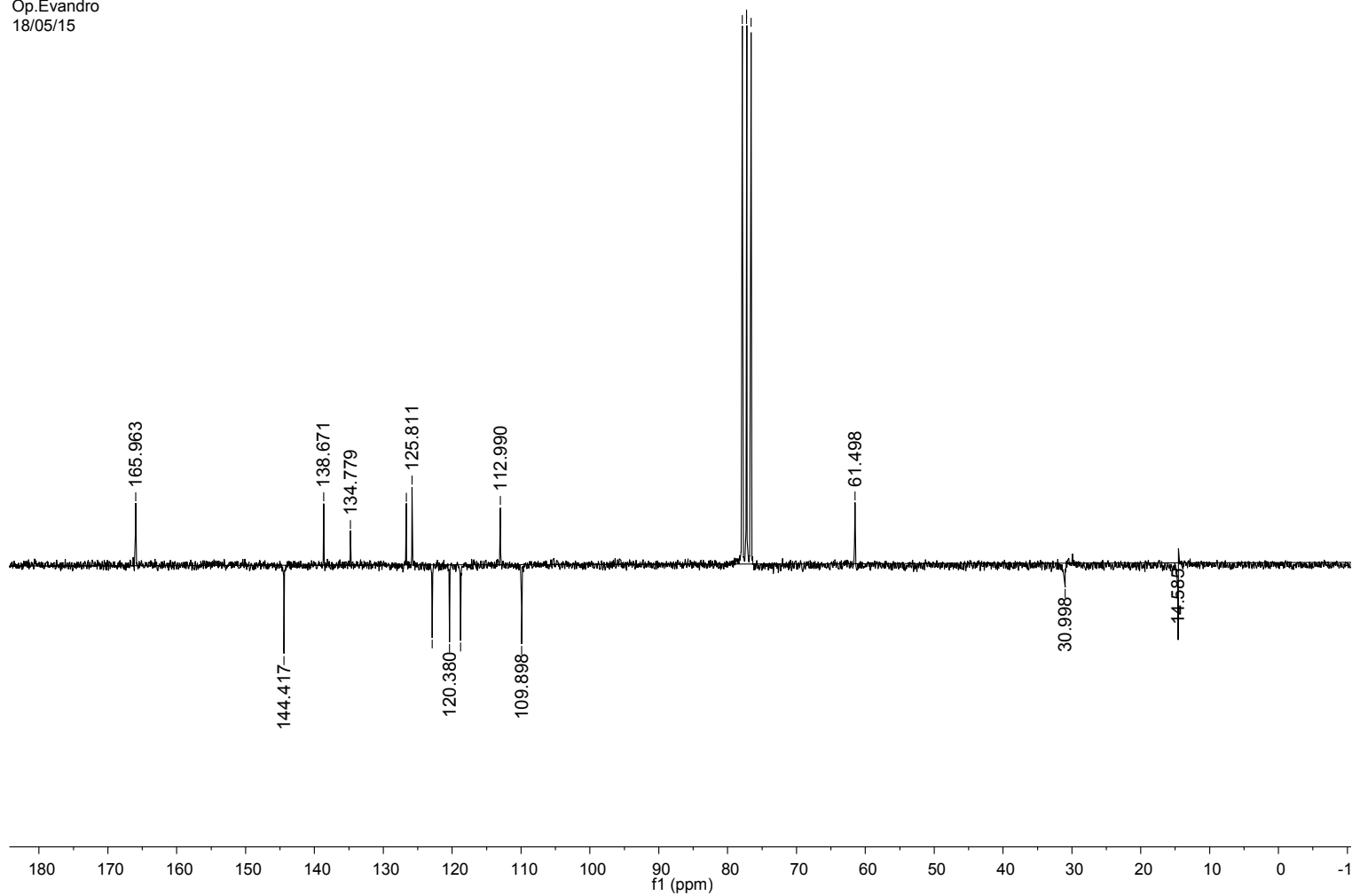


Figura 120: Espectro de RMN de ^{13}C – APT do derivado (14) (200 MHz, CDCl_3).

M1P3-aptGisely
M1P3-Gisely
Op.Evandro
18/05/15



6.2.3.3.5 Mistura de derivados

A mistura de derivados 01 e 14 (Figura 123) foi obtida durante a reação de metilação da caulerpina (metodologia para a caulerpina *N*-metil)

Figura 121: Estrutura dos componentes da mistura de derivados.

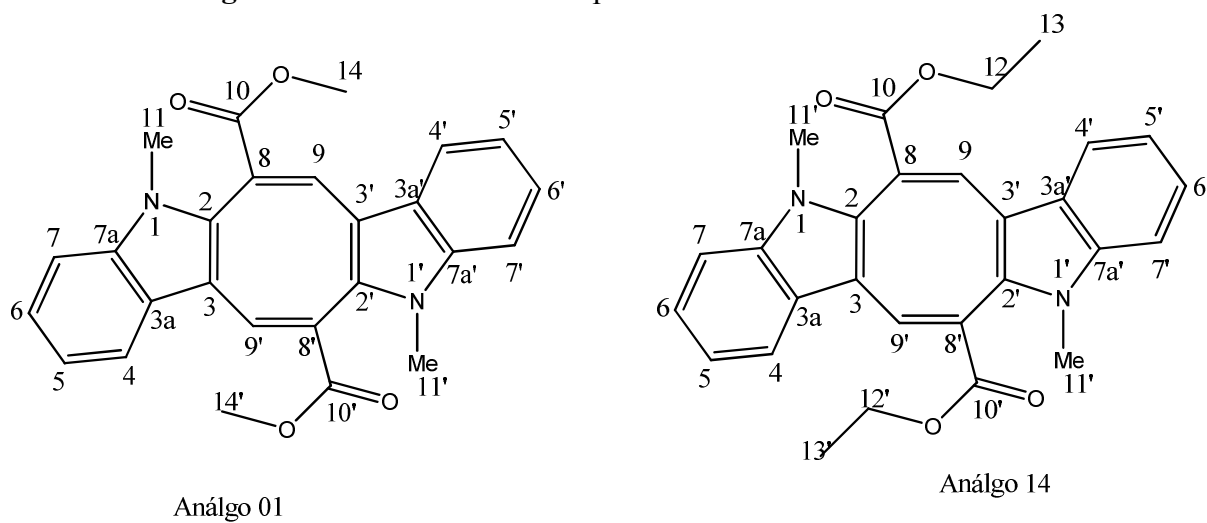


Figura 122: Espectro de RMN de ^1H da mistura de derivados (500 MHz, CDCl_3).

