

PRODUTOS NATURAIS DAS ESPONJAS MARINHAS *AAPTOS* SP., *HYMENIACIDON* AFF. *HELIOPHILA*, E DO NUDIBRÂNQUIO *DORIS* AFF. *VERRUCOSA*

Ana Claudia Granato, Roberto G. S. Berlinck*

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

Alviclér Magalhães, Alexandre B. Schefer, Antonio G. Ferreira

Departamento de Química - Universidade Federal de São Carlos - São Carlos - SP

Bianca de Sanctis, José Carlos de Freitas, Eduardo Hajdu e Alvaro E. Migotto

Centro de Biologia Marinha - Universidade de São Paulo - São Sebastião - SP

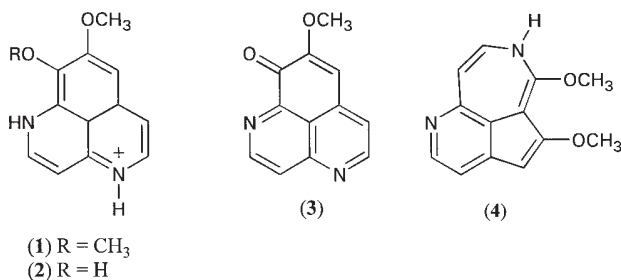
Recebido em 22/6/99; aceito em 21/1/00

NATURAL PRODUCTS FROM THE MARINE SPONGES *Aaptos* sp. AND *Hymeniacidon* aff. *heliophila*, AND FROM THE NUDIBRANCH *Doris* aff. *verrucosa*. Herein we describe the isolation of homarine and piridiniumbetaine B from the sponge *Aaptos* sp. Although homarine has a common occurrence among animals, piridiniumbetaine B was only recently isolated from the marine sponge *Agelas dispar*. The isolation of piridiniumbetaine B from two taxonomically distant marine sponges corroborate previous assumptions that such betaines should be regarded rather as primary metabolites. We have also isolated (9-[5'-(methylthio)- β -D-xylofuranosyl]adenine (xylosyl-MTA) from the mantle of a nudibranch identified as *Doris* aff. *verrucosa*. The occurrence of xylosyl-MTA in the mantle of this animal strongly suggests that it is the same nudibranch species described for the Mediterranean sea. We have been unable to detect any other compound in the mantle extract of *D. aff. verrucosa* other than xylosyl-MTA and sterols. GC-MS analysis of the sterol fraction from the nudibranch and its prey, the sponge *Hymeniacidon* aff. *heliophila*, revealed the occurrence of the ubiquitous sterols, cholesterol, brassicasterol, cholestanol, 24-methylcholesterol and 24-ethylcholesterol, as the only common metabolites, therefore precluding any assumption concerning the sequestration of secondary metabolites by the nudibranch from *H. aff. heliophila*.

Keywords: sponge; nudibranch; marine natural products.

INTRODUÇÃO

Espojas marinhas do gênero *Aaptos* constituem a única fonte natural de alcalóides do tipo 1*H*-benzo-[de][1,6]-naftiridínicos, também denominados de aaptaminas. A aaptamina 1 foi inicialmente isolada da esponja *Aaptos aaptos* proveniente da ilha de Okinawa, costa do Japão¹. Os mesmos autores isolaram dois outros derivados correlatos, a desmetilaaptamina 2 e a desmetiloxiaaptamina 3, a partir da mesma esponja². Recentemente, Rudi e Kashman isolaram a partir da mesma esponja, desta vez proveniente do mar vermelho, um novo derivado das aaptaminas, denominado aaptosina 4, que apresenta um esqueleto heterocíclico do tipo 5,8-diazabenz-[c,d]azuleno, até então sem precedentes em produtos naturais³. Os alcalóides heteroaromáticos isolados da esponja *Aaptos aaptos* apresentam atividades biológicas como bloqueadores de receptores α -adrenérgicos¹, ação citotóxica e atividade antimicrobiana².



