

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prospecção química de esponjas marinhas e bioensaios relacionados às atividades anticâncer *in vitro* e de defesa em modelo *Zebrafish*

RENATA BIEGELMEYER DA SILVA

Porto Alegre, 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prospecção química de esponjas marinhas e bioensaios relacionados às atividades anticâncer *in vitro* e de defesa em modelo *Zebrafish*

Tese apresentada por **Renata Biegelmeyer da Silva** para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Profa. Dra. Amélia T. Henriques

Co-orientador: Dr. Mario Luiz Conte da Frota Junior

Porto Alegre, 2013.

Tese/Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 28.08.13, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Daniel Pens Gelain

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Renata Pereira Limberger

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Miriam de Barcellos Falkenberg

Universidade Federal do Santa Catarina

Biegelmeier, Renata

Prospecção química de esponjas marinhas e bioensaios relacionados às atividades anticâncer in vitro e de defesa em modelo Zebrafish / Renata Biegelmeier. -- 2013.

233 f.

Orientadora: Amélia T. Henriques.

Coorientador: Mário Luiz Conte da Frota Junior.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. esponjas marinhas. 2. anticâncer. 3. esfingosídeos. 4. ácidos graxos. 5. Zebrafish. I. Henriques, Amélia T., orient. II. da Frota Junior, Mário Luiz Conte, coorient. III. Título.

\

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação da Prof^a. Dra. Amélia Henriques no laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia e co-orientação do Dr. Mario Luiz Conte da Frota Junior no Departamento de Bioquímica, ambos na Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Parte fundamental do trabalho foi realizada no Departamento de Química e Bioquímica da Universidade da Califórnia, San Diego, Estados Unidos, sob a supervisão do Prof. Dr. Tadeusz Franciszek Molinski. A autora recebeu bolsas de estudos das agências CNPq e CAPES/PDSE (durante estágio sanduíche na Universidade da Califórnia).

"Deus não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer algo só depende de nossa vontade e perseverança".

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dra. Amélia T. Henriques por tudo que aprendi desde o período da iniciação científica, pela confiança depositada em meu trabalho, pelas oportunidades, inclusive de ingressar diretamente no doutorado e por todo o incentivo.

Ao Dr. Mario Luiz Conte da Frota Junior pela co-orientação, pelas palavras de motivação e por me iniciar nesta nova área de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Tadeusz Molinski pela oportunidade de estágio no Departamento de Química e Bioquímica da Universidade da Califórnia, pelos recursos disponibilizados e ensinamentos. Também agradeço à Dra. Paige Stout da Universidade da Califórnia por sua contribuição no trabalho e principalmente pela amizade e apoio durante o período de estágio no exterior.

Ao Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira por disponibilizar seus recursos no Departamento de Bioquímica e ao M.Sc. Rafael Schröder por sua contribuição neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Diogo Losch de Oliveira pela acolhida em seu laboratório, e ao Dr. Eduardo Rico por aceitarem o desafio proposto e pela ajuda na realização dos ensaios com *Zebrafish*.

Ao Prof. Alexandre Fuentesfria e Bruna Pippi pela colaboração no trabalho.

À Prof^ª. Dra. Beatriz Mothes pelos ensinamentos na área de esponjas e ao João Carraro pela ajuda com as coletas e identificação das esponjas.

Ao Laboratório de Farmacognosia, Prof. Dr. José A. Zuanazzi, Prof^ª. Dra. Miriam Apel e a todos os colegas. Obrigada por fazerem parte desta longa caminhada, pelos momentos de descontração e pela troca de conhecimentos: Eduardo, Graziela, Luíz, Marina, Rafaela, Raquel e Tiago.

Aos amigos que me acompanharam durante esta jornada acadêmica: Cláudia, Carolina, Leandro, Melissa e Roger. Um agradecimento especial à Juliana por todo apoio e amizade.

À UFRGS, especialmente à Faculdade de Farmácia, responsável pela minha formação, da qual me orgulho em fazer parte.

À minha família pelo amor, carinho, incentivo e por sempre torcerem por mim. Em especial à minha mãe Liana, meu braço-direito, meu exemplo de força e determinação. À minha vó Adelina, meu exemplo como pessoa, que agora lá de cima está guiando meus caminhos.

Ao meu noivo Douglas, pelo companheirismo, amor, amizade e ajuda. Obrigada por compreender a minha ausência, pelo conforto nos momentos difíceis e por todo incentivo.

RESUMO

A descoberta de fármacos a partir de produtos isolados de organismos marinhos tem apresentado um grande crescimento nos últimos anos, principalmente devido aos avanços tecnológicos analíticos, síntese química e biotecnologia. Dentre estes, as esponjas representam uma das principais fontes de metabólitos protótipos para diversas atividades, destacando-se os efeitos antitumorais. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo a investigação química e biológica de três esponjas coletadas na costa sul-brasileira: *Haliclona tubifera*, *Polymastia janeirensis* e *Scopalina ruetzleri*. Considerando a correlação entre câncer, distúrbios da coagulação e desbalanço de espécies reativas de oxigênio (EROs), foram realizados ensaios visando a aquisição destas atividades e a identificação de substâncias bioativas. Para a esponja *H. tubifera* foram observados interessantes efeitos antitumorais em células de glioma e neuroblastoma humano ($IC_{50} < 20 \mu\text{g/ml}$), além das atividades antioxidante e anticoagulante para a fração acetato de etila. O composto majoritário desta fração foi isolado como um derivado *N*-Boc e sua configuração foi estabelecida utilizando um novo protocolo de dicroísmo circular e semissíntese de derivados. Assim, este esfingosídeo de cadeia longa isolado (2R,3R,6R,7Z)-2-amino-7-octadecene-1,3,6-triol, foi denominado *halisphingosine A*. Um novo composto minoritário, *halisphingosine B* foi obtido usando técnicas de isolamento em escala nanomolar. Sua configuração absoluta foi estabelecida por comparação com o composto A. Da mesma forma, para a esponja *S. ruetzleri*, a fração acetato de etila demonstrou os resultados mais promissores. Um potencial efeito anticâncer e de inibição dos radicais peroxila foi observado. Além disso, um efeito modulador da peroxidação lipídica foi evidenciado em ensaio *ex vivo* de dienos conjugados. Através da análise por RMN de ^1H , verificou-se que a fração era majoritariamente constituída por ácidos graxos, os quais foram derivatizados para caracterização por Cromatografia Gasosa (GC/FID). Foram identificados 32 ácidos graxos principalmente poli-insaturados (53%). Ácidos graxos minoritários não usuais para o ambiente marinho também foram caracterizados. A esponja *P. janeirensis* apresentou os

efeitos citotóxicos mais promissores em células de glioma e neuroblastoma humano, com um $IC_{50} < 1,0 \mu\text{g/ml}$ para o extrato aquoso (pH 6,8), sendo este efeito pH-dependente, uma vez que o extrato (pH 5,8) não alterou a viabilidade celular. Para *P. janeirensis*, foi também investigado seu potencial de defesa química em modelo de *Zebrafish*. Foi observado que o extrato aquoso desencadeia um efeito de fuga, alterando significativamente o comportamento espaço-temporal de peixes *Danio rerio*. Analisando em conjunto, os dados do presente trabalho representam uma nova contribuição para o estudo químico e biológico de espécies de esponjas marinhas da costa sul-brasileira e apontam as potencialidades destas esponjas na busca de moléculas protótipos para fármacos, especialmente relacionados à terapia do câncer.

Palavras-chave: *Polymastia janeirensis*; *Haliclona tubifera*; *Scopalina ruetleri*; esponjas marinhas; anticâncer; esfingosídeos; ácidos graxos; Zebrafish.

ABSTRACT

Chemical prospecting of marine sponges and bioassays related to anticancer activities in vitro and of defense in zebrafish model

Drug discovery from marine natural products has increased in the past few years, mainly due to technological advances in spectroscopy, chemical synthesis and biotechnology. Among all marine animals, sponges represent one of the major sources of prototype metabolites for several biological activities, highlighting the antitumor effects. In this context, this study carried out chemical and biological investigation of three sponges collected on the South Brazilian coastline: *Haliclona tubifera*, *Polymastia janeirensis* and *Scopalina ruetzleri*. Considering the correlation between cancer, clotting disorders and imbalance of reactive oxygen species (ROS), experiments were conducted for acquisition of these activities and identification of bioactive compounds. *H. tubifera* showed an interesting cytotoxic effect in human neuroblastoma and glioma cell lines ($IC_{50} < 20 \mu\text{g/ml}$), antioxidant and anticoagulant effect for ethyl acetate (EtOAc) fraction. The major compound of EtOAc fraction was isolated as an *N*-Boc derivative and its configuration was established using a new circular dichroism protocol with the production of semi-synthetic derivatives. This long chain sphingoid base (2R,3R,6R,Z)-2-aminooctadec-7-ene-1,3,6-triol was named as halisphingosine A. A new minor compound, halisphingosine B was obtained using nanomol scale techniques and their absolute configuration was established by comparison with compound A. Likewise, for the sponge *S. ruetzleri*, the EtOAc fraction showed the most promising results. A potential anticancer effect, inhibition of peroxy radicals and modulation effect of lipid peroxidation was observed. Fingerprint ^1H NMR analysis showed that this fraction is mainly constituted of fatty acids. Through Fatty Acid Methyl Ester (FAMES) analysis by GC/FID, it was possible to identify 32 fatty acids, of which around 50% were Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs). In addition, some minor unusual fatty acids for the

marine biosphere were identified. It was observed for *P. janeirensis* the most promising cytotoxic effects on human glioma and neuroblastoma cells, with an $IC_{50} < 1.0 \mu\text{g/ml}$ to aqueous extract (pH 6.8), being this effect pH-dependent, since the extract (pH 5.8) did not affect the cell viability. Moreover, *P. janeirensis* was investigated along their potential chemical defense in Zebrafish model. Aqueous extract triggered an escape effect, significantly altering the spatio-temporal swimming activity of animals. Taken together, the data presented from this study represent a new contribution to chemical and biological research of marine sponge species from South Brazilian coastline, and point the potentialities of sponges to search chemical prototypes for drugs, especially related to cancer therapy.

Keywords: *Polymastia janeirensis*; *Haliclona tubifera*; *Scopalina ruetleri*; marine sponges; anticancer; sphingosines; fatty acids; Zebrafish.

LISTA DE FIGURAS

III. REVISÃO

Figura 1: Distribuição de produtos naturais marinhos por filos isolados em 2013	35
Figura 2: Representação esquemática da estrutura de uma esponja	37
Figura 3: Número de produtos isolados de esponjas nos últimos 10 anos.....	39
Figura 4: Compostos isolados de esponjas marinhas que estão em estudo clínico.	40
Figura 5: Taxonomia da esponja marinha <i>Polymastia janeirensis</i>	41
Figura 6: Foto <i>in situ</i> da esponja marinha <i>Polymastia janeirensis</i>	41
Figura 7: Esteróis isolados do gênero <i>Polymastia</i>	45
Figura 8: Metabólitos isolados da esponja <i>P. sobustia</i>	46
Figura 9: Ácidos graxos isolados do gênero <i>Polymastia</i>	47
Figura 11: Foto <i>in situ</i> da esponja marinha <i>Scopalina ruetzleri</i>	48
Figura 10: Taxonomia da esponja marinha <i>Scopalina ruetzleri</i>	48
Figura 12: Compostos isolados da esponja marinha <i>S. ruetzleri</i>	50
Figura 13: Taxonomia da esponja marinha <i>Haliclona tubifera</i>	52
Figura 14: Foto <i>in situ</i> da esponja marinha <i>Haliclona tubifera</i>	52
Figura 15: Primeiro metabólito isolado de esponjas do gênero <i>Haliclona</i>	60
Figura 16: Alcaloides isolados de esponjas marinhas do gênero <i>Haliclona</i>	62
Figura 17: Acetilenos obtidos de esponjas do gênero <i>Haliclona</i>	63
Figura 18: Kendarimida A, peptídeo isolado de esponjas do gênero <i>Haliclona</i>	64

V. ARTIGO 1

Figure 1: Sphingoid bases from <i>Haliclona tubifera</i> and D-ribosphingosine	76
Figure 2. Newman diagrams of major contributing conformers and predicted signs of exciton coupled CD spectra.	77
Figure 3. Measured circular dichroism spectra of per-naphthoyl derivatives prepared from L-serine.	78
Figure 4. Measured CD spectra and hybrid CD spectra of naphthoyl derivatives	79

Figure S1. Measured CD spectra of N,O,O-tetranaphthoyl halisphingosine overlaid with hybrid spectra generated from CD of 4 and erythro- 6b	84
Figure S2. ¹ H NMR spectrum of 1a (500 MHz, CD ₃ OD).....	86
Figure S3. ¹³ C NMR spectrum of 1a (125 MHz, CDCl ₃).....	86
Figure S4. DEPT135 spectrum of 1a (125 MHz, CD ₃ OD).....	87
Figure S5. COSY spectrum of 1a (600 MHz, CD ₃ OD).....	88
Figure S6: HSQC spectrum of 1a (500 MHz, CD ₃ OD).....	89
Figure S7. HMBC spectrum of 1a (500 MHz, CD ₃ OD).....	90
Figure S8. ¹ H NMR spectrum of 2a (600 MHz, CD ₃ OD).....	91
Figure S9. COSY spectrum of 2a (600 MHz, CD ₃ OD).....	92
Figure S10. ¹ H NMR spectrum of acetone 3 (500 MHz, CDCl ₃).....	93
Figure S11. ¹ H NMR spectrum of mononaphthoate 4 (500 MHz, CDCl ₃).....	94
Figure S12. ¹ H NMR spectrum of tetranaphthoyl deriv. 5 (500 MHz, CDCl ₃).....	95
Figure S13. ¹ H NMR spectrum of per-acetyl B 8 (600 MHz, CDCl ₃).....	96
Figure S14. ¹ H NMR spectrum of 7,8-dihydro-per-acetyl A 8 (500 MHz, CDCl ₃).....	97
Figure S15. COSY spectrum of 8 (600 MHz, CDCl ₃).....	98
Figure S16. LCMS Coinjection of 8	99

V. ARTIGO 2

Figure 1 Sphingoid bases isolated from EtOAc fraction of <i>H. tubifera</i>	118
Figure 2 Effect of marine sponge <i>H. tubifera</i> on blood coagulation	119
Figure 3 TRAP from marine sponge <i>H. tubifera</i>	120
Figure 4 CL intensity measured after the addition of <i>H. tubifera</i> fractions.....	121

VI. ARTIGO 3

Fig. 1: TRAP from marine sponge <i>S. ruetzleri</i>	143
Fig. 2: CL intensity measured after the addition <i>S. ruetzleri</i> fractions.....	144
Fig. 3: Unusual fatty acids identified for <i>S. ruetzleri</i>	145
Fig. 4: Conjugated dienes from marine sponge <i>S. ruetzleri</i>	146
Fig. S1: ¹ H NMR spectra of <i>S. ruetzleri</i> EtOAc fraction.... Erro! Indicador não definido.	

VII. ARTIGO 4

Fig. 1: Effect of marine sponge *Polymastia janeirensis* on blood coagulation..... 166

Fig. 2: Profile of changes in blood coagulation of marine sponge *P. janeirensis* fractions and extracts. 167

Fig. 3: TRAP from marine sponge *P. janeirensis* 168

Fig. 4: CL intensity measured after the addition of *P. janeirensis* extracts and fractions 169

VIII. ARTIGO 5

Fig. 1 Division of the open tank. 189

Fig. 2 Overall exploratory activity of animals in extract and control group..... 190

Fig. 3 Endpoint parameters of Zebrafish behavior filtered by right area of the open tank and by time. 191

Fig. 4 Locomotor and exploratory activity of Zebrafish filtered by left area of open tank and by time. 192

Fig. 5 Distribution profile of *P. janeirensis* extract on water and representative occupancy plots of extract group in the open tank. 193

Fig. 6 Evaluation of behavior parameters of Zebrafish across time after the addition of *P. janeirensis* aqueous extract or distilled water. 194

Fig.7 Whole-body cortisol levels of Zebrafish 195

IX. DISCUSSÃO GERAL

Figura 20: Perfil cromatográfico da Fração HT-EA6-3 em CLAE/ELSD 203

Figura 21: Esponja *P. janeirensis* e seu líquido após a coleta. 205

LISTA DE TABELAS

III. REVISÃO

Tabela 1: Compostos isolados de esponjas do gênero *Haliclona* 54

IV. ARTIGO 1

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR Data of Halisphingosine A and Per-acetyl Halisphingosine B 76

Table S1. Tabulated parameters for measured and hybrid CD spectra in Fig. 4 and Fig. S1 84

V. ARTIGO 2

Table 1 In vitro growth inhibitory activity against human cancer cell lines and antioxidant effect expressed as TEAC of *H. tubifera* fractions. 117

VI. ARTIGO 3

Table 1. In vitro growth inhibitory activity against human cancer cell lines and antioxidant effect expressed as TEAC of *S. ruetzleri* fractions 141

Table 2. Fatty-Acid composition of ethyl acetate fraction of marine sponge *S. ruetzleri*..... 142

VII. ARTIGO 4

Table 1: Cytotoxic effects against human cancer cell lines and antioxidant potential expressed as TEAC of *P. janeirensis* 165

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	221
II. OBJETIVOS	27
III. REVISÃO DO TEMA	31
III.1 Produtos Naturais de Origem Marinha	33
III.2 Esponjas Marinhas	36
III.3 Esponjas marinhas como fonte de novos fármacos	38
III.4 <i>Polymastia janeirensis</i> (Boury-Esnault, 1973).....	41
III.4.1 Produtos isolados de esponjas do gênero <i>Polymastia</i>	43
III.5 <i>Scopalina ruetzleri</i> (Wiedenmayer, 1977).....	48
III.6 <i>Haliclona tubifera</i> (George e Wilson, 1919)	52
III.6.1 Produtos isolados de esponjas do gênero <i>Haliclona</i>	53
III.7 Câncer	65
III.7.1 Gliomas.....	66
III.7.2 Neuroblastoma.....	67
III.7.3 Câncer e Coagulação	69
III.7.4 Câncer e as Espécies Reativas de Oxigênio (EROS)	70
IV. ARTIGO 1. Halisphingosines A and B, Modified Sphingoid Bases from <i>Haliclona tubifera</i> . Assignment of Configuration by Circular Dichroism and van't Hoff's Principle of Optical Superposition.....	73
V. ARTIGO 2. Potential effect of Sphingosines Fraction from marine sponge <i>Haliclona tubifera</i> against brain tumor cell lines, free radicals and blood coagulation.....	101
VI. ARTIGO 3. Effects on cancer therapy of biologically active fatty acids from the marine sponge <i>Scopalina ruetzleri</i>	123
VII. ARTIGO 4. pH-dependent cytotoxic effects on cancer cell lines of marine sponge <i>Polymastia janeirensis</i> extracts	149

VIII. ARTIGO 5. Chemical defense of marine sponge <i>Polymastia janeirensis</i>: analysis of Spatio-Temporal Behavior of Zebrafish	171
IX. DISCUSSÃO GERAL	197
X. CONCLUSÕES.....	207
XI. PERSPECTIVAS	211
XII. REFERÊNCIAS	215

I. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o ambiente marinho tem originado expressiva variedade de compostos com grande diversidade de atividades biológicas. Os oceanos são fontes de um grande grupo de produtos naturais, e a descrição de novos compostos, muitas vezes únicos em suas estruturas, tem sido relatada (SPAINHOUR 2005; BLUNT et al., 2013). Estima-se que, dos 153.000 produtos de origem natural aproximadamente 22.000 são derivados de organismos marinhos (BLUNT et al., 2011).

Entre estes, as esponjas representam uma das mais promissoras fontes de metabólitos biativos (SIPKEMA et al., 2005), devido principalmente à sua condição sésil e filtradora, a qual requer um efetivo sistema de defesa (BOHLIN et al., 2010). Por isso, as esponjas marinhas têm se mantido, por anos, como umas das principais fontes de produtos isolados (BLUNT et al., 2013). Entre estes destacamos, Ara-C (Cytosar-U®), Ara-A (Vira-A®) e mesilato de eribulina (Halaven®), utilizados na terapêutica para tratamento da leucemia, como agente antiviral e tratamento de câncer de mama metastático, respectivamente. Atualmente dois produtos obtidos destes organismos encontram-se no *pipeline* de estudos clínicos para atividade anticâncer (LIU, 2012; MAYER, 2013).

O câncer é considerado um problema de saúde pública e está fortemente correlacionado ao envelhecimento da população. Dentre todos os tipos de câncer, as estatísticas comprovam a agressividade dos tumores cerebrais e do sistema nervoso, dos quais aproximadamente 92 % dos casos resultaram em óbito (FERLAY et al., 2010). Os gliomas são considerados os mais devastadores tumores primários do cérebro, representando cerca de 30% dos casos (BINELLO e GERMANO, 2011). Por outro lado, o neuroblastoma é o tumor maligno mais comum na infância, afetando principalmente crianças entre 1 a 3 anos (PARK et al., 2010).

As evidências clínicas comprovam uma estreita relação entre câncer e distúrbios da coagulação (PICCIOLI et al., 2004). O estado de hipercoagulação relaciona-se com o crescimento do tumor e a síntese de mediadores pró-coagulantes, enquanto que a

neoangiogênese e as disfunções dos órgãos afetados também contribuem para agravar o quadro (MEIS e LEVY 2007; KVOLIK et al., 2010).

A etiologia do câncer está associada a diversos processos metabólicos: mutações em uma variedade de genes envolvidos na regulação do ciclo celular e vias de reparo do DNA, estresse oxidativo e autofagia (MORRIS et al., 2010). As mitocôndrias são importantes integradores da função celular, por isso podem afetar o equilíbrio homeostático da célula. Por esta razão, uma das principais causas de câncer está associada a disfunções mitocondriais e o consequente desbalanço na produção de Espécies reativas de oxigênio (EROs) (DE MOURA et al., 2010).

Apesar da variedade de fármacos existentes para o tratamento de diferentes tipos de câncer, problemas referentes à baixa seletividade dos antineoplásicos e ao fenótipo de resistência a múltiplos fármacos dão sustentação para a busca de novas moléculas com propriedades antiproliferativas e, principalmente, novas modalidades terapêuticas. Nesse contexto, as esponjas marinhas surgem como uma potencial fonte para busca de moléculas para aumentar o arsenal terapêutico disponível.

Embora o litoral brasileiro seja um dos mais extensos, existem poucos estudos com esponjas coletadas no Brasil objetivando a descoberta de novos fármacos (FROTA JUNIOR et al., 2012). Face à potencialidade desse tema, um grupo de pesquisas, formado por docentes e discentes da Faculdade de Farmácia e do Departamento de Bioquímica desta Universidade, em colaboração com a Fundação Zoobotânica do Estado do Rio Grande do Sul iniciou investigações de extratos de esponjas coletadas na costa Sul do Brasil. Resultados promissores foram obtidos para as atividades anticâncer, antiqumiotática (MONKS et al., 2002) e antiviral (DA SILVA et al., 2006). Lectinas foram caracterizadas e isoladas da esponja *Axinella corrugata* (DRESCH et al., 2008 e 2011). Além disso, foi possível estabelecer o mecanismo de ação dos extratos brutos de *P. janeirensis* para células de glioma humano (FROTA JUNIOR et al., 2009a,b).