CLPME-1hGisely
CLPME-Gisely
Op Evandro
08/02/2017

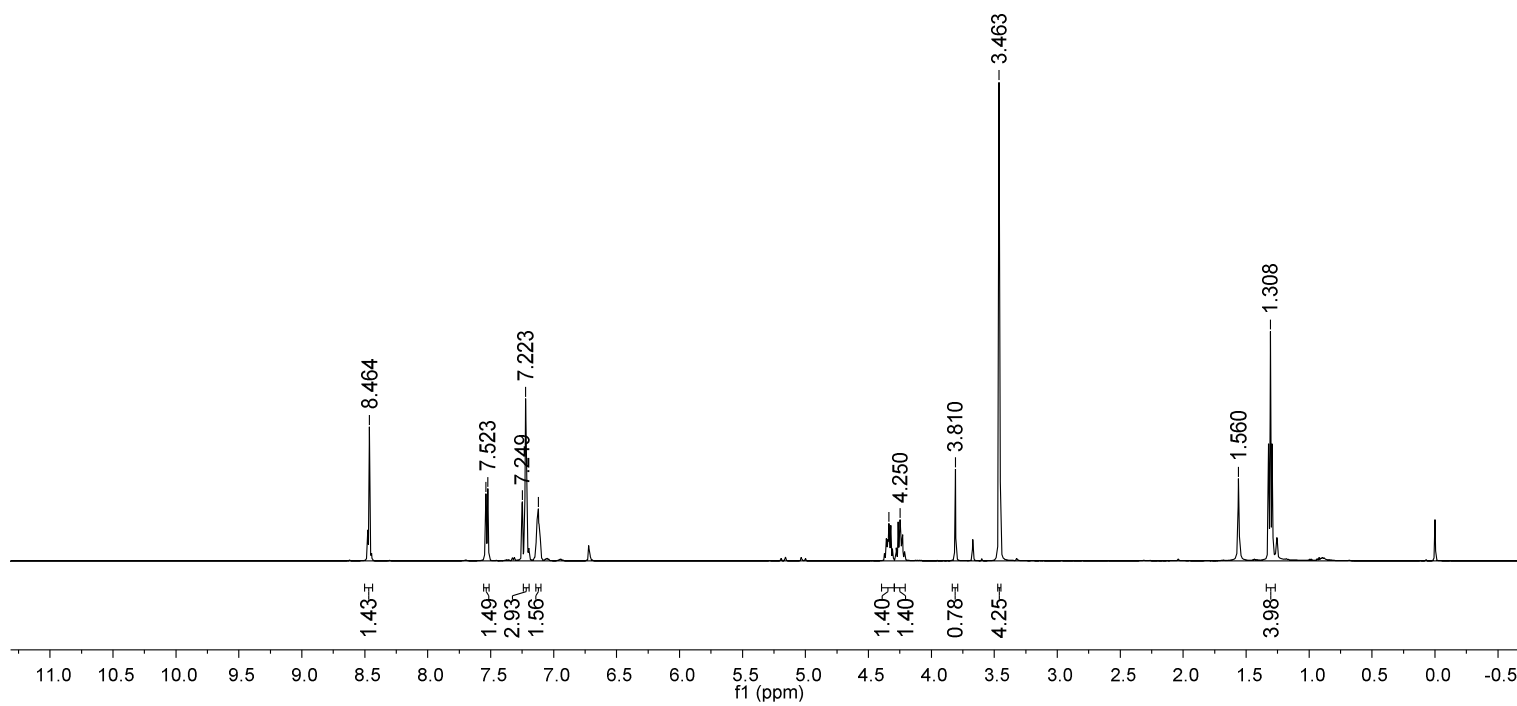


Figura 123: Espectro de RMN de ^{13}C – APT da mistura de derivados (500 MHz, CDCl_3).

CLPME-aptGisely
CLPME-Gisely
Op Evandro
08/02/2017

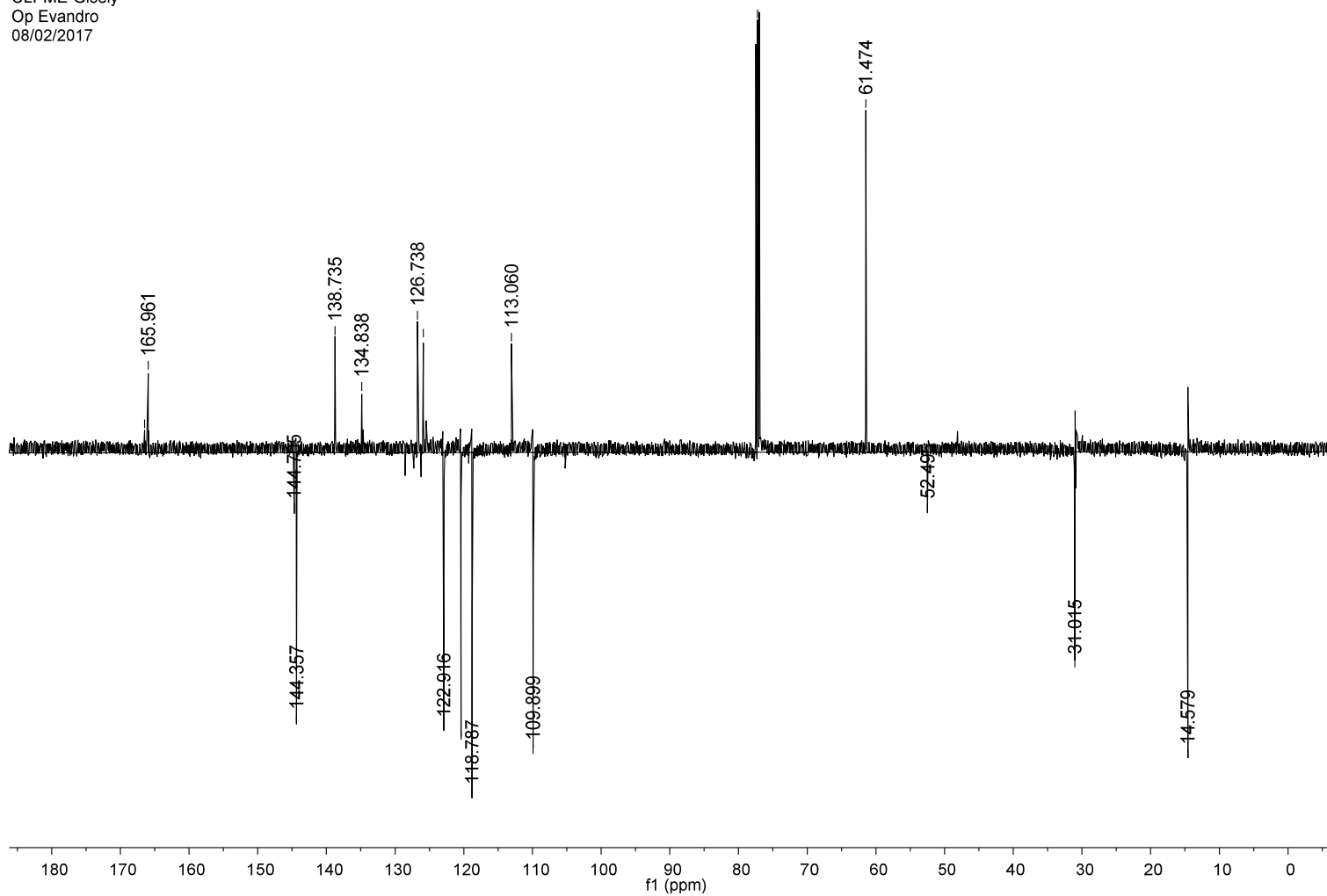
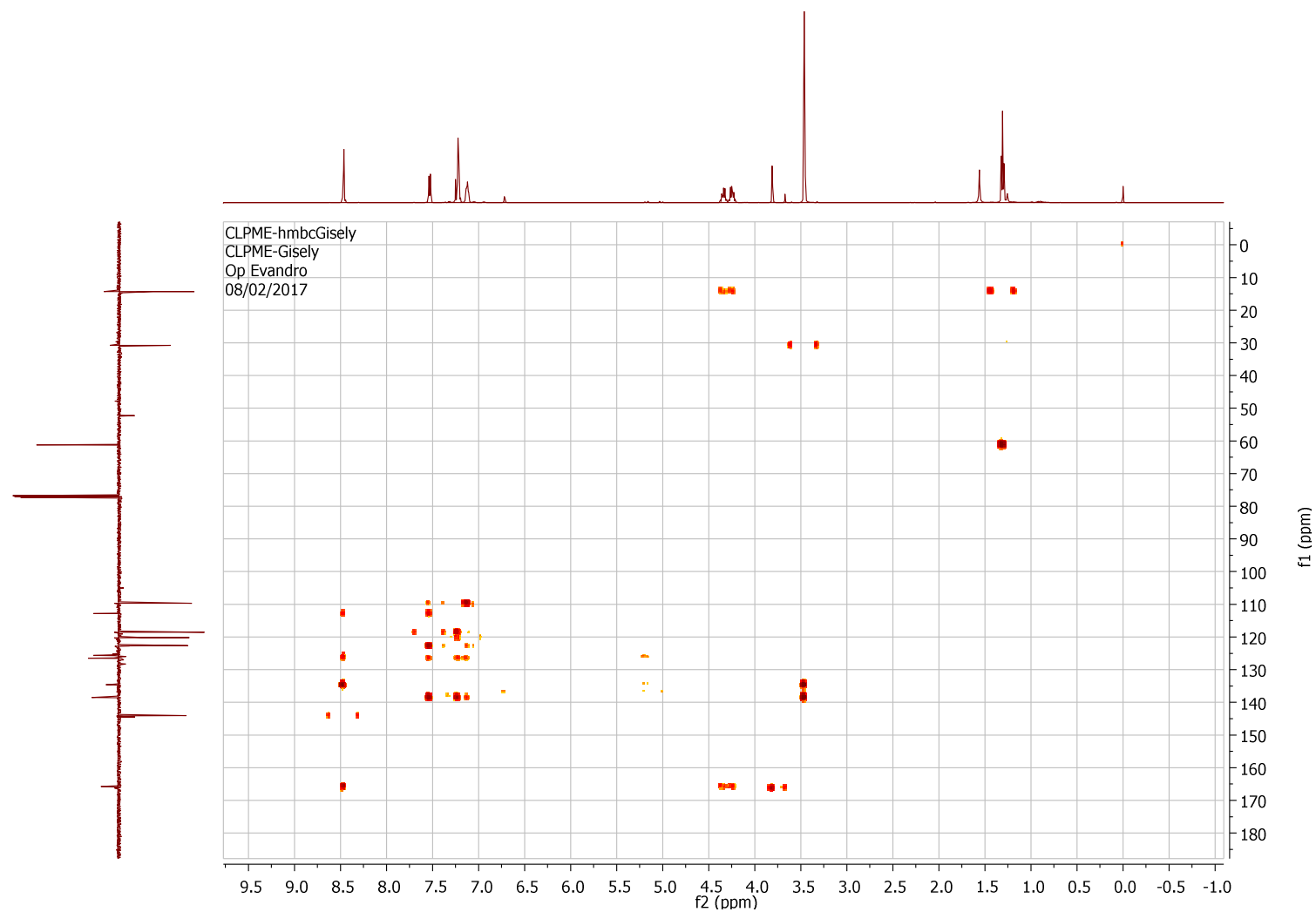


