

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

Jéssica Celestino Ferreira Sousa

**SEMI-SÍNTESE DE NOVOS DERIVADOS DA CAULERPINA E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO ÁCIDO CAULERPÍNICO**

ORIENTADORA: Prof. Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Kristerson Reinaldo de Luna Freire

JOÃO PESSOA-PB

2016

JÉSSICA CELESTINO FERREIRA SOUSA

**SEMI-SÍNTESE DE NOVOS DERIVADOS DA CAULERPINA E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO ÁCIDO CAULERPÍNICO**

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: Prof. Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Kristerson Reinaldo de Luna Freire

JOÃO PESSOA-PB

2016

S725s Sousa, Jéssica Celestino Ferreira.
 Semi-síntese de novos derivados da Caulerpina e
 avaliação da atividade leishmanicida do ácido caulerpínico /
 Jéssica Celestino Ferreira Sousa.- João Pessoa, 2016.
 162f. : il.
 Orientadora: Bárbara Viviana de Oliveira Santos
 Coorientador: Kristerson Reinaldo de Luna Freire
 Tese (Doutorado) - UFPB/CCS
 1. Produtos naturais. 2. Caulerpa racemosa. 3. Caulerpina.
 4. Modificação estrutural.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

JÉSSICA CELESTINO FERREIRA SOUSA

**SEMI-SÍNTESE DE NOVOS DERIVADOS DA CAULERPINA E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO ÁCIDO CAULERPÍNICO**

Tese aprovada em 29/08/2016

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos

Universidade Federal da Paraíba – Orientadora

Prof. Dr. Kristerson Reinaldo de Luna Freire

Universidade Federal da Paraíba – Co-orientador

Prof. Dr. Luís Cezar Rodrigues

Universidade Federal da Paraíba – Examinador Externo

Prof. Dr. Ionaldo José Lima Diniz Basílio

Universidade Federal da Paraíba – Examinador Externo



Prof. Dra. Maria de Fátima Vanderlei de Souza

Universidade Federal da Paraíba – Examinador Interno



Prof. Dr. Marcus Tullius Scotti

Universidade Federal da Paraíba – Examinador Interno

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Ivo de Lima Ferreira e Cláudia de Cássia
Celestino Ferreira por terem concedido todos os seus
ensinamentos, concedendo-me como maior herança a
educação.*

“Conhecerão a verdade, e a verdade os libertará.”

Jesus (Jo. 8:32)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram diretamente e indiretamente para a realização desse trabalho. Em especial a minha orientadora, Prof. Dra. Bárbara Viviana de Oliveira Santos, por ter me concedido a oportunidade de ingressar neste meio acadêmico, por todos os ensinamentos valiosos, apoio, dedicação, compreensão, incentivo, paciência e amizade.

Ao meu Co-orientador Prof. Dr. Kristerson Reinaldo de Luna Freire, pelos ensinamentos científicos.

A Prof. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira da Universidade Federal de Alagoas pela excelente contribuição para o sucesso desse trabalho.

Ao Prof. Dr. George Emmanuel Cavalcanti de Miranda da Universidade Federal da Paraíba pela identificação do material marinho.

A doutoranda Ana Carolina Santana Vieira da Universidade Federal de Alagoas pelo apoio na realização dos testes farmacológicos.

Ao Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia Ambientes Marinhos Tropicais: Heterogeneidade Espaço-Temporal e Respostas à Mudanças Climáticas (INCT AmbTropic) que de acordo com o Edital MCT/CNPq/FNDCT Nº 71/2010 proporcionou o apoio financeiro para a realização desse trabalho.

A todos que fazem parte do Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (professores, alunos e todos os funcionários),

A Universidade Federal da Paraíba e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro concedido.

RESUMO

Espécies do gênero *Caulerpa* (família Caulerpaceae, ordem das Bryopsidales) ocorrem em mares tropicais e subtropicais. A caulerpina (CLP), substância majoritária desse gênero, isolada de várias espécies *Caulerpa*, apresenta várias atividades biológicas, como antioxidantes, antifúngica, inibidor da acetilcolinesterase, antinociceptiva, anti-inflamatória, além de efeitos antiviral e antitumoral. De acordo com o potencial farmacológico dessa molécula, novos estudos foram realizados para o desenvolvimento de derivados pela introdução de novos substituintes nas posições N-indol e do grupo ésteres da CLP, podendo resultar em diferenças químicas significativas e diferentes propriedades farmacológicas. Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivos isolar a substância CLP da espécie *Caulerpa racemosa* e realizar modificações estruturais para a obtenção de novos derivados bem como avaliar a atividade leishmanicida da CLP e do ácido caulerpínico. A partir do extrato etanólico da *Caulerpa racemosa* foi isolado a CLP que foi utilizada como protótipo na semi-sínteses realizadas. Obteve-se 9 (nove) derivados, (6E, 13E)-5,12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-ácido dicarboxílico, já descrito na literatura e os demais derivados inéditos na literatura: (6E,13E)-dibutil 5,12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato; (6E,13E)-diisobutil 5,12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato; (6E,13E)-dipropil 5,12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato; (6E,13E)-dietil 5,12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato; (6E,13E)-dipentil 5,12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato; (6E,13E)-diisopentil 5,12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato; (6E,13E)-dialil 5,12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato; (6E,13E)-dimetil 5,12-diacetil-5,12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato. Todos os constituintes químicos foram identificados por meio de técnicas espectroscópicas de infravermelho e RMN de ^1H e ^{13}C . Estudo realizado com a CLP e o ácido caulerpínico mostrou que esse exibiu atividade significativa contra promastigotas de *Leishmania amazonenses*.

Palavras chaves: *Caulerpa racemosa*, Caulerpina, Modificação estrutural.

ABSTRACT

The *Caulerpa* genus was recognized by Lamouroux as the Caulerpaceae family, belonging to the order of Bryopsidales. Species and subspecies of this genus are distributed mainly in tropical and subtropical seas. The major substance of this genus is the caulerpina, bis-indolealkaloid, first isolated in 1970 from the species *Caulerpa racemosa*. Several studies using caulerpina showed various biological activities such as antioxidant, antifungal, acetylcholinesterase inhibitor, antinociceptive and anti-inflammatory, as well as antiviral and anti tumor effect. According to the pharmacological potential of this molecule, further studies were performed to develop analogues by introducing new substituents can result in significant chemical differences and different pharmacokinetic properties. This study aims to isolate caulerpine; make structural modifications to obtain novel analogues of caulerpine; and assess the potential cytotoxic and leishmanicide of caulerpine and derivatives. From the ethanol extract of the *Caulerpa racemosa* it was possible to isolate the caulerpine substance and from performed semi-synthesis was obtained the following derivatives, (6*E*, 13*E*)-5,12-dihydrocycloocta [1,2-*b*: 5,6-*B'*]diindole-6,13-dicarboxylic acid, as described in the literature and other novel derivatives in the literature: (6*E*, 13*E*)-dibutyl 5, 12 dihydrocycloocta[1,2-*b*: 5,6-*b'*]diindole-6,13-dicarboxylate; (6*E*, 13*E*)-diisobutyl 5, 12 dihydrocycloocta[1,2-*b*: 5,6-*b'*]diindole-6,13-dicarboxylate; (6*E*, 13*E*)-dipropyl 5, 12 dihydrocycloocta[1,2-*b*: 5,6-*b'*]diindole-6,13-dicarboxylate; (6*E*, 13*E*)-diethyl 5, 12 dihydrocycloocta[1,2-*b*: 5,6-*b'*]diindole-6,13-dicarboxylate; (6*E*, 13*E*)-diethyl 5, 12 dihydrocycloocta[1,2-*b*: 5,6-*b'*]diindole-6,13-dicarboxylate; (6*E*, 13*E*)-dipentyl 5, 12 dihydrocycloocta[1,2-*b*: 5,6-*b'*]diindole-6,13-dicarboxylate; (6*E*, 13*E*)-diisopentyl 5, 12 dihydrocycloocta[1,2-*b*: 5,6-*b'*]diindole-6,13-dicarboxylate; (6*E*, 13*E*)-diallyl 5, 12 dihydrocycloocta[1,2-*b*: 5,6-*b'*]diindole-6,13-dicarboxylate; (6*E*,13*E*)-dimethyl 5,12-diacetyl 5, 12 dihydrocycloocta[1,2-*b*: 5,6-*b'*]diindole-6,13-dicarboxylate. All chemical constituents were identified by infrared spectroscopic techniques and ¹H and ¹³C NMR. The CLP and caulerpinic acid study demonstrated significant activities against promastigotes of Amazon Leishmania.

Keywords: *Caulerpa racemosa*, Caulerpine, Structural change.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais substâncias isoladas do Gênero <i>Caulerpa</i>	26
Figura 2. Principais substâncias isoladas do Gênero <i>Caulerpa</i>	27
Figura 3. <i>Caulerpa racemosa</i>	28
Figura 4. <i>Caulerpina</i> (1).....	30
Figura 5. Forma evolutiva intracelular: amastigotas (A) e formas promastigotas (B) de <i>Leishmania</i> spp.	34
Figura 6. Ciclo biológico da Leishmaniose.	35
Figura 7. Distribuição da Leishmaniose Cutânea no Velho e Novo Mundo.....	36
Figura 8. Distribuição da Leishmaniose Visceral no Velho e Novo Mundo..	36
Figura 9. Estrutura química da caulerpina (1).	68
Figura 10. Espectro de IV da caulerpina	71
Figura 11. Espectro de RMN de ^1H da <i>Caulerpina</i> (200 MHz, CDCl_3)	72
Figura 12. Espectro de RMN de ^{13}C da <i>Caulerpina</i> (50 MHz, CDCl_3)	73
Figura 13. Estrutura química do derivado (2) da caulerpina.....	76
Figura 14. Espectro de IV do derivado (2).....	79
Figura 15. Espectro de IV do derivado (2).....	80
Figura 16. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado (2) (50 MHz, CD_3OD)	81
Figura 17. Estrutura química do derivado (3) da caulerpina.....	84
Figura 18. Espectro de IV do derivado (3).....	87
Figura 19. Espectro de RMN de ^1H do derivado (3) (200 MHz, CDCl_3).....	88
Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado (3) (50 MHz, CDCl_3)	89
Figura 21. Estrutura química do derivado (4) da caulerpina.....	92
Figura 22. Espectro de IV do derivado (4).....	95
Figura 23. Espectro de RMN de ^1H do derivado (4) (200 MHz, CDCl_3).....	96
Figura 24. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado (4) (50 MHz, CDCl_3)	97
Figura 25. Estrutura química do derivado (5) da caulerpina.....	100
Figura 26. Espectro de IV do derivado (5).....	103
Figura 27. Espectro de RMN de ^1H do derivado (5) (200 MHz, CDCl_3).....	104
Figura 28. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado (5) (50 MHz, CDCl_3).	105
Figura 29. Estrutura química do derivado (6) da caulerpina.....	107
Figura 30. Espectro de IV do derivado (6).....	110
Figura 31. Espectro de RMN de ^1H do derivado (6) (200 MHz, CDCl_3).....	111

Figura 32. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado (6) (50 MHz, CDCl_3).	112
Figura 33. Estrutura química do derivado (7) da caulerpina.....	114
Figura 34. Espectro de IV do derivado (7).....	117
Figura 35. Espectro de RMN de ^1H do derivado (7) (200 MHz, CDCl_3).....	118
Figura 36. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado (7) (50 MHz, CDCl_3).	119
Figura 37. Estrutura química do derivado (8) da caulerpina.....	121
Figura 38. Espectro de IV do derivado (8).....	124
Figura 39. Espectro de RMN de ^1H do derivado (8) (200 MHz, CDCl_3).....	125
Figura 40. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado (8) (50 MHz, CDCl_3).	126
Figura 41. Estrutura química do derivado (9) da caulerpina.....	128
Figura 42. Espectro de IV do derivado (9).....	131
Figura 43. Espectro de RMN de ^1H do derivado (9) (500 MHz, CDCl_3).....	132
Figura 44. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado (9) (125 MHz, CDCl_3).	133
Figura 45. Estrutura química do derivado (10) da caulerpina.....	136
Figura 46. Espectro de IV do derivado (10).....	139
Figura 47. Espectro de RMN de ^1H do derivado (10) (200 MHz, CDCl_3).....	140
Figura 48. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado (10) (50 MHz, CDCl_3).	141
Figura 49. A citotoxicidade do ácido caulerpínico em camundongos BALB/C e com macrófagos peritoneais. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução do MTT.....	144
Figura 50. Atividade do ácido caulerpínico contra parasitas intracelulares 48 h após a infecção... ..	144
Figura 51. Macrófagos infectados, in vitro, com <i>L. amazonensis</i> (setas vermelhas), amastigotas (seta verde), derivado sintético ácido caulerpínico.....	145

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados de RMN de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50MHz) da caulerpina registrados em CDCl_3	69
Tabela 2. Dados comparativos de RMN ^{13}C da caulerpina isolada (δ , CDCl_3 , 50 MHz) com modelos da literatura (δ , CDCl_3 , 125 MHz) (LORENZO,2010).....	70
Tabela 3. Dados de RMN de ^1H (200 Hz) e ^{13}C (50 Hz) do derivado (2) registrados em CDCl_3	77
Tabela 4. Dados comparativos de RMN ^{13}C da caulerpina isolada (δ , CDCl_3 , 200 MHz) com o derivado (2) (δ , CDCl_3 , 50 MHz)	78
Tabela 5. Dados de RMN de ^1H (200 Hz) e ^{13}C (50 Hz) do derivado (3) registrados em CDCl_3	85
Tabela 6. Dados comparativos de RMN ^{13}C da caulerpina isolada (δ , CDCl_3 , 50 MHz) com o derivado (3) (δ , CDCl_3 , 50 MHz).....	86
Tabela 7. Dados de RMN de ^1H (200 Hz) e ^{13}C (50 Hz) do derivado (4) registrados em CDCl_3	93
Tabela 8. Dados comparativos de RMN ^{13}C da caulerpina isolada (δ , CDCl_3 , 50 MHz) com derivado (4) (δ , CDCl_3 , 50 MHz).	94
Tabela 9. Dados de RMN de ^1H (200 Hz) e ^{13}C (50 Hz) do derivado (5) registrados em CDCl_3	101
Tabela 10. Dados comparativos de RMN ^{13}C da caulerpina isolada (δ , CDCl_3 , 50 MHz) com derivado (5) (δ , CDCl_3 , 50 MHz).	102
Tabela 11. Dados de RMN de ^1H (200 Hz) e ^{13}C (50 Hz) do derivado (6) registrados em CDCl_3	108
Tabela 12. Dados comparativos de RMN ^{13}C da caulerpina isolada (δ , CDCl_3 , 50 MHz) com derivado (6) (δ , CDCl_3 , 50 MHz).	109
Tabela 13. Dados de RMN de ^1H (200 Hz) e ^{13}C (50 Hz) do derivado (7) registrados em CDCl_3	115
Tabela 14. Dados comparativos de RMN ^{13}C da caulerpina isolada (δ , CDCl_3 , 50 MHz) com derivado (7) (δ , CDCl_3 , 50 MHz).	116
Tabela 15. Dados de RMN de ^1H (200 Hz) e ^{13}C (50 Hz) do derivado (8) registrados em CDCl_3	122
Tabela 16. Dados comparativos de RMN ^{13}C da caulerpina isolada (δ , CDCl_3 , 50 MHz) com derivado (8) (δ , CDCl_3 , 50 MHz).	122

Tabela 17. Dados de RMN de ^1H (500 Hz) e ^{13}C (125 Hz) do derivado (9) registrados em CDCl_3	129
Tabela 18. Dados comparativos de RMN ^{13}C da caulerpina isolada (δ , CDCl_3 , 125 MHz) com derivado (9) (δ , CDCl_3 , 50 MHz).	130
Tabela 19. Dados de RMN de ^1H (200 Hz) e ^{13}C (50 Hz) do derivado (10) registrados em CDCl_3	137
Tabela 20. Dados comparativos de RMN ^{13}C da caulerpina isolada (δ , CDCl_3 , 200 MHz) com derivado (10) (δ , CDCl_3 , 200 MHz).	138
Tabela 21. Efeito leishmanicida de Pentamidina, Ácido Caulerpínico e Caulerpina contra promastigotas <i>L. amazonensis</i>	143

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt: Acetato de Etila

Ara-A: Adenina-arabinosídeo

Ara:C: Citosina-arabinosídeo

BB: Broadening

CC: Cromatografia de adsorção em coluna

CCDA: Cromatografia em camada delgada analítica

CCDP: Cromatografia em camada delgada preparativa

CDCl₃: Clorofórmio deuterado

CD₃OD: Metanol deuterado

***d*:** Dupleto

***dd*:** Duplo dupleto

EtOH: Etanol

g: Grama

HCl: Ácido clorídrico

Hz: Hertz

IV: Infravermelho

J: Constante de acoplamento

LiOH: Hidróxido de Lítio

***m*:** Multiplete

MeOH: Metanol

mg: miligrama

mL: mililitro

MHz: Megahertz

nm: Nanômetro

Na₂SO₄: Sulfato de sódio anidro

p.: Página

RMN de ¹H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN de ¹³C: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

s: Simpleto

SI: Sistema Internacional de Unidades

t: Tripleto

Unicamp: Universidade de Campinas

UFPB: Universidade Federal da Paraíba

UV: Ultravioleta

δ: Deslocamento químico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	23
2.1. Algas Marinhas	23
2.2. Macroalgas Verdes (Chlorophytas).....	23
2.2.1. Considerações sobre o gênero <i>Caulerpa</i> Lamouroux(Caulerpaceae) e <i>Caulerpa racemosa</i> (Forsskal) J. Agardh.....	24
2.2.2. Considerações sobre a espécie <i>Caulerpa racemosa</i> (Forsskal) J. Agardh.....	28
2.3. Caulerpina (CLP)	29
2.4 A ESTRATÉGIA DA MODIFICAÇÃO MOLECULAR.....	31
3. LEISHMANIA.....	32
3.1 Epidemiologia.....	32
3.2. O agente etiológico da Leishmania e seu ciclo evolutivo	33
3.3. Distribuição Geográfica.....	35
3.4. Formas Clínicas	37
3.5. Arsenal Terapêutico	39
4. OBJETIVOS	42
5. METODOLOGIA.....	45
5.1. Métodos Cromatográficos	45
5.2. Métodos Espectrométricos.....	45
5.3. Coleta e processamento da <i>Caulerpa racemosa</i>	46
5.4. Obtenção do extrato.....	46
5.5. Isolamento da Caulerpina	47
5.6. Procedimento Experimental	48
5.6.1. Obtenção dos Derivados da Caulerpina	48
5.6.1.1. Obtenção do(6 <i>E</i> , 13 <i>E</i>)-5,12-dihidrocicloocta[1,2- <i>b</i> :5,6- <i>b'</i>]diindol-6,13-ácido dicarboxílico (2)	48
5.6.1.2. Obtenção do (6 <i>E</i> ,13 <i>E</i>)-dibutil 5,12-dihidrocicloocta[1,2- <i>b</i> :5,6- <i>b'</i>]diindol-6,13-dicarboxilato (3)	49
5.6.1.3. Obtenção do (6 <i>E</i> ,13 <i>E</i>)-diisobutil 5,12-dihidrocicloocta[1,2- <i>b</i> :5,6- <i>b'</i>]diindol-6,13-dicarboxilato (4).....	51
5.6.1.4. Obtenção do (6 <i>E</i> ,13 <i>E</i>)-dipropil 5, 12-dihidrocicloocta[1,2- <i>b</i> :5,6- <i>b'</i>]diindol-6,13-dicarboxilato (5).....	53

5.6.1.5. Obtenção do (6 <i>E</i> ,13 <i>E</i>)-dietil 5,12-dihidrocicloocta[1,2- <i>b</i> :5,6- <i>b'</i>]diindol-6,13-dicarboxilato (6)	55
5.6.1.6. Obtenção do (6 <i>E</i> ,13 <i>E</i>)-dipentil 5,12-dihidrocicloocta[1,2- <i>b</i> :5,6- <i>b'</i>]diindol-6,13-dicarboxilato (7)	56
5.6.1.7. Obtenção do (6 <i>E</i> ,13 <i>E</i>)-diisopentil 5,12-dihidrocicloocta[1,2- <i>b</i> :5,6- <i>b'</i>]diindol-6,13-dicarboxilato (8).....	58
5.6.1.8. Obtenção do (6 <i>E</i> ,13 <i>E</i>)-dialil 5,12-dihidrocicloocta[1,2- <i>b</i> :5,6- <i>b'</i>]diindol-6,13-dicarboxilato (9)	60
5.6.1.9. Obtenção do (6 <i>E</i> ,13 <i>E</i>)-dimetil 5,12-diacetil-5,12-dihidrocicloocta[1,2- <i>b</i> :5,6- <i>b'</i>]diindol-6,13-dicarboxilato(10).....	62
5.7. Estudo da atividade leishmanicida	63
5.7.1. Cultura de promastigotas	63
5.7.2. Ensaio de viabilidade sobre formas promastigotas	63
5.7.3. Cultura de macrófagos	63
5.7.4. Ensaio de viabilidade de macrófagos.....	64
5.7.5. Ensaio de amastigotas	64
6.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
6.1. Caracterização estrutural da Caulerpina	66
6.2. Obtenção e caracterização estrutural do derivado 2 (ácido caulerpínico).....	74
6.3. Obtenção e caracterização estrutural do derivado (3)	82
6.4. Obtenção e caracterização estrutural do derivado (4)	90
6.5. Obtenção e caracterização estrutural do derivado (5)	98
6.6. Obtenção e caracterização estrutural do derivado (6)	106
6.7. Obtenção e caracterização estrutural do derivado (7)	113
6.8. Obtenção e caracterização estrutural do derivado (8)	120
6.9. Obtenção e caracterização estrutural do derivado (9)	127
6.10. Obtenção e caracterização estrutural do derivado (10)	134
7. ATIVIDADE LEISHMANICIDA.....	143
8. CONCLUSÃO.....	147
9. REFERÊNCIAS.....	152

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A química de produtos naturais sempre teve papel relevante para o desenvolvimento de fármacos, cosméticos e outros bioprodutos, dado a diversidade estrutural e grupo funcionais presentes em milhares de substâncias que compõem a biodiversidade brasileira. Um exemplo disto é a quantidade de medicamentos inspirados nos produtos naturais como antitumorais, fármacos para tratamento de doenças cardíacas, do sistema nervoso central (SNC), diabetes, anti-inflamatórios, antivirais, etc. (BONZANI, 2016).

Diversas estratégias e metodologias são disponíveis para que se possa sintetizar e descobrir novos fármacos. A química de produtos naturais representa uma dessas estratégias, visto que a maioria dos fármacos em uso clínico é de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese química planejada a partir de modelos estruturais dos produtos naturais. Esses dados comprovam a importância da parceria entre Químicos Medicinais e Químicos de Produtos Naturais para a descoberta de fármacos inovadores (BARREIRO E BOZANI *et al.*, 2009).

Neste contexto, a comunidade científica, na busca de novas entidades químicas de origem natural juntamente com os avanços nas técnicas de isolamento e caracterização química, os progressos e a sofisticação dos bioensaios, que se mostram cada vez mais eficazes, receberam o reforço de mais um importante grupo de profícuos produtores de moléculas interessantes, os organismos marinhos (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2009).

Produtos marinhos vêm despertando o interesse de laboratórios de pesquisa das empresas farmacêuticas e nos últimos anos algumas companhias foram fundadas com o objetivo de desenvolver novos fármacos baseados em protótipos de origem marinha. É o caso da PharmaMar, fundada em 1986 e, hoje, uma divisão do grupo Zeltia, que nos últimos 20 anos investiu mais de 1,2 bilhão de reais na pesquisa de fármacos de origem marinha com potencial terapêutico. A PharmaMar conta com uma coleção de mais de 65 mil organismos marinhos, de onde já foram isoladas 700 novas entidades químicas e 30 novas famílias de substâncias já foram descritas (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2009).

Vale ressaltar a importância de alguns fármacos relacionados a substâncias de origem marinha em uso clínico - como anticâncer [ara-C (Citarabina®) e trabectedina (Yondelis®)], que teve seu uso aprovado em 57 países em todo o mundo, aumentando as vendas em 17 milhões de euros no primeiro trimestre de 2010 (WILKE *et al.*, 2010); O Antiviral, [ara-A (Vidarabina®)] que é um metabólito sintético Ara-A presente em *Eunicella cavolini* que é uma espécie de coral, conhecida popularmente como chicote amarelo do mar, pertencente à família Gorgoniidae, sendo nativo do mar Mediterrâneo; O analgésico neuropático [ziconotídeo (Prialt®)], que é derivado de um veneno do molusco marinho *Conus magus* e foi aprovado pelo FDA, para uso como medicamento em 2004 e a Azidotimidina (AZT) o primeiro medicamento a ser utilizado no tratamento efetivo contra Aids (FELICIO *et al.*, 2012).

Diante desta realidade, várias pesquisas no Brasil estão sendo incrementadas na busca racional de bioprodutos de valor agregado e, recentemente, através do Edital MCT/CNPq/FNDCT Nº 71/2010 – foram criados quatro Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia em Ciências do Mar dentre eles está o coordenado pelo Prof. Dr. José Maria Landim Domingues da UFBA cujo objetivo, dentre outros, é o conhecimento dos fundos marinhos: geodiversidade e biodiversidade, mapeamento da biodiversidade marinha que poderá contribuir também para o desenvolvimento tecnológico nacional, levando em conta que a diversidade micromolecular dos inúmeros organismos marinhos ainda é muito pouco explorada como uma fonte de substâncias de interesse farmacológico.

Tendo em vista que um dos fatores de extrema importância para a descoberta de princípios ativos naturais consiste, principalmente, na interação entre a química e a farmacologia e que quanto mais estreita for esta colaboração, mais rápida e consistentemente serão alcançados os objetivos almejados. Neste contexto, os ambientes marinhos são fontes de uma enorme diversidade de classes químicas como os alcaloides, esteroides e terpenos, entre outros.

Os alcaloides são metabólitos secundários provenientes de aminoácidos contendo pelo menos um nitrogênio em sua estrutura. Dentro da classe dos alcaloides heterocíclicos, encontramos os alcaloides indólicos que compreendem

um grande grupo de produtos naturais de ocorrência frequente (já foram identificados mais de 1500) e considerável diversidade estrutural (HESSE, 2002).

Dentre as importantes moléculas biologicamente ativas que contém o núcleo indólico em suas estruturas encontram-se a Indometacina que inibe a atividade oxidativa intracelular e exerce efeitos antioxidantes na membrana de lipossomas (MAFFEI-FACINO *et al.*, 1993; TOUHEY *et al.*, 2002); o *L*-triptofano, um dos 20 aminoácidos essenciais envolvidos na síntese protéica das células dos seres humanos e seu derivado a serotonina, importante neurotransmissor relacionado com o comportamento emocional, regulação de humor e sensações de prazer, também sendo relatada pela sua capacidade de proteger os tecidos biológicos contra danos causados pela radiação. Isso poderá indicar a capacidade da serotonina em interagir com espécies reativas de oxigênio gerado por radiação ionizante possuindo, portanto, um grande potencial antioxidante (STOLE, 1999; KANG, 2009). Outra importante classe de fármacos são os triptofanos utilizados no tratamento da enxaqueca, como por exemplo, o Naratriptano, comercializado com o nome de Naramig (KARAMYANE HARMAN *et al.*, 2010).

A caulerpina (CLP), alcaloide bis-indólico, substância majoritária de espécies de *Caulerpa* mostrou moderada atividade antitumoral, atuando como um regulador de crescimento das plantas e, também, na inibição da bomba de multirresistência a xenobióticos em algas (VEST *et al.*, 1983, SU *et al.*, 1997; SCHRODER *et al.* 1998). Estudos anteriores relataram sua síntese bem como obtenção de novos análogos (AGUILAR; GERTRUDES, 1970; TALAZ; SARACOGU, 2010; CAVALCANTE-SILVA *et al.*, 2013). Recentemente, estudos químicos-farmacológicos mostraram sua potencialidade anti-inflamatória e antinociceptiva em modelos animais (BITENCOURT *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2009a), e que através da aplicação de estratégias de similaridade estrutural com a indometacina, elegeu-a excelente alvo terapêutico para o tratamento da inflamação, apresentando um candidato a protótipo de inibidor de cicloxigenase (COX) em testes *in vivo* (SOUZA *et al.*, 2009b).

Diante dos resultados obtidos dessa promissora molécula, o presente estudo tem como objetivo semi-sintetizar moléculas derivadas da CLP isolada a partir da *Caulerpa racemosa* com a finalidade de produzir novos protótipos

candidatos a fármacos que estejam voltados para as doenças negligenciadas uma vez que, estudos realizados com os extratos de *Caulerpa racemosa* e *Caulerpa sertularioides* relataram atividade leishmanicida (SOARES, 2003).

Fundamentação Teórica

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Algas Marinhas

As algas marinhas são organismos usados como matéria-prima de produtos como medicamentos, combustíveis e cosméticos, além de servirem como alimento animal e humano. Os produtos naturais ou metabólitos secundários, oriundos desses organismos, são mediadores de interações ecológicas e ocorrem em grupos específicos de organismos (TEIXEIRA, 2012).

No Brasil o estudo dos produtos naturais está relacionado a várias linhas de pesquisas de biólogos, farmacêuticos, bioquímicos e químicos, entre outros. Esses estudos envolvem o isolamento e a elucidação estrutural de novas moléculas bioativas, como também, a síntese, as modificações estruturais dessas moléculas e as atividades biológicas proporcionando a obtenção de protótipos candidatos a fármacos (TEIXEIRA, 2012).

A biodiversidade marinha forneceu, em 2010 mais de 1.000 novos compostos com atividades biológicas a partir de micro-organismos, fitoplânctons, algas verdes, algas marrons, algas vermelhas, cnidários e esponjas (BLUNT *et al.*, 2012).

2.2. Macroalgas Verdes (Chlorophytas)

Em sua maioria as macroalgas são bentônicas, ou seja, elas crescem fixas ao substrato e apresentam diversos tipos morfológicos de talos: unicelulares, multicelulares filamentosos ou parenquimatosos (KANAGAWA & NEVES, 2011).

Entre as macroalgas o filo Chlorophyta é um dos mais abundantes e diversificados, tanto em nível de espécies, como também de padrões morfológicos, estruturais e reprodutivos, sendo responsável pela maior parte do oxigênio produzido nos oceanos, e assim como as plantas, as macroalgas participam do processo de fotossíntese. São classificadas no sub-reino

Viridiplantae das plantas verdes. (LIRA, 2013; LELIAERT *et al.*, 2012; VIDOTTI *et al.*, 2004).

As clorofíceas marinhas são encontradas nos mares tropicais e subtropicais, sendo que, algumas ordens são predominantemente marinhas, como exemplo, Bryopsidales. Dentre essas, destaca o gênero *Caulerpa*, que é um dos gêneros de algas marinhas mais distintas dentro da família Caulerpaceae, identificável não somente a partir da sua forma de crescimento como também na sua morfologia interna (LIRA, 2013; BRAYNER *et al.*, 2008).

2.2.1. Considerações sobre o gênero *Caulerpa* Lamouroux (Caulerpaceae) e *Caulerpa racemosa* (Forsskal) J. Agardh.

Em 1809 o gênero *Caulerpa* foi reconhecido por Lamouroux como membro da família Caulerpaceae, que pertence à ordem das Bryopsidales. Outro indivíduo inserido nessa família é o gênero *Caulerpella* (WYNNE, 2005).

As espécies e subespécies desse gênero encontram-se distribuídas principalmente, nos mares tropicais e subtropicais do mundo (OLIVEIRA FILHO, 1977). No nordeste brasileiro, especificamente, no litoral de Pernambuco e Arquipélago de Fernando de Noronha foram referidas, até o momento, 17 espécies (Pereira *et al.* 2002; Oliveira-Carvalho *et al.* 2003; Villaça *et al.* 2006), enquanto que na Paraíba, especificamente no município de Pitimbu, foram identificados 5 espécies de *Caulerpa*: *Caulerpa lanuginosa* J. Agardh, *Caulerpa kempfii* (Forsskal) J. V. Lamouroux, *Caulerpa kempfii* A. B. Joly & S. Pereira, *Caulerpa mexicana* Sonderex Kutzing, *Caulerpa verticillata* J. Agardh e *Caulerpa sertularioides* (S. G. Gmelin) M. Howe (LUCENA *et al.*, 2007).

A substância majoritária desse gênero, até o momento, é a CLP, estando presente em vinte das suas espécies. A partir das análises da *Caulerpa serrulata* (Forsskal) J. Agardh foi isolado outro alcaloide, a caulersina que é estruturalmente muito similar a caulerpina, embora não se tenha constatado qualquer tipo de atividade biológica (SU *et al.*, 1997). Estudos com as espécies *C. ashmeadii*, *C. paspaloides*, *C. lentillifera*, *C. racemosa* var. *Uvifera*, *C. sertularioides*, levaram ao isolamento do composto formado por hidroxi-amidas, denominada caulerpicina

(Figura 1, p. 26) (VEST *et al.*, 1983; NIELSEN *et al.*, 1982). Outra substância de importância para o gênero é o ácido caulerpínico, isolado da *C. mexicana* (PAUL & FENICAL, 1985).

Alguns sesquiterpenos foram isolados, entre eles estão, a caulerpenina que é um metabólito majoritário da *Caulerpa taxifolia* que tem propriedades antibacterianas e antifúngicas, além de serem tóxicas para peixes, larvas e outros animais marinhos (PAUL & FENICAL, 1986); ainda da *Caulerpa taxifolia* foram descobertos dois novos sesquiterpenos aromáticos valerenanos, Caulerpal A e B, que apresentaram ação inibitória frente à proteína HPTP1B (proteína humana tirosina fosfatase 1B), a qual é responsável em diminuir os níveis de insulina (MAO *et al.*, 2006). Além da flexilina, um sesquiterpeno isolada da *Caulerpa mexicana* (AMICO *et al.*, 1978; BLACKMAN; WELLS, 1978) e ainda foi encontrado em *Caulerpa prolifera*, outro sesquiterpeno conhecido como furocaulerpina, com a presença de um anel furano (Figura 1, p. 27) (NAPOLI *et al.*, 1981).

Estudos anteriores realizados por extratos de *C. sertularioides* e *C. mexicana* apresentaram atividade anti-inflamatória, ao inibir significativamente a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal, em modelo animal de peritonite induzida por carragenana (DA MATTA *et al.*, 2011) bem como extrato de *C. mexicana* apresentaram significativa eficácia quando utilizados isoladamente ou em associação com probiótico na terapêutica do modelo murinho de colite ulcerativa (BITENCOURT *et al.*, 2011).

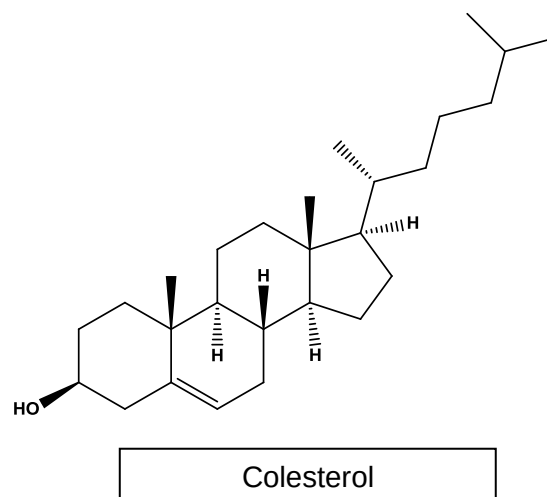
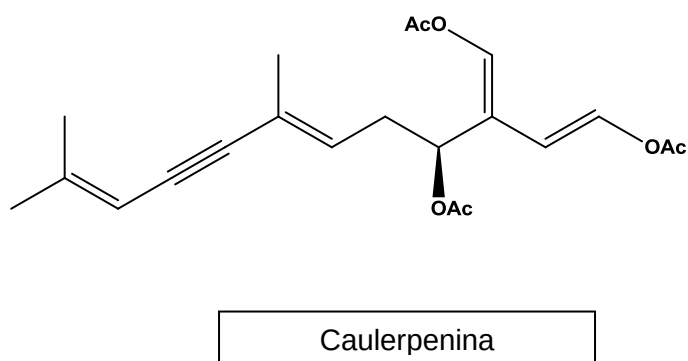
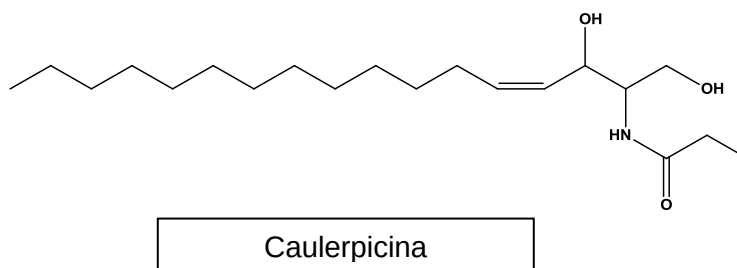
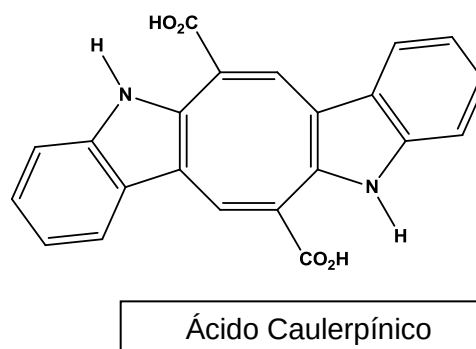
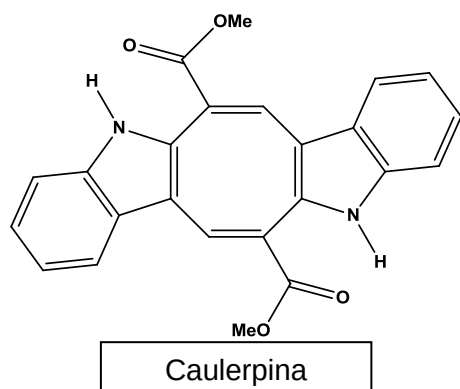
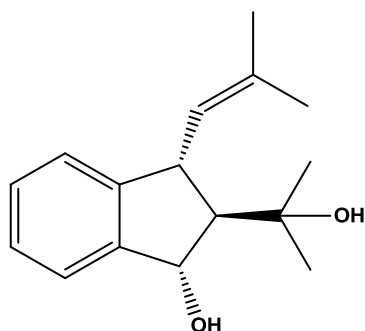
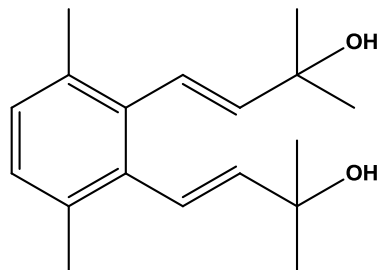


Figura 1. Principais substâncias isoladas do Gênero Caulerpa.

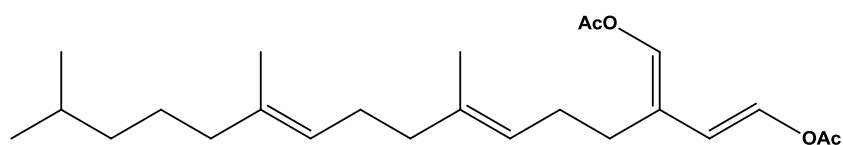
Continuação:



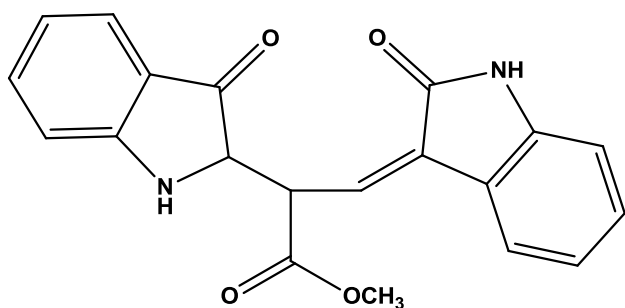
Caulerprenilol A



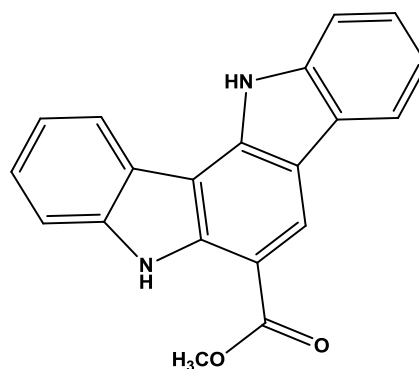
Caulerprenilol B



Trifarina



Racemosina A



Racemosina B

Figura 1. Principais substâncias isoladas do Gênero *Caulerpa*.

2.2.2. Considerações sobre a espécie *Caulerpa racemosa* (Forsskal) J. Agardh.

A alga verde *Caulerpa racemosa* (Forsskal) J. Agardh apresenta talos verdes claros de consistência firme sobre regiões rizomatosas ou estoloníferas que partem em direção oposta ao substrato, e ramos eretos sobre filamentos rizoidais (

Figura 2, p. 28). O seu talo é conhecido como cenocítico, pois a partir de uma célula inicial e uninucleada ele cresce através de sucessivas divisões do nucleares (BRAYNER *et al.*, 2008). A espécie é encontrada nos estados nordestinos do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas e Bahia. Em nível mundial relata-se a sua existência no Oceano Pacífico Ocidental, Ilhas do Pacífico, Oceano Atlântico, Oceano Índico e Mar Mediterrâneo (BARATA, 2008).



Figura 2. *Caulerpa racemosa*.

