

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DAS ESPONJAS *Aplysina fistularis* E *Dysidea* sp. E ATIVIDADE ANTITUBERCULOSE DA 11-CETOFISTULARINA-3

Renata C. Gandolfi, Marina B. Medina e Roberto G. S. Berlinck*

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

Simone P. Lira

Departamento de Ciências Exatas, Escola Superior de Agricultura "Luiz Queiroz", Universidade de São Paulo, CP 9, 13418-900 Piracicaba - SP, Brasil

Fabio Cícero de Sá Galetti e Célio L. Silva

Farmacore Biotecnologia Ltda, Ribeirão Preto - SP, / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, 14049-900 Ribeirão Preto - SP, Brasil

Katycyca Veloso e Antonio G. Ferreira

Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, CP 676, 13560-970 São Carlos - SP, 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, Campus Univ. Ondina, 40170-290 Salvador - BA, Brasil

Recebido em 1/12/09; aceite em 9/6/10; publicado na web em 24/9/10

SECONDARY METABOLITES FROM THE SPONGES *Aplysina fistularis* AND *Dysidea* sp. AND THE ANTITUBERCULOSIS ACTIVITY OF 11-KETOFISTULARIN-3. The present investigation reports the isolation of aeropylsinin-2, 2-(3,5-dibromo-4-methoxyphenyl)-*N,N,N*-trimethyletanamionium, 7,9-dibromo-10-hydroxy-8-methoxy-1-oxa-2-azaspiro[4.5]deca-2,6,8-trien-3-carboxylic acid and its methyl ester, 11-oxoaerotionin, aerotionin, 11-keto-12-hydroxyaerotionin, 11-ketofistularin-3 and fistularin-3 from *Aplysina fistularis*, as well as of furodysinin lactone and 9 α ,11 α -epoxicholest-7-en-3 β ,5 α ,6 α ,10-tetrol-6-acetate from *Dysidea* sp. Although the extracts of both sponges displayed antituberculosis activity, only 11-ketofistularin-3 isolated from *A. fistularis* displayed antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* H34Rv, with MIC at 16 μ g/mL and SI of 40, a result that reinforce that fistularin-3 derivatives are interesting leads for the development of antituberculosis drugs.

Keywords: marine sponge; *Aplysina fistularis*; *Dysidea* sp..

INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma doença respiratória prevalente em todo o mundo. Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada com o agente etiológico causador da tuberculose, a micobactéria *Mycobacterium tuberculosis*. Considerada doença erradicada durante os anos 60-70, a tuberculose ressurgiu nos anos 80 associada a linhagens resistentes a antibióticos, de difícil tratamento, que exige 6 meses ininterruptos de quimioterapia. Considera-se que a tuberculose é um dos maiores problemas de saúde pública, especialmente quando associada com doenças que promovem deficiência de imunidade, tais como AIDS.^{1,2} Neste contexto, a busca por novos agentes terapêuticos para o tratamento da tuberculose tem chamado a atenção.

Dois dentre os cinco principais antibióticos utilizados no tratamento de tuberculose são de origem natural. A estreptomicina (**1**), originalmente isolada das actinobactérias *Streptomyces lavendulae* e *S. griseus*, atua sobre *M. tuberculosis* inibindo a síntese proteica por parte da subunidade ribossomal 30S. Já a rifampicina (**2**) é um derivado da rifamicina (**3**), a qual foi originalmente isolada de *S. mediterranei*. A rifampicina atua sobre *M. tuberculosis* inibindo a transcrição da subunidade β da RNA polimerase.³ Além da estreptomicina e da rifampicina, dentre os sete antibióticos de segunda linha utilizados no tratamento de tuberculose, quatro são produtos naturais ou derivados de produtos naturais.³ Sendo assim, é evidente a importância de produtos do metabolismo se-

cundário na descoberta e desenvolvimento de medicamentos para o tratamento da tuberculose.⁴⁻¹⁰

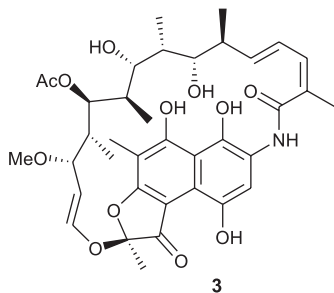
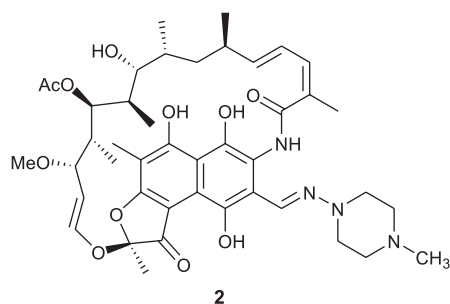
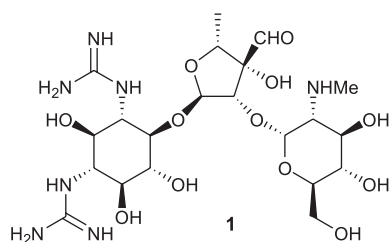
A prospecção de extratos de invertebrados marinhos da costa do Brasil com atividade antituberculose¹¹ levou-nos à descoberta de derivados da dibromotirosina,¹² bem como de alcaloides alquilpiridínicos¹³ e alquilpiperidínicos¹⁴ ativos contra *M. tuberculosis* H37Rv. A continuidade deste programa nos levou a investigar os extratos de duas esponjas marinhas, *Aplysina fistularis* e *Dysidea* sp., das quais os extratos metanólicos apresentaram atividade antituberculose contra *M. tuberculosis* H37Rv. O único composto ativo isolado, a 11-ceto-fistularina-3, apresentou potente atividade antituberculose e excelente índice de seletividade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Investigação química do extrato MeOH da esponja *Aplysina fistularis*