Juntamente com os moluscos tectibrânquios, os moluscos nudibrânquios pertencem à sub-Ordem Opisthobranchia, que engloba moluscos que não apresentam concha externa ou que possuem uma concha interna de tamanho pequeno, a qual, presume-se, seja um resquício adaptativo.⁴ Por não possuírem conchas (defesa mecânica), presume-se que os moluscos Opisthobranchia desenvolveram a capacidade de sintetizar e/ou de acumular substâncias que atuam como defesas químicas⁴⁻⁷. Moluscos nudibrânquios são geralmente sequestradores de produtos naturais provenientes de suas presas (esponjas, ascídias, briozoários, algas, cnidários ou outros moluscos). Todavia, em alguns casos demonstrou-se a capacidade de determinadas espécies de nudibrânquios de biossintetizarem *de novo* várias substâncias isoladas de suas glândulas digestivas ou de seu manto⁸⁻¹¹. Por concentrarem quantidades apreciáveis destes compostos orgânicos para sua defesa, os moluscos opisthobrânquios constituem uma fonte importante de produtos naturais com atividades biológicas.

Entre as décadas de 40 e 60, Eveline e Ernest Marcus realizaram o primeiro levantamento de espécies de moluscos opisthobrânquios do Brasil. Duas espécies pertencentes ao gênero *Doris* foram descritas: *D. verrucosa* e *D. bovena*¹². O nudibrânquio *D. verrucosa* foi descrito como sendo de coloração cinzenta apresentando no máximo 3 cm de comprimento. Já o nudibrânquio *D. bovena* foi descrito por Ernest Marcus como sendo uma espécie endêmica, que se alimenta de uma esponja de cor alaranjada, o que confere ao molusco a mesma cor¹², podendo atingir até no máximo 1 cm de comprimento.

Durante coleta realizada nos arredores do Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo em novembro de 1998, obtivemos 3 espécimens de um molusco alaranjado do gênero *Doris*. Dois dos moluscos se encontravam a menos de 10 centímetros da esponja *Hymeniacidon* aff. *heliophila*; o

e-mail: rberlink@iqsc.sc.usp.br

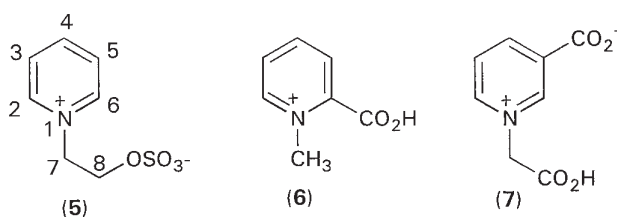
terceiro animal foi encontrado sobre a mesma esponja. Coletamos também um pouco da desova¹ de *D. aff. verrucosa*.

A classificação taxonômica dos moluscos coletados foi realizada pelo Dr. Luiz Ricardo L. Simone, do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. Pelas características anatômicas do animal, o Dr. Simone sugeriu tratar-se de uma espécie morfologicamente muito próxima a *Doris verrucosa*, descrita para o Mediterrâneo, à despeito de sua coloração alaranjada. Contudo, o Dr. Simone ressaltou que a ocorrência da mesma espécie de molusco em localidades tão distantes poderia ser um indicativo de se tratar de uma sub-espécie. Sendo assim, o animal foi classificado como sendo *Doris aff. verrucosa*. Nosso intuito foi de analisar a ocorrência de produtos naturais no extrato de *Doris aff. verrucosa* e de sua desova, de tal maneira que pudessemos ter indicadores químicos que auxiliassem a classificação do molusco em questão.