Fonte: Prof. Dr. George Emmanuel Cavalcanti de Miranda

Diversos estudos que utilizaram extratos da alga *Caulerpa racemosa*, apresentaram várias atividades biológicas, como antioxidantes (CAVAS & YURDAKOC, 2005; CHEW *et al.*, 2008), antifúngico e inibidor da

acetilcolinesterase (RADWAN *et al.*, 2007), antinociceptiva (SOUZA *et al.*, 2009a e anti-inflamatória (SOUZA, 2011) e leishmanicida (SOARES, 2003).

Ainda de acordo com a literatura, foram isolados a partir da *Caulerpa racemosa* os esteroides: colesterol, brassicasterol, 24-metilenocolesterol, poriferasterol, fucosterol (SHEVCHENKO *et al.*, 2009; AKNIN *et al.*, 1992). Recentemente, duas novas substâncias derivados de para-xilenos, chamados caulerprenilol A e B e dois novos alcaloides bis-indólicos racemosina A e B. (LIU *et al.*, 2013a; LIU *et al.*, 2013b).

2.3. Caulerpina (CLP)

A CLP é um alcaloide bis-indólico isolado de várias espécies de *Caulerpa*: *C. Ashmeadii*, *C. paspaloides*, *C. languinosa*, *C. Mexicana*, *C. peltata*, *C. prolifera* (SCHWEDE *et al.*, 1987). Foi isolada pela primeira vez em 1970, a partir de uma extração etílica, da espécie *C. racemosa* na forma de pequenos cristais vermelhados (AGUILLAR-SANTOS, 1970).

O fragmento indólico, presente na CLP, resulta da “fusão” do anel de benzeno com as posições 2 e 3 do anel de pirrol e é um dos mais importantes sistemas de anéis heterocíclicos. Os indoís são uma extensa família de compostos presentes em bactérias, plantas e animais, sendo alvo de especial interesse na Química Biológica e Química Medicinal, sendo provavelmente, os compostos heterocíclicos mais amplamente distribuídos na natureza, presente, por exemplo, o aminoácido triptofano que é o precursor da serotonina (JOULE *et al.*, 1998).

A CLP é um alcaloide bis-indólico (Figura 3, p. 30) intercalado com núcleo raro, o ciclooctatetraeno incorporado diretamente com grupos carbonilas, que apresenta efeito espasmolítico em íleo de cobaia, possivelmente, através da inibição do influxo de cálcio intracelular (Cavalcante-Silva *et al.*, 2013). Além disto, estudos pré-clínico com a CLP relataram relaxamento do íleo pré-contraído pelo KCl e carbacol de um modo dependente da concentração. (CAVALCANTE-SILVA *et al.*, 2013).

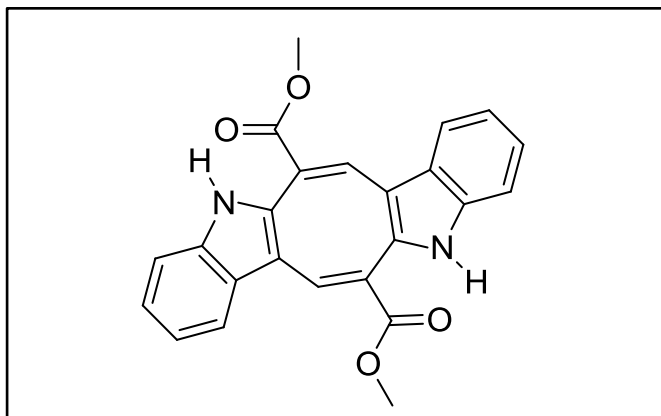


Figura 3. Caulerpina (1)

Estudos recentes, *in vitro*, verificaram a sua ação antitumoral inibindo a ativação do fator de transcrição HIF-1 (hypoxia-inducible fator-1) um importante alvo molecular no tratamento do câncer (LIU *et al.*, 2009). Adicionalmente estudos comprovaram a sua ação antiviral, inibindo algumas fases da replicação do vírus herpes simplex tipo 1, mostrando que esta pode ser uma alternativa para drogas sintéticas, como o aciclovir (MACEDO *et al.*, 2012).

Conforme falado anteriormente, estudos realizados com a CLP, comprovaram atividades antimigratórias para leucócitos e atividades antinociceptiva e anti-inflamatória, através do ensaio *in vitro* de inibição de ciclooxigenase, sendo esta capaz de inibir, significativamente e seletivamente a COX-2, sugerindo que o mecanismo de ação da CLP envolva a inibição de prostaglandinas produzidas por COX-1. (SOUZA *et al.*, 2009b). Também foi avaliado o efeito espasmolítico da CLP em íleo de cobaia, os resultados indicam a inibição das concentrações fásicas induzidas por carbacol, histamina e serotonina de forma não seletiva. Além disso, houve inibição das concentrações cumulativas induzidas por serotonina, de uma forma dependente da concentração, sugerindo um antagonismo não competitivo. Sendo ainda comprovada que a CLP mostrou significativa atividade no tratamento da colite ulcerativa (MIRANDA, 2014).

Diante desta molécula promissora, estudos voltados para o desenvolvimento de análogos pela introdução de novos substituintes podem resultar em diferenças químicas significativas e diferentes propriedades farmacológicas. A introdução de um novo substituinte na CLP poderá causar

significativas mudanças na lipofilicidade, afetando o transporte do análogo através de membranas e nos vários fluidos encontrados no corpo. Podendo também causar mudanças na forma, que resultaria em restrições conformacionais e afetariam a ligação com o sítio ativo. Além disto, a adição de um novo grupo pode introduzir um novo caminho metabólico para o derivado, podendo modificar as propriedades farmacodinâmicas do análogo, como potência, duração de ação, estabilidade metabólica e efeitos colaterais (GARETH, 2007). Portanto, sugerindo-a como forte candidata a estudos voltados para o desenvolvimento de novos protótipos de fármacos, logo, interessantes alvos sintéticos.

2.4. A ESTRATÉGIA DA MODIFICAÇÃO MOLECULAR

A transformação de moléculas simples em produtos de maior valor agregado sempre foi relevante na indústria farmacêutica, essa estratégia de modificação molecular permite a preservação de subunidades farmacofóricas que previamente foram identificadas no protótipo natural ou sintético, a partir de um planejamento racional para novos candidatos a fármacos (SILVA *et al.*, 2002)

O planejamento molecular envolve uma multiplicidade de fatores capazes de desenvolver novas estruturas com efeitos farmacológicos melhorados, menos tóxicos e com eficácia otimizada. Neste contexto produtos naturais são utilizados como modelos para a síntese de substâncias análogas mais potentes e seletivas, que podem ser obtidas mais facilmente e com baixos custos (CECHINEL, 2007).

Inúmeros fármacos disponíveis atualmente no mercado farmacêutico foram obtidos sinteticamente baseados em estruturais naturais ativas. Um exemplo clássico é a morfina que foi o precursor dos analgésicos da classe da 4-fenilpiperidinas; assim como o aciclovir que foi obtido, em 1977, por simplificação sendo empregado até hoje no tratamento da *Herpes*; o indinavir, fármaco antiviral empregado no tratamento da AIDS, um exemplo recente da aplicação da estratégia de simplificação molecular de um protótipo desenvolvido a partir do conhecimento da estrutura 3D do sítio receptor (BARREIRO, 2002).

Diante do exposto, a síntese de fármacos a partir de produtos naturais pode levar à obtenção de substâncias de grande interesse químico-medicinal, além de desenvolver um elo entre a química e a farmacologia capaz de proporcionar novos

candidatos a fármacos. Dessa forma, foi realizado modificações na molécula da CLP visando à síntese de novos derivados através de reações de acetilação e esterificações, reações tipicamente de baixa complexidade e amplamente estudadas, mas que poderão apresentar um amplo leque de atividades biológicas.

3. LEISHMANIA

3.1. Epidemiologia

A Organização Mundial de Saúde (OMS) denominou de Doenças Negligenciadas aquelas associadas às populações mais pobres e as precárias condições de vida porque os investimentos em pesquisa e desenvolvimento não priorizam essa área. Doença de Chagas, leishmaniose, esquistossomose, hanseníase, malária, entre outras, são consideradas doenças negligenciadas por serem infecções causadas por parasitos, bactérias ou vírus, que afetam mais de um bilhão de pessoas no mundo, muitas vezes vivendo em estado de extrema pobreza (WHO, 2013).

As doenças negligenciadas têm alta prevalência em regiões com climas tropicais e subtropicais, ocorrendo em vários países dos continentes africano, asiático e latino americano, incluindo o Brasil cuja ocorrência dessas doenças já foi descrita, inclusive, diferenciando entre as varias regiões do país. Tais doenças prejudicam e incapacitam irreversivelmente indivíduos, o que gera profundos impactos econômico, social e político. Os efeitos diretos de tais doenças podem ser observados na saúde, educação e na redução da produtividade da população trabalhadora. (LINDOSO *et al.*, 2009; WEISS, 2008).

A leishmaniose é uma das doenças que vem recebendo atenção no cenário brasileiro, sua transmissão ocorre pela picada de flebotomíneos, pertencentes à família Psychodidae, subfamília Phlebotominae com dois gêneros epidemiologicamente importantes: *Phlebotomus*, espécies do velho Mundo, e *Lutzomyia*, espécies do Novo Mundo (READY, 2010).

No Brasil, assim como em outros países do Novo Mundo, as leishmanioses constituem um importante problema de saúde pública. A doença está presente em

todas as regiões com 28.000 casos de leishmaniose tegumentar e 3.000 de leishmaniose visceral notificados por ano (WHO, 2010; LINDOSO *et al.*, 2009).

Conforme orientação da Organização Mundial de Saúde, o tratamento de para as diferentes formas clínicas da leishmaniose são os antimoniais pentavalentes. No Brasil o antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) é o fármaco de primeira escolha para as diferentes formas de leishmaniose humana, e vem sendo utilizado desde os anos de 1940 (BRASIL, 2007, AMATO *et al.*, 2007).

A Leishmaniose é considerada uma doença tropical negligenciada e um agravo de saúde pública, a leishmaniose é um complexo de enfermidades causadas por diferentes espécies do gênero *Leishmania* que atingem os continentes asiáticos, europeu, americano e africano. Esta protozoose está entre as doenças tropicais mais frequentes do mundo, atingindo 98 países e mais de 12 milhões de pessoas (WHO, 2010, 2014).

A doença afeta principalmente as pessoas que vivem em países em desenvolvimento, estando associada à devastação das matas, deslocamento e aumento da população, condições precárias de habitação, falta de saneamento básico e de higiene, além de fatores que implicam na maior suscetibilidade do hospedeiro, como desnutrição e imunossupressão (ASHFORD, 2000).

Os vetores responsáveis pela transmissão dos parasitas são insetos denominados flebotomíneos, da ordem Díptera, família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae* e gênero *Lutzomyia*, e são popularmente conhecidos como mosquito-palha, asa-dura, birigui ou cangalhinha. Apenas as fêmeas são hematófagas e, durante seu repasto sanguíneo, são capazes de transmitir o parasito ao hospedeiro mamífero (ASHFORD, 2000).

3.2. O agente etiológico da *Leishmania* e seu ciclo evolutivo

O parasito se apresenta de duas formas: promastigota, a forma flagelada, e amastigota, a forma não flagelada, encontrada no citoplasma das células fagocitárias (WHEELER *et al.*, 2011). A amastigota apresenta-se na forma arredondada ou oval com diâmetro entre 3 a 5 µm e possui flagelo rudimentar que

estão presentes dentro dos fagócitos mononucleares dos hospedeiros vertebrados e multiplicam-se por divisão binária simples dentro do macrófago hospedeiro até o rompimento deste e liberação de novas formas amastigotas no meio extra celular que irão invadir novos macrófagos (REY, 2008, DA CRUZ & PIRMEZ, 2005; GRIMALDI JR. & TESH, 1993). As promastigotas metacíclicas são alongadas, possuem um flagelo bastante desenvolvido, são encontradas dentro do intestino dos flebotomíneos fêmea (inseto vetor) e são as formas infectantes (Figura 4, p. 34) (ALMEIDA *et al.*, 2003).

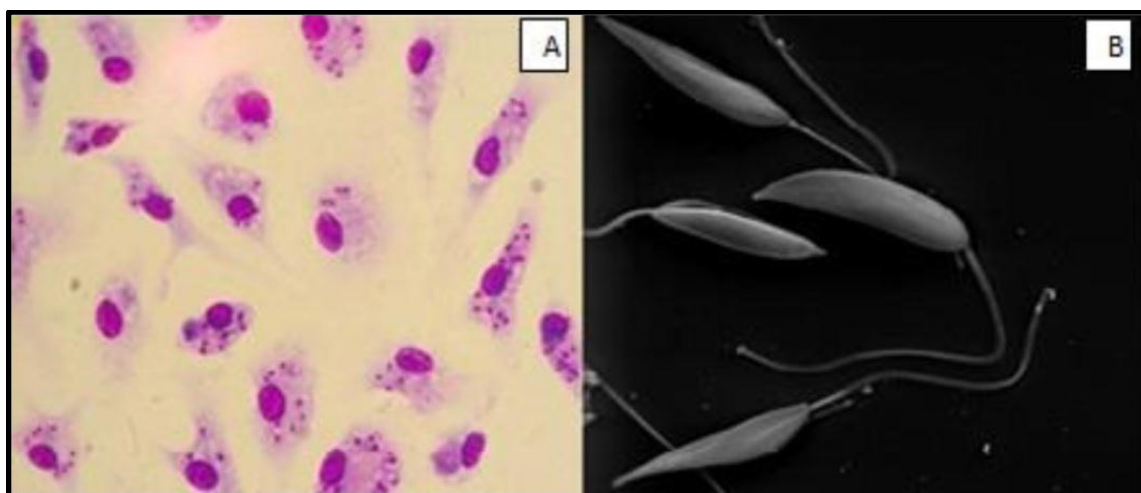


Figura 4. Forma evolutiva intracelular: amastigotas (A) e formas promastigotas (B) de Leishmania spp.Fonte: <http://www.cdc.gov/dpdx/>

Durante o repasto sanguíneo, as fêmeas infectadas inoculam, junto com a saliva as formas promastigotas metacíclicas no hospedeiro vertebrado. Estas formas são fagocitadas por macrófagos iniciando a fase de desenvolvimento intracelular do parasito. Estas formas quando internalizadas se estabelecem em um vacúolo parasitóforo (fagolisossoma), separando-as do citoplasma celular. E é no interior do fagolisossoma que acontece a transformação da forma promastigota para amastigota. Após se multiplicarem no interior das células, ocorre a ruptura da célula e disseminação do parasita para as células não infectadas. Por sua vez, as amastigotas livres ou células infectadas podem ser ingeridas por um flebotomíneo durante o repasto sanguíneo. No interior do intestino dos insetos, os macrófagos infectados se rompem liberando as formas amastigotas, que se transformam em

promastigotas recomeçando o ciclo biológico do parasita (Figura 4, p. 34) (KAYE & SCOTT; 2011; VANNIER-SANTOS, 2002).

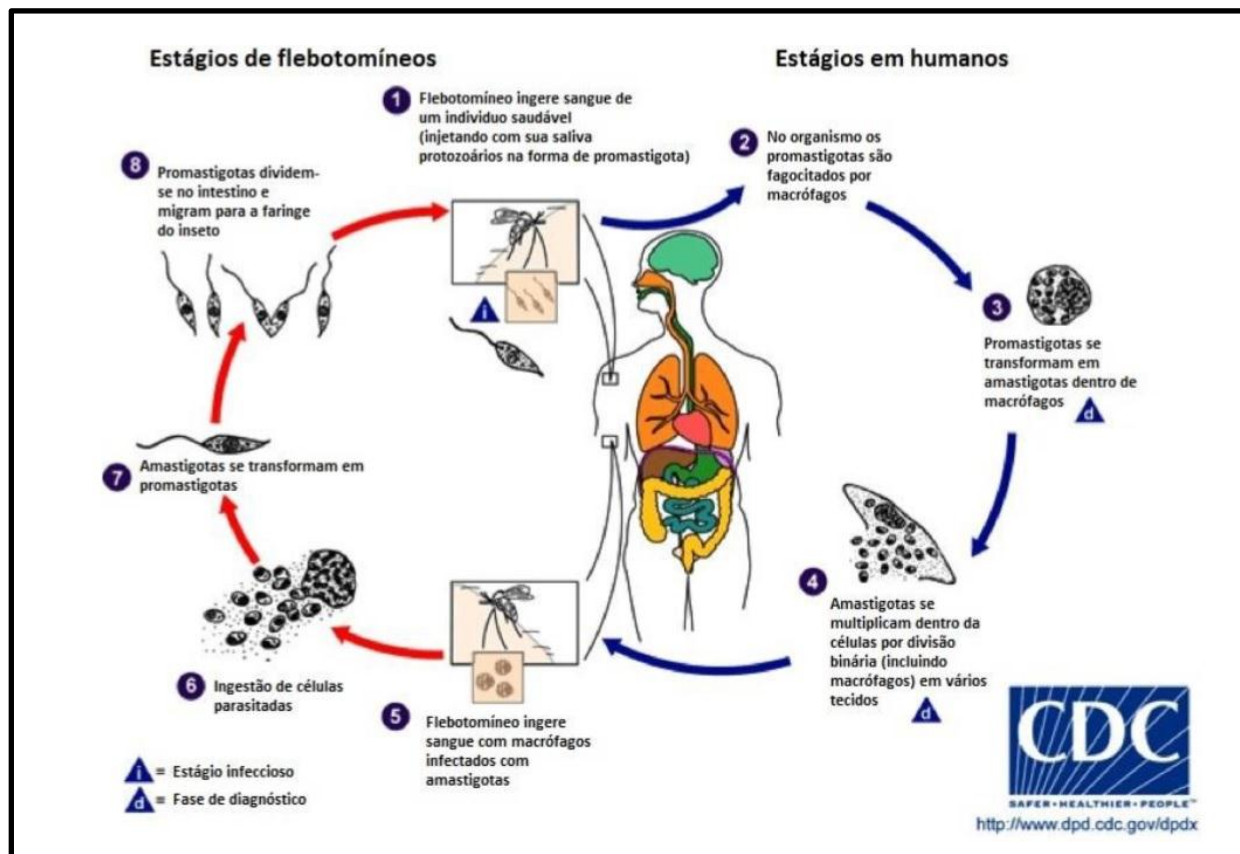


Figura 5. Ciclo biológico da Leishmaniose. Fonte: <http://www.cdc.gov/dpdx/>

3.3. Distribuição Geográfica

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, atualmente, ocorrem entre 0,7 a 1,3 milhões de casos por ano da forma cutânea, sendo que dois terços ocorrem em seis países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã e a República Árabe da Síria (Figura 5, p. 35). A forma visceral apresenta aproximadamente um total de 200.000 a 400.000 casos, sendo que 90% destes ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão (Figura 6 e 8, p. 36) (OMS, 2015).

Entre os anos de 2007 e 2013 foram registrados no Brasil 159.301 casos de Leishmaniose tegumentar (LT) e 26.112 de visceral (LV). A região Nordeste

possui o maior percentual de casos registrados para LV no país (51%) e o segundo para LTA (33,30%), perdendo apenas para a região Norte (40,9%) (SINAM, 2015).

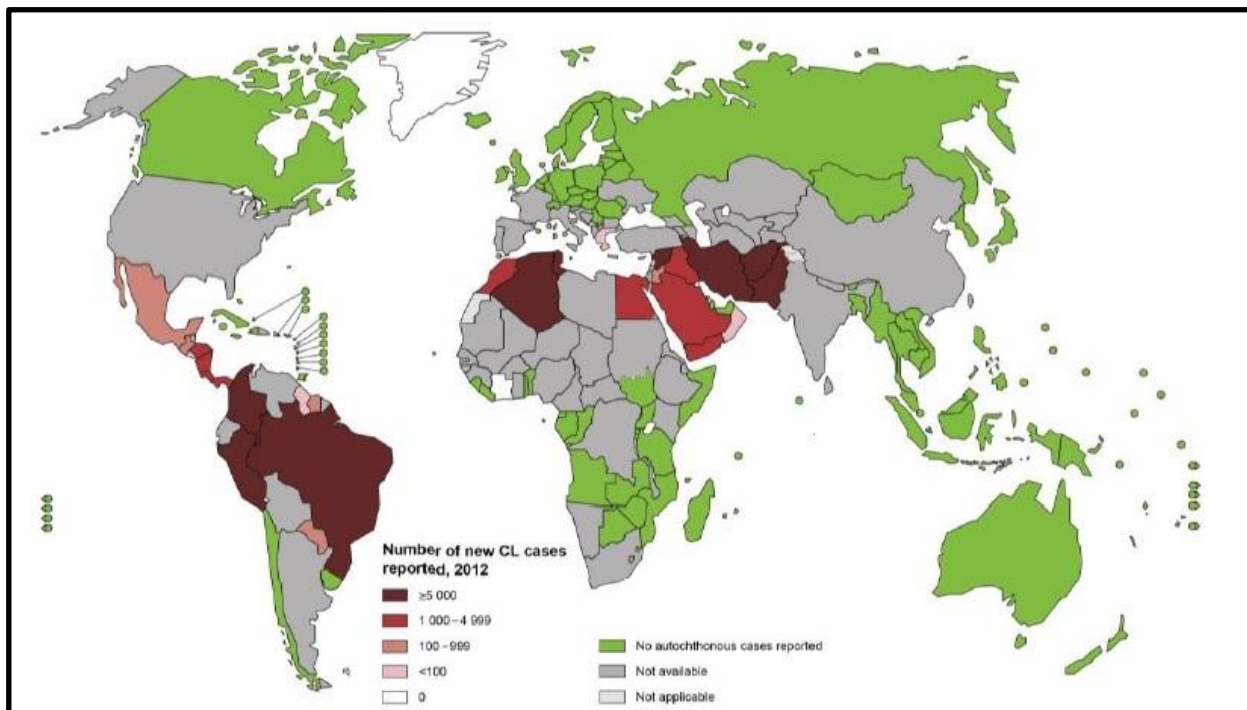


Figura 6. Distribuição da Leishmaniose Cutânea no Velho e Novo Mundo. Fonte: OMS, 2015.

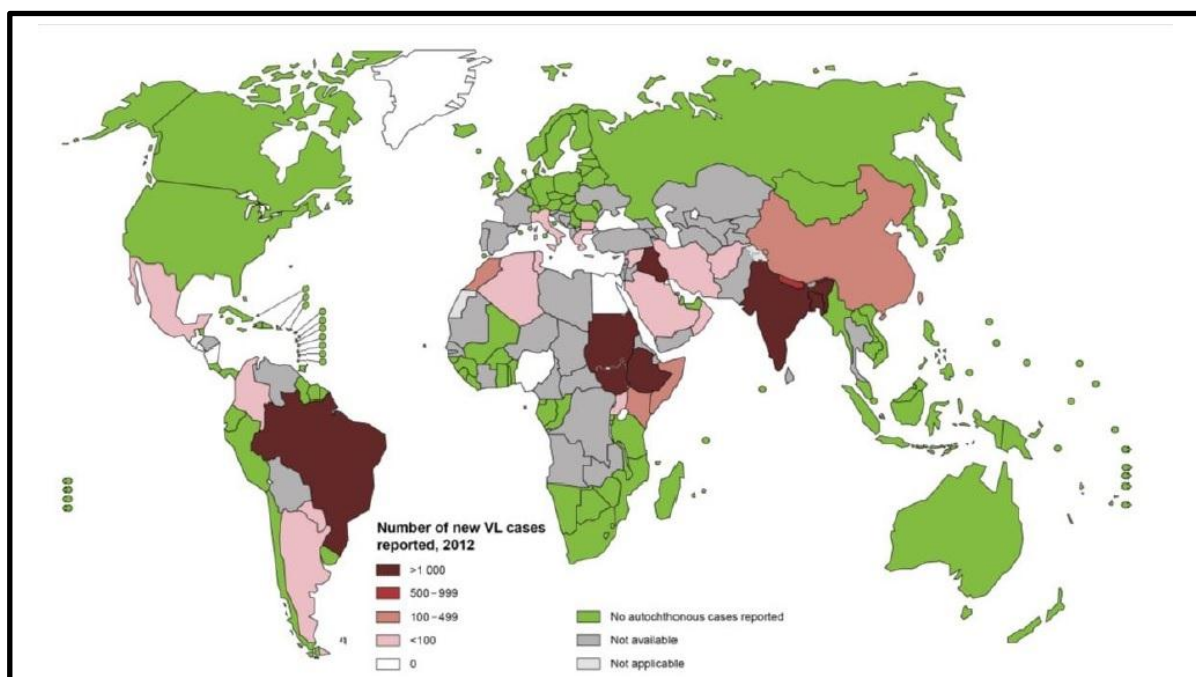


Figura 8. Distribuição da Leishmaniose Visceral no Velho e Novo Mundo.
Fonte: OMS, 2015.

3.4. Formas Clínicas

As leishmanioses possuem um amplo espectro de manifestações clínicas, está associado com as diferentes espécies de *Leishmaniae* com a resposta imune do indivíduo podendo ser divididas em dois grupos: a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) subdividida em: leishmaniose cutânea (LC), a leishmaniose mucocutânea (LMC) e a leishmaniose cutânea difusa (LCD), uma variante da LC; e a Leishmaniose Visceral Americana (LVA), também conhecida como calazar, sendo esta forma a mais grave da doença (DAVID & CROFT, 2009; RATH *et al.*, 2003).

A leishmaniose cutânea localizada é a forma mais comum, é tida como uma forma benigna da leishmaniose, apresentando acometimento da pele com lesões ulceradas indolores, únicas ou múltiplas, com base eritematosa e infiltrada, associada a bordas bem delimitadas e elevadas. O fundo da ferida é avermelhado e com granulações, com tendência a cura espontânea em pacientes imunocompetentes ou respondem bem ao tratamento padrão com antimonial (MITROPOULOS *et al.*, 2010).

A *L. braziliensis* é o agente etiológico da LC, sendo a espécie mais prevalente no homem, o período de incubação é relativamente variável, podendo a infecção evoluir após um período de incubação de 1-12 semanas, em uma pápula que aumenta de tamanho podendo formar úlcera (AMATO *et al.*, 2008). É encontrada em todas as zonas endêmicas do Brasil. A LC também está associada a *L. guyanensis*, ocorrendo na margem norte do rio Amazonas em áreas de colonização recente (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994, ALTAMIRANO-ENCISO *et al.* 2003).

A *Leishmania braziliensis* é a principal causadora da leishmaniose mucocutânea (LMC) no Brasil, embora existam relatos de poucos casos da doença associados com a *L. amazonenses* (BARRAL *et al.*, 1991). Este compromete a mucosa, com destruição tissular progressiva da mucosa nasal, bucal, e perfuração de septo, podendo atingir palato, faringe, laringe e garganta alterando a anatomia e fisiologia destes órgãos, ocasionando uma possível desfiguração da face e perda do septo, palato e pavilhão auditivo, devido à intensa resposta inflamatória (BRASIL, 2007). Apesar de sua extensão e severidade, poucos parasitos são encontrados nas lesões. Os indivíduos com LMC não apresentam cura espontânea e na maioria das vezes são refratários ao tratamento convencional com antimonial, podendo evoluir para o óbito (DAVID & CRAFT, 2009, REITHINGER *et al.*, 2007).

A Leishmaniose Cutânea Difusa (LD) é uma forma rara da leishmaniose, é causada pela *L. amazonenses* ou pela *L. aethiopica* caracteriza-se por lesões nodulares não ulceradas que afetam principalmente a face, e podem chegar a cobrir o corpo inteiro com grande quantidade de parasitos (RATH *et al.*, 2003).

A leishmaniose visceral (LV) ou Calazar é causada principalmente por *L. donovani* nos países do Velho Mundo e pela *L. chagasi* nos países do Novo Mundo, é caracterizada por apresentar evolução crônica com envolvimento sistêmico através de sinais como hepatoesplenomegalia e caquexia e pode levar a morte. Normalmente, os sintomas aparecem depois de um período de incubação de 1 a 3 meses e incluem febre irregular e persistente, acompanhada de sudorese, fraqueza e perda de peso, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia,

pancitopenia, anemia, hipergamaglobulinemia e leucopenia ou trombocitopenia (MURRAY *et al.*, 2005, BALAÑA-FOURCE *et al.*, 1998). Neste tipo de forma clínica, as amastigotas residem em células do sistema retículo endotelial de vísceras, podendo comprometer baço, fígado, linfonodos e intestino, causando uma infecção disseminada visceral (SIMOES-MATTOS *et al.*, 2002; MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008).

3.5. Arsenal Terapêutico

Dentre os compostos de antimoniais utilizados no tratamento da leishmaniose, destacam-se os complexos de antimônio trivalentes tais como o tartarato antimonial de potássio (Tártaro emético), antimoniato de bis-catecol-3,5-dissulfonato sódico (Stibophen®, Repodral®, Fuadina®) e tioglicolato de sódio e antimônio, bem como os antimoniais pentavalentes, antimoniato de *N*-metilglucamina (Glucantime®, antimoniato de meglumina), gluconato de antimônio sódico (Pentostan®, Solustibosan®, estibogluconato sódico) e uréia estibamina (Estibamine®) (RATH *et al.*, 2003).

A anfotericina B é um antibiótico macrolídeo da classe dos polienos, derivado de uma cepa de *Streptomyces nodosus*, largamente utilizado para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas. Esse fármaco pertence ao grupo de fármacos leishmanicidas de segunda geração e é usado extensivamente no caso de falhas no tratamento com compostos antimoniais.

A Pentamidina, uma diamidina aromática, é comercializada para uso em humanos nas seguintes formulações: Isotionato (Pentacarinat) e Mesilato (Lomidina®). Tem sido usada como tratamento alternativo para leishmaniose cutânea e visceral quando os pacientes são refratários ou hipersensíveis aos antimoniais pentavalentes (CROFT & YARDLEY, 2002).

Miltefosina (hexadecilfosfocolina) foi originalmente desenvolvida como um fármaco anticâncer e é o primeiro fármaco para tratamento por via oral que possui comprovada atividade leishmanicida (MURRAY *et al.*, 2005, CROFT & ENGEL, 2006).

O tratamento para a leishmaniose permanece o mesmo há cinco décadas, apesar dos avanços obtidos com as pesquisas na área. Atualmente, os fármacos de escolha são os antimoniais pentavalentes, além da introdução de anfotericina B e miltefosina como forma de minimizar a resistência dos parasitos (AMATO *et al.*, 2007; MASMOUDI *et al.*, 2013). Essa terapêutica é limitada e insatisfatória pelo alto custo, efeitos adversos, resistência do parasito e via de administração parenteral (SINGH; SIVAKUMAR, 2004). Motivos esses que levam muitos pacientes a abandonarem o tratamento, favorecendo o aparecimento de cepas resistentes (AMATO, 2000).

Pesquisas recente demonstraram a importância dos alcaloides no tratamento dessa patologia, visto que a (+)-harmalina que é um alcaloide indólico e possui um núcleo β -carbolina, apresentou uma significativa atividade leishmanicida *in vitro* e *in vivo*. Atividade confirmada a partir de estudos realizados com os extratos da *Kopsia griffithii*, ricos em β -carbolinas (ISHIKURA *et al.*, 2009). A atividade leishmanicida de outros novos alcaloides, entre eles, a tripargina, deplancheine, debromoarborescidina A e cantin-6-ona confirmaram a potencialidade dos alcaloides β -carbolínicos contra a forma promastigota da *Leishmania major* (RODRIGUES-JÚNIOR, 2009).

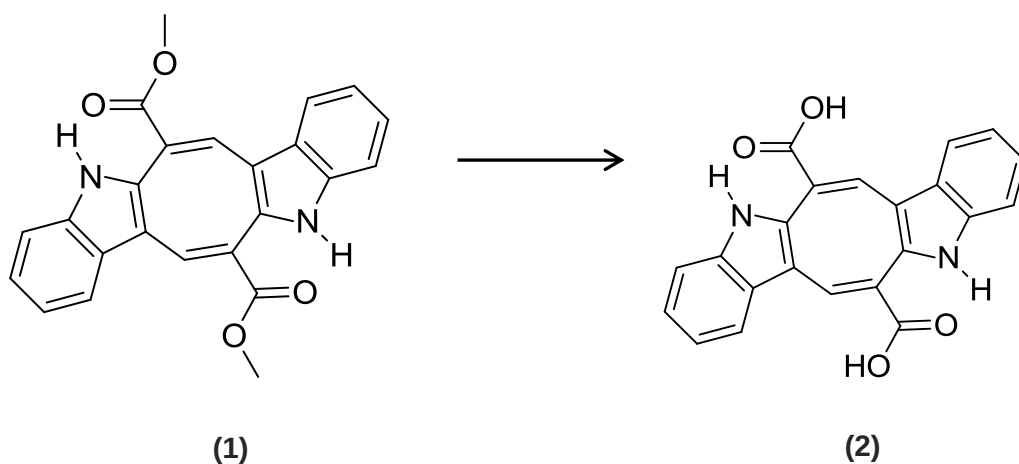
Nessas premissas o presente trabalho, objetiva sintetizar análogos de alcaloides indólicos a partir da CLP em busca de modelos estruturais para atividade Leishmanicida.

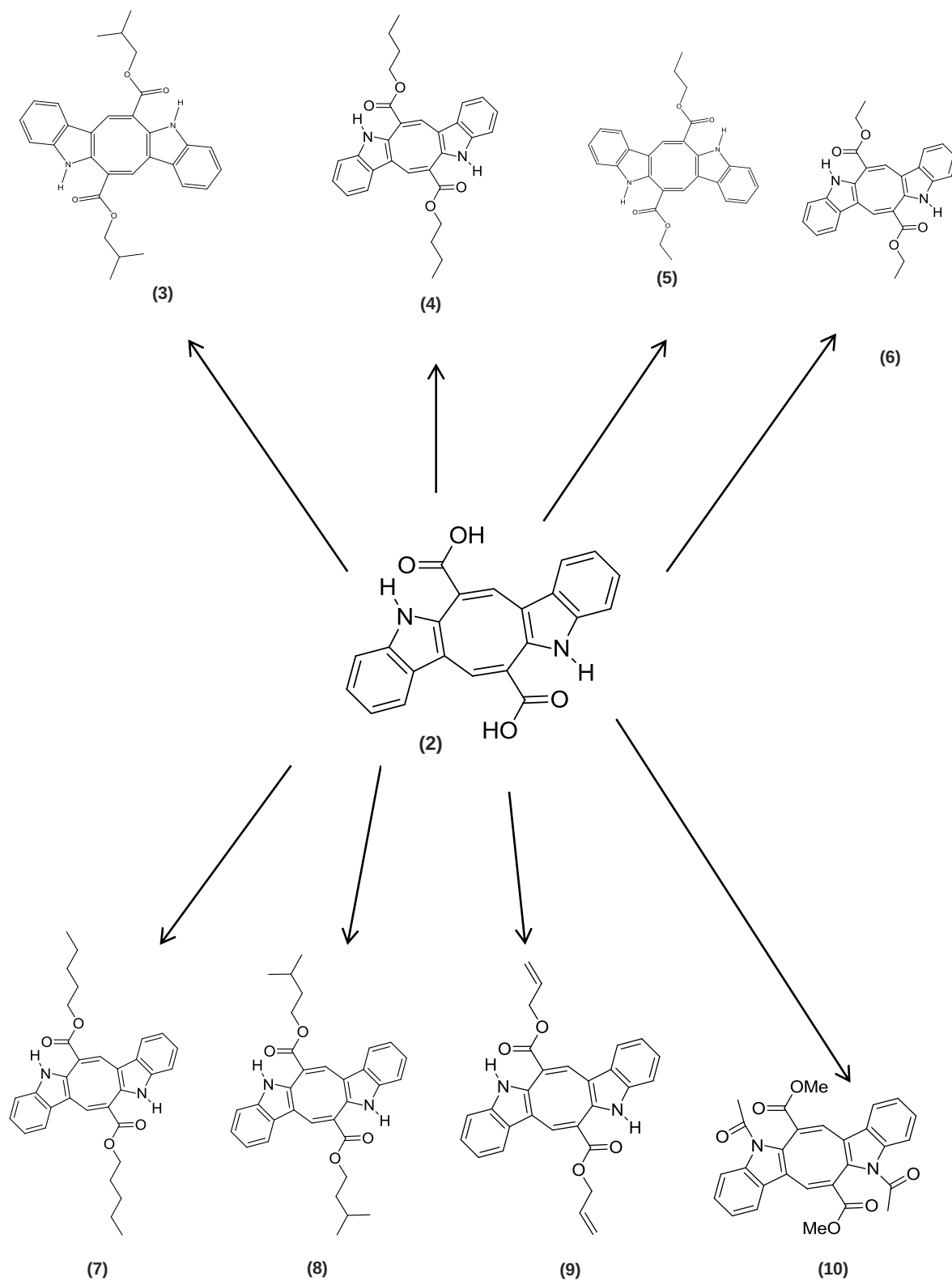
Objetivos

4. OBJETIVOS

O presente trabalho faz parte da linha de pesquisa do INCT AmbTropic que objetiva o isolamento e semi-síntese de produtos de origem marinha. Inicialmente foram definidos como objetivos o isolamento e identificação estrutural do principal componente da espécie de *Caulerpa racemosa*, a caulerpina.

A prioridade desse estudo foi a semi-síntese de substâncias que poderiam ser obtidas de forma eficiente e rápida e que fossem inéditas ou ainda não avaliadas em testes Leishmanicida. Dessa forma foram sintetizados derivados da caulerpina com diferentes substituintes no indol e na função éster.





Metodologia

5. METODOLOGIA

5.1. Métodos Cromatográficos

As análises de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foram realizadas em cromatoplas de alumínio de gel de sílica 60 PF₂₅₄ da Macherey-Nagel com espessura de 0,20 mm e com indicador de fluorescência. A revelação das substâncias, em análise, nas cromatoplas analíticas foi obtida por exposição à luz ultravioleta em dois comprimentos de onda (254 e 366 nm).

A cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foi feita utilizando sílica gel, PF₂₅₄ (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 ativadas em estufa a 110°C durante 2 horas. A revelação das substâncias em análise foi evidenciada por exposição à luz ultravioleta em dois comprimentos de onda (254 e 366 nm).

Na cromatografia em coluna (CC) por adsorção foi empregada gel de sílica da Merckou da Vetec ($\varnothing$ μ m 63-200) como fase estacionária, sendo o comprimento e o diâmetro das colunas utilizadas, além da quantidade de gel de sílica, determinados pela quantidade e a complexidade das amostras submetidas a estes procedimentos de separação e isolamento de compostos.

Para a fase móvel, os eluentes utilizados foram hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. Todos os reagentes e solventes foram utilizados na forma comercial, sem prévia purificação.

5.2. Métodos Espectrométricos

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ¹H) e de Carbono treze (RMN de ¹³C) foram realizados no Núcleo de Caracterização e análise da Universidade Federal da Paraíba (NUCAL/UFPB) em espectrômetro Bruker 200 [200 MHz (¹H) e 50 MHz (¹³C)], e em colaboração com

o grupo de pesquisas do Prof. Dr. Fernando Coelho (UNICAMP). 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. Os deslocamentos químicos foram expressos em δ , pelos picos dos hidrogênios pertencentes às moléculas residuais não-deuteradas dos solventes deuterados utilizados: clorofórmio (δ 7,27) e metanol (δ 3,31). Nos espectros de RMN ^{13}C , os deslocamentos químicos foram referenciados pelos picos centrais dos ^{13}C dos solventes: clorofórmio (δ 77,23) e metanol (δ 49,17). 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).

5.3. Coleta e processamento da *Caulerpa racemosa*

As amostras da espécie de *Caulerpa racemosa* foram coletadas na Paraíba, especificamente, no litoral da cidade de Pitimbu durante marés de sizígia (-0,2 a 2,0). A espécie foi coletada e identificada pelo Professor Dr. George Emmanuel Cavalcanti de Miranda do Departamento de Biologia Molecular/CCEN/UFPB e uma exsicata foi depositada no herbário Professor Lauro Pires Xavier, da Universidade Federal da Paraíba sob o número JPB 13999.

Uma vez no laboratório, as amostras foram lavadas com água destilada e separada de epífitas e outras algas, após isso, foram secas a temperatura ambiente, aproximadamente 25°C.

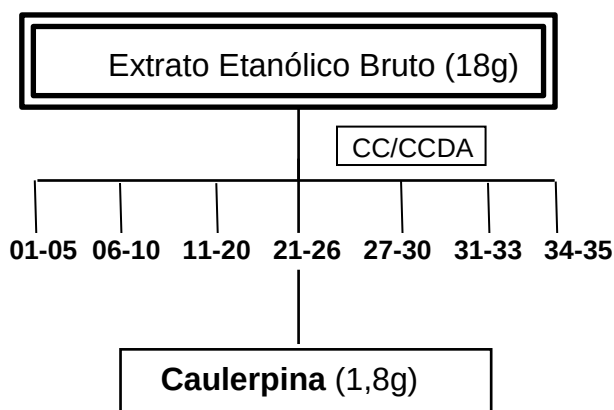
5.4. Obtenção do extrato

O método de extração utilizado para as amostras coletadas de *Caulerpa racemosa* foram extraídas por maceração com etanol (6L) em recipiente de aço inoxidável, por 72 horas. A solução extrativa resultante, depois de filtrada, foi concentrada com o auxílio de evaporador rotativo, sob pressão reduzida, a uma temperatura não superior a 50°C, obtendo o extrato etanólico bruto (ETB).