O extrato metanólico de *A. fistularis* foi submetido a várias separações cromatográficas (ver Parte Experimental), resultando na obtenção dos derivados da dibromotirosina aeroplisinina-2 (**4**),¹⁵ 2-(3,5-dibromo-4-metoxifenil)-*N,N,N*-trimetiletanamônio (**5**),¹⁶ o ácido 7,9-dibromo-10-hidroxi-8-metoxi-1-oxa-2-azaspiro[4.5]deca-2,6,8-trieno-3-carboxílico (**6**),¹⁷ bem como o éster metílico deste último (**7**),¹⁸ a 11-oxoaerotionina (**8**),¹⁹ a aerotionina (**9**),²⁰ a 11-ceto-12-hidroxi-aerotionina (**10**),²¹ a 11-cetofistularina-3 (**11**)²² e a fistularina-3 (**12**).²³ Todos os derivados da dibromotirosina isolados de

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



A. fistularis coletada na Baía de Todos os Santos foram identificados pela análise de seus dados espectroscópicos e por comparação com dados da literatura, cujas referências para comparação são indicadas para os compostos **4-12** na seção experimental.

Todos os compostos isolados de *A. fistularis* da Baía de Todos os Santos já foram isolados de outras esponjas marinhas da ordem Verongida, inclusive da costa do Brasil. A aeroplisinina-2 (**4**) foi por nós isolada anteriormente a partir de uma esponja do gênero *Aplysina*.²⁴ O 2-(3,5-dibromo-4-metoxifenil)-*N,N,N*-trimetiletanamônio (**5**) foi por nós anteriormente isolado da esponja *Verongula gigantea*.²⁵ O ácido **6** e seu respectivo éster metílico **7** não foram anteriormente isolados de esponjas Verongida do Brasil, e sim das esponjas *Verongula* sp.,¹⁶ *Pseudoceratina* sp.¹⁷ e *Verongula gigantea*²⁶ do Caribe. Todavia, o éster etílico de **6** foi por nós isolado de *Aplysina* sp.²⁴ Embora o nome sistemático IUPAC 7,9-dibromo-10-hidroxi-8-metoxi-1-oxa-2-azaspiro[4.5]deca-2,6,8-trieno-3-carboxílico possa ser utilizado para designar o composto **6**, o grupo de Fattorusso não propôs outra designação para esta substância.^{16,17,26} Desta forma, propomos aqui o nome ácido verongidoico para **6** e éster metílico do ácido verongidoico para **7**. Tal designação se justifica pelo fato de o ácido **6** ser a unidade estrutural mais comumente encontrada em derivados da dibromotirosina isolados de esponjas marinhas da ordem Verongida. A 11-oxoaerotionina (**8**) foi por nós anteriormente isolada da esponja *A. fulva* também da Baía de Todos os Santos, bem como a aerotionina (**9**) e a 11-oxo-12-hidroxi-aerotionina (**10**).²⁷ Já a 11-cetofistularina-3 (**11**) foi isolada anteriormente das esponjas *Aplysina archeri*²² e *Aplysina* sp..²⁸ Por fim, a fistularina-3 (**12**) foi por nós isolada a partir das esponjas *A. cauliformis*,¹² *A. fulva*^{27,29} e *A. caissara*.³⁰

Análises de dicroísmo circular realizadas com os compostos **4**, **6-12** indicaram que as configurações absolutas dos centros estereogênicos C-1 e C-6, bem como C-1' e C-6' nos compostos **8-12** são todos

1(*R*), 6(*S*) e 1'(*R*), 6'(*S*). Estas análises foram realizadas e comparadas como anteriormente descrito para compostos correlatos isolados de *A. caissara*.³⁰ Os resultados obtidos das análises de dicroísmo circular reforçam, de maneira contundente, a proposta de rota biogênica por nós discutida para derivados da dibromotirosina que apresentam o ácido verongidoico (**6**) em sua estrutura.²⁷

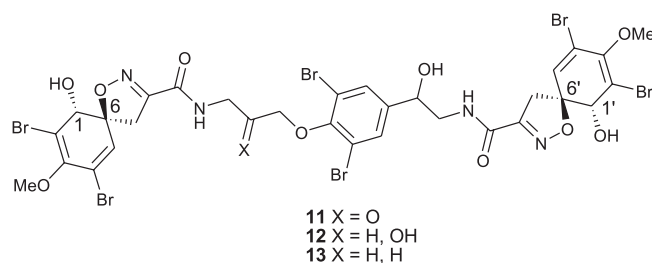
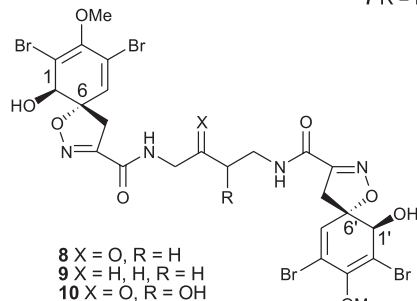
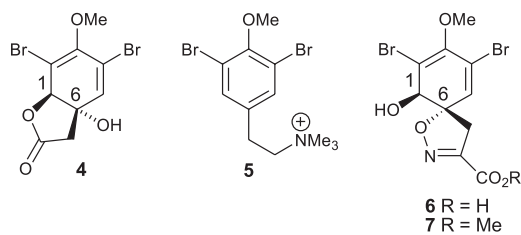
Estudos anteriores realizados com a esponja *A. fistularis* levaram ao isolamento da aerotionina (**9**),³¹ bem como de uma série de derivados da dibromotirosina obtidos em estudos de biossíntese.^{32,33} É importante ressaltar que espécies designadas *Aplysina fistularis* forma *fulva*²⁴ e *Aplysina fistularis-fulva*³⁴ se referem à espécie *A. fulva*, enquanto que *Aplysina fistularis insularis*³⁵ se refere à espécie *Aplysina insularis*. Logo, as fistularinas-1, -2 e -3 foram originalmente isoladas de *A. fulva* (= *A. fistularis* forma *fulva*), mas não de *A. fistularis*.²³ Sendo assim, esta é a primeira investigação exaustiva dos metabólitos secundários da espécie *A. fistularis*.

