

**ISOLAMENTO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE PRODUTOS NATURAIS DAS ESPONJAS *Monanchora arbuscula*, *Aplysina* sp., *Petromica ciocalyptoides* E *Topsentia ophiraphidites*, DA ASCÍDIA *Didemnum ligulum* E DO OCTOCORAL *Carijoa riisei***

**Miriam H. Kossuga, Simone P. de Lira, Andréa M. Nascimento, Maria Teresa P. Gambardella e Roberto G. S. Berlinck\***  
Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 780, 13560-970 São Carlos – SP, Brasil

**Yohandra R. Torres**

Departamento de Química, Universidade Estadual do Centro-Oeste, Rua Camargo Varela de Sá, 3, 85040-080 Guarapuava - PR, Brasil

**Gislene G. F. Nascimento**

Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Metodista de Piracicaba, Rodovia do Açúcar, km 156, 13400-901 Piracicaba - SP, Brasil

**Eli F. Pimenta, Marcio Silva, Otávio H. Thiemann e Glaucius Oliva**

Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos - SP, Brasil

**André G. Tempone e Márcia S. C. Melhem**

Divisão de Biologia Médica, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 351, São Paulo - SP, Brasil

**Ana O. de Souza, Fabio C. S. Galetti e Célio L. Silva**

Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP, Brasil

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

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

**Eduardo Hajdu**

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

**Solange Peixinho**

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

**Rosana M. Rocha**

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

Recebido em 13/7/06; aceito em 18/1/07; publicado na web em 24/7/07

ISOLATION AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF SECONDARY METABOLITES FROM THE SPONGES *Monanchora* aff. *arbuscula*, *Aplysina* sp. *Petromica ciocalyptoides* AND *Topsentia ophiraphidites*, FROM THE ASCIDIAN *Didemnum ligulum* AND FROM THE OCTOCORAL *Carijoa riisei*. The investigation of extracts from six species of marine invertebrates yielded one new and several known natural products. Isoptilocaulin from the sponge *Monanchora* aff. *arbuscula* displayed antimicrobial activity at 1.3 µg/mL against an oxacillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. Five inactive known dibromotyrosine derivatives, **2** – **6**, were isolated from a new species of marine sponge, *Aplysina* sp. The sponges *Petromica ciocalyptoides* and *Topsentia ophiraphidites* yielded the known halistanol sulfate **A** (**7**) as an inhibitor of the antileishmanial target adenosine phosphoribosyl transferase. The ascidian *Didemnum ligulum* yielded asterubin (**10**) and the new *N,N*-dimethyl-*O*-methylethanolamine (**11**). The octocoral *Carijoa riisei* yielded the known 18-acetoxypregna-1,4,20-trien-3-one (**12**), which displayed cytotoxic activity against the cancer cell lines SF295, MDA-MB435, HCT8 and HL60.

Keywords: marine sponge; ascidian; octocoral.

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, investigações químicas e farmacológicas de organismos marinhos têm contribuído significativamente para a descoberta de novas substâncias químicas potencialmente bioativas para fins terapêuticos<sup>1</sup>. Embora o litoral brasileiro seja o segundo mais extenso depois da Austrália, o desenvolvimento da química de produtos naturais de organismos marinhos no Brasil foi negligenciado por muitos anos, porque o principal foco da química de produtos naturais brasileira foi direcionado ao estudo de plantas. Desta maneira, a fauna marinha brasileira ainda é pouco explorada na pesquisa por produtos naturais biologicamente ativos, estrutu-

ralmente inéditos ou taxonomicamente relevantes<sup>2</sup>.

No presente trabalho relata-se a investigação química dos extratos brutos bioativos de quatro esponjas, uma ascídia e um octocoral. Descreve-se o isolamento de um alcalóide guanidínico a partir da esponja *Monanchora* aff. *arbuscula*, de cinco derivados da dibromotirosina, a partir da esponja *Aplysina* sp., o isolamento do mesmo esterol trissulfatado a partir de ambas esponjas *Petromica ciocalyptoides* e *Topsentia ophiraphidites*, o primeiro isolamento da asterubina, a partir de uma ascídia, *Didemnum ligulum*, da qual também foi isolada a *N,N*-dimetil-*O*-metilethanolamina, inédito na literatura, além do 18-acetoxipregna-1,4,20-trien-3-ona a partir do octocoral *Carijoa riisei*. Também são apresentados os resultados de testes de atividade biológica realizados com estes metabólitos secundários.

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

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Investigação química da esponja *Monanchora arbuscula*

O extrato metanólico da esponja *Monanchora arbuscula* apresentou potentes atividades antibacteriana, antimicobacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv e citotóxica. O extrato metanólico foi então submetido a várias separações cromatográficas (ver Parte Experimental), resultando na obtenção do alcalóide guanidínico isoptilocaulina (**1**). A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e experimento DEPT 135° de **1** (MeOH- $d_4$ , 125 MHz) permitiu observar quinze sinais referentes a dois grupos metila, seis grupos metileno (dois dos quais com deslocamentos químicos idênticos), quatro grupos metino e três carbonos do tipo  $\text{sp}^2$ . O sinal em  $\delta$  156,4 foi atribuído ao carbono da ligação dupla carbono-nitrogênio guanidínico e os dois sinais em  $\delta$  136,3 e 132,9 foram atribuídos a dois carbonos de uma ligação dupla carbono-carbono. A análise conjunta dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (MeOH- $d_4$ , 500 MHz), de  $^{13}\text{C}$  e bidimensionais (HMQC, HMBC e COSY), espectro de massas, bem como a comparação com dados da literatura<sup>3,4</sup> permitiram identificar a substância **1** como sendo a isoptilocaulina.

Estudos químicos anteriores realizados com esponjas do gênero *Monanchora* demonstraram que espécies deste gênero são uma rica fonte de alcalóides guanidínicos<sup>5</sup>. Recentemente, a isoptilocaulina foi isolada de uma esponja do gênero *Monanchora* (cf. *Monanchora unguifera*)<sup>4</sup>. Todavia, considerando-se que os gêneros *Ptilocaulis*, *Monanchora* e *Crambe* possam ser considerados um único gênero, *Crambe*<sup>6</sup>, é possível que o isolamento da isoptilocaulina (**1**) de *M. unguifera* esteja relacionada à sua ocorrência em diferentes espécies de esponjas de um mesmo gênero. A isoptilocaulina (**1**) foi submetida à avaliação de sua atividade antibacteriana contra linhagens suscetíveis e resistentes a antibióticos de diferentes bactérias (Tabela 1), apresentando concentração inibitória mínima (CIM) de 170  $\mu\text{g/mL}$  contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (cloranfenicol: 1,3  $\mu\text{g/mL}$ ), 85  $\mu\text{g/mL}$  contra *Escherichia coli* ATCC 25922 (cloranfenicol: 20  $\mu\text{g/mL}$ ), 170  $\mu\text{g/mL}$  contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27583 (cloranfenicol: 13  $\mu\text{g/mL}$ ), e CIM de 1,3, e 85,0  $\mu\text{g/mL}$  contra duas linhagens de *S. aureus* resistentes ao antibiótico oxacilina, contra as quais o antibiótico padrão cloranfenicol não foi ativo. Sendo assim, a isoptilocaulina (**1**) mostrou ser um potente antibiótico contra linhagens resistentes de *S. aureus*, causadoras de infecções hospitalares para as quais existem poucos antibióticos efetivos. Este é o primeiro estudo da atividade antibacteriana da isoptilocaulina contra linhagens resistentes de bactérias.

### Investigação química da esponja *Aplysina sp.*

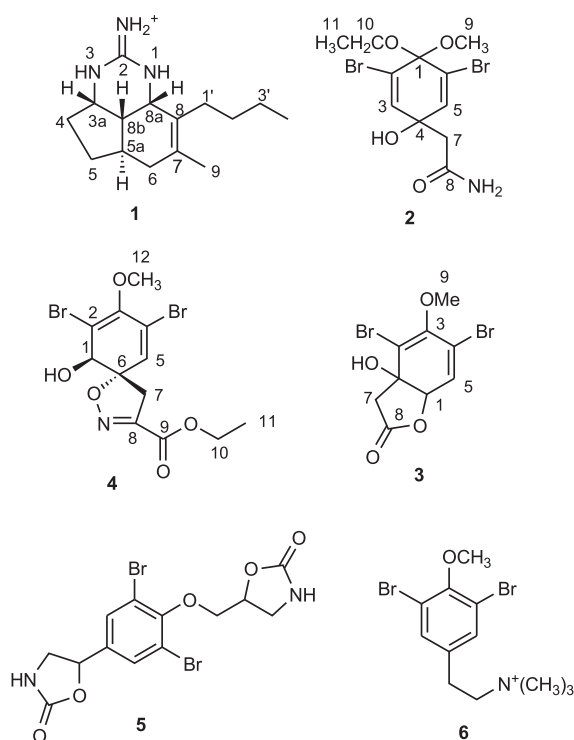
O gênero *Aplysina* pertence à ordem Verongida, conhecido como sendo fonte de substâncias bromadas derivadas da tirosina<sup>7</sup>. Espécimens de *Aplysina sp.*, recentemente descrita como sendo uma espécie nova de esponja do litoral baiano<sup>8</sup>, foram obtidos na Baía de Todos os Santos, Salvador (BA) em 1999. A esponja preservada em EtOH foi diretamente enviada ao Museu Nacional (UFRJ), onde foi identificada. O material biológico foi separado do EtOH, triturado em MeOH, e os extratos etanólico e metanólico foram reunidos e evaporados. Em seguida, o extrato hidroalcoólico foi submetido a uma série de partições. A fração solúvel em AcOEt foi então submetida a uma série de separações cromatográficas, (ver Parte Experimental), resultando no isolamento de cinco substâncias (**2-6**). A substância **2** mostrou ser um sólido vítreo, cujo espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) apresentou sinais correspondentes a um grupo metoxila em  $\delta$  3,13 (s, 3H), a um grupo