5.5. Isolamento da Caulerpina

Uma alíquota do extrato etanólico bruto (Esquema 1, p. 47).foi submetida à cromatografia de adsorção em coluna (CC), utilizando sílica gel como fase estacionária e como eluentes os solventes hexano, diclorometano e acetato de etila puros ou em misturas binárias em grau crescente de polaridade, as 35 frações de 50 mL obtidas foram concentradas em evaporador rotativo e reunidas após CCDA de acordo com seu perfil cromatográfico. As frações do intervalo entre 21 a 26 forneceram sólido avermelhado que após análise em Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (^1H), Carbono treze (^{13}C), Infravermelho e comparação com dados da literatura, verificou-se tratar da caulerpina (Figura 4, p. 32).

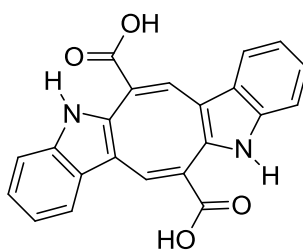
Esquema 1. Isolamento da caulerpina



5.6. Procedimento Experimental

5.6.1. Obtenção dos Derivados da Caulerpina

5.6.1.1. Obtenção do (6*E*, 13*E*)-5,12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-ácido dicarboxílico (2)



(2)

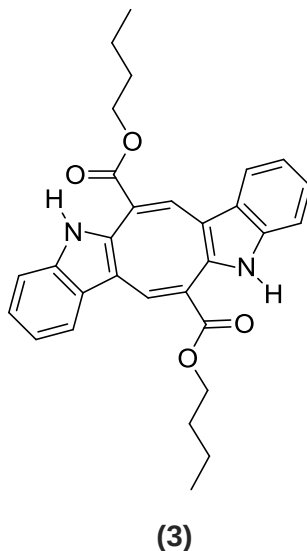
A uma solução de Caulerpina (1) (1,0 equiv., 0,05 mmol, 20 mg) em 20 mL de Acetonitrila:H₂O (2:1) foi adicionado 20 mg [20,0 equiv., 1,0 mmol] de Hidróxido de Lítio (LiOH) (20,0 equiv., 1,0 mmol). A reação foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente, e o consumo do material de partida ocorreu após um período de 2 horas, sob monitoramento por meio de CCDA. O excesso da acetonitrila foi evaporado a pressão reduzida, e à solução resultante foram adicionados 20 mL de água destilada, submetida a uma extração com 20 mL de acetato de etila (3 vezes). A fase orgânica resultante foi reunida e extraída com 5 mL de ácido clorídrico diluído a 3%. A fase orgânica foi tratada com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄), filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O produto, (6*E*, 13*E*)-5,12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-ácido dicarboxílico (2), foi obtido na forma de um sólido preto com rendimento de 90%, equivalente a 18 mg.

IV (KBr, $n_{\max}$): 3443, 3410, 3059, 3018, 2952, 2894, 2664, 2630, 2575, 2514, 1658, 1612, 1583, 1551, 1458, 1407, 1266, 1207, 1154, 1018, 921, 767, 725, 663, 516 cm⁻¹.

¹H RMN (200 MHz, CD₃OD) δ 7,05(m, 2H); 7,05 (m, 2H); 7,30 (d, 2H); 7,40(d, 2H); 8,22 (s, 1H).

¹³C RMN (50 MHz, CD₃OD) δ 112,4; 112,9; 118,6; 121,0; 123,6; 127,4; 129,0; 134,5; 139,3; 143,3; 169,4.

5.6.1.2. Obtenção do (6*E*,13*E*)-dibutil 5, 12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato (3)



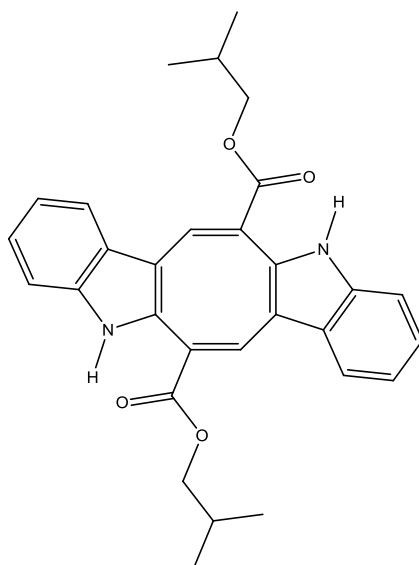
A uma solução de ácido caulerpínico (2) (1,0 equiv., 0,0814 mmol, 30 mg) em álcool n-butílico (10 mL), foram gotejados 0,013 mL de cloreto de tionila (SOCl_2) (2,26 equiv., 0,1839 mmol) à temperatura ambiente. A temperatura foi elevada à 60°C, mantida sob agitação magnética e monitorada através de CCDA até o completo consumo do material de partida (24 horas). A mistura foi evaporada sob pressão reduzida, suspendida em água destilada e foi submetida a uma extração com diclorometano (3 x 20 mL). A fase orgânica foi reunida, tratada com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O material obtido foi submetido à cromatografia em coluna (CC), utilizando sílica gel como fase estacionária e como eluentes os solventes hexano e acetato de etila, ($\text{AcOEt} : \text{Hexano} = 30:70$). Obteve-se o total de 10 frações, das quais, num intervalo de Fr5-Fr8 apresentaram-se puras, obtendo assim o produto, (6*E*,13*E*)-dibutil5,12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato (3), na forma de um sólido avermelhado em 74% de rendimento, equivalente a 22,2 mg.

IV (KBr, n_{max}): 3375, 3052, 2958, 2925, 2852, 2894, 1678, 1626, 1491, 1480, 1415, 1383, 1252, 1213, 1178, 1159, 1028, 741, 668, 490 cm^{-1} .

¹H RMN (200 MHz, CDCl₃) δ 1,00 (t, 6H); 1,45 (sex, 6H); 1,77 (q, 4H) 4,31 (t, 4H); 7,09 (m, 2H); 7,18 (m, 2H); 7,30 (d, 1H); 7,41 (d, 1H); 8,03 (s, 1H); 9,31 (s, 1H).

¹³C RMN (50 MHz, CDCl₃) δ 13,9; 19,4; 30,8; 65,5; 111,6 112,4; 118,0; 120,7; 123,4; 127,4 128,3; 133,2; 139,3 142,5; 166,4.

5.6.1.3. Obtenção do (6*E*,13*E*)-diisobutil 5, 12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato (4)



(4)

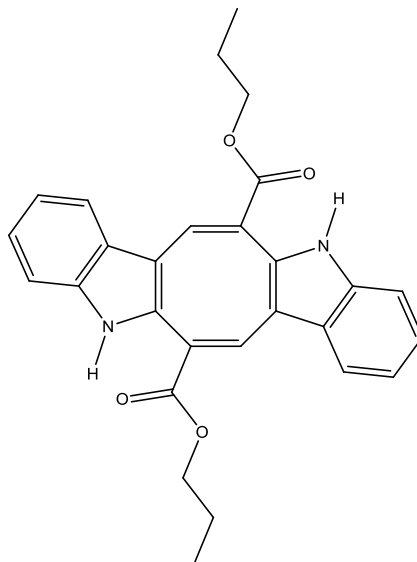
A uma solução de ácido caulerpínico (2) (1,0 equiv., 0,0814 mmol, 30 mg) em álcool iso-butílico (10 mL), foram gotejados 0,013 mL de cloreto de tionila (SOCl_2) (2,26 equiv., 0,1839 mmol) à temperatura ambiente. A temperatura foi elevada à 60°C, mantida sob agitação magnética e monitorada através de CCDA até o completo consumo do material de partida (24 horas). A mistura foi evaporada sob pressão reduzida, suspendida em água destilada e foi submetida a uma extração com diclorometano (3 x 20 mL). A fase orgânica foi reunida, tratada com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O material obtido foi submetido à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) utilizando como eluentes os solventes hexano e acetato de etila, (AcOEt :Hexano - 20:80). Obtendo assim o produto, (6*E*,13*E*)-diisobutil 5, 12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato (4), na forma de um sólido marrom em 70% de rendimento, equivalente a 21mg.

IV (KBr, n_{max}): 3979, 3056, 2961, 2891, 2871, 16798, 1626, 1481, 1456, 1415, 1250, 1215, 1176, 1155, 1031, 769, 741, 668, 609, 482 cm^{-1} .

^1H RMN (200 MHz, CDCl_3) δ 1,03 (d, 6H); 4,09 (d, 2H); 2,05 (m, 1H); 7,07 (m, 3H); 7,18 (m, 3H); 7,27 (d, 1H); 7,40 (d, 1H); 8,06 (s, 1H); 9,35 (s, 1H).

^{13}C RMN (50 MHz, CDCl_3) δ 19,3; 27,9; 71,7; 111,6, 112,4; 118,0; 120,7; 123,4; 127,4; 128,3 133,2; 137,8; 142,5; 166,4.

5.6.1.4. Obtenção do (6*E*,13*E*)-dipropill 5, 12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato (5)



(5)

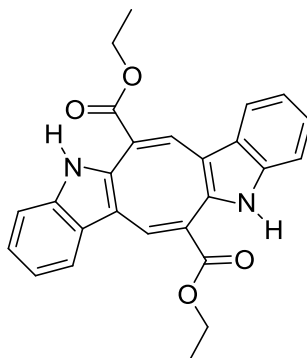
A uma solução de ácido caulerpínico (2) (1,0 equiv., 0,0814 mmol, 30 mg) em álcool n-propílico (5 mL), foram gotejados 0,013mL de cloreto de tionila (SOCl_2) (2,26 equiv., 0,1839 mmol) à temperatura ambiente. A temperatura foi elevada à 60°C, mantida sob agitação magnética e monitorada através de CCDA até o completo consumo do material de partida (6 horas). A mistura foi evaporada sob pressão reduzida, suspendida em água destilada e foi submetida a uma extração com acetato de etila (3 x 20 mL). A fase orgânica foi reunida, tratada com sulfato de sódio anidro (Na_4SO_2), filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O material obtido foi submetido à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) utilizando como eluentes os solventes hexano e acetato de etila, (AcOEt:Hexano - 20:80). Obtendo assim o produto, (6*E*,13*E*)-dipropill 5, 12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato (5), na forma de um sólido alaranjado em 75% de rendimento, equivalente a 22,5mg.

IV (KBr, n_{max}): 3998, 3056, 3032, 2964, 2926, 2898, 2876, 2852, 1679, 1611, 1460, 1415, 1321, 1260, 1180, 1065, 949, 769, 731, 544 cm^{-1} .

¹H RMN (200 MHz, CDCl₃) δ1,05 (t, 3H); 1,08 (t, 3H); 1,75 (m, 2H); 4,26 (t, 2H); 7,08 (m, 2H); 7,17 (m, 2H); 7,28 (d, 2H); 7,39 (d, 1H), 7,41 (d, 1H); 8,04 (s, 1H); 9,31 (s, 1H).

¹³C RMN (50 MHz, CDCl₃) δ10,7; 22,1; 67,2; 111,6; 112,4; 118,0; 120,8; 123,4; 125,8; 128,3; 133,2; 137,5; 142,5, 166,4.

5.6.1.5. Obtenção do (6*E*,13*E*)-dietil 5, 12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato (6)



(6)

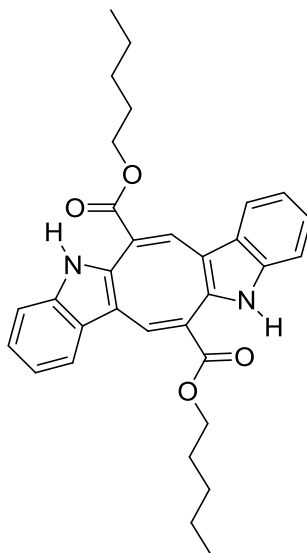
A uma solução de ácido caulerpínico (2) (1,0 equiv., 0,0814 mmol, 30 mg) em álcool etílico (6 mL), foram gotejados 0,013 mL de cloreto de tionila (SOCl_2) (2,26 equiv., 0,1839 mmol) à temperatura ambiente. A temperatura foi elevada à 60°C, mantida sob agitação magnética e monitorada através de CCDA até o completo consumo do material de partida (12 horas). A mistura foi evaporada sob pressão reduzida, suspendida em água destilada e foi submetida a uma extração com acetato de etila (3 x 20 mL). A fase orgânica foi reunida, tratada com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O material obtido foi submetido à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) utilizando como eluentes os solventes hexano e acetato de etila, (AcOEt :Hexano - 20:80). Obtendo assim o produto, (6*E*,13*E*)-dietil 5, 12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato (6), na forma de um sólido avermelhado em 78% de rendimento, equivalente a 23,4 mg.

IV (KBr, n_{max}): 3382, 3055, 2997, 2952, 2925, 2852, 1687, 1631, 782 cm^{-1} .

^1H RMN (200 MHz, CDCl_3) δ 1,41 (t, 2H); 1,44 (m, 3H); 4,37 (q, 2H); 7,08 (m, 4H), 7,17 (m, 4H); 7,35 (m, 4H); 7,42 (d, 1H); 8,03 (s, 1H); 9,29 (s, 1H).

^{13}C RMN (50 MHz, CDCl_3) δ 14,4; 61,7; 118,6; 111,6; 112,4; 118,0; 120,7; 123,4; 125,8; 128,3; 133,1; 137,8; 142,5; 166,4.

5.6.1.6. Obtenção do (6*E*,13*E*)-dipentil 5, 12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato (7)



(7)

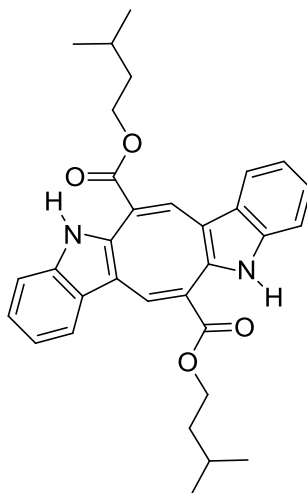
A uma solução de ácido caulerpínico (2) (1,0 equiv., 0,0814 mmol, 30 mg) em álcool amílico (6 mL), foram gotejados 0,013 mL de cloreto de tionila (SOCl_2) (2,26 equiv., 0,1839 mmol) à temperatura ambiente. A temperatura foi elevada à 60°C, mantida sob agitação magnética e monitorada através de CCDA até o completo consumo do material de partida (8 horas). A mistura foi evaporada sob pressão reduzida, suspendida em água destilada e foi submetida a uma extração com acetato de etila (3 x 20 mL). A fase orgânica foi reunida, tratada com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O material obtido foi submetido à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) utilizando como eluentes os solventes hexano e acetato de etila, (AcOEt :Hexano - 20:80). Obtendo assim o produto, (6*E*,13*E*)-dipentil 5, 12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato (7), na forma de um sólido alaranjado em 67% de rendimento, equivalente a 20,1 mg.

IV (KBr, n_{max}): 3401, 3372, 3058, 2952, 2932, 2855, 1680, 1628, 1459, 1415, 1321, 1259, 1180, 1158, 1056, 732 cm^{-1} .

¹H RMN (200 MHz, CDCl₃) δ 0,94(t, 3H); 1,41 (m, 4H); 1,78 (m, 2H); 1,81 (m, 2H); 4,25 (t, 2H); 4,29 (t, 2H); 4,32 (t, 2H); 7,08 (m, 4H); 7,18 (d, 4H), 7,28 (m, 4H); 7,40 (d, 4H); 8,03 (s, 1H); 9,32 (s, 1H).

¹³C RMN (50 MHz, CDCl₃) δ 14,1; 22,5; 28,3; 28,4; 67,8; 111,6; 112,4; 118,0; 120,7; 123,4; 125,8; 128,3; 133,2; 137,8; 142,5; 166,4.

5.6.1.7.Obtenção do (6*E*,13*E*)-diisopentil 5, 12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato (8)



(8)

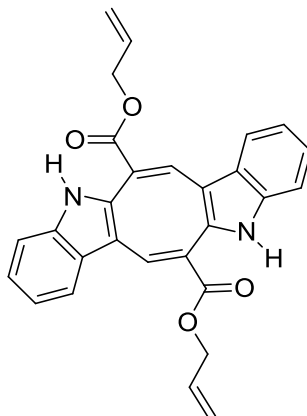
A uma solução de ácido caulerpínico (2) (1,0 equiv., 0,0814 mmol, 30 mg) em álcool iso-amílico (6 mL), foram gotejados 0,013mL de cloreto de tionila (SOCl_2) (2,26 equiv., 0,1839 mmol) à temperatura ambiente. A temperatura foi elevada à 60°C, mantida sob agitação magnética e monitorada através de CCDA até o completo consumo do material de partida (8 horas). A mistura foi evaporada sob pressão reduzida, suspendida em água destilada e foi submetida a uma extração com acetato de etila (3 x 20 mL). A fase orgânica foi reunida, tratada com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O material obtido foi submetido à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) utilizando como eluentes os solventes hexano e acetato de etila, (AcOET:Hexano - 20:80). Obtendo assim o produto, (6*E*,13*E*)-diisopentil 5, 12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato (8), na forma de um sólido avermelhado em 65% de rendimento, equivalente a 19,5 mg.

IV (KBr, n_{max}): 3377, 2957, 2925, 2871, 1685, 1629, 1457, 1256, 1227, 1179, 1059, 741 cm^{-1} .

¹H RMN (200 MHz, CDCl₃) δ 0,99 (d, 6H); 1,68 (m, 3H); 4,32 (t, 2H); 7,08 (m, 3H); 7,17 (m, 3H); 7,28 (d, 3H); 7,40 (d, 1H); 8,02 (s, 1H); 9,32 (s, 1H).

¹³C RMN (50 MHz, CDCl₃) δ 22,6; 25,4; 37,4; 64,4; 111,6; 112,4; 118,0; 120,8; 123,4; 125,8; 128,3; 133,2; 137,8; 142,5; 166,4.

5.6.1.8. Obtenção do (6*E*,13*E*)-dialil 5, 12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato (9)



(9)

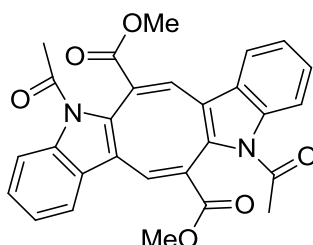
A uma solução de ácido caulerpínico (2) (1,0 equiv., 0,0814 mmol, 30 mg) em álcool alílico (6 mL), foram gotejados 0,013mL de cloreto de tionila (SOCl_2) (2,26 equiv., 0,1839 mmol) à temperatura ambiente. A temperatura foi elevada à 60°C, mantida sob agitação magnética e monitorada através de CCDA até o completo consumo do material de partida (8 horas). A mistura foi evaporada sob pressão reduzida, suspendida em água destilada e foi submetida a uma extração com acetato de etila (3 x 20 mL). A fase orgânica foi reunida, tratada com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O material obtido foi submetido à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) utilizando como eluentes os solventes hexano e acetato de etila, (AcOEt :Hexano - 20:80). Obtendo assim o produto, (6*E*,13*E*)-dialil 5, 12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato (9), na forma de um sólido alaranjado em 50% de rendimento, equivalente a 15 mg.

IV (KBr, n_{max}): 3401, 2957, 2925, 2853, 1680, 1611, 1458, 1415, 1253, 1180, 1177, 1041, 733 cm^{-1} .

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 4,79 (d, 2H); 5,32 (dd, 2H); 5,43 (dd, 2H); 6,04 (m, 1H); 6,05 (m, 1H); 7,09 (t, 1H); 7,18(m, 1H); 7,29 (d, 1H); 7,42 (d, 1H); 8,08 (s, 1H); 9,24 (s, 1H); 9,24 (s, 1H).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃) δ 66,2; 111,6; 112,6; 118,1; 119,0; 120,9; 123,5; 125,6; 128,3; 132,0; 133,1; 137,9; 143,0; 165,8.

5.6.1.9. Obtenção do (6*E*,13*E*)-dimetil 5, 12-diacetil-5,12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato (10)



(10)

A uma solução de Caulerpina (1) (1,0 equiv., 0,0814 mmol, 30 mg) em diclorometano (15 mL), foram adicionados trietilamina (2,1 equiv., 0,42 mmol, 0,1 mL) e anidrido acético (4,1 equiv., 0,82 mmol, 0,2 mL). A reação foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente, e o consumo do material de partida ocorreu após um período de 24 horas, sob monitoramento por meio de CCDA. A mistura foi evaporada sob pressão reduzida, foi adicionados 20 mL de água destilada, submetida a uma extração com 20 mL diclorometano (2 vezes). A fase orgânica resultante foi reunida e extraída com 20 mL de ácido clorídrico diluída a 3%. A fase orgânica foi tratada com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O produto, (6*E*,13*E*)-dimetil 5, 12-diacetil-5,12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato (10), foi obtido na forma de um sólido amarelo em um rendimento de 90%, equivalente a 27 mg.

IV (KBr, n_{max}): 3475, 3418, 3022, 2997, 1726, 1708, 1460, 1433, 1369, 1300, 1247, 1204, 1114, 1064, 1006, 744 cm^{-1} .

^1H RMN (200 MHz, CDCl_3) δ 2,56 (s, 3H); 3,77 (s, 3H); 7,21 (m, 2H); 7,23 (m, 2H); 7,21 (m, 2H); 7,25 (m, 2H); 7,30 (d, 2H); 7,37 (d, 2H); 8,01 (s, 1H).

^{13}C RMN (50 MHz, CDCl_3) δ 26,7; 52,6; 115,0; 119,4; 122,3; 125,5; 126,0; 128,3; 131,8; 132,8; 135,3; 136,6; 165,2; 169,5.

5.7. Estudo da atividade leishmanicida

Os estudos farmacológicos foram realizados no Laboratório de Farmacologia e Imunidade-LAFI-UFAL, sob coordenação da Profa. Magna Suzana Alexandre Moreira. O estudo relacionado à atividade leishmanicida foi realizado com auxílio das doutorandas Carolina Barbosa Brito da Matta e Carolina Vieira.

5.7.1. Cultura de promastigotas: Promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MCAN/BR/89/BA262) cedidas gentilmente pela Dra. Valéria de Matos Borges do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - Fiocruz-BA foram mantidas *in vitro* em meio Schneider's suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 2% urina humana masculina a 27°C em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (BOD). No momento do uso, os parasitos foram colocados em tubos Falcon e centrifugados a 3500 rpm durante 10 minutos a 25°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuspensionado em meio Schneider's, realizou-se a contagem dos parasitos em câmara de Neubauer, para posterior plaqueamento e execução dos experimentos.

5.7.2. Ensaio de viabilidade sobre formas promastigotas: formas promastigotas de *L. amazonensis* (1×10^6 por poços) foram contadas e plaqueadas num volume de 500 µL por poços em placas de 48 poços com meio Schneider suplementado com 10% de SFB, duplicadas, e expostas a diferentes concentrações das substâncias. A pentamidina foi usada como fármaco padrão. Para os poços controles utilizou-se meio Schneider e DMSO (0,1%). Em seguida, a placa foi incubada em estufa BDO a 27°C por 48 horas. Após esse período o número de promastigotas foi estimado através da contagem na câmara de Neubauer, realizando diluição limitante e com auxílio de um microscópio óptico com objetiva de 40x.

5.7.3. Cultura de macrófagos: Foram utilizados macrófagos obtidos a partir de camundongos BALB/c previamente inoculados por via intraperitoneal com 3% de meio de tioglicolato (Sigma). Mantidos em garrafas de cultura contendo 10mL de meio RPMI suplementado com 10% de SFB e 2mM de L-glutamina, aminoácidos não essenciais e piruvato. Para os experimentos, as células foram

contadas, ajustadas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB e posteriormente plaqueadas numa placa de 96 poços.

5.7.4. Ensaio de viabilidade de macrófagos: Para o estudo da viabilidade celular de macrófagos frente à caulerpina e derivados, o grupo utilizou o método de redução de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol- 2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (MOSMANN, 1983; HUSSAIN; NOURI; OLIVER, 1993). Foram utilizados macrófagos obtidos a partir de camundongos BALB/c, plaqueados em placas de 96 poços por 1 hora em (1×10^5 /poço) e expostos a diferentes concentrações das substâncias diluídas em meio RPMI suplementado (0,1, 1, 10 e 100 μ M) por um período de 48 horas em estufa a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Os poços controles continham células cultivadas apenas com meio de cultura ou células cultivadas na presença do diluente das substâncias (DMSO 0,1%). Após a incubação, o sobrenadante foi descartado e em seguida foi adicionado 100 μ L da solução de MTT (5 mg/10mL). As placas foram novamente incubadas por um período de 1 hora em estufa a 37°C e a 5% de CO₂, posteriormente foi retirado o sobrenadante e adicionado 100 μ L de DMSO e realizada a leitura em espectrofotômetro a 550 nm. A viabilidade celular dos poços tratados com as concentrações foi comparada ao padrão de morte obtido nas culturas controle.

5.7.5. Ensaio de amastigotas: Foram utilizados macrófagos obtidos a partir de camundongos BALB/c, foram plaqueados na proporção de 10^5 células/poço de placa de 24 poços com lamínulas por uma hora com meio RPMI suplementado. Os macrófagos foram incubados *overnight* e, posteriormente, infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis*, numa proporção de 10 parasitos: 1 macrófago. A placa foi incubada por 6 horas em estufa a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após 6 horas de infecção, os macrófagos foram “lavados” com solução salina com fosfatos (PBS, pH 7,2), para remoção dos parasitos não interiorizados. Os macrófagos foram cultivados com RPMI suplementado com 10% SFB, 2mM de L-glutamina, 2mM aminoácidos não essenciais e 2mM piruvato, na presença ou não dos derivados na concentração de 10 μ M e foram mantidos em estufa a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

Resultados e Discussão

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Caracterização estrutural da Caulerpina

O estudo fitoquímico da espécie *Caulerpa racemosa*, permitiu o isolamento da substância caulerpina (1) que se apresentou na forma sólido vermelho escuro.

A identificação da caulerpina (1) foi possível por meio da análise do espectro de absorção na região do IV e RMN de ^1H e ^{13}C (Tabela 1, p. 69) e comparações com dados da literatura (Tabela 2, p. 70).

No espectro de IV observou-se a presença da absorção correspondente ao estiramento N-H em 3382 cm^{-1} . Ainda é possível observar o sinal em 2852 cm^{-1} correspondentes a estiramentos tipo C-H de metoxila.

A presença do grupo éster foi sugerida pelas absorções em 1687 cm^{-1} corresponde ao estiramento C=O e 1265 cm^{-1} relacionado ao estiramento C-O (Figura 10, p. 71). O deslocamento da carbonila para uma menor frequência se deve ao deslocamento de elétrons π para a ligação C=O, aumentando o caráter de ligação simples das ligações C=O no híbrido de ressonância e, assim, diminui suas constantes de força (PAVIA *et al.*, 2010).

O espectro RMN ^1H (Figura 11, p. 72) sugeriu a presença de um anel aromático orto dissustituído, devido à presença dois dupletos orto em δ_{H} 7,42 ($J=7,6\text{ Hz}$, H-4/H-4') e 7,30 ($J=7,8\text{ Hz}$, H-7/H-7') e dois duplos tripletos em orto entre os hidrogênios em δ_{H} 7,18 ($J=1,4$ e $7,2\text{ Hz}$, H-6/H-6') e δ_{H} 7,08 ($J=1,4$ e $7,2\text{ Hz}$, H-5/H-5') condizentes com a presença de anel aromático dissustituído em orto (PAVIA *et al.*, 2010).

A presença de um simpleto em δ_{H} 9,2 refere-se ao hidrogênio ligado a nitrogênio, característico de um alcaloide de núcleo indólico (GOVENKAR; WAHIDULLA, 2000; ANJANEYULU *et al.*, 1992). Ainda é possível observar a presença de um simpleto em δ_{H} 8,0 atribuído ao hidrogênio de carbono metínico do anel ciclooctatetraeno e δ_{H} 3,90 característico de metoxila (PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2007;).

Os dados de RMN ^1H encontrados sugerem que a substância pode se tratar do alcaloide CLP, anteriormente isolado da espécie *Caulerpa racemosa*.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 12, p. 73) apresentou 12 sinais, destes, 6 são para carbonos não hidrogenados, 5 são para carbonos metínicos e 1 para metoxila. A presença dos sinais entre δ_{C} 111, 6 e 142,9 confirmaram a presença do anel aromático, pois são característicos de carbono sp^2 e carbonos não hidrogenados. O sinal em δ_{C} 52,6 sugere a presença de uma metoxila e o sinal em δ_{C} 166,9 indica a presença de uma carbonila de éster (LORENZO, 2010). Vale ressaltar que a caulerpina por ser uma molécula simétrica, possui o dobro de números de carbonos em relação aos picos apresentados no espectro com intensidades dobradas.

Os dados espectrais permitiram identificar a substância como sendo o alcaloide bis-indólico caulerpina, (6*E*, 13*E*)-dimetil 5,12- dihidrocicloocta [1,2 *b*: 5, 6-*b'*] diindol-6,13-dicarboxilato), isolada em 1970 a partir da *Caulerpa racemosa* e *C. sertularioides*. Em 1988, foi descrito que a CLP apresenta baixa toxicidade e uma variedade de atividades biológicas tem sido relatada atualmente (CHAY, et al., 2014) (Figura 9, p. 68).

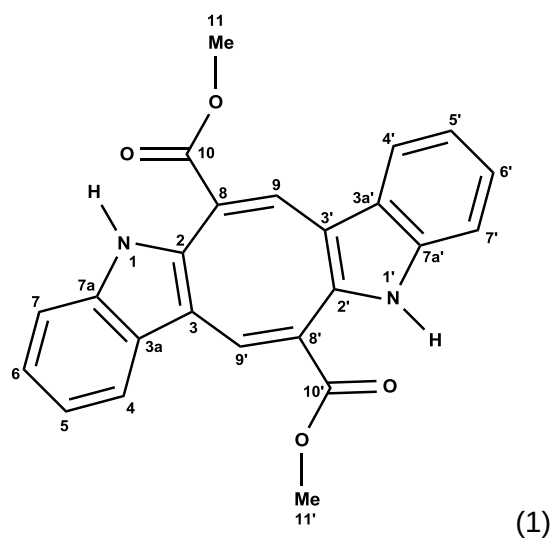


Figura 9. Estrutura química da caulerpina (1).

Tabela 1. Dados de RMN de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50MHz) da caulerpina registrados em CDCl_3 .

	δ_{H}	δ_{C}
C		
2/2'	-	132,9
3/3'	-	112,6
3a/3a'	-	128,2
7a/7a'	-	137,8
8/8'	-	125,5
10/10'	-	166,8
CH		
4/4'	7,42(dd, $J = 7,6 \text{ Hz}$, 1H)	118,1
5/5'	7,08(dt, $J = 1,4; 7,6 \text{ Hz}$, 4H)	120,8
6/6'	7,18 (dt, $J = 1,4; 7,2 \text{ Hz}$, 4H)	123,5
7/7'	7,30(dd, $J = 7,6 \text{ Hz}$, 4H)	111,6
9/9'	8,0 (s, 1H)	142,9
OCH₃		
11/11'	3,90 (s, 3H)	52,6

Tabela 2. Dados comparativos de RMN ^{13}C da caulerpina isolada (δ , CDCl_3 , 50 MHz) com modelos da literatura (δ , CDCl_3 , 125 MHz) (LORENZO,2010).

	Literatura	Caulerpina
C		
2/2'	132,8	132,9
3/3'	112,5	112,6
3a/3a'	128,3	128,2
7a/7a'	137,7	137,8
8/8'	125,6	125,5
10/10'	166,6	166,8
CH		
4/4'	118,1	118,1
5/5'	120,7	120,8
6/6'	123,3	123,5
7/7'	111,5	111,6
9/9'	142,9	142,9
CH₃O		
11/11'	52,6	52,6

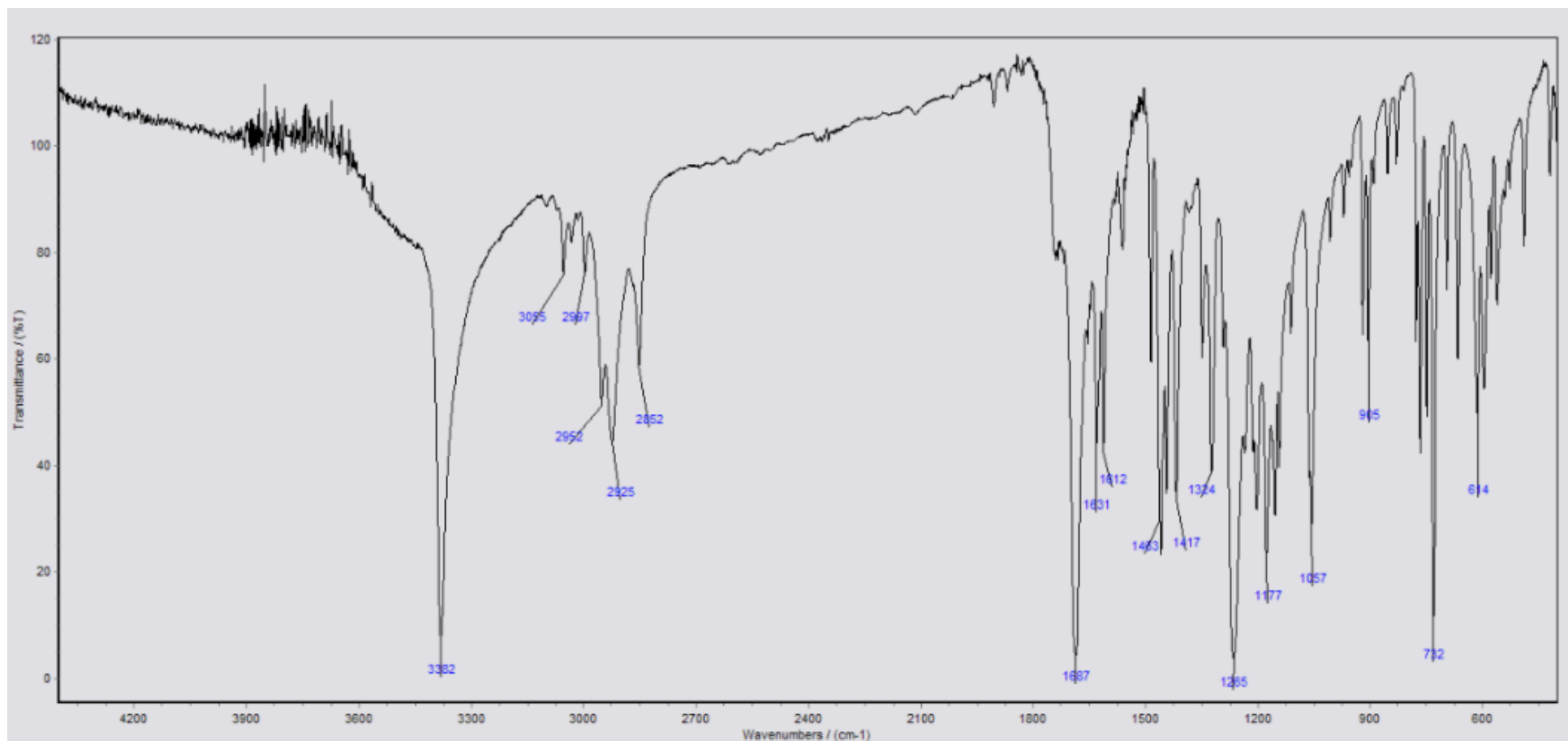


Figura 10. Espectro de IV da caulerpina.

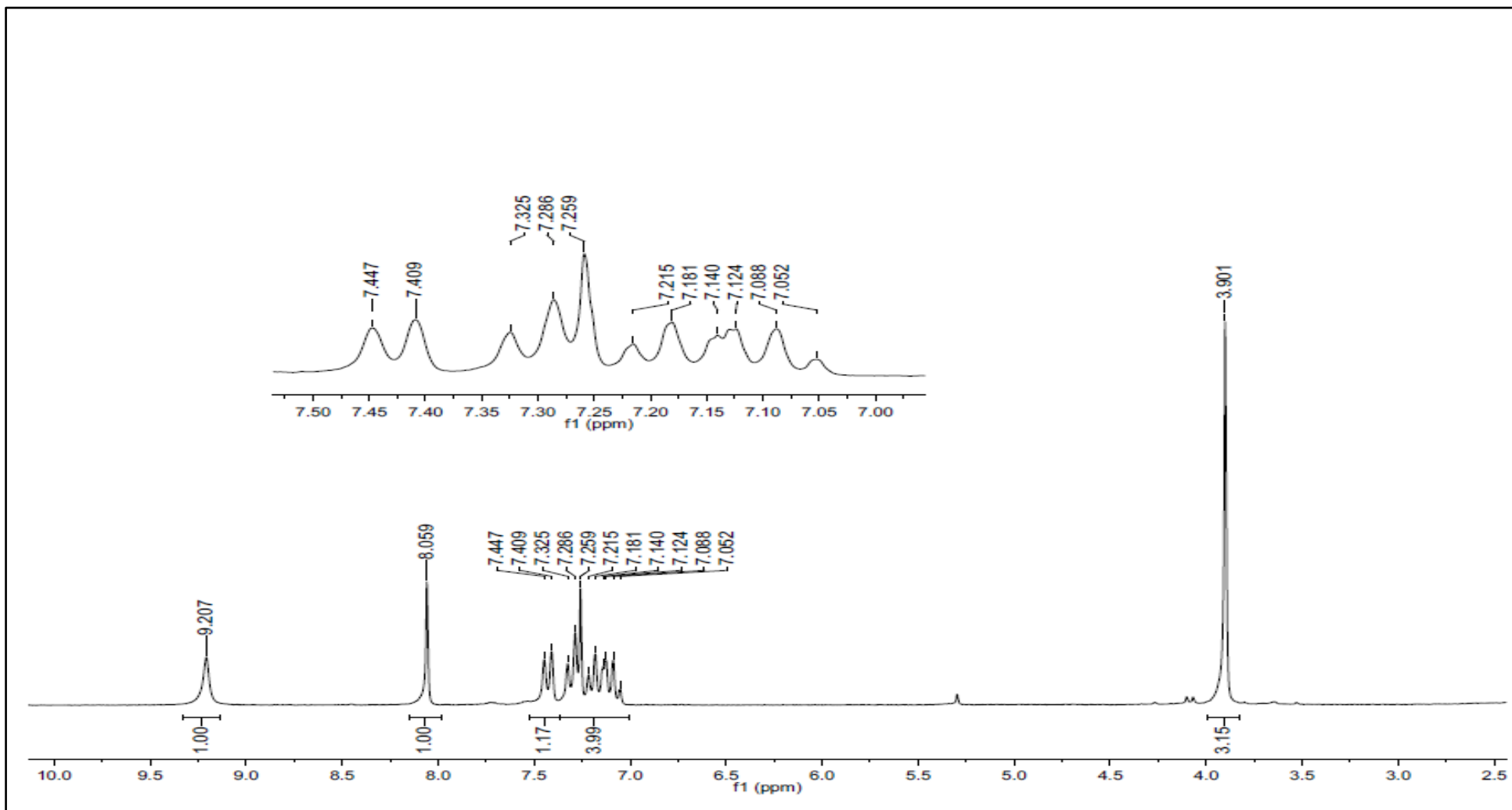


Figura 11. Espectro de RMN de ^1H da Caulerpina (200 MHz, CDCl_3).