Após o isolamento dos compostos **4-11** a partir de *A. fistularis*, estes foram testados contra *M. tuberculosis* H37Rv, mas somente a 11-cetofistularina-3 (**11**) apresentou atividade antimicrobiana. A fistularina-3 (**12**) e a 11-desoxi-fistularina-3 (**13**) já haviam sido testadas contra *M. tuberculosis* H37Rv, e apresentaram MIC de 7,1 e 7,3 µg/mL, respectivamente. Os índices de seletividade (IS = IC₅₀/MIC) dos compostos **12** e **13** contra macrófagos J774 foram de 28,17 e 86,13, respectivamente. No caso da 11-cetofistularina-3 (**11**), esta apresentou MIC de 16 µg/mL e SI de 40, e esta é a primeira avaliação deste composto em bioensaio de atividade antituberculose. Estes dados reforçam nossa hipótese de que o estado de oxidação em C-11 na estrutura das fistularinas **11-13** pouco afeta a ação antimicrobiana destes compostos.¹² Considerando-se os excelentes índices de seletividade apresentados pelos compostos **11-13** frente a *M. tuberculosis* H37Rv, esta classe de substâncias constitui um bom modelo para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento da tuberculose. Sendo assim, foi depositada patente no INPI para o possível desenvolvimento de fistularinas e derivados no tratamento de tuberculosos.³⁶

Investigação química da esponja *Dysidea* sp.

Esponjas do gênero *Dysidea* são, ao lado das esponjas da ordem Verongida, das mais estudadas do ponto de vista químico/farmacológico,³⁷ e também do grupo de esponjas que vem sendo estudado há quase 40 anos.³⁸ Metabólitos de classes diversas já foram isolados de esponjas marinhas do gênero *Dysidea*, os quais incluem fenóis bromados, terpenos, peptídeos modificados, derivados de ácidos graxos incomuns, neurotoxinas e alcalóides.³⁹ Recentemente reportamos os resultados das primeiras investigações químicas de esponjas do gênero *Dysidea* oriundas do litoral do Brasil, que resultaram no isolamento de ceramidas saturadas³⁹ e de derivados do ácido pirodisinoico.³⁹ Outras amostras de esponjas deste gênero foram coletadas no litoral da Baía de Todos os Santos,¹¹ dentre as quais uma amostra da esponja *Dysidea* sp.. O extrato MeOH desta esponja (BA99ES-38) apresentou atividade antibiótica contra 4 linhagens de *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina e contra *M. tuberculosis* H37Rv, bem como atividade citotóxica sobre a linhagem de células de câncer de cólon HCT-8.¹¹

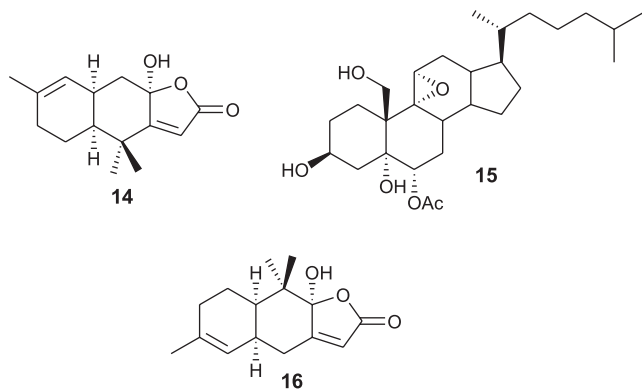
O fracionamento do extrato MeOH de *Dysidea* sp. por partição líquido-líquido e por uma série de separações cromatográficas (ver Parte Experimental) levou ao isolamento da lactona da furodisinina (**14**) e ao esterol 9 α ,11 α -epoxicolest-7-eno-3 β ,5 α ,6 α ,10-tetrol-6-acetato (**15**). A lactona da furodisinina **14** foi originalmente isolada da esponja *Dysidea etheria*.⁴⁰ O esterol altamente oxigenado **15** foi isolado de outra esponja *Dysidea* sp. da ilha de Guam e teve sua estrutura completamente estabelecida por Gunasekera e Schmitz em 1983,⁴¹ tendo sido reisolado como substância inédita em 2005 por



Huang e colaboradores a partir de uma esponja do gênero *Dysidea* do Mar da China.⁴² O composto **15** apresentou atividade antifúngica contra *Candida albicans*, inibindo a bomba de efluxo de fluconazol,⁴³ porém se mostrou inativo nos testes de atividade antituberculose contra *M. tuberculosis* H37Rv por nós realizados.

O sesquiterpeno **14** teve sua estrutura elucidada como sendo a lactona da furodisinina, pela análise de seus dados espectroscópicos e espectrométricos (EMAR, RMN-¹H, RMN-¹³C, HSQC, COSY ¹H-¹H e ROESY) e pela comparação de seus dados espectroscópicos com dados da literatura.⁴⁰ Como discutido por Grode e Cardellina,⁴⁰ a distinção entre a lactona da furodisinina (**14**) e a lactona da furodisina (**16**) não é trivial, e requer uma cuidadosa análise dos dados espectroscópicos. Os dados de **14** concordam de maneira excelente com os dados da literatura para a lactona da furodisinina,⁴⁰ e diferem dos dados reportados para a lactona da furodisina (**16**).⁴³ Infelizmente a pequena quantidade isolada do composto **14** não nos permitiu sua avaliação no bioensaio de atividade antituberculose.