etoxila em  $\delta$  3,35 (q,  $J = 7,0$  Hz, 2H) e  $\delta$  1,20 (t, 3 H,  $J = 7,0$  Hz, 3H), um sinal em  $\delta$  6,75 (s, 2H) relativo a dois hidrogênios olefínicos quimicamente equivalentes e um sinal em  $\delta$  2,54 (s, 2H) pertencente a um grupo metileno. A análise conjunta dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz) e bidimensionais (HMQC, HMBC e COSY) e a comparação com dados da literatura<sup>9</sup> permitiram identificar a substância **2** como sendo a (3',5'-dibromo-4'-etoxi-1'-hidroxi-4'-metoxiciclohexa-2',5'-dienila) acetamida, a qual mostrou ser essencialmente inativa em ensaios de atividade antimicrobiana contra *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10231 e linhagens resistentes à oxacilina de *S. aureus* e *P. aeruginosa* (Tabela 1).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **3** (MeCN- $d_3$ , 500 MHz) apresentou dois dubletos em  $\delta$  2,84 e 2,89 (1H cada,  $J = 17,7$  Hz), um singlete de um hidrogênio olefínico em  $\delta$  6,46 (1H); um singlete em  $\delta$  5,15 (1H) de um hidrogênio ligado a carbono oxigenado e um singlete em  $\delta$  3,74 (3H) de um grupo metoxila. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância **3** (PND e DEPT 135°, MeCN- $d_3$ , 125 MHz) apresentou 9 átomos de carbono, sendo  $\text{CH}_3$  em  $\delta$  61,5 referente a um grupo metoxila,  $\text{CH}_2$  em  $\delta$  42,2, dois grupos metino, um  $\text{sp}^2$  em  $\delta$  135,5 e um  $\text{sp}^3$  em  $\delta$  89,1 de carbono metino oxigenado. Além disso, foram observados sinais de 5 carbonos  $\text{sp}^2$ , sendo um em  $\delta$  173,7, que foi atribuído a um grupo carbonila de éster, três sinais em  $\delta$  151,2, 119,3, 107,6 atribuídos a carbonos  $\text{sp}^2$  totalmente substituídos, e um sinal em  $\delta$  77,0 de carbono quaternário oxigenado. Após a análise dos dados acima descritos e comparação com dados da literatura<sup>10</sup>, a substância **3** foi identificada como sendo a aeroplisinina-2, previamente isolada das esponjas *Aplysina aerophoba*, *A. fistularis* forma *fulva* e *A. archeri*<sup>10-12</sup>. O composto **3** também demonstrou ser essencialmente inativo contra *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *C. albicans* ATCC 10231 e linhagens resistentes à oxacilina de *S. aureus* e *P. aeruginosa* (Tabela 1).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância **4** (MeCN- $d_3$ , 500 MHz) apresentou sinais em  $\delta$  6,41 (s, 1H, H-5), 4,16 (s, 1H, H-1), 3,70 (s, 3H, MeO), além de um sistema AB em  $\delta$  3,69 e 3,06 (1H cada,  $J = 18,2$  Hz) característico de um sistema espirocicloexadienilisoazol, comumente encontrado em muitos outros constituintes químicos de esponjas da ordem Verongida. Os outros sinais de  $^1\text{H}$  observados referem-se a um grupo etoxila em  $\delta$  4,29 (q,  $J = 7,1$  Hz, 2H) e  $\delta$  1,30 (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H). O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **4** (MeCN- $d_3$ , 125 MHz) exibiu sinais de dois grupos metila ( $\delta$  14,4 e 60,8), dois grupos metileno ( $\delta$  40,0 e 63,0), dois grupos metino ( $\delta$  132,3 e 75,1) e cinco carbonos  $\text{sp}^2$  e um quaternário ( $\delta$  161,0, 153,3, 149,0, 122,3, 113,8 e 92,6, respectivamente). A análise dos espectros HMQC e HMBC e comparação com dados da literatura<sup>13,14</sup> permitiram determinar a estrutura de **4** como sendo a 2,4-dibromo-1-hidroxi-3-metoxi-6-oxa-3-azaspiro[4.5]dec-2,4,8-trieno-8-carboxilato de etila. Embora esta substância seja inédita na literatura, o fato do ácido correspondente já ter sido isolado de *Pseudoceratina sp.*<sup>13</sup> sugere que esta seja um artefato de isolamento formado pela condensação do ácido correspondente com EtOH durante o processo de armazenamento. O espectro de dicróismo circular de **4** apresentou efeito Cotton positivo em  $\lambda_{\text{max}}$  255 e 290 nm, indicando configuração absoluta 1(R), 6(S)<sup>7</sup>.

As substâncias **5** e **6** foram identificadas como sendo a [3,5-dibromo-4-[(2-oxo-5-oxazolidinila)]metoxifenil]-2-oxazolidinona<sup>15</sup> e o 2-(3,5-dibromo-4-metoxifenil)-*N,N,N*-trimetiletanamônio<sup>16</sup>. O composto **5** também não apresentou atividade antimicrobiana contra os mesmos microrganismos patogênicos supra mencionados (Tabela 1). Este é o primeiro estudo químico realizado com a esponja *Aplysina sp.*



**Tabela 1.** Resultados da atividade antimicrobiana *in vitro* das substâncias **1**, **2**, **3** e **5**

Substâncias	Linhagens Microbianas CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )							
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
<b>1</b>	170	85	170	1,3	85	nt	nt	nt
<b>2</b>	1250	1250	-	-	-	-	-	625
<b>3</b>	-	-	-	-	-	250	-	-
<b>5</b>	1250	1250	1250	-	-	-	-	625

Linhagens microbianas: **1**. *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) – Gram positiva; **2**. *Escherichia coli* (ATCC 25922) – Gram negativa; **3**. *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) – Gram negativa; **4**. *Staphylococcus aureus* ORSA 8; **5**. *Staphylococcus aureus* ORSA 108; **6**. *P. aeruginosa* 13; **7**. *P. aeruginosa* P1; **8**. *Candida albicans* (ATCC 10231) – levedura. ORSA: cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina. (-):ausência de inibição; (nt): não testada.

### Investigação química das esponjas *Petromica ciocalyptoides* e *Topsentia ophiraphidites*

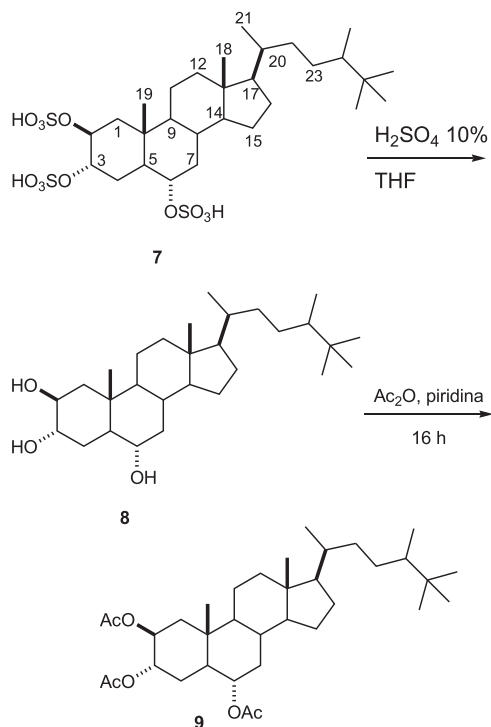
O extrato metanólico da esponja *Petromica ciocalyptoides* coletada na Baía de Todos os Santos (Salvador, BA) apresentou atividade inibitória da enzima adenosina fosforribosil transferase isolada de *Leishmania tarantolae* (98% de inibição a 50  $\mu\text{g/mL}$ ) e foi submetido a uma série de separações cromatográficas biomonitoradas. O espectro de RMN- $^1\text{H}$  (MeOH- $d_4$ , 400 MHz) do constituinte ativo isolado (**7**) em MeOH- $d_4$  apresentou dois sinais alargados de hidrogênios em  $\delta$  4,80 e 4,75 (sl), sugerindo estarem ligados a carbonos substituídos por grupos sulfato. Outro sinal de hidrogênio oximetínico foi observado em  $\delta$  4,19 (dt, 4,4 e 10,9 Hz). Sinais de hidrogênios entre  $\delta$  2,5 e 0,5, incluindo sinais de grupos metila em  $\delta$  0,69, 0,83, 0,95, 0,85 (*t*-butila) e 0,83, sugeriram uma estrutura do tipo esteroidal substituída com grupos hidroxila sulfatados. O espectro de massas em modo FAB $^+$  de **7** apresentou um pico de íon pseudo-molecular  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  de intensidade muito pequena em  $m/z$  709. A determinação estrutural do esterol