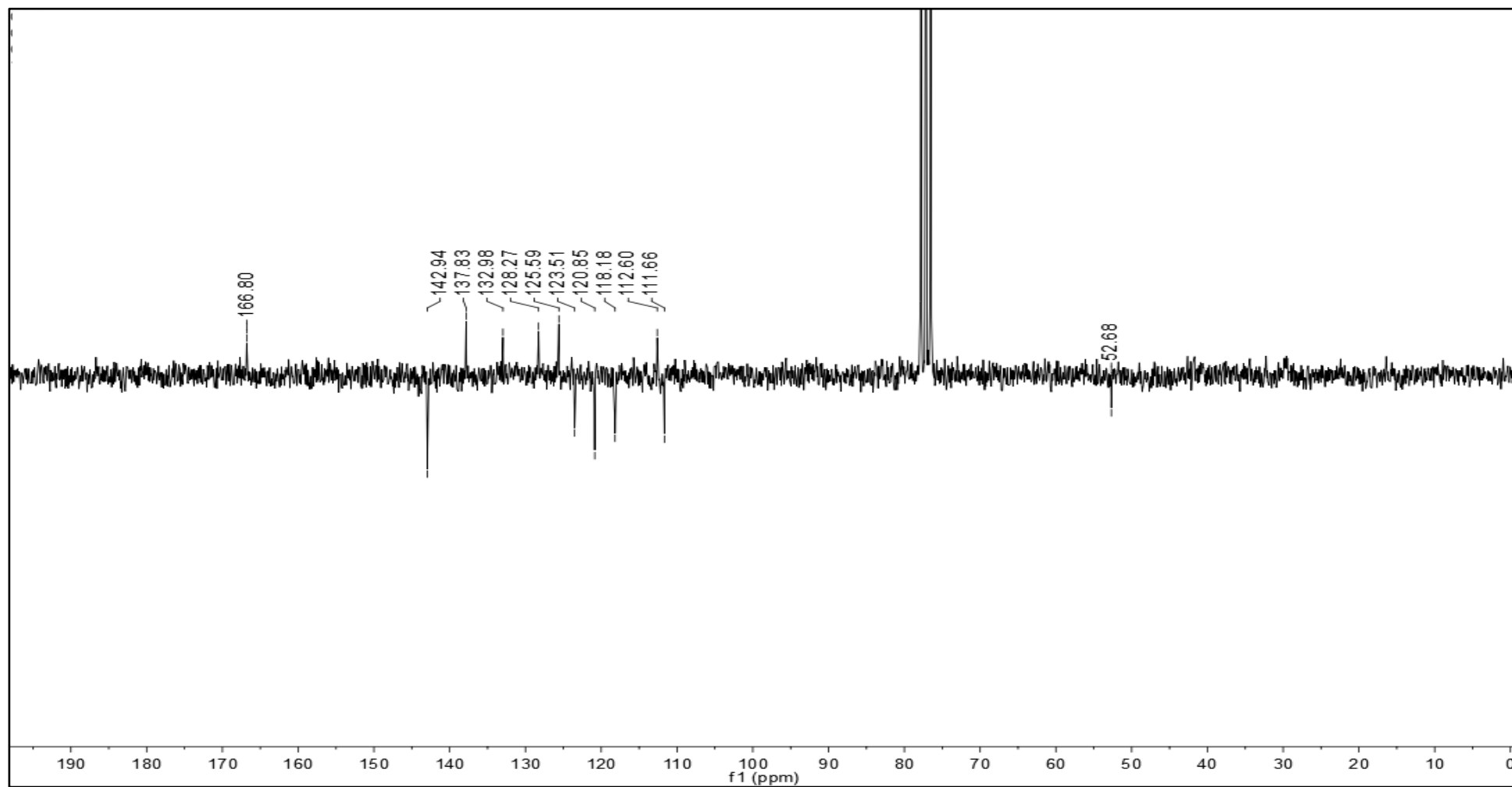
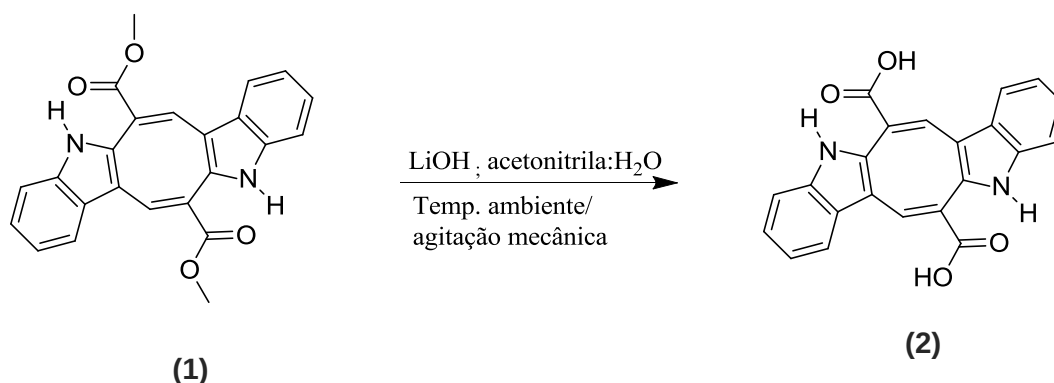


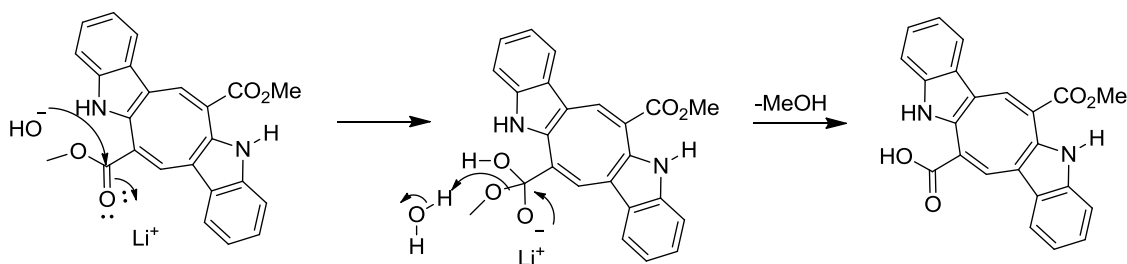
Figura 12. Espectro de RMN de ^{13}C da Caulerpina (50 MHz, CDCl_3).

6.2. Obtenção e caracterização estrutural do derivado 2 (ácido caulerpínico).

A semi-síntese para a elaboração do ácido caulerpínico ocorreu por meio da hidrólise da CLP em meio básico (LiOH) em uma mistura de Acetonitrila:H₂O (1:1) (AMARANTE *et al.*, 2011).



O ácido carboxílico (2) derivado da CLP pode ser obtido pela hidrólise do éster em meio básico, através de uma reação de adição nucleofílica-eliminação à carbonila de éster. A chave para esse mecanismo é a formação de um intermediário tetraédrico que retorna ao grupo carbonila após a eliminação. A etapa inicial da reação envolve adição nucleofílica no grupo da carbonila, pois o carbono da carbonila eletrofílico aceita elétrons da base e a habilidade do átomo do oxigênio da carbonila em acomodar um par de elétrons da ligação dupla carbono-oxigênio. O intermediário formado a partir do composto de acila normalmente elimina o grupo abandonador, essa eliminação regenera a ligação dupla do carbono-oxigênio (SOLOMONS *et al.*, 2006).



O ácido caulerpínico apresentou-se como um sólido preto, solúvel em metanol. Sua identificação foi realizada através de análises espectrais de Infravermelho, RMN ^1H e ^{13}C (Tabela 3, p. 77) e comparações com dados da CLP isolada no presente trabalho (Tabela 4, p. 78).

A obtenção do ácido caulerpínico foi verificada pela análise do espectro de absorção na região do IV (figura 14, p. 64). Observou-se a presença do sinal de absorção correspondente ao estiramento N-H em 3443 cm^{-1} . Ainda é possível observar a presença do sinal de absorção correspondente ao estiramento C-H de sp^2 em 3059 cm^{-1} e ao sinal de absorção correspondente ao estiramento O-H em 3410 . A presença correspondente ao estiramento C-O em 1266 cm^{-1} , do ácido carboxílico (PAVIA *et al.*, 2010). O sinal de absorção em 1658 cm^{-1} corresponde ao estiramento C=O, relacionado à presença de carbonila do ácido carboxílico. E finalmente o sinal em 1407 cm^{-1} correspondente ao estiramento C-O-H (PAVIA *et al.*, 2010).

O espectro de RMN ^1H (Figura 15, p. 80) do ácido caulerpínico apresentou feições semelhantes ao da CLP. Foram observados sinais em δ_{H} 6,97 a 7,41 característicos do núcleo aromático. Analisando o espectro é possível observar um simpleto em δ_{H} 8,22 característico do hidrogênio de carbono metínico do anel ciclooctatetraeno, entretanto, não é possível observar no espectro o sinal em δ_{H} 3,90 característico de metoxila, evidenciando que ocorreu a hidrólise da CLP e formação do produto ácido (PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

O espectro de RMN ^{13}C -APT (Figura 16, p. 81) apresentou 11 sinais significativos, destes, 6 são para carbonos não hydrogenados e 5 para carbonos metínicos. A presença do anel aromático foi ratificada pelos sinais entre δ_{C} 112,0 e 143,3 que são característicos de carbonos sp^2 e carbonos não hydrogenados. Ainda observou-se a presença de uma carbonila de ácido e em δ_{C} 169,5. A ausência do sinal em δ_{C} 52,6 característico de metoxila, corrobora com o espectro de RMN ^1H que mostrou sinais para uma substância ácida (PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

Os dados espectrais, permitiram identificar a substância obtida como sendo (6*E*, 13*E*)-5,12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-ácido dicarboxílico (2) (Figura 13, p. 76).

Isolado pela primeira vez em 1985, a partir da *Caulerpa mexicana* (CHAY *et al.*, 2014) e pela primeira vez semi-sintetizado a partir da CLP (Figura 13, p. 76)

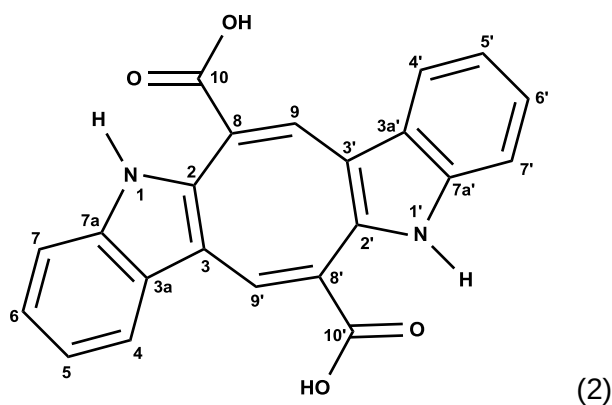


Figura 13. Estrutura química do derivado (2) da caulerpina.

Tabela 3. Dados de RMN de ^1H (200 Hz) e ^{13}C (50 Hz) do derivado (2) registrados em CDCl_3 .

	δ_{H}	δ_{C}
C		
2/2'	-	134,5
3/3'	-	112,4
3a/3a'	-	127,4
7a/7a'	-	139,3
8/8'	-	129,0
10/10'	-	169,7
CH		
4/4'	7,40(d, $J = 7,6$ Hz, 2H)	118,6
5/5'	7,05 (m, 2H)	121,0
6/6'	7,05 (m, 2H)	123,6
7/7'	7,30(d, $J = 7,6$ Hz, 2H)	112,9
9/9'	8,22 (s, 1H)	143,3

Tabela 4. Dados comparativos de RMN ^{13}C da caulerpina isolada (δ , CDCl_3 , 200 MHz) com o derivado (2) (δ , CDCl_3 , 50 MHz)

	Derivado (2)	Caulerpina
C		
2/2'	134,5	132,9
3/3'	112,4	112,6
3a/3a'	127,4	128,2
7a/7a'	139,3	137,8
8/8'	129,0	125,5
10/10'	169,7	166,8
CH		
4/4'	118,6	118,1
5/5'	121,0	120,8
6/6'	123,6	123,5
7/7'	112,9	111,6
9/9'	143,3	142,9
OCH3		
11/11'	-	52,6

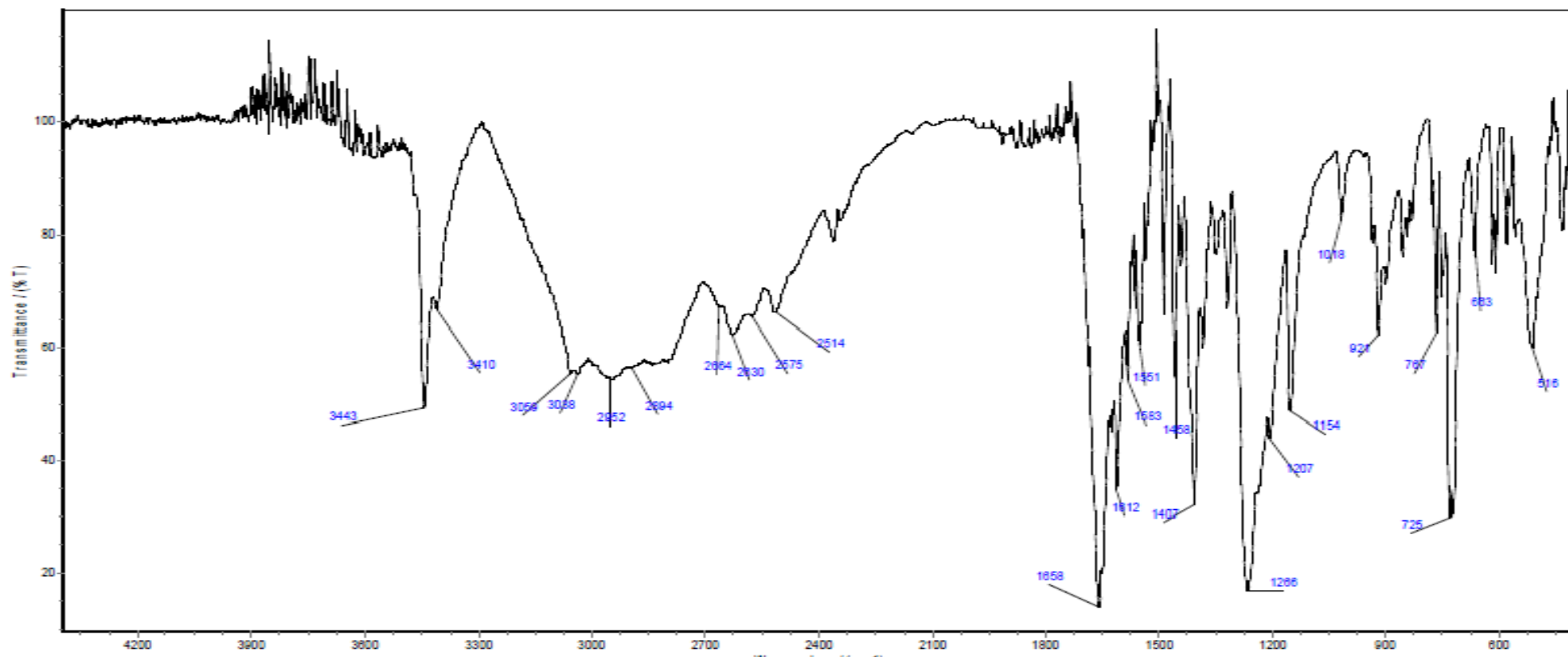


Figura 14. Espectro de IV do derivado (2).

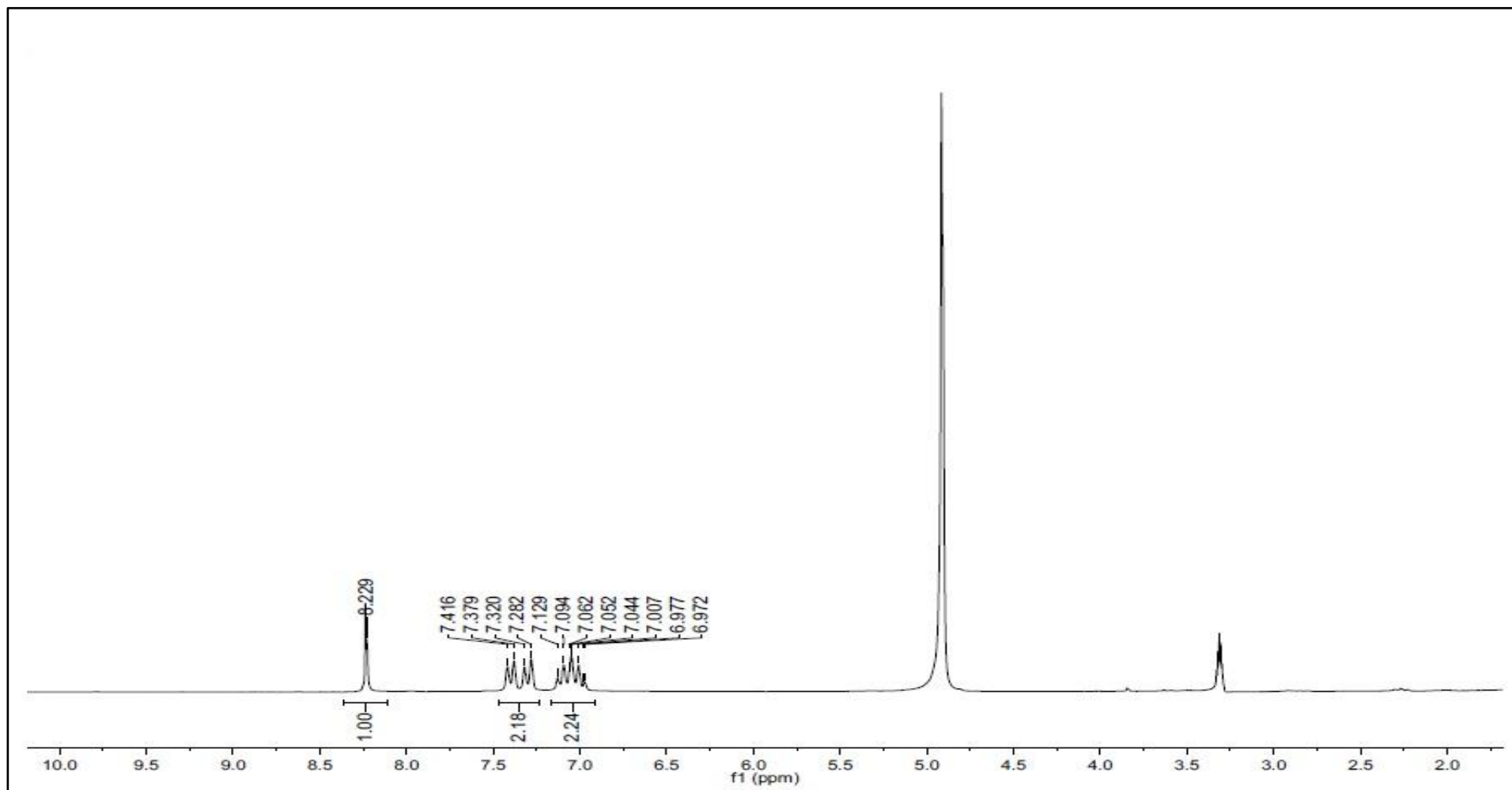


Figura 15. Espectro de RMN de ^1H da do derivado (2) (200 MHz, CDCl_3).

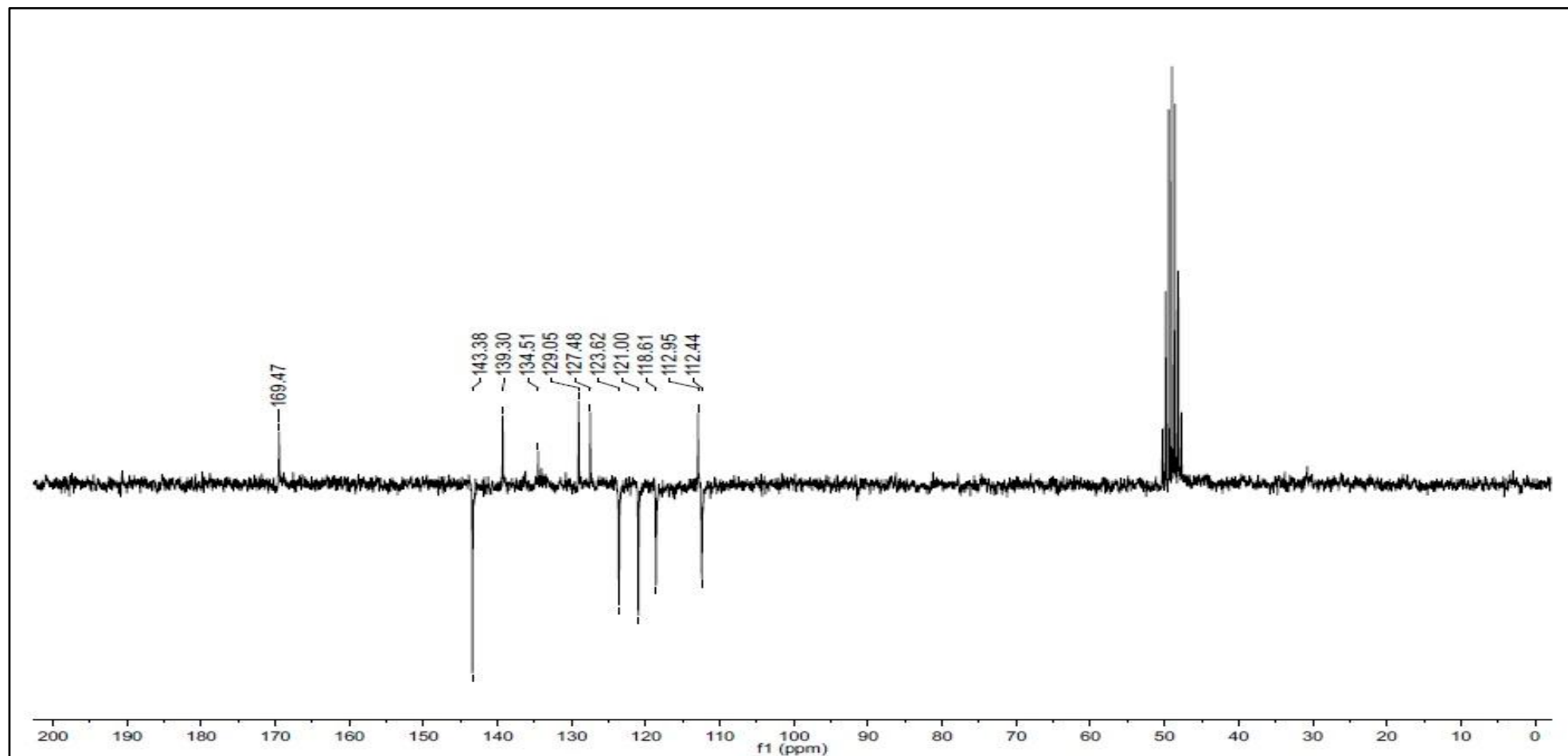
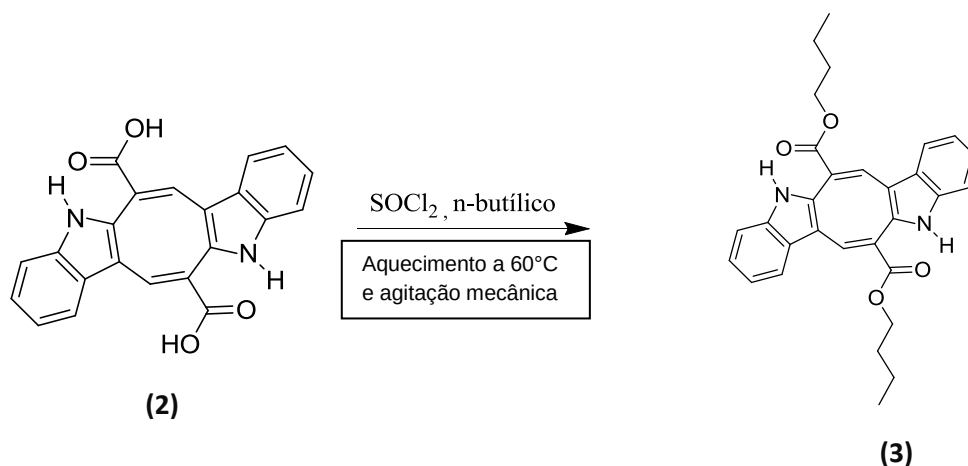


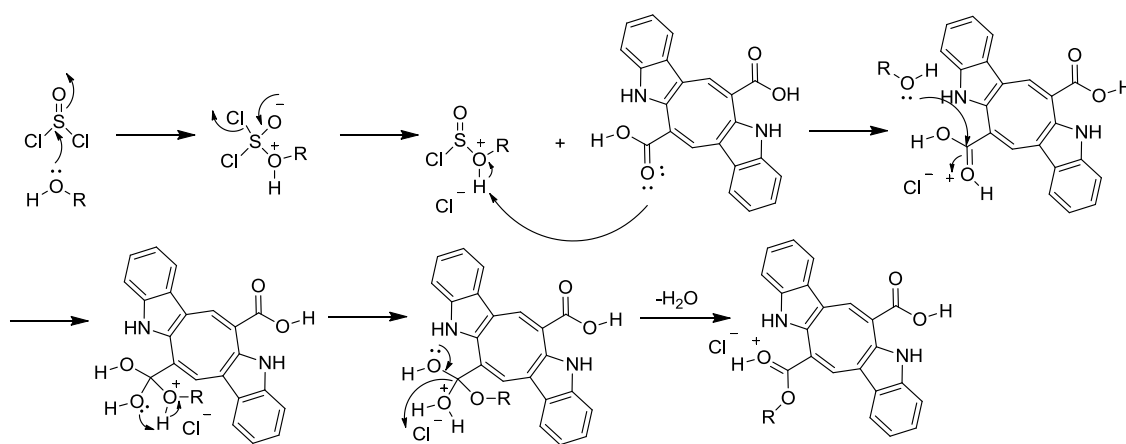
Figura 16. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado (2) (50 MHz, CD_3OD).

6.3. Obtenção e caracterização estrutural do derivado (3)

Para a obtenção do derivado (3) ocorreu, uma esterificação do ácido caulerpínico mediada pelo cloreto de tionila, o mecanismo para essa reação envolve uma catálise ácida resultante da liberação do ácido clorídrico através de uma reação entre o cloreto de tionila e o n-butanol (Tanaka *et al.*, 1995).



A catálise ácida ocorre quando o ácido do substrato é mais reativo que a espécie neutra (SOLOMONS *et al.*, 2006).



O análogo (3) apresentou-se como um sólido avermelhado, solúvel em clorofórmio. Sua identificação foi realizada através de análises espectrais de Infravermelho, RMN ^1H e ^{13}C (Tabela 5, p. 85) e comparações com dados da CLP isolada no presente trabalho (Tabela 6, p. 86).

A formação do éster n-Butílico foi verificada pela análise do espectro de absorção na região do IV (Figura 18, p. 87) observando-se a presença do sinal de absorção correspondente ao estiramento N-H em 3375 cm^{-1} . Ainda é possível observar os sinais em 2852 cm^{-1} correspondentes a estiramentos tipo C-H sp^3 . Como também a presença correspondente ao estiramento C-O de éster em 1252 cm^{-1} . E o sinal de absorção em 1678 cm^{-1} corresponde ao estiramento C=O, relacionado à presença de carbonila do éster (PAVIA *et al.*, 2010).

O espectro de RMN ^1H (Figura 19, p. 88) apresentou semelhanças com a caulerpina. Foram observados sinais entre δ_{H} 7,09 a 7,43 característicos do núcleo aromático. Analisando o espectro é possível observar a presença de um simpleto em δ_{H} 9,3 sugere atribuição ao hidrogênio ligado a nitrogênio que é característico deste tipo de alcaloide (ANJANEYULU *et al.*, 1992). O espectro de RMN ^1H revelou ainda, a presença de um simpleto em δ_{H} 8,03 característico do hidrogênio de carbono metínico do anel ciclooctatetraeno (PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

Adicionalmente podem ser observados sinais indicando a presença do grupo n-butílico: δ_{H} 4,31 (triplete, $J= 5,4\text{Hz}$) correspondente ao CH_2 ligado a oxigênio; δ_{H} 1,77 (quinteto, $J= 5,6\text{ Hz}$) e δ_{H} 1,45 (sexteto, $J= 6\text{ Hz}$) ambos os hidrogênios de carbono metilênicos do grupo n-butil; δ_{H} 1,03 (triplete, $J= 5,8$) referente à metila terminal (PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

O espectro de RMN ^{13}C -APT (Figura 20, p. 89) apresentou 15 sinais significativos, destes, 6 são para carbonos não hidrogenados, 5 para carbonos metínicos, 3 para carbonos metilênicos e 1 para carbono metílico. A presença de sinais entre δ_{C} 111,6 e 142,5 confirmaram a presença de anel aromático, pois são característicos de carbonos mono hidrogenados e não hidrogenados. Foi possível observar o sinal em δ_{C} 166,4 correspondente a presença de uma

Os dados obtidos confirmaram a obtenção do derivado (6*E*, 13*E*)-dibutil 5, 12dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato (3) (Figura 17, p. 84) , descrito pela primeira vez na literatura.



Figura 17. Estrutura química do derivado (3) da caulerpina.

Tabela 5. Dados de RMN de ^1H (200 Hz) e ^{13}C (50 Hz) do derivado (3) registrados em CDCl_3 .

	δ_{H}	δ_{C}
C		
2/2'	-	133,2
3/3'	-	112,4
3a/3a'	-	127,4
7a/7a'	-	139,3
8/8'	-	128,3
10/10'	-	166,4
CH		
4/4'	7,41 (d, $J= 7,6$, 1H)	118,0
5/5'	7,09(m, 4H)	120,7
6/6'	7,18(m, 4H)	123,4
7/7'	7,30 (d, $J= 7,6$, 1H)	111,6
9/9'	8,03 (s, 1H)	142,5
CH₂		
11/11'	4,31 (t, $J= 5,4\text{Hz}$, 4H)	65,5
12/12'	1,77 (q, $J= 5,6\text{Hz}$, 4H)	30,8
13/13'	1,45 (sex, $J= 6\text{Hz}$, 6H)	19,4
CH₃		
14/14'	1,00 (t, $J= 5,8\text{Hz}$, 6H)	13,9

Tabela 6. Dados comparativos de RMN ^{13}C da caulerpina isolada (δ , CDCl_3 , 50 MHz) com derivado (3) (δ , CDCl_3 , 50 MHz).

	Derivado (3)	Caulerpina (isolada)
C		
2/2'	133,2	132,9
3/3'	112,4	112,6
3a/3a'	127,4	128,2
7a/7a'	139,3	137,8
8/8'	127,4	125,5
10/10'	166,4	166,8
CH		
4/4'	118,6	118,1
5/5'	120,7	120,8
6/6'	123,6	123,5
7/7'	112,4	111,6
9/9'	142,5	142,9
CH₂		
11/11'	65,5	-
12/12'	30,8	-
13/13'	19,4	-
CH₃		
14/14'	13,9	-
OCH₃		
11/11'	-	52,68

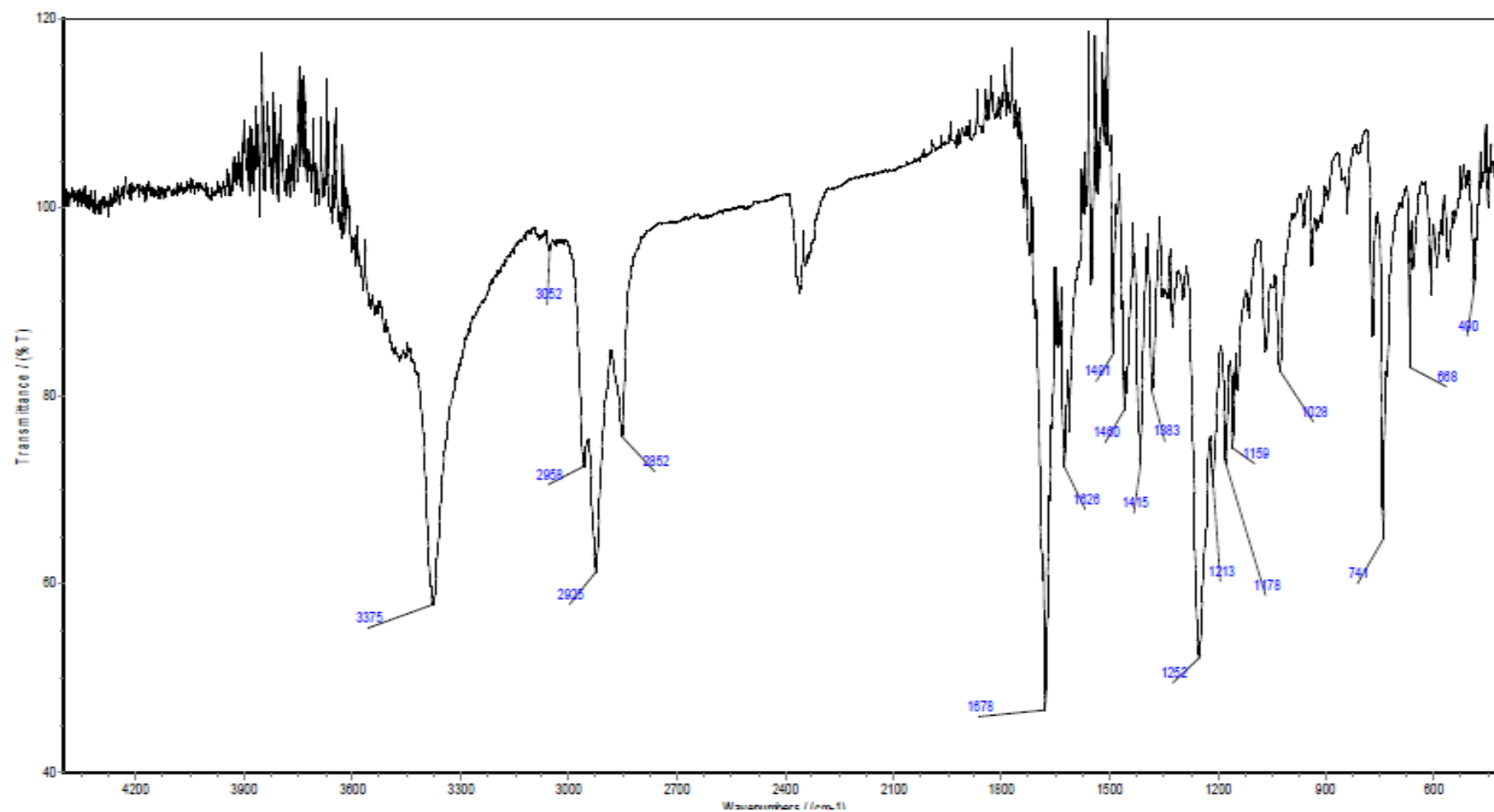


Figura 18. Espectro de IV do derivado (3).

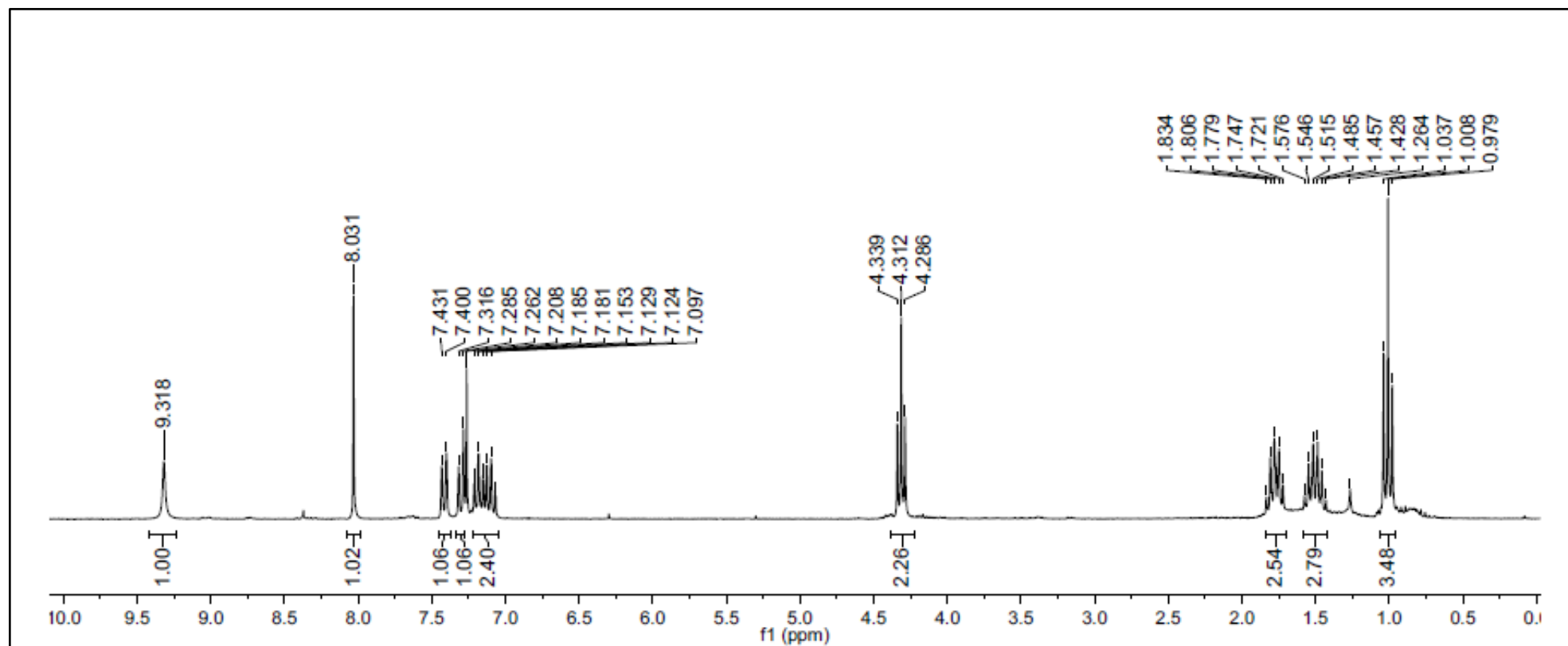


Figura 19. Espectro de RMN de ^1H do derivado (3) (200 MHz, CDCl_3).

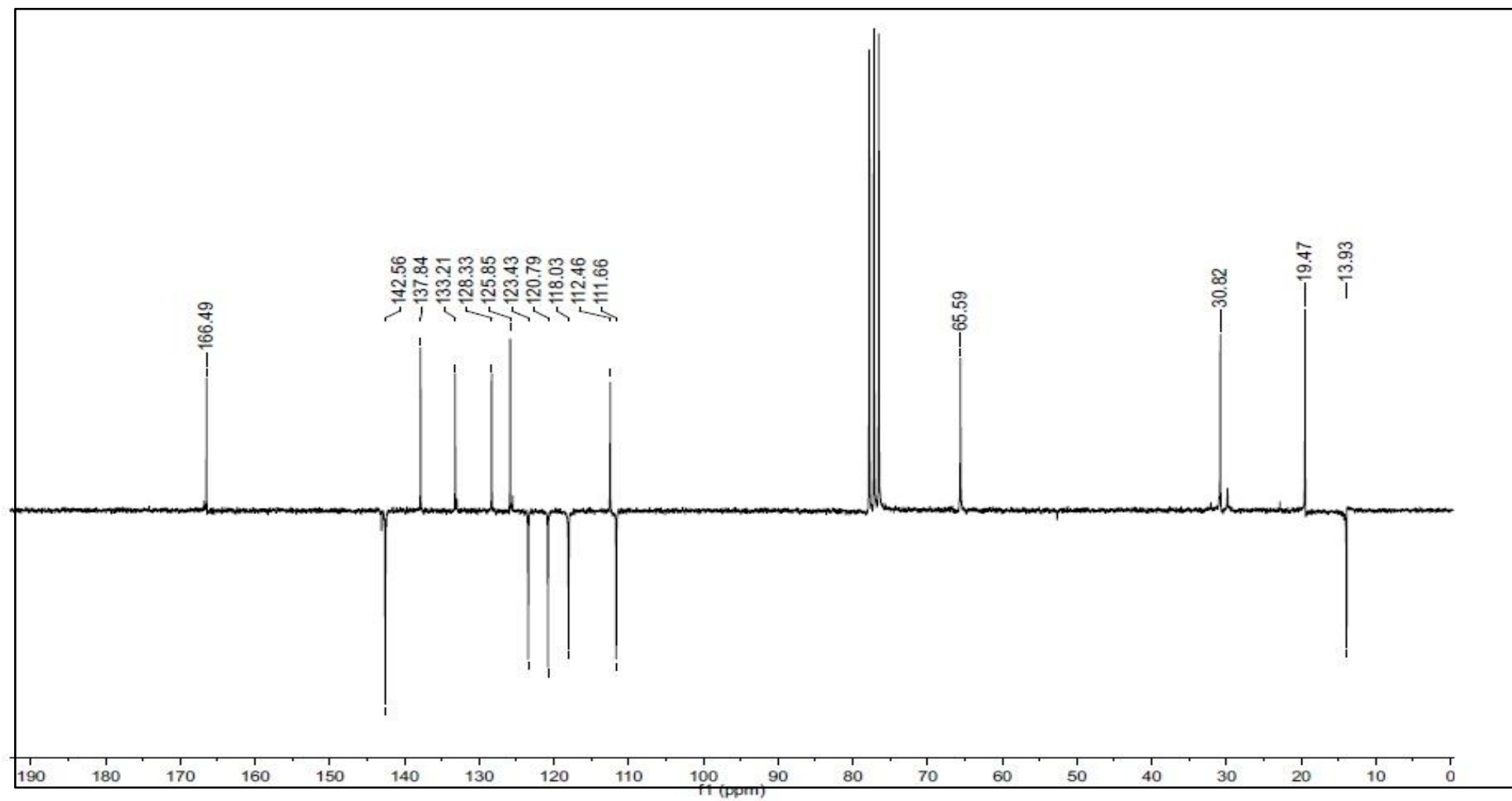
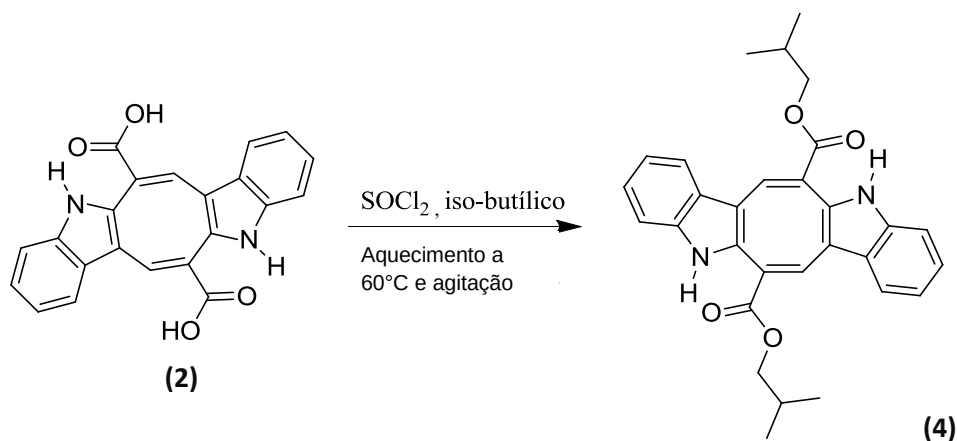


Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado (3) (50 MHz, CDCl_3).

6.4. Obtenção e caracterização estrutural do derivado (4)

A obtenção do derivado (4) seguiu o mesmo protocolo de esterificação do ácido caulerpínico (2) catalisada pelo cloreto de tionila, com o álcool iso-butílico. (Tanaka *et al.*, 1995).



O análogo (4) apresentou-se como um sólido marrom, solúvel em clorofórmio. Sua identificação foi realizada através de análises espectrais de Infravermelho, RMN ^1H e ^{13}C (Tabela 7, p.93) e comparações com dados da CLP isolada no presente trabalho (Tabela 8, p.94).

A formação do éster iso-butílico foi verificada pela análise do espectro de absorção na região do IV (Figura 22, p.95), observando-se a presença do sinal de absorção correspondente ao estiramento N-H em 3379 cm^{-1} . Ainda é possível observar o sinal em 2871 cm^{-1} correspondentes a estiramentos tipo C-H sp^3 . Como também a presença correspondente ao estiramento C-O de éster em 1250 cm^{-1} . E o sinal de absorção em 1678 cm^{-1} corresponde ao estiramento C=O, relacionado à presença de carbonila do éster (PAVIA *et al.*, 2010).