Neste contexto, este trabalho teve como foco a avaliação da composição química e das atividades biológicas de extratos de três esponjas, *Haliclona tubifera* (George e Wilson, 1919), *Polymastia janeirensis* (Boury-Esnault, 1973) e *Scopalina ruetzleri* (Wiedenmayer, 1977), coletadas no litoral do Sul do Brasil. *S. ruetzleri* é constituída por um tecido fino e delicado, entretanto, apresentou um perfil epibiótico no ambiente marinho, mostrando sua grande capacidade química de defesa (ENGEL e PAWLIK, 2005). Segundo observações no campo de coleta, *P. janeirensis*, aparentemente, não é atacada por predadores (FROTA JUNIOR, 2008) e libera um líquido de coloração laranja com propriedades ictiotóxicas (MOTHES et al., 2006; MURICY e HAJDU, 2006), as quais não foram comprovadas cientificamente. *H. tubifera* é encontrada no litoral brasileiro cobrindo grandes extensões de rocha (LERNER, 1993), porém esta espécie ainda carece de investigação.

II. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho consistiu na investigação química e biológica das esponjas *Haliclona tubifera*, *Polymastia janeirensis*, e *Scopalina ruetzleri* coletadas na costa sul-brasileira.

Os objetivos específicos incluíram:

- Fracionamento bioguiado dos extratos das três espécies;
- Avaliação do potencial anticâncer das frações em células de glioma e neuroblastoma humano;
- Investigação dos efeitos na coagulação sanguínea e do potencial antioxidante total das frações;
- Caracterização química das frações ativas;
- Isolamento e elucidação estrutural dos compostos obtidos;
- Avaliação da defesa química de *P. janeirensis* utilizando modelo comportamental de *Zebrafish*.

III. REVISÃO DO TEMA

III.1 Produtos Naturais de Origem Marinha

O ambiente marinho está emergindo, cada vez mais, como uma importante fonte de compostos bioativos (SPAINHOUR, 2005), os quais têm mostrado maior potencial de bioatividade em comparação com os obtidos de fontes terrestres (MONTASER e LUESCH, 2011). Somente no ano de 2011, houve um aumento de 15% comparando com 2010, no número de compostos isolados a partir de microrganismos marinhos, algas (verde, marrom e vermelha), esponjas, cnidários, briozoários, moluscos, tunicados e equinodermos (BLUNT et al., 2013). Estudos pré-clínicos de citotoxicidade feitos pelo NCI (National Cancer Institute) reportam que aproximadamente 1 % dos extratos de animais marinhos testados mostra potencial antitumoral, contra 0,1 % dos obtidos dos demais organismos (MONTASER e LUESCH, 2011).

Tendo em vista que mais de 70 % da superfície do nosso planeta é coberta por oceanos, alguns especialistas consideram que a biodiversidade deste ambiente é maior que a existente nas florestas tropicais. Considerando o fato de muitos organismos marinhos serem animais sésseis e de corpo mole, um sistema químico de defesa é essencial para sua sobrevivência. Seus metabólitos são liberados na água, sendo assim rapidamente diluídos, portanto, eles devem ser muito potentes para atingir seu efeito final desejado, oferecendo assim uma grande oportunidade para a descoberta de novos agentes terapêuticos (HAEFNER, 2003).

Foi somente no final dos anos 1950 que o conceito de fármacos oriundos do ambiente marinho começou a atrair interesse. Essa ideia ganhou força através de um trabalho pioneiro realizado por Bergmann e seus colaboradores, com o isolamento de um nucleosídeo da esponja *Cryototethya crypta* (BERGMANN e FREENEY 1950, 1951). Subsequentemente, dois outros nucleosídeos foram isolados desta esponja, espongosina e espongouridina (BERGMANN e BURKE, 1955 e 1956; BERGMANN e STEMPIEN, 1957). Os arabino-nucleosídeos espongotimidina e espongouridina derivados de timina e

uracil, respectivamente, serviram de modelo para a síntese de novos compostos (BASLOW, 1969)

Os análogos sintéticos derivados destes nucleosídeos, Ara-A e Ara-C, foram os primeiros produtos naturais de origem marinha a atingir o mercado para uso terapêutico (KIJOA e SAWANGWONG, 2004). O Ara-C (Citarabina) é produzido sinteticamente e atualmente é vendido para tratamento da leucemia aguda não linfoblástica. Por outro lado, o Ara-A (Vidarabina) é um agente antiviral utilizado para tratamento de infecções oftalmológicas contra *Herpes simplex* (POMPONI, 2001). Esses estudos também contribuíram para dar origem a diversos nucleosídeos incomuns com potencial terapêutico, como o primeiro medicamento usado como anti-HIV, zidovudina ou AZT (SUCKLING, 1991).

Atualmente existem seis fármacos derivados de organismos marinhos em uso clínico, incluindo os já citados Ara-C e Ara-A, além de diversos compostos que se encontram em estudos clínicos (LIU, 2012; MONTASER e LUESCH, 2011). O ziconotídeo ou ω -conotoxina MVIIA (Prialt®), peptídeo isolado do molusco *Conus magnus*, foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 2004 para manejo da dor crônica, por possuir um potencial antinociceptivo mil vezes superior a morfina. A trabectedina (Yondelis®), alcaloide tetraidroquinolínico isolado da ascídea caribenha *Ecteinascidia turbinata*, foi aprovada pela Comissão Européia para o tratamento de sarcomas de tecidos moles e para recidiva de câncer de ovário, mas aguarda aprovação do FDA. Mesilato de eribulina (Halaven®), análogo sintético do composto halicondrina B, isolado da esponja *Halichondria okadai* em 1986, ganhou aprovação do FDA em 2010 para câncer de mama metastático (MONTASER e LUESCH, 2011). A mais recente contribuição do ambiente marinho para o mercado farmacêutico, a brentuximabe vedotina foi aprovada pelo FDA em 2011 para tratamento de linfomas de Hodgkin e está sendo comercializada pelo nome Adcetris®. Este é um análogo sintético da dolastatina 10, um

produto natural isolado a partir do molusco *Dolabella auriculara* (ADCETRIS, 2012; LIU, 2012; SENTER e SIEVERS, 2012).

A descoberta de fármacos a partir de produtos naturais marinhos tem apresentado um grande crescimento nos últimos anos (MOLINSKI et al., 2009), principalmente devido à disponibilidade de abordagens modernas para superar os desafios. Os avanços tecnológicos, tais como estratégias de amostragem, RMN em escala nanomolar para a determinação estrutural, síntese química total, fermentação e biotecnologia são cruciais para a viabilização destes produtos como fonte de novos fármacos (MONTASER e LUESCH, 2011). Estima-se que dos 153.000 produtos de origem natural aproximadamente 22.000 são derivados de produtos marinhos (BLUNT et al., 2011). Dentre a grande biodiversidade marinha, as esponjas representam umas das maiores fontes de produtos naturais, como pode ser observado na Figura 1.

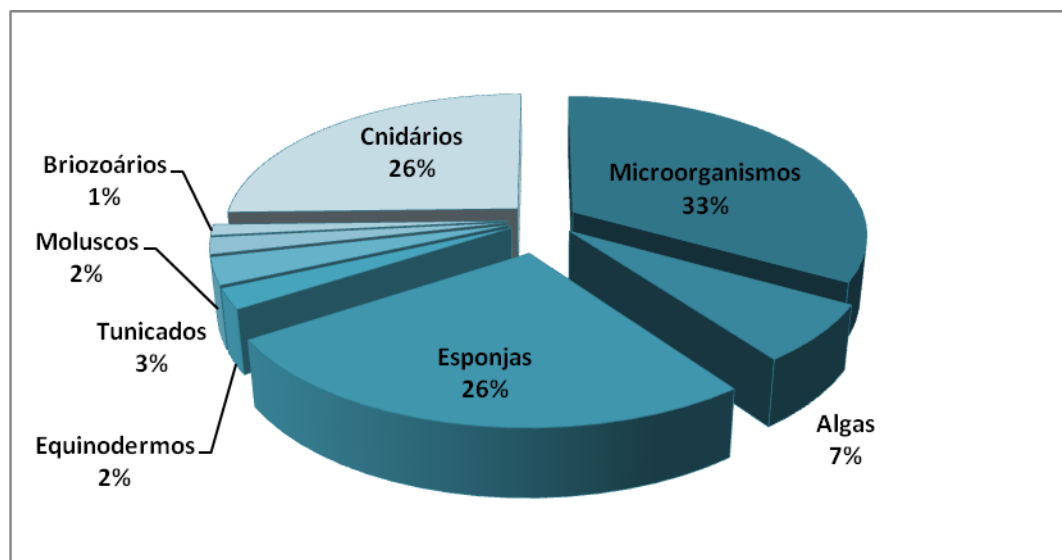


Figura 1: Distribuição de produtos naturais marinhos por filos isolados no ano de 2011 (Adaptado de: Blunt et al., 2013).

III.2 Esponjas Marinhas

As esponjas marinhas (Filo Porífera) são organismos altamente adaptados que sobreviveram por mais tempo do que qualquer outro animal pluricelular. Surgiram há mais de 550 milhões de anos atrás, no período Pré-Cambriano, Era Paleozóica, sendo consideradas um modelo essencial na transição entre organismos unicelulares e pluricelulares (BERGQUIST, 1978).

Estes animais vivem fixos a rochas, corais e outros substratos duros, ou também em fundos arenosos ou lodos. Portanto, sua distribuição está associada à duração do seu período larval livre-nadante, em geral de poucas horas. Os principais fatores que afetam a distribuição da larva são a temperatura e salinidade. Sua fixação é afetada por fatores como luz, gravidade e turbulência da água (BERGQUIST, 1978).

O nome Porífera origina-se do latim (*porus* = poro; *ferre* = portar), justificando a presença de pequenas aberturas na superfície, chamadas poros. Cada poro é formado por um porócito, uma célula em forma de anel que se estende da superfície externa até a cavidade central denominada de átrio ou espongiocele. Internamente, a parede do corpo é revestida pelos coanócios, células flageladas responsáveis por promover a movimentação da água no interior do corpo da esponja. Os coanócitos realizam a filtração da água capturando partículas alimentares e microorganismos. Após a filtração, a água é expelida para o meio externo através de uma abertura maior, denominada ósculo. A parede corporal externa é revestida com células achatadas conhecidas como pinacócitos, que juntas formam a pinacoderme. Os pinacócitos da base secretam um material que promove a fixação da esponja ao substrato. Por baixo da pinacoderme está o mesóhilo, composto por uma matriz protéica gelatinosa que contém células amebóides e material esquelético. Possuem um esqueleto de sustentação relativamente complexo, constituído por uma rede de espículas rígidas, fibras flexíveis e sedimentos externos, como areia, ou ainda uma combinação destes três elementos (Figura 2). A maioria das esponjas tem esqueleto formado por fibras de espongina, juntamente com espículas, as quais podem ser de sílica

(semelhante ao vidro) ou de carbonato de cálcio. As espículas possuem tamanhos menores, denominadas microescleras e também tamanhos maiores, as megascleras, que formam os elementos de sustentação principal no esqueleto. A combinação das dimensões, do tipo e da distribuição das espículas, assim como sua relação com o esqueleto fibroso, são as ferramentas-chave para identificação das esponjas (MOTHES et al., 2006).

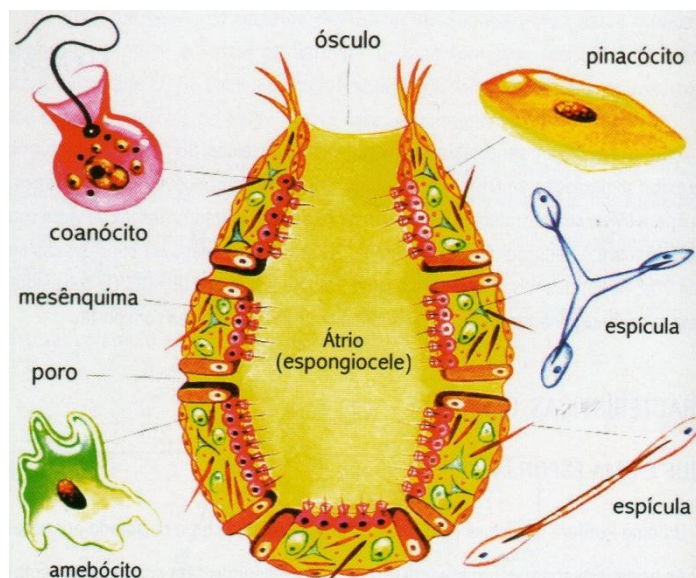


Figura 2: Representação esquemática da estrutura de uma esponja (Fonte: Mothes et al., 2006).

O filo Porífera divide-se em 3 classes principais: Calcarea, Desmospongiae e Hexactinellida. A classe Calcarea é representada por espécies que possuem esqueleto de espículas de carbonato de cálcio (CaCO_3) di-, tri- ou tetractinais, em geral restrita a águas rasas. A classe Desmospongiae inclui espécies com esqueleto de espículas silicosas mono-, di- ou tetractinais, com fibras de espongina presentes ou ausentes. Esta classe abrange cerca de 85% das espécies atuais de esponjas distribuídas por todos os ambientes aquáticos. A classe Hexactinellida possui uma histologia peculiar bastante característica, conhecida como “rede trabecular” formada pela organização dos tecidos em forma de

uma rede e abrange cerca de 500 espécies de esponjas com espículas silicosas hexactinais, as quais, em sua maioria, são restritas a águas profundas ou com temperaturas baixas (BASLOW, 1969; MOTHEs et al., 2006; MURICY e HAJDU, 2006).

III.3 Esponjas marinhas como fonte de novos fármacos

As esponjas marinhas representam o filo mais estudado devido a diversos fatores: (a) são abundantes, independente da profundidade ou temperatura; (b) são relativamente grandes e fáceis de serem recoletadas; (c) produzem a maior variedade de metabólitos secundários; (d) oferecem uma grande variabilidade química dentro de uma mesma espécie (PALERMO, 2003).

Devido à sua condição sésil e filtradora, as esponjas marinhas desenvolveram ao longo da sua evolução, um efetivo sistema contra o estresse ambiental, produzindo substâncias que têm papel fundamental na defesa contra patógenos, parasitas, predadores e também a bioincrustação de organismos (BOHLIN et al., 2010). Por estas razões, acredita-se que as esponjas possuam um mecanismo químico de defesa (BECERRO et al., 2003; THOMS e SCHUPP, 2007), contribuindo para a probabilidade de identificação de novas substâncias bioativas a partir destes animais. Nos últimos anos, cerca de 300 novos produtos foram isolados de esponjas, como pode ser observado na Figura 3 (BLUNT et al., 2013).

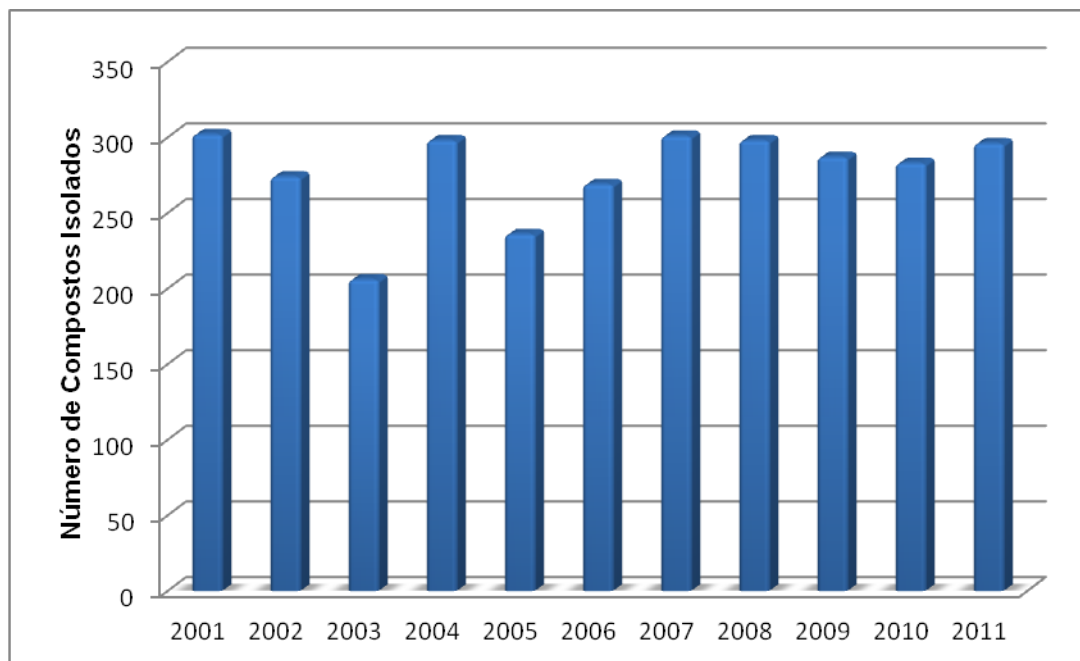


Figura 3: Número de produtos isolados de esponjas marinhas entre 2001 e 2011 (BLUNT et al., 2003-2013).

Diversas atividades biológicas são relatadas para os produtos isolados, como antiviral, antibacteriana, antifúngica, antituberculose, anticoagulante, anti-inflamatória e anticâncer (MAYER et al., 2013). Dentre estas, destaca-se a atividade anticâncer, com o maior número de metabólitos ativos isolados. Atualmente, dois produtos encontram-se no *pipeline* de estudos para esta atividade (Figura 4). Hemiasterilina (**1**), tripeptídeo isolado de *Hemiasterella minor*, teve seus estudos clínicos completados e está em desenvolvimento pela indústria Eisai Inc. O policetídeo PM060184 (**2**) isolado de *Lithoplocamia lithistoides*, encontra-se em estudo clínico fase I e II para câncer de ovário, mama, pulmão e leucemia pela empresa PharmaMar (LIU, 2012; MAYER, 2013).

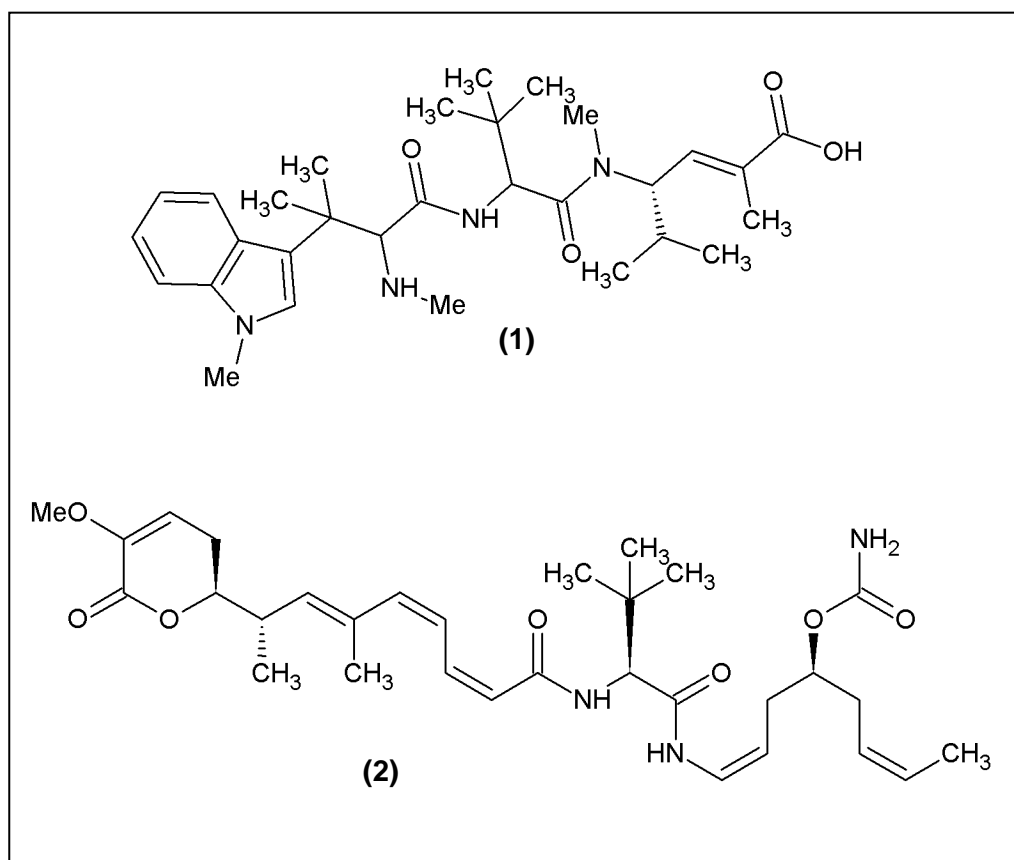


Figura 4: Compostos isolados de esponjas marinhas que estão em estudo clínico.

O Brasil tem uma costa litorânea de aproximadamente 8000 km com grandes áreas de recifes de corais e costões rochosos que abrigam uma grande diversidade de esponjas (MURICY e HAJDU, 2006). Recentemente, uma revisão da literatura sobre os produtos isolados destes animais com potencial anticâncer, evidenciou que os trabalhos realizados explorando a diversidade química da nossa fauna marinha são ínfimos frente ao seu real potencial (FROTA JUNIOR et al., 2012).

III.4 *Polymastia janeirensis* (Boury-Esnault, 1973)

A classificação taxonômica da esponja *Polymastia janeirensis* está apresentada na Figura 5. Ela possui uma morfologia bastante peculiar, conforme pode ser observado na Figura 6. Apresenta coloração externa marrom arroxeadada escura com numerosas projeções cilíndricas que partem do corpo incrustante, conhecidas como papilas, com até 5 cm de altura por 0,5 cm de diâmetro. Além disso, possui uma consistência firme e coloração interna amarela esverdeada. É encontrada em rochas cobertas de areia, da qual se projetam apenas as papilas, em profundidades de 3-39 metros (MOTHES et al., 2006; MURICY e HAJDU, 2006).

Filo: Porífera
Classe: Demospongiae
Ordem Hadromerida
Família Polymastiidae
Gênero <i>Polymastia</i>
Espécie <i>Polymastia janeirensis</i> .

Figura 5: Taxonomia da esponja marinha *Polymastia janeirensis*.



Figura 6: Foto *in situ* da esponja marinha *Polymastia janeirensis* (João de Fraga Carraro).

Observações de campo relatam que esta esponja ao ser cortada libera um líquido alaranjado com propriedades antibacteriana e ictiotóxica (MOTHES et al., 2006; MURICY e HAJDU, 2006), as quais não foram comprovadas cientificamente. Além disso, apresenta uma aparente falta de predadores naturais (FROTA JUNIOR, 2008). Estas observações ecológicas tornam-se importantes para uma abordagem orientada para a descoberta de novas drogas (PROKSCH et al., 2010). Até o momento, os trabalhos realizados com esta espécie descrevem propriedades biológicas somente em extratos brutos.

Muricy e colaboradores (1993) demonstraram que o extrato metanólico da esponja apresentou forte atividade antimicrobiana frente às bactérias gram positivas *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* e também às bactérias gram negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Também, foi observado uma atividade antifúngica moderada frente a *Candida tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* e *Cryptococcus laurentii*. Em outro estudo, foi relatado que o extrato aquoso foi capaz de inibir cepas de *Staphylococcus epidermidis* (LAPORT et al., 2012).

