

PRODUTOS NATURAIS DA ASCÍDIA *Botrylloides giganteum*, DAS ESPONJAS *Verongula gigantea*, *Ircinia felix*, *Cliona delitrix* E DO NUDIBRÂNQUIO *Tambja eliora*, DA COSTA DO BRASIL**Ana Claudia Granato, Jaíne H. H. L. de Oliveira, Mirna H. R. Selegim e Roberto G. S. Berlinck***

Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 780, 13560-970 São Carlos - SP

Mário L. Macedo e Antonio G. Ferreira

Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, CP 676, 13560-970 São Carlos - SP

Rosana M. da Rocha

Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, CP 19020, 81531-990 Curitiba - PR

Eduardo Hajdu

Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Quinta da Boa Vista, s/n, 20940-040 Rio de Janeiro - RJ

Solange Peixinho

Departamento de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador - BA

Claudia O. Pessoa, Manoel O. Moraes e Bruno C. Cavalcanti

Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza - CE

Recebido em 9/12/03; aceito em 9/8/04; publicado na web em 14/1/05

NATURAL PRODUCTS FROM THE ASCIDIAN *Botrylloides giganteum*, FROM THE SPONGES *Verongula gigantea*, *Ircinia felix*, *Cliona delitrix* AND FROM THE NUDIBRANCH *Tambja eliora*, FROM THE BRAZILIAN COASTLINE. Two new marine metabolites, 3Z, 6Z, 9Z-dodecatrien-1-ol (1) from the ascidian *Botrylloides giganteum* and 4H-pyran-2ol acetate from the sponge *Ircinia felix* (4) are herein reported. The known bromotyrosine compounds, 2-(3,5-dibromo-4-methoxyphenyl)-N,N,N-dimethylethanammonium (2) and 2,6-dibromo-4-(2-(trimethylammonium)ethyl)phenol (3), have been isolated from the sponge *Verongula gigantea*. Serotonin (5) is reported for the first time from the sponge *Cliona delitrix*, and tambjamins A (15) and D (16) isolated as their respective salts from the nudibranch *Tambja eliora*. Only tambjamine D presented cytotoxicity against CEM (IC₅₀ 12.2 µg/mL) and HL60 (IC₅₀ 13.2 µg/mL) human leukemia cells, MCF-7 breast cancer cells (IC₅₀ 13.2 µg/mL), colon HCT-8 cancer cells (IC₅₀ 10.1 µg/mL) and murine melanoma B16 cancer cells (IC₅₀ 6.7 µg/mL).

Keywords: marine sponge; nudibranch; ascidian.

INTRODUÇÃO

O estudo da biodiversidade em todas suas facetas é prioridade global, como reconhecido na Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento (UNCED – Rio de Janeiro, 1992). Devido à sua enorme biodiversidade o Brasil tem papel importante a desempenhar, e o levantamento dos recursos biológicos nas 200 milhas da Zona Econômica Exclusiva de nossa costa marítima insere-se de forma marcante neste contexto mais amplo. O levantamento de recursos brasileiros em espécies marinhas ainda é incipiente, levando-se em conta que outras nações aceleram seus programas em química e farmacologia de organismos marinhos, almejando a obtenção de patentes para moléculas de interesse farmacológico derivadas destes organismos.

A química de produtos naturais marinhos constitui um ramo da química de produtos naturais que atingiu excelência em pesquisa a partir dos anos 80. Atualmente, são conhecidas mais de 10.000 substâncias do metabolismo secundário de invertebrados e microorganismos marinhos, muito menor do que o número de substâncias isoladas a partir de plantas e microorganismos terrestres, cerca de 150.000 no total¹. A diversidade estrutural dessas substâncias, associada às suas atividades biológicas, tem atraído continuamente a atenção de diversos grupos de pesquisa do mundo inteiro². Todavia, no Brasil, a pesquisa em produtos naturais de origem marinha é ainda incipiente, apesar de ter sido iniciada há mais de 30 anos, segundo Kelecom^{3,4}.

Ao longo dos últimos anos, temos continuamente investigado o

metabolismo secundário de invertebrados e microorganismos marinhos, objetivando não somente o isolamento de produtos naturais biologicamente ativos, mas também estruturalmente inéditos ou taxonomicamente relevantes⁵⁻¹⁴, focalizando particularmente produtos naturais de esponjas e ascídias. Esses dois grupos de invertebrados têm sido continuamente explorados durante os últimos 25 anos, devido ao potencial de aplicação farmacológica de várias substâncias isoladas desses animais¹⁵. Um levantamento realizado por pesquisadores do “National Cancer Institute” indicou que, dentre as fontes naturais de substâncias anti-tumorais, os organismos marinhos são os que forneceram o maior número de extratos orgânicos com altas porcentagens de atividade anti-tumoral^{16,17}. Dentre as substâncias anti-tumorais oriundas de invertebrados marinhos hoje em avaliação clínica I e II, duas têm origem em esponjas, um de octocoral, um de briozoário, e três em ascídias¹⁸, o que demonstra o grande potencial destes animais na produção de substâncias bioativas.

Neste trabalho apresentamos a investigação química de diferentes invertebrados marinhos. Relatamos o isolamento de quatro produtos naturais inéditos na literatura: um álcool poliinsaturado a partir da ascídia *Botrylloides giganteum*, de dois compostos aromáticos biogeneticamente derivados da dibromotirosina, a partir da esponja *Verongula gigantea* e o isolamento de um derivado pirânico a partir da esponja *Ircinia felix*. Também relatamos pela primeira vez o isolamento da serotonina a partir da esponja *Cliona delitrix*. As tambjamins A e D foram aqui isoladas pela primeira vez na forma de sais, a partir do nudibrânquio *Tambja eliora*. Também são apresentados os resultados de testes de atividade citotóxica realizados com a tambjamina D, previamente desconhecidos.

*e-mail: rgsberlinck@iqsc.usp.br

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Investigação química da ascídia *Botrylloides giganteum*

O extrato metanólico da ascídia *Botrylloides giganteum* obtida no costão rochoso da Praia do Cabelo Gordo de Fora (São Sebastião, SP) apresentou atividade antibiótica moderada contra *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina, e foi submetido a uma série de separações cromatográficas (ver Parte Experimental). Obteve-se uma fração contendo o álcool 3Z, 6Z, 9Z-dodecatrien-1-ol (**1**), na forma de um sólido vítreo. Seu espectro de massas em modo FAB apresentou um pico de íon molecular $[M+H]^+$ em m/z 181. Uma medida de alta resolução neste sinal indicou a fórmula $C_{12}H_{20}O$ para **1** (medido para $C_{12}H_{21}O$: 181.15899, Δm -1.39 ppm), a qual apresenta índice de deficiência de hidrogênios (IDH, ou número de não-saturações) igual a três. A presença de três duplas ligações foi facilmente observada nos espectros de RMN ^{13}C (BBD) e HSQC de **1**, além de cinco grupos metileno e um grupo metila. A estereoquímica *Z* foi definida para as três duplas ligações presentes em **1**, de acordo com os deslocamentos químicos abaixo de δ 30,0 observados para os grupos metileno alílicos, bem como por comparação com dados da literatura¹⁹⁻²¹. A posição das duplas ligações foi estabelecida por análise dos espectros COSY 1H - 1H e HMBC. O grupo metilênico carbinólico em δ 3.69 mostrou estar adjacente ao grupo metileno em δ 2.30 e este, por sua vez, vizinho ao metino sp^2 em δ 5.35. Já o grupo metila em δ 0.93 mostrou estar acoplado com o metileno em δ 2.04, o qual por sua vez acopla com o metino sp^2 em δ 5.32. Acoplamentos 1H - 1H (COSY) e de longa distância 1H - ^{13}C (HMBC) observados entre os sinais dos metinos sp^2 e o multiplete em δ 2.78, atribuído a dois grupos metileno, forneceram a estrutura de **1** como sendo a do 3Z, 6Z, 9Z-dodecatrien-1-ol.