O espectro de RMN ^1H (Figura 23, p.96), apresentou sinais semelhantes aos demais derivados descritos anteriormente, o RMN ^1H do éster iso-butílico mostrou a presença do anel aromático, do hidrogênio característico de N-H do anel indólico e do anel ciclooctatetraeno (PAVIA *et al.*, 2010).

A presença do grupo iso-butílico pôde ser observada no espectro de RMN ^1H através dos seguintes sinais: um duplete intenso em 1,03 ($J=6,6$ Hz) com integral para 6 hidrogênios, referentes às metilas terminas do grupo iso-butílico, além de um multiplete em δ_{H} 2,05 ($J= 6,6$ Hz), correspondente ao CH, e um duplete em 4,09 ($J= 6$ Hz) referente aos hidrogênios do carbono oximetilênico (PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

O sinais referentes ao grupo iso-butílico também observados no RMN ^{13}C (Figura 24, p. 97), confirmando a sua presença. As duas metilas terminais foram encontradas sobrepostas em δ_{C} 19,03 e o sinal encontrado em δ_{C} 71,72 foi atribuído ao carbono oximetilênico do grupo iso-butílico. Vale ressaltar que por ser uma molécula simétrica, possui o dobro de números de carbonos em relação aos picos apresentados no espectro com intensidades dobradas (PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

Os dados espectrais permitiram identificar a substância como sendo (6*E*,13*E*)-diisobutil 5, 12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato (4) (Figura 21, p.92), descrito pela primeira vez na literatura.

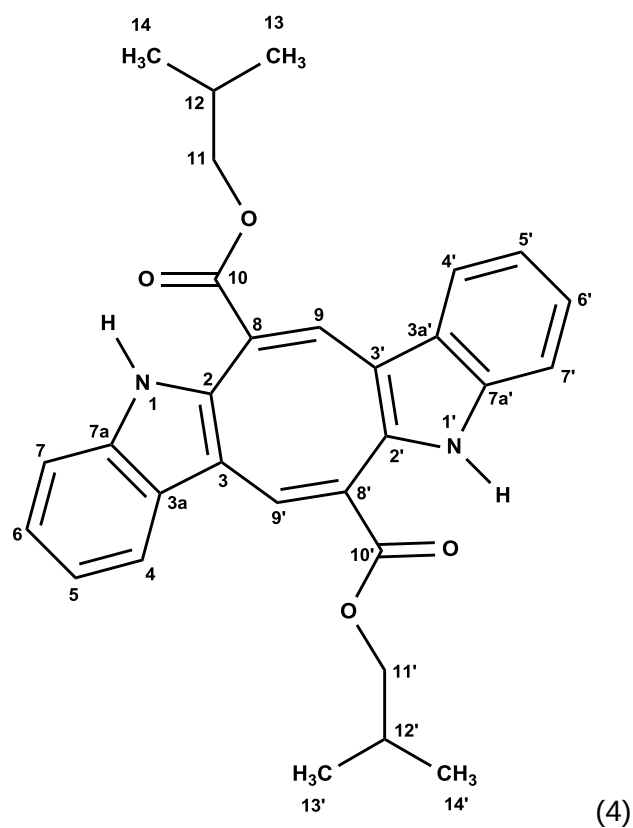


Figura 21. Estrutura química do derivado (4) da caulerpina.

Tabela 7. Dados de RMN de ^1H (200 Hz) e ^{13}C (50 Hz) do derivado (4) registrados em CDCl_3 .

	δ_{H}	δ_{C}
C		
2/2'	-	133,2
3/3'	-	112,4
3a/3a'	-	127,4
7a/7a'	-	137,8
8/8'	-	128,3
10/10'	-	166,4
CH		
4/4'	7,40 (d, $J= 7,6$ Hz, 1H)	118,0
5/5'	7,07 (m, 3H)	120,7
6/6'	7,18 (m, 3H)	123,4
7/7'	7,27(d, $J= 7,6$ Hz, 1H)	112,4
9/9'	8,06 (s, 1H)	142,5
12/12'	2,05 (m, 1H)	27,9
CH₂		
11/11'	4,09(d, $J= 6$ Hz, 2H)	71,7
CH₃		
13/13'	1,03(d, $J= 6,6$ Hz, 6H)	19,3
14/14'	1,03(d, $J= 6,6$ Hz, 6H)	19,3

Tabela 8. Dados comparativos de RMN ^{13}C da caulerpina isolada (δ , CDCl_3 , 50 MHz) com derivado (4) (δ , CDCl_3 , 50 MHz).

	Derivado (4)	Caulerpina
C		
2/2'	133,2	132,9
3/3'	112,4	112,6
3a/3a'	127,4	128,2
7a/7a'	137,8	137,8
8/8'	128,3	125,5
10/10'	166,4	166,8
CH		
4/4'	118,0	118,1
5/5'	120,7	120,8
6/6'	123,4	123,5
7/7'	111,6	111,6
9/9'	142,5	142,9
12/12'	27,9	-
CH₂		-
11/11'	71,7	-
CH₃		-
13/13'	19,3	-
14/14'	19,3	-
OCH₃		
11/11'	-	52,6

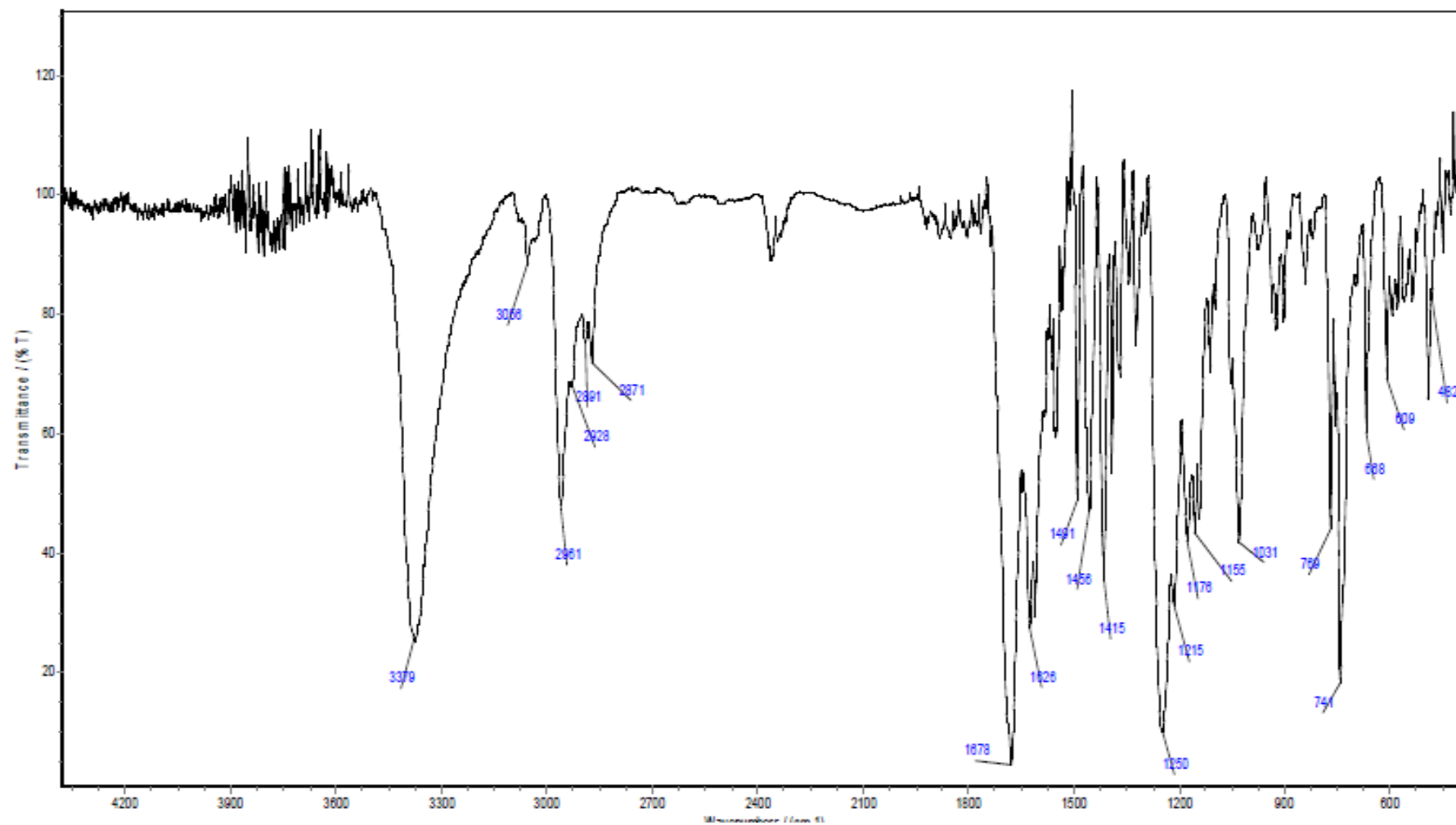


Figura 22. Espectro de IV do derivado (4).

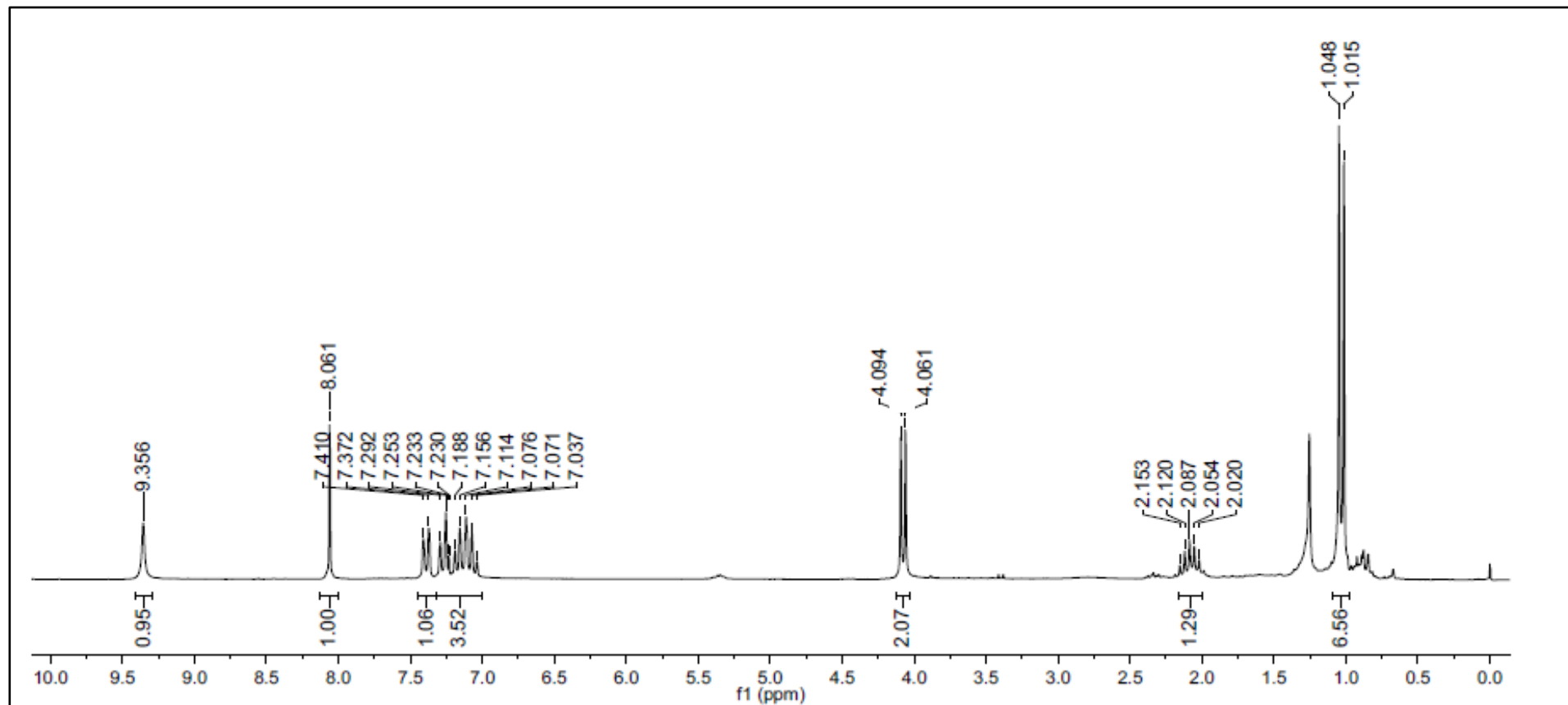


Figura 23. Espectro de RMN de ^1H do derivado (4) (200 MHz, CDCl_3).

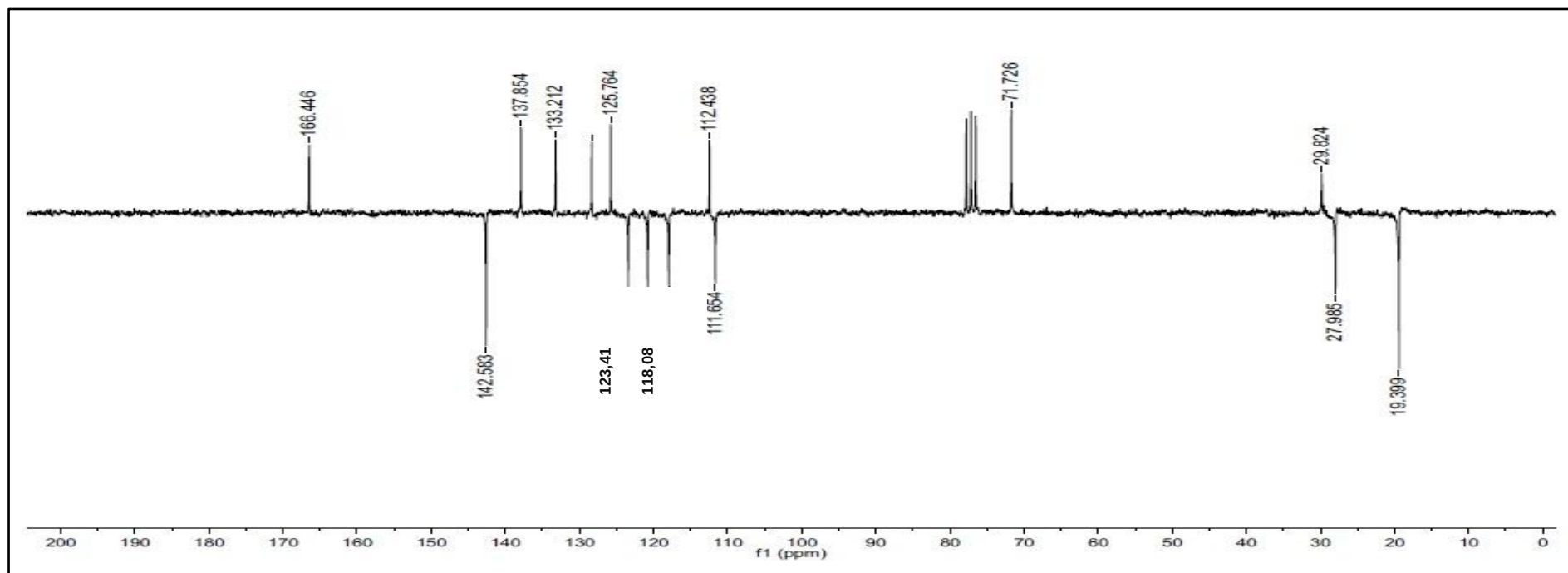
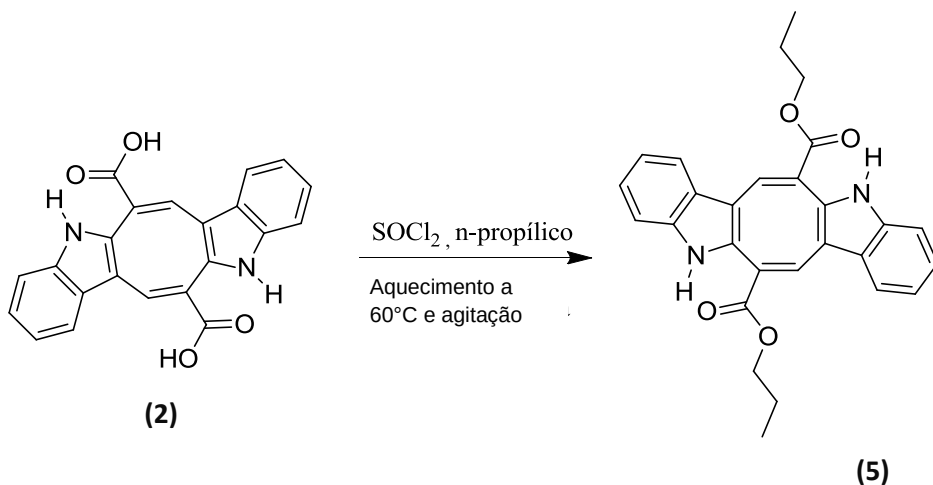


Figura 24. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado (4) (50 MHz, CDCl_3).

6.5. Obtenção e caracterização estrutural do derivado (5)

Para a obtenção do derivado (5) seguiu o mesmo protocolo de esterificação do ácido caulerpínico (2) catalisada pelo cloreto de tionila, com o álcool n-propílico (Tanaka *etl.*, 1995).



O análogo (5) apresentou-se como um sólido alaranjado, solúvel em clorofórmio. Sua identificação foi realizada através de análises espectrais de Infravermelho, RMN ^1H e ^{13}C (

Tabela 9, p. 101) e comparações com dados da CLP isolada no presente trabalho (Tabela 10, p. 102).

A formação do éster n-Propílico foi verificada pela análise do espectro de absorção na região do IV (Figura 26, p.103), observando-se a presença do sinal de absorção correspondente ao estiramento N-H em 3398 cm^{-1} . Ainda é possível observar o sinal em 2876 cm^{-1} correspondente a estiramentos tipo C-H sp^3 . Como também a presença correspondente ao estiramento C-O de éster em 1260 cm^{-1} . E o sinal de absorção em 1679 cm^{-1} corresponde ao estiramento C=O, relacionado à presença de carbonila do éster (PAVIA *et al.*, 2010).

O espectro de RMN ^1H (

Figura 27, p.104), apresentou sinais semelhantes aos demais derivados descritos anteriormente, o RMN ^1H do éster n-propílico mostrou a presença do anel aromático, do hidrogênio característico de N-H do anel indólico e do anel ciclooctatetraeno (PAVIA *et al.*, 2010).

A presença do grupo n-propílico pôde ser observada no espectro de RMN ^1H através dos seguintes sinais: um tripleto intenso em 4,26 ($J= 6,6\text{ Hz}$) com integral para 2 hidrogênios, referente ao CH_2 , altamente desprotegido por estar ligado à oxigênio. Um sexteto em $\delta_{\text{H}} 1,75$ ($J= 6,6\text{ Hz}$) correspondente ao CH_2 e um tripleto em 1,05 ($J= 7\text{ Hz}$) referente aos hidrogênios da metila terminal (PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

Os sinais referentes ao grupo n-propílico também foram observados no RMN ^{13}C (Figura 28, p. 105), confirmando a sua presença. São esses: $\delta_{\text{C}} 10,75$ (CH_3); 22,19 (CH_2); 67,29 (CH_2) (PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

Os dados espectrais permitiram identificar a substância como sendo (6*E*,13*E*)-dipropill 5, 12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato (5) (

Figura 25, p.100), descrita pela primeira vez na literatura.

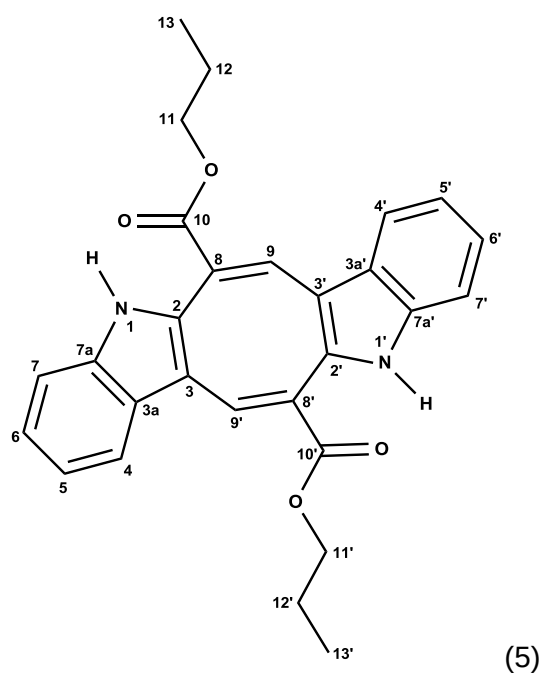


Figura 25. Estrutura química do derivado (5) da caulerpina

Tabela 9. Dados de RMN de ^1H (200 Hz) e ^{13}C (50 Hz) do derivado (5) registrados em CDCl_3 .

	δ_{H}	δ_{C}
C		
2/2'	-	133,2
3/3'	-	112,4
3a/3a'	-	125,8
7a/7a'	-	137,8
8/8'	-	128,3
10/10'	-	166,4
CH		
4/4'	7,41 (d, $J=7,6$ Hz, 1H)	118,0
5/5'	7,08 (m, 2H)	120,8
6/6'	7,17 (m, 2H)	123,4
7/7'	7,28 (d, $J=7,6$ Hz, 2H)	111,6
9/9'	8,04 (s, 1H)	142,5
CH₂		
11/11'	4,26(t, $J=6,6$ Hz, 2H)	67,2
12/12'	1,75 (m, 2H)	22,1
CH₃		
13/13'	1,05 (t, $J=7$ Hz, 3H)	10,7

Tabela 10. Dados comparativos de RMN ^{13}C da caulerpina isolada (δ , CDCl_3 , 50 MHz) com derivado (5) (δ , CDCl_3 , 50 MHz).

	Derivado (5)	Caulerpina
C		
2/2'	133,2	132,9
3/3'	112,4	112,6
3a/3a'	125,8	128,2
7a/7a'	137,8	137,8
8/8'	128,3	125,5
10/10'	166,4	166,8
CH		
4/4'	118,0	118,1
5/5'	120,8	120,8
6/6'	123,4	123,5
7/7'	111,6	111,6
9/9'	142,5	142,9
CH₂		
11/11'	67,2	-
12/12'	22,1	-
CH₃		
13/13'	10,7	-
OCH₃		
11/11'	-	52,6

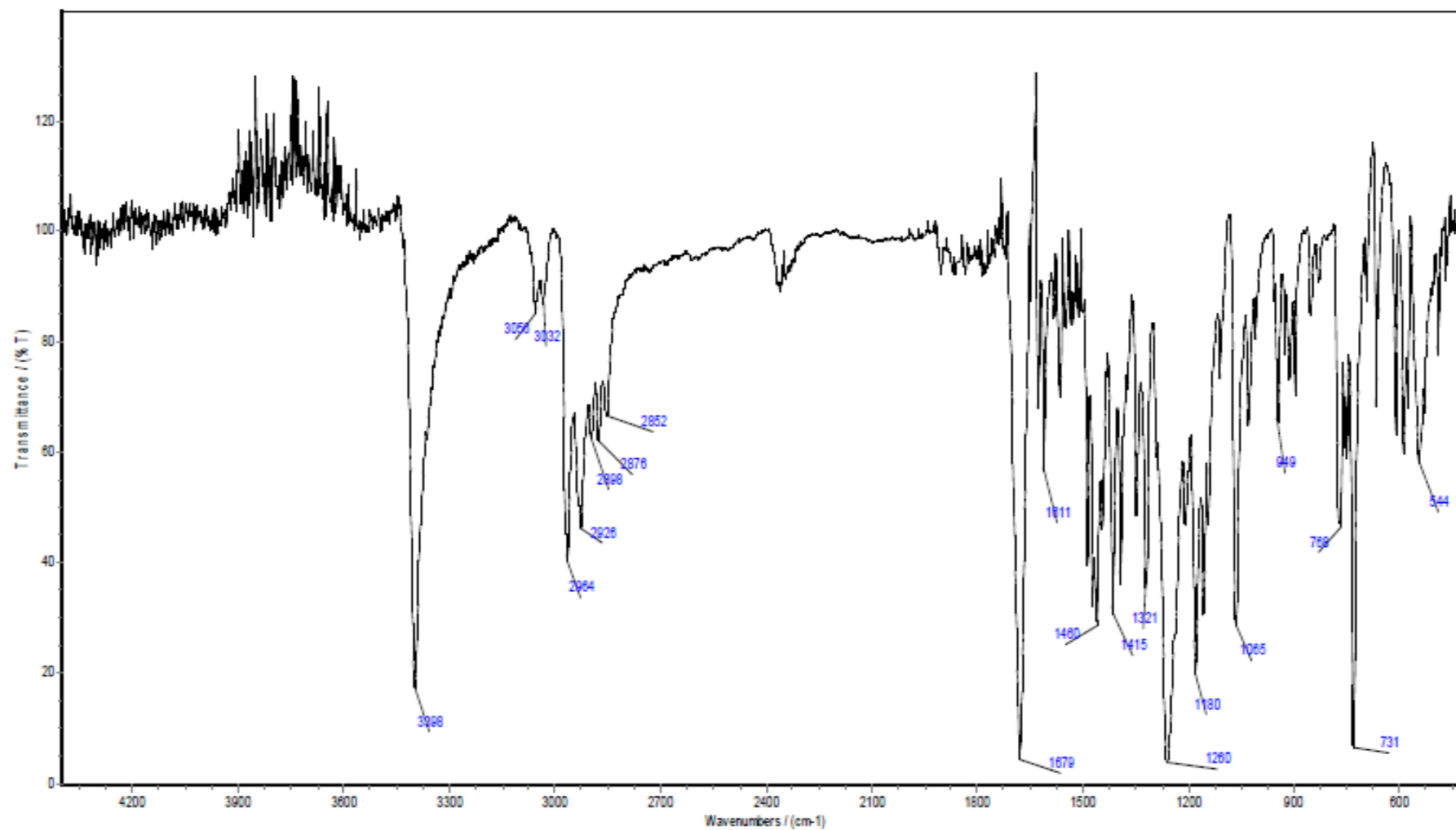


Figura 26. Espectro de IV do derivado (5).

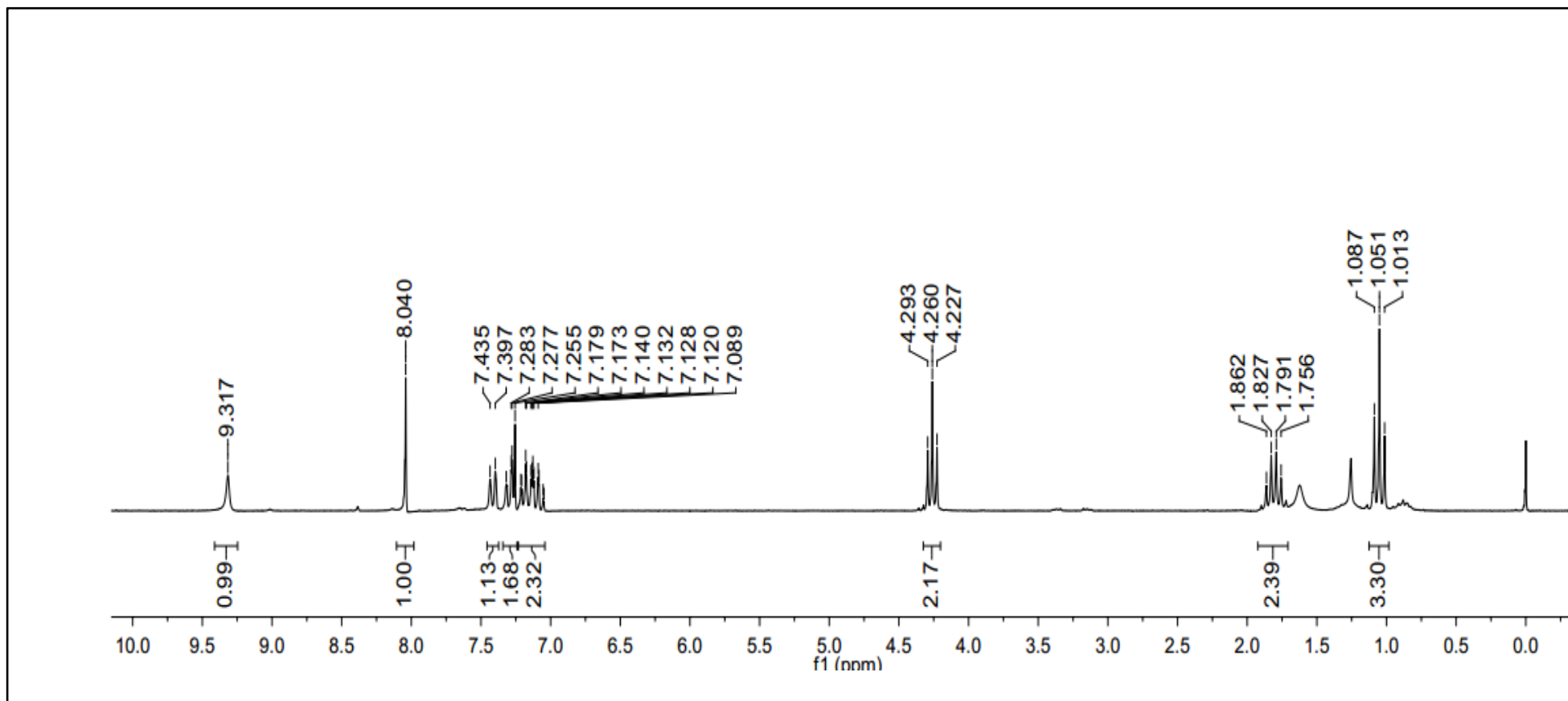


Figura 27. Espectro de RMN de ^1H do derivado (5) (200 MHz, CDCl_3).

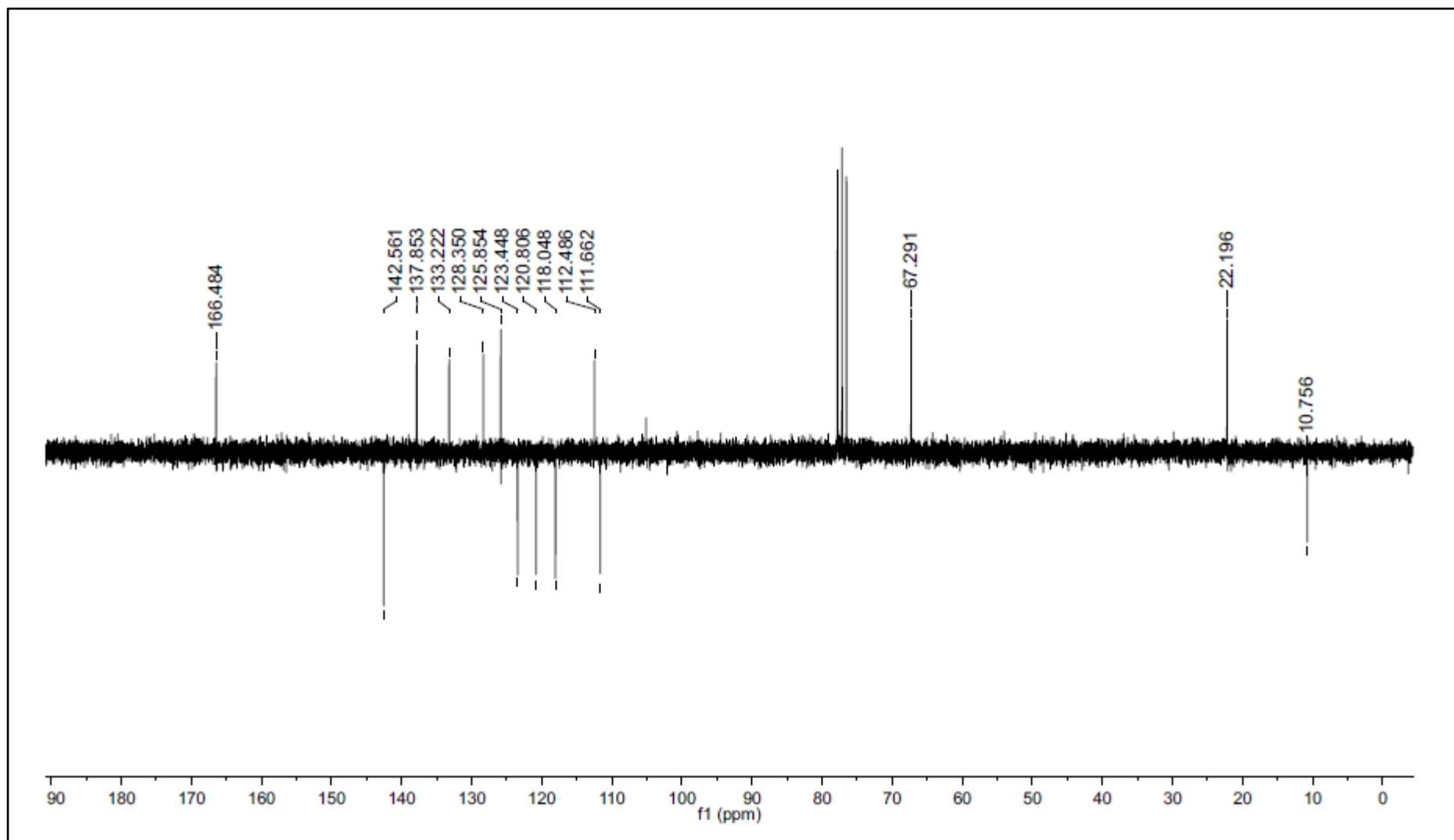
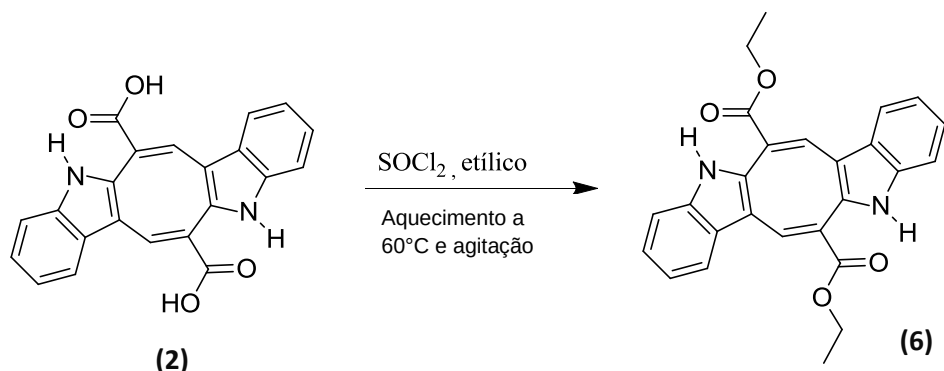


Figura 28. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado (5) (50 MHz, CDCl_3).

6.6. Obtenção e caracterização estrutural do derivado (6)

Para a obtenção do derivado (6) seguiu o mesmo protocolo de esterificação do ácido caulerpínico (2) catalisada pelo cloreto de tionila, com o álcool etílico (Tanaka *et al.*, 1995).



O análogo (6) apresentou-se como um sólido avermelhado, solúvel em clorofórmio. Sua identificação foi realizada através de análises espectrais de Infravermelho, RMN ^1H e ^{13}C (Tabela 11, p.108) e comparações com dados da CLP isolada no presente trabalho (Tabela 12, p. 109).

A formação do éster etílico foi verificada pela análise do espectro de absorção na região do IV (Figura 30, p. 110), observando-se a presença do sinal de absorção correspondente ao estiramento N-H em 3382 cm^{-1} . Ainda é possível observar o sinal em 2852 cm^{-1} correspondentes a estiramentos tipo C-H sp^3 . Como também a presença correspondente ao estiramento C-O de éster em 1200 cm^{-1} . E o sinal de absorção em 1687 cm^{-1} corresponde ao estiramento C=O, relacionado à presença de carbonila do éster (PAVIA *et al.*, 2010).

O espectro de RMN ^1H (Figura 31, p. 111), apresentou sinais semelhantes aos demais derivados descritos anteriormente, o RMN ^1H do éster etílico mostrou a presença do anel aromático, do hidrogênio característico de N-H do anel indólico e do anel ciclooctatetraeno (PAVIA *et al.*, 2010).

A presença do grupo etílico pôde ser observada no espectro de RMN ^1H através dos seguintes sinais: um quarteto em 4,37 (J=7 Hz) com integral para 2 hidrogênios, referente ao CH_2 , altamente desprotegido por estar próximo de um

elemento eletronegativo, o oxigênio. Foi ainda visualizado um tripleto intenso em δ_H 1,41 (J= 7 Hz) referente aos hidrogênios da metila terminal (PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

Os sinais referentes ao grupo etílico também foram observados no RMN ^{13}C (Figura 32, p. 112), confirmando a sua presença. São esses: δ_C 14,46 (CH₃) e 61,74 (CH₂) (PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

Os dados espectrais permitiram identificar a substância como sendo (6*E*,13*E*)-dietil 5, 12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato (6) (Figura 28, p. 106), descrita pela primeira vez na literatura.

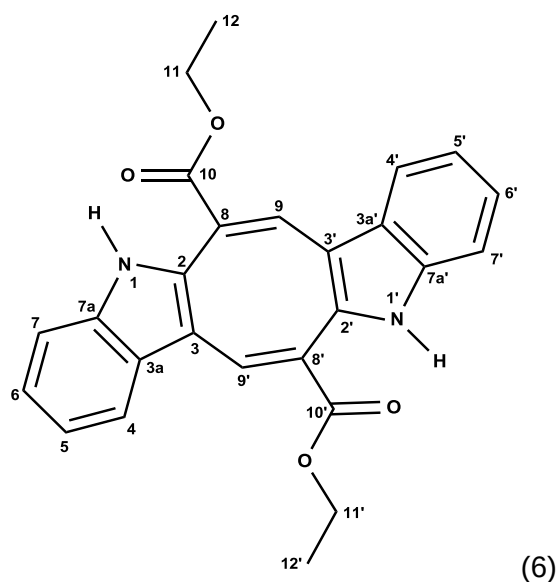


Figura 29. Estrutura química do derivado (6) da caulerpina

Tabela 11. Dados de RMN de ^1H (200 Hz) e ^{13}C (50 Hz) do derivado (6) registrados em CDCl_3 .

	δ_{H}	δ_{C}
C		
2/2'	-	133,1
3/3'	-	112,4
3a/3a'	-	125,8
7a/7a'	-	137,8
8/8'	-	128,3
10/10'	-	166,4
CH		
4/4'	7,42 (d, $J=7,6$ Hz, 1H)	118,0
5/5'	7,08 (m, 4H)	120,7
6/6'	7,17(m, 4H)	123,4
7/7'	7,35 (m, 4H)	111,6
9/9'	8,03 (s, 1H)	142,5
CH₂		
11/11'	4,37 (q, $J=7$ Hz, 2H)	61,7
CH₃		
12/12'	1,41 (t, $J=7$ Hz, 2H)	14,4

Tabela 12. Dados comparativos de RMN ^{13}C da caulerpina isolada (δ , CDCl_3 , 50 MHz) com derivado (6) (δ , CDCl_3 , 50 MHz).

	Derivado (6)	Caulerpina (isolada)
C		
2/2'	133,1	132,9
3/3'	112,4	112,6
3a/3a'	125,8	128,2
7a/7a'	137,8	137,8
8/8'	128,3	125,5
10/10'	166,4	166,8
CH		
4/4'	118,0	118,1
5/5'	120,7	120,8
6/6'	123,4	123,5
7/7'	111,6	111,6
9/9'	142,5	142,9
CH₂		
11/11'	61,7	-
CH₃		-
12/12'	14,4	
OCH₃		
11/11'	-	52,6

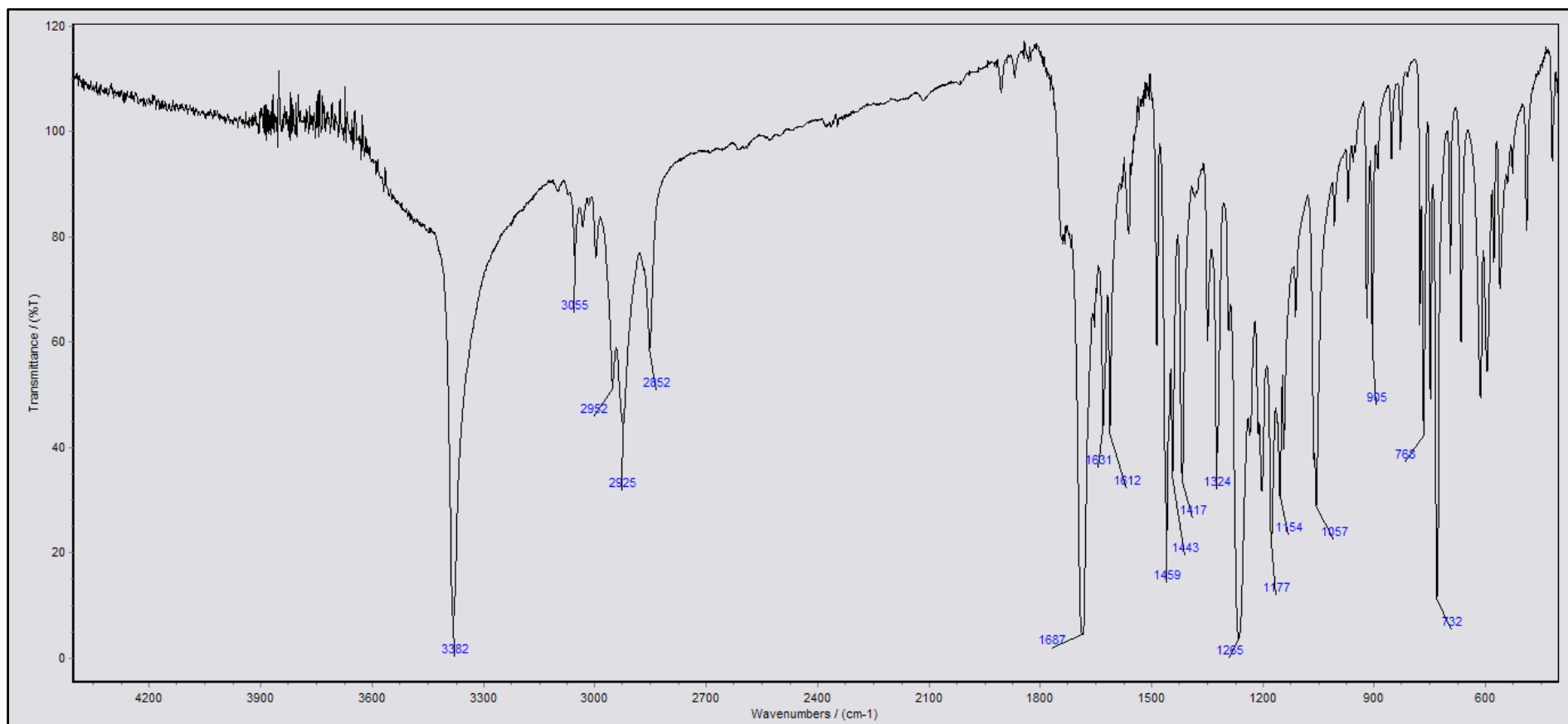


Figura 30. Espectro de IV do derivado (6).