Através de um *screening* realizado pelo nosso grupo de pesquisa com esponjas coletadas na costa sul brasileira, foi observado importante atividade citotóxica do extrato orgânico de *P. janeirensis* contra células de câncer de colo retal, células de glioma e células de câncer de pulmão (HT-29, U-373 e NCI-H460, respectivamente), com IC₅₀ entre 25 e 50 µg/ml. Além disso, o extrato aquoso retardou a migração de leucócitos em um ensaio quimiotático (MONKS et al., 2002). Posteriormente, atividade antiviral foi evidenciada para extrato aquoso de *P. janeirensis* contra o rotavírus RV-SA11, com inibição dos últimos estágios de replicação do rotavírus, enquanto que o extrato orgânico apresentou atividade contra o vírus (cepa HSV-1, KOS) da herpes (DA SILVA et al., 2006).

Face ao potencial citotóxico apresentado, um estudo mais aprofundado foi realizado para avaliação do seu mecanismo de ação frente a células de glioma humano.

Os extratos aquoso e orgânico reduziram a viabilidade de células de glioma humano (linhagem U138MG) com $IC_{50} < 15 \mu\text{g/ml}$. A menor concentração (10 $\mu\text{g/ml}$) induziu apoptose por uma via dependente de caspase-9 e demonstrou efeito citotóxico seletivo para a linhagem de glioma humano quando comparado com células não transformadas (FROTA JUNIOR, 2008; FROTA JUNIOR et al., 2009a,b)

Recentemente, um *screening* com diversas esponjas e algas marinhas foi realizado para as atividades anticoagulante e antiagregação plaquetária. O extrato acetona da esponja *P. janeirensis* diminuiu o percentual de agregação plaquetária e aumentou o tempo de coagulação verificado através dos ensaios de tempo de recalcificação, tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada e coagulação do fibrinogênio (MOURA et al., 2011).

III.4.1 Produtos isolados de esponjas do gênero *Polymastia*

O estudo com esponjas do gênero *Polymastia* teve sua origem com o pesquisador pioneiro Bergmann e seus colaboradores. Eles identificaram em extratos da esponja *P. infrapilosa*, além do colesterol, um segundo esterol saturado da ordem de $C_{28}H_{50}O$, o qual foi nomeado de aptostanol (BERGMANN et al., 1950).

Foi somente a partir da década de 90 que o isolamento de esteróis de esponjas do gênero teve continuidade. Kong e Andersen (1993) isolaram de *P. boletiformis* um esterol 3β -*O*-sulfatado denominado de polimastiamida A (**3**). Este foi o primeiro exemplo de um novo tipo de produto natural marinho formado pela combinação de esterol e α -aminoácido e foi isolado a partir de um fracionamento bioguiado para atividade antimicrobiana. Apresentou atividade frente a *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Pythium ultimum*. A continuidade deste trabalho deu origem ao isolamento de outros esteróis minoritários presentes no extrato de *P. boletiformis*, os quais foram identificados

como polimastiamidas B-F (**4-9**). Dificuldades no isolamento e separação destes constituintes foram atribuídas à presença de grupamentos sulfato e ácido carboxílico que conferiam a estas moléculas uma extrema polaridade (KONG e ANDERSEN, 1996).

Xu e Zeng (2000a) isolaram de *P. sobustia* coletada no sul da China dois novos esteróis oxigenados (**10-11**). Logo depois, esse mesmo tipo de composto esteroidal foi encontrado na esponja *P. tenax* coletada na Colômbia (**12-14**). Os compostos (**12**) e (**13**) apresentaram uma significativa citotoxicidade contra linhagens de carcinoma humano de pulmão (A-549), carcinoma humano de cólon (HT-29 e H-116), endotélio de rato (MS-1) e carcinoma humano de próstata (PC-3) com IC₅₀ de 0,5-10 µg/ml (SANTAFÉ et al., 2002). A continuação dos estudos com a esponja *P. sobustia* levou ao isolamento de outro metabólito inédito, uma tetraidroxiamida de cadeia longa (**15**), além de timina (**16**), uracil (**17**) e ácido *p*-hidroxibenzóico (**18**) (XU e ZENG, 2000b e 2001).

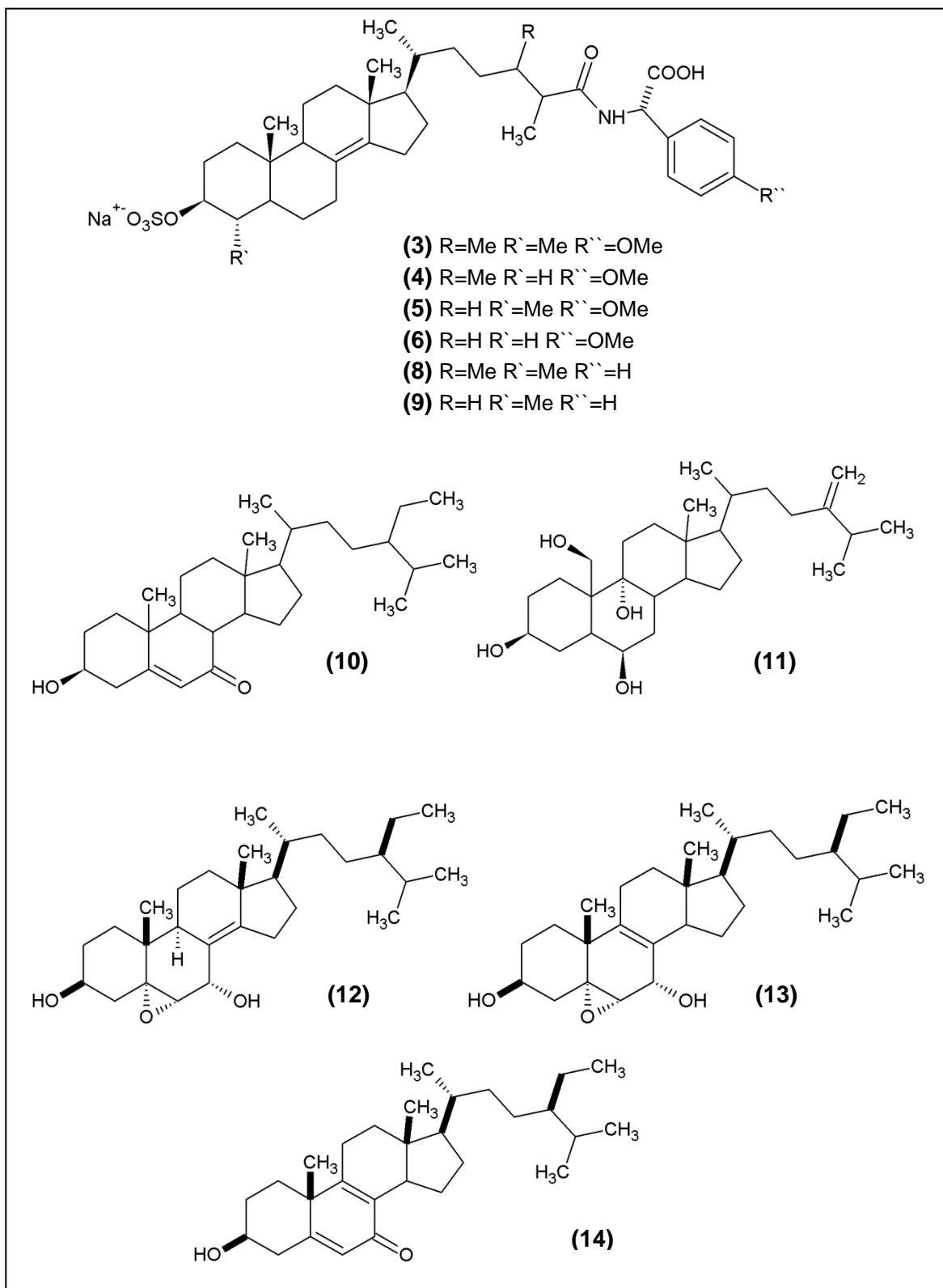


Figura 7: Esteróis isolados do gênero *Polymastia*.

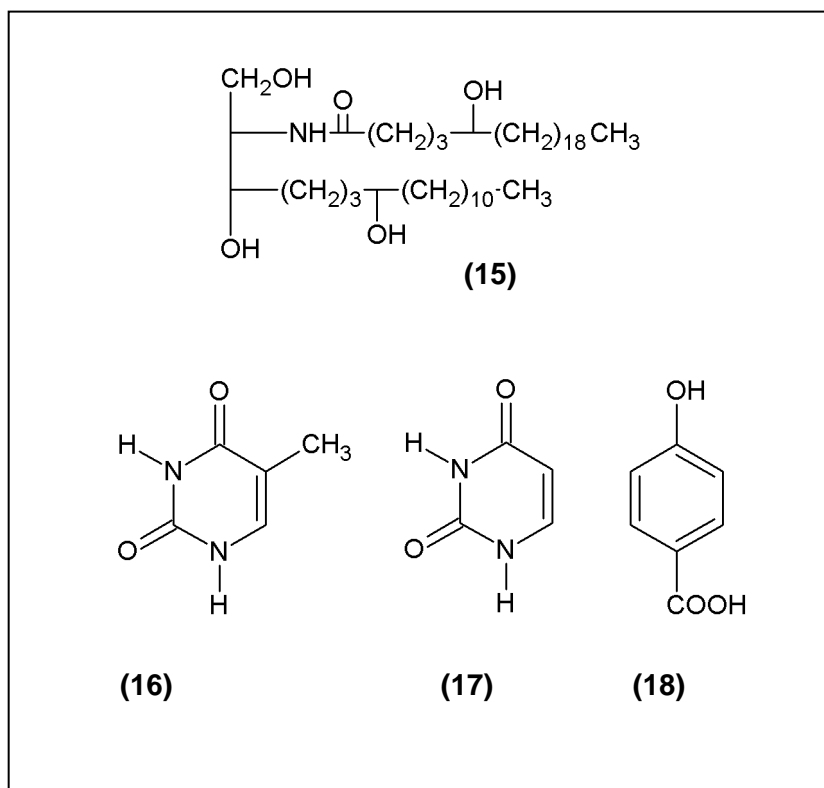


Figura 8: Metabólitos isolados da esponja *P. sobustia*.

Ácidos graxos também são frequentemente encontrados e o primeiro relato deste grupo de metabólitos em esponjas do gênero *Polymastia* foi realizado por Ayanoglu e seus colaboradores em 1985. Eles isolaram ácidos graxos 2-acetóxi com cadeia saturada (C_{22-30}) da esponja *P. gleneni*, sendo o ácido 2-acetoxitetraacosanóico (2-OAc-24:0) o composto majoritário (19).

Posteriormente, 24 ácidos graxos foram identificados para *Polymastia* sp. (RODKINA et al., 2008) e 60 para a esponja *P. penicillus*, coletada na França. Dentre os diversos ácidos graxos identificados nesta última, destaca-se o ácido 17-metil-13-ácido octadecanóico (20) (DENIS et al., 2009) que foi sintetizado em um processo de sete etapas, com rendimento de 45% do total. Este produto apresentou atividade antiprotozoária contra *Leishmania donovani* com uma concentração efetiva 50% de 19,8

$\mu\text{g/ml}$ e inibiu completamente a DNA topoisomerase leishmania IB com uma concentração de $50 \mu\text{M}$. (CARBALLEIRA et al., 2009).

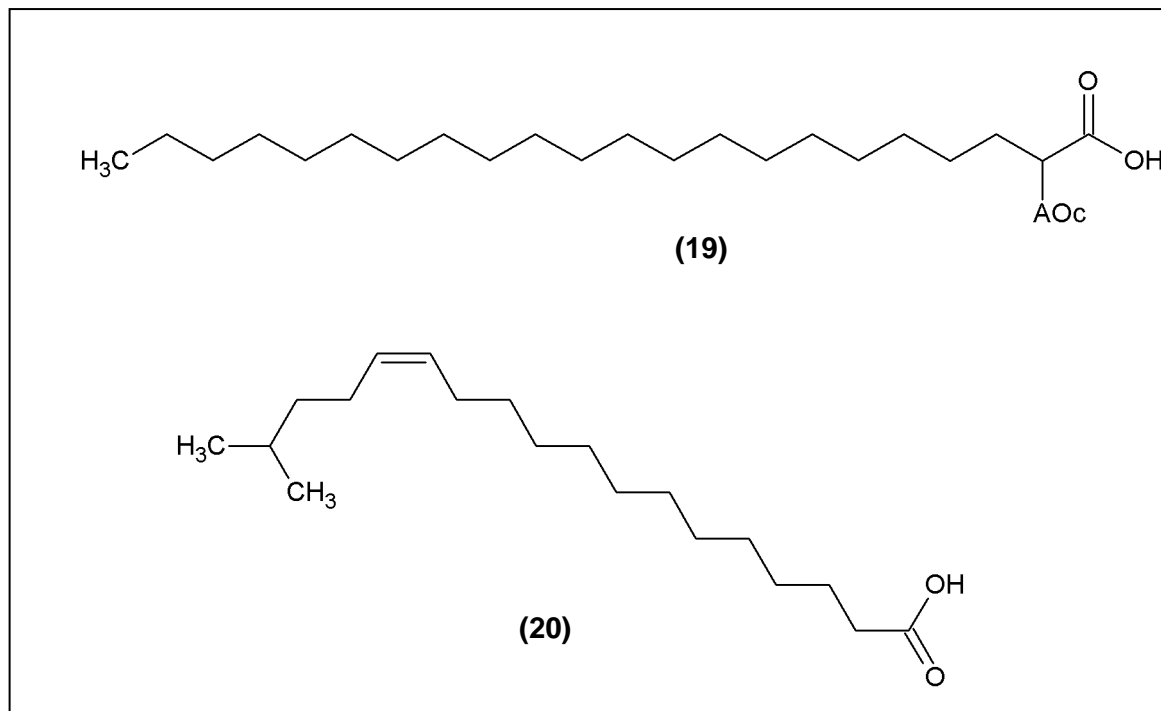


Figura 9: Ácidos graxos isolados do gênero *Polymastia*.

III.5 *Scopalina ruetzleri* (Wiedenmayer, 1977)

Scopalina ruetzleri foi originalmente descrita como *Ulosa ruetzleri* e a sua taxonomia está apresentada na figura 10. Esta esponja apresenta forma incrustante com 5-50 mm de espessura e coloração amarela ou laranja-clara (como pode ser observada na figura 11), consistência carnuda, macia, delicada e facilmente rasgável. Sua superfície possui textura lisa com ósculos circulares diminutos (1-4 mm de diâmetro) dispersos aleatoriamente. Geralmente, fixa-se em paredes de rochas em ambientes de águas rasas e calmas, mas suporta diferentes condições de iluminação (LERNER et al., 2005; MOTHE et al., 2006; MURICY e HAJDU, 2006).

Filo: Porífera
Classe: Demospongiae
Ordem: Halichondrida
Família: Dictyonellidae
Gênero: <i>Scopalina</i>
Espécie: <i>Scopalina ruetzleri</i>

Figura 10: Taxonomia da esponja marinha *Scopalina ruetzleri*.



Figura 11: Foto *in situ* da esponja marinha *Scopalina ruetzleri* (João de Fraga Carraro).

Poucas espécies são conhecidas para o gênero *Scopalina* (BLANQUER e URIZ, 2007), por isso os únicos compostos isolados para este gênero são os relatados para *S. ruetzleri*. Os estudos com esta espécie iniciaram na década de 80 por Cardellina e seus colaboradores, com o isolamento do composto majoritário presente no extrato diclorometano, 17Z-tetracosanil 1-glicerol éter (**21**) (CARDELLINA II et al., 1983). Logo depois, foi identificada a presença de um metabólito indólico (**22**), que atua como regulador no crescimento de plantas (CARDELLINA II et al., 1986).

Mais tarde, foi identificado um potente agente inseticida denominado ulosantoina (**23**) e outro metabólito, inativo, estruturalmente relacionado (**24**). A ulosantoina demonstrou possuir uma forte atividade contra a larva do tabaco (*Manduca sexta*) com dose letal de 50% (DL₅₀) de 6 ppm. Além disso, este metabólito foi totalmente letal em aplicações tópicas para o besouro do feijão mexicano (*Epilachna varivestis*) e para a lagarta (*Spodoptera frugiperda*) com dose de 0,2 e 2,0 µg, respectivamente. Ulosantoina também foi excepcionalmente tóxica para a barata americana (*Periplaneta americana*), seja aplicada topicamente (DL₁₀₀ = 1,0 µg) ou intratoracicamente (DL₁₀₀ = 0,2 µg). Este foi o mais importante inseticida isolado da biosfera marinha desde o isolamento da nereistoxina, o qual serviu de modelo para o inseticida comercial Padan (VANWAGENEN et al., 1993).

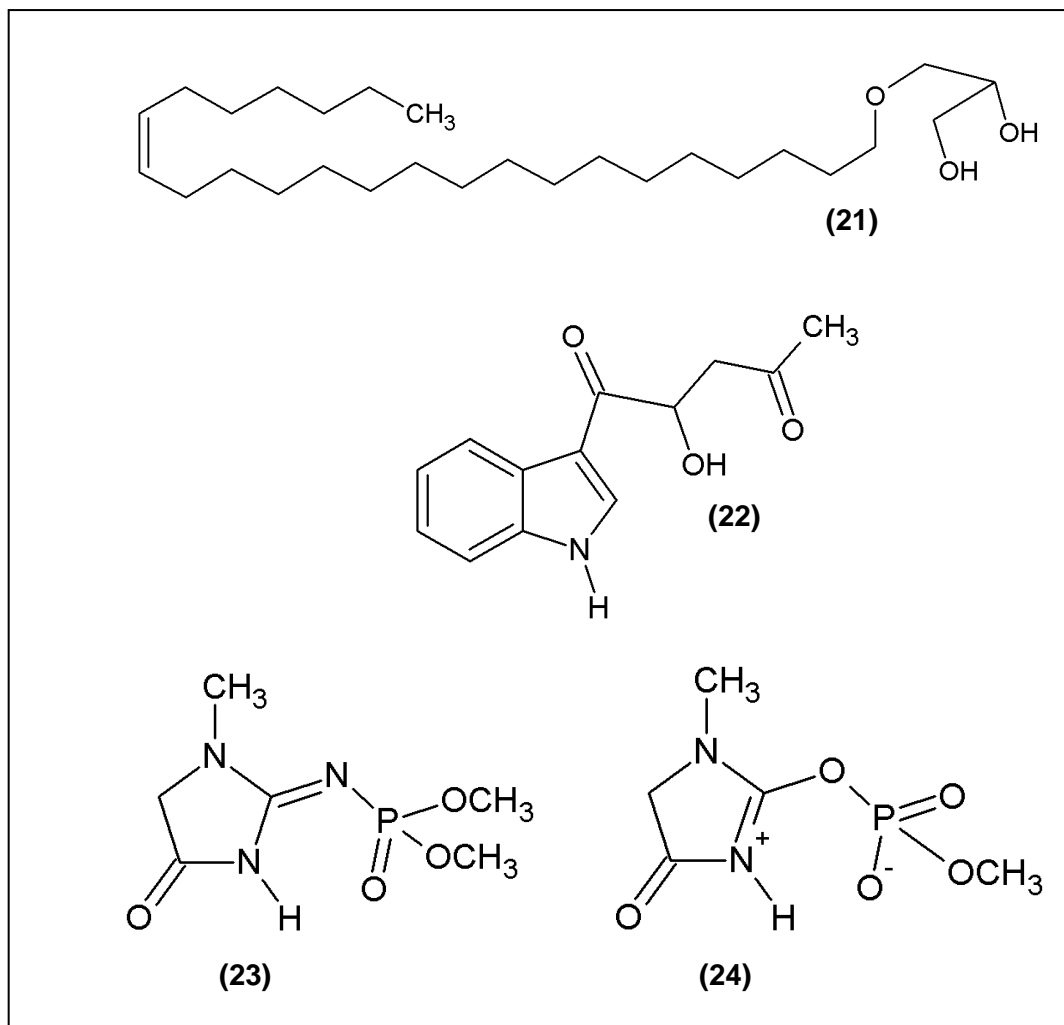


Figura 12: Compostos isolados da esponja marinha *S. ruetzleri*.

Prado e colaboradores (2004) demonstraram que o extrato metanólico desta esponja produz um efeito antiproliferativo contra células de carcinoma mamário humano com $IC_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$. Além disso, o tratamento com este extrato produz diminuição das células em fase de mitose, sugerindo que o efeito antiproliferativo deve-se ao atraso na progressão do ciclo celular. Em outro trabalho, foi relatado que os extratos metanólico e hexânico de *S. ruetzleri* produziram atividade antifúngica contra *Candida albicans* (GALEANO e MARTÍNEZ, 2007).

Um estudo sobre a avaliação das interações interespecíficas entre esponjas em habitats de recifes de corais na Flórida mostrou que dentre 43 espécies avaliadas, *S. ruetzleri* ficou no topo da hierarquia com o maior índice de crescimento, pois demonstrou nunca ser coberta por outras espécies com as quais entrou em contato. Além disso, apresentou um perfil epibiótico em 9 das 13 espécies com as quais interagia, ou seja, frequentemente cobria outras espécies de esponjas. A capacidade de crescimento excessivo *S. ruetzleri* é provavelmente um resultado de sua capacidade de cobrir substratos disponíveis e da aparente incapacidade das outras esponjas de cobrir seus delicados tecidos (ENGEL e PAWLIK, 2005).

Recentemente foi realizado um estudo sobre o perfil de alimentação do peixe *Holacanthus ciliaris*, comparando com a abundância dos organismos bentônicos no arquipélago de São Pedro e São Paulo - Brasil. Esses peixes alimentavam-se preferencialmente de esponjas e algas e, em menor proporção, de cnidários e briozoários. *S. ruetzleri*, uma das esponjas mais abundantes, foi totalmente evitada na alimentação dos peixes (REIS et al., 2013). Estes dados abrem perspectivas bastante interessantes para estudo com esta esponja que apesar de possuir um tecido fino, frágil e delicado possui uma grande capacidade de defesa.

III.6 *Haliclona tubifera* (George e Wilson, 1919)

Haliclona tubifera também pode ser chamada de *Reniera tubífera* e *Adocia tubifera* e sua classificação taxonômica está representada na Figura 13. É uma esponja incrustante e espessa, de coloração lilás-azulada com ósculos de 1-4 mm de diâmetro, situados em pronunciadas elevações (Figura 14). Pode ser encontrada em profundidades de 10 a 13 metros, em substrato rochoso. Frequentemente, aparece cobrindo grandes extensões de rochas (LERNER, 1993).

Filo: Porífera
Classe: Demospongiae
Ordem: Haplosclerida
Família: Chalinidae
Gênero: <i>Haliclona</i>
Espécie: <i>Haliclona tubifera</i>

Figura 13: Taxonomia da esponja marinha *Haliclona tubifera*.



Figura 14: Foto *in situ* da esponja marinha *Haliclona tubifera* (João de Fraga Carraro).