Em conclusão, o presente trabalho apresenta o primeiro isolamento de derivados da dibromotirosina da esponja *Aplysina fistularis*, dos



quais a 11-ceto-fistularina-3 (**11**) apresentou atividade antituberculose com excelente índice de seletividade. Além disso, a investigação química do extrato ativo contra *M. tuberculosis* da esponja *Dysidea* sp., também realizado pela primeira vez, levou-nos a obter a lactona da furodisinina (**14**) e o esteroide altamente oxigenado **15**, dos quais o último mostrou ser inativo no teste de atividade antituberculose.

Material suplementar

Espectros de RMN-¹H e RMN-¹³C dos compostos aeroplisinina-2 (**4**), 2-(3,5-dibromo-4-metoxifenil)-*N,N,N*-trimetiletanamônio (**5**), ácido verongídico (**6**), éster metílico do ácido verongídico (**7**), 11-oxoaerotionina (**8**), aerotionina (**9**), 11-ceto-12-hidroxi-aerotionina (**10**), 11-cetofistularina-3 (**11**) e fistularina-3 (**12**), estão disponíveis em <http://quimicanova.s bq.org.br>, na forma de arquivo PDF, com acesso livre.

PARTE EXPERIMENTAL

Generalidades

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em um aparelho FT-IR Bomem MB102 em pastilha de silício. Para as medições de rotação específica foi usado um polarímetro 241 Perkin-Elmer. Os espectros na região do ultravioleta foram obtidos em MeOH, em um aparelho Hitachi U-3210. Os espectros de RMN foram obtidos em DMSO-*d*₆, MeOH-*d*₄, MeCN-*d*₃ ou CDCl₃, a 25 °C utilizando TMS como padrão interno, com um aparelho Bruker ARX 9.4 Tesla operando em 400,35 MHz (¹H) e 100,10 MHz (¹³C). 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 IHHQ, em modo FAB. Solventes de grau analítico (P.A.) 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, usando 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.

Ensaio da atividade antimicrobacteriana *in vitro*

O procedimento deste bioensaio foi realizado exatamente como descrito anteriormente.²⁴

Estudo químico da esponja *Aplysina fistularis*

A esponja *Aplysina fistularis* (534,5 g) foi coletada em seu habitat natural, na Baía de Todos os Santos, Salvador-BA, em 1999, e imediatamente congelada. Um espécimen padrão (MNRJ 2666) foi depositado no Museu Nacional, UFRJ. O material congelado foi liofilizado e mantido em EtOH 93% a -20 °C. Quando da extração, o EtOH de preservação foi filtrado e o animal foi re-extraído com MeOH (triturado em liquidificador). O extrato MeOH foi filtrado, combinado com o EtOH de preservação e o extrato alcoólico foi evaporado até se obter uma suspensão aquosa. Esta foi diluída com MeOH de maneira a se obter uma solução de composição aproximada MeOH-H₂O 9:1. Esta solução (500 mL) foi particionada com *n*-hexano (3 x 500 mL). A fração MeOH-H₂O foi então evaporada, diluída em H₂O (500 mL) particionada com AcOEt (3 x 500 mL).

A fração AcOEt foi evaporada até a secura. Foram obtidos 2,2 g do extrato *n*-hexano e 5,5 g do extrato AcOEt. A fração aquosa foi evaporada até a secura, da qual se obteve 11,7 g.

O extrato AcOEt foi submetido a uma separação por cromatografia de permeação em gel de Sephadex LH-20 (50 g, 170 x 2 cm), utilizando-se MeOH como eluente. Foram obtidas 7 frações, Afis-AcOEt-A (274 mg), Afis-AcOEt-B (172 mg), Afis-AcOEt-C (37 mg), Afis-AcOEt-D (295 mg), Afis-AcOEt-E/F (234 mg), Afis-AcOEt-G (686 mg) e Afis-AcOEt-H (171 mg). A fração Afis-AcOEt-A não apresentou derivados de dibromotirosina.

A fração Afis-AcOEt-B foi submetida a uma separação por cromatografia em coluna de sílica gel derivatizada com grupos cianopropila (5 g), utilizando-se um gradiente de AcOEt/MeOH 1:1 em CH₂Cl₂ (10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50 e 100% AcOEt/MeOH 1:1). Após a análise por cromatografia em camada delgada (CCD) das 36 frações obtidas (eluente: CH₂Cl₂/MeOH 9:1; revelador: UV, 254 nm), estas foram reunidas em frações: Afis-AcOEt-B1 (104 mg), Afis-AcOEt-B2 (15 mg) e Afis-AcOEt-B3 (23 mg). A fração Afis-AcOEt-B1 foi submetida a uma separação por cromatografia em coluna de sílica gel derivatizada com grupos cianopropila (5g), utilizando-se um gradiente de AcOEt/MeOH 8:2 em CH₂Cl₂ (10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 100% AcOEt/MeOH 8:2). A análise por CCD (eluente: CH₂Cl₂/MeOH 9:1; revelador: UV, 254 nm) permitiu reunir as 42 frações obtidas em 3 frações: Afis-AcOEt-B1A (46 mg), Afis-AcOEt-B1B (8 mg) e Afis-AcOEt-B1C/D (14 mg). A fração Afis-AcOEt-B1B mostrou estar pura e foi identificada como sendo o 2-(3,5-dibromo-4-metoxifenil)-*N,N,N*-trimetiletanamônio (**5**).^{16,25}

A fração Afis-AcOEt-C foi submetida a uma separação por cromatografia em coluna de sílica gel derivatizada com grupos octadecila (C₁₈, 5 g), utilizando-se um gradiente de MeOH em H₂O (10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10, 100% MeOH). Após a análise por CCD (eluente: CH₂Cl₂/MeOH 9:1; revelador UV 250 nm), as 100 frações obtidas foram reunidas em 5: Afis-AcOEt-C1 (22 mg), Afis-AcOEt-C2 (2 mg), Afis-AcOEt-C3 (11 mg), Afis-AcOEt-C4 (11 mg) e Afis-AcOEt-C5 (3 mg). Todavia, análises por RMN-¹H indicaram que nenhuma destas frações apresentou derivados da dibromotirosina.