No melhor de nosso conhecimento, o álcool **1** é conhecido apenas como um produto de síntese^{19,20}, mas não como produto do metabolismo secundário. Se, por um lado, ascídias do gênero *Botrylloides* parecem ser tipicamente produtoras de compostos aromáticos biogeneticamente oriundos da tirosina²¹, sulfatos de alcanos e alenos, estruturalmente relacionados com **1**, foram previamente isolados de ascídias pertencentes às ordens Aplousobranchia (*Polycitor adriaticus*, *Aplidium conicum*), Phlebobranchia (*Ascidia mentula*, *Ascidia virginea*, *Phallusia mammilata*, *Phallusia fumigata*) e Stolidobranchia (*Botrylloides schlosseri*, *Halocynthia roretzi*, *Microcosmus vulgaris*)²²⁻²⁶. A ampla ocorrência destes compostos em animais da Classe Ascidiacea sugere que possam talvez apresentar algum tipo de função específica na biologia dos tunicados e, portanto, poderiam ser vistos como metabólitos primários. Todavia, a real função destes compostos ainda é desconhecida.

Investigação química da esponja *Verongula gigantea*

Esponjas pertencentes à ordem Verongida são tipicamente bioprodutoras de derivados da dibromotirosina¹². Espécimens de *Verongula gigantea* foram obtidos por dragagens ao longo da costa do estado de Espírito Santo, no âmbito do projeto REVIZEE. O material em etanol foi diretamente enviado ao Museu Nacional, onde foi catalogado. Parte do material coletado foi enviado para o Instituto de Química de São Carlos, onde foi separado do etanol de preservação, triturado em metanol, e os extratos etanólico e metanólico reunidos e evaporados. Depois de evaporado, o extrato hidroalcoólico foi submetido a uma série de partições. O extrato aquoso foi então submetido a uma série de separações cromatográficas, resultando na obtenção de duas frações contendo derivados fenólicos. A primeira fração mostrou ser um sólido vítreo, cujo espectro de massas em modo bombardeamento rápido de átomos (FAB) forneceu um sinal

tripleto de íon quase-molecular em m/z 350, 352 e 354, compatível com a fórmula $C_{12}H_{18}Br_2NO$, a qual foi confirmada com uma medida de massa exata (medido: 351,97401; calculado para $C_{12}H_{18}Br_2NO$: 351,97347), que indica um IDH de 4, sugerindo a presença de um anel aromático. Tal fato foi confirmado pela observação dos sinais de carbonos aromáticos no espectro de RMN- ^{13}C em δ 133,35, 117,30, 152,19 e 135,92. Considerando-se a observação de apenas 4 sinais de ^{13}C aromáticos e um único sinal de hidrogênio aromático em δ 7,71 (s, 2H) concluímos que o composto apresenta substituição simétrica no anel aromático. Além dos sinais de carbonos e hidrogênios aromáticos, a análise dos espectros de RMN- 1H , ^{13}C e HSQC indicou a presença de um grupo metoxila, dois grupos metileno e um grupo trimetilamônio. O grupo metoxila, em δ 3,78 (^{13}C 60,31) mostrou estar acoplado ao carbono aromático em δ 152,19. Já os hidrogênios do grupo trimetilamônio, em δ 3,14 (s, 9H; ^{13}C 52,23), apresentaram acoplamento à longa distância com o carbono do metileno em δ 3,56 (dd, 5,4 e 8,3 Hz; ^{13}C 65,07), o qual por sua vez mostrou estar acoplado ao outro grupo metileno em δ 3,01 (dd, 5,4 e 7,6 Hz; ^{13}C 26,88). Os hidrogênios deste último grupo metileno demonstraram apresentar acoplamento à longa distância com o carbono aromático quaternário em δ 135,92. Considerando-se a simetria molecular indicada pelos 4 sinais de carbonos aromáticos no espectro de RMN- ^{13}C e apenas 1 sinal de hidrogênio aromático no espectro de RMN- 1H , a estrutura deste composto foi estabelecida como sendo o 2-(3,5-dibromo-4-metoxifenil)-*N,N,N*-trimetiletanamônio **2**.

O composto aromático presente na segunda fração obtida a partir do fracionamento cromatográfico do extrato aquoso de *V. gigantea* também se apresentou como um sólido vítreo. Seu espectro de massas em modo FAB forneceu um sinal tripleto de íon molecular em m/z 336, 338 e 340, compatível com a fórmula $C_{11}H_{16}Br_2NO$, a qual foi confirmada com uma medida de massa exata (medido: 337,95813; calculado para $C_{11}H_{16}Br_2NO$: 337,95782). A análise de seus espectros de RMN- 1H , ^{13}C , HSQC e HMBC confirmou tal hipótese, indicando a estrutura do 2,6-dibromo-4-(2-(trimetilamônio)etilfenol) para **3** (ver Parte Experimental).

O composto **2** havia sido anteriormente isolado da esponja *Verongula* sp.²⁷, enquanto que o composto **3** foi previamente isolado da esponja *Aplysina fistularis*²⁸, ambas oriunda do Caribe.

Investigação química da esponja *Ircinia felix*

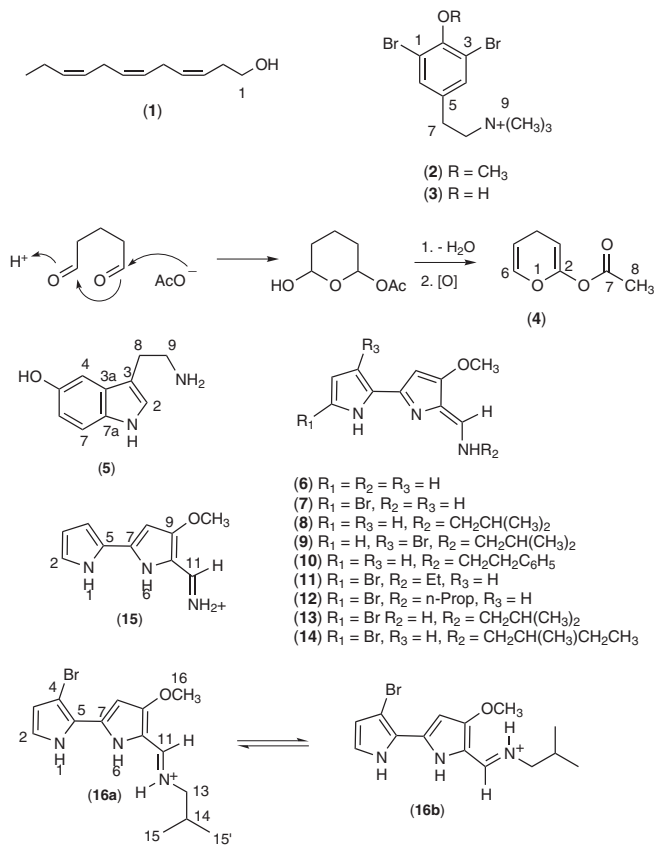
Esponjas do gênero *Ircinia* constituem um dos grupos mais estudados de poríferos, a partir dos quais foram isolados principalmente diversos sesterterpenos furânicos e quinonas polipreniladas^{2,29}. Em particular, extratos da esponja *Ircinia felix* apresentaram atividades antibiótica e ictiotóxica³⁰. Desta mesma esponja foram isolados diferentes ésteres de ácidos graxos de sesterterpenos furânicos derivados da variabilina e da strobilina³¹. Esponjas do gênero *Ircinia* apresentam um odor pronunciadamente desagradável, que se deve à presença de compostos sulfurados voláteis, para os quais foi postulada função de defesa química³². Todavia, estudos posteriores rejeitaram esta hipótese, tendo sido comprovada a função antipredatória de derivados de sesterterpenos presentes nestes animais^{33,34}. No presente estudo, o extrato metanólico de *I. felix* coletada na Baía de Todos os Santos (Salvador, BA) apresentou potente atividade antibiótica contra uma linhagem de *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina, isolada no Hospital Municipal de Piracicaba (SP), além de atividade moderada contra diversas outras linhagens resistentes e não resistentes de *S. aureus*, contra *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. O isolamento dos constituintes deste extrato foi dificultado devido à instabilidade dos mesmos em diferentes solventes e fases estacionárias. Após inúmeras tentativas para se isolar os compostos responsáveis pelas atividades antibióticas observadas, optou-se por acetilar uma das frações ativas.