Estudos com esta esponja realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram efeito citotóxico contra três linhagens de câncer: carcinoma de colo retal (HT-29), glioma (U-373) e carcinoma de pulmão (NCI-H460), com IC₅₀ de aproximadamente 30 µg/ml para o extrato orgânico. Além disso, atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Micrococcus luteus* também foram evidenciadas (MONKS et al., 2002).

III.6.1 Produtos isolados de esponjas do gênero *Haliclona*

O gênero *Haliclona* compreende muitas espécies, sendo amplamente estudado. Extensa revisão da literatura de compostos isolados de esponjas do gênero desde o ano 2000 foi realizada, objetivando verificar a diversidade química e biológica. Conforme pode ser visualizado na tabela 1, diversos metabólitos com potencial farmacológico foram isolados de 14 diferentes espécies do gênero. Entretanto, muitos trabalhos não descrevem a espécie estudada, referindo-se somente ao gênero *Haliclona* (sp).

A diversidade química encontrada no gênero compreende peptídeos, acetilenos, ácidos graxos, glicosilceramidas, terpenóides, esfingolipídeos, esteróides, esfingosídeos, polímeros, e em maior destaque, os alcaloides. Nestes metabólitos, a atividade citotóxica destaca-se como a principal atividade farmacológica relatada. Encontra-se também atividade antibacteriana, antifúngica, antituberculose, anti-HIV, antiinflamatória, antioxidante, dentre outras.

Tabela 1: Substâncias químicas isoladas de esponjas do gênero *Haliclona*.

Espécie	Composto	Classe química	Atividade Farmacológica	Referência
<i>Haliclona sp.</i>	Lemberinas A	Acetileno Álcool	Citotóxica	Aoki et al., 2000
<i>Haliclona sp.</i>	Lemberina B e C	Acetileno Álcool	Citotóxica	Aoki et al., 2002
<i>Haliclona sp.</i>	18-bromooctadeca-9(E),17(E)-dien-7,15-ácido diinóico; (1E,5E,12E,19E)-1,22-dibromodocosa-1,5,12,19-tetraen-3,14,21-triino; metil-18-bromooctadeca-9(E),17(E)-dien-7,15- diinoato	Acetileno Bromado	Citotóxica	Alarif et al., 2013
<i>Haliclona sp.</i>	Haliclonina	Acetileno Oxigenado	-	Chill et al., 2000
<i>Haliclona sp.</i>	6-Bromo-icosa 3Z,5E,8Z,13E,15E pentaeno-11,19-ácido diinóico	Ácido Graxo Bromado Poli-insaturado	Citotóxica	Aratake et al., 2009
<i>Haliclona sp.</i>	1-Hidróximetil-7-metóxiisoquinolin-6-ol Mimosamicina	Alcaloide Isoquinolínico	Citotóxica	Rashid et al., 2001
<i>Haliclona sp.</i>	Renierol	Alcaloide	Hipouricêmica Inibidora da Xantina-oxidase	Wang et al., 2008
<i>Haliclona sp.</i>	3-Alquilpiridinico dimerico, 3-Alquilpiridinico trimético	Alcaloide Alquilpiperidínico	Citotóxica	Casapullo et al., 2009
<i>Haliclona sp.</i>	Haliciclamina A	Alcaloide Alquilpiperidínico Tetracíclico	Antituberculose	Arai et al., 2008
<i>Haliclona sp.</i>	22-Hidroxihaliclonaciclamina B Haliclonaciclamina A e B	Alcaloide Alquilpiperidínico Tetracíclico	Antituberculose	Arai et al., 2009

Tabela 1 cont.: Substâncias químicas isoladas de esponjas do gênero *Haliclona*.

Espécie	Composto	Classe química	Atividade Farmacológica	Referência
<i>Haliclona sp.</i>	Ciclohaliclonaminas A-E	Alcaloide Alquiperidínico	-	Teruya et al., 2006
<i>Haliclona sp.</i>	Papuamina, Haliclonadamina	Alcaloides Pentacíclicos	Citotóxica	Ymazaki et al., 2013
<i>Haliclona sp.</i>	Halaminol A-C	Alquil amino álcool	Antifúngica	Clark et al., 2001
<i>Haliclona sp.</i>	(6Z,9Z,12Z,15Z)-1-[(2-feniletil)amino] octadeca-6,9,12,15-tetraen-3-ona (6Z,9Z,12Z,15Z)-1-(dietilamino)octadeca-6,9,12,15-tetraen-3-ona	Amino Cetonas	-	Sun et al., 2010
<i>Haliclona sp.</i>	Bis-1,3-dialquiperidinas cíclicas	Ciclo alquilpiridina	Citotóxica e antibacteriana	Lee et al., 2012
<i>Haliclona sp.</i>	2-Palmitamidoetano ácido sulfúrico	Derivado da taurina	-	Wang et al., 2009
<i>Haliclona sp.</i>	Haliclomercaptodipeptideo Dicetopiperazines ciclo(Pro-Leu), ciclo(Pro-Ala) e ciclo(Pro-Tyr)	Dicetopiperazina	-	Li et al., 2011
<i>Haliclona sp.</i>	Esfingolípídeos 1a-d, 2, 3	Esfingolípídeos	Citotóxica	Ayyad et al., 2009
<i>Haliclona sp.</i>	Reniosidas A1-5, B1-5; (2R,3R,6R,7Z)-2-amino-7-octadecene-1,3,6-triol	Glicosilceramida e Esfingosídeo	Citotóxica	Mansoor et al., 2007a,b
<i>Haliclona sp.</i>	Glicosilceramida tipo A (1-3) Glicosilceramida tipo B (1-2)	Glicosilceramida	-	Ahn et al., 2009
<i>Haliclona sp.</i>	Reniosidas C1-C3, C5-C14	Glicosilceramidas	-	Park et al., 2009
<i>Haliclona sp.</i>	Halioxepina	Meroditerpeno	Citotóxica Antioxidante	Trinato et al., 2011
<i>Haliclona sp.</i>	Adociasulfato 10	Merohexaprenoide	-	Blackburn e Faulkner 2000

Tabela 1 cont.: Substâncias químicas isoladas de esponjas do gênero *Haliclona*.

Espécie	Composto	Classe química	Atividade Farmacológica	Referência
<i>Haliclona sp</i>	Ácido Haliclórico A e B	Merohexaprenoide	Inibidor da enzima enzima indoleamina 2,3-dioxigenase	Williams et al., 2012
<i>Haliclona sp.</i>	Haliclotriol A e B	Merotriterpeno	Antimicrobiana	Crews e Harisson 2000
<i>Haliclona sp.</i>	Kendarimida A	Peptídeo	Reversor da Glicoproteína-P mediadora da resistência a múltiplas drogas em células tumorais	Aoki et al., 2004
<i>Haliclona sp.</i>	Haliclonamidas A e B.	Peptídeo	-	Guan et al., 2001
<i>Haliclona sp.</i>	Haliptepines A e B	Peptídeo	Anti-inflamatória	Randazzo et al., 2001
<i>Haliclona sp.</i>	Haliclamida	Peptídeo	Citotóxica	Randazzo et al., 2001b
<i>Haliclona sp.</i>	Haliclonamides C, D e E	Peptídeo	Antifouling	Sera et al., 2002
<i>Haliclona sp.</i>	Derivado sulfônico da Haligramida A	Peptídeo	Antifouling	Sera et al., 2003
<i>Haliclona sp.</i>	6-hidroxi-7-metoxiisoquinolinametanol Mimosamicina	Quinolina	-	Saito et al., 2004
<i>Haliclona sp.</i>	Fuclona sulfato	Triterpeno + Hidroxiquinona	Anti-HIV	Bokesch et al., 2002
<i>H. baeri</i>	Maleimida-5-oxima Tetillapirona	Derivado da piperidina e do pirano	-	Wattanadilok et al., 2007

Tabela 1 cont.: Substâncias químicas isoladas de esponjas do gênero *Haliclona*.

Espécie	Composto	Classe química	Atividade Farmacológica	Referência
<i>H. caerulea</i>	Halilectina 1 Halilectina 2	Lectina	-	Carneiro et al., 2012
<i>H. cribricutis</i>	S,S-Fenvalerato R,S-Fenvalerato	Piretroide	Inseticida Antimicrobiana	Goud et al., 2005
<i>H. cymaeformis</i>	Tetillapirona Nortetillapirona	Derivado do pirano	Antifúngica	Wattanadilok et al., 2007
<i>H. densaspicula</i>	Densanins A e B	Alcaloide Pirrol Macrocíclico	Inibição da produção de Óxido Nítrico	Hwang et al., 2012
<i>H. exigua</i>	Araguspongina-C	Alcaloide	Antileishmaniose	Dube et al., 2007
<i>H. fulva</i>	Fulvinos	Acetilenos Oxigenados	Antimicrobiana	Nuzzo et al., 2012
<i>H. lunisimilis</i>	(1Z,3Z)-1-Clorohexadeca-1,3-dieno-5,7- diino-14-ol, (1Z,3E,9Z)-15-Acetóxi-1-clorohexadeca- 5,7-diino-1,3,9-trieno, (1Z,3E)-14-Acetóxi-1-clorohexadeca -1,3 dieno-5,7-diino.	Acetileno Clorado	-	De Jesus e Faulkner, 2003
<i>H. nigra</i>	Haligramidas A e B,	Hexapeptídeo	Citotóxica	Rashid et al., 2000
<i>H. oculata</i>	Oculatol Oculatolida	Esterol	-	Yu et al., 2006

Tabela 1 cont.: Substâncias químicas isoladas de esponjas do gênero *Haliclona*.

Espécie	Composto	Classe Química	Atividade Farmacológica	Referência
<i>H. sarai</i>	Sarainas A, B e C	Alcaloide Macrocíclico	Antibacteriana Hemolítica Inibidor da Acetilcolinesterase	Defant et al., 2011
<i>H. sarai</i>	Poli-APs	Polímero	Antifouling Citotóxica Inibidor da Acetilcolinesterase	Garanventa et al., 2010
<i>H. tulearensis</i>	Isohalitulina Haliclorensina B Haliclorensina C	Alcaloide	-	Sorek et al., 2010
<i>H. vansoesti</i>	(2R,3R,7Z)-2-Aminotetradec-7-eno-1,3-diol	Alquil amino álcool	Antimicrobiana	Devijver et al., 2000 Richelle-Maurer et al., 2001
<i>H. viscosa</i>	3-Alquilpiridinico monomérico	Alcaloide Alquilpiridínico	Citotóxica Antibacteriana	Timm et al., 2008
<i>H. viscosa</i>	Viscosamina (3-alquilpiridinico trimérico) Ciclostelletamina C (3-alquilpiridinico monomérico)	Alcaloide Alquilpiridínico	-	Volk e Köck 2003
<i>H. viscosa</i>	Viscosalina (1,3-dialquil piridínico acíclico)	Alcaloide Alquilpiridínico	-	Volk e Köck 2004
<i>H. viscosa</i>	Haliclaminas C e D (3- alquiltetrahidropiridina)	Alcaloide Alquilpiridínico	-	Volk et al., 2004
<i>H. viscosa</i>	Viscosalinas B1, B2, E1, E2	Alcaloide Alquilpiridínico		Schmidt et al., 2012

Tabela 1 cont.: Substâncias químicas isoladas de esponjas do gênero *Haliclona*.

Espécie	Composto	Classe Química	Atividade Farmacológica	Referência
<i>H. viscosa</i>	Haliclaminas E e F	Alcaloide Piridínico	-	Schmidt et al., 2009
<i>H. viscosa</i>	Haliclociclina C	Alcaloide Piridínico	-	Schmidt et al., 2011
<i>H. viscosa</i>	Haliclamina G e H	Alcaloide Piridínico	-	Chycon et al., 2012
<i>H. viscosa</i>	Haliscosamina	Esfingosídeo	Antifúngica	El-Amraoui et al., 2013

O interesse em esponjas do gênero *Haliclona* começou na década de 60, desde a obtenção de um extrato aquoso de *H. viridis* com elevada toxicidade para camundongos, o qual foi nomeado de halitoxina (BASLOW e TURLAPATY, 1969). Extratos com propriedades tóxicas similares foram obtidos de várias espécies do gênero. Porém, somente em 1978 o composto tóxico foi isolado de *H. rubens*, *H. vidiris* e *H. erina* e sua estrutura, elucidada por Schmitz e seus colaboradores. Além disso, foi demonstrado que este composto possui atividade citotóxica, hemolítica e tóxica para camundongos e peixes. Como pode ser visualizado na figura 15, a halitoxina (25) consiste em um composto polimérico com várias unidades 3-alkilpiridínicas unidas pelo nitrogênio do anel e a cadeia 3-alkil da unidade subsequente.

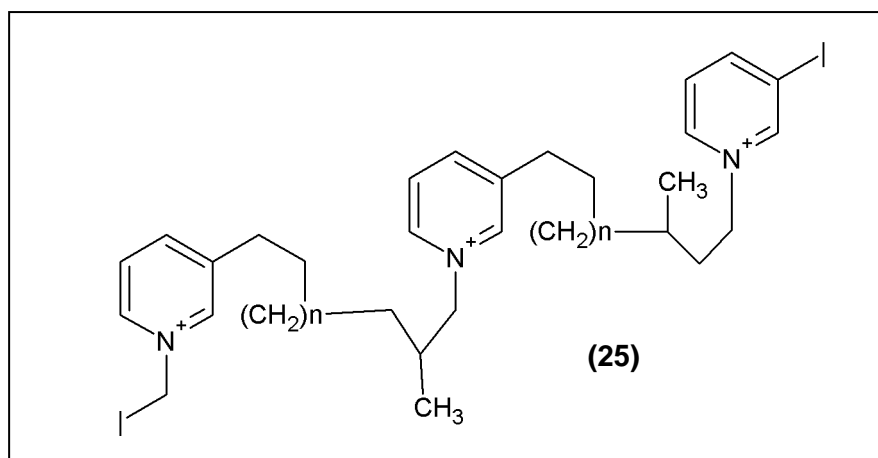


Figura 15: Primeiro metabólito isolado de esponjas do gênero *Haliclona*, denominado de halitoxina.

A presença desta toxina não pode ser generalizada a todas as espécies do gênero, entretanto a grande maioria dos alcaloides isolados pertence à classe dos alcaloides piridínicos e piperidínicos. Dentre estes metabólitos, Arai e colaboradores (2008) isolaram um alcaloide alquilpiperidínico tetracíclico denominado de haliciclamina A (26) com atividade antituberculose. Este composto demonstrou uma atividade bactericida para *Mycobacterium smegmatis*, *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis* H37Ra com CIMs na faixa

de 1,0-5,0 µg/ml. A continuação dos estudos levou à avaliação do seu mecanismo de ação, o qual se baseia na expressão da proteína DedA (ARAI et al., 2011).

Wang e colaboradores (2008) isolaram um alcaloide de *Haliclona* sp. com atividade hipouricêmica, verificada através de ensaios *in vivo* em ratos. Após a administração oral desse metabólito, chamado de renierol (**27**), em doses de 10, 20 e 30 mg/kg, houve diminuição significativa do nível sérico de urato. Além disso, demonstrou potente inibição da xantina oxidase, enzima envolvida na fisiopatologia da gota.

Alcaloides macrocíclicos isolados da esponja *H. sarai* chamam atenção pela sua estrutura peculiar, como pode ser observado na figura 16. Denominados de sarainas A, B e C (**28-30**), esses metabólitos demonstraram uma inibição seletiva sobre bactérias gram-positivas, com a maior atividade mostrada pela forma protonada contra *Streptococcus agalactiae*. Observou-se, ainda, atividade hemolítica e inibidora da enzima acetilcolinesterase (DEFANT et al., 2011).

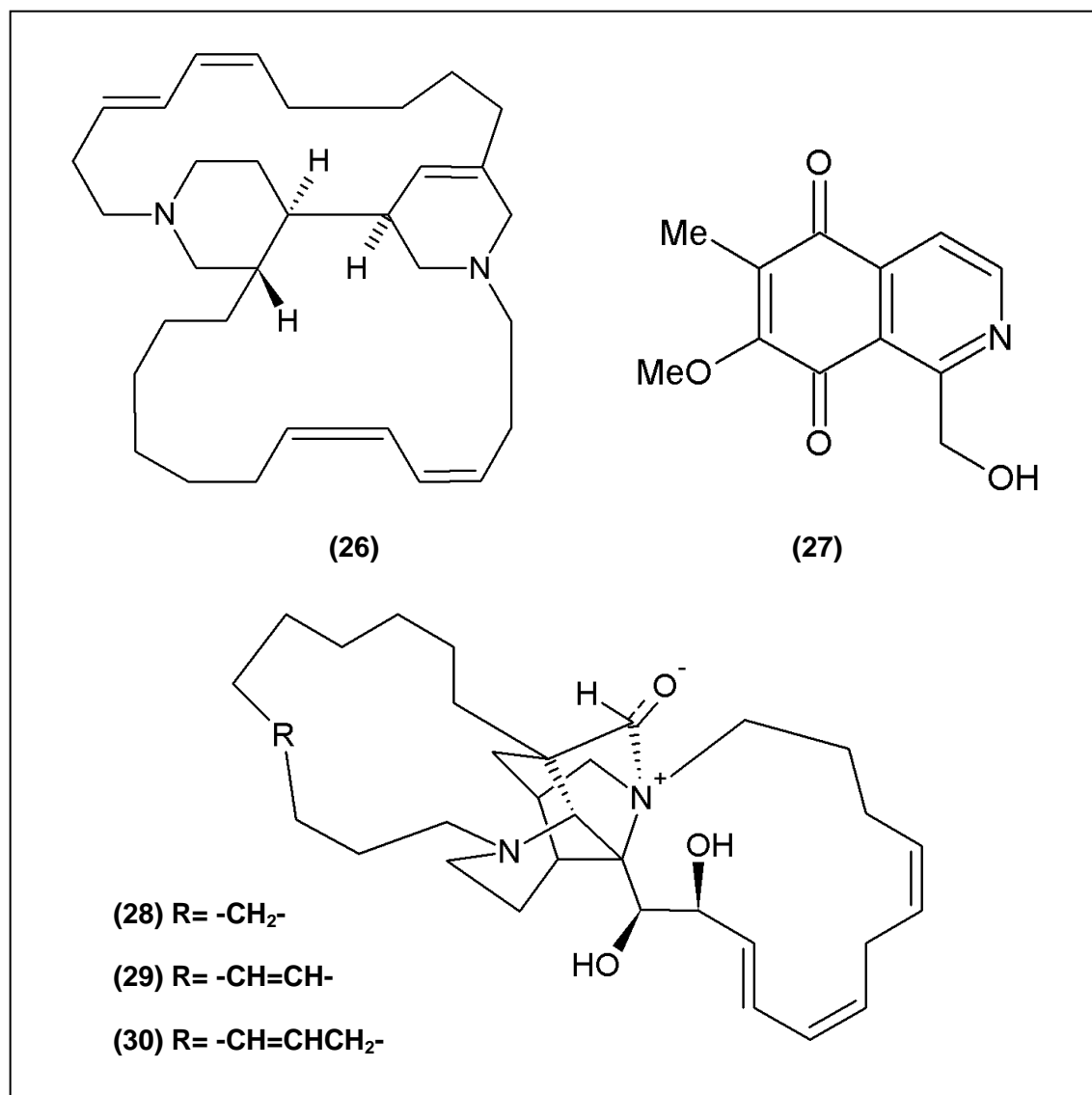


Figura 16: Alcaloides isolados de esponjas marinhas do gênero *Haliclona*.

Além dos alcaloides, outros metabólitos isolados se destacam principalmente com relação aos aspectos farmacológicos, como, por exemplo, os acetilenos obtidos por Aoki e colaboradores (2000 e 2002) de esponjas do gênero, os quais foram denominados de lemerinas A, B e C (**31-33**). Lemberina A apresentou atividade citotóxica contra linhagem de ratos PC12 tumoral de medula adrenal e linhagem Neuro 2A de neuroblastoma nas concentrações de 2,0 e 0,1 µg/ml, respectivamente. Apesar das

lemberinas B e C apresentarem diferenças na cadeia carbônica com relação à lemberina A, também apresentaram atividade contra linhagem Neuro 2A de neuroblastoma de ratos. Por isso, cinco análogos foram sintetizados para avaliação da relação estrutura-atividade, onde se observou que o tamanho da cadeia e a estereoquímica do grupamento hidroxila do carbono-3 são importantes para a atividade. Por outro lado, as ligações insaturadas não parecem afetar o efeito citotóxico.

Devido aos resultados promissores obtidos para lemberina A, este metabólito foi totalmente sintetizado (MURAKAMI et al., 2001) e avaliado seu mecanismo de ação contra linhagem de neuroblastoma. Observou-se que lemberina A induz diferenciação celular em células de neuroblastoma Neuro 2A e produz uma maior expressão da proteína p21/WAF1, interrompendo o ciclo celular na fase G1 (AOKI et al., 2001, 2003).

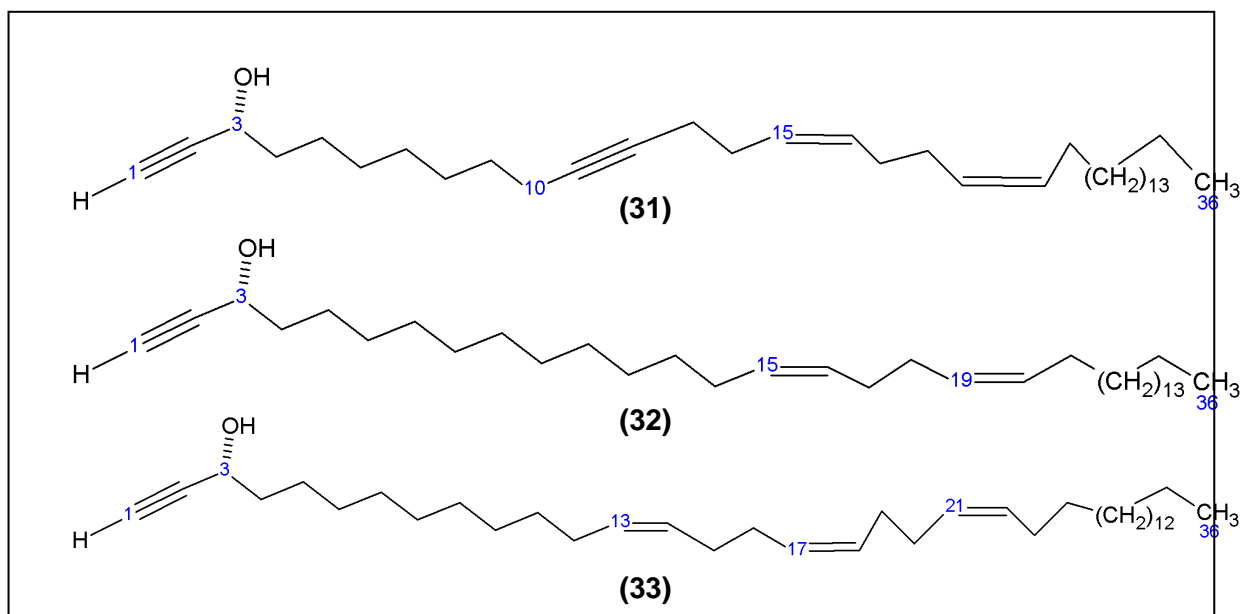


Figura 17: Acetilenos obtidos de esponjas do gênero *Haliclona*.