No presente trabalho apresentamos os resultados da investigação química de três espécies de invertebrados marinhos: uma esponja do gênero *Aaptos*, o nudibrânquio *Doris aff. verrucosa* e a esponja *Hymeniacidon aff. heliophila*. Foram isoladas diferentes substâncias aromáticas nitrogenadas de ambos *Aaptos* sp. e *Doris aff. verrucosa*, as quais foram identificadas pela análise de seus dados espectroscópicos e comparação com dados da literatura. Também foi investigada a composição em esteróis de *Doris aff. verrucosa* e da esponja *Hymeniacidon aff. heliophila*, que constitui pelo menos parte da dieta do molusco. Este é o primeiro de trabalho de investigação química de uma espécie de nudibrânquio coletado na costa do Brasil.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A esponja marinha *Aaptos* sp. foi coletada e imediatamente imersa em etanol. O animal foi subsequentemente triturado em metanol, os extratos foram combinados, filtrados e concentrados até um volume de 500 mL. A suspensão alcoólica foi então particionada com hexano. O extrato metanólico resultante apresentou atividades hemolítica e anti-mitótica moderadas, sendo então submetido à cromatografia relâmpago em sílica-gel (gradiente de metanol em cloro de metileno), cromatografia em Sephadex LH20 (metanol) e finalmente purificação por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa (eluente: acetonitrila-água 7:3), fornecendo a piridíniobetaína **5** e a homarina **6** em rendimentos de 7,6 x 10⁻⁵ e 2,3 x 10⁻⁴%, respectivamente, com relação à massa úmida da esponja.



A piridíniobetaína **5** apresentou o pico de íon molecular em *m/z* 188 em seu espectro de massas de baixa resolução. A análise dos seus dados de RMN-¹³C (BBD e DEPT, 100.1 MHz) e RMN-¹H (400 MHz) indicou a presença de 7 átomos de carbono e 9 átomos de hidrogênio. O espectro de ultravioleta de **5** apresenta bandas em 225, 260 e 280 nm, típicas de um cromóforo heteroaromático monocíclico como o íon piridínio. O espectro no infravermelho apresenta bandas em 3438 (água

de hidratação, ν_{O-H}), 2956, 2917, 2850 (ν_{C-H} alifático), 1727, 1632, 1462 ($\nu_{C=C}$ e $\nu_{C=N}$) e 1187 cm⁻¹ (intensa, deformação axial simétrica de grupo SO₂), confirmando a presença do anel piridínico e indicando a presença de um grupo sulfato. Esses dados indicaram uma fórmula molecular C₇H₁₀NSO₃, que indica a presença de 6 graus de instauração: quatro do anel piridínico e duas do grupo sulfato. A inspeção do espectro de RMN-¹H de **5** indicou que se tratava claramente de um derivado piridínico, já que **5** apresenta sinais de um sistema do tipo AMX aromático entre δ 8,0 e 9,0. O duplo dubleto em δ 9,05 (*J* = 1,2 e 6,8 Hz) corresponde aos hidrogênios 2 e 6 do anel piridínico; o triplo tripleto em δ 8,57 (*J* = 1,4 e 7,8 Hz) corresponde ao hidrogênio 4 do anel aromático; o tripleto ligeiramente alargado em δ 8,07 (*J* = 7,5 Hz) é atribuído aos hidrogênios 3 e 5 do anel piridínio. O espectro de RMN-¹³C apresenta três sinais na região de carbonos aromáticos, com valores de deslocamento químico típicos de um anel piridínio (δ 129,0, 146,7 e 147,1). A presença do grupo etilsulfato pôde ser confirmada em se analisando os espectros de RMN mono e bidimensionais de **5**. Além dos valores de deslocamento químico para o grupo metileno ligado ao nitrogênio piridínico (δ_H 5,05, dd, 5,9 e 6,0 Hz; δ_C 59,2) e para o grupo metileno ligado ao grupo sulfato (δ_H 3,48, dd, 5,9 e 6,0 Hz; δ_C 51,6), o espectro de correlação a longa distância obtido com gradiente de campo gHMBC em μ Probe indicou a correlação heteronuclear entre os hidrogênios 2 e 6 e o carbono 7, bem como entre os hidrogênios 7 e 7' e os carbonos 2 e 6, confirmando a estrutura da piridíniobetaína **5**.