Figura 124: Espectro de HMBC da mistura de derivados (500 MHz, CDCl_3).



6.3 Ensaio de citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade foram realizados no laboratório de virologia da Fundação Oswaldo Cruz - Pernambuco, com a colaboração do Dr. Lindomar Pena.

Para a avaliação da citotoxicidade dos derivados da caulerpina foram utilizadas células Vero (células renais de macaco verde africano *Cercopithecus aethiops*; ATCC, Manassas, VA, EUA) cultivadas em meio modificado Dulbecco (DMEM) suplementado com 5% de soro fetal bovino (FBS), 0,1 μ M HEPES e 2,5 μ g/mL de gentamicina a 37 °C em 5% de CO₂. Em todos os ensaios realizados foram utilizadas células Vero 90% confluentes. A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio). Cada concentração utilizada no ensaio foi repetida seis vezes.

O MTT é um corante amarelo, que é reduzido por enzimas mitocondriais e citoplasmáticas a um composto azul denominado formazan, insolúvel em solução aquosa. A redução do sal tetrazólio MTT, principalmente pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase (SLATER; SAWYER; STRAULI, 1963), é muito utilizada em ensaios de avaliação de sobrevivência e proliferação celular, uma vez que somente as células viáveis reduzem o MTT (amarelo) para o formazan (azul), o qual, uma vez solubilizado, pode ser quantificado espectroscopicamente. Sendo assim, a quantidade de formazan produzido é proporcional ao número de células viáveis presentes (MOSMANN, 1983; DENIZOT; LANG, 1986).

O ensaio de redução do sal de tetrazólio foi realizado como descrito por Cheng et al. (2013), com algumas modificações. Cada amostra teste foi diluída em DMEM, contendo 2% de soro bovino fetal em 8 diferentes concentrações. Foram plaqueadas células Vero em uma concentração de 2×10^4 células/poço e incubadas por 24-36 horas. Quando as células apresentaram 90% de confluência o meio foi removido dos poços e as amostras adicionadas, seguindo-se incubação por 72 horas. Transcorrido este tempo o meio foi descartado e adicionou-se 20 μ L de solução de MTT a cada poço. As placas foram incubadas por 4 horas a 37 °C. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e foram adicionados 150 μ L de DMSO a cada poço, a fim de dissolver os cristais de formazan. As placas foram submetidas a agitação durante 10 min, seguindo-se a leitura da absorbâncias (densidade óptica) em leitor de microplacas ELISA no comprimento de onda de 540 nm.

Considerando que a caulerpina apresenta CC₅₀ de 1167 μ M (MACEDO et al., 2012) e que as modificações estruturais realizadas durante este estudo podem aumentar ou diminuir a

citotoxicidade da molécula, realizou-se ensaio de MTT para caulerpina, derivados 01, 02, 03, 04, 05, 07, 08, 09, 10 e 11 em concentrações que variaram entre 200 e 1800 μM .

6.4 Triagem antiviral.

Os testes de triagem antiviral foram realizados no laboratório de virologia da Fundação Oswaldo Cruz - Pernambuco, com a colaboração do Prof. Dr. Lindomar Pena.

A atividade anti-HSV-1 dos derivados da caulerpina foram avaliados como descrito por Cheng et al. (2013) com pequenas modificações. Para esta avaliação foram utilizadas células Vero nas mesmas condições descritas para o teste de citotoxicidade e realizados dois ensaios:

- **Ensaio 1 (Tratamento e infecção):** Após a remoção do meio de cultura as células foram infectadas com HSV-1 (MOI 0.2) e tratadas com concentrações da amostra que permitissem no mínimo 75% de viabilidade celular. As placas foram incubadas a 37 °C em 5% de CO₂ por 72 h e a viabilidade celular foi avaliada ao microscópio eletrônico pelo método do MTT.
- **Ensaio 2 (Tratamento pós-infecção):** Após a remoção do meio de cultura o vírus HSV-1 (MOI 0.2) foi acrescido aos poços contendo células por 1 hora. Decorrido este tempo as células foram lavadas e adicionou-se concentrações da amostra que permitissem no mínimo 75% de viabilidade celular. As placas foram incubadas a 37 °C em 5% de CO₂ por 72 h e a viabilidade celular foi avaliada ao microscópio eletrônico pelo método do MTT.

Para as duas metodologias descritas os poços contendo apenas meio de células foi considerado controle de crescimento celular, os poços adicionados de meio de cultura e vírus como controle positivo, os poços acrescidos de meio, vírus e aciclovir como controle negativo e os poços contendo as amostras como tratamento.

A razão de inibição foi calculada utilizando-se a fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{(\text{OD tratamento} - \text{OD controle negativo})}{(\text{OD crescimento celular} - \text{OD controle positivo})} \times 100$$

***OD = Densidade óptica (absorvância)**

6.5 Atividade antifúngica

Os ensaios micológicos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Oral do núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal da Paraíba, com a colaboração do Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro.

6.5.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Para a realização dos testes antifúngicos foram utilizadas cepas de *Candida* spp. utilizadas nos ensaios microbiológicos provenientes da coleção holandesa CBS (Central Bureau voor Schimmelcultures) – *C. albicans* CBS 562, *C. tropicalis* CBS 94 e *C. krusei* CBS 73.

A CIM foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo Sabouraud Dextrose (CSD, KASVI, Curitiba, Brasil), de acordo com protocolo proposto pelo Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais - CLSI (2002), onde foi avaliada atividade antifúngica dos produtos produzidos a uma concentração inicial de 1.000 µg/mL, frente às cepas fúngicas do gênero *Candida*: *C. albicans* CBS 562; *C. tropicalis* CBS 94 e *C. krusei* CBS 73.

Foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços e inicialmente foram inseridos em cada poço 100 µL de CSD. A seguir, 100 µL da solução da substância, serão inseridos no primeiro poço de cada coluna e diluídos seriadamente através da retirada de uma alíquota de 100 µL da cavidade mais concentrada para a cavidade sucessora. Ao fim de cada coluna, a última alíquota retirada foi desprezada.

Em seguida, foram inseridos em cada poço 100 µL do inóculo da cepa fúngica, preparado de acordo com as normas do CLSI (2002) em CSD com concentração final equivalente a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL. As placas foram incubadas em estufa por 24 h a 37 °C e, em seguida, realizada leitura visual dos resultados a partir da observação da formação de aglomerados de células fúngicas no fundo dos poços.

Para confirmação da presença de micro-organismos viáveis, foram inseridos 50 µL do corante TCT (2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio) em cada poço da placa e a mesma incubada novamente em estufa por 24 h. Neste sentido, na segunda leitura, foram considerados contendo micro-organismos viáveis os poços corados em vermelho. Foi considerada a CIM a menor concentração da substância capaz de inibir visivelmente o crescimento fúngico.