A complexidade e diversidade química do gênero pode ser exemplificada pelo peptídeo isolado de *Haliclona* sp. (Figura 18), o qual possui 11 resíduos de aminoácidos, com muitos resíduos N-metila, chamado de kendarimida A (**34**). Este composto mostrou-se um potente modulador de resistência a múltiplas drogas em células tumorais, invertendo completamente resistência à colchicina em células de carcinoma humano (KB-C2) com superexpressão de glicoproteína-P. Kendarimida, na concentração de 6 μ M, mostrou inibição do crescimento de 87% na presença de 0,1 mg de colchicina. Este peptídeo possui uma estrutura muito semelhante à ciclosporina, também um potente modulador de resistência a múltiplos fármacos. Assim, os autores estimaram que a similaridade estrutural destes compostos esteja relacionada com suas atividades moduladoras (AOKI et al., 2004).

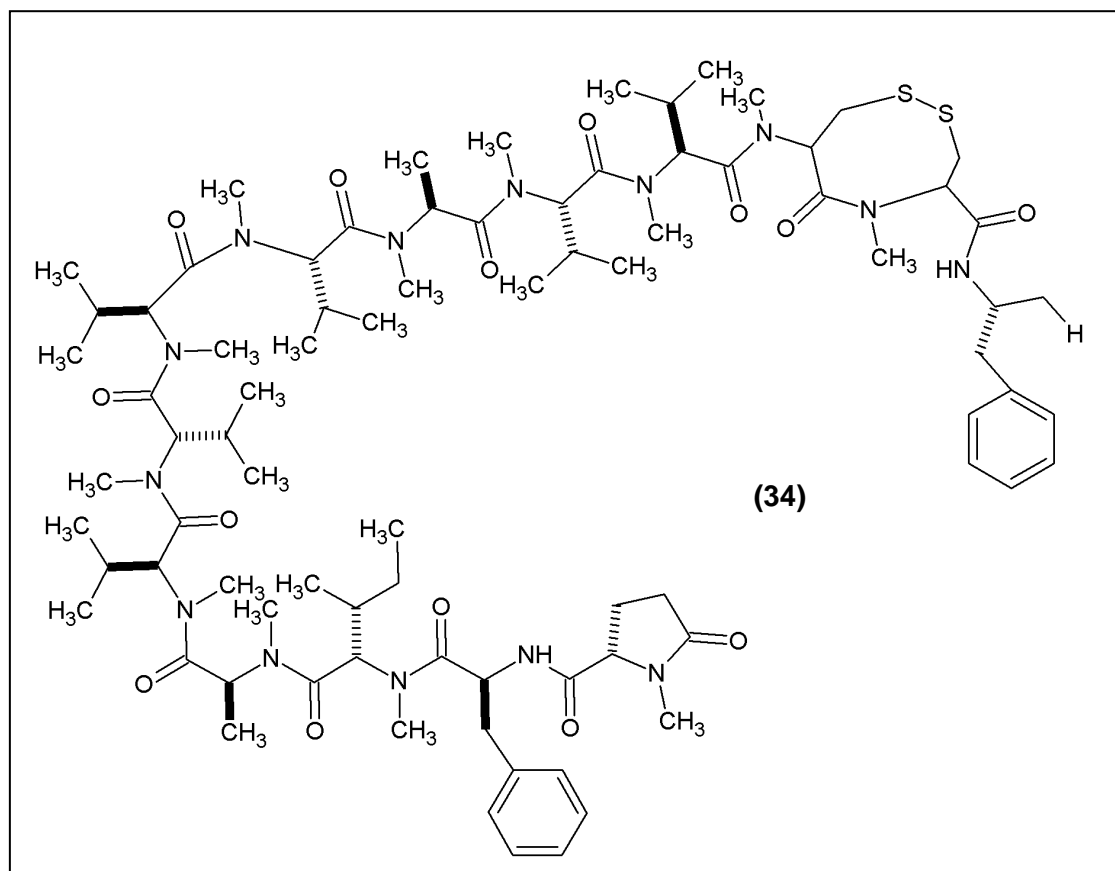


Figura 18: Kendarimida A, peptídeo isolado de esponjas do gênero *Haliclona*.

III.7 Câncer

Há aproximadamente quatro décadas a situação global dos casos de câncer vem mudando, pois atinge tanto os países desenvolvidos quanto aqueles em desenvolvimento. Por isso, o câncer ganhou uma dimensão maior e atualmente é considerado um dos mais importantes problemas de saúde pública (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Segundo os dados publicados pelo projeto Globocan, em 2008 surgiram 12,7 milhões de casos de câncer e ocorreram 7,6 milhões de mortes no mundo (FERLAY et al., 2010). A estimativa para 2030, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) é de 27 milhões de casos incidentes, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

O Brasil ainda é considerado um país em transição epidemiológica, ou seja, está havendo uma mudança no perfil de mortalidade da população com a diminuição da taxa de doenças infecciosas e o aumento da taxa de doenças crônico-degenerativas, especialmente o câncer (GUERRA et al., 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Em 2008, o Brasil teve uma incidência de aproximadamente 320 mil casos de câncer e uma mortalidade de 190 mil pessoas (FERLAY et al., 2010). As estimativas para o Brasil, em 2012, válidas também para o ano de 2013, apontavam a ocorrência de aproximadamente 385 mil casos novos de câncer, sem considerar os casos de câncer de pele não melanoma. Estes números mostram a magnitude do problema no país. O Ministério da Saúde alerta para a necessidade de prevenção e controle da doença no país, pois com o aumento rápido de casos de câncer pode não haver recursos financeiros para fazer frente aos custos do diagnóstico, tratamento e prevenção. Aumentaria assim, de forma significativa, a mortalidade prematura por câncer, cujas consequências podem ser devastadoras no âmbito social e econômico do país, tornando-se um obstáculo para o desenvolvimento socioeconômico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Dentre os diversos tipos de câncer, os tumores cerebrais são os mais graves e com maior risco de morte, pois podem comprimir o tecido normal do cérebro, causando danos

irreversíveis e por vezes, fatais (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013a). As estimativas comprovam a agressividade deste tipo de câncer; os últimos dados publicados para o Brasil mostram que em 2008 a incidência de câncer cerebral e do sistema nervoso para ambos os sexos foi de 8461 casos e a mortalidade de 7783, ou seja, 92% dos casos (FERLAY et al., 2010). Além disso, o câncer do Sistema Nervoso Central (SNC) representa, na população mundial, aproximadamente 2% de todas as neoplasias malignas, sendo mais frequente em crianças e adultos acima de 45 anos, contribuindo significativamente para a morbidade global (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

III.7.1 Gliomas

As células da glia são células de suporte para o funcionamento do Sistema Nervoso Central (SNC). A maioria dos tumores cerebrais e da medula espinhal se desenvolve a partir de células da glia. Os três tipos de células gliais são: os astrócitos, os oligodendrócitos e as células ependimárias. Os astrócitos ajudam a apoiar e nutrir os neurônios, participando de diversas atividades neuronais, inclusive no processo de cicatrização que ajuda a reparar danos ao tecido cerebral; este tipo de tumor é chamado de astrocitoma ou glioblastoma. Os oligodendrócitos são responsáveis pela produção da bainha de mielina, a qual isola os axônios das células nervosas, os tumores a partir destas células são chamados de oligodendrogliomas. As células ependimárias são células epiteliais colunares que revestem os ventrículos do cérebro e o canal central da medula espinhal, formando as vias de movimentação do líquido cefalorraquidiano; os tumores a partir destas células são conhecidos como ependimomas (FULLER e ALDAPE 2006; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013a).

Os gliomas são considerados os mais devastadores tumores primários do cérebro, representando cerca de 30% dos casos (BINELLO e GERMANO, 2011). A gravidade deste tipo de tumor deve-se também à sua associação a processos metastáticos

(DEANGELIS e POSNER, 2004). Estes tumores são classificados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em quatro graus ascendentes de malignidade, dentre estes, os graus III e IV são considerados alto grau e estão associados com um prognóstico pobre (LOUIS et al., 2007). O grau IV dos gliomas também é chamado de glioblastoma multiforme (GBM) e, além de ser o mais maligno, é o mais comum (BINELLO e GERMANO, 2011). O atual protocolo padrão para gestão deste tipo de tumor inclui cirurgia, radioterapia e temozolomida (TMZ) (ARGYRIOU et al., 2009). Mesmo com este tratamento, pacientes com GBM têm uma sobrevida média de 14,6 meses e uma sobrevida global de apenas 10% em cinco anos (STUPP et al., 2009). A resistência a compostos alquilantes, como a TMZ, é muito comum e frequentemente está relacionada à expressão da enzima de reparo do DNA metilguanina metiltransferase (MGMT) (ESTELLER et al., 2000). Isto mostra a necessidade da busca por agentes multialvos capazes de atingir simultaneamente múltiplas vias de sinalização que ocorrem concomitantemente ou sequencialmente, como uma ativação compensatória, para o crescimento do tumor (ARGYRIOU et al., 2009).

III.7.2 Neuroblastoma

Neuroblastoma é uma forma de câncer iniciado em células nervosas jovens do sistema nervoso simpático (neuroblastos simpático), por isso pode ser encontrado em qualquer lugar ao longo desse sistema (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013b). Este tipo de câncer ocorre em fetos e crianças jovens, sendo raramente encontrado em crianças com mais de 10 anos. Neuroblastoma é o tumor maligno mais comum na infância, correspondendo a aproximadamente 9% de todos os cânceres infantis e 15% das mortes por câncer em crianças. O pico de incidência ocorre em idade de 0-4 anos, com idade mediana de 23 meses e é ligeiramente mais frequente em meninos que em meninas (PARK et al., 2010).

O neuroblastoma raramente se desenvolve no cérebro ou na medula espinhal (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013b), a maioria surge no abdômen, com mais da metade destes decorrentes na glândula adrenal. Outros locais de origem também são bastante comuns, como o pescoço, tórax e pélvis, havendo uma forte correlação da idade da criança com o sítio da doença (PARK et al., 2010).

A extensão do neuroblastoma é definida pelo Sistema de Estadiamento Internacional Neuroblastoma (INSS) que extratifica os estágios da doença (BRODEUR et al., 1993). Os estágios 1, 2A e 2B são considerados de baixo risco, nos quais muitas vezes somente a recessão cirúrgica é necessária, sem intervenção de quimioterapia (SIMON et al., 2004). No estágio 3, o câncer não se espalhou para partes distantes do corpo, como acontece no estágio 4 da doença, no qual o câncer pode se espalhar para linfonodos distantes, ossos, fígado, pele, medula óssea e outros órgãos; nestes casos, além da cirurgia a poliquimioterapia é recomendada. No estágio 4, a quimioterapia chega a ser o tratamento principal. A combinação mais comum de medicamentos para tratar neuroblastoma é composta de cisplatina, ciclofosfamida, doxorrubicina e etoposídeo (MATTHEY et al., 1998; SCHIMDT et al., 2000; AMERICAN CANCER SOCIETY 2013b). O estágio 4S é um estágio especial de neuroblastoma que inclui somente crianças menores de um ano, no qual o tumor primário pode ter se espalhado somente para o fígado, pele, medula óssea ou para os nódulos linfáticos do mesmo lado do corpo. De uma maneira interessante, este estágio sem a amplificação do gene MYCN pode haver regressão espontânea do tumor (BRODEUR et al., 1984; SEEGER et al., 1985). Isso comprova a heterogeneidade clínica do neuroblastoma que é conhecida há décadas, pois um subconjunto de tumores neuroblásticos pode sofrer regressão espontânea enquanto que outros progridem rapidamente independentemente da multimodalidade terapêutica intensiva (AMBROS et al., 2009).

III.7.3 Câncer e Coagulação

Os distúrbios da coagulação em casos de câncer são bastante conhecidos. Aproximadamente 95% dos pacientes com câncer mostraram ativação da coagulação e 50% dos pacientes com tumor sólido tem trombose (Rao e Ezban, 2000). As evidências clínicas de distúrbios da coagulação são comumente o primeiro sinal de malignidade (PICCIOLI et al., 2004). A ativação da coagulação em pacientes com câncer é causada principalmente pelo crescimento do tumor, neoangiogênese e disfunção dos órgãos afetados. Ademais, a terapia antineoplásica pode agravar ainda mais a condição geral dos pacientes e os referidos distúrbios (MEIS e LEVY 2007; KVOLIK et al., 2010).

A quimioterapia antineoplásica pode provocar a diminuição da síntese de α 2-antiplasmina e plasminogênio, importantes fatores anticoagulantes e fibrinolíticos, resultando em uma diminuição da lise do coágulo por plasmina, aumentando o risco de trombose (APPEL et al., 2008). Além disso, o aumento da taxa de apoptose no endotélio tumoral, um dos principais mecanismos de ação dos quimioterápicos, é um fator pró-coagulante forte. Quando a célula entra em apoptose, ocorre a desestruturação da camada de lipídeos, expondo uma classe de lipídeos aniônicos, a fostadidil serina (FS). A expressão de FS no exterior da célula entrando em apoptose gera um acúmulo de trombina na região, desencadeando a coagulação (CASCIOLA-ROSEN et al., 1996; FLYNN et al., 1997; STRIETH et al., 2008).

O estado trombofílico em pacientes com câncer está relacionado com a síntese de mediadores pró-coagulantes como o fator tecidual (FT - principal ativador fisiológico do sistema extrínseco da coagulação sanguínea) e o pró-coagulante neoplásico, cisteína protease (CP). FT é produzido como parte de uma resposta inflamatória do organismo, ativada pela presença de um tumor, uma vez que este seria um organismo estranho. As citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 1β (IL- 1β) e o fator de necrose tecidual (TNF α), são produzidas pelas células neoplásicas estimulando a expressão de FT pelas células endoteliais íntegras e os monócitos, ativando assim a cascata de coagulação

(HILLEN 2000; RICKLES e FALANGA 2001). O fator pró-coagulante neoplásico CP é expresso somente em tecidos neoplásicos e em tecido fetal humano, sendo responsável pela ativação do fator X, sem prévia ativação do fator VII (HOFFMAN et al., 2001).

Por outro lado, alguns dados experimentais sugerem que certos tipos de câncer, como o carcinoma pulmonar de pequenas células e melanoma respondem aos anticoagulantes orais e pacientes sobrevivem por um longo período de tempo (BUCHANAN et al., 1995). Em suma, os efeitos na coagulação sanguínea devem ser atentamente avaliados na terapia antineoplásica, objetivando sua segurança e eficácia.

III.7.4 Câncer e as Espécies Reativas de Oxigênio (EROS)

Espécies reativas de oxigênio (EROS) são constantemente geradas e eliminadas no organismo, desempenhando papel essencial para uma variedade de processos biológicos. Entretanto, evidências sugerem que a etiologia do câncer está intimamente ligada ao aumento intrínseco de EROS, uma condição conhecida como estresse oxidativo. Este desbalanço é causado principalmente por disfunções ou mutações mitocondriais, sinais oncogênicos e ativação do metabolismo (PELICANO et al., 2004; DE MOURA et al., 2010).

O aumento moderado de EROS pode promover a proliferação e a diferenciação celular, enquanto que quantidades excessivas podem causar danos oxidativos a lipídeos, proteínas e ao DNA (TRACHOOTHAM et al., 2009). Além disso, o estresse oxidativo afeta proteínas circulantes e está associado a um padrão anormal de coagulação (SHACTER et al., 1995; ABRAHAM, 2000). Outras consequências da elevação de EROS são a morte celular e também alterações na sensibilidade aos fármacos (PELICANO et al., 2004).

Neste sentido, as estratégias que modulam o estado redox celular estão sendo aplicadas para matar células cancerosas. Ativação da apoptose ou atenuação de resistência de células transformadas para indução de morte celular é talvez a mais promissora direção escolhida para desenvolver novas classes de fármacos. A relação entre estresse oxidativo, apoptose e câncer já é vista pela indústria farmacêutica como potencial para desenvolvimento de novas modalidades de tratamento (BOOY et al., 2005; FULDA, 2011).

IV. ARTIGO 1

Halisphingosines A and B, Modified Sphingoid Bases from *Haliclona tubifera*.
Assignment of Configuration by Circular Dichroism and van't Hoff's Principle of Optical
Superposition

Journal of Natural Products, 76(3), 2013.

RESUMO (Artigo páginas 75-100)

Introdução: Diversas variantes de esfingosídeos C18 de cadeia longa podem ocorrer, especialmente em esponjas, tunicados e algas. Modificações podem incluir comprimentos de cadeia variáveis, ramificação de cadeia por grupos metila, hidroxilação e modificações dos grupamentos. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo o isolamento de esfingosídeos da fração acetato de etila da esponja marinha *Haliclona tubifera* coletada na costa sul brasileira.

Materiais e métodos: Dois esfingosídeos foram isolados da fração acetato de atila de *H. tubifera* como derivados N-Boc através de uma sequência de métodos cromatográficos: cromatografia em coluna flash fase normal, cartuchos SPE C18 e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de espalhamento de luz. Uma nova abordagem de Dicroísmo circular foi desenvolvida utilizando o princípio da sobreposição óptica de Van't Hoff's com derivados semi-sintéticos do produto natural.

Resultados: Os compostos isolados foram denominados de *halisphingosines* A (1) e B (2) (Figura 1). A configuração 6R, 2R, 3R, de *halisphingosine* A, foi determinada pelo método de dicroísmo circular desenvolvido. *Halisphingosine* B, esfingosídeo ainda não reportado na literatura, foi designado pela correlação com *halisphingosine* A e mostrou possuir a mesma configuração absoluta.

Conclusão: O método de dicroísmo circular desenvolvido mostrou ser sensível, sendo aplicável a submiligramas de amostra e foi capaz de prever, simultaneamente, a configuração absoluta dos três estereocentros de *halisphingosine* com precisão e exatidão.

V. ARTIGO 2

Potential effect of Sphingosines Fraction from marine sponge *Haliclona tubifera* against brain tumor cell lines, free radicals and blood coagulation

Submetido ao periódico *Journal of Pharmacy and Pharmacology*

RESUMO (Artigo páginas 103-122)

Introdução: *Haliclona Tubifera* é uma espécie de esponja marinha abundante no litoral brasileiro, porém apresenta poucos trabalhos publicados na literatura. Recentemente, realizamos o isolamento de dois esfingosídeos C18 modificados. Neste contexto, afim de continuar os estudos com esta espécie de esponja, este trabalho teve como objetivo a investigação biológica das frações que levaram ao isolamento destes compostos.

Materiais e métodos: Foram avaliados os efeito citotóxicos das frações acetato de etila, aquosa e hexânica de *H. Tubifera* em linhagem humanas de glioma (U87) e neuroblastoma (SH-SY5Y) usando método de MTT. Além disso, considerando a relação entre câncer, desequilíbrio de espécies reativa de oxigênio e disordres na coagulação sanguínea, também foi investigado os efeitos *in vitro* sobre a coagulação sanguínea e suas propriedades redox. Os efeitos sobre a coagulação do sangue foram avaliados pelo tempo recalcificação (RT) e atividade antioxidante foi verificada utilizando o método do potencial antioxidante reativo total (TRAP).

Resultados: Os resultados mais promissores foram evidencias para a fração acetato de etila da esponja *H. tubifera*, a qual reportamos o isolamento dos esfingosídeos (*halisphingosines A e B*). A fração de esfingosídeos demonstrou efeitos citotóxicos importantes em ambas as linhagens celulares de câncer com um $IC_{50} < 15 \mu\text{g/ml}$, além inibir a produção de radicais peroxil ($TEAC=8,0 \mu\text{M Trolox/g}$ de esponja). Além disso, esta fração apresentou efeitos significativos na coagulação sanguínea, todas as concentrações testadas (1,0-100 $\mu\text{g/ mL}$) alteraram o tempo de coagulação, em comparação com o controle. Na maior concentração testada, observou-se um tempo de recalcificação significativamente maior (cerca de 9 minutos, Figura 1B), frente ao controle que iniciou a coagulação em aproximadamente 6 minutos.

Conclusões: O presente estudo indica a fração de esfingosídeos como uma fonte promissora de protótipos a fármacos para terapia do câncer. Além disso, a relação entre atividade citotóxica e anticoagulante da fração de esfingosídeos de *H. tubifera* abre perspectivas para a pesquisa de novas modalidades terapêuticas no tratamento do câncer, especialmente drogas multifuncionais.

VI. ARTIGO 3

Effects on cancer therapy of biologically active fatty acids from the marine sponge
Scopalina ruetzleri

Submetido ao periódico *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology
& Pharmacology*

RESUMO (Artigo páginas 125-148)

Introdução: Esponjas marinhas estão entre as mais promissoras fontes de ácidos graxos quimicamente diversificadas. Além disso, vários estudos têm demonstrado o efeito de ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs) na terapia do câncer. *Scopalina ruetzleri* é uma esponja marinha que merece especial atenção, principalmente porque tem tecido fino e delicado, porém apresenta um elevado potencial de defesa química. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo a investigação química e biológica da esponja *S. ruetzleri* coletada no litoral Sul do Brasil.

Materiais e métodos: O fracionamento bio guiado da esponja *S. ruetzleri* foi realizado através da avaliação dos efeitos citotóxicos em células de glioma (U87) e neuroblastoma humano (SH-SY5Y) pelo método de MTT, e dos efeitos *in vitro* sobre os radicais livres pelo método de TRAP. Para a caracterização química da fração bioativa, foi realizada análise dos ésteres metílicos dos ácidos graxos (EMAG). Método *ex vivo* de dienos conjugados foi empregado para avaliar os efeitos da fração sobre a peroxidação lipídica.

Resultados: A fração acetato de etila da esponja *S. ruetzleri* mostrou resultados promissores nas células testadas, com IC₅₀ <20 µg/mL. O *fingerprint* por RMN de ¹H mostrou que essa fração é principalmente constituída de ácidos graxos. Assim, através a análise dos EMAGs, foi possível identificar 32 ácidos graxos, dos quais cerca de 50% eram AGPIs. Além disso, alguns ácidos graxos não usuais para o ambiente marinho foram identificados. O ensaio de dienos conjugados, mostrou que a fração de ácidos graxos, em concentrações acima de 50 µg/ml, tem um efeito pró-oxidante, indicando que a peroxidação lipídica pode estar, em parte, relacionada com o mecanismo de citotoxicidade em células de câncer.

Conclusões: Em suma, este trabalho mostrou os efeitos citotóxicos da esponja *S. ruetzleri* em células de glioma e neuroblastoma, além da investigação química da fração bioativa. Em particular, contribuiu para estudos que incidem na aplicação de ácidos graxos no

tratamento de câncer, os quais podem ser usados como adjuvantes para rádio ou quimioterapia ou também como um agentes quimioterápicos.