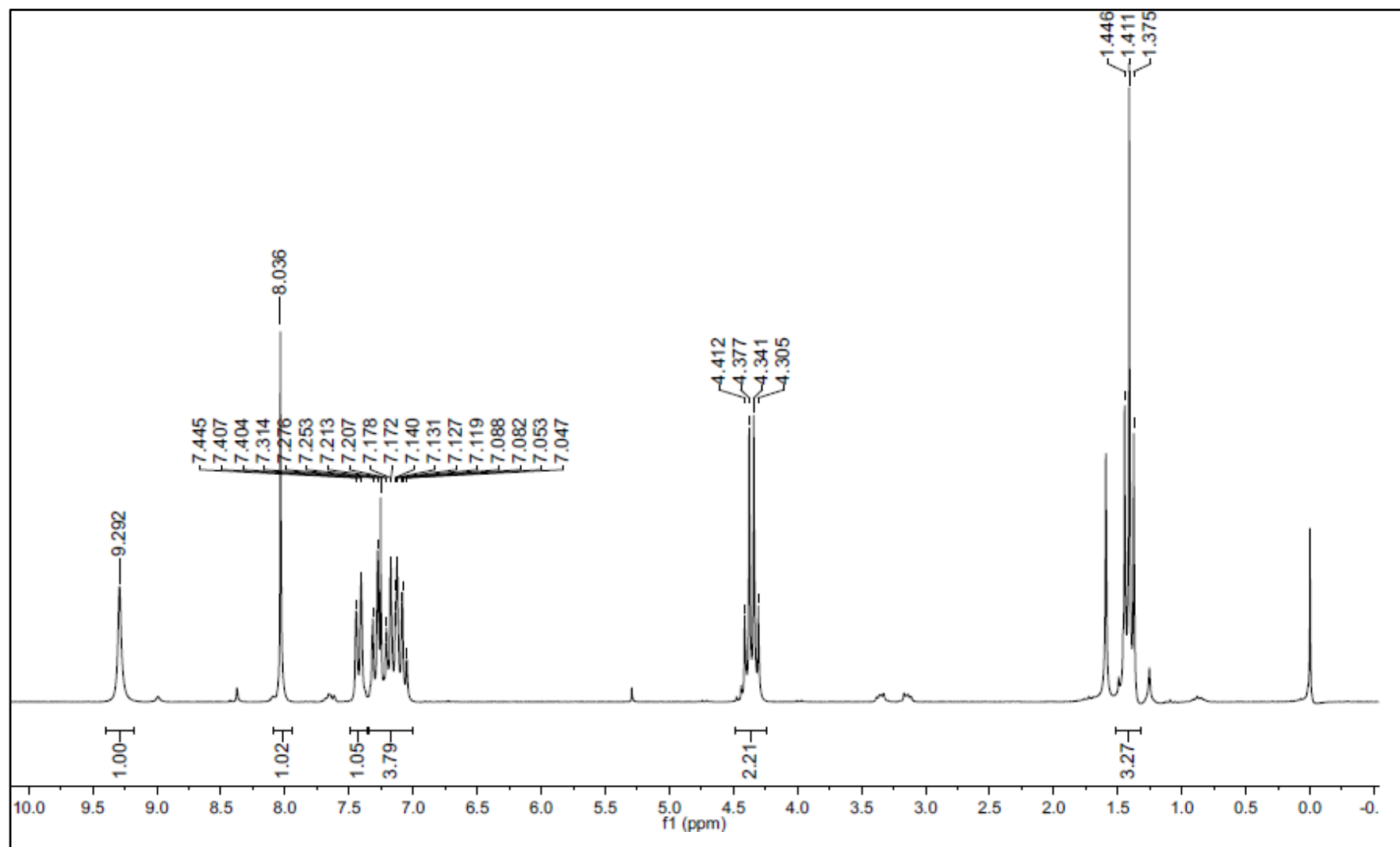


Figura 31. Espectro de RMN de ^1H do derivado (6) (200 MHz, CDCl_3).

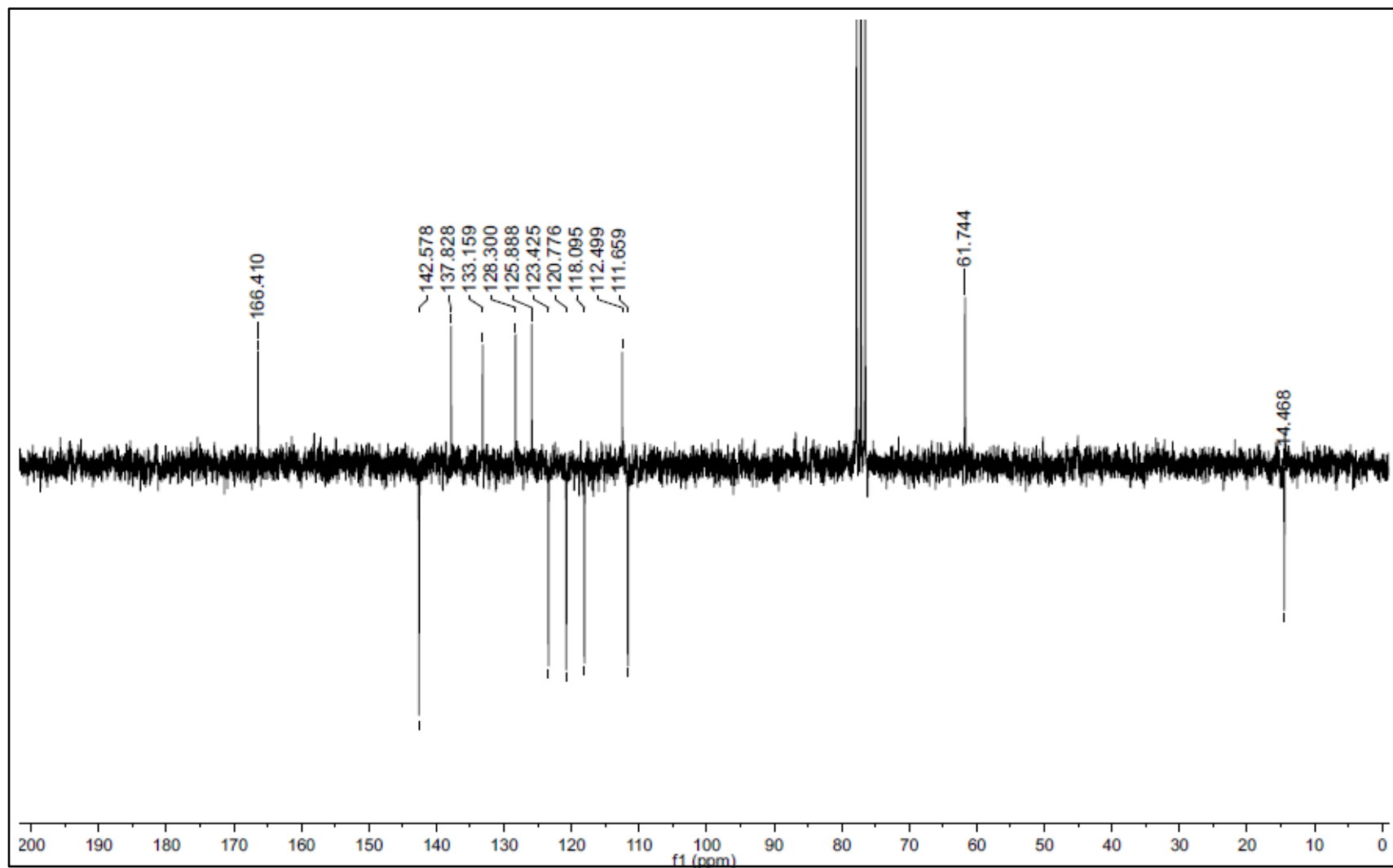
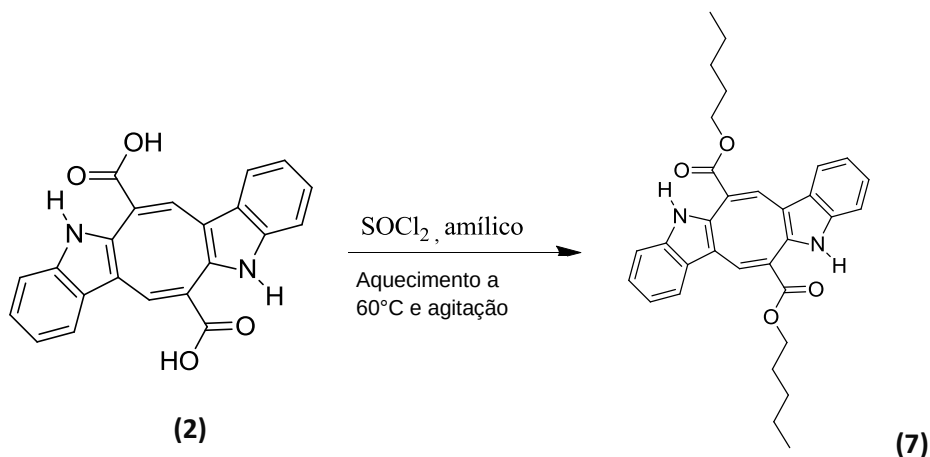


Figura 32. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado (6) (50 MHz, CDCl_3).

6.7. Obtenção e caracterização estrutural do derivado (7)

Para a obtenção do derivado (7) seguiu o mesmo protocolo de esterificação do ácido caulerpínico (2) catalisada pelo cloreto de tionila, com o álcool amílico (Tanaka *et al.*, 1995).



O análogo (7) apresentou-se como um sólido alaranjado, solúvel em clorofórmio. Sua identificação foi realizada através de análises espectrais de Infravermelho, RMN ¹H e ¹³C (Tabela 13, p. 115) e comparações com dados da CLP isolada no presente trabalho (Tabela 14, p. 116).

A formação do éster amílico foi verificada pela análise do espectro de absorção na região do IV (figura 34, página 102). Observou-se a presença do sinal de absorção correspondente ao estiramento N-H em 3401 cm⁻¹ e o sinal em 2855 cm⁻¹ correspondente a estiramentos tipo C-H *sp*³. Como também a presença correspondente ao estiramento C-O em 1259 cm⁻¹. E o sinal de absorção em 1682 cm⁻¹ corresponde ao estiramento C=O, relacionado à presença de carbonila do éster.

O espectro de RMN ¹H (Figura 35, p. 118), apresentou sinais semelhantes aos demais derivados descritos anteriormente, o RMN ¹H do éster amílico mostrou a presença do anel aromático, do hidrogênio característico de N-H do anel indólico e do anel ciclooctatetraeno (PAVIA *et al.*, 2010).

A presença do grupo amílico pôde ser observada no espectro de RMN ¹H através dos seguintes sinais: um tripleto intenso em 4,29 (*J*= 6,6 Hz) com integral para 2 hidrogênios, referente aos carbonos oximetilênicos. Um

multiplete em δ_H 1,78 ($J= 6,6$ Hz) com integral para 2 hidrogênios referente CH_2 . Outro multiplete em δ_H 1,41 ($J= 6,6$ Hz) com integral para 4 hidrogênios referente aos hidrogênios de CH_2 e, finalmente, um triplete em 0,94 ($J=6,6$) com integral para três hidrogênios referente a metila terminal (PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

Os sinais referentes ao grupo amílico também foram observados no RMN ^{13}C (Figura 36, p. 119) confirmando a sua presença. São esses: δ_C 14,15 (CH_3); 22,52 (CH_2); 28,39 (CH_2); 28,47 (CH_2); 65,89 (CH_2) (PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

Os dados espectrais permitiram identificar a substância como sendo(6*E*,13*E*)-dipentil 5, 12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato (7) (Figura 32, p. 113), descrita pela primeira vez na literatura.

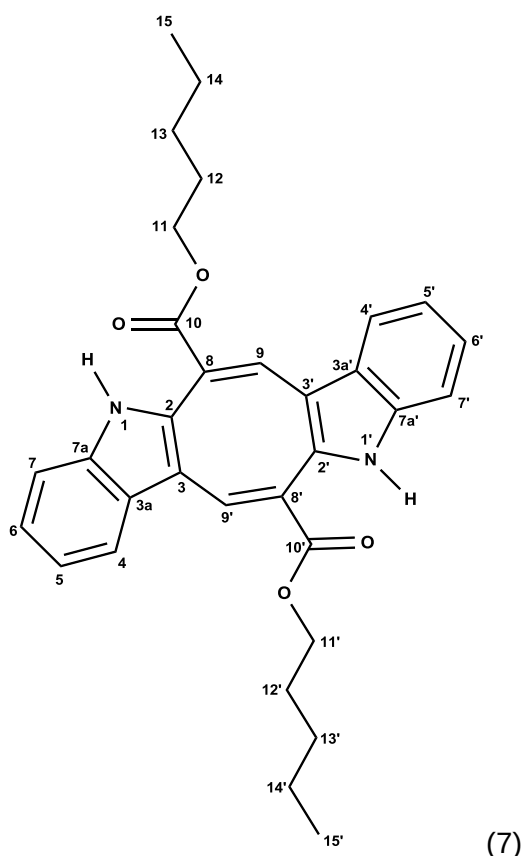


Figura 33. Estrutura química do derivado (7) da caulerpina.

Tabela 13. Dados de RMN de ^1H (200 Hz) e ^{13}C (50 Hz) do derivado (7) registrados em CDCl_3 .

	δ_{H}	δ_{C}
C		
2/2'	-	133,2
3/3'	-	112,4
3a/3a'	-	125,8
7a/7a'	-	137,8
8/8'	-	128,3
10/10'	-	166,4
CH		
4/4'	7,40 (d, $J= 7,6$ Hz, 4H)	118,0
5/5'	7,08 (m, 4H)	120,7
6/6'	7,18 (d, 4H)	123,4
7/7'	7,28 (m, 4H)	111,6
9/9'	8,03 (s, 1H)	142,5
CH₂		
11/11'	4,29(t, $J= 6,6$ Hz, 2H)	67,8
12/12'	1,78 (m, 2H)	28,4
13/13'	1,41 (m, 4H)	28,3
14/14'	1,41 (m, 4H)	22,5
CH₃		
15/15'	0,94(t, $J= 6,6$ Hz, 3H)	14,1

Tabela 14. Dados comparativos de RMN ^{13}C da caulerpina isolada (δ , CDCl_3 , 50 MHz) com derivado (7) (δ , CDCl_3 , 50 MHz).

	Derivado (7)	Caulerpina
C		
2/2'	133,2	132,9
3/3'	112,4	112,6
3a/3a'	125,8	128,2
7a/7a'	137,8	137,8
8/8'	128,3	125,5
10/10'	166,4	166,8
CH		
4/4'	118,0	118,1
5/5'	120,7	120,8
6/6'	123,4	123,5
7/7'	111,6	111,6
9/9'	142,5	142,9
CH₂		
11/11'	67,8	-
12/12'	28,4	-
13/13'	28,3	-
14/14'	22,5	-
CH₃		
15/15'	14,1	-
OCH₃		
11/11'	-	52,6

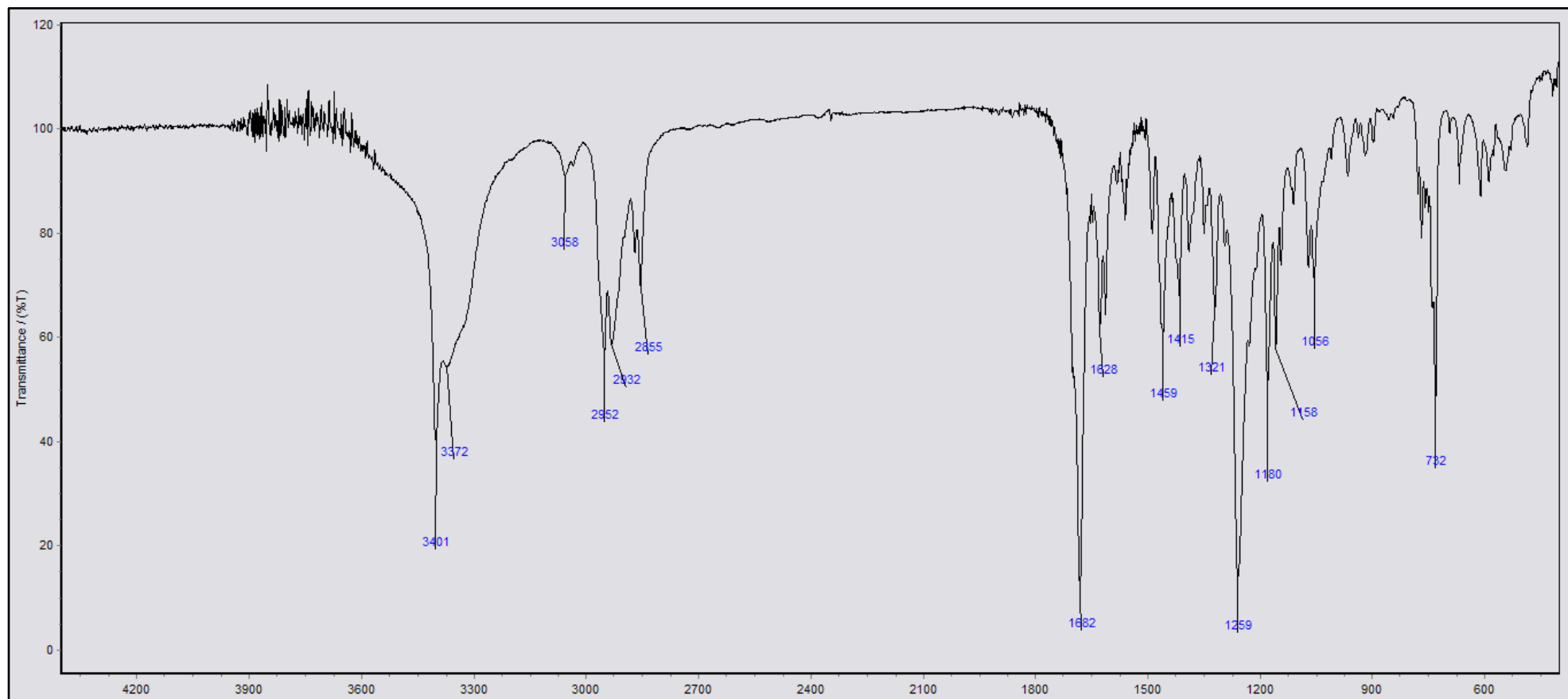


Figura 34. Espectro de IV do derivado (7).

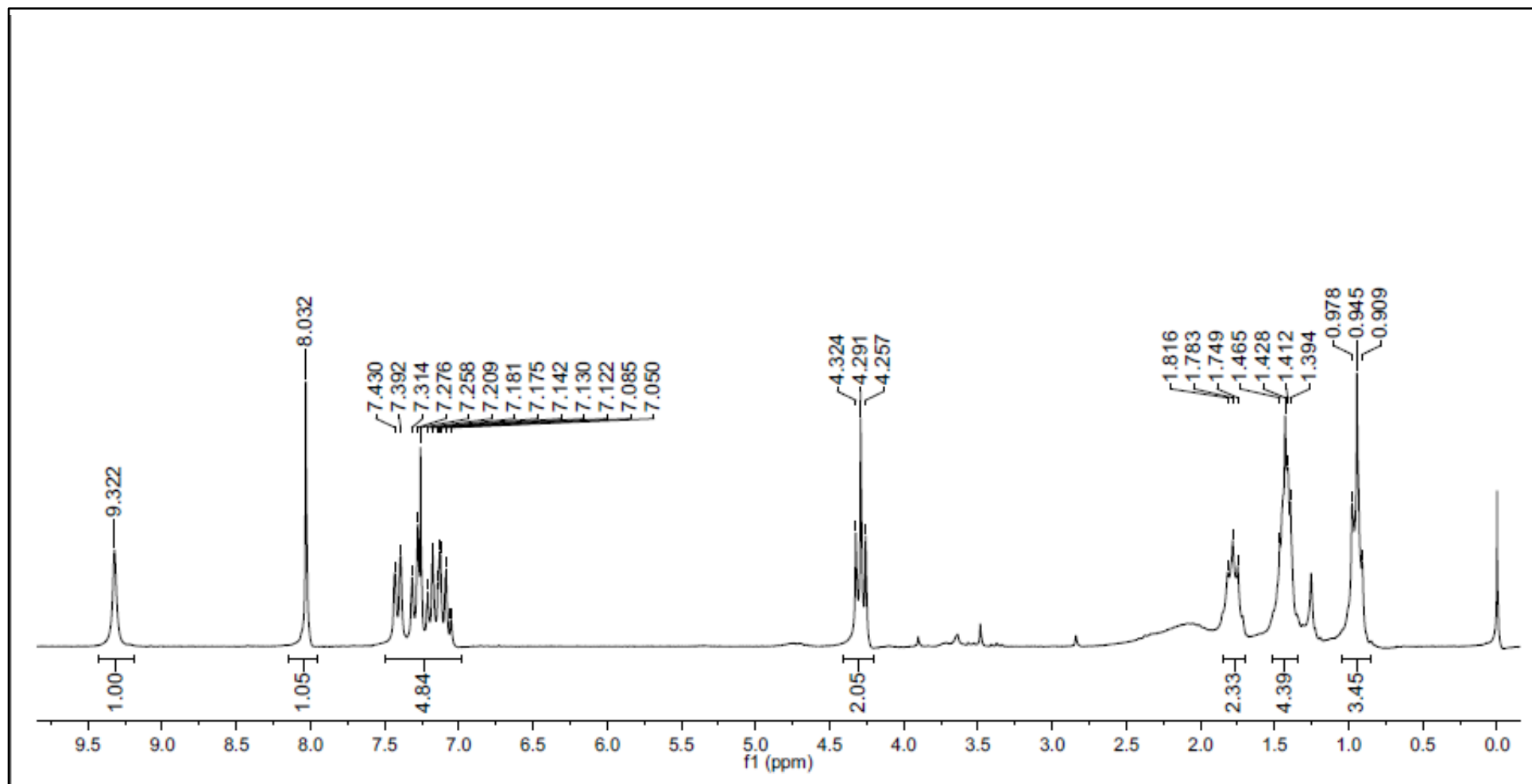


Figura 35. Espectro de RMN de ^1H do derivado (7) (200 MHz, CDCl_3).

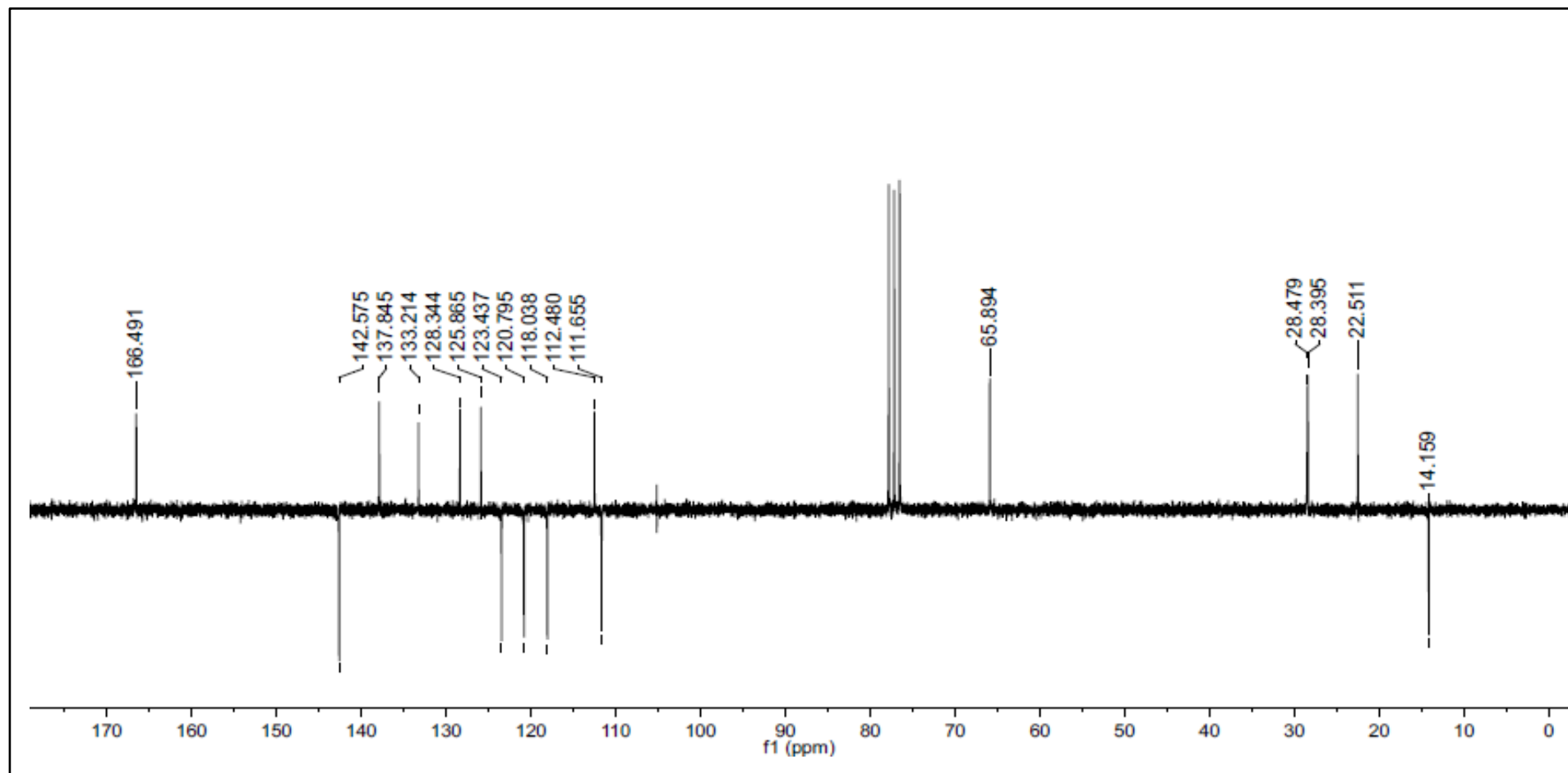
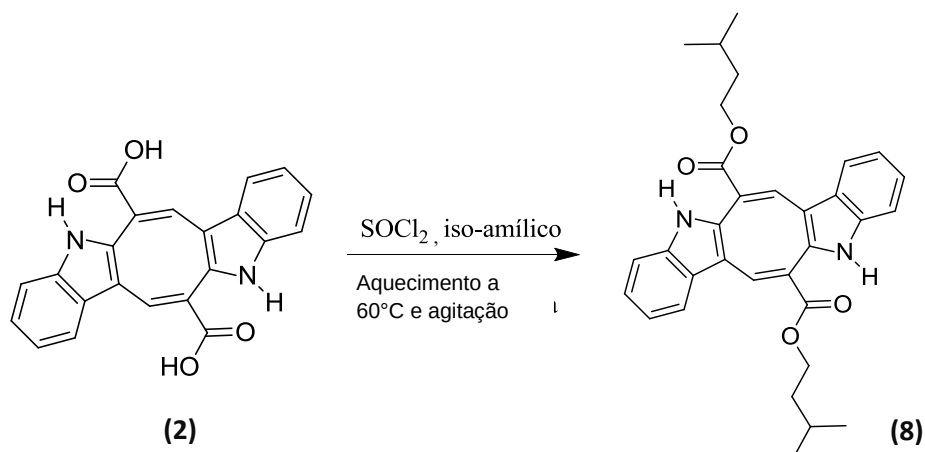


Figura 36. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado (7) (50 MHz, CDCl_3).

6.8. Obtenção e caracterização estrutural do derivado (8)

Para a obtenção do derivado (8) seguiu o mesmo protocolo de esterificação do ácido caulerpínico (2) catalisada pelo cloreto de tionila, com o álcool iso-amílico (Tanaka *et al.*, 1995).



O análogo (8) apresentou-se como um sólido avermelhado, solúvel em clorofórmio. Sua identificação foi realizada através de análises espectrais de Infravermelho, RMN ^1H e ^{13}C (

Tabela 15, p. 122) e comparações com dados da CLP isolada no presente trabalho (Tabela 16, p. 123).

A formação do éster iso-amílico foi verificada pela análise do espectro de absorção na região do IV (Figura 38, p. 124), observando-se a presença do sinal de absorção correspondente ao estiramento N-H em 3377 cm^{-1} . Ainda é possível observar o sinal em 2871 cm^{-1} correspondentes a estiramentos tipo C-H sp^3 . Como também a presença correspondente ao estiramento C-O de éster em 1256 cm^{-1} . E o sinal de absorção em 1685 cm^{-1} corresponde ao estiramento C=O, relacionado à presença de carbonila do éster (PAVIA *et al.*, 2010).

O espectro de RMN ^1H (Figura 39, p. 125) apresentou sinais semelhantes aos demais derivados descritos anteriormente, o RMN ^1H do éster iso-amílico mostrou a presença do anel aromático, do hidrogênio característico de N-H do anel indólico e do anel ciclooctatetraeno (PAVIA *et al.*, 2010).

A presença do grupo iso-amílico pôde ser observada no espectro de RMN ^1H através dos seguintes sinais: um tripleto intenso em 4,32 ($J= 6,8$ Hz) com integral para 2 hidrogênios, referente ao CH_2 oximetilênico. Um multiplete em δ_{H} 1,68 ($J= 6,6$ Hz) com integral para 3 hidrogênios referente CH. Um duplete em δ_{H} 0,99 ($J= 6,4$ Hz) com integral para 6 hidrogênios referente aos hidrogênios das metilas terminais (PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

Os sinais referentes ao grupo iso-amílico também foram observados no RMN ^{13}C (figura 40, página 112), confirmando a sua presença. São esses: δ_{C} 22,68 (CH_3); 25,42 (CH_3); 37,46 (CH_2); 64,41 (CH_2) (PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

Os dados espectrais permitiram identificar a substância como sendo (6*E*,13*E*)-diisopentil 5, 12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato (8) (Figura 36, p. 120), descrita pela primeira vez na literatura.

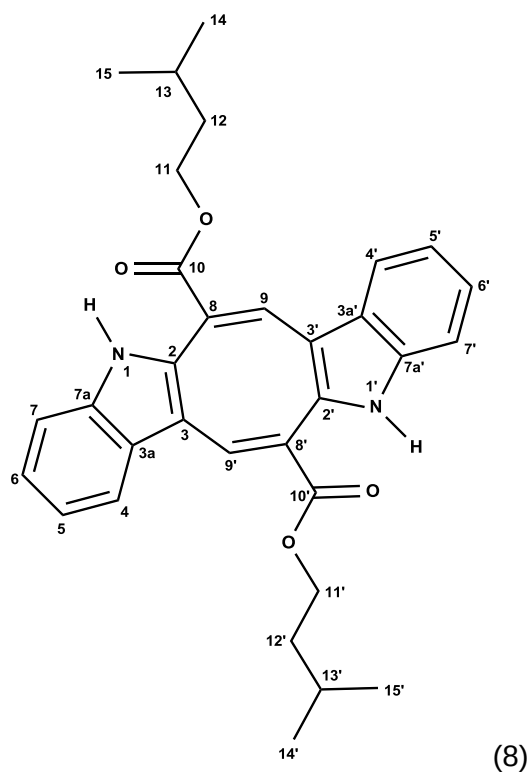


Figura 37. Estrutura química do derivado (8) da caulerpina.

Tabela 15. Dados de RMN de ^1H (200 Hz) e ^{13}C (50 Hz) do derivado (8) registrados em CDCl_3 .

	δ_{H}	δ_{C}
C		
2/2'	-	133,2
3/3'	-	112,4
3a/3a'	-	125,8
7a/7a'	-	137,8
8/8'	-	128,3
10/10'	-	166,4
CH		
4/4'	7,40 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H)	118,0
5/5'	7,08 (m, 3H)	120,8
6/6'	7,17 (m, 3H)	123,4

7/7'	7,28 (d, J= 7,6 Hz, 3H)	111,6
9/9'	8,02 (s, 1H)	142,5
13/13'	1,68 (m, 3H)	
CH₂		
11/11'	4,32 (t, J= 6,8 Hz, 2H)	64,4
12/12'	1,68 (m, 3H)	37,4
CH₃		
14/14'	0,99 (d, J= 6,4 Hz, 6H)	22,6
15/15'	0,99 (d, J= 6,4 Hz, 6H)	25,4

Tabela 16. Dados comparativos de RMN ¹³C da caulerpina isolada (δ, CDCl₃, 50 MHz) com derivado (8) (δ, CDCl₃, 50 MHz).

	Derivado (8)	Caulerpina
C		
2/2'	133,2	132,9
3/3'	112,4	112,6
3a/3a'	125,8	128,2
7a/7a'	137,8	137,8
8/8'	128,3	125,5
10/10'	166,4	166,8
CH		
4/4'	118,0	118,1
5/5'	120,8	120,8

6/6'	123,4	123,5
7/7'	111,6	111,6
9/9'	142,5	142,9
13/13'	111,6	
CH₂		-
11/11'	64,4	-
12/12'	37,4	-
CH₃		-
14/14'	22,6	
15/15'	25,4	-
OCH₃		
11/11'	-	52,6

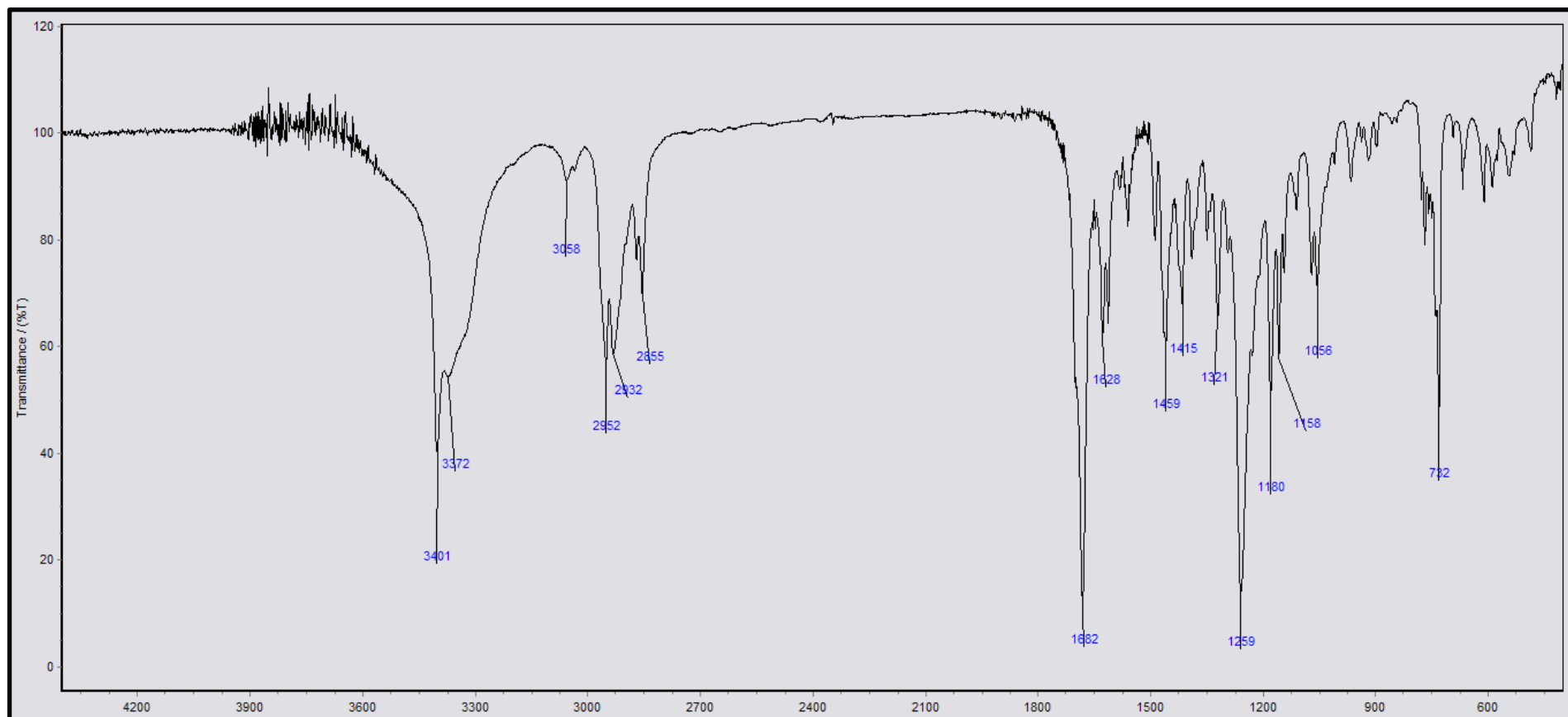


Figura 38. Espectro de IV do derivado (8).

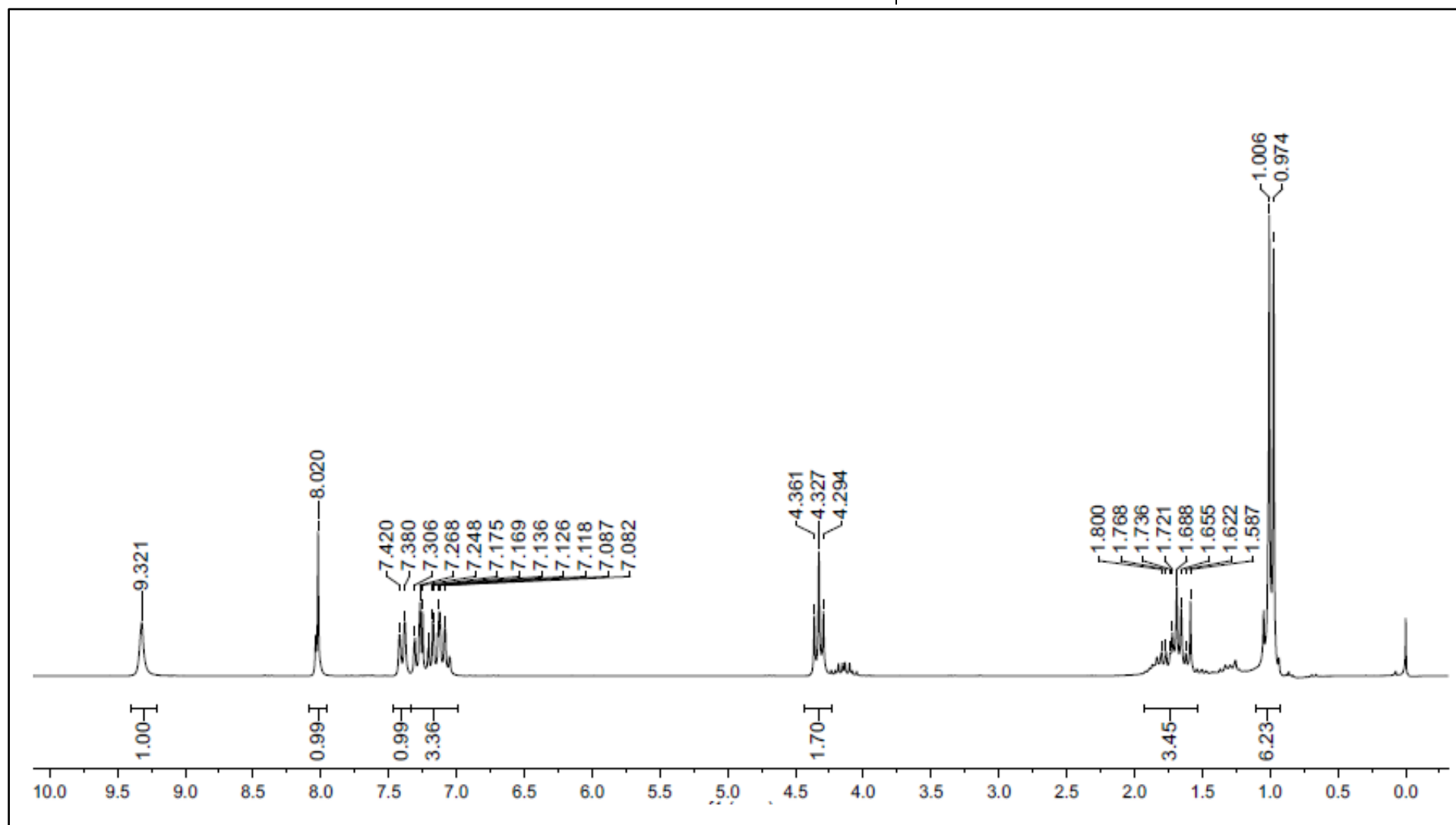


Figura 39. Espectro de RMN de ^1H do derivado (8) (200 MHz, CDCl_3).