A determinação da estrutura da homarina **6** foi também estabelecida pela análise de seus dados espectroscópicos e por comparação com dados da literatura, já que esta substância possui ampla ocorrência¹³ e é, na verdade, considerada como sendo um produto do metabolismo primário¹⁴.

No momento da conclusão da determinação estrutural de **5** e **6**, Cafieri et al.¹⁴ publicaram o isolamento de **5** e outras substâncias análogas a partir da esponja *Agelas dispar*. No entanto, o grupo de pesquisadores italianos inverteu as correlações atribuídas ao sinal do carbono 6 (δ 146,7) com aquelas atribuídas ao carbono 5 (δ 129,0). Nossas atribuições foram estabelecidas sem qualquer ambigüidade pela análise do espectro de correlação à longa-distância gHMBC.

Também recentemente, o grupo de Fusetani isolou o ácido 1-carboximetilnicotínico **7** a partir da esponja *Anthosigmella aff. raromicrosclera*¹⁵. Os autores italianos¹⁴ argumentam que betaínas devem ser consideradas como produtos do metabolismo primário, devido à sua ampla ocorrência tanto no reino animal quanto no reino vegetal. O isolamento de betaínas estruturalmente similares a partir de esponjas taxonomicamente distantes, tais como *Anthosigmella* (Clionidae, Hadromerida), *Agelas* (Agelasidae, Agelasida) and *Aaptos* (Suberitidae, Hadromerida), corrobora esta proposição, baseada nas assertivas de Beers¹⁶ e Blunden and Gordon¹⁷. Sendo assim, é de se esperar que outras betaínas venham a ser isoladas a partir de organismos taxonomicamente distintos, sejam do meio marinho ou terrestre. Adicionalmente, não foi possível detectar a presença de qualquer alcalóide do tipo 1*H*-benzo-[de][1,6]-naftiridínico na esponja *Aaptos* sp. objeto do presente estudo, dado que parece ir contra à proposição de que alcalóides dessa classe seriam indicadores taxonômicos de esponjas do gênero *Aaptos* (Suberitidae)¹⁸.

A segunda parte deste trabalho descreve o isolamento da (9-[5'-desoxi-5'-(metiltio)- β -D-xilofuranosil]adenina **8** a partir do nudibrânquio *Doris aff. verrucosa*. A (9-[5'-desoxi-5'-(metiltio)- β -D-xilofuranosil]adenina **8** também é denominada de xilosil-MTA, e foi previamente isolada do molusco *Doris verrucosa* por Cimino et al.¹⁹.

Os animais e a desova foram coletados separadamente e imediatamente imersos em metanol. Após mais 2 extrações subsequentes, colocando-se os animais em metanol por 10

* O termo desova se refere ao que em inglês denomina-se eggmass (literalmente, massa de ovos).

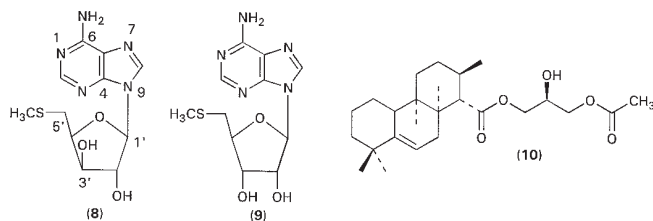
minutos em banho de ultrassom, o extrato dos moluscos foi evaporado à secura e analisado por cromatografia em camada delgada (eluente: cloreto de metileno - metanol 8:2; revelador: inspeção à luz ultravioleta, 254 nm). A análise por CCD indicou a presença de apenas 1 componente majoritário (Rf 0.6). A cromatografia do extrato bruto de *D. aff. verrucosa* em coluna de fase reversa Sep-Pak C-18 (gradiente de metanol em H₂O) forneceu 6,5 mg de xilosil-MTA **8** com grau de pureza bastante satisfatória para sua análise espectroscópica.