trissulfatado **7** foi completada após a obtenção do espectro de massas do derivado dessulfatado e peracetilado **9**. O composto peracetilado **9** forneceu espectro de massas em modo impacto de elétrons com pico de íon molecular  $\text{M}^+$  em  $m/z$  574. Uma medida de massa exata deste forneceu o valor de 574,42324 (calculado: 574,42334,  $\Delta\text{mu}$  0,1 ppm), compatível com a fórmula  $\text{C}_{35}\text{H}_{58}\text{O}_6$ . A análise dos espectros de RMN- $^1\text{H}$ , RMN- $^{13}\text{C}$  (BBD e DEPT, MeOH- $d_4$ , 100 MHz), HMQC, COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  e HMBC e comparação com dados da literatura<sup>17</sup> indicaram tratar-se do trissulfato de halistanol A (**7**), originalmente isolado da esponja *Halichondria cf. moorei* e subsequentemente de outras espécies de esponjas. O trissulfato de halistanol A (**7**) isolado da esponja *Halichondria cf. moorei* inibiu o crescimento de fungos e de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas não especificadas<sup>17,18</sup>. Também apresentou atividade hemolítica<sup>19</sup>, atividade inibidora de várias enzimas<sup>20-22</sup> e atividade “anti-fouling” contra larvas da craca *Balanus amphitrite* com dose de inibição de 2,9  $\mu\text{g/mL}$ <sup>23</sup>. O trissulfato de halistanol A (**7**) isolado de *Petromica ciocalyptoides* apresentou atividade inibidora da enzima adenosina fosforribosil transferase isolada de *Leishmania tarantolae* de maneira dose-dependente, com inibição de 92% em uma concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$  ou  $\text{IC}_{50}$  de 2,87  $\mu\text{g/mL}$ . O composto **7** não apresentou atividade inibitória frente outras PRTases, tais como a hipoxantina-guaniafosforribosil-transferase (HGPR), xantina-fosforribosil-transferase (XPRT) e H-APRT (adenina-fosforribosil-transferase de *Homo sapiens*). Como é bem conhecido o fato de compostos sulfatados apresentarem diversas atividades biológicas devido à presença de seus grupos sulfato<sup>24</sup>, realizou-se a hidrólise destes grupos do trissulfato de halistanol ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  10%, refluxo, 3 h), de maneira a fornecer o correspondente esterol trihidroxilado **8**. O espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (MeOH- $d_4$ , 125 MHz) de **8** indicou que ocorreu a dessulfatação dos grupos hidroxila, uma vez que o deslocamento químico dos carbonos oximetínicos antes observados em  $\delta$  75,7, 75,8 e 78,8 para o composto **7** foram subsequentemente observados em  $\delta$  69,8, 69,0 e 67,5. O composto **8** obtido mostrou ser inativo como inibidor da L-APRT. De maneira a verificar se somente os grupos sulfato seriam responsáveis pela atividade observada, diferentes sais de sulfato de Na, K e Mg foram submetidos ao bioensaio, não apresentando qualquer atividade. Sendo assim, apesar dos grupos sulfato do trissulfato de halistanol A serem essenciais para a atividade de inibição da L-APRT, devem apresentar uma posição espacial necessária para promover a inibição enzimática. O trissulfato de halistanol A foi subsequentemente testado em promastigotas de *Leishmania chagasi*, mas não apresentou qualquer atividade antiparasitária.

Com o objetivo de se avaliar a atividade antifúngica do trissulfato de halistanol A em cepas de *Candida* spp. sensível (*C. parapsilosis*) e resistente (*C. krusei*) a antibióticos pertencentes à classe dos azóis, utilizou-se o ensaio de microdiluição em placas de 96 poços. Neste bioensaio o trissulfato de halistanol A foi mais efetivo contra *C. krusei* resistente aos azóis, apresentando uma  $\text{CI}_{50}$  de 25,81  $\mu\text{g/mL}$  (intervalo de confiança 95%: 16,61 – 40,10  $\mu\text{g/mL}$ ). A anfotericina B foi utilizada como fármaco padrão e apresentou uma  $\text{CI}_{50}$  de 49,46 ng/mL contra *C. krusei* e 18,52 ng/mL contra *C. parapsilosis*. A linhagem sensível *C. parapsilosis* apresentou-se menos suscetível à atividade antibiótica do trissulfato de halistanol A, com  $\text{CI}_{50}$  de 59,01  $\mu\text{g/mL}$  (intervalo de confiança 95%: 57,53 – 60,52  $\mu\text{g/mL}$ ). A atividade fungicida medida pelo método MTT indicou que o trissulfato de halistanol A promoveu inibição de 100% das leveduras na concentrações mais elevadas (150  $\mu\text{g/mL}$ ).

O mesmo trissulfato de halistanol A (**7**) foi isolado da esponja *Topsentia ophiraphidites* coletada na Baía de Todos os Santos (2004). Este foi caracterizado pela análise de seus espectros de RMN mono e bidimensionais, além de ter sido submetido ao procedimento de hidrólise dos grupos sulfato e acetilação de **8**, fornecendo **9** com espectro de massas idêntico ao obtido a partir do mesmo composto

isolado de *P. ciocalyptoides*. Este é o primeiro isolamento de um esteroide sulfatado a partir de esponjas coletadas da costa do Brasil e o primeiro a apresentar inibição enzimática da L-APRT. Recentemente, dois triterpenos e um sesterterpeno dissulfatados foram isolados da esponja *Callyspongia* sp. oriunda de São Sebastião (SP) e também apresentaram atividade inibidora da L-APRT<sup>25</sup>.



### Investigação química da ascídia *Didemnum ligulum*

Ascídias são um grupo de invertebrados exclusivamente marinhos, tipicamente bioprodutores de compostos nitrogenados<sup>26</sup>. Dentre estes, destacam-se uma enorme variedade de peptídeos, alcalóides e derivados nitrogenados. Ascídias pertencentes ao gênero *Didemnum* (Filo Cordata, Classe Ascidiacea) são uma rica reserva de metabólitos marinhos estruturalmente diversificados e biologicamente ativos. A maioria dessas substâncias são compostos nitrogenados derivados de aminoácidos, como peptídeos cíclicos e acíclicos e alcalóides aromáticos<sup>26</sup>.

No presente estudo, o extrato metanólico da ascídia *Didemnum ligulum* oriunda de São Sebastião (SP) apresentou atividade antimicrobiana contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. O extrato bruto foi fracionado por cromatografia de permeação em gel em coluna de Sephadex LH-20 (MeOH) e por cromatografia de fase reversa em coluna de sílica-gel derivatizada com 18 átomos de carbono - C<sub>18</sub> (gradiente de MeOH em H<sub>2</sub>O). A fração contendo compostos nitrogenados de caráter básico (resposta positiva frente ao reagente de Dragendorff em CCD) cristalizou e o sobrenadante foi purificado por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando-se uma coluna de sílica-gel derivatizada com grupos fenila. O composto cristalino foi identificado como sendo a asterubina (**10**) por análise por difração em raios-X (Tabelas 2 e 3), enquanto que o produto purificado por HPLC mostrou ser a *N,N*-dimetil-*O*-metiletanolamina (**11**), identificada pela análise de seus dados espectroscópicos. Posteriormente foram obtidos os dados de RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C e HMQC da asterubina (**10**), que possibilitaram a atribuição dos seus sinais de <sup>1</sup>Hs e <sup>13</sup>Cs, ainda não relatada na literatura.

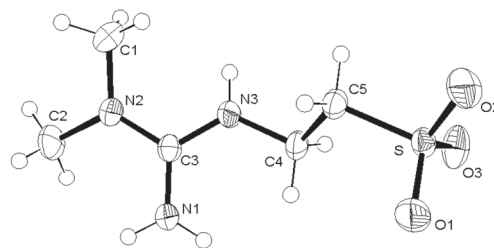


Figura 1. Representação ORTEP da molécula de asterubina (**10**) com os átomos identificados

Tabela 2. Dados cristalográficos da asterubina (**10**)

Fórmula empírica	C <sub>5</sub> H <sub>3</sub> N <sub>3</sub> SO <sub>3</sub>
Dimensões do cristal	0,2 x 0,2 x 0,1
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	P2 <sub>1</sub> /c
a (Å)	6,0852(5)
b (Å)	8,7508(8)
c (Å)	16,553(1)
β (°)	97,063(6)
V (Å <sup>3</sup> )	874,8(1)
Z	4
F(000)	416
Densidade calculada	1,483
μ (mm <sup>-1</sup> )	0,345
Difratômetro	CAD4
Radiação, λ (Å)	MoKα, 0,71073
Temperatura (K)	293
Intervalo de θ	2,48 – 29,95
Intervalo de hkl	-8 ≤ h ≤ 0, 0 ≤ k ≤ 12, -23 ≤ l ≤ 23
Reflexões medidas	2759
Reflexões únicas / Rint	2540 / 0,024
Reflexões observadas (I ≥ 2σ(I))	1752
Parâmetros refinados / restrições	120 / 0
R (obs/all)	0,043/ 0,086
wR (obs/all)	0,107 / 0,122
S	1,032
Δρ min/max (e Å <sup>-3</sup> )	-0,354 / 0,461

Tabela 3. Geometria das ligações de hidrogênio da asterubina (**10**)

D-H	d(D-H)	d(H..A)	<DHA	d(D..A)	A
N1-HN1a	0,84(2)	2,10(2)	163(2)	2,917(2)	O3 <sup>i</sup>
N1-HN1b	0,84(2)	2,04(2)	163(2)	2,860(2)	O2 <sup>ii</sup>
N3-HN3	0,87(2)	2,03(2)	157(2)	2,855(2)	O1 <sup>iii</sup>

Operações de simetria: (i) x, -y+1/2, z-1/2, (ii) -x, y-1/2, -z+1/2, (iii) x+1, y, z