A separação cromatográfica desta fração por HPLC em coluna de sílica-gel levou ao isolamento do acetato do 4*H*-piran-2-ol (4).

Isolado na forma de um sólido amorfo, o acetato do 4*H*-piran-2-ol apresentou um pico de íon molecular em *m/z* 81 em seu espectro de massas em modo impacto eletrônico, que corresponde ao íon [M-HOAc]⁺. A análise de seus espectros de RMN-¹H e RMN-¹³C (BBD e DEPT) indicou a presença de três metinos sp² em δ 5,45 (d, 7,5 Hz; ¹³C 76,0), 6,45 (dd, 6,4 e 7,6 Hz; ¹³C 86,3) e 8,07 (s; ¹³C 146,7), um metileno sp³ em δ 3,05 (ddd, 14,3, 7,5 e 7,6 Hz) e 2,65 (ddd, 14,3, 6,2 e 2,8 Hz; ¹³C 37,9), um grupo metila em δ 2,08 (s; ¹³C 20,8) e dois carbonos sp² quaternários em δ 159,6 e 172,4, este último atribuído ao sinal de um carbono de carbonila. Considerando-se o deslocamento químico dos carbonos metínicos e do carbono quaternário em δ 159,6, é evidente que o composto apresenta duas duplas ligações polarizadas, substituídas por um oxigênio. Conseqüentemente, a fórmula do composto pôde ser estabelecida como sendo C₇H₈O₃, com um IDH de 4, cujo espectro no ultravioleta apresentou absorção em λ_{max} 222 nm, e o espectro no infravermelho apresentou banda em ν_{max} 1741 cm⁻¹, tipicamente atribuída à banda de estiramento C=O de éster. A análise de seu espectro COSY ¹H-¹H indicou o acoplamento do grupo metino em δ 6,45 com o grupo metileno em δ 2,65 e 3,05, o qual por sua vez mostrou estar acoplado com o metino em 5,45. A análise do espectro HMBC indicou acoplamentos do metino em δ 8,07 com o carbono sp² quaternário em δ 159,6, do metino em δ 6,45 com o carbono do metino sp² em δ 146,7 e dos hidrogênios do metileno em δ 2,65 e 3,05 com os carbonos dos metinos em δ 86,3 e 76,0. Além disso, observou-se o acoplamento à longa distância dos hidrogênios da metila em δ 2,08 com o carbono da carbonila em δ 172,4. Levando-se em conta a análise dos dados espectroscópicos obtidos, fica claro que a estrutura deste composto corresponde à do acetato do 4*H*-piran-2-ol (4). Pelo fato deste ter sido obtido a partir de uma fração acetilada proveniente do fracionamento cromatográfico do extrato bruto de *I. felix*, acreditamos que 4 deve ser um artefato de isolamento, oriundo possivelmente da ciclização do pentanodial *via* ataque nucleofílico de um ânion acetato, cujo intermediário sofre desidratação e oxidação originando 4 (Esquema 1). No melhor de nosso conhecimento, tanto 4 quanto o pentanodial não apresentam precedência na literatura de produtos naturais de organismos marinhos.

Investigação química da esponja *Cliona delitrix*

Espojas do gênero *Cliona* são tipicamente produtoras de di-, tri-, tetra- e pentapeptídeos modificados contendo resíduos de aminoácidos aromáticos, tais como 6-bromotriptofano e DOPA³⁵, 6-bromotriptofano condensado com 1,2-dideidrotriptamina, 2,3-dideidroDOPA e leucina³⁵, bem como outras variantes de resíduos modificados de tirosina condensados com outros aminoácidos³⁵. O extrato metanólico da esponja *Cliona delitrix* oriunda da Baía de Todos os Santos apresentou atividade antimitótica contra linhagens de células MCF-7 (câncer de mama). O fracionamento deste extrato bruto por cromatografia em coluna de fase reversa (gradiente de MeOH em H₂O) e em coluna de Sephadex LH-20 (MeOH) resultou no isolamento da serotonina (5-hidroxitriptofano, 5) como o único composto majoritário presente no extrato bruto. A identificação foi realizada pela análise de seus espectros de massas de alta resolução em modo FAB, RMN ¹H, ¹³C, COSY ¹H-¹H, HSQC, HMBC, infravermelho e ultravioleta, bem como por comparação com dados da literatura³⁶. A serotonina, um neurotransmissor, foi previamente isolada da holotúria *Pentacter crassa*³⁷ e mais recentemente a partir da esponja *Hyrtilos reticulatus*³⁶. Recentemente foi atribuída potente atividade anti-oxidante e anti-apoptótica ao L-5-hidroxitriptofano isolado da esponja *Hymeniacidon heliophila*³⁸, o precursor biossintético da serotonina. Ainda não pudemos verificar se a ativi-



Esquema 1

dade antimitótica observada para o extrato bruto de *C. delitrix* deve-se ou não à presença de 5.