VII. ARTIGO 4

pH-dependent cytotoxic effects on cancer cell lines of marine sponge *Polymastia janeirensis* extracts

Submetido ao periódico *Toxicology in vitro*

RESUMO (Artigo páginas 151-170)

Introdução: Observações ecológicas são extremamente importantes para uma abordagem orientada para a descoberta de novas drogas no ambiente marinho. Nosso particular interesse é a esponja marinha *Polymastia janeirensis*, pois de acordo com observações de campo, tem a propriedade de liberar um líquido de coloração laranja com propriedades ictiotóxicas. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo a investigação dos efeitos citotóxicos de extratos aquosos e frações de *P. janeirensis*. Além disso, considerando a ligação entre o câncer, distúrbios da coagulação e o desequilíbrio de espécies reativas de oxigênio, também foi avaliado os efeitos sobre a coagulação sanguínea e suas propriedades redox.

Materiais e métodos: Os efeitos citotóxicos em células de glioma (U87) e neuroblastoma humano (SH-SY5Y) foram avaliados método de MTT. A investigação dos efeitos *in vitro* sobre os radicais livres foi estudada pelo método de TRAP, enquanto que o tempo de recalcificação foi empregado para avaliar os efeitos na coagulação sanguínea.

Resultados: O resultado mais significativo foi observado para o extrato aquoso de *P. janeirensis* (pH = 6,8), o qual produziu uma atividade citotóxica com $IC_{50} < 1,0 \mu\text{g/ml}$ em ambas as linhagens de câncer testadas. Curiosamente, este efeito é altamente dependente do pH da água, uma vez que a viabilidade das células cancerosas não foi afetada quando o extrato foi preparado com água a pH = 5,8. Além disso, o extrato aquoso (pH = 6,8) de *P. janeirensis* apresentou pronunciado efeito antioxidante ($69,25 \mu\text{M}$ Trolox/g de esponja) e também, pró-coagulante, uma vez que iniciou a coagulação em aproximadamente 3,5 minutos ($100 \mu\text{g/ml}$) frente ao controle que iniciou a coagulação em 6 minutos. A estreita semelhança entre o extrato aquoso (pH = 6,8) e o líquido laranja que a esponja libera quando é cortada, indicam que *P. janeirensis* tem um potencial mecanismo químico de defesa que merece ser investigado.

Conclusões: Este trabalho contribuiu para a investigação sobre o potencial bioativo da esponja marinha *P. janeirensis*. Os resultados demonstram um efeito citotóxico pH dependente para células de glioma e neuroblastoma. Além disso, o forte potencial do extrato aquoso em modular os radicais livres e exercer um efeito pro-coagulante suportam o mecanismo de ação citotóxica por apoptose, previamente reportado frente a células de glioma. Podemos, portanto, inferir que a esponja marinha *P. janeirensis* é uma fonte promissora de protótipos a fármacos, especialmente para terapia do câncer.

VIII. ARTIGO 5

Chemical defense of marine sponge *Polymastia janeirensis*: analysis of Spatio-Temporal Behavior of Zebrafish

A ser submetido ao periódico *Archives of Toxicology*

RESUMO (Artigo páginas 173-196)

Introdução: Zebrafish tem sido amplamente aplicado em vários campos da pesquisa biomédica e na busca de novas drogas, uma vez que vários alvos pode ser avaliados, ou seja, neurotoxicidade, aprendizagem, memória, atividade locomotora dentre outros. Esponjas marinhas são animais sésseis e filtrantes, por isso tiveram que desenvolver uma defesa química contra predadores, produzindo metabólitos secundários . De acordo com observações de campo, a esponja marinha *Polymastia janeirensis* tem a propriedade de liberar um líquido laranja, o qual é tóxico para os peixes, sugerindo a presença de mecanismos de defesa química. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi investigar o potencial de defesa química da esponja *P. janeirensis* frente o comportamento espaço-temporal de peixes zebra.

Materiais e métodos: Com o objetivo de simular a liberação do líquido de coloração laranja que é liberado pela esponja, foi utilizado o extrato aquoso (pH 6,8). Após 6 minutos, quando os animais já estavam ambientados ao aparato, foi adicionado o extrato aquoso da esponja para observação dos efeitos no perfil locomotor dos peixes zebra. Para avaliar a condição de estresse após o tratamento com o extrato de *P. janeirensis*, o nível de cortisol foi quantificado.

Resultados: Os resultados mostraram que o extrato aquoso de *P. janeirensis* tem a propriedade de produzir uma resposta de fuga para os animais, uma vez que eles passaram mais tempo no lado esquerdo do aparato, enquanto que o extrato aquoso foi adicionado no lado direito. Desta forma, considerando somente a área esquerda do aparato e após a adição extrato aquoso (6-10 minutos), foi observada alteração significativa no tempo de móvel, na distância percorrida e na sinuosidade de nado dos animais comparando o grupo extrato com o grupo de controle (água destilada) . *Occupancy plots* foram construídos para avaliar o perfil de difusão do extrato ao ser adicionado ao aparato e comparar com a resposta dos animais. Curiosamente, os efeitos sobre o perfil locomotor dos peixes-zebra ocorre assim que o extrato é adicionado ao tanque experimental, fazendo com que os

animais nadem para o lado oposto ao de adição do extrato. Após cerca de 45 segundos, o extrato aquoso da esponja estava espalhado por quase todo o aparato, porém os peixes continuaram a nadar preferencialmente no lado esquerdo. Além disso, o aumento dos níveis de cortisol e da sinuosidade de nado dos animais, permitem considerar que uma condição de estresse está relacionada com o mecanismo de defesa da esponja *P. janeirensis*.

Conclusões: Em resumo, o presente trabalho suporta as observações de campo, a qual descrevem que a esponja marinha *P. janeirensis* utiliza um líquido cor de laranja como defesa química. Além disso, mostramos a aplicação da atividade exploratória espaço - temporal de zebrafish em estudos ecológicos .

IX. DISCUSSÃO GERAL

A descoberta de fármacos antineoplásicos é uma necessidade devido ao crescente número de casos incidentes de câncer. O Ministério da Saúde alerta que a falta de diagnóstico, prevenção e tratamento desta doença pode se tornar um obstáculo para o desenvolvimento sócioeconômico do país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

O potencial dos organismos marinhos na busca de novas moléculas protótipos para aumentar o arsenal terapêutico antineoplásico é evidente. Durante o período 1998-2008, 592 produtos de origem marinha foram incluídos no *pipeline* de estudos pré-clínicos com atividade antitumoral e 666 compostos para outras atividades farmacológicas. Pesquisadores acreditam que o alto grau de inovação nesta área vai levar ao desenvolvimento de uma grande quantidade de medicamentos num futuro próximo (MONTASER e LUESCH, 2011; LIU, 2012).

No último trabalho de revisão realizado por BLUNT e colaboradores (2013) foi apresentado o panorama mundial da pesquisa em organismos marinhos. O Brasil, apesar da sua extensa costa litorânea e conseqüentemente uma grande biodiversidade, vem apresentando um pequeno número de publicações. Em suma, a pesquisa nesta área ainda é incipiente frente ao real potencial do tema.

Face à potencialidade do tema, nosso grupo de pesquisa têm focado há alguns anos no estudo com esponjas marinhas. Neste trabalho, objetivou-se a prospecção química e biológica das esponjas *Polymastia janeirensis*, *Haliclona tubifera*, e *Scopalina ruetzleri*. Estas foram coletadas na Ilha do Arvoredo, a qual pertence ao conjunto de ilhas da Reserva Biológica Marinha do Arvoredo de Santa Catarina. A ilha do Arvoredo, a maior da reserva, está localizada a aproximadamente 11 km de distância da Iha de Santa Catarina (DA ROCHA et al., 2005).

Para o *screening* biológico, as esponjas foram extraídas com metanol e particionadas com solvente orgânico para obtenção das frações a serem testadas nos bioensaios. Para *P. janeirensis* o extrato aquoso também foi testado em virtude desta esponja liberar um líquido de coloração alaranjada no momento da coleta. A viabilidade

das células de glioma e neuroblastoma humano foram quantificadas por método colorimétrico de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]. Os efeitos antioxidantes foram analisados pelo método de TRAP, conforme método validado por Dresch et al (2009). O ensaio anticoagulante foi previamente otimizado com relação aos parâmetros: i) tempos de descongelamento do plasma; ii) tempo de incubação das amostras; iii) método de avaliação. O método estabelecido foi descrito nos manuscritos 2 e 4.

Os resultados anticâncer mais significativos foram observados para a esponja *P. janeirensis*. O extrato aquoso (pH 6.8) teve um efeito citotóxico com $IC_{50} < 1,0 \mu\text{g/ml}$ para células de glioma e neuroblastoma humano. O aspecto mais interessante em relação a este efeito é o fato da atividade ser extremamente dependente do pH da água de extração. Quando a esponja foi extraída em $\text{pH} = 5,8$, a viabilidade das células de glioma e neuroblastoma não foram afetadas. Por outro lado, com $\text{pH} = 6,8$, mostrou uma potencial atividade citotóxica. Além disso, a fração acetato de etila de todas as esponjas testadas apresentaram efeitos citotóxicos interessantes. Para células de glioma, *H. tubifera* teve o maior efeito ($IC_{50} < 15 \mu\text{g/ml}$), seguida da *S. ruetzleri* e *P. janeirensis*. Por outro lado, para células de neuroblastoma, os resultados mais interessantes foram evidenciados para a esponja *S. ruetzleri* (IC_{50} em torno de $10 \mu\text{g/ml}$), depois para *H. tubifera* e por último para *P. janeirensis*.

Na coagulação sanguínea, *P. janeirensis* também se destacou entre as esponjas testadas. A fração acetato de etila produziu interessante efeito anticoagulante, além da fração hexânica e aquosa. Para a fração acetato de etila de *H. tubifera*, também foi observado um aumento no tempo de recalcificação. Por outro lado, o extrato aquoso de *P. janeirensis* mostrou uma atividade pró-coagulante. Até onde nos foi possível verificar, esta é a primeira evidência deste efeito no ambiente marinho.

Considerando que pacientes com câncer possuem ativação da coagulação (MEIS e LEVY 2007; KVOLIK et al., 2010), o efeito anticoagulante observado para a fração

acetato de etila é importante na busca de novas modalidades terapêuticas para o câncer, principalmente, drogas multifuncionais. Por outro lado, cabe destacar que a atividade pró-coagulante do extrato aquoso de *P. janeirensis* é um dado relevante que corrobora com os resultados prévios já publicados. Frota Junior e colaboradores (2009b) descrevem que o extrato aquoso desta esponja induz apoptose por uma via dependente de caspase-9 em células de glioma. Quando a célula entra em apoptose, ocorre a desestruturação da camada de lipídeos fosfatidil serina (FS). A expressão de FS no exterior da célula entrando em apoptose gera um acúmulo de trombina na região, desencadeando a coagulação (CASCIOLA-ROSEN et al., 1996; FLYNN et al., 1997; STRIETH et al., 2008).

O efeito das frações e extratos sobre os radicais livres foi estudado, pois as estratégias que modulam potencial redox celular estão sendo aplicadas tanto para matar células cancerosas (BOOY et al., 2005) quanto na quimioprevenção do câncer (PARK e PEZZUTO 2013). Nossos dados sugerem importantes efeitos antioxidantes para as frações acetato de etila das três espécies e também para o extrato aquoso da esponja *P. janeirensis*. Além disso, este extrato mostrou uma tendência em aumentar a produção dos radicais peroxila no final do ensaio de TRAP (Manuscrito 4 – Figura 4). Estes dados estão de acordo com os resultados encontrados por Frota Junior e colaboradores (2009b), que relatam um efeito citotóxico em células de glioma com um aumento na produção de EROs.

O *fingerprint* químico das frações de interesse: acetato de etila das esponjas *H. tubifera* e *S. ruetzleri* e do extrato aquoso de *P. janeirensis* foi realizado por RMN de ¹H (500 MHz), usando como solventes clorofórmio e água deuterada, respectivamente. E também, análise por cromatografia em camada delgada (CCD), usando como revelador reagente de ninhidrina^a.

^a 0,2g de ninhidrina em 100 ml de etanol, aquecendo-se a placa em estufa a 120°C por 5 minutos.

Analisando o espectro de RMN ^1H da fração acetato de etila da esponja *S. ruetzleri* (Figura S1- Manuscrito 3) foi possível verificar que esta é constituída majoritariamente por ácidos graxos. Desta forma, os mesmos foram derivatizados para serem analisadas por CG/FID. Um total de 32 compostos foram identificados, sendo 52,89% destes ácidos graxos poli-insaturados (AGPI). AGs minoritários não usuais para o ambiente marinho, cotendo ciclopropanos ou metoxila e ácidos graxos ramificados de cadeia longa insaturada também foram caracterizados. Cabe destacar que este é o primeiro trabalho reportando análise química desta espécie coletada na costa brasileira. Entretanto, um composto lipídico não usual (17Z-Tetracosenil-1-glicerol éter) foi o primeiro metabólito a ser isolado de *S. ruetzleri* (CARDELLINA II et al., 1983).

AGPIs tem emergido como importantes adjuvantes para radio e quimioterapia e também como possíveis agentes quimioterápicos. Isto se deve principalmente, ao consenso na literatura que reporta o potencial efeito citotóxico seletivo para células de câncer dos AGPIs, uma vez que as células normais são afetadas em menor grau (DIDDLE 2002; PEREIRA et al., 2011). Estudos tem demonstrado que a liporoxidação (LPO) é um dos principais mecanismos de ação dos ácidos graxos em matar células tumorais (DIDDLE 2002; HOSSAIN et al., 2009). Devido as múltiplas duplas ligações, os AGPIs tem facilidade em perder um átomo de hidrogênio, assim a produção de EROs é responsável por iniciar a LPO, desencadear outras reações e também causar danos a macromoléculas. Desta forma, investigamos o efeito da fração acetato de etila de *S. ruetzleri* na LPO usando método *ex vivo* de dienos conjugados. Observamos que esta fração em concentrações baixas (< 25 $\mu\text{g/ml}$) produz um efeito protetor, por outro lado, em concentrações superiores a 50 $\mu\text{g/ml}$ induz um aumento na LPO. Isto indica, que os efeitos citotóxicos desta fração nas células de glioma e neuroblastoma podem estar em parte, relacionados à LPO.

Analisando em conjunto o espectro de RMN ^1H da fração acetato de etila da esponja *H. tubifera* e CCD positiva para ninhidrina, foi possível sugerir que esta é composta principalmente por esfingosídeos. A presença deste tipo de metabólito foi

evidenciada após reação de adição de grupamento Boc^b e análise por RMN ¹H, mostrando um singlete com $\delta_H = 1,45$, ou seja, presença de um nitrogênio nas moléculas. Dois esfingosídeos foram isolados através de diversas etapas: cromatografia em coluna, extração em fase sólida e CLAE/ELSD, conforme descrito no Manuscrito 1. Entretanto, para isolamento por CLAE foi necessário realizar reação de proteção do nitrogênio dos compostos com grupamento Boc, para termos uma boa resolução dos picos no cromatograma (Figura 20).

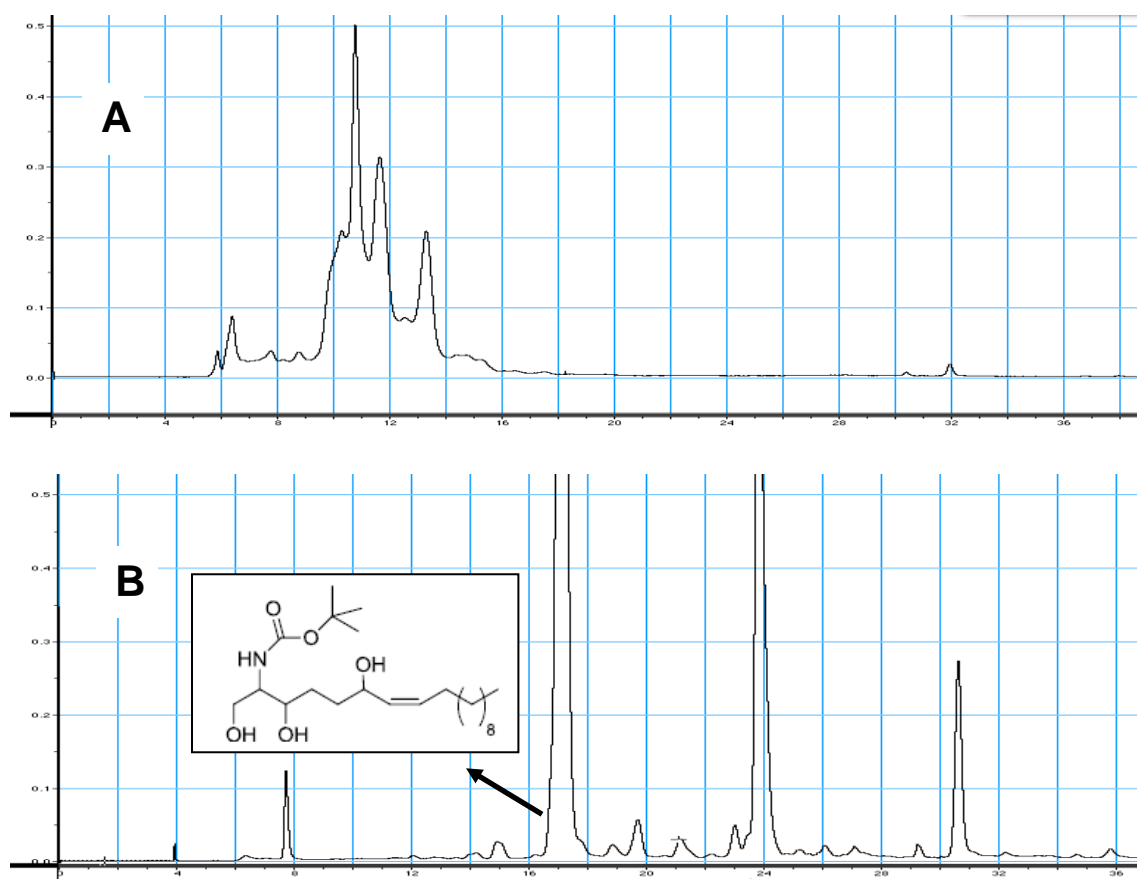


Figura 20: Perfil cromatográfico da Fração HT-EA6-3 em CLAE/ELSD, antes da reação de adição do grupamento Boc (A) e após a reação (B).

^b (Boc)₂O e K₂CO₃ em THF/H₂O (4:1), agitação por 2 h.

O composto majoritário foi isolado e denominado de *halisphingosine A*, o qual, foi previamente reportado por Mansoor et al. (2007b) e sua configuração absoluta estabelecida através do método de Mosher. Considerando a configuração não usual relatada e as limitações deste método: exigência de amostra suficiente para a preparação de *S* e *R* derivados e interpretações equívocas para moléculas com múltiplos grupos -OH e -NH₂, foi criado um novo protocolo de dicroísmo circular (DC), conforme descrito no Manuscrito 1. Assim a configuração *2R,3R,6R* foi verificada em escala nanomolar através da interpretação dos espectros de DC dos derivados mono e tetra-naftoil do produto natural. O novo composto, *halisphingosine B* (7,8-dihidrohalisphingosine A.), teve sua estrutura e configuração (*2R,3R,6R*) estabelecida por comparação com o composto A.

Outros esfingosídeos também foram isolados de esponjas do gênero. Devijver e colaboradores (2000) isolaram o composto (*2R,3R,7Z*)-2-aminotetradec-7-eno-1,3-diol, o qual demonstrou um potente efeito antimicrobiano (Richelle-Maurer et al., 2001) e uma série esfingosídeos foram encontrados para *Haliclona vansoestii* (CLARK et al., 2001). Recentemente, o composto *9Z*-2-amino-docos-9-eno-1,3,13,14-tetraol, denominado de haliscosamina, foi isolado da esponja *Haliclona viscosa* e apresentou propriedades antifúngicas (EL-AMRAOUI et al., 2013).

Não foi possível a obtenção dos produtos naturais para testar nos bioensaios pois o composto *halisphingosine B* foi isolado em quantidade insuficiente (0,6 mg) e as tentativas de remoção do grupamento Boc de *haliphingosine A* não foram efetivas. O uso de ácido trifluoracético (TFA) 50% em clorofórmio ou condições mais brandas (10 equivalentes de TFA, -20 °C) resultou em decomposição do composto. Por outro lado, método de desproteção usando água 100 °C por 24 hs (WANG et al., 2009) foi insuficiente para remoção do grupamento. Considerando os efeitos promissores da fração acetato de etila, a síntese destes compostos, assim como modificações estruturais nestas moléculas torna-se uma perspectiva a ser considerada.

Por outro lado, para o extrato aquoso de *P. janeirensis* não foi possível estabelecer a composição química por RMN de ^1H . Os espectros não apresentaram sinais claros, mesmo após alterações de temperatura das análises (30 °C e 50 °C). Porém, considerando os efeitos promissores deste extrato e a sua semelhança com o líquido que a esponja libera no momento da coleta (Figura 21), decidimos investigar seu potencial de defesa química através da análise comportamental em modelo de Zebrafish (ROSEMBERG et al., 2011).



Figura 21: Esponja *P. janeirensis* (marrom) e seu líquido (laranja) após a coleta.

O extrato aquoso (pH 6.8) foi adicionado no aquário, de modo a simular a liberação do líquido da esponja. Verificamos uma mudança significativa no comportamento espaço-temporal dos peixes *Danio rerio*, através de alterações do tempo móvel, distância percorrida e *absolute turn angle* do animal. Aliado a isto, mostramos que este efeito de fuga gerado pelo extrato aquoso pode estar correlacionado com a indução de estresse no animal, através da tendência observada em aumentar os níveis de cortisol.

Em suma, os dados do presente trabalho representam uma nova contribuição para o estudo químico e biológico de espécies de esponjas marinhas da costa sul brasileira.

X. CONCLUSÕES

Os experimentos realizados nesta tese revelaram o potencial químico e biológico de esponjas marinhas da costa sul-brasileira. Assim podemos concluir que:

1. *H. tubifera* é uma potencial fonte de esfingosídeos com atividade anticâncer, anticoagulante e antioxidante;
2. Os esfingosídeos isolados de *H. tubifera* apresentaram uma configuração absoluta (2*R*,3*R*,6*R*) não usual para este tipo de composto;
3. *Halisphingosine A* e *B* são análogos, sendo *halisphingosine B* um metabólito novo;
4. O método de DC desenvolvido, aplicável a submiligramas de amostra, prediz a configuração absoluta de três estereocentros com precisão e exatidão;
5. *S. ruetzleri* apresentou uma série de ácidos graxos com potenciais propriedades citotóxicas e antioxidantes;
6. O extrato aquoso da esponja *P. janeirensis* produziu efeitos importantes nos bioensaios realizados, corroborando com os trabalhos anteriores que mostram um efeito citotóxico através da morte celular por apoptose;
7. *P. janeirensis* possui um efetivo sistema químico de defesa;
8. O modelo comportamental de Zebrafish pode ser empregado como ferramenta para análise das relações ecológicas no ambiente marinho.

O conjunto dos resultados obtidos aponta as potencialidades destas esponjas na busca de moléculas protótipos para fármacos, especialmente na terapia do câncer.