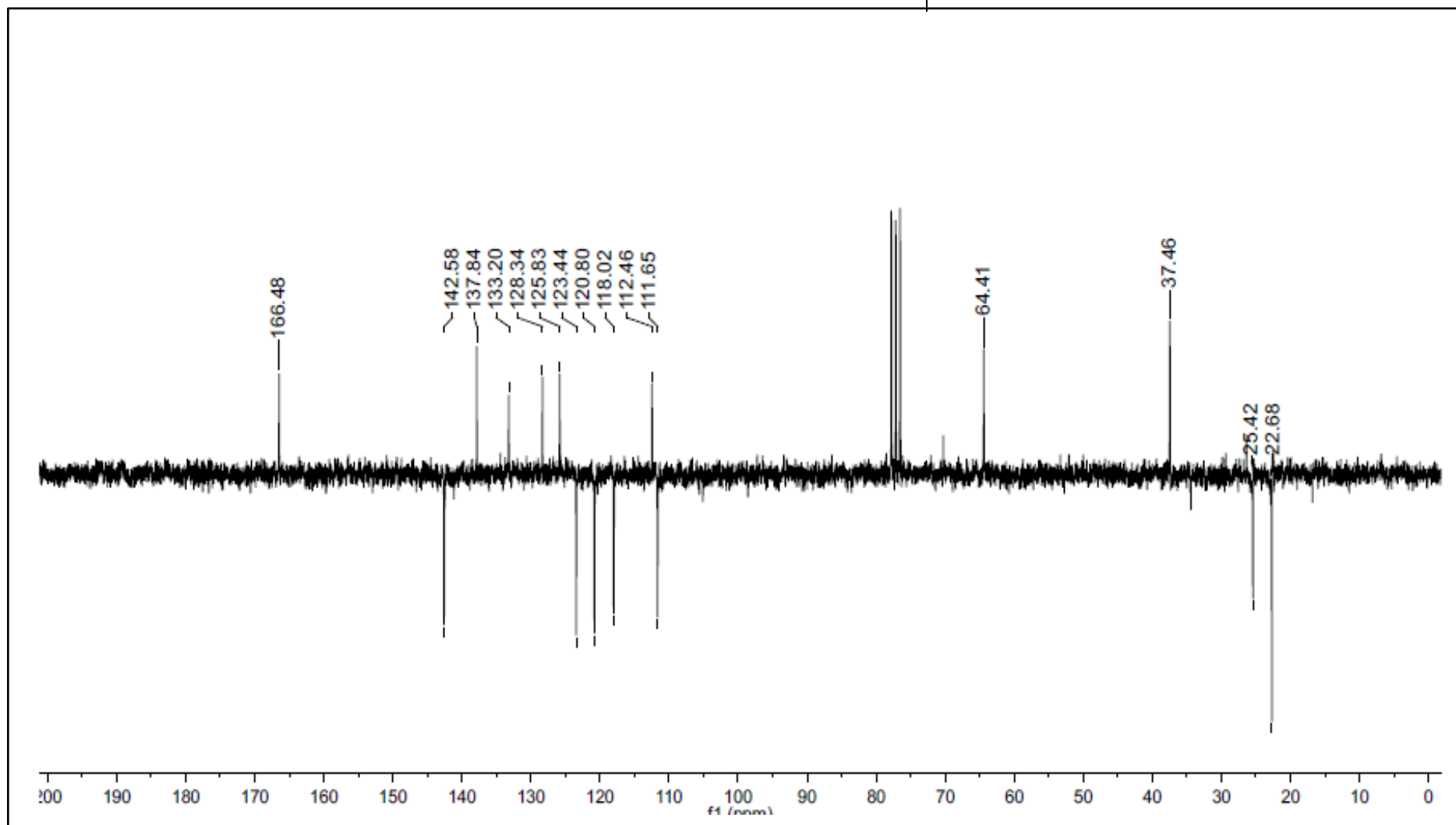
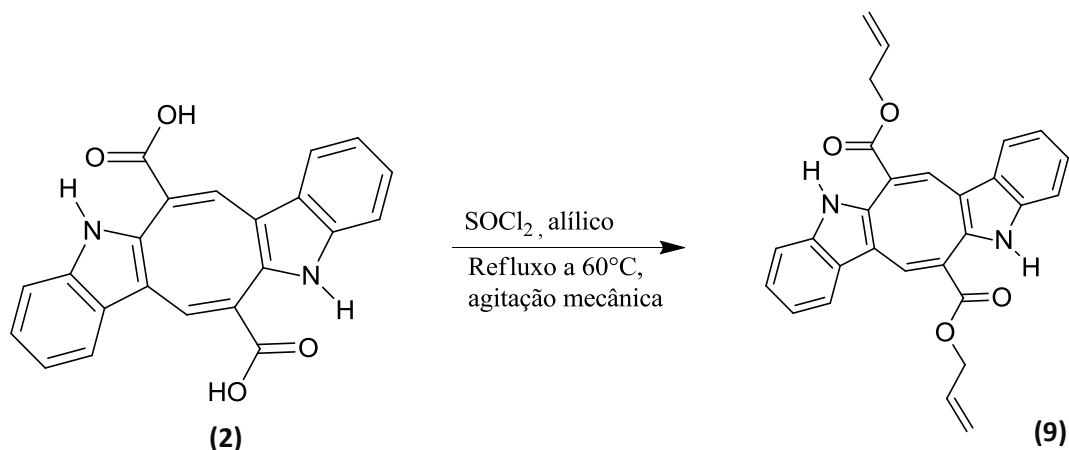


Figura 40. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado (8) (50 MHz, CDCl_3).

6.9. Obtenção e caracterização estrutural do derivado (9)

Para a obtenção do derivado (9) seguiu o mesmo protocolo de esterificação do ácido caulerpínico (2) catalisada pelo cloreto de tionila, com o álcool alílico (Tanaka *et al.*, 1995).



O éster alílico apresentou-se como um sólido avermelhado, solúvel em clorofórmio. Sua identificação foi realizada através de análises espectrais de Infravermelho, RMN ^1H e ^{13}C (Tabela 17, p. 129) e comparações com dados da CLP isolada no presente trabalho (Tabela 18, p. 130).

A formação do éster alílico foi verificada pela análise do espectro de absorção na região do IV (Figura 42, página 118), observando-se a presença do sinal de absorção correspondente ao estiramento N-H em 3401 cm^{-1} . Ainda é possível observar o sinal 2853 cm^{-1} correspondente a estiramentos tipo C-H sp^3 . Como também a presença correspondente ao estiramento C-O de éster em 1253 cm^{-1} . E o sinal de absorção em 1680 cm^{-1} corresponde ao estiramento C=O, relacionado à presença de carbonila do éster (PAVIA *et al.*, 2010).

O espectro de RMN ^1H (Figura 43, p. 132), apresentou sinais semelhantes aos demais derivados descritos anteriormente, o RMN ^1H do éster alílico mostrou a presença do anel aromático, do hidrogênio característico de N-H do anel indólico e do anel ciclooctatetraeno (PAVIA *et al.*, 2010).

A presença do grupo alílico pode ser observada no espectro de RMN ^1H através dos seguintes sinais: um duplete em 4,79 ($J = 5\text{ Hz}$) com integral para 2

hidrogênios, referente ao CH₂, altamente desprotegido por estar ligado a um elemento eletronegativo, o oxigênio. Um multiplete em δ_H 6,04 ($J = 6$ Hz) com integral para 1 hidrogênio referente ao CH sp^2 da dupla ligação, e dois dupletos em δ_H 5,43 ($J = 17$ Hz) e δ_H 5,32 ($J = 10,5$ Hz) com integral para 2 hidrogênios referente aos hidrogênios CH₂ terminais (PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

Os sinais referentes ao grupo alílico também foram observados no RMN ¹³C (Figura 44, p. 133), confirmando a sua presença. São esses: δ_C 66,28 (CH₂), 119,00 (CH₂) e 132,0 (CH) (PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

Os dados espectrais permitiram identificar a substância como sendo (6*E*,13*E*)-dialil 5, 12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato (9) (Figura 40, p. 127), descrita pela primeira vez na literatura.

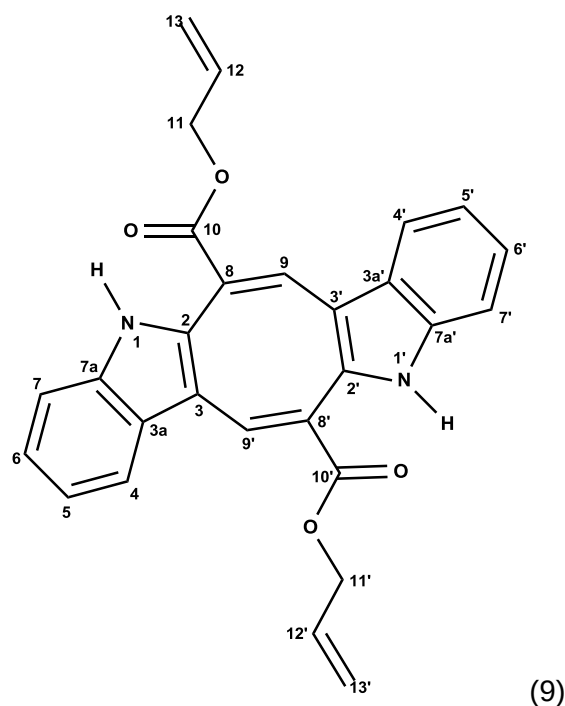


Figura 41. Estrutura química do derivado (9) da caulerpina.

Tabela 17. Dados de RMN de ^1H (500 Hz) e ^{13}C (125 Hz) do derivado (9) registrados em CDCl_3 .

	δ_{H}	δ_{C}
C		
2/2'	-	133,1
3/3'	-	112,6
3a/3a'	-	125,8
7a/7a'	-	137,9
8/8'	-	128,3
10/10'	-	165,8
CH		
4/4'	7,42 (d, $J= 7,6$ Hz, 1H)	118,1
5/5'	7,09 (m, 1H)	120,9
6/6'	7,18 (m, 1H)	123,5
7/7'	7,29 (d, $J= 7,6$ Hz, 1H)	111,6
9/9'	8,08 (s, 1H)	143,0
12/12'	6,04 (m, 1H)	132,0
CH₂		
11/11'	4,79 (d, $J= 5$ Hz, 2H)	66,2
13/13'	5,43 e 5,32 (dd, $J= 17$ e 10,5Hz, 2H)	119,0

Tabela 18. Dados comparativos de RMN ^{13}C da caulerpina isolada (δ , CDCl_3 , 125 MHz) com derivado (9) (δ , CDCl_3 , 50 MHz).

	Derivado (9)	Caulerpina
C		
2/2'	133,1	132,9
3/3'	112,6	112,6
3a/3a'	125,8	128,2
7a/7a'	137,9	137,8
8/8'	128,3	125,5
10/10'	165,8	166,8
CH		
4/4'	118,1	118,1
5/5'	120,9	120,8
6/6'	123,5	123,5
7/7'	111,6	111,6
9/9'	143,0	142,9
12/12'	132,0	
CH₂		-
11/11'	66,2	-
13/13'	119,0	-
OCH₃		
11/11'	-	52,6

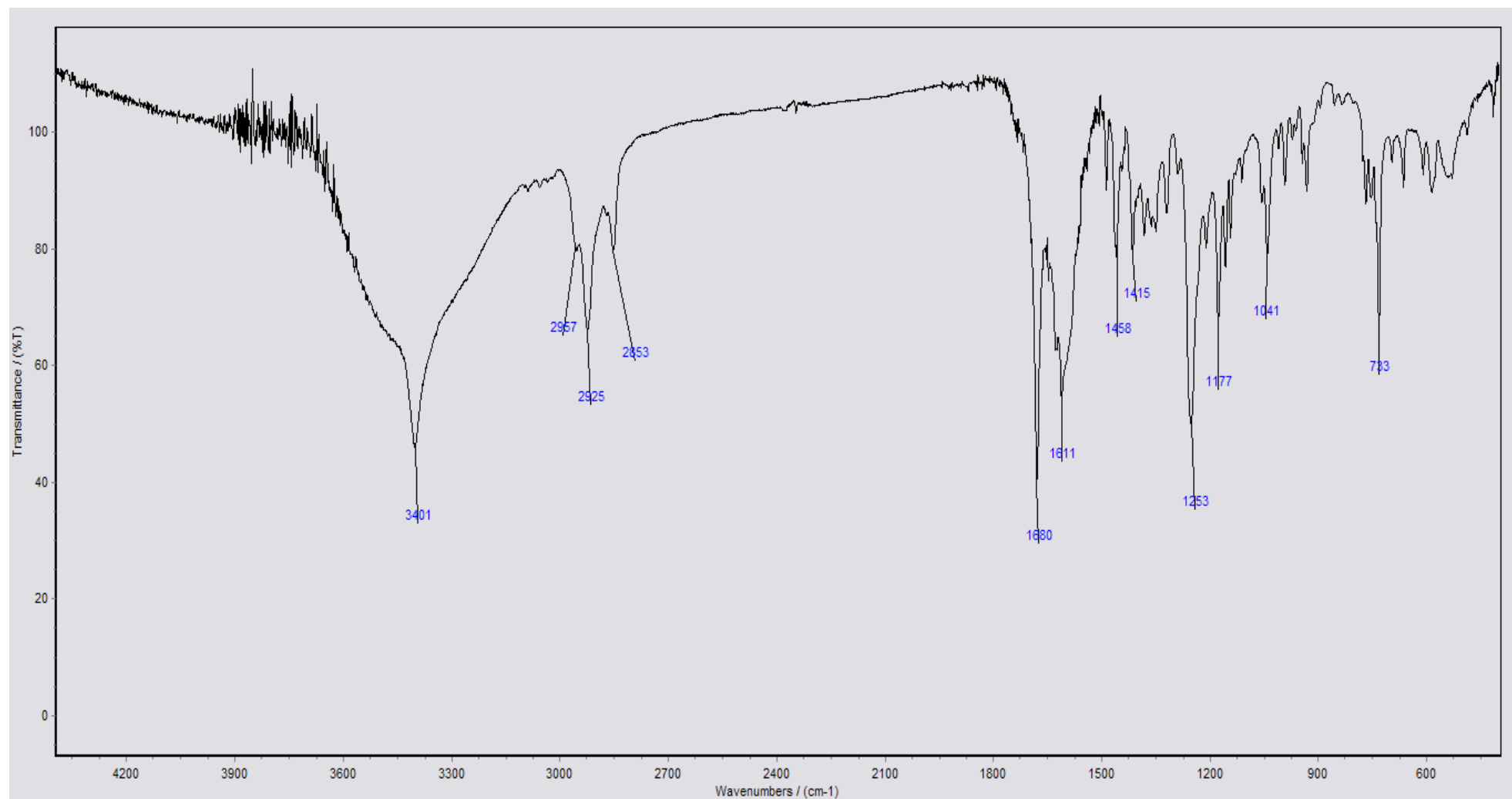


Figura 42. Espectro de IV do derivado (9).

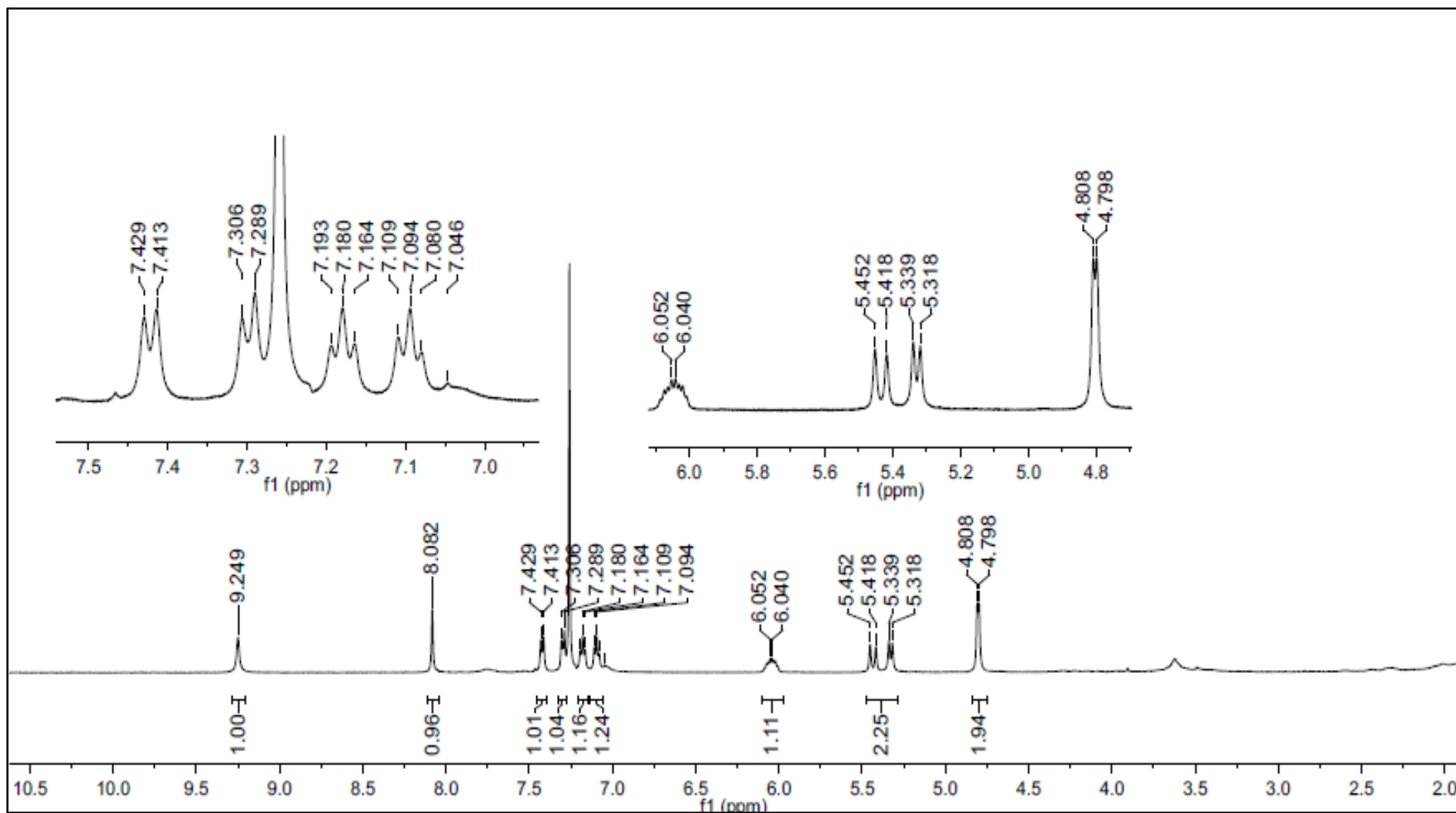


Figura 43. Espectro de RMN de ^1H do derivado (9) (500 MHz, CDCl_3).

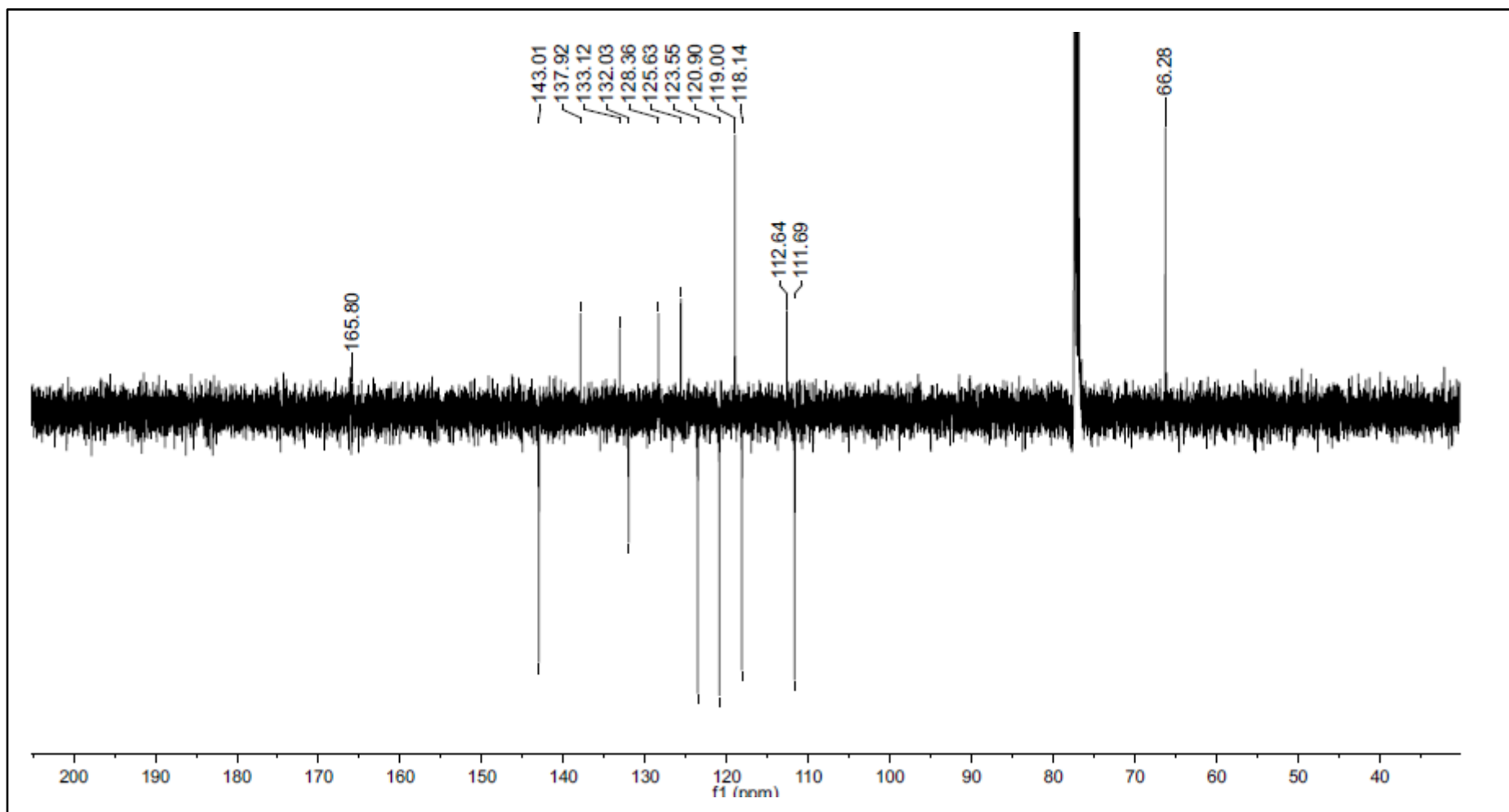
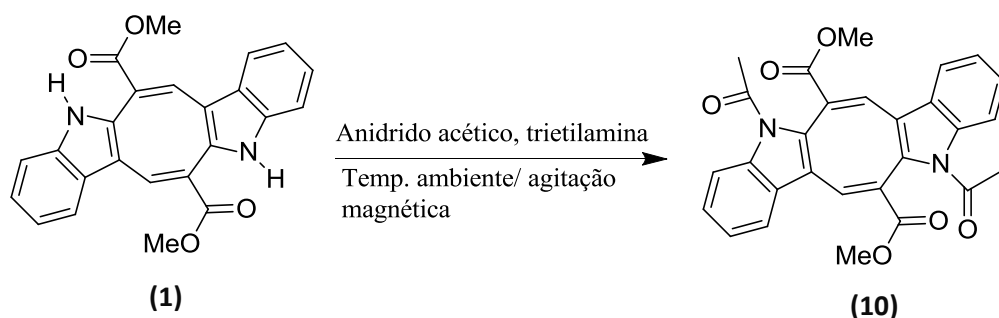


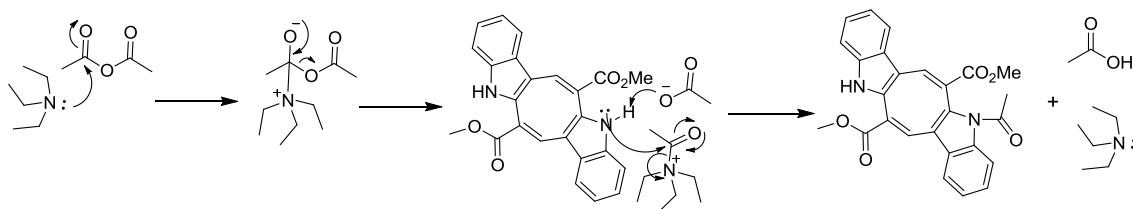
Figura 44. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado (9) (125 MHz, CDCl_3).

6.10 Obtenção e caracterização estrutural do derivado (10)

A obtenção do derivado (10) ocorreu através de uma reação n-acetilação do indol.



A semi-síntese para a elaboração do derivado (10) ocorreu, primeiro, a acetilação da trietilamina, onde o acetato gerado assiste a saída do hidrogênio indólico, ao mesmo tempo em que o indol ataca a espécie acetiltrietilamônio gerada, eliminando trietilamina e ácido acético (SAKAKURA, *et al.*, 2007).



O derivado acetilado apresentou-se como um sólido amarelo, solúvel em clorofórmio. Sua identificação foi realizada através de análises espectrais de Infravermelho, RMN ^1H e ^{13}C (Tabela 19, p. 137) e comparações com dados da CLP isolada no presente trabalho (

Tabela 20, p. 138).

A formação do derivado acetilado foi verificada pela análise do espectro de absorção na região do IV (Figura 46, p.139), observando-se o sinal 2849 cm^{-1} correspondente a estiramentos tipo $\text{C-H } sp^3$. Como também a presença correspondente ao estiramento C-O em 1247 cm^{-1} . E o sinal de absorção em

1708 cm^{-1} corresponde ao estiramento $\text{C}=\text{O}$, relacionado à presença de carbonila do éster (PAVIA *et al.*, 2010).

O espectro de RMN ^1H (Figura 47, p. 140), apresentou semelhanças com a CLP. Foram observados sinais entre δ_{H} 7,21 e 7,99 característicos de núcleo aromático. Analisando o espectro não é possível observar a presença do simpleto em, aproximadamente, δ_{H} 9,20 que é característico da presença do hidrogênio ligado ao nitrogênio de um núcleo indólico, sugerindo a presença de um ligante diferente nesta posição. O espectro de RMN ^1H revelou a presença de um simpleto em δ_{H} 8,01 característico do hidrogênio de carbono metínico do anel ciclooctatetraeno. Foi possível visualizar ainda dois simpletos: um em δ_{H} 2,56 característico de um grupo metilado acetil e outro em δ_{H} 3,77 característico de metoxila (PAVIA *et al.*, 2010; SILVERSTEIN *et al.*, 2007).

O espectro de RMN ^{13}C -APT (Figura 48, p. 141), apresentou 14 sinais significativos, destes, 7 para carbonos não hidrogenados, e 5 para carbonos metínicos e 2 são para carbonos metílicos. A presença de sinais entre δ_{C} 115,0 e 136,6 demonstraram a presença de anel aromático, pois são característicos de carbonos mono hidrogenados e não hidrogenados, ainda observou-se um sinal em δ_{C} 52,6 característico de metoxila, corroborando com o espectro de RMN ^1H . Ainda é possível observar a presença do sinal em δ_{C} 26,7 sugerindo a presença de um carbono metílico desprotegido. Ainda foi possível observar dois sinais de carbonila: um em δ_{C} 165,2 é correspondente à carbonila de éster também presente na estrutura da CLP; outro em δ_{C} 169,5 é correspondente à carbonila do grupo adicionado na reação.

Os dados espectrais mostram a semi-síntese e produção da substância (6*E*,13*E*)-dimetil 5, 12-diacetil-5,12-dihidrocicloocta[1,2-*b*:5,6-*b'*]diindol-6,13-dicarboxilato (10) (Figura 45, p. 136), descrita pela primeira vez na literatura.

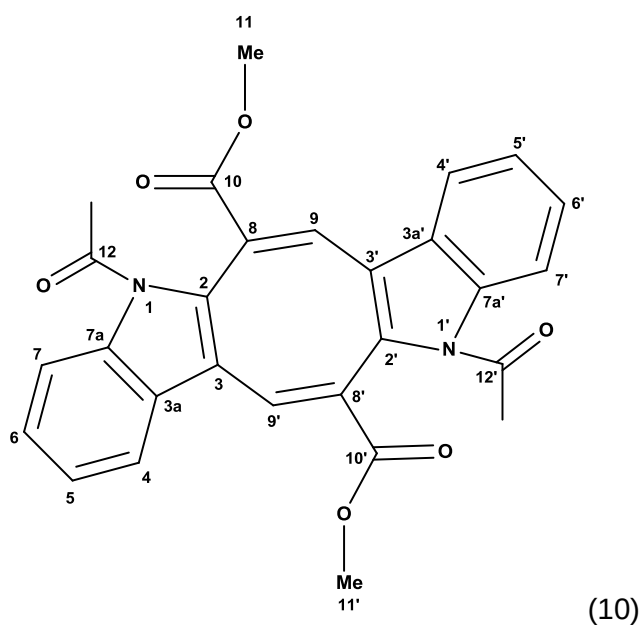


Figura 45. Estrutura química do derivado (10) da caulerpina.

Tabela 19. Dados de RMN de ^1H (200 Hz) e ^{13}C (50 Hz) do derivado (10) registrados em CDCl_3 .

	δ_{H}	δ_{C}
C		
2/2'	-	131,8
3/3'	-	122,3
3a/3a'	-	128,3
7a/7a'	-	136,6
8/8'	-	125,5
10/10'	-	165,2
12/12'	-	169,5
CH		
4/4'	7,37 (d, $J=7,6$ Hz, 1H)	115,0
5/5'	7,21 (m, 2H)	119,4
6/6'	7,25 (m, 2H)	126,0
7/7'	7,30 (d, $J=7,6$ Hz, 2H)	115,0
9/9'	8,01 (s, 1H)	135,3
CH₃		
11/11'	2,56(s, 3H)	52,6
13/13'	3,77 (s, 3H)	26,7

Tabela 20. Dados comparativos de RMN ^{13}C da caulerpina isolada (δ , CDCl_3 , 200 MHz) com derivado (10) (δ , CDCl_3 , 200 MHz).

	Derivado (10)	Caulerpina
C		
2/2'	131,8	132,9
3/3'	122,3	112,6
3a/3a'	128,3	128,2
7a/7a'	136,6	137,8
8/8'	128,3	125,5
10/10'	165,2	166,8
12/12'	169,5	-
CH		
4/4'	115,0	118,1
5/5'	119,4	120,8
6/6'	126,0	123,5
7/7'	115,0	111,6
9/9'	135,3	142,9
CH₃		
11/11'	52,6	-
13/13'	26,7	-
OCH₃		
11/11'	-	52,6

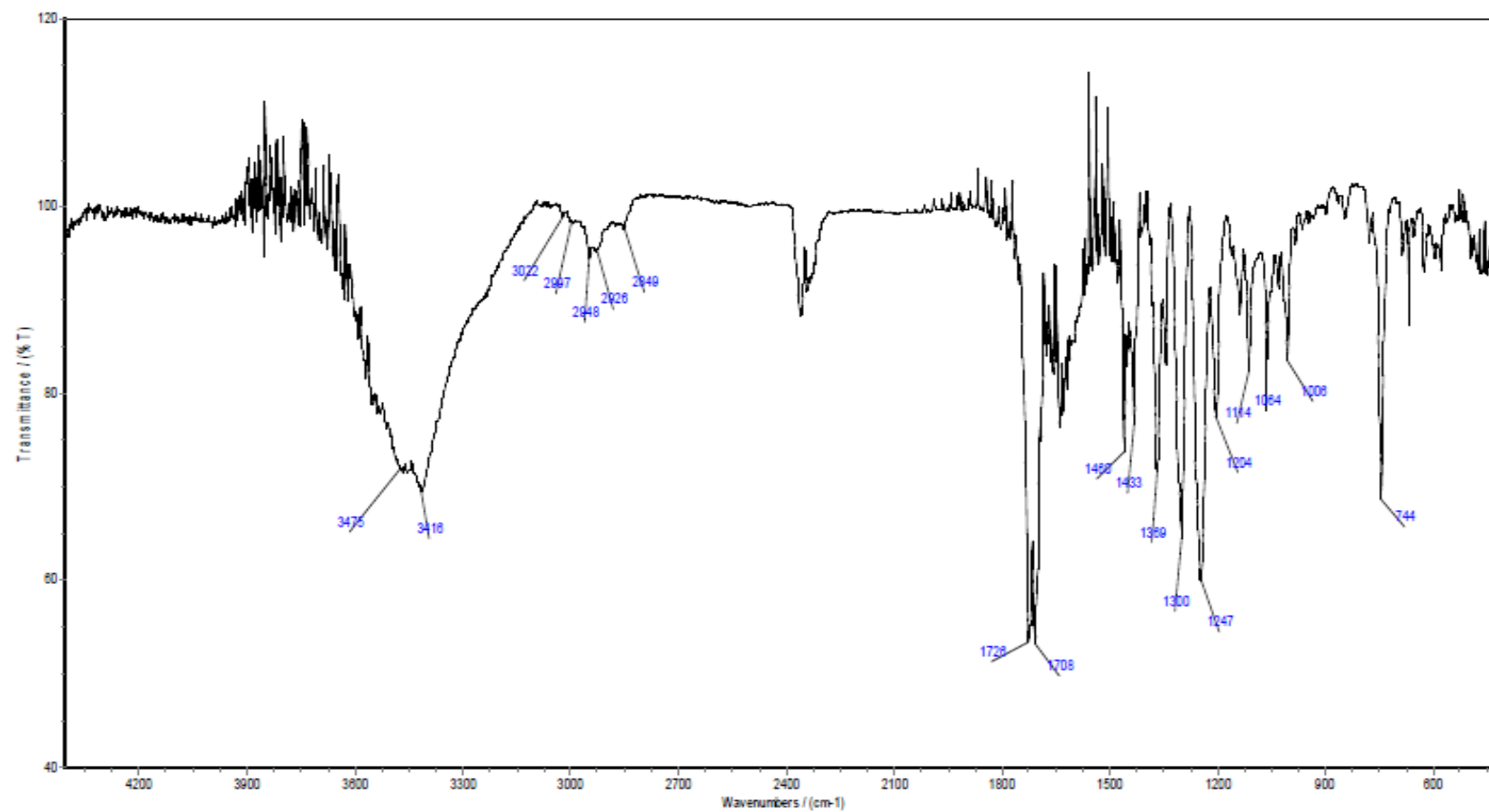


Figura 46. Espectro de IV do derivado (10).

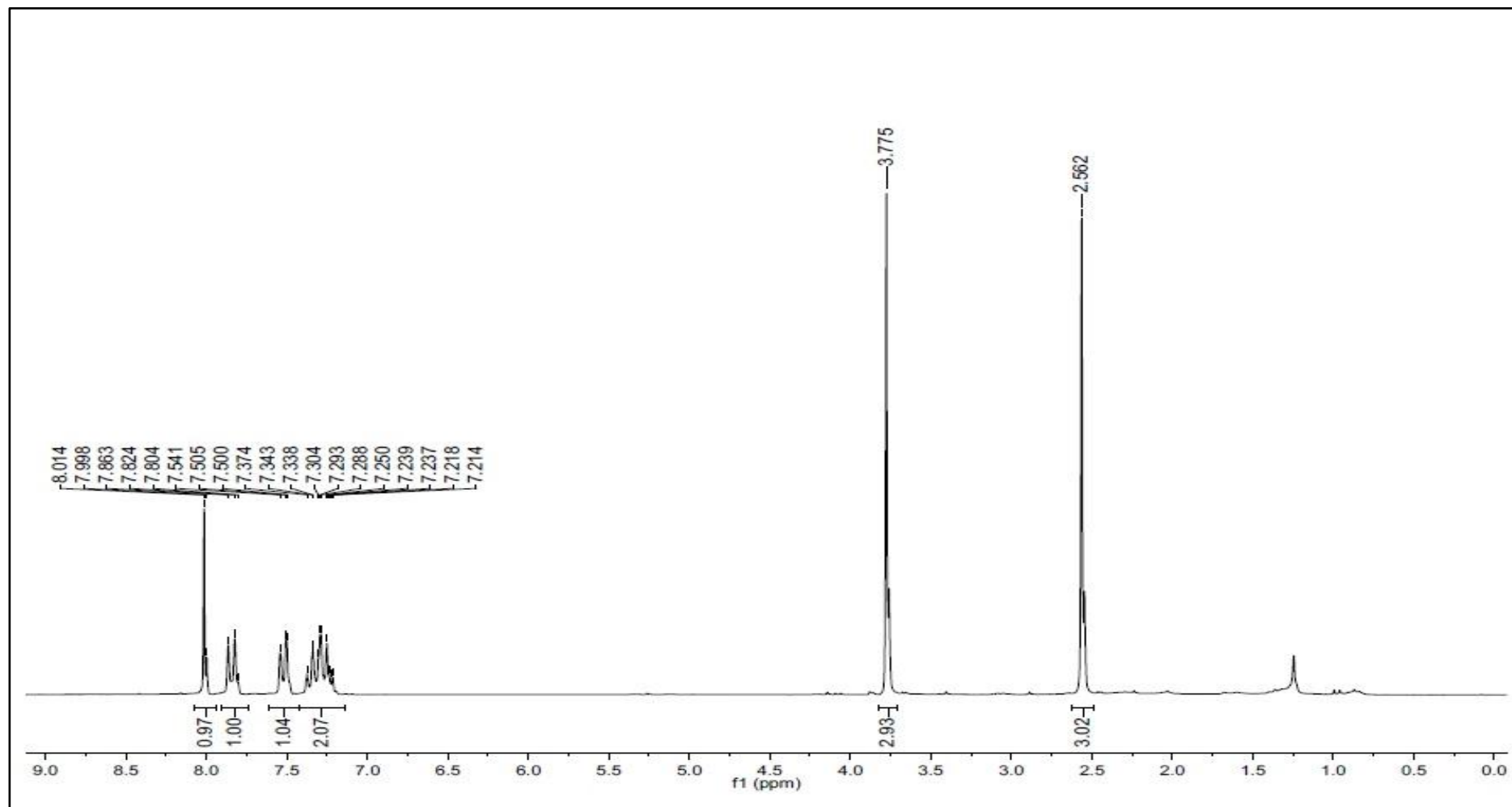


Figura 47. Espectro de RMN de ^1H do derivado (10) (200 MHz, CDCl_3).

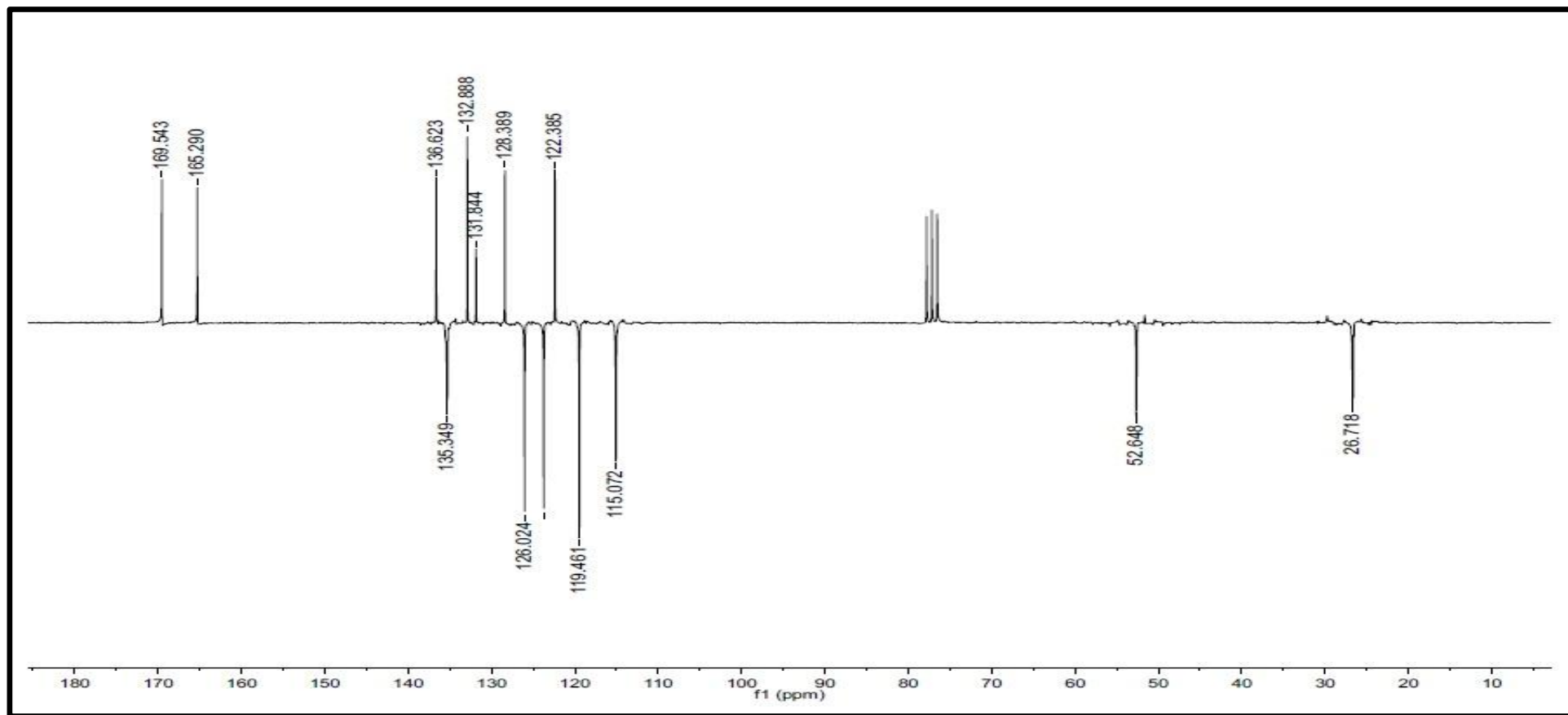


Figura 48. Espectro de RMN de ^{13}C do derivado (10) (50 MHz, CDCl_3).