Isolada na forma de um sólido vítreo amarelo, a substância inédita *N,N*-dimetil-*O*-metiletanolamina (**11**) teve sua estrutura determinada pela análise de seus dados espectroscópicos (RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, HMQC, HMBC, COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H) e espectrometria de massas de alta resolução em modo FAB, cujo espectro apresentou pico de íon pseudo-molecular [M+H]<sup>+</sup> em m/z 104,10813 (calculado: 104,10754), compatível com a fórmula C<sub>5</sub>H<sub>14</sub>NO. O grupo metoxila, com sinal no espectro de RMN-<sup>1</sup>H (MeOH-d<sub>4</sub>, 100 MHz) em δ 3,2 (δ<sup>13</sup>C 54,7) mostrou estar acoplado ao grupo metileno em δ 3,5 (δ<sup>13</sup>C 69) o qual, por sua vez, mostrou estar acoplado ao outro grupo metileno em δ 4,0 (δ<sup>13</sup>C 57,0), que constitui um sistema do tipo

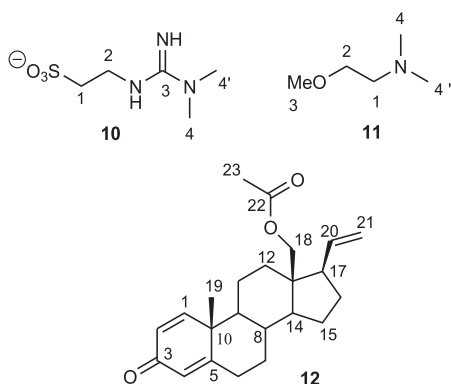


AA'BB' similar ao observado para o composto **6**. O átomo de nitrogênio demonstrou estar substituído por dois grupos metila, que apresentaram sinal no espectro de RMN-<sup>1</sup>H em  $\delta$  2,7 ( $\delta^{13}\text{C}$  40,5). A asterubina já havia sido isolada anteriormente de uma estrela do mar (*Asteria rubens*)<sup>27</sup> e mais recentemente da esponja *Phoriospongia sp.*<sup>28</sup>, mas nunca de uma ascídia. Tal fato pode indicar que a ocorrência de compostos estruturalmente relacionados pode ser ampla, inclusive em organismos com pouca relação filogenética. A etanolamina é na verdade considerada um metabólito primário, sendo constituinte estrutural da colina e da acetilcolina, além de vários derivados lipídicos polares<sup>29</sup>. Tanto a asterubina (**10**) como a *N,N*-dimetil-*O*-metiletanolamina (**11**) mostraram ser inativas em testes de atividades antimicrobiana e antimicobacteriana.

### Investigação química do octocoral *Carijoa riisei*

Octocorais do gênero *Carijoa*, também conhecido como *Telesto*, foram objetos de diversas investigações químicas, tendo sido isolados prostanóides, amidas, esteróis glicosilados citotóxicos e eicosanóides halogenados com atividade antitumoral e anti-inflamatória<sup>30-35</sup>.

No presente estudo, o extrato MeOH do octocoral *Carijoa riisei* coletado em São Sebastião (SP) apresentou atividade citotóxica contra linhagens de células MCF-7 (câncer de mama), melanoma e cólon. Seu extrato bruto também apresentou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp* e *Proteus spp*, todas bactérias resistentes a antibióticos. O fracionamento desse extrato bruto por cromatografia rápida em coluna de sílica gel e por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) resultou no isolamento de um único constituinte. A identificação deste composto foi realizada pela análise dos seus dados espectroscópicos (RMN-<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, HMQC, HMBC e COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H), bem como por comparação com dados existentes na literatura, demonstrando tratar-se do esteróide 18-acetoxipregna-1,4,20-trien-3-ona (**12**), o primeiro metabólito secundário isolado deste octocoral<sup>35</sup>. Foi possível caracterizar agora completamente este composto, o que não foi feito quando de sua publicação original. A 18-acetoxipregna-1,4,20-trien-3-ona (**12**) isolada do octocoral *Carijoa riisei* na presente investigação apresentou moderada atividade em linhagens de células tumorais SF295 (sistema nervoso central) com IC<sub>50</sub> de 14,4 µg/mL, MDA-MB435 (mama) com IC<sub>50</sub> de 23,1 µg/mL, HCT8 (cólon) com IC<sub>50</sub> de 22,0 µg/mL e HL60 (leucemia) com IC<sub>50</sub> de 12,4 µg/mL.



### CONCLUSÃO

Neste trabalho são apresentados os resultados da investigação química dos extratos brutos de quatro espécies de esponjas, uma

ascídia e um octocoral, levando ao isolamento de um composto inédito e 9 conhecidos. Dos 10 compostos isolados, 5 apresentaram atividades antimicrobianas. O alcalóide guanidínico isoptilocalina, isolado de *Monanchora arbuscula*, mostrou ser um potente antibiótico contra linhagens de *S. aureus* resistentes à oxacilina, sendo este o primeiro estudo da atividade antibacteriana da isoptilocalina contra linhagens resistentes de bactérias. De *Aplysina sp.* foram isolados 5 compostos derivados da dibromotirosina, dos quais 3 demonstraram ser inativos em testes de atividade antimicrobiana. O composto já conhecido trissulfato de halistanol A, isolado das esponjas *Petromica ciocalyptoides* e *Topsentia ophiraphidites*, apresentou atividade inibitória da enzima adenosina fosforibosil transferase isolada de *Leishmania tarantolae*, bem como atividade inibitória de *Candida krusei* resistente a antibióticos. A asterubina e a *N,N*-dimetil-*O*-metiletanolamina, ambas isoladas da ascídia *Didemnum ligulum*, mostraram ser inativas nos bioensaios de atividade antimicobacteriana. O esterol 18-acetoxipregna-1,4,20-trien-3-ona foi isolado a partir do octocoral *Carijoa riisei* e demonstrou apresentar moderada atividade citotóxica.

### PARTE EXPERIMENTAL

#### Generalidades

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em um aparelho FT-IR Bomem MB102 em pastilha de sílica. Para as medidas de rotação específica foi usado o polarímetro 241 Perkin-Elmer. Os espectros na região do ultravioleta foram obtidos em MeOH, em um aparelho Hitachi U-3210. Os dados de difração de raio-X foram coletados em um difratômetro automático CAD4 Enraf-Nonius, a 273 K no modo  $\omega$ -2 $\theta$ . Os espectros de RMN foram obtidos em DMSO-*d*<sub>6</sub>, MeOH-*d*<sub>4</sub>, MeCN-*d*<sub>3</sub> ou CDCl<sub>3</sub>, a 25 °C utilizando TMS como padrão interno, nos seguintes aparelhos: Bruker AC-4.7 Tesla, operando em 200,1 MHz (<sup>1</sup>H) e 50,3 MHz (<sup>13</sup>C); Bruker ARX 9.4 Tesla operando em 400,35 MHz (<sup>1</sup>H) e 100,10 MHz (<sup>13</sup>C) e Bruker DRX500 11,7 tesla operando em 500,13 MHz (<sup>1</sup>H) e 125,76 MHz (<sup>13</sup>C) equipado com sonda multinuclear com gradiente de campo no eixo Z. Os espectros de massas foram obtidos utilizando dois equipamentos: espectrômetro de massas VG-7070 operando a uma voltagem de aceleração nominal de 70 eV, no qual os espectros obtidos por EI, FAB ou CI foram calibrados com perfluoroquerosene, álcool 3-nitrobenzílico ou polietilenoglicol; equipamento Hybrid Kratos Concept IIIHQ, em modo FAB. Solventes de grau analítico foram utilizados para a extração e cromatografia em coluna de baixa pressão "flash". 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 das espécies de esponjas coletadas foram depositados na coleção de poríferos do Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ. Um voucher da ascídia *Didemnum ligulum* foi depositado na coleção de Ascidiacea do Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. A gorgônia *C. riisei* foi identificada pelo Dr. A. E. Migotto (Centro de Biologia Marinha, Universidade de São Paulo).

#### Ensaio da atividade antimicrobiana *in vitro*

Para a determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) foram utilizadas 8 cepas microbianas (7 bactérias e 1 levedura, mencionadas na discussão dos resultados e Tabela I) e a técnica da microdiluição<sup>36</sup>. O inóculo foi preparado transferindo-se quatro

a seis colônias de cada bactéria para caldo Mueller-Hinton, incubando-se por 6 h a 37 °C, de modo a se obter uma turbidez de 10<sup>6</sup> bactérias/mL. Inóculo de 100 µL de cada suspensão de células foi colocado nos orifícios da microplaca contendo 100 µL de caldo Mueller-Hinton acrescido da substância em diferentes concentrações (1250, 625, 312, 250, 170, 85, 42,5, 21, 10, 5, 2 e 1 µg/mL). A seguir, incubou-se a 37 °C por 24 h. O crescimento microbiano foi avaliado pela leitura da densidade óptica (620 nm) em aparelho ELISA (Multiskan MS-Labsystem). Como controles negativos foram utilizados o caldo Mueller-Hinton esterilizado e culturas microbianas crescidas sem a adição das substâncias. Como controle positivo foram utilizados cloranfenicol, nistatina e cetoconazol. Todas as amostras foram testadas em duplicata. Nos ensaios onde se verificou a atividade sobre o crescimento da levedura *Candida albicans*, foi utilizado o meio de cultura GYW.