Os ensaios foram realizados em triplicata e a CIM calculada pela moda dos resultados obtidos. O controle positivo utilizado para este teste foi nistatina (Sigma-Aldrich, São Paulo,

Brasil), a uma concentração inicial de 12,5 µg/mL. Foi realizado controle de viabilidade das cepas, controle de esterilidade do meio de cultura e controle do DMSO (dimetilsulfóxido), utilizado para o preparo.

6.5.2 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A partir dos resultados obtidos no ensaio para determinação da CIM, foram semeados 50 µL do conteúdo dos poços referentes a CIM e as duas concentrações imediatamente mais concentradas (CIMx2 e CIMx4) em placas de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose (ASD, KASVI, Curitiba, Brasil), que foram incubadas em estufa a 35 °C por 24 h. A leitura foi realizada pelo método visual, sendo considerada a observação de crescimento fúngico no meio de cultura na forma de colônias. Foi considerada CFM a menor concentração capaz de inibir o crescimento visível do subcultivo (CLSI, 2002). Na sequência, foi determinada a relação CFM/CIM, calculada de forma a determinar se a substância possui uma atividade fungistática ($CFM/CIM \geq 4$) ou fungicida ($CFM/CIM < 4$), conforme proposta adotada por Siddiqui et al. (2013).

6.5.3 Verificação do possível mecanismo de ação da substância sobre a parede celular fúngica – ensaio do sorbitol

Para verificação de um possível efeito das moléculas experimentais sobre a parede celular fúngica, foi determinada a concentração inibitória mínima a partir da técnica da microdiluição (CLSI, 2002) na presença de sorbitol (INLAB, São Paulo, Brasil), um protetor osmótico, que é utilizado como estratégia farmacológica para verificação do possível mecanismo de ação dos produtos sobre a parede celular de *C. albicans* (CBS 562). A técnica foi realizada de forma semelhante à determinação da CIM, no entanto o inóculo utilizado foi preparado com sorbitol a uma concentração final de 0,8 M. As placas foram incubadas em estufa a 35 °C e as leituras realizadas após 24 e 48 h de incubação.

O controle positivo utilizado neste teste foi o Diacetato de Caspofungina – (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), a uma concentração inicial de 5 µg/mL, (LETSCHER-BRU; HERBRECHT, 2003; HAO et al., 2013). foi considerada a CIM na presença de sorbitol a menor concentração da substância capaz de inibir visivelmente o crescimento fúngico (FROST et al., 1995; FREIRES et al., 2014; LEITE et al., 2014).

7 REFERÊNCIAS

ABRANTES, J.; BARBOSA, J.; CAVALCANTI, D.; PEREIRA, R.C.; FONTES, C.F.L.; TEIXEIRA, V.L.; SOUZA, T.M.L.; PAIXÃO, I.C.P. The effects of the diterpenes isolated from the Brazilian brown algae *Dictyota pfaffii* and *Dictyota menstrualis* against the herpes simplex type-1 replicative cycle. **Planta Médica**, v. 76, n. 4, p. 339-344. 2010.

ALARIF, W. M.; AL-LIHAIBI, S. S.; AYYAD, S. N.; ABDEL-RHMAN, M. H.;BADRIA, F. A. Laurene-type sesquiterpenes from the Red Sea red alga *Laurencia obtusa* as potential antitumor e antimicrobial agentes. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v 55, n. 9, p 462-466. 2012.

ALGAEBASE. *Caulerpa racemosa*. Disponível em: <www.algaebase.org>. Acesso em: 30 mar. 2016.

AMARANTE, G. W.; CAVALLARO, M.; COELHO, F. Hyphenating the Curtius rearrangement with Morita-Baylis-Hillman adducts: synthesis of biologically active acyloins and vicinal amino alcohols. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v 22, n. 8, p 1568-1584. 2011.

AMICO, V.; ORIENTE, G.; PIATTELLI, M.; TRINGALI, C.; FATTORUSSO, E.; MAGNO, S.; MAYOL, L. Caulerpenyne, na unusual sequiterpenoid from green alga *Caulerpa prolifera*. **Tetrahedron Letters**. v. 38, p. 3593-3596, 1978.

ANJANEYULU, A. S. R.; PRAKASHI, C. V. S.; MALLAVADHANI, U. V. Sterols and terpenes of the marine green algal species *Caulerpa racemosa* and *Codium decorticans*. **Journal of the Indian Chemical**. v. 68, n. 8, p. 480, 1991.

ANSANEYULU, A. S. R.; PRAKASHI, C. V. S.; MALLAVADHANI, U, V. Sterols and terpenes of the marine green algal species *Caulerpa racemosa* and *Codium decorticans*. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 68, n. 8, p. 480, 1991

ANSANEYULU, A. S. R.; PRAKASHI, C. V. S.; RAJU, K. V. S.; MALLAVADHANI, U, V. Isolation of new aromatic derivatives from marine algal species *Caulerpa racemosa*. *Phytochemistry*. v. 55, n. 4, p. 496-499, 1992.

ANTINORI, S.; MILAZZO, L.; SOLLIMA, S.; GALLI, M.; CORBELLINO, M. Candidemia and invasive candidiasis in adults: a narrative review. **European Journal Internal Medicine**, v. 34, p. 21-28, 2016.

ARENDRUP, M. C. *Candida* and candidaemia. Susceptibility and epidemiology. **Danish Medical Journal**, v. 60, n. 11, e4698, 2013.

AYYAD, S. E. N.; BADRIA, F. A. Caulerpine: antitumor indole alkaloid from *Caulerpa racemosa*. **Alexandria Journal of Pharmaceutical**. v. 8, n. 3, p. 217-219, 1994.

BARBOSA FILHO, J. M. **Projeto Rede Interinstitucional de Algas Bentônica**. 2006.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal - As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**. 2^a ed., p.536. Artmed, 2014.

BARREIRO, E.J.; BOLZANI, V.S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688. 2009.

BITENCOURT, M. A. O.; DANTAS, G. R.; LIRA, D. P.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MIRANDA, G. E. C.; SANTOS, B. V. O.; SOUTO, J. T. Aqueous and methanolic extracts of *caulerpa mexicana* suppress cell migration and ear edema induced by inflammatory agents. **Marine Drugs**, v.9, n. 8, p. 1332-1345. 2011.

BITENCOURT, M. A. O.; SILVA, H. M. D.; ABILIO, G. M. F.; MIRANDA, G. E. C.; MOURA, A. M. A.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; SILVEIRA, E. J.D.; SANTOS, B. V. O.; SOUTO, J. T. Anti-inflammatory effects of methanolic extract of green algae *Caulerpa mexicana* in a murine model of ulcerative colitis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 6, p. 677–682, 2015.

BLACMAN, A. J.; WELLS, R. J. Flexilin and tritarin, terpene 1,4-diacetoxy 1,3-dienos from two *Caulerpa* species. **Tetrahedron Letters**. v. 33, p. 3063-3064, 1990.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A.; MUNRO, M. H. G.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Product Reports**. v 31, n.1, p 160–258. 2015.

BRAYNER, S.; PEREIRA, S. M. B.; PEDROSA, M. E. B. Taxonomia e distribuição do gênero *Caulerpa* Lamouroux (Bryopsidales - Chlorophyta) na costa de Pernambuco e Arquipélago de Fernando de Noronha, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 22, n. 4, p. 914-928, 2008.

CANALS, A.; ARRIBAS-BOSACOMA, R.; ALBERICIO, F.; ÁLVAREZ, M.; AYMAMÍ, J.; COLL, M. Intercalative DNA binding of the marine anticancer drug variolin B. **Scientific Reports**, v. 7, e39680, 2017.

CANCHÉ CHAY, C. I. C.; CANSINO, R. G.; PINZÓN, C. I. E.; TORRES-OCHOA, R. O.; MARTÍNEZ, R. Synthesis and Anti-Tuberculosis Activity of the Marine Natural Product Caulerpin and Its Analogues, **Marine Drugs**, v. 12, v. 4, p. 1757-1772, 2014.

CAPON, R. J.; GHISALBERTI, E. L.; JEFFERIES, P. R. Metabolites of the green algae, *Caulerpa* species. **Phytochemistry**. v 22, n. 6, p 1465 – 1467, 1983.

CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; CORREIA, A. C. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, B. A.; SANTOS, B. V. O.; LIRA, D. P.; SOUSA, J. C. F.; MIRANDA, G. E. C.; CAVALCANTE, F. A.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. Spasmolytic effect of caulerpine involves blockade of ca_2^+ influx on guinea pig ileum. **Marine Drugs**, v.11, n. 5, p. 1553 – 1564. 2013.

CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; CORREIA, A. C. C.; SOUSA, J. C. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. ; SANTOS, B. V. O.; DE MIRANDA, G. E. C.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. ; CAVALCANTE, F. A. Involvement of β adrenergic receptors in spasmolytic effect of caulerpine on guinea pig ileum. **Natural Product Research**, v. 13, n. 1, p. 1-6, 2016.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CHANG, P. N.; OKECHUKWU, S. T. The properties of red seaweed (*Kappaphycus alvarezii*) and its effect on mammary carcinogenesis Vi-Sion. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 87, p. 296–301, 2017.

CHEN, J.; LI, W.; HEQUAN, Y.; XU, J. Insights into drug discovery from natural products through structural modification. **Fitoterapia**. v. 103, p. 231–241, 2015.

CHENG, J.; SUN, N.; ZHAO, X.; NIU, L.; SONG, M.; SUN, Y.; JIANG, J.; GUO, J.; BAI, Y.; HE, J.; LI, H. In vitro screening for compounds derived from traditional Chinese medicines with antiviral activities against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. **Microbial Biotechnology**, v. 23, n. 8, p. 1076-1083, 2013.

CHENG, Y. C.; HUANG, E. S.; LIN, J. C.; MAR, E. C.; PAGANO, J. S.; DUTSCHMAN, G. E.; GRILL, S. P. Unique spectrum of activity of 9-[(1,3-dihydroxy-2-propoxy)methyl]-guanine against herpesviruses *in vitro* and its mode of action against herpes simplex virus type 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, n. 9, p. 2767-2770, 1983.

CHEUKA, P. M.; MAYOKA, G.; MUTAI, P.; CHIBALE, K. The role of natural products in drug discovery and development against neglected tropical diseases. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 1-41, 2017.

CHEUNG, R. C. F.; NG, T. B.; WONG, J. H.; CHEN, Y.; CHAN, W. Y. Marine natural products with anti-inflammatory activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 4, p. 1645-1666, 2016.

CHIN, L. W.; CHENG, Y. W.; LIN, S.S.; LAI, Y.Y.; LIN, L. Y.; CHOU, M. Y.; CHOU, M.C.; YANG, C. C. Anti-herpes simplex virus effects of berberine from *Coptidis rhizoma*, a major component of a Chinese herbal medicine, Ching-Wei-San. **Archives of Virology**, v. 155, n. 12, p. 1933-1941, 2010.

CLAYDEN, J. P.; GREEVES, N.; WARREN, S.G.; WOTHERS, P. D. **Organic Chemistry**. Oxford: Oxford University Press. 2001.

CLEMENS, S. A.C; FARHATII, C. K. Soroprevalência de anticorpos contra vírus herpes simples 1-2 no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 4, p. 726-34. 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) **Protocol M27-A2**. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. NCCLS: Pennsylvania. 2002.

COEN, D. M. Antiviral drug resistance in herpes simplex virus. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 394, p. 49-57, 1996.

COSTA-LOTUFO, L.V.; WILKE, D.V.; JIMENEZ, P. C. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: Histórico & perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 703-716. 2009.

DE CLERCQ, E. Antiviral drugs in current clinical use. **Journal of Clinical Virology**, v. 30, n. 2, p. 115-133, 2004.

DELLAI, A.; MARICIC, I.; KUMAR, V.; ARUTYUNYAN, S.; BOURAOU, A.; NEFZI, A. Parallel chirimolacyclopeptide B and their analogs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter**, v. 20, n. 19, p. 5653-7, 2010.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, n. 2, p. 271-277, 1986.

DING, Y.; YE, X.; ZHU, J.; ZHU, X.; LI, X.; CHEN, B. Structural modification of berberine alkaloid and their hypoglycemic activity. **Journal of Functional Foods**, v7, n. 3, p. 229-237, 2014.

DUARTE, M. C.; LEME, E. E.; DELARMELINA, C.; SOARES, A. A.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A. Activity of essential oils from brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n.2, p. 197-201, 2007.

EL-HOSSARY, E. M.; CHENG, C.; HAMED, M. M.; HAMED, A. N. E.; OHLSEN, K.; HENTSCHEL, U.; ABDELMOHSEN, U. R. Antifungal potential of marine natural products. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 126, n. 27, p. 631-651, 2017.

ELLEPOLA, A. N.; SAMARANAYAKE, L. P. Impact of brief and sequential exposure to nystatin on the germ tube formation and cell surface hydrophobicity of oral *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-infected patients. **Medical Principles and Practice**. v 23, n. 4, p. 307-312. 2014.

FELÍCIO, R.; DEBONSI, H. M.; YOKOYA, N. S.. 4-(hidroximetil)-benzenossulfonato de potássio: metabólito inédito isolado da alga marinha *Bostrychia tenella* (RHODOMELACEAE, CERAMIALES). **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 837-839, 2008.

FEREIRA JR, A.C. **Herpes**: clínica, diagnóstico e tratamento. Rio de Janeiro: Medsi, p. 43-70, 2000.

FERRAMOSCA, A.; CONTE, A.; GUERRA, F.; FELLINE, S.; RIMOLI, M. G.; MOLLO, E.; ZARA, V.; TERLIZZI, A. Metabolites from invasive pests inhibit mitochondrial complex II: A potential strategy for the treatment of human ovarian carcinoma? **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 473, n. 4, p. 1133-1138, 2016.

FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E.; LAMB, R.A. A functional measles virus replication and transcription machinery encoded by the vaccinia virus genome. **Journal of Virological Methods**, v. 79, n 1, p. 65-74. 1999.

FOLMER, F.; JASPARS, M.; SCHUMACHER, M.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Marine natural products targeting phospholipases A2. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, n. 12, p. 1793-800, 2010.

FREIRES, I. A.; DENNY, C.; BENSO, B.; ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacterial: a systematic review. **Molecules**, v. 20, p. 7329-7358, 2015.

FREIRES, I. A.; MURATA, R. M.; FURLETTI, V. F. *Coriandrum sativum* L. (Coriander) essential oil: antifungal activity and mode of action on *Candida* spp., and molecular targets affected in human whole-genome expression. **Plos One**. Doi: 10.1371/journal.pone.0099086. 2014.

FROST, D. J.; BRANDT, K. D.; CUGIER, D. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. **The Journal of Antibiotics**, v. 48, n. 4, p. 306-310, 1995.

GERLIER, D.; THOMASSET, N. Use of MTT colorimetric assay measure cell activation. **Journal of Immunological Methods**, v. 94, n. 1-2, p. 57-63, 1986.

GESCHER, K.; KUHN, J.; HAFEZI, W.; LOUIS, A.; DERKSEN, A.; DETERS, A.; LORENTZEN, E.; HENSEL, A. Inhibition of viral adsorption and penetration by an aqueous extract from *Rhododendron ferrugineum* L. as antiviral principle against herpes simplex virus type-1. **Fitoterapia**, v. 82, n. 3, p. 408-413, 2011.

GHOSH, P.; ADHIKARI, U.; GHOSAL, P.K.; PUJOL, C. A.; CARLUCCI, M. J.; DAMONTE, E.B.; RAY, N. *In vitro* anti-herpetic activity of sulfated polysaccharide fractions from *Caulerpa racemosa*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 23, p. 3151-3157.

GOEL, S.; MITTAL, S.; CHAUDHARY, U. Role of non albicans *Candida* spp. and biofilm in neonatal ICU. **Infectious Disorders - Drug Target**, v. 16, n. 3, p. 192-198, 2016.

GOGINENI, V.; SCHINAZI, R. F.; HAMANN, M. T. Role of marine natural products in the genesis of antiviral agents. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 18, p. 9655-9706, 2015.

GRAHAM, L.E.; WILCOX, L.W. **Algae**. Prentice Hall, 2000.