O espectro de massas de bombardeamento rápido de átomos de alta resolução forneceu um pico de íon semi molecular em m/z 298,0979 (calculado: 298,0987, Δμ 0,8 ppm), indicando a fórmula molecular C₁₁H₁₅N₅O₃S. O espectro no infravermelho da xilosil-MTA **8** apresenta bandas em 3343, 3210 (ν_{N-H}), 2922 (ν_{C-H}), 1645 e 1600 cm⁻¹ (ν_{C=N}). O espectro de UV da mesma substâncias apresenta banda em 260 nm. O espectro de RMN-¹H da xilosil-MTA apresentou sinais típicos de um nucleosídeo: os dois hidrogênios do sistema heteroaromático com deslocamento químico acima de δ 8,00 (δ 8,20, H-2; δ 8,35, H-8), e os hidrogênios da furanose abaixo de δ 4,5 (Tabela 1).

As atribuições dos hidrogênios foi feita pela análise dos espectros COSY ¹H-¹H e gHSQC (correlação direta ¹H-¹³C). A constante de acoplamento de valor nulo entre H-2' e H-3' explica-se pela conformação preferencial adotada pelo anel xilosil (calculada pelo método MM2), na qual os hidrogênios H-2' e H-3' apresentam um ângulo diedro entre si muito próximo de 90°, devido ao fato de que os dois grupos hidroxila ligados a C-2' e C-3' apresentam configuração relativa *anti*.

O grupo de Cimino não apresentou os dados de RMN-¹³C de **8** quando de seu isolamento a partir de *D. verrucosa*¹⁸. Sendo assim, apresentamos os dados de RMN-¹³C em conjunto com os dados de RMN-¹H na Tabela 1. As atribuições de RMN-¹³C foram feitas com base na análise dos espectros de gHSQC (correlação direta ¹H-¹³C) e gHMBC (correlação ¹H-¹³C à longa distância). A atribuição dos carbonos 2' e 4' foi feita de maneira indireta, observando-se os sinais de correlação a longa distância no espectro de gHMBC, já que os sinais dos hidrogênios H-2' e H-4' se sobrepõem e impossibilitam a atribuição direta pela análise do espectro de correlação direta ¹H-¹³C gHSQC. Assim, observou-se que H-1' apresenta correlação à longa distância com o carbono 2', enquanto que os hidrogênios do grupo metilíio (-SCH₃) apresentam correlação à longa distância com o carbono 4', o que permitiu a distinção entre C-2' e C-4' sem qualquer ambigüidade.

Com o intuito de verificarmos a ocorrência da xilosil-MTA na desova de *D. aff. verrucosa*, cerca de 56 mg de desova foi coletada e extraída com metanol. O extrato bruto foi evaporado e diretamente analisado por CLAE, em coluna de fase reversa. Para a realização desta análise, construímos uma curva de calibração com a xilosil-MTA **8** isolada de *D.*



aff. verrucosa, de tal maneira que pudessemos obter a concentração natural de **8** na desova do animal em questão. Verificamos que a desova continha cerca de 2,5 mg de xilosil-MTA, o que corresponde a um valor de 0,4% da massa úmida da desova de *D. aff. verrucosa*.

O isolamento da xilosil-MTA **8** a partir do manto e da desova de *D. aff. verrucosa* é um indicativo adicional de que a espécie de molusco coletada em São Sebastião seja realmente *Doris verrucosa*, de acordo com a análise morfológica realizada pelo Dr. Simone. O molusco *Doris verrucosa* originário do Mediterrâneo é capaz de biossintetizar **8** a partir de 5'-desoxy-5'-metiltioadenosina **9**, bem como a partir de adenina e de metionina²⁰. Parece evidente que *Doris aff. verrucosa* apresenta a mesma habilidade e, portanto, os animais coletados devem certamente pertencer à espécie *Doris verrucosa*.