No bioensaio de atividade antifúngica, as leveduras *Candida krusei* (ATCC 6248) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) foram mantidas em meio RPMI 1640, com L-glutamina (Gibco, Invitrogen) e glicose 2% em pH 7,0. O halistanol A foi dissolvido em DMSO e posteriormente diluído no meio RPMI 1640, utilizando-se microplacas de 96 poços. A suspensão do inóculo de leveduras foi ajustado para 1-5 x 10<sup>5</sup> cfu/mL, sendo adicionados 100 µL do inóculo da levedura em cada poço. A placa foi posteriormente incubada por 24 h à 35 °C na presença do halistanol A. Após agitação, verificou-se o crescimento das leveduras em leitor de placas automático (Multiskan, Sweden) a 480 nm. A anfotericina B (Fungizone) foi utilizada como controle positivo (antifúngico). A atividade fungicida ou fungistática do halistanol A foi avaliada através da viabilidade das leveduras, sendo acompanhada pelo método do MTT<sup>37</sup>. Os cálculos de concentração efetiva 50% foram realizados através de curvas sigmoidais dose-resposta e pelo software Graph Pad Prism 3.0, utilizando-se experimentos realizados em duplicata.

#### Ensaios de inibição enzimática de adenosina fosforribosil transferase de *Leishmania tarentolae*

Experimentos de cinética enzimática e inibição foram realizados em espectrofotômetro. A formação de mono-fosfato de adenosina (AMP) e mono-fosfato de guanosina (GMP) foi acompanhada espectrofotometricamente a 245 e 257,5 nm, respectivamente, utilizando como coeficiente de extinção os valores de 3020 ± 40 e 5340 ± 50 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> respectivamente, em volume final de reação de 1 mL.

Para a determinação da velocidade inicial de reação, adenina, hipoxantina ou guanina foram usados como substrato em concentração fixa contra diferentes concentrações do complexo de magnésio do pirofosfato de fosforribosila (Mg<sub>2</sub>PRPP) e vice-versa. Para a medição da velocidade inicial da reação reversa, tanto o complexo de magnésio do mono-fosfato de adenosina (MgAMP) como o complexo de magnésio do mono-fosfato de guanosina (MgGMP) foram usados como substrato em concentração fixa contra diferentes concentrações de pirofosfato inorgânico de magnésio (MgPPi) ou inibidores e vice-versa.

#### Teste de atividade antiparasitária contra *Leishmania chagasi*

Hamsteres dourados (*Mesocricetus auratus*) foram fornecidos pelo biotério do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo e mantidos em caixas esterilizadas com material absorvente, recebendo água e alimento *ad libitum*. Os hamsteres foram infectados a cada mês com amastigotas provenientes de baço para manutenção da cepa de *Leishmania chagasi*. Todos os procedimentos realizados nos ensaios foram previamente aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo

Lutz. Amastigotas de *L. chagasi* (MHOM/BR/1972/LD) foram purificados de baço de hamsteres dourados através de centrifugação diferencial, sendo a infecção avaliada pelo método de Stauber<sup>36</sup> em 60-70 dias após o inóculo. Promastigotas de *L. chagasi* foram cultivadas em meio M199 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 0,25% de hemina e 5% de urina humana, a 24 °C. Com o objetivo de se verificar a efetividade do halistanol-A em *L. chagasi*, realizou-se a determinação da concentração efetiva 50% (CE<sub>50</sub>) em diferentes concentrações (150 a 0,073 µg/mL), utilizando-se ainda o isotiocianato de pentamidina (Eurofarma) como fármaco padrão. O halistanol-A foi previamente dissolvido em DMSO e posteriormente diluído em meio M199, sendo incubado por um período de 48 h com 1x10<sup>6</sup> promastigotas/poço (previamente contados em hemocítômetro-Neubauer) em placas de 96 poços (triplicata). A viabilidade dos promastigotas foi verificada através de microscopia óptica e do ensaio com MTT<sup>37</sup>. Basicamente, o MTT (5 mg/mL) foi dissolvido em tampão fosfato-salina (PBS), esterilizado em membranas de 0,22 µm e adicionado em um volume de 20 µL/poço. A placa foi novamente incubada por 4 h a 24 °C. A extração da formazana foi realizada através da adição de dodecil sulfato de sódio (100 µL/poço) adicionando-se 10% em HCl 0,01M por um período de 18 h. A densidade óptica dos poços foi verificada em um espectrofotômetro Multiskan MS no comprimento de onda de 570 nm. Poços sem a adição de fármacos (formazana e dodecil sulfato de sódio) e com DMSO foram utilizados como controle de viabilidade do ensaio. A concentração efetiva 50% (CE50) foi analisada pelo software Graph Pad Prism 3.0, através de uma curva sigmóide dose-resposta, com base em pelo menos dois ensaios distintos.

#### Ensaio da atividade citotóxica *in vitro*

O método MTT foi utilizado para a determinação da atividade citotóxica de extratos e compostos puros. Colocou-se em microplacas de 96 orifícios, células aderentes de câncer em uma concentração de 2 x 10<sup>3</sup> células/100 µL e células suspensas (HL-60 e CEM) a uma concentração de 2 x 10<sup>4</sup> células/100 µL. As células foram incubadas durante 24 h. Os extratos foram adicionados em concentrações de 0,39-25 µg/mL às culturas e, em seguida, as células foram incubadas por 3 dias. Utilizou-se uma solução de MTT para finalizar o tempo de incubação. A sobrevivência das células foi avaliada em um espectrofotômetro de varredura multicanal a 540 nm.

#### Estudo químico da esponja *Monanchora arbuscula*

A esponja *Monanchora arbuscula* foi coletada em seu habitat natural, na Baía de Todos os Santos, Salvador-BA e imediatamente congelada. Um espécimen padrão (MNRJ 2499) foi depositado no Museu Nacional, UFRJ. O material congelado foi liofilizado, extraído com MeOH (líquidificador), filtrado e o extrato evaporado até obter-se uma suspensão aquosa, a qual foi diluída com MeOH de maneira a obter-se uma solução de composição aproximada MeOH-H<sub>2</sub>O 9:1. Este extrato foi particionado com *n*-hexano. A fração MeOH-H<sub>2</sub>O foi então evaporada, diluída em H<sub>2</sub>O e aplicada a uma resina XAD-2, a qual foi eluída primeiramente com H<sub>2</sub>O e depois com MeOH-AcOEt 1:1. A fração orgânica foi evaporada e o resíduo submetido a uma série de separações cromatográficas envolvendo cromatografias em colunas de sílica-gel derivatizada com grupos cianopropila, colunas de sílica-gel e, por fim, purificação por HPLC (fase reversa C<sub>18</sub>), de maneira a fornecer a isoptilocalina (1) pura (8,3 mg, 0,005%).

#### Isoptilocalina (1)

Goma marrom. HRFABMS: *m/z* 248,21197; [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = + 21,2 (c 0,00335, MeOH); UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (ε): 241 (6025); IV (filme lí-

quido): 3246, 2920, 2851, 1656, 1610, 1585, 1567, 1460, 1406, 1218, 1175, 1108  $\text{cm}^{-1}$ . RMN- $^1\text{H}$  (MeOH- $d_4$ , 400 MHz): 3,89 (m, 1H, CH-3a); 1,83 (m, 2H, CH $_2$ -4); 1,96 (m, 2H, CH $_2$ -5); 2,20 (m, 1H, CH-5a); 1,37 (sl, 2H, CH $_2$ -6); 4,01 (d, 5,4 Hz, 1H, CH-8a); 2,51 (m, 1H, CH-8b); 2,21 (m, 2H, CH $_2$ -1'); 1,37 (sl, 2H, CH $_2$ -2'); 1,37 (sl, 2H, CH $_2$ -3'); 0,95 (t, 6,7 Hz; 3H, CH $_3$ -4'); 1,78 (s, 3H, CH $_3$ -9); RMN- $^{13}\text{C}$  (MeOH- $d_4$ , 100 MHz): 156,4 (C-2); 50,7 (CH $_3$ -3a); 35,3 (CH $_2$ -4); 32,8 (CH $_2$ -5); 37,5 (CH-5a); 31,9 (CH $_2$ -6); 132,9 (C-7); 136,3 (C-8); 54,6 (CH-8a); 41,2 (CH-8b); 19,8 (CH $_3$ -9); 37,1 (CH $_2$ -1'); 31,9 (CH $_2$ -2'); 23,8 (CH $_2$ -3'); 14,4 (CH $_3$ -4').