A fração Afis-AcOEt-D foi submetida a uma separação por cromatografia em coluna de sílica gel derivatizada com grupos cianopropila (5 g), utilizando-se um gradiente de A (AcOEt/MeOH 9:1) em B (CH₂Cl₂/éter de petróleo 8:2). As proporções de A e B foram de 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 100% A. Foram obtidas 144 frações, as quais, após análise por CCD (eluente: CH₂Cl₂/MeOH 9:1; revelador: UV 254 nm), puderam ser reunidas em 4 frações: Afis-AcOEt-D1 (28 mg), Afis-AcOEt-D2 (84 mg), Afis-AcOEt-D3 (21 mg), Afis-AcOEt-D4 (47 mg). Análises por RMN-¹H das frações obtidas não indicaram a presença de derivados da dibromotirosina.

A fração Afis-AcOEt-E/F foi submetida a uma separação por cromatografia em coluna de sílica gel em modo "relâmpago", utilizando-se um gradiente de A (AcOEt/MeOH 95:5) em B (CH₂Cl₂/éter de petróleo 8:2). As proporções utilizadas de A e B foram de 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 100% A. Foram obtidas 93 frações as quais, após análise por CCD (eluente: CH₂Cl₂/MeOH; revelador UV 254 nm) puderam ser reunidas em 8 frações: Afis-AcOEt-E/F1 (36 mg), Afis-AcOEt-E/F2/3 (25 mg), Afis-AcOEt-E/F4 (3,5 mg), Afis-AcOEt-E/F5 (40 mg), Afis-AcOEt-E/F6 (15 mg), Afis-AcOEt-E/F7 (20 mg), Afis-AcOEt-E/F8/9 (79 mg) e Afis-AcOEt-E/F10 (10 mg). A fração Afis-AcOEt-E/F8/9 foi submetida a uma separação por cromatografia em coluna de sílica gel derivatizada com grupos octadecila (C₁₈, 2 g), utilizando-se um gradiente de MeOH em H₂O (proporções: MeOH/H₂O 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 75:25, 100% MeOH). Após a análise por CCD (eluente: CH₂Cl₂/MeOH 9:1; revelador: UV 254 nm), as 40 frações obtidas foram reunidas em 3

frações: Afis-AcOEt-E/F8/9A (22 mg), Afis-AcOEt-E/F8/9B (15 mg) e Afis-AcOEt-E/F8/9C (30 mg). A fração Afis-AcOEt-E/F2/3 foi purificada por CLAE (coluna: Waters Phenyl μBondapak 7,8 x 300 mm; fluxo: 1,0 mL/min; detector: UV λ_{max} 254 nm; eluente: MeOH/H₂O 8:2) e forneceu o éster metílico do ácido verongidoico (7, 2 mg)¹⁸ e a aeroplisinina-2 (4, 4 mg).^{15,24}

A fração Afis-AcOEt-G foi submetida a uma separação por cromatografia em coluna de sílica gel "relâmpago" (30 g), utilizando-se um gradiente de A (AcOEt/MeOH 95:5) em B (CH₂Cl₂/éter de petróleo 8:2), nas seguintes proporções A/B: 10/90, 20/80, 30/70, 40/60, 50/50, 100% A. Foram obtidas 98 frações que foram analisadas por CCD (eluente: CH₂Cl₂/MeOH 9:1; revelador: UV 254 nm) e reunidas em 7 frações: Afis-AcOEt-G1 (7 mg), Afis-AcOEt-G2 (6 mg), Afis-AcOEt-G3 (3 mg), Afis-AcOEt-G4 (15 mg), Afis-AcOEt-G5 (272 mg), Afis-AcOEt-G6 (152 mg), Afis-AcOEt-G7 (217 mg). A fração Afis-AcOEt-G5 foi separada por CLAE (coluna: Waters Phenyl μBondapak 7,8 x 300 mm; fluxo: 1,0 mL/min; detector: UV λ_{max} 254 nm; eluente: MeOH/H₂O 7:3). A fração Afis-AcOEt-G5D (80 mg) foi identificada como sendo a fistularina-3 (**12**).¹² A fração Afis-AcOEt-G5E (28 mg) foi identificada como sendo a 11-cetofistularina-3 (**11**).²² A fração Afis-AcOEt-G6 foi separada por CLAE (coluna: Phenomenex C₁₈, 19 x 300 mm; fluxo: 2,0 mL/min; detector: UV λ_{max} 254 nm; eluente: MeOH/H₂O 9:1). A terceira fração desta separação, Afis-AcOEt-G6C (121,2 mg) foi submetida a uma repurificação por CLAE (coluna: Waters Phenyl μBondapak de 7,8 x 300 mm; fluxo: 1,0 mL/min; detector: UV λ_{max} 254 nm; eluente: MeOH/H₂O 55:45). A fração Afis-AcOEt-G6C3 (1,4 mg) foi identificada como sendo o ácido verongidoico (**6**).¹⁷ A fração Afis-AcOEt-G6C6 (15 mg) foi identificada como sendo a 11-oxo-12-hidroxi-aerotionina (**10**).²¹ A fração Afis-AcOEt-G6C7 (18 mg) foi identificada como sendo a 11-oxo-aerotionina (**8**).¹⁹ A fração Afis-AcOEt-G6C8 (4 mg) foi identificada como sendo a aerotionina (**9**).^{20,21}