Atividade leishmanicida

7. ATIVIDADE LEISHMANICIDA

O presente estudo demonstrou a atividade, *in vitro*, do ácido caulerpínico (2) em *Leishmania amazonensis*. Os resultados mostraram que a atividade leishmanicida do ácido caulerpínico contra promastigota, resultou em uma concentração inibitória (IC_{50}) de $5,2 \pm 2,5 \mu M$. Enquanto a CLP, alcaloide do qual o ácido caulerpínico foi originado, não apresentou atividade significativa na maior concentração testada, não tendo sido possível calcular a IC_{50} . Em paralelo, o fármaco de referência a pentamidina também foi analisado (Tabela 21, p.143).

Tabela 21. Efeito leishmanicida de Pentamidina, ácido Caulerpínico e Caulerpina contra promastigotas *L. amazonensis*.

Substância	$IC_{50\%}$ (μM)	Efeito Máximo (%)
Pentamidina	2.3 ± 1.0	93.9 ± 0.3
Ácido Caulerpínico	5.2 ± 2.5	72.7 ± 1.8
Caulerpina	>100	42.4 ± 12.8

Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média, SEM Diferenças com $p < 0,01$ foram considerados significativos em relação ao DMSO 0,1% grupo. IC_{50} : concentração necessária para obter 50% de inibição. Fonte: da Matta, CBB, Vieira ACS e Alexandre-Moreira MS.

Para avaliar a citotoxicidade do ácido caulerpínico foi realizado o ensaio de viabilidade sobre a célula hospedeira (macrófagos Balb/C), utilizando o método de MTT. Nesse ensaio nenhuma das concentrações testadas apresentaram toxicidade à célula hospedeira. Na concentração de 100 μM , maior concentração testada, 95,82% das células se mantiveram viáveis após o tratamento com o ácido caulerpínico (Figura 49, p.144).

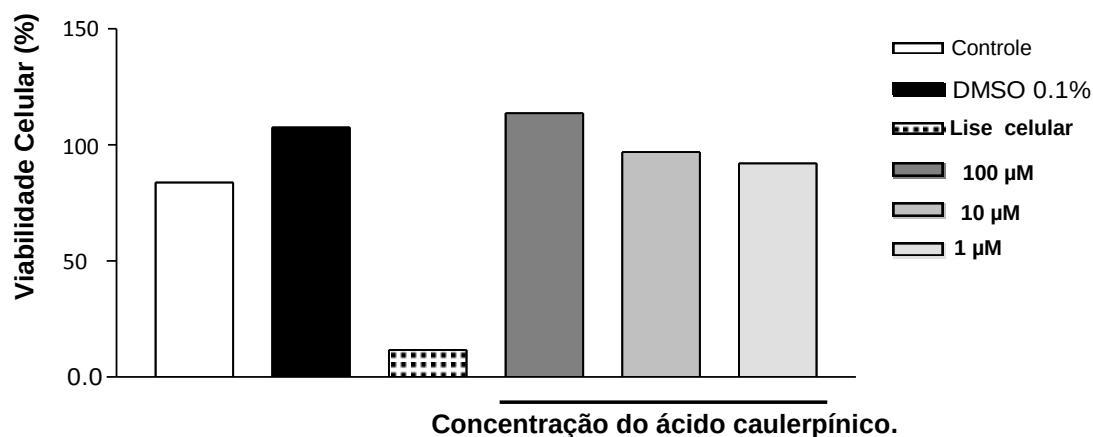


Figura 49. A citotoxicidade do ácido caulerpínico em camundongos BALB/C e com macrófagos peritoneais. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de redução do MTT. Fonte: da Matta, CBB, Vieira ACS e Alexandre-Moreira MS.

Em seguida, dado que não houve citotoxicidade para a célula hospedeira, foi avaliada a atividade das substâncias contra promastigotas de *L. Amazonensis* interiorizada em macrófagos peritoneais (Balb/c). Nesse ensaio, após 48 horas de exposição observou-se uma redução significativa no índice de infecção, resultando em 99,5% de um efeito máximo (Figura 50, p. 144).

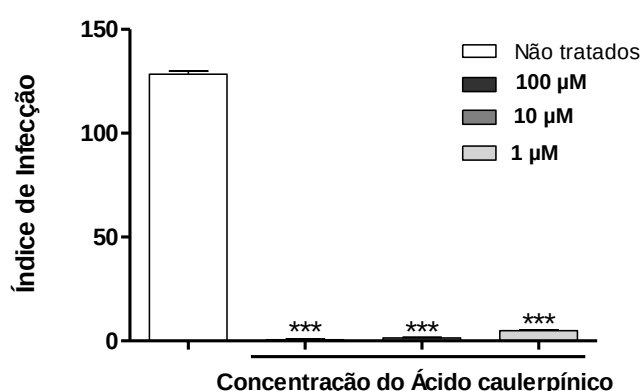


Figura 50. Atividade do ácido caulerpínico contra parasitas intracelulares 48 h após a infecção. Fonte: da Matta, CBB, Vieira ACS e Alexandre-Moreira MS.

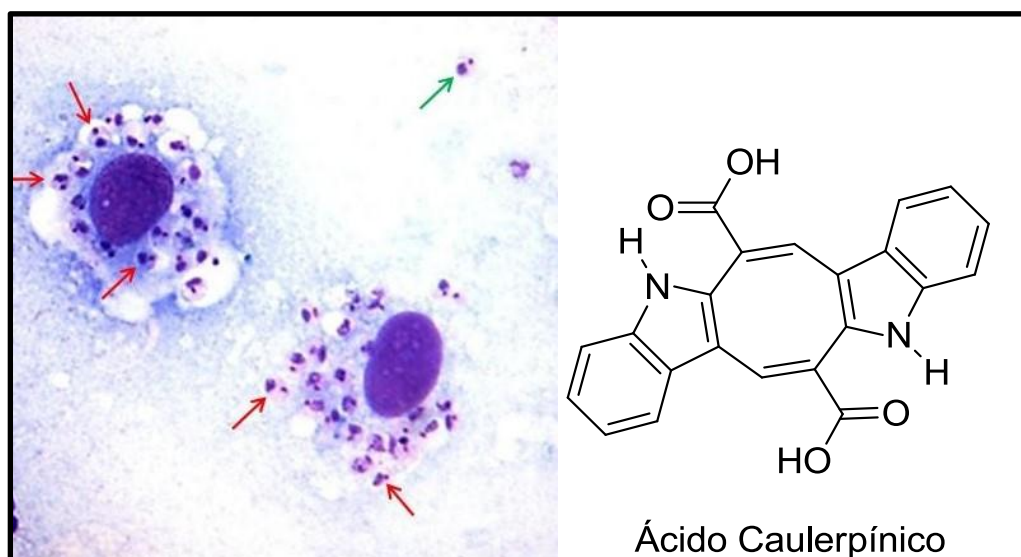


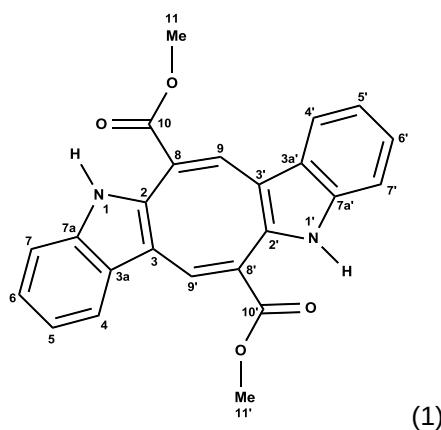
Figura 51. Macrófagos infectados, in vitro, com *L. amazonensis* (setas vermelhas), promastigotas (seta verde), derivado sintético ácido caulerpínico. Fonte: <http://leishnao.blogspot.com.br/>

O ácido caulerpínico já foi isolado das espécies *Caulerpa racemosa* e *Caulerpa sertularioides*, estudos anteriores dos extratos dessas espécies relataram sua atividade leishmanicida, no entanto, não foi mencionado nenhuma relação com o ácido caulerpínico (SOARES *et al.*, 2003). Modificações estruturais na CLP permitiram a semi-síntese, do ácido caulerpínico (2) que apresentou excelente atividade leishmanicida contra promastigotas *L. amazonensis* em comparação com o fármaco Pentamidina e com o metabólito Caulerpina. Dado esse que pode sugerir que a atividade leishmanicida do extrato de espécies de *Caulerpa* pode ter sido pela presença do ácido caulerpínico nesses extratos. (tabela 21, p. 139).

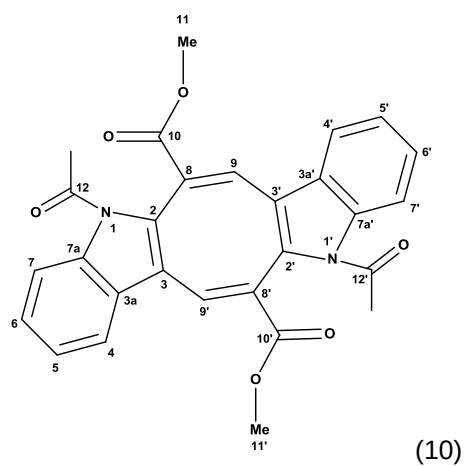
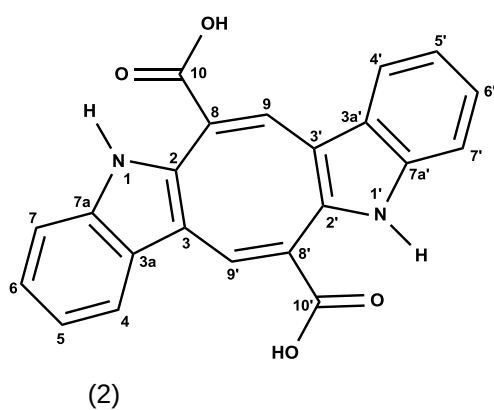
Conclusões

8. CONCLUSÃO

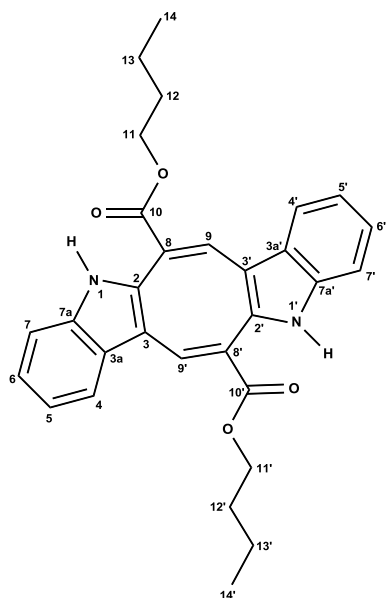
A partir do extrato etanólico da *Caulerpa racemosa* foi possível o isolamento da substância CLP (1) um alcaloide bis-indólico, e sua identificação por meio técnicas espectroscópicas de infravermelho e RMN de ^1H e ^{13}C .



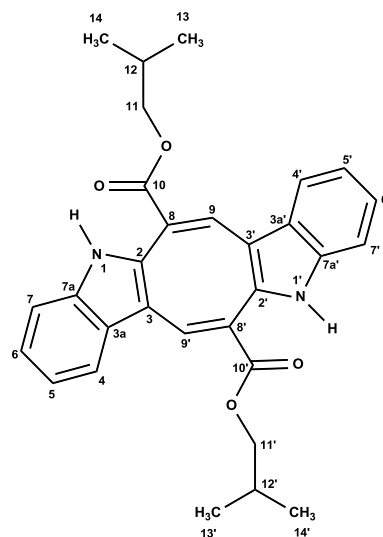
Usando como ponto de partida a própria CLP (1), foi possível obter o ácido caulerpínico (2) e o derivado *N*-acetilado (10).



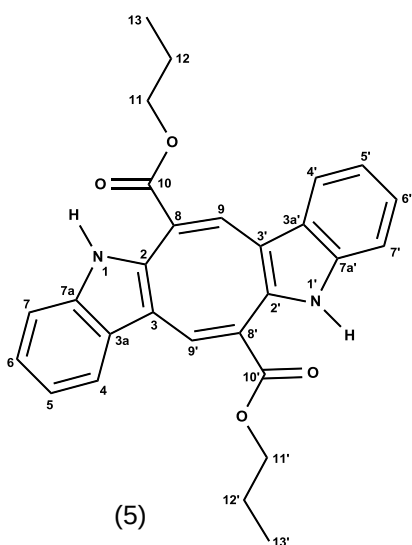
Em seguida, partindo-se do ácido caulerpínico (2) foi possível a realização da semi-síntese de 7 (sete) derivados ésteres, todos inéditos na literatura.



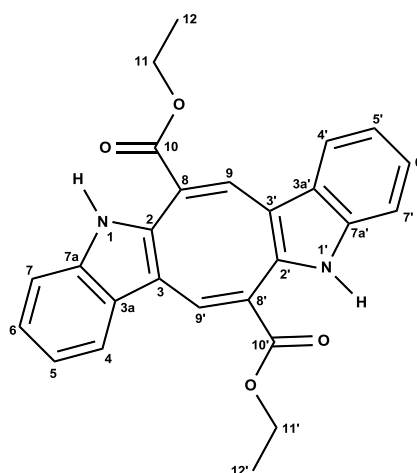
(3)



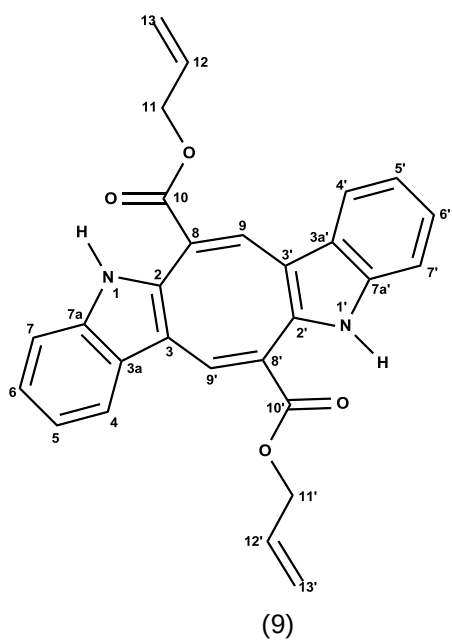
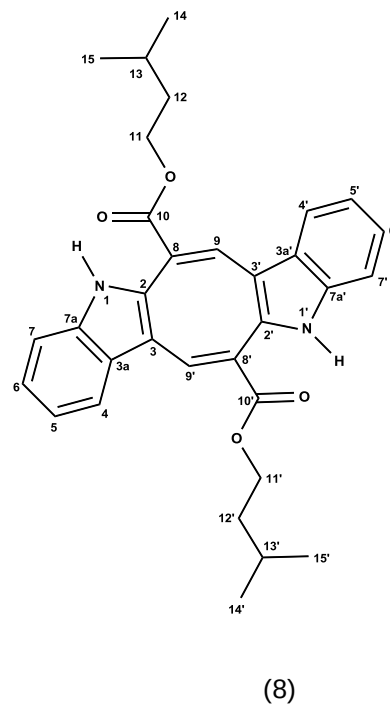
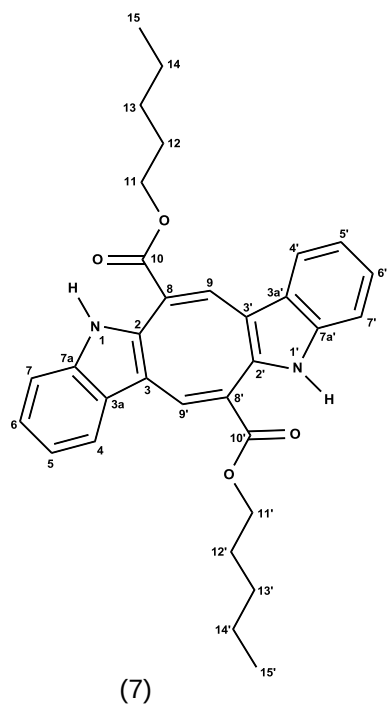
(4)



(5)



(6)



A CLP (1) e seu derivado, o ácido caulerpínico (2) foram testados no laboratório de Farmacologia e Imunidade-LAFI-UFAL, sob coordenação da Profa. Magna Suzana Alexandre Moreira para ensaios farmacológicos, *in vitro*, sobre a atividade leishmanicida. O ácido caulerpínico (2) apresentou significativo resultado frente aos macrófagos infectados na célula do hospedeiro, enquanto a CLP não apresentou atividade.

Referências

9. REFERÊNCIAS

AGUILAR, S.; GERTRUDES. Dep. of Bot., Univ. of Hawaii, Honolulu, HI, USA. **Journal of the Chemical Society** [Section] C: Organic. 1970.

AGUILLAR-SANTOS, G. Caulerpin, a New Red Pigment from Green Algae of the Genus *Caulerpa*. **J. Chem. Soc. (C)**, p. 842-843, 1970.

ALMEIDA, M. C.; VILHENA, V.; BARRAL, A.; NETO, M. B., Leishmanial infection: analysis of its first steps. Review. **Mem.do Inst. O. Cruz**, v. 98, p. 861-870, 2003.

ALTAMIRANO-ENCISO, A. J.; MARZOCHI, M. C.; MOREIRA, J. S.; SCHUBACH, A. O.; MARZOCHI, K. B. [On the origin and spread of cutaneous and mucosal leishmaniasis, based on pre- and post- colombian historical source]. **Hist Cienc Saude Manguinhos**, v. 10, p. 852-882, 2003.

AMATO, V. S. *et al.* Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 77, n. 2, p. 266–274, ago. 2007.

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

AMICO, V.; ORIENTE, G.; PIATTELLI, M. TRINGALI, C.; FATORRUSO, E.; MAGNO, S. MAYOL, L. Caulerpenyne, an usual sesquiterpenoid from the green alga *Caulerpa prolifera*. **Tetrahedron Letters**, n. 38, p. 3593– 3596, 1978.

ANJANEYULU, A S. R; PRAKASH, C. V. S.; RAJU, K.V.S & MALLAVADHANI U. V. Isolation of new aromatic derivatives from a marine algal species *Caulerpa racemosa*. **Phytochemistry**.v 55 (4), p. 496-499, 1992.

AKNIN, M.; NZAOU, M.; KORNPORST, M.; GAYDOU, E. M.; SAMB.A.; MIRALLES, J. Sterol composition of twelve Chlorophyceae from the Senegalese coast and their chemotaxonomic significance. **Phytochemistry**, v. 31, n. 12, p. 4167-4169, 1992.

ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int. J. Parasitol.** v. 30, p. 1269–1281, 2000.

BALAÑA-FOUCE, R, REGUERA, R M, CUBRÍA, J C & ORDÓÑEZ, D. The Pharmacology of Leishmaniasis. **Gen. Pharmac**, 30(4): 435-443, 1998.

BARATA, D. Taxonomia e filogenia do gênero *Caulerpa* J.V. Lamour. (Bryopsidales, Chlorophyta) no Brasil. Tese de doutorado, Instituto de Botânica, São Paulo, 2008.

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEN, H.; MCMAHON PRATT, D.; RIBEIRO DE JESUS, A.; ALMEIDA, R.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E. M.; *ET AL.* Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am J Trop Med Hyg**, v. 44, p. 536-546, 1991.

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

BOLZANI, Vanderlen da S.. **Biodiversidade, bioprospecção e inovação no Brasil**. *Cienc. Cult.* [online]. 2016, vol.68, n.1, pp. 04-05. ISSN 2317-6660.

BLACMAN, A. J.; WELLS, R. J. Flexilin and triarin, terpene 1,4-diacetoxy 1,3-diols from two *Caulerpa* species. **Tetrahedron Letters**, v. 33, p. 3063-3064, 1978.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A.; MUNRO, M. H. G.; PRINSEP, M. R. Marine Natural products. **Nat. Prod. Rep.**, v. 29, p. 144–222, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana. Diagnósticos Clínico e Diferencial**. Brasília, DF, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Mudanças climáticas e ambientais e seus efeitos na saúde: cenários e incertezas para o Brasil. Organização Pan-Americana da Saúde**. Brasília; 2008.

BRAYNER, S.; PEREIRA, S. M. B.; BANDEIRA-PEDROSA, M. E. 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(4), p. 914-928, 2008.

CAVAS; YURDAKOC, K. An investigation on the antioxidant status of the invasive alga *Caulerpa racemosavar. cylindracea* (Sonder) Verlaque, Huisman et Boudores (Caulerpales, Chorophyta). **Journal of Experimental Marine Biology**. v. 325, p. 189-200, 2005.

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. (2013): Spasmolytic effect of caulerpine involves blockade of Ca²⁺ influx on guinea pig ileum. **marine drugs**, 11, 1553-1564.

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

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

CHEW, Y. L. *et al.* Antioxidant activity of edible brown, green and red seaweeds from the tropical region. **LWT- Food Science and Technology**.v.41, p. 1067-1072, 2008.

CROFT, S. L.; ENGEL, J. Miltefosine--discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 100 Suppl 1: S4-8, 2006.

CROFT, S. L.;YARDLEY, V. Chemotherapy of leishmaniasis. **Curr Pharm Des**, v.8, p. 319-342, 2002.

CRUCIANI, G.; PASTOR, M.; GUBA, W. VolSurf: a new tool for the pharmacokinetic optimization of lead compounds. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol.11, suppl. 2, p. 29–39, 2000.

Da-CRUZ, A. & PIRMEZ, C. In: Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias, COURA, J.R. (Ed), Rio de Janeiro, **Guanabara Koogan**, 697-712, 2005.

DA MATTA, B. B. C; SOUZA, E. T.; QUEIROZ, A. C.; LIRA, D. P.; ARAUJO, M.V;CAVALCANTE-SILVA, L. H. A.; MIRANDA, G. E.C.; ARAÚJO-JÚNIOR, J.X.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SANTOS, B.V.O.; ALEXANDRE-MOREIRA, M.S. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activity from Algae of the Genus *Caulerpa*. **Marine Drugs**. v. 9, n. 3, p.307-318, 2011.

DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatol Ther**, 22: 491-502, 2009.

DAVISON, A. J. BENKO, M. HARRACH, B. Genetic content and evolution of adenoviruses. **J. Gen Virol**. v. 84, p. 2895-2908, 2003.

DAVISON, A.J.; EBERLE, R.; EHLERS, B.; HAYWARD, G.S.; MCGEOCH, D.J.; MINSON, A.C. *et al*/The order Herpesvirales. **Arch Virol**. 154:171–77, 2009.

DEWAR, M.J.S.; ZOEBISCH, E.G.; HEALY, E.F.; STEWART, J.J.P. J. Am. **Chem. Soc.**, v. 107, p. 3902-3909, 1985.

DEWAR, M.J.S.; HEALY, E.F.; HOLDER, A.J.; YUAN, Y.C. J. **Comput.Chem**, v. 11, p. 541-542, 1990.

DIAGO-MESEGUER, J.; PALOMO-COLL, A. L. **A new reagent for activating carboxyl groups; prepatation and reactions of N,N-Bis [2-oxo-3-ox-azolidinyl] phosphorodiamdic Chloride**. Departamento de Investigación Gema S.A., Beethoven, 15, Barcelona-21, Spain, 1980.

DHIMAN RC, PAHWA S, DHILLON GP, Dash AP. **Climate change and threat of vector-borne diseases in India: are we prepared?** *Parasitol Res* 2010; 106(4): 763-73.

EBNER K, RAUCH M, PREUNER S, LION T. Typing of human adenoviruses in specimens from immunosuppressed patients by PCR- fragment length analysis and real-time quantitative PCR. *J. Clin Microbiol*. 44(8): 2808-15,2006.

FELÍCIO, R.; OLIVEIRA, L. L. A.; Debonisi, M. H. Bioprospecção a partir dos oceanos: conectando a descorbeta de novos fármacos aos produtos naturais marinhos. **Ciência e Cultura**, v. 64, no.3, 2012.

GARETH, T. **Medicinal chemistry: an introduction**. 2. ed. John Wiley & Sons Ltd. 2007, 648 p.

GUVEN, K. C.; PERCOT, A.; SEZIK, E. Alkaloids in Marine Algae. **Mar. Drugs**, v. 8, p. 269-284, 2010.

GRIMALDI JR G, TESH RB Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin Microbiol Rev**, 6: 230-250, 1993.

HALES S, de WET.; N, MAINDONALD; J, WOODWARD A. **Potential effect of population and climate changes on global distribution of dengue fever: an empirical model**. *Lancet* 2002; 36(9336): 830-4.

HALGREN, T. A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. **J. Comput. Chem**, v. 17, p. 490–519, 1996.

HESSE, M. **Alkaloids: Nature Curse Or Blessing**; Ed. Wiley-VCH; Weinheim, 2002.

ISHIKURA, M.; Yamada, K. **Nat. Prod. Rep.**, 26, 803, 2009

JANOSIK, T.; JOHNSON, A.; BERGMAN, J. Synthesis of the marine alkaloids rhopaladins A, B, C and D, **Tetrahedron**, 58 (14), pp. 2813 – 2819, 2002.

JOULE, J. A.; Mills, K.; Smith, G. F., *Indoles: Reactions and Synthesis*. Stanley Thomes, **Cheltenham**, p. 305, 1988.

JOULE, J. A. **Indole and its derivatives in science and synthesis: Howben – Weyl Methods of molecular transformations**. THOMAS E. J. George Thieme, Stuttgart, 2001, v. 10, Chapter 13.

KANG, K.; Park, S.; Kim, Y.S.; Lee, L.S.; Back, K., 2009. Biosynthesis and biotechnological production of serotonin derivatives. **Appl. Microbiol. Biotechnol** 83, pp. 27–34.

KANAGAWA, A. L.; NEVES, M. A. Biologia e Sistemática de Fungos, Algas e Briófitas. **Ciências Biológicas – Caderno CB Virtual** 2, n.2, p.279-302, 2011.

KARAMYAN, A. J. K.; HARMANN, M. T. Marine Indole Alkaloids: Potential New Drug Leads for the Control of Depression and Anxiety. **Chem. Rev.**, v. 110, p. 4489-4497, 2010.

KASTENHOLZ, M. A., PASTOR, M., CRUCIANI, G., HAAKSMA, E. E. J., FOX, T. GRID/CPCA: A New Computational Tool To Design Selective Ligands, **J. Med. Chem.**, v. 43, p. 3033-3044, 2000.

KAYE, P.; SCOTT, P.. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Rev. Microb., London**, v. 11, n. 9, p.604-615, 2011.

KHETSURIANI, N.; LAMONTE-FOWLKES, A.; OBERST, S.; PALLANSCH, M. A. Centers for disease control and prevention. Enterovirus surveillance – United States, 1970-2005. **M. M. R Surveill. Summ.**, v. 15, n. 55, p. 1-20, 2006.

LEACH, A. R. 2001. **Molecular Modeling: Principles and Applications**. London: Prentice Hall.

LELIAERT, F.; SMITH, D. R.; MOREAU, H.; HERRON, M. D.; VERBRUGGEN, H.; DELWICHE, C. F.; CLERCK, O. D. Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.31, n., p. 1–46, 2012.

LIMA, L. M. Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira, **Quimica Nova**, v. 30 (6), p.1456-1468, 2007.

LIU, A.; LIU, D.; LIANG, T.; YU, X.; FENG, M.; YAO, L. Caulerprenylols A and B, two rare antifungal prenylated para-xylenes from the green alga *Caulerpa*

Racemosa. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, p. 2491-2494, 2013a

LIU, D.; MAOA, S.; ZHANG, H.; YU, X.; FENG, M. Caulerprenylols Racemosina A and B, two novel bisindole alkaloids from the green alga *Caulerpa racemosa*. **Fitoterapia**, v. 91, p. 15-20, 2013b

LIU, Y et al. The Caulerpa Pigment Caulerpin Inhibits HIF-1 Activation and Mitochondrial Respiration. **Journal of Natural Products**, v. 72, n 12, p. 2104-2109, 2009.

LINDOSO, J. A.; LINDOSO, A. A. Neglected tropical diseases in Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.51, p. 247-253, 2009.

LIRA, Constituintes Químicos e Atividade Biológica dos Organismos Marinhos: *Caulerpa mexicana*, *Briothamnion triquetrum*, *Hypnea musciformis* e *Ircinia felix*. João Pessoa: UFPB, 2011, 178 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, UNIVERSIDADE Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

LIESEGANG, T. J. Herpes simplex virus epidemiology and ocular importance. **Cornea**.v.20, p. 1-13, 2001.

LIVORSI, D.; ANDERSON, E.; QURESHI, S.; HOWARD, M.; WANG, Y.F.; FRANCO-PAREDES, C. Brainstem encephalitis: an unusual presentation of herpes simplex virus infection. **Journal Neurology** 257(9): 1432-7, 2010.

LORENZO, V. P. **Estudo Fitoquímico com fins farmacológicos da Alga Bentônica *Caulerpa racemosa***. Dissertação da Universidade Federal da Paraíba. 2010.

LUCENA, L. A. F.; KANAGAWA, A. I.; MARTINS G. J. M.; TARGINO, C. H.; MIRANDA, G. E. C.; HORTA, P. A. Levantamento da flora do Infralitoral do

Município de Pitimbu, Litoral Sul do Estado da Paraíba, Brasil. **Revista Brasileira Biociências**, v.5(2), p.585-587, 2007.

MAIA-ELKHOURY A. N. S.; ALVES W. A.; SOUSA-GOMES M. L.; SENA J. M.; LUNA E. A.. Leishmaníase visceral no Brasil: evolução e desafios. **Cad. de Saúde Pública**, v.24, 2008.

MAFFEI-FACINO, R.; Carini, M.; Aldini, G.; Saibene, L.; Macciocchi, A., 1993. Antioxidant profile of nimesulide, indomethacin and diclofenac in phosphatidylcholine liposomes (PCL) as membrane model. **Int. J. Tissue React.**, 15, pp. 225–234.

MAO, S.; GUO, Y; SHEN, X. Two novel aromatic valerenane-type sesquiterpenes from the Chinese green alga *Caulerpa taxifolia*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.16, p. 2947-2950, 2006.

MACEDO, N. R. P. V. *et al.* Caulerpin as a potential antiviral drugs against herpes simplex virus type. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, p. 861-867, 2012).

MARZOCHI, M. C.; MARZOCHI, K. B. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cad Saude Publica**, 10 Suppl 2: 359-375, 1994.

MIRANDA, Efeitos do alcaloide indólico caulerpina, obtido de alga do Gênero *Caulerpa*, em modelos de colite experimental murina. Natal, UFRN 2014, 71 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE, Natal, 2014.

MITROPOULOS, P.; KONIDAS, P.; DURKIN-KONIDAS, M. New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment. **J Am Acad Dermatol**, v. 63, p. 309-322, 2010.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, p. 1561-1577, 2005.

NAPOLI, L.; FATTORUSSO, E.; MAGNO, S.; MAYOL, L. Furocaulerpin, a new acetylenic sesquiterpenoid from the green alga *Caulerpa prolifera*. **Experientia**, v. 37, p.1132, 1981.

NIELSEN, P. G.; CARLÉ, J. S. CHRISTOPHERSEN, C. Final Structure of caulerpicin, a toxin mixture from the green alga *Caulerpa racemosa*. **Phytochemistry**, v. 21, n.7, p. 1643- 1645, 1982.

NUNES, G. B. L.; POLICARPO, P.R.; COSTA, L. M.; da SILVA, T. G.; MILITÃO, G. C. G.; CÂMARA C. A.; BARBOSA-FILHO, J.M.; GUTIERREZ, S. J. C. *In vitro* antioxidante and cytotoxic activity of some synthetic riparin-derived compounds. **Molecules**, 19(4), 4595-4607, 2014.

OLIVEIRA-CARVALHO, M.F.; PEREIRA, S.M.B. & ZICKEL, C.S. Florística e distribuição espaço-temporal das clorófitas bentônicas em trechos recifais do litoral norte do estado de Pernambuco - Brasil. **Hoehnea**, v. 30, p. 201-212, 2003.

OLIVEIRA FILHO, E.C. An annotated list of the Brazilian seaweeds in Dickie's herbarium. **Journal Linnean Society Botany**, v. 69, p. 229-238,1974.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Leishmaniasis. Geneve, 2015. Disponível em: < http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf>. Acesso em: 15 set. 2015.

OSANAI CH, TRAVASSOS DA ROSA AP, TANG AT, DO AMARAL RS, Passos AD, TAUIL PL. Surto de dengue em Boa Vista, Roraima Nota previa. **Rev Inst Med Trop** 25(1): 53-4 São Paulo,1983.

PALLANSCH, M. A.; OBERSTE, M. S. Coxsackievirus, Echovirus, and other enterovirus. In. GORGACH, S. C.; BARTLET, J. G. BACKLOW, N. R. **Infectious diseases**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2004, p, 2047-2051.

PAUL, V. J. FENICAL, W. Chemical defense in tropical green algae, order Caulerpales. **Marine Ecology - Progress Series**, v. 34, p. 157-169, 1986.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à Espectroscopia**. 4 ed. Cengage Learning; São Paulo, 2010.

PEREIRA, S.M.B.; OLIVEIRA-CARVALHO, M.F.; ANGEIRAS, J.A.P.; BANDEIRA-PEDROSA, M.E.; OLIVEIRA, N.M.B.; TORRES, J.; Gestinari, L.M.; COCENTINO, A.L.M.; SANTOS, M.D.; NASCIMENTO, P.R.F. & CAVALCANTI, D.R. 2002. Algas bentônicas do Estado de Pernambuco. Pp. 97-124. In: M. Tabarelli & J.M.C. Silva (eds). **Diagnóstico da biodiversidade de Pernambuco**. Recife, Editora Massangana.

RADWANG, M. A. A. *et al.*, Synthesis and biological evaluation of new 3-substituted indole derivatives as potential anti-inflammatory and analgesic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**.v. 15, p. 3832-3814, 2007.

RATH,S.; TRIVELIN, L.A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; JESUS, M.N.; MARZAL, P.C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26 (4), p. 550-555, 2003.

READY, P. D. Leishmaniasis emergence in Europe. **Euro surveillance**, v. 15, n. 10, p. 1–13, 2010.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis**, v.7, p. 581-596, 2007.

REY, L. Leishmania e leishmaníases: os parasitos. In: Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. Rio de Janeiro, **Guanabara Koogan**, 2008.

ROBINSON, M. W.; OVERMEYER, J. H.; YOUNG, A. M.; ERHARDT, P. W.; MALTESE, W. A. Synthesis and evaluation of indole-based chalcones as inducers of methuosis, a novel type of nonapoptotic cell death. **J. Med. Chem.** v. 55, p. 1940-1956, 2012.

RODRIGUES-JÚNIOR, M. T., Síntese e Atividade Citotóxica, Leishmanicida e Sobre o Sistema Nervoso Central de Compostos b-Carbólicos. Campinas: UEC, 2009, p. 273, tese (Doutorado) – UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, Campinas, 2009.

ROIZMAN, B; KNIPE, D.M.; WHITLEY, R.J. Herpes Simplex Viruses. In: Knipe, D.M. &Howley, R.M. Fields virology. 5th ed. Pennsylvania-Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p.2502–601, 2007

de SÁ ALVES, F. R.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. From Nature to Drug Discovery: The Indole Scaffold as a “Privileged Structure,” *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 9, p. 7, 2009.

SAKAKURA, A.; KAWAJIRI, K.; OHKUBO, T.; KOSUGI, Y.; ISHIHARA, K.; Widely Useful DMAP-Catalyzed Esterification under Auxiliary Base- and Solvent-Free Conditions. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 129, p. 14775-14779, 2007.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SIMMONS, A. Clinical Manifestations and Treatment considerations of Herpes simplex virus infection. **J Infect Dis.** v.186, p. 871-7, 2002.

SING, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment for leishmaniasis. **J. Infect. Chemother**, v. 10, p. 307-315, 2004.

SOLOMONS, T. W. Graham; Fryhle, Craig B. **Química Orgânica, vol. 1 e 2**. 9 ed. LTC, 2009.

STOLE, S., 1999. Indole derivatives as neuroprotectants. *Life Sciences*, 65, pp. 1943–1950.

SIMÕES-MATTOS, L.; TEIXEIRA, M.J.; COSTA, D.C.; PRATA, J.R.C.; BEVILAQUA, C.M.L.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Evaluation of terbinafine treatment in *Leishmania chagasi*-infected hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Vet. Parasitology**, v.103, p.207–216, 2002.

SINAM, Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Tabulação de dados. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>, acesso em 20 de Setembro de 2015.

SOUZA, éverton Tenório de. Evaluation of the potencial antinociceptive and anti-inflammatory of the benthic alga *Caulerpa racemosa* (Forssk.) J. Agardh (caulerpaceae). 2011. 115 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2011.

SOUZA, E. T; LIRA, D.P.L; QUEIROZ, S. 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.; ATHAIDE-FILHO, P.F.; SANTOS, B.V.O.; ALEXANDRE-MOREIRA, M.Z. Antinociceptive activities of crude methanolic extract phases, n-butanolic, chloroformic and ethyl acetate from *Caulerpa racemosa* (Caulerpaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 19, p. 115-120, 2009a.

SOUZA, E. T; LIRA, D.P.L; QUEIROZ, S. 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.; ATHAIDE-FILHO, P.F.; SANTOS, B.V.O.; ALEXANDRE-MOREIRA, M.Z. The Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Caulerpin, a Bisindole Alkaloid, Isolated from Seaweeds of the Genus *Caulerpa*. *Marine Drugs* 7(4), pp. 689-704, 2009b.

SCHWEDE, J. G. CARDELLINA, J. H.; GRODE, H. S.; JAMES, 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.

SHEVCHENKO, N. M.; BURTSEVA, Y. V.; ZVYAGINTSEVA, T. N.; MAKAROVA, T. N.; SEERGEVA O, S.; ZAKHARENKO, A. M.; ISAKOV, V. V.; LINH, N. T.; HOA, N. X.; NY; LY, B. M.; HUYEN, P. V. Polysaccharides and sterols from green algae *Caulerpa lentilifera* e *C. sertularioides*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 45, n. 1, p. 1-5, 2009.

SCHROEDER, H. C.; BADRIA, F. A.; AYYAD, S. N.; BATEL, R.; WEINS, M.; HASSENEIN, H. M. A.; KURELEC, B.; MULLER, W. E. G. **Toxicology and Pharmacology**, v. 5, p. 119–126, 1998.

SU, J.-Y.; ZHU, Y.; ZENG, L.-M.; XU, X.-H., 1997. A New Bisindole from Alga *Caulerpaserrulata*, **Natural. Products Reports**, v. 60 (10), p. 1043 –1044, 1997.

TANAKA, K.; SAWANISHI, H. (1995): Asymmetric syntheses of all four isomers of 4-amino-4-carboxyproline: novel conformationally restricted glutamic acid analogs. **Tetrahedron: Asymmetry**, 6, 1641-1656.

TALAZ, O.; SARACOGLU, N. A study on the synthesis of structural analogs of bis-indole alkaloid caulerpin: a step-by-step synthesis of a cyclic indole-tetramer **Tetrahedron**, v. 66 (10), p. 1902 –1910, 2010.

TEIXEIRA, V. L. Produtos naturais de algas marinha bêntônicas, **Virtual Química**, v. 5 (3), p 343-362, 2012.

VANNIER-SANTOS, M. A.. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. **Cur.Pharm. Design.**, v. 8, n. 4, p. 297-318, 2002.

TOUHEY, S.; O'Connor, R.; Plunkett, S.; Maguire, A.; Clynes, M., 2002. Structure-activity relationship of indomethacin analogues for MRP-1, COX-1 and COX-2 inhibition: identification of novel chemotherapeutic drug resistance modulators. **Eur. J. Cancer**, 38, pp. 1661–1670.

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.

VIDOTTI, E. C.; ROMLLEMBERG, M. C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**, v. 27 (1), p. 139-145, 2004.

VILLAÇA, R.; PEDRINI, A.G.; PEREIRA, S.M.B. & FIGUEIREDO, M.A.O. 2006. Flora marinha bentônica das Ilhas Oceânicas brasileiras. Pp. 106-146. In: R.J.V. Alves & J.W.A. Castro (orgs.). **Ilhas Oceânicas brasileiras da pesquisa ao manejo**. Brasília, Ministério do Meio Ambiente/ Sociedade Brasileira de Ficologia.

WEISS, M. G. **Stigma and the social burden of neglected tropical diseases. PLoS Negl Trop Dis**, 2: e 237, 2008.

WILLS, B. A. Coagulation abnormalities in dengue hemorrhagic fever: Serial investigations in 167 Vietnamese children with dengue shock syndrome. **Clin Infect. Dis.** v, 35, p. 277-285, 2002.

WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; ARAÚJO, R. M.; SILVA, W. M. B.; PESSOA, O. D. L.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO L. V. Pro-apoptotic activity of lipidic α -amino acids isolated from *Protopallythoa variabilis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 7997-8004, 2010.

WYNNE, M. J. A Checklist of benthics marine algae of red prisms from *Caulerpa sertularioides*. **Huaxue Shijie**, v 20 (5), p 265-266, 1998.

WHO. World Health Organization. Global Health Observatory Data Repository: leishmaniasis. WHO, Geneva, Switzerland, 2014.

WHO. World Health Organization. **Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases**: Second WHO report on neglected tropical diseases. WHO, Geneva, Switzerland, 2013.

WHO. World Health Organization. **Control of leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis**. WHO, Geneva, Switzerland, 2010.

WHEELER, R. J.; GLUENS, E.; GULL, K. The cell cycle of Leishmania: morphogenetic events and their implications for parasite biology. **Molecular Microbiology**, v. 79, n.3, p. 647-62. Feb 2011.