### Estudo químico da esponja *Aplysina* sp.

A esponja *Aplysina* sp., coletada na Baía de Todos os Santos, Salvador-BA (vouchers MNRJ 2578 e 4173 do Museu Nacional, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ) e preservada em EtOH (696 g) foi filtrada e triturada em liquidificador com MeOH. 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 AcOEt. O extrato em AcOEt foi submetido a uma cromatografia em coluna de sílica gel Sep-Pak (10 g) com um gradiente de MeOH em CH $_2$ Cl $_2$ . Foram obtidas 6 frações desta separação. A primeira fração obtida, AcEA-1, foi submetida a uma cromatografia em Sephadex LH-20 (MeOH). Desta separação foram obtidas 7 frações. Destas frações, a segunda (AcEA-1-2) foi submetida a uma cromatografia em coluna de sílica gel Sep-Pak (2 g) com gradiente de MeOH/AcOEt 1:1 em CH $_2$ Cl $_2$ . Das frações obtidas, a fração AcEA-1-2-2 mostrou ser constituída pela (3',5'-dibromo-4'-etoxi-1'-hidroxi-4'-metoxiciclohexa-2',5'-dienil)acetamida (**2**) (245,7 mg, 0,04%). A terceira fração (AcEA-1-3) foi submetida a uma cromatografia em coluna de sílica gel Sep-Pak (2 g) e purificada por HPLC, utilizando-se uma coluna Waters  $\mu$ Bondapak Phenyl (7,8 x 300 mm) com uma mistura de MeOH/H $_2$ O 1:1 obtendo-se a aeroplisinina-2 (**3**) (1 mg, 0,0001%) e o 7,9-dibromo-6-hidroxi-8-metoxi-4-oxa-3-azaspiro[4.5]dec-2,7,9-trieno-2-carboxilato de etila (**4**) (1,4 mg, 0,0002%). À fração AcEA-1-5 foi adicionado MeOH a frio, o que resultou na precipitação da [3,5-dibromo-4-[(2-oxo-5-oxazolidinil)metoxifenil]-2-oxazolidinona (**5**) (55 mg, 0,008%). A fração AcEA-2 foi submetida a uma cromatografia em Sephadex LH-20 (MeOH), resultando em 8 frações. A segunda (AcEA-2-2) e a quinta (AcEA-2-5) frações desta separação foram purificadas por HPLC, em coluna Waters  $\mu$ Bondapak Phenyl (7,8 x 300 mm) com uma mistura de MeOH/H $_2$ O 1:1 e em coluna CSC Inertsil 150A/ODS 25  $\mu\text{m}$  (25 x 0,94 cm) com uma mistura de ACN/H $_2$ O 65:35, respectivamente, que resultou no isolamento do 2-(3,5-dibromo-4-metoxifenil)-*N,N,N*-trimetiletanamônio (**6**) (7,9 mg, 0,001%) e novamente na substância (**3**) (2,9 mg, 0,0004%).

### (3',5'-dibromo-4'-etoxi-1'-hidroxi-4'-metoxiciclohexa-2',5'-dienil)acetamida (**2**)

Sólido vítreo.  $[\alpha]_D^{25} = +1,80$  (c 0,0167, CHCl $_3$ ); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (e): 260 nm (6500); IV (filme líquido): 3415, 3351, 2978, 2896, 1669, 1628, 1440, 1400, 1322, 1061  $\text{cm}^{-1}$ . RMN- $^1\text{H}$  (CDCl $_3$ , 400 MHz): 6,75 (s, 2H, CH-2 e 6); 2,54 (s, 2H, CH $_2$ -7); 3,13 (s, 3H, CH $_3$ -9); 3,35 (q, 7,1 Hz, 2H, CH $_2$ -10); 1,20 (t, 7,1 Hz, 3H, CH $_3$ -11); RMN- $^{13}\text{C}$  (CDCl $_3$ , 100 MHz): 96,7 (C-4); 124,1 (C-3 e 5); 140,3 (CH-2 e 6); 71,3 (C-1); 44,2 (CH $_2$ -7); 173,2 (C-8); 51,3 (CH $_3$ -9); 60,2 (CH $_2$ -10); 15,4 (CH $_3$ -11).

### Aeroplisinina-2 (**3**)

Sólido vítreo. LREI:  $m/z$  339,8;  $[\alpha]_D^{25} = +57,1$  (c 0,0007, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (e): 283 nm (4056); IV (filme líquido): 3422, 1774, 1320, 1200, 1084  $\text{cm}^{-1}$ ; RMN- $^1\text{H}$  (MeCN- $d_3$ , 500 MHz):

5,15 (s, 1H, CH-1); 6,46 (s, 1H, CH-5); 2,89 e 2,84 (d, 17,7 Hz, 1H, CH $_2$ -7); 3,74 (s, 3H, CH $_3$ -9); RMN- $^{13}\text{C}$  (MeCN- $d_3$ , 125 MHz): 89,1 (CH-1); 77,0 (C-2); 107,6 (C-3); 151,2 (C-4); 119,3 (C-5); 135,5 (CH-6); 42,2 (CH $_2$ -7); 173,7 (C-8); 61,5 (CH $_3$ -9).

### 2,4-dibromo-1-hidroxi-3-metoxi-6-oxa-3-azaspiro[4.5]dec-2,4,8-trieno-8-carboxilato de etila (**4**)

Sólido vítreo.  $[\alpha]_D^{25} = +137,9$  (c 0,0014, MeOH); UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (e): 292 nm (2085); IV (filme líquido): 3422, 1719, 1595, 1262, 1127, 990  $\text{cm}^{-1}$ ; RMN- $^1\text{H}$  (ACN- $d_3$ , 500 MHz): 4,16 (d, 7,3 Hz, 1H, CH-1); 6,41 (s, 1H, CH-5); 3,69 e 3,06 (d, 18,2 Hz; 1H, CH $_2$ -7); 4,29 (q, 7,1 Hz, 2H, CH $_2$ -10); 1,30 (t, 7,1 Hz, 3H, CH $_3$ -11); 3,70 (s, 3H, CH $_3$ -12); RMN- $^{13}\text{C}$  (ACN- $d_3$ , 125 MHz): 75,1 (CH-1); 113,8 (C-2); 149,0 (C-3); 122,3 (C-4); 132,3 (CH-5); 92,6 (C-6); 40,0 (CH $_2$ -7); 153,3 (C-8); 161,0 (C-9); 63,0 (CH $_2$ -10); 14,4 (CH $_3$ -11); 60,8 (CH $_3$ -12).

### Estudo da esponja *Petromica ciocalyptoides*

A esponja foi coletada na Baía de Todos os Santos em 1999 e imediatamente congelada. O material congelado foi liofilizado, extraído com MeOH (liquidificador), filtrado e o extrato evaporado até obter-se uma suspensão aquosa, a qual foi diluída com MeOH de maneira a obter-se uma solução de composição aproximada MeOH-H $_2$ O 9:1. Este extrato foi particionado com *n*-hexano. A fração polar foi evaporada, dissolvida em MeOH e submetida a uma separação por cromatografia de permeação em gel de Sephadex LH-20 (MeOH). A segunda fração obtida dessa cromatografia demonstrou ser ativa no bioensaio de inibição da L-APRT e foi purificada em uma coluna de fase reversa C $_{18}$  eluída com um gradiente de MeOH em H $_2$ O. A quarta fração obtida desta separação demonstrou ser ativa contra a L-APRT fornecendo o trissulfato de halistanol A puro (0,154 g, 0,18%).

### Trissulfato de halistanol A (**7**)

Sólido amorfo bege.  $[\alpha]_D^{29,4} = +9,97$  (c 0,084, MeOH); RMN  $^1\text{H}$  (MeOH- $d_4$ , 400 MHz): 2,11 (dl, 14,3; CH $_2$ -1); 1,46 (m; CH $_2$ -1); 4,75 (sl; CH-2); 4,80 (sl; CH-3); 2,29 (dl, 14,5; CH $_2$ -4); 1,78 (tl, 14,4; CH $_2$ -4); 1,62 (m; CH-5); 4,19 (dt, 4,4 e 10,9; CH-6); 2,36 (dl, 10,2; CH $_2$ -7); 1,04 (m; CH $_2$ -7); 1,53 (m; CH-8); 0,73 (m; CH-9); 1,33 (m; CH $_2$ -11); 2,01 (dl, 12,4; CH $_2$ -12); 1,15 (m; CH $_2$ -12); 1,16 (m; CH-14); 1,61 (m; CH $_2$ -15); 1,11 (d, 6,3; CH $_2$ -15); 1,86 (m; CH $_2$ -16); 1,64 (m; CH $_2$ -16); 1,13 (m; CH-17); 0,69 (sl; CH $_3$ -18); 0,83 (sl; CH $_3$ -19); 1,38 (m; CH-20); 0,95 (d, 7,4; CH $_3$ -21); 1,58 (m; CH $_2$ -22); 0,90 (m; CH $_2$ -22); 0,86 (m; CH $_2$ -23); 0,99 (m; CH $_2$ -24); 0,85 (s; CH $_3$ -26); 0,85 (s; CH $_3$ -27); 0,83 (d; CH $_3$ -28); 0,85 (s; CH $_3$ -29); RMN  $^{13}\text{C}$  (MeOH- $d_4$ , 100 MHz): 39,2 (CH $_2$ -1); 75,7 (CH-2); 75,8 (CH-3); 25,1 (CH $_2$ -4); 45,4 (CH-5); 78,8 (CH-6); 40,1 (CH $_2$ -7); 35,2 (CH-8); 55,8 (CH-9); 37,7 (C-10); 21,9 (CH $_2$ -11); 41,3 (CH $_2$ -12); 43,8 (C-13); 57,6 (CH-14); 25,2 (CH $_2$ -15); 29,2 (CH $_2$ -16); 57,7 (CH-17); 12,5 (CH $_3$ -18); 15,3 (CH $_3$ -19); 37,7 (CH-20); 19,6 (CH $_3$ -21); 37,7 (CH $_2$ -22); 22,03 (CH $_2$ -23); 45,5 (CH $_2$ -24); 34,1 (CH-25); 27,8 (CH $_3$ -26); 27,8 (CH $_3$ -27); 15,0 (CH $_3$ -28); 27,8 (CH $_3$ -29).