GROSSET, M.; DESNOS-OLLIVIER, M.; GODET, C.; KAUFFMANN-LACROIX, C.; CAZENAVE-ROBLOT, F. Recurrent episodes of candidemia due to *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* and *Candida albicans* with acquired echinocandin resistance. **Medical Mycology Case Reports**, v. 14, p. 20-23, 2016.

HANDLEY, J. T.; BLACKMAN, A. J. Monocyclic diterpenes from the marine alga *Caulerpa trifaria* (Chlorophyta). **Australian Journal of Chemistry**. v. 53, n. 1, p. 67-71, 2001.

HANSEN, E.; ANDERSEN, J. H. Screening for marine natural products with potential as chemotherapeutics for acute myeloid leukemia. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 17, n. 1, p.71-77, 2016.

HAO, B.; CHENG, S.; CLANCY, C. J. Caspofungin kills *Candida albicans* by causing both cellular apoptosis and necrosis. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.57, n.1, p. 326-332, 2013.

HARDEN, E.; HARTLINE, C.; FALSHAW, R.; CARNACHAN, S.; KERN, E.; PRICHARD, M. Virucidal Activity of Extracts from Four Algae Species Against Herpes Simplex Virus. *Antiviral Research*, v. 78, n 2, p. A1–A76, 2008.

HAYAT, S.; RAHMAN, A.; CHOUDHARY, M. I.; KHAN, K. M.; SCHUMANN, W.; BAYER, E. N- alkylation of anilines, carboxamides and several nitrogen heterocycles using CsF±Celite/alkyl halides/CH₃CN combination. **Tetrahedron**, v. 57, n. 50, p. 9951-9957, 2001.

HENRIQUES, M.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. Adhesion of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to acrylic and hydroxyapatite. **Biointerfaces**. v 33, n 1, p. 235-241, 2004.

HORTA, P.A. **Aspectos taxonômicos e ecologia de macroalgas bênticas**. UFSC, 2000.

HUANG, Q.; HAN, Q.; FU, S.; YAO, Z.; SU, L.; ZHANG, X.; LIN, S.; XIANG, S. Rhodium-Catalyzed NH-Indole-Directed C–H Carbonylation with Carbon Monoxide: Synthesis of 6H-Isoindolo[2,1-a]indol-6-ones. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 81, n. 24, p. 12135-12142, 2016.

KELLY, N. C.; ZIMET, G. D.; AALSMA, M. C.; BERSTEIN, D. I; FORTENBERRY, J. D.; ROSENTHAL, S. L. Intent to accept and acceptance of herpes testing in adolescents and young adults. **Sexually Transmitted Infections**, v. 85, n. 4, p. 296-299, 2009.

KETCHA, D. M.; GRIBBLE, G. W. A Convenient synthesis of 3-acylindoles via Friedel Crafts acylation of 1-(phenylsulfonyl)indole. A new route to pyridocarbazole-5,11-quinones and ellipticine. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 50, n. 26, p. 5451-5457, 1985.

KINSKY, S. C. The effect of polyene antibiotics on permeability in *Neurospora chassa*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 4, p. 353-357, 1961.

KOISHI, A. C.; ZANELLO, P. R.; BIANCO, E. M.; BORDIGNON, J.; SANTOS, C. N. D. Screening of dengue virus antiviral activity of marine seaweeds by an In situ enzyme-linked immunosorbent assay. **PLoS One**, v. 7, n. 12, e51089, 2012.

KÜMMERLE, A. E. **Uma quimioteca de N-acilidrazonas (NAH): a influência da metila na modulação das propriedades analgésicas e anti-inflamatórias de novos candidatos a fármacos**. 2009. Tese – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

LANG, R.; SHI, L.; LI, D.; XIA, C.; LI, F. A general method for palladium-catalyzed direct carbonylation of indole with alcohol and phenol. **Organic letters**. v. 14. n. 16, p. 4130-4133. 2012.

LAURITANO, C.; IANORA, A. Marine organisms with anti-diabetes properties. **Marine Drugs**, v. 14, n. 12, p. 1-14, 2016.

LAVRENOV, S. N.; LUZIKOV, Y. N.; BYKOV, E. E.; REZNIKOVA, M. I.; STEPANOVA, E. V.; GLAZUNOVA, V. A.; VOLODINA, Y. L.; TATARSKY JR., V. V.; SHTIL, A. A.; PREOBRAZHENSKAYA, M. N. Synthesis and cytotoxic potency of novel tris (a-alkylindol-3-yl)methylum salts: role of N-alkyl substituents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 18, p. 6905-6913, 2010.

LE, Z. G.; ZHONG, T.; XIE, Z. B.; LU, X. X.; CAO, X. Green and efficient protocol for N-alkylation of benzotriazole using basic ionic liquid [Bmim]OH as catalyst under solvent-free conditions. **Synthetic Communications**, v. 40, n. 1, p. 2525-2530, 2010.

LEITE, M. C. A.; BEZERRA, A. P. B.; SOUSA, J. P. Evaluation of antifungal activity and action mechanism of citral against *Candida albicans*. **Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1-9, 2014.

LETSCHER-BRU, V.; HERBRECHT, R. Caspofungin: the first representative of a new antifungal class. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v 51, n.3, p. 513-521, 2003.

LIN, X.; LIU, M.; HU, C.; LIAO, D.J. Targeting cellular proapoptotic molecules for developing anticancer agents from marine sources. **Current Drug Targets**, v. 11, n. 6, p. 708-15, 2010.

LIRA, D. F. **Constituintes químicos e atividade biológica dos organismos marinhos: *Caulerpa mexicana*, *Bryothamium triuquetum*, *Hypnea musciformis* e *Ircinia felix***. 2013. Tese – Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

LIU, A; LIU, D.; LIANG, T.; YU, X.; FENG, M.; YAO, L.; FANG, Y.; WANG, B.; FENG, L.; ZHANG, M.; MAO. Caulerprenylols A and B, two rare antifungal prenylated *para*-xylenes from the green alga *Caulerpa racemosa*. **Bioorganic & Medical Chemistry Letters**. v 23, n 9, p. 2491-2494, 2013.

LIU, D. -Q.; MAO, S. -C.; ZHANG, H.-Y.; YU, X. -Q.; FENG, M. -T.; WANG, B.; FENG, L.-H.; GUO, Y. -W. Racemosins A and B, two novel bisindole alkaloids from the green alga *Caulerpa racemosa*. **Fitoterapia**. v. 91, n. 12, p. 15–20, 2013.

LIU, K. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-chromatographic analysis of lipids in biological materials. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. v 71, n 11, p. 1179-1187, 1994.

LIU, R.; ZHANG, P.; GAN, T.; COOK, J. M. Regiospecific bromination of 3-methylindoles with NBS and its application to the concise synthesis of optically active unusual tryptophans present in marine cyclic peptides. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 62, n. 21, p. 7447-7456, 1997.

MACEDO, N. R. P. V.; RIBEIRO, M. S.; VILLAÇA, R. C.; FERREIRA, W.; PINTO, A. M.; TEIXEIRA, V. L.; CIRNE-SANTOS, C.; PAIXÃO, I. C. N. P.; GIONGO, V. Caulerpin as a potential antiviral drug against herpes simplex virus type 1. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 22, n. 4, p. 861-867, 2012.

MALCOLM, A.M.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. **Fields Virology**. 4 ed. Philadelphia, 2001.

MALVE, H. Exploring the ocean for new drug developments: marine pharmacology. **Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences**, v. 8, n. 2, p. 83-91, 2016.

MAUBON, D.; GARNAUD, C.; CALANDRA, T.; SANGLARD, D.; CORNET, M. Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now? **Intensive Care Medicine**. v. 40, n. 9, p. 1241-1255, 2014.

MENESES, E. A.; CAVALCANTE, M. S.; FARIAS, R. B.; TEIXEIRA, A. B.; PINHEIRO, F. G.; BEZERRA, B. P.; TORRES, J. C. N.; CUNHA, F. A. Frequência e atividade enzimática de *Candida albicans* isoladas da mucosa bucal de crianças de uma creche da prefeitura de Fortaleza, Ceará, Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 4, n. 1, p. 9-13, 2005.