Investigação química do nudibrânquio *Tambja eliora*

Moluscos nudibrânquios (Classe Gastropoda, Subclasse Opisthobranchia) são tipicamente considerados predadores de esponjas, ascídias, briozoários, octocorais, algas e outros moluscos³⁹, a partir dos quais adquirem os mais diversos produtos naturais. Além disso, demonstrou-se que várias espécies de nudibrânquios possuem a capacidade de biossintetizar produtos naturais *de novo*⁴⁰. Dentre os poucos alcalóides (menos de 30) isolados de nudibrânquios, as tambjamins constituem uma classe particular de derivados bis-pirrolícos originalmente isolados de *Tambja abdere*, *T. eliora* e *Roboastra tigris*, sendo esta última uma espécie carnívora que se alimenta das duas espécies precedentes. Tanto *T. abdere* quanto *T. eliora* alimentam-se exclusivamente do briozoário *Sessibugula translucens*⁴¹. A primeira investigação química de *T. eliora*, *T. abdere* e *R. tigris* levou ao isolamento das tambjamins A – D (6) – (9)⁴², para os quais não foram atribuídos os sinais de ¹H nem de ¹³C. Apenas subsequentemente realizou-se a atribuição dos sinais de ¹H e ¹³C para a tambjamina A e C, tendo sido também isoladas as tambjamins E (10) e F (11) a partir da ascídia *Atapazoa* sp. e de nudibrânquios do gênero *Nembrotha*⁴³. As tambjamins G – J (12) – (15) foram posteriormente isoladas do briozoário *Bugula dentata*⁴⁴. Quando as tambjamins A – D são secretadas por *T. abdere*, inibem o ataque predatório de *R. tigris*⁴⁵. Todavia, pelo fato da concentração da mistura de tambjamins em *T. eliora* ser muito menor, não promovem defesa contra a predação por parte de *R. tigris*. *Roboastra tigris* por sua vez segue a trilha de ambos *T. eliora* e *T. abdere*, que contém menores concentrações das tambjamins⁴⁵. Já no caso da ascídia

Atapazoa sp. e de nudibrânquios do gênero *Nembrotha*, as tambjamins exercem função de defesa contra a predação por parte de peixes carnívoros⁴³. A tambjamina E (**10**) também atua como agente intercalante de DNA do timo⁴⁶.

No presente trabalho, 9 indivíduos do nudibrânquio *T. eliora* foram encontrados na Laje da Serraria, face oceânica da Ilha de São Sebastião (Ilhabela) em maio de 2002. Os animais foram extraídos com acetona e metanol em ultrassom, os extratos foram reunidos, evaporados e separados por uma série de cromatografias em coluna de sílica-gel Waters Sep-Pak (10 g), fornecendo a tambjamina A e a tambjamina D em suas formas protonadas (**15**) e (**16**), respectivamente. A protonação de ambos alcalóides pôde ser observada em seus respectivos espectros de RMN ¹H, os quais apresentaram dados discordantes com aqueles apresentados para os mesmos compostos isolados na forma de base livre⁴². A tambjamina A protonada (**15**) apresentou sinais de quatro hidrogênios ativos em δ 11,84 (sl), 12,87 (sl), 9,73 (d, 16 Hz) e 9,38 (d, 6,4 Hz). O primeiro apresentou correlações à longa distância com os carbonos em δ 111,7 (C-3) e 110,1 (C-5), e pôde ser atribuído a NH-1. O segundo hidrogênio ativo apresentou correlações à longa distância com os carbonos em δ 92,1 (C-8), 110,1 (C-5), 141,18 (C-7) e 163,7 (C-9), sendo atribuído a NH-6. Os dois últimos hidrogênios ativos foram atribuídos ao grupo imínio, sendo que aquele que apresenta maior deslocamento químico (δ 9,73) está em relação *trans* com o hidrogênio vinílico H-11 em δ 7,82 (dd, 8,7 e 16,2 Hz). De maneira a confirmar a hipótese estrutural proposta para a tambjamina A protonada (**15**), decidimos obter seu espectro de correlação direta HMQC ¹H-¹⁵N. Neste, observa-se NH-1 (δ 11,84) acoplado com o nitrogênio em δ 154,0, NH-6 (δ 12,87) acoplado com o nitrogênio em δ 137,5, e o par NH₂-12 (δ 9,73 e 9,38) acoplado com o nitrogênio em δ 123,0. Pelo fato do par de hidrogênios do grupo NH₂ da tambjamina A apresentar acoplamento com o hidrogênio vinílico em δ 7,82, indicamos que a forma protonada da tambjamina A apresenta a estrutura indicada (**15**).

No caso da tambjamina D, observamos a presença de três hidrogênios ativos em δ 13,6 (sl), 11,0 (sl) e 9,65 (dtl, 6,5 e 13,0 Hz). O primeiro apresenta acoplamento à longa distância com os carbonos em δ 92,8 (C-8), 110,7 (C-10), 120,5 (C-5), 140,6 (C-7) e 164,1 (C-9), e foi atribuído ao hidrogênio ativo NH-6. O segundo, em δ 10,96, apresentou acoplamentos com os carbonos em δ 101,9 (C-4), 114,7 (C-3) e 120,5 (C-5), e foi atribuído a NH-1. Por fim, o hidrogênio ativo em δ 9,6 apresentou somente um acoplamento à longa distância com o carbono em δ 110,7 (C-10), e foi atribuído ao grupo NH-12. Foram igualmente obtidos espectros de correlação direta HMQC ¹H-¹⁵N, bem como de correlação à longa distância HMBC ¹H-¹⁵N, onde se estabeleceu o deslocamento químico dos nitrogênios N-1 (δ 152,0), N-6 (δ 142,0) e N-12 (δ 133,0). Como o hidrogênio NH-12 apresenta constante de acoplamento de 13,0 Hz com o hidrogênio vinílico em δ 7,4 (d, 15,1 Hz), a dupla ligação apresenta geometria *E*, determinando a estrutura da tambjamina D como sendo (**16**). De maneira a verificar uma possível conformação preferencial da tambjamina D entre as estruturas (**16a**) e (**16b**), foram realizados experimentos de irradiação por Efeito Nuclear Overhauser nas frequências de ressonância dos hidrogênios NH-6, CH₃-17, CH-11 e NH-12. Os resultados indicaram que não existe uma conformação preferencial da tambjamina D em solução de DMSO-*d*₆. A irradiação do sinal de CH₃-16 provoca efeito NOE em H-11, que sofre também efeito NOE quando o sinal de NH-6 é irradiado. A irradiação do sinal de NH-12 não provoca efeito NOE em nenhum hidrogênio além de CH₂-13. Sendo assim, concluímos que a tambjamina D apresenta um equilíbrio conformacional entre as formas (**16a**) e (**16b**) em solução. Como mencionado acima, os dados de RMN ¹H das tambjamins isoladas neste trabalho apresentam discordância com os dados publicados na literatura⁴². Além disso, o trabalho original⁴²

não apresenta dados de RMN ¹³C, os quais aqui foram atribuídos sem ambigüidades.

Enquanto que a tambjamina A não apresentou qualquer atividade biológica em bioensaios de atividade antibacteriana, antifúngica, antimicobacteriana e citotóxica, a tambjamina D apresentou atividade citotóxica contra células tumorais humanas leucêmicas CEM (IC₅₀ 12,2 µg/mL) e HL60 (IC₅₀ 13,2 µg/mL), de mama MCF-7 (IC₅₀ 13,2 µg/mL), de cólon HCT-8 (IC₅₀ 10,1 µg/mL) e de melanoma murino B16 (IC₅₀ 6,7 µg/mL). No trabalho de isolamento original⁴², as tambjamins A e C apresentaram atividade antibacteriana contra *E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis* e *Vibrio anguillarum* em concentrações de 50 µg/disco. Já as tambjamins B e D apresentaram atividade antibacteriana contra *B. subtilis*, *S. aureus*, *V. anguillarum* e antifúngica contra *Candida albicans* em concentrações de 5 µg/disco. Todas as tambjamins originalmente obtidas de *T. eliora*, *T. abdere* e *R. tigris* também inibiram a divisão celular de ovos fecundados de ouriço-do-mar em concentrações de 1 µg/mL, um bioensaio bastante utilizado no passado para se detectar atividade citotóxica⁴⁷.