### Hidrólise do trissulfato de halistanol A (**7**)

O trissulfato de halistanol A (**7**, 10 mg) foi refluxado em 1 mL de dioxano e 1 mL de uma solução de H $_2$ SO $_4$  10% em H $_2$ O durante 3 h $^{38}$ . Depois deste período, o meio reacional foi neutralizado com solução saturada de NaHCO $_3$  e evaporado até a secura. O material obtido foi redissolvido em H $_2$ O e submetido à extração em fase sólida em coluna de sílica-gel derivatizada com C $_{18}$  (Waters SepPak $^{\circ}$  2 g), eluída com H $_2$ O, H $_2$ O/MeOH 1:1 e MeOH 100%. As frações obtidas foram evaporadas e analisadas por CCD (revelador: solu-



ção de ácido fosfomolibdico em EtOH, seguido de aquecimento em placa a 110 °C durante 2 min). A fração eluída em H<sub>2</sub>O/MeOH 1:1 apresentou o esteroide dessulfatado (6,7 mg, 67% de rendimento), com o qual foram realizadas análises de RMN-<sup>13</sup>C e EM. HRESIMS [M - 2.H<sub>2</sub>O + H]<sup>+</sup> *m/z* 413.2675, calc 412.37052. RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 75 MHz): 69.8, 69.0, 67.5, 56.1, 55.6, 54.5, 45.5, 43.6, 42.3, 42.1, 36.1, 35.1, 33.5, 33.1, 27.9, 27.7, 27.3, 25.3, 24.0, 20.5, 19.1, 15.3, 14.7, 12.1.

#### Acetilação do trissulfato de halistanol A dessulfatado (8)

O composto **8** (6,7 mg) foi transferido para um reator de 2 mL com MeOH, o qual foi evaporado. A amostra foi dissolvida em 0,5 mL de piridina e, em seguida, adicionou-se 0,5 mL de anidrido acético. A reação foi mantida sob agitação magnética por uma noite. Após a reação, os reagentes foram evaporados e o produto purificado por cromatografia em coluna de sílica gel (Waters Sep Pak®, 2 g) com um gradiente de B em A, onde A foi hexano e B foi uma mistura de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-AcOEt 9:2, fornecendo 3,0 mg (44,7 %) do produto **9**.

#### Estudo da esponja *Topsentia ophiraphidites*

A esponja foi coletada na Baía de Todos os Santos em 2004 e imediatamente congelada. O material congelado (574,7 g) foi liofilizado, extraído com MeOH (liqüidificador), filtrado e o extrato evaporado até obter-se uma suspensão aquosa, a qual foi diluída com MeOH de maneira a obter-se uma solução de composição aproximada MeOH-H<sub>2</sub>O 9:1. Este extrato foi particionado com *n*-hexano. A fração hidroalcoólica foi evaporada e ressuspenida em H<sub>2</sub>O, sendo em seguida submetida à outra partição com AcOEt (300 mL, repetindo-se por três vezes), obtendo-se duas frações: a fração AcOEt e a aquosa. A fração aquosa foi evaporada, dissolvida em MeOH e submetida a uma separação cromatográfica em coluna de Sephadex LH-20 (MeOH). A segunda fração obtida dessa cromatografia demonstrou ser ativa no bioensaio de inibição da enzima L-APRT e foi purificada em uma coluna de fase reversa C<sub>18</sub> eluída com um gradiente de MeOH em H<sub>2</sub>O. A quinta fração desta separação demonstrou ser ativa contra a L-APRT, fornecendo o trissulfato de halistanol A puro, o mesmo composto isolado da esponja *Petromica ciocalyptoides* (22,0 mg, 0,003%).

#### Estudo químico da ascídia *Didemnum ligulum*

A ascídia (204 g) foi coletada em São Sebastião-SP em 1999 e conservada em EtOH. O material foi extraído exaustivamente com MeOH, filtrado e evaporado. O extrato evaporado foi diluído com MeOH/H<sub>2</sub>O 9:1 e particionado com *n*-hexano. A fração polar foi evaporada, suspensa em H<sub>2</sub>O e submetida a uma partição líquido-líquido com AcOEt. O extrato AcOEt foi fracionado através de cromatografia de permeação em gel Sephadex LH-20 com eluição isocrática (MeOH) e, em seguida, por cromatografia de fase reversa em coluna de sílica-gel derivatizada com grupos octadecil (C<sub>18</sub>) (Waters Sep Pak® 10 g) utilizando-se gradiente MeOH em H<sub>2</sub>O. A fração contendo compostos nitrogenados (positiva ao reagente de Dragendorff) foi dissolvida em MeOH-*d*<sub>4</sub> (500 µL), transferida para um tubo de RMN e mantida em geladeira a 4 °C. Após 24 h observou-se a formação de cristais monoclinicos, os quais foram cuidadosamente retirados do tubo e analisados por difração por raios-X. Posteriormente, os cristais foram dissolvidos em DMSO-*d*<sub>6</sub> e analisados por RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C, COSY <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H e HMQC. O composto cristalino foi identificado como sendo a asterubina (**10**) (4,0 mg, 0,002%). O sobrenadante em MeOH-*d*<sub>4</sub> foi purificado por cromatografia líquida em coluna de fase reversa, utilizando-se uma coluna Waters µBondapak™ fenil (125 Å/10 µm 7,8 x 300 mm), com uma mistura de MeOH/H<sub>2</sub>O (70:30) como eluente. A

separação foi monitorada em 212 nm, obtendo-se a *N,N*-dimetil-*O*-metiletanolamina (**11**) (10,4 mg, 0,005%).

#### Asterubina (10)

Sólido cristalino incolor, HRESIMS: *m/z* 218,0578, [M + Na]<sup>+</sup>; RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz): 7,53 (s, 3NH); 3,44 (dd, 4,7 e 11,7 Hz; 2H, CH<sub>2</sub>-2); 2,94 (s, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-4 e 4'); 2,72 (t, 4,7 Hz; 2H, CH<sub>2</sub>-1); RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 100 MHz): 155,7 (C-3); 39,0 (C-2); 49,1 (C-1) e 37,8 (C-4 e 4').

#### *N,N*-dimetil-*O*-metiletanolamina (11)

Sólido vítreo amarelo, HRFABMS: *m/z* 104,10813; IV (filme líquido): 3369, 1668, 1622, 1202 cm<sup>-1</sup>; RMN-<sup>1</sup>H (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 400 MHz): 4,0 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-1); 3,5 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-2); 3,2 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-3) e 2,7 (s, 6H, CH<sub>3</sub>-4 e 4'); RMN-<sup>13</sup>C (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 100 MHz): 57 (C-1); 69 (C-2); 54,7 (C-3) e 40,5 (C-4 e 4').

#### Determinação da estrutura cristalina da asterubina (10)

Os dados de difração da asterubina (**10**) foram coletados em um difratômetro automático CAD4 Enraf-Nonius, a 273 K no modo ω-2θ. Os parâmetros de cela unitária foram obtidos e refinados usando 22 reflexões centradas automaticamente. Na Tabela 2 estão listados os principais dados cristalográficos e as condições de refinamento. Os dados de intensidade foram corrigidos pelos fatores de absorção usando o Método PSISCAN<sup>39</sup>. A estrutura foi resolvida através do SIR92<sup>40</sup> e refinada pelo método de mínimos quadrados com matriz completa e sucessivas sínteses de Fourier diferença, usando o sistema WinGX<sup>41</sup>. Os átomos de hidrogênio ligados aos átomos de N foram localizados em mapas de Fourier diferença e foram incluídos no refinamento com parâmetros de deslocamento térmico 1,2 vezes o Ueq do átomo ao qual se ligam. Os demais átomos de hidrogênio foram colocados em suas posições ideais com parâmetros de deslocamento térmico 1,5 vezes o Ueq do átomo ao qual se ligam para hidrogênios de metilas e 1,2 para os demais. Todos os átomos não hidrogênio foram refinados anisotropicamente. Uma representação ORTEP<sup>42</sup> da molécula com os átomos identificados é apresentada na Figura 1. No empacotamento cristalino a molécula de asterubina forma três ligações de hidrogênio intermoleculares entre N1 e O3, N1 e O2 e N3 e O1. A geometria das ligações de hidrogênio, com respectivas operações de simetria, é apresentada na Tabela 3.

#### Estudo do octocoral *Carijoa riisei*

O animal (89 g) foi coletado em São Sebastião (SP) em 1997 e imediatamente imerso em EtOH e mantido a -20 °C. O octocoral foi separado do EtOH de estocagem e triturado em MeOH. Ambos extratos EtOH e MeOH foram reunidos, filtrados e evaporados até um volume de aproximadamente 300 mL. A suspensão hidroalcoólica foi particionada com *n*-hexano, resultando em duas frações que foram evaporadas, pesadas e avaliadas por CCD utilizando-se como reveladores lâmpada de UV (λ = 254 nm), Dragendorff, ácido fosfomolibdico e ninidrina. A fração hexânica foi submetida a uma cromatografia rápida em coluna de sílica gel 230-400 Mesh, utilizando-se um gradiente de AcOEt em *n*-hexano. A quarta fração resultante desta cromatografia foi purificada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando-se uma coluna de fase reversa C<sub>18</sub> CSC-inertsil (150 Å/ODS2, 5 µm) com uma mistura de H<sub>2</sub>O/acetonitrila/isopropanol (35:15:50) como eluente e monitorada em 280 nm. Obteve-se assim, a 18-acetoxipregna-1,4,20-trien-3-ona (**12**) (5 mg, 0,006%).

#### 18-acetoxipregna-1,4,20-trien-3-ona (12)

Sólido vítreo amarelo, LRESIMS: *m/z* 377 [M+Na]<sup>+</sup>; UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (ε): 245 (15600); [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = + 36,25 (c 0,0032, MeOH);



IV (filme líquido): 2939, 1740, 1737, 1663, 1239, 1030, 900  $\text{cm}^{-1}$ .