Mais interessante, porém, é o fato de ambos moluscos possuírem dietas baseadas em esponjas pertencentes ao mesmo gênero: *D. verrucosa* alimenta-se principalmente da esponja *Hymeniacidon sanguinea*²¹, enquanto que *Doris aff. verrucosa* coletada em São Sebastião alimenta-se de *Hymeniacidon aff. heliophila*. Com o intuito de verificarmos a hipótese de que os moluscos coletados pudessem acumular alguma substância proveniente da esponja *Hymeniacidon aff. heliophila*, coletamos a esponja e realizamos um estudo comparativo por cromatografia em camada delgada com ambos extratos, polar (MeOH) e apolar (hexano) dos dois animais, *Doris aff. verrucosa* e *Hymeniacidon aff. heliophila*. Por cromatografia em camada delgada, não foi possível observar a presença de qualquer metabólito comum aos dois animais, exceção feita à fração de esteróis. Sendo assim, as frações esteróidicas de ambos animais foram obtidas após sucessivas cromatografias de seus respectivos extratos hexânicos em coluna de sílica-gel, e subsequentemente analisadas por cromatografia gasosa acoplada a um detector de espectrometria de massas. As análises por CG-EM indicaram uma composição qualitativa praticamente idêntica para a fração esteróidica de ambos animais. Porém, apenas esteróis de ampla ocorrência foram detectados em ambos molusco e esponja: colesterol (majoritário), colestanol, 24-etilcolesterol e brassicasterol. No caso de *Hymeniacidon aff. heliophila*, também verificamos a presença de 24-metilcolesterol. Assim, não é possível afirmarmos com certeza se o molusco *Doris aff. verrucosa* sequestra ou não os

Tabela 1. Dados de RMN-¹H e RMN-¹³C da xilosil-MTA (**8**) (CD₃OD).

#H/C	δ ¹ H (J em Hz) ^a	δ ¹³ C ^b	correlações à longa distância (HMBC)
2	8,20 (s)	155,0	C-4, C-6
4		150,0	
5		122,0	
6		157,0	
8	8,35 (s)	142,0	C-4, C-5
1'	5,96 (dl, 1,1)	92,7	C-2', C-4, C-8
2'	4,40 (s)	83,0	C-3', C-4'
3'	4,13 (d, 0,6)	77,2	C-4', C-1'
4'	4,42 (m)	84,6	C-3'
5'a	2,85 (dd, 6,4 e 13,6)	27,0	S-CH ₃ , C-3', C-4'
5'b	2,97 (dd, 7,6 e 13,6)		S-CH ₃ , C-3', C-4'
S-CH ₃	2,18 (s)	16,3	C-4', C-5'

^aEspectro obtido em a 400 MHz; ^bespectro obtido a 100.1 MHz; J_{HMBC} = 8 Hz

esteróis, ou alguma outra substância, de *Hymeniacion aff. heliophila*. Todavia, o pequeno número de moluscos coletados (apenas 3) não nos permitiu evidenciar a presença de qualquer outra substância presente no seu manto além da xilosil-MTA **8**, de aminoácidos e nucleosídeos (detectados por ccd) além dos esteróis. Já o molusco *D. verrucosa* originário do Mediterrâneo possui em seu manto derivados terpenoídicos condensados a uma unidade glicerol, as verrucosinas (p. ex., verrucosina A **10**)²², das quais ainda não se conhece a verdadeira origem biogenética, se produzidas *de novo* pelo molusco ou se acumuladas por este através da sua dieta.