CONCLUSÃO

O presente trabalho apresenta o isolamento de um novo álcool poliinsaturado da ascídia *B. giganteum*, de dois novos derivados aromáticos biogeneticamente oriundos da dibromotirosina a partir da esponja *V. gigantea*, de um novo derivado do pirano a partir da esponja *I. felix*, da serotonina a partir da esponja *C. delitrix* e de dois alcalóides bis-pirrolícos a partir do nudibrânquio *T. eliora*. Além disso, observamos atividade citotóxica para a tambjamina D contra cinco tipos de células tumorais humanas, atividade anteriormente não reportada para este alcalóide. Embora de natureza estrutural simples, os produtos naturais isolados neste trabalho pertencem a classes estruturais relacionadas com metabólitos secundários típicos de cada grupo taxonômico investigado.

PARTE EXPERIMENTAL

Generalidades

Os espectros no infravermelho foram obtidos em um aparelho FT-IR Bomem MB102 em pastilha de sílica. Os espectros no ultravioleta foram obtidos em MeOH, em um aparelho Hitachi U-3210. Os espectros de RMN foram obtidos em DMSO-*d*₆, MeOH-*d*₄, ACN-*d*₃ ou CDCl₃, a 25 °C utilizando TMS como padrão interno, nos seguintes aparelhos: Bruker AC-4.7 Tesla, operando em 200.1 MHz (¹H) e 50.3 MHz (¹³C); Bruker ARX 9.4 Tesla operando em 400.35 MHz (¹H) e 100.10 MHz (¹³C); Bruker DRX500 11,7 tesla operando em 500,13 MHz (¹H) e 125,76 MHz (¹³C) equipado com sonda multinuclear com gradiente de campo no eixo Z. Os espectros de massas foram obtidos com dois equipamentos: a) espectrômetro de massas VG-7070 operando a uma voltagem de aceleração nominal de 70 eV, no qual espectros obtidos por EI, FAB ou CI foram calibrados com perfluoroquerosene, álcool 3-nitrobenzílico ou polietilenoglicol; b) equipamento Hybrid Kratos Concept IHHQ, em modo FAB. Os solventes utilizados para a extração e cromatografia em coluna de baixa pressão "flash" são de grau analítico, sem purificação posterior. Solventes de grau cromatográfico (HPLC) e água MilliQ foram utilizados em separações por cromatografia líquida, utilizando um equipamento Waters de bomba quaternária 600, detector de duplo feixe UV 2487 e processador-registrador 746. Vouchers da espécie de esponjas coletadas foram depositados na coleção de poríferos do Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

Bioensaios

As substâncias puras **1**, **2**, **3**, **4**, **15** e **16** foram submetidas a testes de atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Enterobacter* sp. e *Pseudomonas aeruginosa*, bem como aos testes de atividade citotóxica contra linhagens de células leucêmicas CEM e HL60, de mama MCF-7, de cólon HCT-8 e de melanoma murino B16, de acordo com procedimentos descritos anteriormente¹³. No caso dos testes de atividade antimicrobiana, nenhuma substância apresentou atividade em concentração menor de 500 µg/disco e halo de inibição maior de 5 mm sendo, portanto, consideradas inativas. No caso dos testes de atividade citotóxica, somente a substância **16** apresentou atividade em concentração menor de 50 µg/mL para cada linhagem de célula tumoral testada.

Teste de atividade anti-tuberculose contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

A atividade antimicrobiana das substâncias puras **1**, **2**, **3**, **4**, **15** e **16** foi testada contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294, utilizando-se a técnica de microplaca com indicador de azul de Alamar⁴⁹. Neste procedimento, *M. tuberculosis* H37Rv cresce em meio Loweinstein-Jensen mantido a 37 °C, em uma concentração ajustada à densidade celular correspondente a 1x10⁷ células/mL. O meio celular é diluído de 1:25 em meio Middlebrook 7H9. Soluções estoque das substâncias foram diluídas em DMSO em concentrações variando de 1000 a 80 µg/mL, e estas soluções foram esterilizadas por filtração através de filtro PTFE de 0,22 µm (Millex-FG, Millipore) antes de serem diluídas de um fator 1:10 no meio Middlebrook 7H9, e mantidas a -80 °C até serem utilizadas. Foram feitas diluições seriadas em meio Middlebrook 7H9 a partir da solução 1:10 em microplacas de 96 orifícios, obtendo-se 100 µL em cada orifício. A concentração máxima de DMSO na solução de teste foi de, no máximo, 2,5%. O meio de crescimento contendo *M. tuberculosis* H37Rv foi adicionado em cada orifício das microplacas, e estas foram incubadas a 37 °C em câmara umidificada durante 6 dias. Foram feitos controles com meio contendo apenas *M. tuberculosis*, apenas o meio de incubação e outro, contendo apenas as soluções com as substâncias. Após 6 dias, foram adicionados 25 µL de uma mistura 1:1 (v/v) de reagente azul de Alamar e 10% Tween 80, e as placas foram re-incubadas a 37 °C. Após 24 h, foi observada mudança da coloração de azul para cor-de-rosa nos orifícios onde houve crescimento de *M. tuberculosis*. A concentração de inibição mínima para o crescimento de *M. tuberculosis* foi determinada visualmente como sendo a menor concentração necessária para a conversão da coloração de azul para rosa. Utilizou-se rifampicina como referência. Nenhuma das substâncias testadas apresentou atividade inibitória menor de 1 mg/mL, sendo assim consideradas inativas.

Estudo químico da ascídia *Botrylloides giganteum*

Espécimens de *Botrylloides giganteum* foram coletados por mergulho livre no costão da Praia do Cabelo Gordo de Fora, próximo ao Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo, durante o verão de 1997. Os animais coletados foram imediatamente imersos em EtOH absoluto e mantidos a -20 °C. Um espécimen voucher (STY30) foi depositado na coleção de ascídias do Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. O animal (360 g, massa líquida) foi separado do EtOH de estocagem (500 mL) e triturado em MeOH (1 L). Ambos extratos foram reunidos, filtrados e evaporados até um volume final de 400 mL. A suspensão hidroalcoólica foi particionada com hexano. A fração polar foi evaporada até a secura, dissolvida em H₂O (300 mL) e

particionada com AcOEt. (3 x 200 mL). A fração AcOEt (6,5 g) foi submetida a uma cromatografia em modo “flash” em uma coluna de fase reversa C₁₈ Waters Sep-Pak (10 g) com um gradiente de MeOH em H₂O. A fração eluída com 7:3 H₂O-MeOH foi posteriormente fracionada por cromatografia em Sephadex LH-20 (MeOH) fornecendo 5 frações. A análise por RMN ¹H das frações obtidas indicou a presença de compostos poliinsaturados na terceira fração. Esta foi purificada por duas etapas cromatográficas sucessivas utilizando colunas de fase reversa C₁₈ Whatman Partisil 10 ODS-3 com 1:1 MeOH-H₂O e Waters µBondapak C₁₈ com 1:1 MeOH-H₂O, fornecendo 7,9 mg (0,0022%) de 3Z, 6Z, 9Z-dodecatrien-1-ol.