A fração Afis-AcOEt-H foi submetida a uma separação por cromatografia em coluna de sílica gel "relâmpago" (30 g), utilizando-se um gradiente de A (AcOEt/MeOH 95:5) em B (CH₂Cl₂/éter de petróleo 8:2), nas seguintes proporções A/B: 10/90, 20/80, 30/70, 40/60, 50/50, 100% A. Foram obtidas 88 frações que puderam ser reunidas em 3 após análise por CCD (eluente: CH₂Cl₂/MeOH 9:1; revelador: UV 254 nm): Afis-AcOEt-H1 (15 mg), Afis-AcOEt-H2 (58 mg), Afis-AcOEt-H3 (34 mg). Análises por RMN-¹H das frações obtidas não indicaram a presença de derivados da dibromotirosina.

Estudo químico da esponja *Dysidea* sp.

A esponja *Dysidea* sp., coletada na Baía de Todos os Santos, Salvador-BA em 1999, e foi imediatamente congelada após a coleta. Um espécimen padrão (MNRJ 2480) foi depositado no Museu Nacional, UFRJ. A esponja foi liofilizada e submetida a três extrações com MeOH após trituração em liquidificador. O extrato MeOH foi filtrado e parcialmente evaporado até um volume final de 400 mL. A suspensão hidroalcoólica foi particionada com *n*-hexano (3 x 400 mL). A fração hexânica (Dv-hex) foi evaporada até a secura e forneceu 1,6 g. A fração MeOH/H₂O foi evaporada até a total remoção do MeOH. A suspensão aquosa obtida foi diluída com H₂O até um volume final de 400 mL. Esta suspensão foi particionada com AcOEt. Após evaporação das frações AcOEt e H₂O obtiveram-se os extratos Dv-AcOEt (1,2 g) e Dv-Aq (6,1 g). Após análise por CCD (eluentes: CH₂Cl₂/MeOH 9:1, 8:2 e 7:3; reveladores: UV, ninidrina e Dragendorff) a fração H₂O foi descartada por não apresentar compostos de interesse.

O extrato Dv-hex (1,6 g) foi submetido a uma separação por cromatografia em coluna de sílica gel (10 g), utilizando-se como eluente um gradiente de AcOEt em *n*-hexano (10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10, 100% AcOEt). Foram

obtidas 11 frações diferentes: Dv-hex-1 (0,18 g), Dv-hex-2 (0,11 g), Dv-hex-3 (0,3 g), Dv-hex-4 (0,17 g), Dv-hex-5 (0,18 g), Dv-hex-6 (0,16 g), Dv-hex-7 (0,03 g), Dv-hex-8 (0,05 g), Dv-hex-9 (0,03 g), Dv-hex-10 (0,4 g) e Dv-hex-11 (0,01 g). As frações Dv-hex-5 e Dv-hex-6 apresentaram compostos com intensa absorção no UV em placa de CCD (eluente: *n*-hexano/AcOEt 7:3), razão pela qual o estudo destas frações foi priorizado.

A fração Dv-hex-5 foi submetida a uma cromatografia em coluna pré-empacotada de sílica gel (2 g) utilizando-se como eluente um gradiente de AcOEt (solvente A) em *n*-hexano/CH₂Cl₂ 1:1 (solvente B) nas proporções A/B 10/90, 20/80, 30/70, 40/60, 50/50, 100% A e 100% MeOH. Após análise por CCD das 60 frações obtidas (eluente: *n*-hexano/AcOEt 7:3; revelador: UV 254 nm e spray de ácido fosfomolibdico, seguido de aquecimento em placa a cerca de 80 °C) estas foram reunidas em 8 frações, denominadas Dv-hex-5A a Dv-hex-5F, Dv-hex-5AcOEt (eluída com AcOEt 100%) e Dv-hex-5MeOH (eluída com MeOH 100%). A fração Dv-hex-5B (0,011 g) apresentou composto majoritário ainda impuro, e foi purificada por CLAE (coluna: Waters μ -Porasil sílica gel 5 μ m, 19 x 300 mm; eluente: *n*-hexano/AcOEt/MeOH 80:18:2; fluxo: 1 mL/min; detecção: UV λ_{\max} 254 nm). Obteve-se 1,4 mg da lactona da furodisinina (14).⁴⁰ As outras frações obtidas do extrato hexânico apresentaram somente esteróis, esteroides, ésteres do glicerol e ácidos graxos e não foram investigadas.