MONGE, R. A.; ROMA'N, E.; NOMBELA, C.; PLA, J. The MAP Kinase signal transduction network in *Candida albicans*. **Microbiologia**. v. 152, n. 4, p. 905-912, 2006.

MONTANARI, C. A. **Química medicinal: métodos e fundamentos em planejamento de fármacos**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2011.

MOSMANN, T.. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MÜLLER, V.; VIEMANN, D.; SCHMIDT, M.; ENDRES, N.; LUDWING, S.; LEVERKUS, M. *Candida albicans* triggers activation of distinct signaling pathways to establish a proinflammatory gene expression program in primary human endothelial cells. **Journal of Immunology**. v. 179, n. 1, p. 8435-8445, 2007.

MURRAY, P. R.; ROSENTAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

NAGAPPAM, T.; VAIRAPPAM, C. S. Nutritional and bioactive properties of three edible species of green algae, genus *Caulerpa* (Caulerpaceae). **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 1, p. 1019-1027, 2014.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NIELSEN, P. G.; CARLE, J. S.; CHRISTOPHERSENC, C. Final structure of caulerpicin, a toxic mixture from the green alga *Caulerpa racemosa*. **Phytochemistry**. v. 21, p. 1643-1645, 1982.

OROZCO, A. S.; ZHOU, X.; FILLER, S. G. Mechanisms of the proinflammatory response of endothelial cells to *Candida albicans* infection. **Infect Immunology**. v. 68, n. 3, p. 1134-1141, 2000.

OSUNA-RUIZA, I.; PEZ-SAIZB, C. M.; BURGOS-HERNÁNDEZB, A.; VELA-ZQUEZC, C.; NIEVES-SOTOA, M.; HURTADO-OLIVAA, M. A. Antioxidant, antimutagenic and antiproliferative activities in selected seaweed species from Sinaloa, Mexico. **Pharmaceutical biology**, 2016.

OTTONI, O.; CRUZ, R.; ALVES, R. Efficient and simple methods for the introduction of sulfonyl, acyl and alkyl protecting groups on the nitrogen of indole and its derivatives. **Tetrahedron**, v. 54, n. 46, p. 1315-1328, 1998.

PATRICK, G. L. **An introduction to Medicinal Chemistry**. 5 ed. Oxford:Oxford university press, 2013.

PAUL, V. J.; FENICAL, W. Diterpenoid metabolites from pacific marine algae of the order Caulerpaceae (Chlorophyta). **Phytochemistry**. v. 24, n. 10, p. 2239-2243, 1985.

PAUL, V. J.; LITTLER, M. M.; LITTLER, D. S.; FENICAL, W. J. Evidence for chemical defense in tropical green alga *Caulerpa ashmeadii* (CAULERPACEAE: CLOROPHYTA): Isolation of new bioactive sesquiterpenoids. **Chemical Ecology**. v. 13, n. 5, p. 1171-1185, 1987.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 1 ed. São Paulo: Cengage Learning, 2012.

PRABHAKAR, K.; SATHISH-KUMAR, L.; RAJENDRAN, S.; CHANDRASEKARAN, M.; BHASKAR, K.; SAIJT-KHAN, A. K. Antifungal activity of plant extracts against *Candida* species from oral lesions. **Indian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 70, n. 6, p. 801-803, 2008.

PUTANAM, K. P.; BOMBICK, D.W.; DOOLITTLE, D.J. Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. **Toxicology in Vitro**, v. 16, n.5, p. 599-607, 2002.

RAMAGE, G.; SAVILLE, S. P.; THOMAS, D. P.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. *Candida* biofilms: an update. **Eukaryot Cell**. v. 4, n. 4, p. 633-638, 2005.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 7ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

RAUB, M. F.; CARDELLINA, J. H., II; SCHWEDE, J. G. The green algal pigment caulerpin as a plant growth regulator. **Phytochemistry**. v. 26, n.3, p. 619-620, 1987.

RÍOS, N.; MEDINA, G.; JIMÉNEZ, J.; YÁNEZ, C.; GARCIA, M. Y.; BERNARDO, M. L.; GUALTIERI, M. Actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de algas marinhas venezolanas. **Revista Peruana de Biología**., v. 16, n. 1, p. 97-100, 2009.

ROIZMAN, B.; KNIPE, D.M. Herpes Simplex virus and their replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E.; LAMB, R.A.; MALCOLM, A.M.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E. **Fields Virology**. 4 ed. v. 1. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2001.

RUTHER, T.; ROSS, T.; MENSFORTH, E.; HOLLENKAMP, A. F. N-alkylation of N-heterocyclic ionic liquid precursors in ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 11, n. 6, p. 804-809, 2009.

SALTCORNER. **Algae**. Disponível em: <<http://www.saltcorner.com/LMAM/ShowChapter.php?ChapterID=18>>. Acesso em: 07 mar. 2016.

SARMIENTO, G. P.; VITALE, R. G.; AFELTRA, J.; MOLTRASIO, G. Y.; MOGLIONI, A. G. Synthesis and antifungal activity of some substituted phenothiazines and related compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 1, p. 101-105, 2011.

SAULNIER, M. G.; GRIBBLE, G. W. Generation and Reactions of 3-Lithio-1-(phenylsulfonyl) indole. **Organic Chemistry**. v 47, n 5, p 757-761, 1982.

SCHRODER, H. C.; BADRIA, F. A.; AYYAD, S. N.; BATEL, R.; WIENS, M.; HASSANEIN, H. M. A.; KURELEC, B.; MULLER, W. E. G. Inhibitory effects of extracts from the marine alga *Caulerpa taxifolia* and of toxin from *Caulerpa racemosa* on multixenobiotic resistance in the marine sponge *Geodia cydonium*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 5, n. 2, p. 119-126, 1998.

SCHWEDE, J. G.; CARDELLINA II, J. H.; GROPE, S. H.; JAMES JR, T. R.; BLACKMAN, A. J. Distribution of the pigment caulerpin in species of the green alga *Caulerpa*. *Phytochemistry*. v. 26, n. 1, p. 155-158, 1987.

SELIM, S.; AMIN, A.; HASSAN, S.; HAGAZEY, M. Antibacterial, cytotoxicity and anticoagulant activities from *Hypnea esperi* and *Caulerpa prolifera* marine algae. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 28, n.2, p. 525-530, 2015.

SELLAM, A.; WHITEWAY, M. Recent advances on *Candida albicans* biology and virulence. **F100Research**, v. 5, p. 2582, 2016.

SHAHAPUR, P. R.; BIDRI, R. C. Recent trends in the spectrum of opportunistic infections in human immunodeficiency virus infected individuals on antiretroviral therapy in South India. **Journal of Natural Science, Biology and Medicine**. v. 5, n. 2, p. 392-396, 2014.

SIDDIQUI, Z. N.; FAROOQ, F.; MUSTHAFA, T. N. M. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**. v. 17, n.2, p. 237-243, 2013.

SILBER, J.; KRAMER, A.; LABES, A.; TASDEMIR, D. From discovery to production: biotechnology of marine fungi for the production of new antibiotics. **Marine Drugs**, v. 14, n. 7, p. 1-20, 2016.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C. P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

SLATER, T. F.; SAWYER, B.; STRAULI, U. Studies on succinate-tetrazolium reductase system. III. Points of coupling of four tetrazolium salts. **Biochimica et Biophysica Acta**. v 77, p. 383-393, 1963.

SOARES, A. R.; ROBAÍNA, M. C. S.; MENDES, G. S.; SILVA, T. S. L.; GESTINARI, L. M. S.; PAMPLONA, O. S.; YONESHIGUE-VALETIN, Y.; KAISER, C. R.; ROMANOS, M.

T. V. Antiviral activity of extracts from Brazilian seaweeds against herpes simplex virus. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 4, p. 714-723, 2012.

SOERENS, D.; SANDRIN, J.; UNGEMACH, F.; MOKRY, P.; WU, G. S.; YAMANAKA, E.; HUTCHINS, L.; DIPIERRO, M.; COOK, J. M. Study of the Pictet-Spengler reaction in aprotic media: synthesis of the beta-galactosidase inhibitor, pyridindolol. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 44, n. 4, p. 535-545, 1979.