PARTE EXPERIMENTAL

Generalidades

Espectros de infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro Bomem MB102. Espectros no ultravioleta foram realizados dissolvendo-se as amostras em metanol grau espectrofotométrico (Aldrich), em um aparelho Shimadzu UV-180. Espectros de RMN foram obtidos em um aparelho Bruker AC-4.7 T, operando em 200.1 MHz na frequência de ¹H e em 50.3 MHz na frequência de ¹³C, ou em um aparelho Bruker ARX 9.4 T operando em 400.35 MHz na frequência de ¹H e em 100.10 MHz para ¹³C. Os espectros de RMN foram realizados a 28°C, utilizando-se tetrametilsilano como referência interna. Espectros de massas foram obtidos em um aparelho Kratos concept IHQ híbrido, com ionização secundária promovida por íons Césio. Para as análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas utilizou-se um aparelho Hewlett Packard modelo 5970, uma coluna HP-1 (cross-linked) de dimensões 25,0 m x 0,2 mm, com filme de 0,3 µm. As condições gerais de análise por CG-EM foram: temperatura do injetor: 280°C; temperatura de interface: 280°C. Ionização a 70 eV. Separações por CLAE foram realizadas em um aparelho Shimadzu LC-9A, monitorando-se em 254 nm. Solventes comerciais foram utilizados para cromatografias em coluna, e grau cromatográfico para as purificações em CLAE. Análises por CCD foram feitas utilizando-se placas cromatográficas de sílica-gel em poliéster (Aldrich) com indicador de fluorescência (254 nm).

Coleta e identificação das esponjas *Aaptos sp.*, *Hymeniacion aff. heliophila* e do molusco *Doris aff. verrucosa*.

Um único espécimen da esponja *Aaptos sp.* foi coletado na Ilha da Prainha (23°51.146'S - 45°24.997'W), Canal de São Sebastião e preservado em etanol. Um fragmento do animal foi mantido como voucher e depositado na coleção do Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro (MNRJ 560).

Espécimens da esponja *Hymeniacion aff. heliophila* foram coletados no costão rochoso da praia das Pitangueiras (23°49.656'S - 45°25.351'W), e preservados em etanol. Espécimens do animal foram mantidos como voucher e depositados na coleção do Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro (MNRJ 1307, 1317, 1689, 1941 e 1945).

Três indivíduos do molusco nudibrânquio *Doris aff. verrucosa* foram coletados no costão rochoso da praia das Pitangueiras, e preservados em metanol. Após a extração, um espécimen foi enviado para o Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo. Outro espécimen foi enviado ao Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro, para a análise de seu conteúdo estomacal.

A desova de *Doris aff. verrucosa* foi observada a menos de 1 cm de distância dos animais, como sendo da mesma coloração alaranjada que o molusco. Foram coletados 56 mg da desova, os quais foram imediatamente imersos em metanol.

Extração e isolamento da piridíniobetaína B 5 e homarina 6 a partir da esponja *Aaptos sp.*

A esponja *Aaptos sp.* (1315 g, peso líquido) foi separada do etanol de preservação (1 L) e triturada em 2 L de metanol. O triturado foi filtrado, combinado com o metanol de preservação e o extrato obtido foi evaporado até um volume de aproximadamente 500 mL. A suspensão foi particionada com hexano (3 x 500 mL). O extrato metanólico foi então evaporado até a secura, fornecendo 16 g de uma goma marrom. Esse extrato foi submetido à cromatografia de coluna relâmpago em sílica-gel (230-400 mesh), com um gradiente de metanol em cloreto de metileno, completando-se a eluição com metanol puro. Obteve-se seis frações. A análise por cromatografia em camada delgada (eluente: CH₂Cl₂-MeOH 7:3; revelador: inspeção à luz ultravioleta em 254 nm e posterior borrifamento com ninidrina com aquecimento a 110°C) e por RMN-¹H das frações obtidas indicou a presença de substâncias heterocíclicas aromáticas na quinta fração (0,384 g). Esta foi submetida à cromatografia em Sephadex LH20 (MeOH), fornecendo sete frações, das quais a terceira (0,047 g) mostrou ser constituída pelas substâncias aromáticas. A mistura foi separada e purificada por CLAE (coluna semi-preparativa Whatman Partisil 10 ODS-3; solvente: acetonitrila/água 7:3; fluxo: 2 mL/min.; detecção: 254 nm), fornecendo 1 mg de piridíniobetaína B **5** e 3 mg da homarina **6**.