RMN- $^1\text{H}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz): 7,2 (d, 10,1 Hz; CH-1); 6,11 (dd, 10,1 e 1,85 Hz; CH-2); 6,0 (s; CH-4); 2,50 (ddd, 16,0, 5,0 e 2,0 Hz; CH $_2$ -6); 2,33 (dt, 12,8 Hz; CH $_2$ -6); 0,96 (dd, 13,0 e 2,0 Hz; CH $_2$ -7); 1,95 (d; 13,0 Hz; CH $_2$ -7); 0,73 (m; CH-8); 1,04 (m; CH-9); 1,24 (m; CH $_2$ -11); 1,69 (m; CH $_2$ -11); 1,55 (ddd, 26,0, 13,0 e 3,5 Hz; CH $_2$ -12); 1,71 (m; CH $_2$ -12); 1,22 (m, 12,4; CH-14); 1,80 (m; CH $_2$ -15); 1,68 (m; CH $_2$ -15); 2,05 (m; CH $_2$ -16); 1,05 (m; CH $_2$ -16); 2,08 (m; CH-17); 4,05 (d, 12 Hz; CH $_2$ -18); 3,98 (d, 11,8 Hz; CH $_2$ -18); 1,20 (sl; CH $_3$ -19); 5,79 (ddd, 17,25, 10,35 e 7,6 Hz; CH-20); 4,94 (d, 10,4 Hz; CH $_2$ -21); 4,90 (d, 1,96 Hz; CH $_2$ -21); 2,0 (s; CH $_3$ -23); RMN- $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 125 MHz): 156,6 (CH-1); 127,0 (CH-2); 185,2 (C-3); 123,3 (CH-4); 169,5 (C-5); 32,1 (CH $_2$ -6); 33,6 (CH $_2$ -7); 35,0 (CH-8); 52,3 (CH-9); 43,4 (C-10); 24,5 (CH $_2$ -11); 22,2 (CH $_2$ -12); 46,2 (C-13); 53,7 (CH-14); 26,8 (CH $_2$ -15); 32,2 (CH $_2$ -16); 54,1 (CH-17); 61,5 (CH $_2$ -18); 18,7 (CH $_3$ -19); 139,32 (CH-20); 114,13 (CH-21); 170,5 (C-22); 21,0 (CH $_3$ -23).

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a gentileza do Prof. B. Copp (University of Auckland, Auckland, Nova Zelândia), do Dr. D. E. Williams e Prof. R. J. Andersen (University of British Columbia, Vancouver, Canadá) pela ajuda na obtenção dos espectros de massas de baixa e alta resolução. 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. 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. M. do Nascimento (03/10805-4), S. P. de Lira (03/06471-3) e M. H. Kossuga agradecem, respectivamente, à FAPESP e à CAPES pelas bolsas de estudos concedidas. R. G. S. Berlinck, E. Hajdu, R. M. Rocha e A. G. Ferreira também agradecem ao CNPq pelas bolsas de produtividade em pesquisa.

## Dados cristalográficos

Os dados cristalográficos da estrutura da asterubina (10) foram depositados no Cambridge Crystallographic Data Center, CCDC No. 613063. Cópias destas informações podem ser obtidas com The Director, CCDC, 12 Union Road, Cambridge, CB2 1EZ, UK (e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk ou <http://www.ccdc.cam.ac.uk>).

## REFERÊNCIAS

- Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Munro, M. H. G.; *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 26.
- Berlinck, R. G. S.; Hajdu, E.; Rocha, R. M.; Oliveira, J. H. H. L.; Hernandez, I. L. C.; Selegim, M. H. R.; Granato, A. C.; Almeida, E. V. R.; Nunez, C. V.; Muricy, G.; Peixinho, S.; Pessoa, C.; Moraes, M. O.; Cavalcanti, B. C.; Nascimento, G. G. F.; Thiemann, O.; Silva, M.; Souza, A. O.; Silva, C. L.; Minarini, P. R. R.; *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 510.
- Harbour, G. C.; Tymiak, A. A.; Rinehart Jr, K. L.; Shaw, P. D.; Hughes Jr, R. G.; Mizsak, S. A.; Coats, J. H.; Zurenko, G. E.; Li, L. H.; Kuentzel, S. L.; *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 5604.

- Gallimore, W. A.; Kelly, M.; Scheuer, P. J.; *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1420.
- Berlinck, R. G. S.; Kossuga, M. H.; *Nat. Prod. Rep.* **2005**, *22*, 516 e referências citadas.
- van Soest, R. W. M.; Braekman, J. C.; Faulkner, D. J.; Hajdu, E.; Harper, M. K.; Vacelet, J.; *Bull. Inst. R. Sci. Nat. Belg.* **1996**, *66* (suppl.), 89.
- Lira, T. O.; Berlinck, R. G. S.; Nascimento, G. G. F.; Hajdu, E.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2006**, *17*, 1233.
- Pinheiro, U.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2002.
- Andersen, R. J.; Faulkner, D. J.; *Tetrahedron Lett.* **1973**, *14*, 1175.
- Minale, L.; Sodano, G.; Chan, W. R.; Chen, A. M.; *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1972**, *11*, 674.
- Ciminiello, P.; Constantino, V.; Fattorusso, E.; Magno, S.; Mangoni, A.; Pansini, M.; *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 705.
- Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Fattorusso, E.; Magno, S.; Carrano, L.; Pansini, M.; *Tetrahedron* **1996**, *52*, 9863.
- Aiello, A.; Fattorusso, E.; Menna, M.; Pansini, M.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1995**, *23*, 377.
- Ogamino, T.; Nishiyama, S.; *Tetrahedron* **2003**, *59*, 9419.
- Kossuga, M. H.; Macmillan, J. B.; Rorgers, E. W.; Molinski, T. F.; Nascimento, G. G. F.; Rocha, R. M.; Berlinck, R. G. S.; *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1879.
- Granato, A. C.; Oliveira, J. H. H. L.; Selegim, M. H. R.; Berlinck, R. G. S.; Macedo, M. L.; Ferreira, A. G.; Rocha, R. M.; Hajdu, E.; Peixinho, S.; Pessoa, C.; Moraes, M. O.; Cavalcanti, B. C.; *Quim. Nova* **2005**, *28*, 192.
- Fusetani, N.; Matsunaga, S.; Konosu, S.; *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 1985.
- Kanazawa S.; Fusetani N.; Matsunaga S.; *Tetrahedron* **1992**, *48*, 5467.
- Sperry, S.; Crews, P.; *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 29.
- Yang, S. W.; Buivich, A.; Chan, T. M.; Smith, M.; Lachowicz, J.; Pomponi, S. A.; Wright, A. E.; Mierzwa, R.; Patel, M.; Gullo, V.; Chu, M.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1791.
- Moni, R. W.; Willis, R. J.; Quinn, R. J.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, *2*, 1631.
- Slate, D. L.; Lee, R. H.; Rodriguez, J.; Crews, P.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *203*, 260.
- Tsakamoto, S.; Kato, H.; Hirota, H.; Fusetani, N.; *Biofouling* **1997**, *11*, 283.
- Kornprobst, J. M.; Sallenave, C.; Barnathan, G.; *Comp. Biochem. Physiol. B – Biochem. Mol. Biol.* **1998**, *119*, 1.
- Gray, C.; Lira, S. P.; Silva, M.; Pimenta, E. F.; Thiemann, O. H.; Oliva, G.; Andersen, R. J.; Hajdu, E.; Berlinck, R. G. S.; *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 8685.
- Davidson, B. S.; *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1771; Ding, Q.; Chichak, K.; Lown, J. W.; *Curr. Med. Chem.* **1999**, *6*, 1; Selvi, S. T.; Mohan, P. S.; *Indian J. Chem. Sect. B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.* **1999**, *38*, 1118; Groundwater, P. W.; Munawar, M. A.; *Adv. Heterocycl. Chem.* **1998**, *70*, 89.
- Ackermann, D.; *Z. Physiol. Chem.* **1935**, *232*, 206; Ackermann, D.; *Verh. Physik.-Med. Ges. Wurzburg* **1936**, *59*, 73.
- Capon, R.; comunicação pessoal.
- Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M.; *Princípios de Bioquímica*, 2ª ed., Sarvier: São Paulo, 1995, p. 494-495.
- Shen, Y.; Cheng, Y.; Lin, Y.; Guh, J.; Teng, C.; Ko, C.; *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 542.
- Lyanage, G. K.; Schmitz, F. J.; *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 148.
- Maia, L. F.; Epifanio, R. A.; Fenical, W.; *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1427.
- Baker, B. J.; Okuda, R. K.; Yu, P. T. K.; Scheuer, P. J.; *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 2976.
- Baker, B. J.; Scheuer, P. J.; *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 1346.
- Ross, R. A.; Scheuer, P. J.; *Tetrahedron Lett.* **1979**, 4701.
- Zapantiss, A.; Lacy, M. K.; Horvat, R. T.; Grauer, D.; Barnes, B. J.; O'Neal, B.; Couldry, R.; *J. Clin. Microbiol.* **2005**, *43*, 2629.
- Hjerstedt, J.; Hahn, B. L.; Kos, W. L.; Sohnle, P. G.; *Mycoses* **1998**, *41*, 487.
- Aoki, S.; Naka, Y.; Itoh, T.; Furukawa, T.; Rachmat, R.; Akiyama, S.; Kobayashi, M.; *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 827.
- North, A. C. T.; Phillips, D. C.; Mathews, F. S.; *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Crystallogr.* **1968**, *24*, 351.
- Altomare, A.; Cascarano, G.; Giacovazzo, C.; Guagliardi, A.; *J. Appl. Crystallogr.* **1993**, *26*, 343.
- Farrugia, L. J.; *J. Appl. Crystallogr.* **1999**, *32*, 837.
- Farrugia, L. J.; *J. Appl. Crystallogr.* **1997**, *30*, 565.