SOUSA, J. C. F. **Semi-síntese de novos derivados da caulerpina**. 2016. Tese – Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

SOUSA, M. B.; PIRES, K. M.S.; ALENCAR, D.B.; SAMPAIO, A. H.; SAKER-SAMPAIO, S. α -, β -caroteno e α tocoferol em algas marinhas in natura α - and β -carotene, and α -tocopherol in fresh seaweeds. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n 4, p. 953-958, 2008.

SOUTH, G.R.; WHITTICK, A. Introduction to Phycology. 1 ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, p. 344, 1987.

SOUZA, E. T.; LIRA, D. P.; QUEIROZ, A. C.; SILVA, D. J. C., AQUINO, A. B.; MELLA, E. A. C.; LORENZO, V. P.; MIRANDA, G. E. C.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; CHAVES, M. C. O.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; SANTOS, B. V. O.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. The antinociceptive and anti-inflammatory activities of caulerpin, a bisindole alkaloid isolated from seaweeds of the genus *caulerpa*. **Marine Drugs**. v. 7, n.1, p. 689-704, 2009.

SOUZA, T. M.; ABRANTES, J. L.; EPIFANIO, R. A.; LEITE-FONTES, C. F.; FRUGULHETTI, I. C. The alkaloid 4-methylaaptamine isolated from the sponge *Aaptos aaptos* impairs Herpes simplex virus type 1 penetration and immediate-early protein synthesis. **Planta Medica**, v. 73, n. 3, p. 200-205, 2007.

SPEAR, P.G. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. **Cell Microbiology**. v. 6, n. 5, p. 401-410, 2004.

SU, J. -Y.; ZHU, Y.; ZENG, L. -M.; XU, X. -H. A new bisindole from alga *Caulerpa serrulata*. **Natural Products Reports**. v. 60, n. 10, p. 1043-1044, 1997.

TANG, H. J.; LIU, W. L.; LIN, H. L.; LAI, C. C. Epidemiology and prognostic factors of candidemia in cancer patients. **Plos One**. v. 9, n. 6, p. 99- 103, 2014.

THEIN, Z. M.; SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. **Archives of Oral Biology**. v. 51, n. 1, p. 672-680, 2006.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R., CASE, C. L. **Microbiologia**. 8 ed. Porto alegre: Artmed, 2005.

TORTORANO, A. M.; KIBBLER, C.; PEMAN, J.; BERNHARDT, H.; KLINGSPOR, L.; GRILLOT, R. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 27, n. 5, p. 359-366, 2006.

TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 6 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2015.

TSUI, C.; KONG, E. F.; JABRA-RIZK, M. A. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. **Pathogens and Disease**, v. 74, n. 4, p. 1-13, 2016.

VAIRAPPAN, C. S. Antibacterial activity of major secondary metabolites found in four species of edible green macroalgae genus *Caulerpa*. **Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences**, v. 6, n. 2, p. 197-201, 2004.

VEST, S. E.; DAWES, C. J.; ROMEO, J. T. Distribution of caulerpin and caulerpicin in eight species of the green alga *Caulerpa* (Caulerpales). **Botanica Marina**. v. 26, p. 313-316, 1983.

VOYLES, B. A. **The biology of viruses**. St Louis: Mosby-Year book, 1993. 386p.

VYPRACHTICKY, D.; KMÍNEK, I.; POKORNA, V.; CIMROVA, V. Efficient synthesis of N-alkyl-2,7-dihalocarbazoles by simultaneous carbazole ring closure and N-alkylation. **Tetrahedron**, v. 68, n. 25, p. 5075-5080, 2012.

WANG, N. C.; TEO, K.; ANDERSON, H. J. Pyrrole chemistry. XVII. Alkylation of the pyrrolyl ambident anion. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 55, n. 23, p. 4112-4116, 1977.

WAN-LOY, C.; SIEW-MOI, P. Marine algae as a potential source for anti-obesity agents. **Marine Drugs**, v. 14, n. 12, p. 1-19, 2016.

WHITE, D. O.; FENNER, F. J. **Medical Virology**. 4 ed, San Diego: Academic, 1994. 603p.

WHITLEY, R.J.; ROIZMAN, B. Herpes simplex virus infections. **The Lancet**. v. 357, n. 9267, p. 1513–1518, 2001.

XING, Q.I.; PAN, L.I.; HUI, L.V.; RUI, L. A. N. G.; CHUNGU, X. I. A.; FUWEI, L. I. Acid-Catalyzed Acylation Reaction *via* C–C Bond Cleavage: A Facile Approach to 3-Acylindole. Electronic Supplementary Material (ESI) for ChemComm. **Royal Society of Chemistry**, v.50, p. 12181-12184, 2015.

XU, S. H.; CHEN, Y. Z.; ZENG, L. M. Isolation and identification of red prism from *Caulerpa sertularioides*. **Huaxue Shijie**. v. 20, n. 5, p. 265-266, 1998.

YANG, C.; CHEN, H.; LU, S.; ZHANG, M.; TIAN, W.; WANG, M.; ZHANG, L.; SONG, Y.; SHEN, A.; ZHOU, Y.; ZHU, J.; ZHENG, C. Structural modification of luteolin from *Flos chrysanthemi* leads to increased tumor cell growth inhibitory activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 15, p. 3464-3467, 2016.

YANG, H.; LIU, D. Q.; LIANG, T. J.; LI, J.; LIU, A. H.; YANG, P.; LIN, K.; YU, X. Q.; GUO, Y. W.; MAO, S. C.; WANG, B. J. Racemosin C, a novel minor bisindole alkaloid with protein tyrosine phosphatase-1B inhibitory activity from the green alga *Caulerpa racemosa*, **Journal of Asian Natural Products Research**, v.16, n. 12, p. 1158-1165, 2014.

YANG, P.; LIU, D.; LIANG, T.; ZHANG, H.; LIU, A.; GUO, Y.; MAO, S. Bioactive constituents from the green alga *Caulerpa racemosa*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v 23, n.1, p. 38-45, 2015.

YE, Q.; MAO, W.; ZHOU, Y.; XU, L.; LI, Q.; GAO, Y.; WANG, J.; LI, C.; XU, Y.; XU, Y.; LIAO, H.; ZHANG, L.; GAO, J.; LI, J.; PANG, T. Synthesis and biological evaluation of 3-([1,2,4]triazolo [4,3-a]pyridin-3-yl)-4-(indol-3-yl)-maleimides as potent, selective GSK-3 β inhibitors and neuroprotective agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 5, p. 1179-1188, 2015.

YILMAZ-KARADAG, F.; ERGEN, P.; AYDIN, O.; DOGRU, A.; TANIDIR, B.; VAHABOGLU, M. H. Evaluation of epidemiological characteristics and risk factors affecting mortality in patients with candidemia. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 46, n. 6, p. 1724-1728, 2016.

YU, H.; ZHANG, H.; DONG, M.; WU, Z.; SHEN, Z.; XIE, Y.; KONG, Z.; DAI, X.; XU, B. Metabolic reprogramming and AMPK α 1 pathway activation by caulerpin in colorectal cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 50, n. 1, p. 161-172, 2017.

ZHAO, M.; KAMADA, T.; TAKEUCHI, A.; NISHIOKA, H.; KURODA, T.; TAKEUCHI, Y. Structure-activity relationship of indoloquinoline analogs anti-MRSA. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 23, p. 5551-5554, 2015.

ZHAO, S.; KANG, J.; DU, Y.; KANG, J.; ZHAO, X.; XU, Y.; CHEN, R.; WANG, Q.; SHI, X. An efficient ultrasound-assisted synthesis of N-Alkyl Derivatives of carbazole, indole, and phenothiazine. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 51, n. 5, p. 683-689, 2014.

ZHENG, C.; ZHANG, M.; CHEN, H.; WANG, C.; ZHANG, M.; JIANG, J.; TIAN, W.; LV, J. LI, T.; ZHU, J.; ZHOU, Y. Luteolin from *Flos chrysanthemi* and its derivatives: new small molecule Bcl-2 protein inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 19, p. 4672-4677, 2014.

ZILBERBERG, M. D.; KOTHARI, S.; SHORR, A. F. Cost-effectiveness of micafugin as an alternative to fluconazole empiric treatment of suspected ICU-acquired candidemia among patients with sepsis: a model simulation. **Critical Care**, v. 13, n. 3, p. 1-11, 2009.