3Z, 6Z, 9Z-Dodecatrien-1-ol (1)

Sólido vítreo. HRFABMS: *m/z* 181.15899; UV (MeOH) λ_{max} (ε): 274 (100); IV (filme líquido): 3246, 2920, 2851, 1656, 1610, 1585, 1567, 1460, 1406, 1218, 1175, 1108 cm⁻¹. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz): 3,69 (t, 7,0; CH₂-1); 2,30 (m; CH₂-2); 5,35 (m; CH-3); ; 5,34 (m; CH-4); 2,78 (m; CH₂-5); 5,30 (m; CH-6); 5,28 (m; CH-7); 2,78 (m; CH₂-8); 5,32 (m; CH-9); 5,32 (m; CH-10); 2,04 (dd, 7,0 e 7,3; H₃C-11); 0,93 (t, 7,5; H₃C-12); RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100,1 MHz): 64,9 (CH₂-1); 27,2 (CH₂-2); 126,0 (CH-3); 129,1 (CH-4); 25,2 (CH₂-5); 127,9 (CH-6); 127,6 (CH-7); 25,0 (CH₂-8); 126,8 (CH-9); 131,4 (CH-10); 19,9 (CH₂-11); 14,0 (CH₃-12).

Estudo químico da esponja *Verongula gigantea*

A esponja *V. gigantea*, coletada por dragagens ao longo da costa do estado de Espírito Santo e preservada em etanol (voucher MNRJ 4734 do Museu Nacional, UFRJ) (205,8 g), foi filtrada e triturada em liquidificador com metanol. Ambos extratos MeOH e EtOH foram reunidos e evaporados até se obter uma suspensão aquosa. Em seguida, realizou-se uma partição da fase aquosa com acetato de etila. O extrato aquoso submetido a uma cromatografia em uma coluna de fase reversa C₁₈ Sep-Pak (10 g) com um gradiente de MeOH em H₂O. Foram obtidas 3 frações desta separação. A primeira fração obtida, VG.AQ.1, foi submetida a uma cromatografia em Sephadex LH-20 (MeOH). Desta separação foram obtidas 4 frações. Destas, a terceira (VG.AQ.1-C) foi submetida a uma cromatografia em baixa pressão, utilizando-se uma coluna de fase reversa C₁₈ Lichroprep RP-18 Lobar[®] (gradiente de MeOH em H₂O). Foram obtidas 6 frações, sendo a fração VG.AQ.1-C.4 constituída pelo 2-(3,5-dibromo-4-metoxifenil)-*N,N,N*-trimetiletanamônio (**2**) (21,9 mg, 0,01%). A fração VG.AQ.1-C.3 foi purificada por uma cromatografia em coluna de fase reversa C₁₈ Sep-Pak (2 g) com um gradiente de MeOH em H₂O, obtendo-se o 2,6-dibromo-4-(2-(trimetilamônio)etilfenol) (**3**) (29,2 mg, 0,014%).

2-(3,5-dibromo-4-metoxifenil)-*N,N,N*-trimetiletanamônio (2)

Sólido vítreo. HRFABMS: *m/z* 351.97401. UV (MeOH) λ_{max} (ε): 282 nm (1.500); IV (filme líquido): 3401, 3022, 2928, 2359 (CO₂), 1632, 1545, 1472, 1422, 1260, 1207, 991, 922, 871, 739 cm⁻¹. RMN-¹H (DMSO-*d*₆, 200 MHz): 7,71 (s, 2H, CH-4 e 6); 3,78 (s, 3H, CH₃-10); 3,56 (dd, 5,4 e 8,3 Hz, 2H, CH₂-8); 3,14 (s, 9H, (CH₃)₃-9); 3,01 (dd, 5,4 e 7,6 Hz, 2H, CH₂-7);. RMN-¹³C (DMSO-*d*₆, 50 MHz): 152,19 (C-3); 133,35 (CH-1 e 5); 117,30 (C-2 e 4); 135,92 (C-6); 65,07 (CH₂-8); 60,31 (CH₃-10); 52,23 ((CH₃)₃-9); 26,88 (CH₂-7).

2,6-dibromo-4-(2-(trimetilamônio)etilfenol) (3)

Sólido vítreo. HRFABMS: *m/z* 337.95813; UV (MeOH) λ_{max} (ε): 282 nm (1.350); IV (filme líquido): 3330, 3015, 2938, 1680, 1635, 1550, 1478, 1411, 1322, 1264, 1237, 1177, 1036, 874, 736, 648 cm⁻¹; RMN-¹H (MeOH-*d*₄, 400 MHz): 7,50 (s, 2H, CH-3 e 5); 3,53 (dt, 7,4 e 8,5 Hz; 2H, CH₂-7); 3,20 (s, 9H, (CH₃)₃-9); 3,04 (dt, 7,1 e 8,9 Hz; 2H, CH₂-8);. RMN-¹³C (MeOH-*d*₄, 50 MHz): 150,5 (C-1); 132,86

(CH-3 e 5); 112,35 (C-2 e 6); 129,92 (C-4); 65,74 (CH₂-8); 52,51 ((CH₃)₃-9); 26,92 (CH₂-7).

Estudo da esponja *Ircinia felix*

A esponja preservada em etanol (1200 g, voucher MNRJ 2550 do Museu Nacional, UFRJ) foi separada do solvente e triturada em liquidificador com metanol. Ambos extratos alcoólicos foram reunidos, evaporados até se obter uma suspensão aquosa. A fração aquosa foi particionada com CH₂Cl₂, obtendo-se assim o extrato diclorometano (2,13 g) e o extrato aquoso, que foi descartado. O extrato CH₂Cl₂ foi aplicado em uma coluna de sílica-gel (70-230 Mesh). A cromatografia foi realizada no modo "flash" com gradiente de acetato de etila em hexano, tendo sido obtidas 6 frações. A quinta fração foi separada em uma coluna de fase reversa C₁₈ Waters Sep-Pak (10 g), utilizando-se um gradiente de MeOH em H₂O, como eluente. Foram obtidas 4 frações. Destas, a primeira foi acetilada com 1 mL de anidrido acético e 1 mL de piridina, sob agitação durante 12 h. Após a acetilação, a amostra foi evaporada e purificada por cromatografia em coluna de sílica gel 230-400 Mesh, em modo "flash" com um gradiente de MeOH em CH₂Cl₂ e, em seguida, por HPLC utilizando-se uma coluna Waters μ -Porasil (sílica gel) com uma mistura i-PrOH/MeOH/ACN 15:80:5 e a separação foi monitorada em 254 nm, obtendo-se o acetato de 4H-piran-2-ol (**4**) (5,8 mg, 0,0004%).

Acetato de 4H-piran-2-ol (**4**)

EIMS: *m/z* 81 [M-HOAc]⁺; UV (MeOH) λ_{\max} (ϵ): 222 (1200); IV (filme líquido): 2928, 2850, 1741, 1370, 1235, 1059 cm⁻¹. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 400 MHz): 8,07 (s, CH-6); 6,45 (dd, 6,4 e 7,6 Hz, CH-5); 5,45 (d, 7,5 Hz, CH-3); 3,05 (ddd, 14,3, 7,5 e 7,6 Hz, CH₂-4); 2,65 (ddd, 2,8, 6,2 e 14,3 Hz, CH₂-4'); 2,08 (s, CH₃-8). RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 500 MHz): 172,4 (C-7); 159,6 (C-2); 146,8 (CH-6); 86,3 (CH-5); 75,98 (CH-3); 37,92 (CH₂-4); 20,82 (CH₃-8).