XI. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos levam as seguintes perspectivas de continuação deste trabalho:

- Caracterização química do extrato aquoso da esponja *P. janeirensis*;
- Investigação dos mecanismos químicos de defesa da *P. janeirensis* através da análise dos efeitos do extrato aquoso em Zebrafish: neurotoxicidade, estresse oxidativo, dentre outros.
- Continuidade no isolamento de esfingosídeos da esponja *H. tubifera*;
- Síntese dos compostos *halisphingosine A*, *halisphingosine A* e análogos semi-sintéticos
- Ensaio biológicos dos compostos sintetizados.

XII. REFERÊNCIAS

ABRAHAM, E. Coagulation abnormalities in acute lung injury and sepsis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 22, p. 401-404. 2000.

ADCETRIS [Prescribing Information]. Bothell, WA: Seattle Genetics, Inc; 2012. Disponível em: <<http://www.adcetris.com/patient/prescribing-information.php>>. Acesso em: 15 jul. 2013.

AHN, Y. M.; LEE, W-W.; JUNG, J. H.; LEE, S-G.; HONGA, J. Structural determination of glucosylceramides isolated from marine sponge by fast atom bombardment collision-induced dissociation linked scan at constant B/E. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 44, n. 12, p. 1698-1708, 2009.

ALARIF, W. M. A.; ABDEL-LATEFF, A. B. C.; AL-LIHAIBI, S. S. A.; AYYAD, S.-E. N. D.; BADRIA, F. A. A new cytotoxic brominated acetylenic hydrocarbon from the marine sponge *haliclona* sp. with a selective effect against human breast cancer. *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, v. 68 C, n. 1-2, p. 70-75, 2013.

AMBROS, P. F.; AMBROS, I. M.; BRODEUR, G. M.; HABER, M.; KHAN, J.; NAKAGAWARA, A.; SCHLEIERMACHER, G.; SPELEMAN, F.; SPITZ, R.; LONDON, W. B.; COHN, S. L.; PEARSON, A. D.; MARIS, J. M. International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee British. *Journal of Cancer*, v. 100, p. 1471-1482, 2009.

AMERICAN CANCER SOCIETY, *Brain tumors in Adults*, 2013a. Disponível em: <<http://www.cancer.org/Cancer/BrainCNS Tumors in Adults/DetailedGuide/brain-and-spinal-cord-tumors-in-adults-what-are-brain-spinal-tumors>>. Acesso em: 24 jun. 2013.

AMERICAN CANCER SOCIETY, *Neuroblastoma*, 2013b. Disponível em: <<http://www.cancer.org/Cancer/Neuroblastoma/DetailedGuide/neuroblastoma-what-is-neuroblastoma>>. Acesso em: 27 jun. 2013.

AOKI, S.; MATSUI, K.; TANAKA, K.; SATARIB, R.; KOBAYASHI, M. Lembehynes A, a Novel Neuritogenic Polyacetylene, from a Marine Sponge of *Haliclona* sp. *Tetrahedron*, v. 56, p. 9945-9948, 2000.

AOKI, S.; MATSUI, K.; WEI, H.; MURAKAMI, N.; KOBAYASHI, M. Structure-activity relationship of neuritogenic spongean acetylene alcohols, lembehynes. *Tetrahedron*, v. 58, p. 5417-5422, 2002.

AOKI, S.; CAO, L.; MATSUI, K.; RACHMAT, R.; AKIYAMA, S.-I.; KOBAYASHI, M. Kendarimide A, a novel peptide reversing P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in tumor cells, from a marine sponge of *Haliclona* sp. *Tetrahedron*, v. 60, n. 33, p. 7053-7059, 2004.

AOKI, S.; MATSUI, K.; TAKATA, T.; HONG, W.; KOBAYASHI, M. Lembehyne A, a Spongean Polyacetylene, Induces Neuronal Differentiation in Neuroblastoma Cell. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 289, n. 2, p. 558-563, 2001.

AOKI, S.; MATSUI, K.; TAKATA, T.; KOBAYASHI, M. In situ photoaffinity labeling of the target protein for lembehyne A, a neuronal differentiation inducer. *FEBS Letters*, v. 544, n. 1-3, p. 223-227, 2003.

APPEL, I. M.; HOP, W. C.; VAN KESSEL-BAKVIS, C.; STIGTER, R.; PIETERS, R. L. Asparaginase and the effect of age on coagulation and fibrinolysis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Thrombosis and Haemostasis*, v. 100, n. 2, p. 330-337, 2008.

ARAI, M.; ISHIDA, S.; SETIAWAN, A.; KOBAYASHI, M. Haliclonacyclamines, tetracyclic alkylo piperidine alkaloids, as anti-dormant mycobacterial substances from a marine sponge of *Haliclona* sp. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 57, n. 10, p. 1136-1138, 2009.

ARAI, M.; LIU, L.; FUJIMOTO, T.; SETIAWAN, A.; KOBAYASHI, M. DedA Protein Relates to Action-Mechanism of Halicyclamine A, a Marine Spongean Macrocyclic Alkaloid, as an Anti-dormant Mycobacterial Substance. *Marine Drugs*, v. 9, n. 6, p. 984-993, 2011.

ARAI, M.; SOBOU, M.; VILCHÉZE, C.; BAUGHN, A.; HASHIZUME, H.; PRUKSAKORN, P.; ISHIDA, S.; MATSUMOTO, M.; JACOBS JR. W. R.; KOBAYASHI, M. Halicyclamine A, a marine spongean alkaloid as a lead for anti-tuberculosis agent. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 16, n. 14, p. 6732-6736, 2008.

ARATAKE, S.; TRIANTO, A.; HANIF, N.; DE VOOGD, N. J.; TANAKA, J. A. New Polyunsaturated Brominated Fatty Acid from a *Haliclona* Sponge. *Marine Drugs*, v. 7, n. 4, p. 523-527, 2009.

ARGYRIOU, A. A.; ANTONACOPOULOU, A.; ICONOMOU, G.; KALOFONOS, H.P. Treatment options for malignant gliomas, emphasizing towards new molecularly targeted therapies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 69, p. 199-210, 2009.

AYANOGLU, E.; KURTZ, K.; KORNPROBST, J. M.; DJERASSI, C. New natural 2-acetoxy fatty acids using chemical ionization and electron impact mass spectrometry. *Lipids*, v. 20, n. 3, p. 141-144, 1985.

AYYAD, S-E.; BAHAFFI, S. O. S.; HASHISH, N. E. Isolation and structure determination of the biologically active sphingolipids from marine sponge *Haliclona* species. *Natural Product Research*, v. 23, n. 1, p. 44-50, 2009.

BASLOW, M. H. Porifera (Sponges). In: *Marine Pharmacology- A study of toxins and other biologically active substances of marine origin*, The Williams & Wilkins Co: Baltimore, 1969. cap. 8, p. 86-99.

BASLOW, M. H.; TURLAPATY, P. In vivo antitumor activity and other pharmacological properties of halitoxin obtained from the sponge *Haliclona viridis*. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*, v. 12, p. 6-8, 1978.

BECERRO, M. A.; THACKER, R. W.; TURON, X.; URIZ, M. J.; PAUL, V. J. Biogeography of sponge chemical ecology: comparisons of tropical and temperate defenses. *Oecologia*, v. 135, p. 91-101, 2003.

BERGMANN, W.; FEENEY, R. J. The isolation of a new thymine pentoside from sponges. *Journal of the American Chemical Society*, v. 72, p. 2809-2810, 1950.

BERGMANN, W.; MCTIGUE, F. H.; LOW, E. M.; STOKES, W. M.; FEENEY, R. J. Contributions to the study of marine products. XXVI. Sterols from sponges of the family Suberitidae. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 15, n. 1, p. 96-105, 1950.

BERGMANN, W.; FEENEY, R. J. Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. I. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 16, p. 981-987, 1951.

BERGMANN, W.; BURKE, D. C. Contributions to the study of marine products. XXXIX. The nucleosides of sponges. III. Spongothymidine and spongouridine. *The Journal of Organic Chemistry*, n. 20, p. 1501-1507, 1955.

BERGMANN, W.; BURKE, D. C. Contributions to the study of marine products. XL. The nucleosides of sponges. IV. Spongosine. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 21, p. 226-228, 1956.

BERGMANN, W.; STEMPIEN JR., M. F. Contributions to the study of marine products. XLIII. The nucleosides of sponges. V. The synthesis of spongosine. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 22, p. 1575-1577, 1957.

BERGQUIST P. R. *Sponges*. London: Hutchinson, 1978. 268p.

BINELLO, E.; GERMANO, I. M. Targeting glioma stem cells: A novel framework for brain tumors. *Cancer Science*, v. 102, n. 11, p. 1958-1966, 2011.

BLACKBURN, C.L.; FAULKNER, D. J. Adociasulfate 10, A New Merohexaprenoid Sulfate from the Sponge *Haliclona* (aka *Adocia*) sp. *Tetrahedron*, v. 56, n. 43, p. 8429-8432, 2000.

BLANQUER, A.; URIZ, M-J. Cryptic speciation in marine sponges evidenced by mitochondrial and nuclear genes: A phylogenetic approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 45, p. 392–397, 2007.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. *Natural Products Report*, v. 20, p. 1-48, 2003.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. *Natural Products Report*, v. 21, p. 1-49, 2004.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. *Natural Products Report*, v. 22, p. 15-61, 2005.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. *Natural Products Report*, v. 23, p. 26-78, 2006.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; HU, W-P.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. *Natural Products Report*, v. 24, p. 31-86, 2007.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; HU, W-P.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. *Natural Products Report*, v. 25, p. 35-94, 2008.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; HU, W-P.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. *Natural Products Report*, v. 26, p. 170–244, 2009.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. *Natural Products Report*, v. 27, p. 165–237, 2010.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. *Natural Products Report*, v. 28, p. 196–268, 2011.

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

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A.; MUNRO, M. H. G.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. *Natural Products Report*, v. 30, p. 237–323, 2013.

BOHLIN, L.; GÖRANSSON, U.; ALSMARK, C.; WEDÉN, C.; BLACKLUND, A. Natural products in modern life science. *Phytochemistry Reviews*, v. 9, p. 279–30, 2010.

BOKESCH, H. R.; STULL, A. C.; PANNELL, L. K.; MCKEE, T. C.; BOYD, M. R. New pentacyclic sulfated hydroquinone from the marine sponge *Haliclona* sp. *Tetrahedron Letters*, v. 43, n. 16, p. 3079-3081, 2002.

BOOY, E. P.; JOHAR, D.; KADKHODA, K.; BAY, G. H.; LOS, M. The Immune System, Involvement in Neurodegenerative Diseases, Ageing and Cancer. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents*, v. 4, n. 4, p. 349-352, 2005.

BRODEUR, G. M.; PRITCHARD, J.; BERTHOLD, F.; CARLSEN, N. L. T.; CASTEL, V.; CASTLEBERRY, R. P.; DE BERNARDI, B.; EVANS, A. E.; FAVROT, M.; HEDBORG, F.; KANEKO, M.; KEMSHEAD, J.; LAMPERT, F.; LEE, R. E. J.; LOOK, A. T.; PEARSON, A. D. J.; PHILIP, T.; ROALD, B.; SAWADA, T.; SEEGER, R. C.; TSUCHIDA, Y.; VOUTE P. A. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *Journal of Clinical Oncology*, v. 11, n. 8, p. 1466-1477, 1993.

BRODEUR, G. M.; SEEGER, R. C.; SCHWAB, M.; VARMUS, H. E.; BISHOP, J. M. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science*, v. 224, p. 1121–1124, 1984.

BUCHANAN, M.; BRISTER, S. J.; OFOSU, F. A. Thrombin: Its Key Role in Thrombogenesis: Implications for its Inhibition Clinically. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 72, p. 157–165, 1995.

BUCHANAN, M.; BRISTER, S. J.; OFOSU, F. A. Thrombin: Its Key Role in Thrombogenesis: Implications for its Inhibition Clinically. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 72, p. 157–165, 1995.

CARBALLEIRA, N. M.; MONTANO, N.; BALAÑA-FOUCE, R.; PRADA, C. F. First total synthesis and antiprotozoal activity of (Z)-17-methyl-13-octadecenoic acid, a new marine fatty acid from the sponge *Polymastia penicillus*. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 161, n. 1, p. 38-43, 2009.

CARDELLINA II, J. H., GRADEN, C. J., GREER, B. J., KERN, J. R. 17Z-tetracosenyl 1-glycerol ether from the sponges *Cinachyra alloclada* and *Ulosa ruetzleri*. *Lipids*, v. 18, n. 2, p. 107-110, 1983.

CARDELLINA II, J. H.; NIGH, D.; VANWAGENEN, B. C. Plant growth regulatory indoles from the sponges *Dysidea etheria* and *Ulosa ruetzleri*. *Journal of Natural Products*, v. 49, n. 6, p.1065-1067, 1986.

CARNEIRO, R. F.; DE MELO, A. A.; DO NASCIMENTO, F. E. P.; SIMPLICIO, C. A.; DO NASCIMENTO, K. S.; DA ROCHA, B. A. M.; SAKER-SAMPAIO, S.; MOURA, R. M.; MOTAC, S. S.; CAVADA, B. S.; NAGANO, C. S. Sampaio, A. H. Halilectin 1 (H-1) and Halilectin 2 (H-2): two new lectins isolated from the marine sponge *Haliclona caerulea*. *Journal of Molecular Recognition*, v. 26, p. 51–58, 2013.

CASAPULLO, A.; PINTO, O. C.; MARZOCCO, S.; AUTORE, G.; RICCIO, R. 3 Alkylpyridinium Alkaloids from the Pacific Sponge *Haliclona* sp. *Journal of Natural Products*, v. 72, n. 2, p. 301-303, 2009.

CASCIOLA-ROSEN, L.; ROSEN, A.; PERI, M.; SCHLISSEL, M. Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity: Implications for coagulation events and antigenic spread in systemic lupus erythematosus. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA*, v. 93, n. 4, p. 1624-629, 1996.

CHILL, L.; MIROZ, A.; KASHMAN, Y. Haliclonyne, a New Highly Oxygenated Polyacetylene from the Marine Sponge *Haliclona* Species. *Journal of Natural Products*, v. 63, n. 4, p. 523-526, 2000.

CLARK, R. J.; GARSON, M. J.; HOOPER, J. N. A. Antifungal Alkyl Amino Alcohols from the Tropical Marine Sponge *Haliclona* n. sp. *Journal of Natural Products*, v. 64, n. 12, p. 1568-1571, 2001.

CREWS, P.; HARRISON, B. New Triterpene-Ketides (Merotriterpenes), Haliclotriol A and B, from an Indo-Pacifc *Haliclona* Sponge. *Tetrahedron*, v. 56, n. 46, p. 9039-9046, 2000.

CYCHON, C.; SCHMIDT, G.; MORDHORST, T.; KÖCK, M. Structure elucidation of submilligram quantities of natural products - Application to haliclamines G and H from the Arctic marine sponge *Haliclona viscosa*. *Section B Journal of Chemical Science*, v. 67, n. 9, p. 944-950, 2012.

DA ROCHA, R. M.; MORENO, T. R.; METRI, R. Ascídias (Tunicata, Ascidiacea) da Reserva Biológica Marinha do Arvoredo, Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 22, n. 2, p. 461-476, 2005.

DA SILVA, A. C.; KRATZ, J. M.; FARIAS, F. M.; HENRIQUES, A. T., DOS SANTOS, J.; LEONEL, R. M.; LERNER, C.; MOTHES, B.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O. In vitro Antiviral Activity of Marine Sponges Collected Off Brazilian Coast. *Biological Pharmaceutical Bulletin*. v. 29, n. 1, p. 135-140, 2006.

- DE JESUS, R. P.; FAULKNER, D. J. Chlorinated Acetylenes from the San Diego Sponge *Haliclona lunisimilis*. *Journal of Natural Products*, v, 66, n. 5, p. 671-674, 2003.
- DE MEIS, E.; LEVY R. A. Câncer e trombose: uma revisão da literatura. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 53, n.2, p. 183-193, 2007.
- DE MOURA M. B.; DOS SANTOS, L. S.; HOUTEN, B. V. Mitochondrial Dysfunction in Neurodegenerative Diseases and Cancer. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 51, p. 391-405, 2010.
- DEANGELIS, L. M.; POSNER, M. D. Brain Metastases. In: KUFÉ, D. W.; POLLOCK, R. E.; WEICHSELBAUM, R. R.; BAST, R. C.; GANSLER, T. S.; HOLLAND, J. F.; FREI, E. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6 ed. Hamilton (ON): BC Decker; 2004. cap. 84, p. 1227-1231.
- DEFANT, A.; MANCINI, I.; RASPOR, L.; GUELLA, G.; TURK, T.; SEPČIĆ, K. New Structural Insights into Saraines A, B, and C, Macrocyclic Alkaloids from the Mediterranean Sponge *Reniera (Haliclona) sarai*. *European Journal of Organic Chemistry*, n. 20-21, p. 3761-3767, 2011.
- DENIS, C.; WIELGOSZ-COLLIN, G.; BRETÉCHÉ, A.; RUIZ, N.; RABESAOTRA, V.; BOURY-ESNAULT, N.; KORNPORST, J.-M.; BARNATHAN, G. New 17-Methyl-13-Octadecenoic and 3,16 Docosadienoic Acids from the Sponge *Polymastia penicillus*. *Lipids*, v. 44, p. 655-663, 2009.
- DEVIJVER, C.; SALMOUN, M.; DALOZE, D.; BRAEKMAN, J. C.; DE WEERDT, W. H.; DE KLUIJVER, M. J.; GOMEZ, R. (2R,3R,7Z)-2-Aminotetradec-7-ene-1,3-diol, a New Amino Alcohol from the Caribbean Sponge *Haliclona vansoesti*. *Journal of Natural Products*, v. 63, n. 7, p. 978-980, 2000.
- DRESCH, M. T. K, KAPPEL, V. D.; ROSSATO, S. B.; BIEGELMEYER, R.; MAYORGA, P., ZUANAZZI, J. A. S.; HENRIQUES, A. T.; MOREIRA, J. C. F. Optimization and validation of an alternative method to evaluate Total Reactive Antioxidant Potential (TRAP). *Analytical Biochemistry*, v. 385, n. 1, p. 107-114, 2009.
- DUBE, A.; SINGH, N.; SAXENA, A.; LAKSHMI, V. Antileishmanial potential of a marine sponge, *Haliclona exigua* (Kirkpatrick) against experimental visceral leishmaniasis. *Parasitology Research*, v. 101, n. 2, p. 317-324, 2007.
- EL-AMRAOUI, B.; BIARD J-F.; FASSOUANE, A. Haliscosamine: a new antifungal sphingosine derivative from the Moroccan marine sponge *Haliclona viscosa*. *SpringerPlus*, v. 2, p. 252-272, 2013.

ENGEL, E.; PAWLIK, J. R. Interactions among Florida sponges. I. Reef habitats *Marine Ecology Progress Series*, v. 303, p. 133–144, 2005.

ESTELLER, M; GARCIA-FONCILLAS, J.; ANDION, E.; GOODMAN, S. N.; HIDALGO, O. F.; VANACLOCHA, V.; BALYN, S. B.; HERMAN, J. G. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *The New England Journal of Medicine*, v. 343, n. 19, p. 1350–1354, 2000.

FERLAY, J.; SHIN, H. R.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C.; PARKIN, D. M. *Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer. Base GLOBOCAN 2008*, v. 1.2, n. 10. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>. Acesso em: 18 nov. 2011.

FERREIRA, M.; CABADO, A. G.; CHAPELA, M.; FAJARDO, P.; ATANASSOVA, M.; GARRIDO, A.; VIEITES, J. M.; LAGO J. Cytotoxic activity of extracts of marine sponges from NW Spain on a neuroblastoma cell line. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 32, p. 430–437, 2011.

FLYNN, P. D.; BYRNE, C. D.; BAGLIN, T. P.; WEISSBERG, P. L.; BENNETT, M. R. T generation by apoptotic vascular smooth muscle cells. *Blood*, v. 89, n. 12, p. 4378-384, 1997.

FROTA JUNIOR, M. L. C. *A esponja marinha Polymastia janeirensis como fonte de novos fármacos contra o câncer*. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, 2008 (Tese de Doutorado).

FROTA JUNIOR, M. L. C.; BRAGANHOL, E.; CANEDO, A. D.; KLAMT, F.; APEL, M. A.; LERNER, C.; MOTHE, B.; BATTASTINI, A. M. O.; HENRIQUES, A. T.; MOREIRA, J. C. F. Extracts of marine sponge *Polymastia janeirensis* induce oxidative cell death through a caspase-9 apoptotic pathway in human U138MG glioma cell line. *Investigational New Drugs*, v. 27, p. 440-446, 2009a.

FROTA JUNIOR, M. L. C.; BRAGANHOL, E.; CANEDO, A. D.; KLAMT, F.; APEL, M. A.; LERNER, C.; MOTHE, B.; BATTASTINI, A. M. O.; HENRIQUES, A. T.; MOREIRA, J. C. F. Brazilian marine sponge *Polymastia janeirensis* induces apoptotic cell death in human U138MG glioma cell line, but not in a normal cell culture. *Investigational New Drugs*, v. 27, p. 13-20, 2009b.

FROTA JUNIOR, M. L. C.; BIEGELMEYER, R.; MOTHE, B.; HENRIQUES, A. T.; MOREIRA, J. C. F. Current Status on Natural Products with Antitumor Activity from Brazilian Marine Sponges. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, v. 13, n. 1, p. 235-244, 2012.

FULLER, G. N.; ALDAPE K. D. Neuropathology and Molecular biology of Intracranial tumors. In: DEMONTE, F.; GILBERT, M. R.; MAHAJAN, A.; MCCUTCHEON, I. E.; BUZDAR, A. U.; FREEDMAN, R. S. *Tumors of the Brain and Spine*. Norwell: Springer Science+Business Media, LLC, 2003. v. 1 digital, p.23-35. Disponível em:<<http://www.springerlink.com/content/r252h0/#section=306466&page=1&locus=92>> Acesso em: 20 nov. 2011.

FULDA, S. Targeting apoptosis signaling pathways for anticancer therapy. *Frontiers in Oncology*, v. 1, p. 1-7, 2011.

GALEANO E.; MARTÍNEZ, A. Antimicrobial activity of marine sponges from Urabá Gulf, Colombian Caribbean region. *Journal de Mycologie Médicale*, v. 17, p. 21-24, 2007.

GARAVENTA, F.; PIAZZA, V.; ZOVKO, A.; TURK, T.; CHELOSSI, E.; FALUGI, C.; ALUIGI, M. G.; ANGELINI, C.; TROMBINO, S.; GALLUS, L.; FERRANDO, S.; ALBINI, A.; PALEARI, L.; SEPČIČ, K.; FAIMALI, M. Multiple functions of the cholinesterase inhibiting polyalkylpyridinium salts extracted from the marine sponge *Haliclona sarai*. *WSEAS Transactions on Biology and Biomedicine*, v. 7, n. 3, p. 103-113, 2010.

GOUD, T. V.; KRISHNAIAH, P.; REDDY, S. M.; SRINIVASULU, M.; RAO, M. R.; VENKATESWARLU, Y. Chemical investigation of the marine sponges *Clathria reinwardti* and *Haliclona cribricutis*. *Indian Journal of Chemistry*, v. 44B, p. 607-610, 2005.