A fração Dv-AcOEt (1,2 g) foi filtrada para eliminação de sais inorgânicos e subsequentemente submetida a uma cromatografia em coluna pré-empacotada de sílica gel derivatizada com grupos cianopropila (5 g), utilizando-se como eluente um gradiente de AcOEt/MeOH 1:1 (solvente A) em CH₂Cl₂ (solvente B) nas seguintes proporções A/B: 10/90, 20/80, 30/70, 40/60, 50/50, 100% A. As 60 frações obtidas foram analisadas por CCD (eluentes: *n*-hexano/AcOEt 7:3 ou 1:1; reveladores: UV 254 nm e spray de ácido fosfomolibdico, seguido de aquecimento em placa a cerca de 80 °C), e reunidas em quatro frações: Dv-AcOEt-1 (0,47 g), Dv-AcOEt-2 (0,034 g), Dv-AcOEt-3 (0,034 g) e Dv-AcOEt-4 (0,006 g). A fração Dv-AcOEt-1 foi submetida a uma separação por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (eluente: MeOH), da qual se obteve 7 frações: Dv-AcOEt-1A a Dv-AcOEt-1G. Devido à sua similaridade cromatográfica, as frações Dv-AcOEt-1C (0,15 g) e Dv-AcOEt-1D (0,11 g) foram reunidas, originando a fração Dv-AcOEt-1C/D (0,26 g). Esta foi submetida a uma nova separação cromatográfica, em coluna de sílica gel derivatizada com grupos cianopropila (5 g), utilizando-se um eluente de AcOEt/MeOH 75:25 (solvente A) em CH₂Cl₂ (solvente B), nas seguintes proporções A/B: 10/90, 20/80, 30/70, 40/60, 50/50, 100% A. Foram obtidas 50 frações que, após análises por CCD (eluentes: *n*-hexano/AcOEt 7:3 ou 1:1; reveladores: UV 254 nm e spray de ácido fosfomolibdico, seguido de aquecimento em placa a cerca de 80 °C) foram reunidas em 3 frações, das quais a primeira, Dv-AcOEt-1C/D1 (0,19 g), foi submetida a uma nova separação em coluna de sílica gel derivatizada com grupos cianopropila (2 g), utilizando-se um gradiente de AcOEt/MeOH 9:1 (solvente A) em CH₂Cl₂/*n*-hexano 9:1 (solvente B), nas seguintes proporções A/B: 10/90, 20/80, 30/70, 40/60, 50/50, 100% A. Após análises por CCD (eluentes: *n*-hexano/AcOEt 7:3 ou 1:1; reveladores: UV 254 nm e spray de ácido fosfomolibdico, seguido de aquecimento em placa a cerca de 80 °C) as 47 frações obtidas foram reunidas em 5 frações, das quais a segunda, Dv-AcOEt-1C/D1A (0,14 g), foi novamente separada, desta vez por cromatografia em coluna de sílica gel (2 g) utilizando-se um gradiente de AcOEt/MeOH 95:5 (solvente A) em *n*-hexano/CH₂Cl₂ 1:1 (solvente B), nas seguintes proporções A/B: 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 100% A. Análises por CCD das frações obtidas (eluentes: *n*-hexano/AcOEt 7:3 ou 1:1; reveladores: UV 254 nm e spray de ácido fosfomolibdico, seguido de aquecimento em placa a cerca de 80 °C) levaram

à reunião das 38 frações em 5, das quais a segunda, Dv-AcOEt-1C/D1A2 (0,047 g), apresentou solubilidade parcial em MeOH. Após filtração, a fração insolúvel (0,035 g) foi solubilizada em 0,5 mL de DMSO e purificada por CLAE (coluna: inertsil ODS-3 (GL Sciences, Inc) C₁₈, dimensões 250 x 4,6 mm; 5 μ m; eluente: MeOH/H₂O 7:3; fluxo 1 mL/min; detecção: UV λ_{\max} 254 nm). As frações obtidas desta separação ainda mostraram ser misturas. A fração obtida da lavagem da coluna com MeOH 100% resultou na obtenção de 1,8 mg do 9 α ,11 α -epoxicolest-7-eno-3 β ,5 α ,6 α ,10-tetrol-6-acetato (15).^{41,42}

AGRADECIMENTOS

À 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, bem como dos espectros de RMN a 600 MHz. 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 (05/60175-2) a R. G. S. Berlinck, no programa BIOprospectA/BIOTA. Renata C. Gandolfi e Marina B. Medina agradecem ao programa PIBIC/CNPq/USP pelas bolsos de iniciação científica concedidas. Simone P. de Lira (06/60510-9) agradece à FAPESP pela bolsos de pós-doutorado concedida. R. G. S. Berlinck, E. Hajdu, e A. G. Ferreira também agradecem ao CNPq pelas bolsos de produtividade em pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Riccardi, G.; Pasca, M. R.; Buroni, S.; *Future Microbiol.* **2009**, *4*, 597.
- Smith, N. H.; Hewinson, R. G.; Kremer, K.; Brosch, R.; Gordon, S. V.; *Nature Rev. Microbiol.* **2009**, *7*, 537.
- Sacchettini, J. C.; Rubin, E. J.; Freundlich, J. S.; *Nature Rev. Microbiol.* **2008**, *6*, 41.
- Copp, B. R.; Pearce, A. N.; *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 278.
- Laport, M. S.; Santos, O. C. S.; Muricy, G.; *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2009**, *10*, 86.
- Palomino, J. C.; Ramos, D. F.; da Silva, P. A.; *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 1898.
- Kishore, N.; Mishra, B. B.; Tripathi, V.; Tiwari, V. J.; *Fitoterapia* **2009**, *80*, 149.
- Basso, L. A.; Silva, L. H. P.; Fett-Neto, A. G.; Junior, W. F. A.; Moreira, I. S.; Palma, M. S.; Calixto, J. B.; Filho, S. A.; Santos, R. R.; Soares, M. B. P.; Santos, D. S.; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2005**, *100*, 575.
- McGawa, L. J.; Lall, N.; Meyer, J. J. M.; Eloff, J. N.; *J. Ethnopharm.* **2008**, *119*, 482.
- Wright, G. D.; Sutherland, A. D.; *Trends Mol. Med.* **2007**, *13*, 260.
- Selegim, M. H. R.; Lira, S. P.; Kossuga, M. H.; Batista, T.; Berlinck, R. G. S.; Hajdu, E.; Muricy, G.; Rocha, R. M.; Nascimento, G. F.; Silva, M.; Pimenta, E. F.; Thiemann, O. H.; Oliva, G.; Cavalcanti, B. C.; Pessoa, C.; Moraes, M. O.; Hajdu, E.; Peixinho, S.; Rocha, R. M.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2007**, *17*, 287.
- Oliveira, M. F.; Oliveira, J. H. H. L.; Galetti, F. C. S.; Souza, A. O.; Silva, C. L.; Hajdu, E.; Peixinho, S.; Berlinck, R. G. S.; *Planta Med.* **2006**, *72*, 437.
- Oliveira, J. H. H. L.; Selegim, M. H. R.; Timm, C.; Grube, A.; Köck, M.; Nascimento, G. F.; Martins, A. C. T.; Silva, E. G. O.; Souza, A. O.; Galetti, F. C. S.; Minarini, P. R. R.; Silva, C. L. L.; Hajdu, E.; Berlinck, R. G. S.; *Mar. Drugs* **2006**, *4*, 1.
- de Oliveira, J. H. H. L.; Grube, A.; Kock, M.; Berlinck, R. G. S.; Macedo, M. L.; Ferreira, A. G.; Hajdu, E.; *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1685.
- Minala, L.; Sodano, G.; Chan, W. R.; Chen, A. M.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1972**, 674.

16. Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Magno, S.; Pansini, M.; *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 1564.
17. Aiello, A.; Fattorusso, E.; Menna, M.; Pansini, M.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1995**, *23*, 377.
18. Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Magno, S.; Pansini, M.; *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 1564.
19. Acosta, A. L.; Rodriguez, A. D.; *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 1007.
20. Fattorusso, E.; Minale, L.; Sodano, G.; Moody, K.; Thomson, R. H.; *J. Chem. Soc. D: Chem. Commun.* **1970**, 752.
21. Ciminiello, P.; Costantino, V.; Fattorusso, E.; Magno, S.; Mangoni, A.; Pansini, M.; *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 705.
22. Gunasekera, S. P.; Cross, S. S.; *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 509.
23. Gopichand, Y.; Schmitz, F. J.; *Tetrahedron Lett.* **1979**, 3921.
24. Kossuga, M. H.; Lira, S. P.; Nascimento, A. M.; Gambardella, M. T. P.; Berlinck, R. G. S.; Torres, Y. R.; Nascimento, G. G. F.; Pimenta, E. F.; Silva, M.; Thiemann, O. H.; Oliva, G.; Tempone, A. G.; Melhem, M. S. C.; Souza, A. O.; Galetti, F. C. S.; Silva, C. L.; Cavalcanti, B.; Pessoa, C. O.; Moraes, M. O.; Hajdu, E.; Peixinho, S.; Rocha, R. M.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 1194.
25. 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. O.; Moraes, M. O.; Cavalcanti, B. C.; *Quim. Nova* **2005**, *28*, 192.
26. Ciminiello, P.; Dell'Aversano, C.; Fattorusso, E.; Magno, S.; Pansini, M.; *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 263.
27. Nuñez, C. V.; Almeida, E. V. R.; Granato, A. C.; Marques, S. O.; Santos, K. O.; Pereira, F. R.; Macedo, M. L.; Ferreira, A. G.; Hajdu, E.; Pinheiro, U. S.; Muricy, G.; Peixinho, S.; Freeman, C. J.; Gleason, D. F.; Berlinck, R. G. S.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2008**, *36*, 283.
28. Mancini, I.; Guella, G.; Laboute, P.; Debitus, C.; Pietra, F.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans I* **1993**, 3121.
29. Rogers, E. W.; Oliveira, M. F.; Berlinck, R. G. S.; König, G. M.; Molinski, T. F.; *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 891.
30. 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; 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.* **2003**, *66*, 1039; Lira, T. O.; Nascimento, G. F. F.; Hajdu, E.; Berlinck, R. G. S.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2006**, *17*, 1233.
31. McMillan, J. A.; Paul, I. C.; Goo, Y. M.; Rinehart, K. L.; Krueger, W. C.; Pschigoda, L. M.; *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 39.
32. Tymiak, A. A.; Rinehart, K. L.; *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6763.
33. Carney, J. R.; Rinehart, K. L.; *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 971.
34. Gulavita, N. K.; Pomponi, S. A.; Wright, A. E.; Garay, M.; Sills, M. A.; *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 954.
35. Compagnone, R. S.; Avila, R.; Suarez, A. I.; Abrams, O. V.; Rangel, H. R.; Arvelo, F.; Pina, I. C.; Merentes, E.; *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1443.
36. Silva, C. L.; Berlinck, R. G. S.; Souza, A. O.; Oliveira, M. F.; *P. I. 0.600.470-9.7.*, **2006**.
37. Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Hu, W.-P.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R.; *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 170; Faulkner, D. J.; *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 1.
38. Sharma, G. M.; Vig, B.; *Tetrahedron Lett.* **1972**, *17*, 1715.
39. Marques, S. O.; Veloso, K.; Ferreira, A. G.; Hajdu, E.; Peixinho, S.; Berlinck, R. G. S.; *Nat. Prod. Commun.* **2009**, *4*, 917; Williams, D. E.; Marques, S. O.; Hajdu, E.; Peixinho, S.; Andersen, R. J.; Berlinck, R. G. S.; *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 1691.
40. Grode, S. H.; Cardellina II, J. H.; *J. Nat. Prod.* **1984**, *47*, 76; Dumdei, E.; Kubanek, J.; Coleman, J. E.; Pika, J.; Andersen, R. J.; Steiner, J. R.; Clardy, J.; *Can. J. Chem.* **1997**, *75*, 773.
41. Gunasekera, S. P.; Schmitz, F. J.; *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 885.
42. Huang, X.-C.; Guo, Y.-W.; Mollo, E.; Cimino, G.; *Helv. Chim. Acta* **2005**, *88*, 281.
43. Goetz, G. H.; Harrigan, G. G.; Likos, J.; *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1486.