Estudo químico da esponja *Cliona delitrix*

A esponja (voucher MNRJ 2551 do Museu Nacional, UFRJ) congelada (200,6 g) foi liofilizada e mantida em MeOH (1L) por uma noite. Após a filtração do material sólido, repetiu-se esse processo 6 vezes. Em seguida, o extrato foi concentrado e realizou-se uma partição com hexano, obtendo-se assim dois extratos: hexânico (1,2609 g) e MeOH (1,8072 g). O extrato MeOH foi separado por cromatografia em coluna de fase reversa C₁₈ Waters Sep-Pak (10 g), utilizando-se como eluente um gradiente de metanol em água. Foram obtidas cinco frações. A segunda fração foi purificada por cromatografia em coluna de permeação em gel Sephadex LH-20 (MeOH), fornecendo a serotonina (26,5 mg, 0,013%). A identificação da serotonina foi feita por comparação com dados da literatura³⁶.

Estudo químico do nudibrânquio *Tambja eliora*

Nove indivíduos do nudibrânquio *T. eliora* foram coletados em abril-maio de 2002, na Laje da Serraria, face oceânica da Ilha de São Sebastião, e preservados em água do mar, na qual foram congelados. Uma fotografia dos animais coletados pode ser solicitada ao autor principal. Após seu descongelamento, a água na qual foram preservados foi extraída com CH₂Cl₂/AcOEt 1:1. Os nove indivíduos foram extraídos com CH₂Cl₂/acetona 1:1 (extrato A), CH₂Cl₂/MeOH 1:1 (extrato B), e com MeOH 100% (extrato C) sob ultrassom. Após comparação por CCD (CH₂Cl₂/MeOH 9:1), reuniu-se os extratos A e B. O extrato C (448 mg) foi submetido à cromatografia em coluna de sílica-gel derivatizada com grupos cianopropila Waters Sep-Pak (10 g), com um gradiente de acetona em hexano, seguido de um gradiente de acetona

em CH₂Cl₂, outro gradiente de MeOH em CH₂Cl₂ e MeOH 100%. A quarta fração proveniente desta separação (13,5 mg) foi submetida a uma cromatografia em coluna de sílica-gel Waters Sep-Pak (2 g), com um gradiente de acetona e MeOH 9:1 em CH₂Cl₂, em seguida acetona/MeOH 9:1, 1:1 e MeOH 100%. Obteve-se assim 7,0 mg da tambjamina A. Os extratos A e B reunidos foram submetidos a uma cromatografia em coluna de sílica-gel derivatizada com grupos cianopropila Waters Sep-Pak (10 g), utilizando-se o mesmo gradiente utilizado na separação do extrato C. A segunda e terceira frações desta separação foram submetidas a uma série de fracionamentos por cromatografia em coluna de sílica-gel Waters Sep-Pak (2 g), resultando na obtenção da forma protonada da tambjamina A (12 mg) e da tambjamina D (20 mg).

Tambjamina A (**15**)

Sólido vítreo verde escuro. UV (MeOH) λ_{\max} (ϵ): 255 (2400), 275 (1700), 330 (1650), 400 (6100); IV (filme líquido): 3205, 3126, 2925, 2850, 1675, 1595, 1537, 1456, 1313, 733 cm⁻¹. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 500 MHz): 12,87 (sl, NH-6), 11,84 (sl, NH-1), 9,73 (d, 16 Hz, NH-12a), 9,38 (d, 6,4 Hz, NH-12b), 7,82 (dd, 8,7 e 16 Hz, H-11), 7,14 (dd, 2,6 e 4 Hz, H-4), 7,07 (m, H-2), 6,5 (d, 2,2 Hz, H-8), 6,28 (dt, 2,3 e 3,6 Hz, H-3), 3,69 (s, CH₃-13); RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 125 MHz): 163,76 (C-9), 141,76 (C-11), 141,18 (C-7), 124,08 (C-4), 121,77 (C-10), 111,66 (C-2), 110,53 (C-3), 110,1 (C-5), 92,11 (C-8), 58,97 (C-13).

Tambjamina D (**16**)

Sólido vítreo verde escuro. HRFABMS: *m/z* 324,07048 e *m/z* 326,06889; UV (MeOH) λ_{\max} (ϵ): 257 (2350), 280 (1770), 345 (1800), 390 (5950); IV (filme líquido): 3446, 3223, 2960, 1661, 1601, 1520, 1460, 1362, 1302, 1237, 1161, 1009, 886, 782, 742 cm⁻¹. RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 500 MHz): 13,6 sl, H-6), 11,0 (sl, H-1), 9,65 (dt, 6,7 e 15 Hz), 7,40 (d, 15 Hz, H-11), 7,00 (t, 3 Hz, H-2), 6,61 (d, 2,4 Hz, H-8), 6,33 (t, 2,7 Hz, H-3), 3,95 (s, CH₃-16), 3,35 (t, 6,5 Hz, H-13), 2,05 (sept, 6,7 Hz, H-14), 1,03 (d, 6,7 Hz, CH₃-15 e 15'); RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 100 MHz): 164,10 (C-9), 142,09 (C-11), 140,64 (C-7), 124,05 (C-2), 120,55 (C-5), 114,72 (C-3), 110,75 (C-10), 101,95 (C-4), 92,80 (C-8), 59,27 (C-13), 58,97 (C-16), 29,89 (C-14), 20,23 (C-15 e 15').

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a gentileza dos Profs. B. Copp (University of Auckland, Auckland, Nova Zelândia), R. J. Andersen e Dr. D. E. Williams (University of British Columbia, Vancouver, Canadá) pela ajuda na obtenção dos espectros de massas de baixa e alta resolução, bem como à Profa. G. G. F. do Nascimento (Faculdade de Ciências da Saúde, UNIMEP, Piracaba) e A. O. de Souza (Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP), pela realização dos bioensaios de atividade antimicrobiana e antimicrobacteriana, respectivamente. Os autores também são gratos aos Profs. M. da G. B. S. Moreira, J. C. Freitas e E. Trajano, diretores do Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo (CEBIMar-USP), pelas muitas facilidades oferecidas durante as coletas de invertebrados da região de São Sebastião. Agradecemos também ao Dr. L. R. Simone e seu aluno de doutorado C. M., pela identificação do nudibrânquio *Tambja eliora*. O apoio financeiro para a realização deste trabalho foi concedido pela American Society of Pharmacognosy Foundation (1998 Research Starter Grant) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (96/04316-5 e 01/03095-5) a R. G. S. Berlinck. A. C. Granato e J. H. H. L. de Oliveira agradecem à FAPESP pelas bolsas de estudos concedidas. R. G. S. Berlinck também agradece à USP pela concessão do contrato PROCONTES à M. H. R. Selegim. R. G. S. Berlinck, E.