GUAN, L. L.; SERA, Y.; ADACHI, K.; NISHIDA, F.; SHIZURI, Y. Isolation and Evaluation of Nonsiderophore Cyclic Peptides from Marine Sponges. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 283, n. 4, p. 976-981, 2001.

GUERRA, M. R.; GALLO, C. V. M.; AZEVEDO, G.; MENDONÇA, S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 5, n. 3, p. 227-234, 2005.

HAEFNER, B. Drugs from the deep: Marine natural products as drug candidates. *Drug Discovery Today*, v. 8, n. 12, p. 536-544, 2003.

HILLEN, H. F. Thrombosis in cancer patients. *Annals of Oncology*, v. 11, n. 3, p. 273-276, 2000.

HOFFMAN, R.; HAIM, N.; BRENNER, B. Cancer and thrombosis revisited. *Blood Reviews*, v. 15, n. 2, p. 61-67, 2001.

HWANG, B. S.; OH, J. S.; JEONG, E. J.; SIM, C. J.; RHO, J-R. Densanins A and B, New Macrocyclic Pyrrole Alkaloids Isolated from the Marine Sponge *Haliclona densaspicula*. *Organic Letters*, v. 14, n. 24, 2012.

KIJJOA, A.; SAWANGWONG, P. Drugs and Cosmetics from the Sea. *Marine Drugs*, v. 2, p. 73-82, 2004.

KONG, F.; ANDERSEN, R. J. Polymastiamide A, a novel steroid/amino acid conjugate isolated from the Norwegian marine sponge *Polymastia boletiformis* (Lamarck,1815). *The Journal of Organic Chemistry*, v. 58, p. 6924 –6927, 1993.

KONG, F.; ANDERSEN, R. J. Polymastiamide B-F, novel steroid/aminoacid conjugates isolated from the Norwegian marine sponge *Polymastia boletiformis*. *Journal of Natural Products*, v. 59, p. 379–85, 1996.

KVOLIK, S.; JUKIC, M.; MATIJEVIC, M.; MARJANOVIC, K.; GLAVAS-OBROVAC, L. An overview of coagulation disorders in cancer Patients. *Surgical Oncology*, v. 19, p. e33-e46, 2010.

LEE, Y.; JANG, K. H.; JEON, J.; YANG, W-Y.; SIM, C. J.; OH, K-B.; SHIN. J. Cyclic Bis-1,3-dialkylpyridiniums from the Sponge *Haliclona* sp. *Marine Drugs*, v. 10, p. 2126-2137, 2012.

LERNER, C.; MOTHES, B.; CARRARO, J. L. Novos registros e ampliação de limites meridionais de distribuição de poríferos (Porífera, Demospongiae) no Atlântico sudoeste. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 22, n. 3, p. 596-612, 2005.

LERNER, C. B. *Esponjas da Ilha do Galé (Porifera, Demospongiae) “Reserva Biológica Marinha do Arvoredo” Santa Catarina, Brasil*. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 1993 (Dissertação de Mestrado).

LI, H.; WANG, B.; LI, Y. An unusual mercapto-containing and three known diketopiperazines from the marine sponge *Haliclona* Sp. *Proceedings 2011 International Conference on Human Health and Biomedical Engineering, HHBE*, art. 6028393, p. 643-645, 2011.

LIU, Y. Renaissance of Marine Natural Product Drug Discovery and Development. *Journal of Marine Science: Research & Development*, v. 2, n. 2, p. 1-2., 2012.

LOUIS, D. N.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O. D.; CAVENEE, W. K.; BURGER, P. C.; JOUVET, A.; SCHEITHAUER, B. W.; KLEIHUES, P. The 2007 WHO classification of tumors of the central nervous system. *Acta Neuropathologica*, v. 114, n. 2, p. 97–109, 2007.

MANSOOR, T. A.; SHINDE, P. B.; LUO, X.; HONG, J.; LEE, C.-O.; CHUNG, J. S.; BYENG, W. S.; JUNG, J. H. Renierosides, Cerebrosides from a Marine Sponge *Haliclona (Reniera) sp.* *Journal of Natural Products*, v. 70, n. 9, p. 1481-1486, 2007a.

MANSOOR, T. A.; PARK, T. S.; LUO, X.; HONG, J.; LEE, C. O.; JUNG, J. H. A New Sphingosine from a Marine Sponge *Haliclona (Reniera) sp.* *Natural Product Science*, v. 13, n. 3, p. 247-250, 2007b.

MATTHAY, K. K.; PEREZ, C.; SEEGER, R. C.; BRODEUR, G. M.; SHIMADA, H.; ATKINSON, J. B.; BLACK, C. T.; GERBING, R.; HAASE, G. M. STRAM, D. O.; SWIFT, P.; LUKENS J. N. Successful treatment of stage III neuroblastoma based on prospective biologic staging: a Children's Cancer Group study. *Journal of Clinical Oncology*, v. 16, n. 4, p. 1256–1264, 1998.

MAYER, A. M. S.; RODRÍGUEZ A. D.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O.; FUSETANI, N. Marine pharmacology in 2009–11: Antibacterial, Antidiabetic, Antifungal, Anti-Inflammatory, Antiprotozoal, Antituberculosis, and Antiviral Activities; Affecting the Immune and Nervous Systems, and other Miscellaneous Mechanisms of Action. *Marine Drugs*, v. 11, p. 2510-2573, 2013.

MAYER, A. M. S. *Marine Pharmaceuticals: The Clinical Pipeline*, 2013. Disponível em:<<http://marinepharmacology.midwestern.edu/clinPipeline.htm>>. Acesso em: 20 jul. 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). *Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: Inca, 2011. 118p. Disponível em:<<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2013.

MOLINSKI, T. F.; DALISAY, D. S.; LIEVENS, S. L.; SALUDES, J. P. Drug development from marine natural products. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 8, p. 69-85, 2009.

MONKS, N. R.; LERNER, C.; HENRIQUES, A. T.; FARIAS, F. M.; SCHAPOVAL, E. E. S.; SUYENAGA, E. S.; ROCHA, A. B.; SCHWARTSMANN, G.; MOTHE, B. Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine sponges collected off coast of Santa Catarina, southern Brazil. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 281, p. 1-12, 2002.

MONTASER, R.; LUESCH, H. Marine natural products: a new wave of drugs? *Future Medicinal Chemistry*, v. 3, n. 12, p. 1475–1489, 2011.

MOTHES, B.; LERNER, C.; DA SILVA, C. M. M. *Guia ilustrado: esponjas marinhas da costa sul brasileira*. 2. ed. Pelotas: USEB, 2006, 119p.

MOURA, L. A.; ORTIZ-RAMIREZ, F.; CAVALCANTI, D. N.; RIBEIRO, S. M.; MURICY, G.; TEIXEIRA, V. L.; FULY, A. L. Evaluation of Marine Brown Algae and Sponges from Brazil as Anticoagulant and Antiplatelet Products. *Marine Drugs*, v. 9, p. 1346-1358, 2011.

MURICY, G.; HADJU, E.; ARAUJO, F. V.; HAGLER, A. N. Antimicrobial activity of Southwestern Atlantic shallow-water marine sponges (Porifera). *Scientia Marina*, v. 57, n. 4, p. 427-432, 1993.

NUZZO, G.; CIAVATTA, M. L. VILLANI, G.; MANZO, E.; ZANFARDINO, A.; VARCAMONTI, M.; GAVAGNIN, M. Fulvynes, antimicrobial polyoxygenated acetylenes from the Mediterranean sponge *Haliclona fulva*. *Tetrahedron*, v. 68, n. 2, p. 754-760, 2012.

PALERMO, J. A. Productos Naturales de Origen Marina. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (ORG.). *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*. 5. ed. Porto Alegre: EDUFRGS; Florianópolis: EDUFSC, 2003. cap. 38, p. 996-1044.

PARK, E-J.; PEZZUTO, J. M. Antioxidant Marine Products in Cancer Chemoprevention. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 19, p. 115-138, 2013.

PARK, J. R.; EGGERT, A.; CARON, H. Neuroblastoma: Biology, Prognosis, and Treatment. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, v. 24, p. 65-86, 2010.

PARK, T.; MANSOOR, T. A.; SHINDE, P. B.; BAO, Q.; HONG, J.; JUNG, J. H. New Cerebrosides from a Marine Sponge *Haliclona* (*Reniera*) sp. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 57, n. 1, p. 106-111, 2009.

PELICANO, H.; CARNEY, D.; HUANG, P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resistance Updates*, v. 7, p. 97-110, 2004.

PICCIOLI, A.; LENSING, A. W.; PRINS, M. H.; FALANGA, A.; SCANNPIECO, G. L.; LERAN, M.; CIGOLINI, M.; AMBROSIO, G. B.; MONREAL, M.; GIROLAMI, A.; PRANDONI, P. Extensive screening for occult malignant disease in idiopathic venous thromboembolism: a prospective randomized clinical trial. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 2, n. 6, p. 884-889, 2004.

POMPONI, S. A. The oceans and human health: the discovery and development of marine-derived drugs. *Oceanography*, v. 14, n. 1, p. 78-87, 2001.

PRADO, M. P.; TORRES, Y. R.; BERLINK, R. G. S.; DESIDERÁ, C.; SANCHEZ, M. A.; CRAVEIRO, M. V.; HAJDU E.; DA ROCHA, R. M.; MACHADO-SANTELLI, G. M. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 313, p. 125-137, 2004.

PROKSCH, P.; PUTZ, A.; ORTLEPP, S.; KJER, J.; BAYER, M. Bioactive natural products from marine sponges and fungal endophytes. *Phytochemistry Reviews*, v. 9, p. 475-489, 2010.

RANDAZZO, A.; BIFULCO, G.; GIANNINI, C.; BUCCI, M.; DEBITUS, C.; CIRINO, G.; GOMEZ-PALOMA, L. Halipeptins A and B: Two Novel Potent Anti-inflammatory Cyclic Depsipeptides from the Vanuatu Marine Sponge *Haliclona* species. *Journal of the American Chemical Society*, v. 123, n. 44, p. 10870-10876, 2001a.

RANDAZZO, A.; DEBITUS, C.; GOMEZ-PALOMA, L. Haliclamide, a novel cyclic metabolite from the Vanuatu marine sponge *Haliclona* sp. *Tetrahedron*, v. 57, p. 4443-4446, 2001b.

RAO, L. V.; EZBAN, M. Active site-blocked activated factor VII as an effective antithrombotic agent: mechanism of action. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, v. 11, p. 135-143, 2000.

RASHID, M. A.; GUSTAFSON, K. R.; BOSWELL, J. L.; BOYD, M. R. Haligramides A and B, Two New Cytotoxic Hexapeptides from the Marine Sponge *Haliclona nigra*. *Journal of Natural Products*, v. 63, n. 7, p. 956-959, 2000.

RASHID, M. A.; GUSTAFSON, K. R.; BOYD, M. R. A New Isoquinoline Alkaloid from the Marine Sponge *Haliclona* Species. *Journal of Natural Products*, v. 64, n. 9, p. 1249-1250, 2001.

REIS, F.; MORAES, F.; BATISTA, D.; VILLAÇA, R.; AGUIAR, A.; MURICY, G. Diet of the queen angelfish *Holacanthus ciliaris* (Pomacanthidae) in São Pedro e São Paulo Archipelago, Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, v. 93, n. 2, p. 453-460, 2013.

RICHELLE-MAURER, E.; BRAEKMAN, J.-C.; DE KLUIJVER, M. J.; GOMEZ, R.; DE VYVER, G.; SOEST, R. W. M.; DEVIJVER, C. Cellular location of (2R, 3R, 7Z)-2 aminotetradec-7-ene-1, 3-diol, a potent antimicrobial metabolite produced by the Caribbean sponge *Haliclona vansoesti*. *Cell and Tissue Research*, v. 306, n. 1, p. 157-165, 2001.

RICKLES, F. R.; FALANGA, A. Molecular basis for the relationship between thrombosis and cancer. *Thrombosis Research*, v. 102, n. 6, p. 215-224, 2001.

RODKINA, S. A.; IMBS, A. B.; KRASOKHIN, V. B. Fatty Acids of Sponges from the Sea of Okhotsk. *Russian Journal of Marine Biology*, v. 34, n. 6, p. 384–390. 2008.

ROSEMBERG, D. B.; RICO, E. P.; MUSSULINI, B. H. M.; PIATO, A. L.; CALCAGNOTTO, M. E.; BONAN, C. D.; DIAS, R. D.; BLASER, R. E.; SOUZA, D. O., DE OLIVEIRA, D. L. Differences in Spatio-Temporal Behavior of Zebrafish in the Open Tank Paradigm after a Short-Period Confinement into Dark and Bright Environments. *Plos One*, v. 5, n. 5, p. e19397-e19397, 2011.

SAITO, N.; TANAKA, C.; SATOMI, T.; OYAMA, C.; KUBO, A. Chemistry of Renieramycins. Part 4. Synthesis of a Simple Natural Marine Product, 6-Hydroxy-7-methoxyisoquinolinemethanol. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 52, n. 2, p. 282-286, 2004.

SANTAFÉ, G.; PAZ, V.; RODRÍGUEZ, J.; JIMÉNEZ, C. Novel Cytotoxic Oxygenated C29 Sterols from the Colombian Marine Sponge *Polymastia tenax*. *Journal of Natural Products*, v. 65, p. 1161-1164, 2002.

SCHMIDT, M. L.; LUKENS, J. N.; SEEGER, R. C.; BRODEUR, G. M.; SHIMADA, H.; GERBING, R. B., STRAM, D. O.; PEREZ, C.; HAASE, G. M.; MATTHAY, K. K. Biologic factors determine prognosis in infants with stage IV neuroblastoma: a prospective Children's Cancer Group study. *Journal of Clinical Oncology*, v. 18, n. 6, p. 1260–1268, 2000.

SCHMIDT, G.; TIMM, C.; KÖCK, M. New haliclamines E and F from the Arctic sponge *Haliclona viscosa*. *Organic and Biomolecular Chemistry*, v. 7, n. 15, p. 3061-3064, 2009.

SCHMIDT, G., TIMM, C.; KÖCK, M. Halilocyclin C, a New Monomeric 3-Alkyl Pyridinium Alkaloid from the Arctic Marine Sponge *Haliclona viscosa*. *Zeitschrift für Naturforschung - Section B Journal of Chemical Sciences*, v. 66, n. 7, p. 745-748, 2011.

SCHMIDT, G.; TIMM, C.; GRUBE, A.; VOLK, C. A.; KÖCK, M. Viscosalines B1,2 and E1,2: Challenging New 3-Alkyl Pyridinium Alkaloids from the Marine Sponge *Haliclona viscosa*. *Chemistry European Journal*, v. 18, p. 8180 – 8189, 2012.

SCHMITZ, F. J.; HOLLENBEAK, K. H.; CAMPBELL, D. C. Marine Natural Products: Halitoxin, Toxic Complex of Several Marine Sponges of the Genus *Haliclona*. *Journal of Organic Chemistry*, v. 43, n. 20, p. 3916-3922, 1978.

SEEGER, R. C.; BRODEUR, G. M.; SATHER, H.; DALTON, A.; SIEGEL, S. E.; WONG, K. Y.; HAMMOND, D. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *The New England Journal of Medicine*, v. 313, p. 1111– 1116, 1985.

SENER, P. D.; SIEVERS, E. L. The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma. *Nature Biotechnology*, v. 30, n. 7, p. 631- 637, 2012.

SEPČIČ, K.; BATISTA, U.; VACELET, J.; MAČEK, P.; TURK, T. Biological Activities of Aqueous Extracts from Marine Sponges and Cytotoxic Effects of 3-Alkylpyridinium Polymers from *Reniera sarai*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 117C, n. 1, p. 47–53, 1997.

SERA, Y.; ADACHI, K.; FUJII, K.; SHIZURI, Y. A New Antifouling Hexapeptide from a Palauan Sponge, *Haliclona* sp. *Journal of Natural Products*, v. 66, n. 5, p. 719-721, 2003.

SERA, Y.; ADACHI, K.; FUJII, K.; SHIZURI, Y. Isolation of Haliclonamides: New Peptides as Antifouling Substances from a Marine Sponge Species, *Haliclona*. *Marine Biotechnology*, v. 4, n. 5, p. 441-446, 2002.

SHACTER, E.; WILLIAMS, J. A.; LEVINE, R. L. Oxidative modification of fibrinogen inhibits thrombin-catalyzed clot formation. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 18, p. 815-82, 1995.

SIMON, T.; SPITZ, R.; FALDUM, A.; HERO, B.; BERTHOLD, F. New definition of low-risk neuroblastoma using stage, age, and 1p andMYCNstatus. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, v. 26, n. 12, p. 791–796. 2004.

SIPKEMA, D.; FRANSSEN, M. C.; OSINGA, R.; TRAMPER, J.; WIJFFELS, R. H. Marine Sponges as Pharmacy. *Journal of Marine Biotechnology*, v. 7, p. 142-162, 2005.

SOREK, H.; RUDI, A.; AKNIN, M.; GAYDOU, E. M.; KASHMAN, Y. Isohalitulin and Haliclorensins B and C, Three Marine Alkaloids from *Haliclona tulearensis* *Journal of Natural Products*, v. 73, n. 3, p. 456-458, 2010.

SPAINHOUR, C. B. Natural Products. In: GAD, S. C. *Drug Discovery Handbook*, John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2005. cap. 1, p.1-62.

STRIETH, S.; NUSSBAUM, C. F.; EICHHORN, M. E.; FUHRMANN, M.; TEIFEL, M.; MICHAELIS, U.; BERGHAUS, A.; DELLIAN, M. Tumor-selective vessel occlusions by platelets after vascular targeting chemotherapy using paclitaxel encapsulated in cationic liposomes. *International Journal of Cancer*, v. 122, p. 452-460, 2008.

STUPP, R.; HEGI, M.E.; MASON, W.P.; VAN DEN BENT, M.J.; TAPHOORN, M.J.B.; JANZER, R.C.; LUDWIN, S.K.; ALLGEIER, A.; FISHER, B.; BELANGER, K.; HAU, P.; BRANDES, A.A.; GIJTENBEEK, J.; MAROSI, C.; VECHT, C.J.; MOKHTARI, K.; WESSELING, P.; VILLA, S.; EISENHAEUER, E.; GORLIA, T.; WELLER, M.; LACOMBE, D.; CAIRNCROSS, J.G.; MIRIMANOFF, R.O. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTCNCIC trial. *The Lancet Oncology*, v. 10, n. 5, p. 459-466, 2009.

SUCKLING, C. J. Chemical approaches to the discovery of new drugs. *Science Progress*, v. 75, p. 323-360, 1991.

TERUYA, T.; KOBAYASHI, K.; SUENAGA, K.; KIGOSHI, H. Cyclohaliclonamines A-E: Dimeric, Trimeric, Tetrameric, Pentameric, and Hexameric 3-Alkyl Pyridinium Alkaloids from a Marine Sponge *Haliclona* sp. *Journal of Natural Products*, v. 69, n. 1, p. 135-137, 2006.

TIMM, C.; VOLK, C.; SASSE, F.; KÖCK, M. The first cyclic monomeric 3 alkylpyridinium alkaloid from natural sources: identification, synthesis, and biological activity. *Organic and Biomolecular Chemistry*, v. 6, n. 21, p. 4036-4040, 2008.

THOMS, C.; SCHUPP, P. J. Chemical defense strategies in sponges: a review. In: Custódio, M. R.; Lôbo-Hajdu, G.; Hajdu, E.; Muricy, G. (eds). *Porifera research: biodiversity, innovation and sustainability*. Série Livros 28. Museu Nacional: Rio de Janeiro, 2007, pp. 627-637.

TRACHOOTHAM, D.; ALEXANDRE, J.; HUANG, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nature Reviews -Drug Discovery*, v. 8, p. 579-591, 2009.

TRIANTO, A.; HERMAWAN, I.; DE VOOGD, N. J.; TANAKA, J. Halioxepine, a New Meroditerpene from an Indonesian Sponge *Haliclona* sp. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 59, n. 10, p. 1311-1313, 2011.

VANWAGENEN, B. C.; LARSEN, R.; CARDELLINA II, J. H. Ulosantoin, a Potent Insecticide from the Sponge *Ulosa ruetzleri*. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 58, p. 335-337, 1993.

VOLK, C. A.; KÖCK, M. Viscosamine: The First Naturally Occurring Trimeric 3 Alkyl Pyridinium Alkaloid. *Organic Letters*, v. 5, n. 20, p. 3567-3569, 2003.

VOLK, C. A.; LIPPERT, H.; LICHTER, E.; KÖCK, M. Two New Haliclamines from the Arctic Sponge *Haliclona viscosa*. *European Journal of Organic Chemistry*, v. 14, p. 3154-3158, 2004.

- VOLK, C.A.; KÖCK, M. Viscosaline: new 3-alkyl pyridinium alkaloid from the Arctic sponge *Haliclona viscosa*. *Organic and Biomolecular Chemistry*, v. 2, n. 13, p. 1827-1830, 2004.
- WANG, B.; JIN LEE, K.; ZHANG, S.; JUNG, J. H.; LIU, Y. 2-palmitamidoethanesulfonic acid, a taurine derivative from the marine sponge *Haliclona* sp. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 45, n. 1, p. 137-138, 2009.
- WANG, G.-F.; SHANG, Y.-J.; JIAO, B.-H.; HUANG, C.-G. Renierol from marine sponge *Haliclona*.sp.: A natural inhibitor of xanthine oxidase with hypouricemic effects. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v. 23, n. 3, p. 406-410, 2008.
- WANG, J.; LIANG, Y.-L.; QU, J. Boiling water-catalyzed neutral and selective N-Boc deprotection. *Chemical Communications*, p. 5144-5146, 2009.
- WATTANADILOK, R.; SAWANGWONG, P.; RODRIGUES, C.; CIDADE, H.; PINTO, M.; PINTO, E.; SILVA, A.; KIJOA, A. Antifungal Activity Evaluation of the Constituents of *Haliclona baeri* and *Haliclona cymaeformis*, Collected from the Gulf of Thailand. *Marine Drugs*, v. 5, n. 2, p. 40-51, 2007.
- WILLIAMS, D. E.; STEINØ, A.; DE VOOGD, N. J.; MAUK, A. G.; ANDERSEN, R. J. Halicloic Acids A and B Isolated from the Marine Sponge *Haliclona* sp. Collected in the Philippines Inhibit Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *Journal of Natural Products*, v. 75, p. 1451-1458, 2012.
- XU, S.; ZENG, L. The Identification of Two New Sterols from Marine Organism. *Chinese Chemical Letters*, v. 11, n. 6, p. 531-534, 2000a.
- XU, S.; ZENG, L. Isolation and identification of a new long-chain tetrahydroxyamide. *Journal of Chinese medicinal materials*, v. 23, n. 9, p. 533-535, 2000b.
- XU, S.; ZENG, L. Study on the Chemical Constituents of Marine Sponge *Polymastia sobustia*. *Chinese Journal of Organic Chemistry*, v. 21, n. 1, p. 45-48, 2001.
- YU, S.; DENG, Z.; PROKSCH, P.; LIN, W. Oculatol, Oculatolide, and A-nor Sterols from the Sponge *Haliclona oculata*. *Journal of Natural Products*, v. 69, n. 9, p. 1330-1334, 2006.