Hajdu, R. M. Rocha e A. G. Ferreira também agradecem ao CNPq pelas bolsas de produtividade em pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Gräfe, U. Em *Drug Discovery from Nature*; Springer, Berlin, 2001, p. 117-124.
2. Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R.; *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 1.
3. Kelecom, A.; *Ciência e Cultura* **1997**, *49*, 321.
4. Kelecom, A.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1998**, *9*, 101.
5. Roberge, M.; Berlinck, R. G. S.; Xu, L.; Anderson, H.; Lim, L. Y.; Curman, D.; Stringer, C. M.; Friend, S. H.; Davies, P.; Vincent, I.; Haggarty, S. J.; Kelly, M. T.; Britton, R.; Piers, E.; Andersen, R. J.; *Cancer Res.* **1998**, *58*, 5701.
6. Berlinck, R. G. S.; Britton, R.; Piers, E.; Lim, L.; Roberge, M.; Rocha, R. M.; Andersen, R. J.; *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9850.
7. Lindsay, B.; Almeida, A. M. P.; Smith, C.; Rocha, R. M.; Berlinck, R. G. S.; Ireland, C. M.; *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1573.
8. Hernandez, I. L. C.; Godinho, M. J. L.; Magalhães, A.; Schefer, A. B.; Ferreira, A. G.; Berlinck, R. G. S.; *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 664.
9. Torres, Y.R.; Berlinck, R. G. S.; Magalhães, A.; Schefer, A. B.; Ferreira, A. G.; Hajdu, E.; Muricy, G.; *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1098.
10. Granato, A. C.; Berlinck, R. G. S.; Schefer, A. B.; Magalhães, A.; Ferreira, A. G.; de Sanctis, B.; Freitas, J. C.; Migotto, A. E.; Hajdu, E.; *Quim. Nova* **2000**, *23*, 594.
11. Britton, R.; de Oliveira, J. H. H. L.; Andersen, R. J.; Berlinck, R. G. S.; *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 254.
12. Saeki, B. M.; Granato, A. C.; Berlinck, R. G. S.; Magalhães, A.; Schefer, A. B.; Ferreira, A. G.; Pinheiro, U. G.; Hajdu, E.; *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 796.
13. Torres, Y. R.; Berlinck, R. G. S.; Nascimento, G. G. F.; Fortier, S. C.; Pessoa, C.; Moraes, M. O.; *Toxicol.* **2002**, *40*, 885.
14. Torres, Y.R.; Bugni, T. S.; Berlinck, R. G. S.; Ireland, C. M.; Magalhães, A.; Ferreira, A. G.; Rocha, R. M.; *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 5429.
15. Faulkner, D. J.; *Antonie van Leeuwenhoek* **2000**, *77*, 135.
16. Garson, M. J. Em *Sponges in Time and Space*; van Soest, R. W. M.; van Kempen, T. M. G.; Braekman, J. C., eds.; Balkema: Rotterdam, 1994, p. 427-440.
17. Cragg, G. M.; Newman, D. J.; Snader, K. M.; *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 52.
18. Fusetani, N. Em *Drugs from the Sea*; Fusetani, N., ed.; Karger, Basel, 2001, p. 1-5.
19. Brauner, A.; Budzikiewicz, H.; Boland, W.; *Org. Mass Spectrom.* **1982**, *17*, 161.
20. Sandri, J.; Viala, J.; *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6627.
21. McDonald, L. A.; Swesey, J. C.; Ireland, C. M.; Carroll, A. R.; Coll, J. C.; Bowden, B. F.; Fairchild, C. R.; Cornell, L.; *Tetrahedron* **1995**, *51*, 5237; Smith, C. J.; Hettich, R. L.; Jompa, J.; Tahir, A.; Buchanan, M. V.; Ireland, C. M.; *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 4147.
22. Tsukamoto, S.; Kato, H.; Hirota, H.; Fusetani, N.; *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 1606.
23. Crispino, A.; De Giulio, A.; De Rosa, S.; De Stefano, S.; Milone, A.; Zavodnik, N.; *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 1575.
24. Aiello, A.; Fattorusso, E.; Menna, M.; Carnuccio, R.; D'Acquisto, F.; *Tetrahedron* **1997**, *53*, 5877.
25. Aiello, A.; Fattorusso, E.; Menna, M.; Carnuccio, R.; Iuvone, T.; *Tetrahedron* **1997**, *53*, 11489.
26. De Rosa, S.; Milone, A.; Crispino, A.; Jaklin, A.; De Giulio, A.; *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 462.
27. Mierzwa, R.; King, A.; Conover, M. A.; Tozzi, S.; Puar, M. S.; Patel, M.; Coval, S. J.; *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 175.
28. Cimmiello, P.; Dell'Aversano, C.; Fattorusso, E.; Magno, S.; Oansini, M.; *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 263.
29. Faulkner, D. J.; *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 1.
30. Green, G.; Gomez, P.; Bakus, G. J. Em *Proceedings of the Third International Sponge Conference*; 1990, p. 109-114; Bakus, G. J.; Schulte, B.; Shu, S.; Wright, M.; Green, G.; Gomez, P. Em *Proceedings of the Third International Sponge Conference*; 1990, p. 102-108.
31. Martinez, A.; Duque, C.; Fujimoto, Y.; *Lipids* **1997**, *32*, 565; Martinez, A.; Duque, C.; Sato, N.; Tanaka, R.; Fujimoto, Y.; *Nat. Prod. Lett.* **1995**, *6*, 1; Martinez, A.; Duque, C.; Hara, N.; Fujimoto, Y.; *Nat. Prod. Lett.* **1995**, *6*, 281.
32. Duque, C.; Bonilla, A.; Bautista, E.; Zea, S.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2001**, *29*, 459.
33. Tsoukatou, M.; Hellio, C.; Vagias, C.; Harvala, C.; Roussis, C.; *Z. Naturforsch.* **2002**, *57*, 161.
34. Pawlik, J. R.; McFall, G.; Zea, S.; *J. Chem. Ecol.* **2002**, *28*, 1101.
35. Andersen, R. J.; Stonard, R. J.; *Can. J. Chem.* **1979**, *57*, 2325; Stonard, R. J.; Andersen, R. J.; *Can. J. Chem.* **1980**, *58*, 2121; Stonard, R. J.; Andersen, R. J.; *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 3687; Palermo, J. A.; Brasco, M. F. R.; Seldes, A. M.; *Tetrahedron* **1996**, *52*, 2727; Palermo, J. A.; Brasco, M. F. R.; Cabezas, E.; Balzaretto, V.; Seldes, A. M.; *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 488.
36. Salmoun, M.; Devijver, C.; Daloze, D.; Braekman, J. C.; van Soest, R. W. M.; *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1173.
37. Gregson, R. P.; Marwood, J. F.; Quinn, R. J.; *Experientia* **1981**, *37*, 930.
38. Lysek, N.; Kinscherf, R.; Claus, R.; Lindel, T.; *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.* **2003**, *58*, 568.
39. Avila, C.; *Ocean. Mar. Biol. Annu. Rev.* **1995**, *33*, 487.
40. Cimino, G.; Ghiselin, M. T. Em *Marine Chemical Ecology*; McClintock, J. B.; Baker, B. J., eds.; CRC Press: Boca Raton, 2001, p. 115-154.
41. Farmer, W. M.; *Veliger* **1978**, *20*, 375.
42. Carté, B.; Faulkner, D. J.; *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 2314.
43. Lindquist, N.; Fenical, W.; *Experientia* **1991**, *47*, 504.
44. Blackman, A. J.; Li, C.; *Aust. J. Chem.* **1994**, *47*, 1625.
45. Carté, B.; Faulkner, D. J.; *J. Chem. Ecol.* **1986**, *12*, 795.
46. Melvin, M. S.; Ferguson, D. C.; Lindquist, N.; Manderville, R. A.; *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 6861.
47. Fusetani, N. Em *Bioorganic Marine Chemistry*; Scheuer, P. J., ed.; Springer-Verlag: Berlin e Heidelberg, 1987, vol. 1, p. 61-92.