Piridíniobetaína B 5: sólido vítreo. UV (MeOH) λ_{max} (nm) 225, 260 e 280. IV (filme líquido em pastilha de sílica): 3438, 2956, 2917, 2850, 1727, 1632, 1462, 1383, 1261, 1187, 1033 e 732 cm⁻¹. EIMS m/z (abundância relativa): 188 (7%, M⁺), 154 (40%), 136 (37%), 123 (23%), 95 (57%), 83 (76%), 71 (100%). RMN-¹H (400 MHz, MeOH-d₄) δ (J em Hertz): 9,05 (2H, dd, 1,2 e 6,8, H-2 e H-6); 8,57 (1H, tt, 1,4 e 7,8, H-4); 8,07 (2H, t, 7,5, H-3 e H-5); 5,05 (2H, dd, 5,9 e 6,0, H-7); 3,48 (2H, dd, 5,9 e 6,0, H-8). RMN-¹³C (100.1 MHz, CD₃OD): 146,7 C-2 e C-6; 129,0 C-3 e C-5; 147,1 C-4; 59,2 C-7; 51,6 C-8.

Homarina 6: sólido vítreo. UV (MeOH) λ_{max} 272 nm. IV (filme líquido em pastilha de sílica): 3500-2500 (larga), 1711, 1692 e 1644 cm⁻¹. FABMS m/z (abundância relativa): 160 (M⁺+ Na⁺; 50%), 140 (100%), 138 (M⁺; 32%), 118 (58%), 94 (M⁺ - CO₂; 63%). RMN-¹H (400 MHz, MeOH-d₄) δ (J em Hertz): 8,04 (1H, d, 6,3, H-3); 8,54 (1H, dd, 6,3 e 6,3, H-4); 7,97 (dd, 5,4 e 5,7), 8,72 (d, 4,9). RMN-¹³C (100.1 MHz, CD₃OD): 146,7 CH-2 e CH-6; 129,0 CH-3 e CH-5; 147,1 CH-4; 59,2 CH₂-7; 51,6 CH₂-8.

Extração e isolamento (9-[5'-desoxi-5'-(metiltio)-β-D-xilofuranosil]adenina 8 a partir do nudibrânquio *Doris aff. verrucosa* e sua desova

Os 3 espécimens de *Doris aff. verrucosa* coletados (5 g, massa total dos 3 animais) foram separados do metanol de preservação e subsequentemente extraídos com acetona (2 x 30 mL) em banho de ultrassom (15 minutos por extração). Os extratos orgânicos foram evaporados, fornecendo 0,3384 g de extrato bruto. Este último foi submetido à separação por cromatografia em coluna de fase reversa (Waters Sep Pak C-18 cartridge), com um gradiente de metanol em água. Após análise por ccd (CH₂Cl₂/ MeOH; reveladores: ácido fosfomolibdico e lâmpada de UV) as frações obtidas foram reunidas de acordo com o seu padrão cromatográfico. Obteve-se 3 frações: Dv.1 (0,0400g), Dv.2 (0,0900g), Dv.3 (0,0065g). A análise por cromatografia em camada delgada das frações obtidas (eluente: CH₂Cl₂-MeOH 8:2; revelador: inspeção à luz ultravioleta) indicou a presença de um único composto majoritário na fração Dv.3. Essa fração forneceu 6,5 mg de (9-[5'-desoxi-5'-(metiltio)-β-D-xilofuranosil]adenina **8** pura.

Cerca de 56 mg da desova de *D. aff. verrucosa* foram coletadas e preservadas em metanol. A postura foi subseqüentemente exaustivamente extraída com metanol sob ultrassom. O extrato metanólico (11 mg) foi então analisado por cromatografia líquida de alto desempenho (CLAE). Condições de análise: coluna analítica Lichrosorb RP-18; eluente 0,05% TFA-MeOH 6:4; detecção em 254 nm. Construiu-se uma curva de calibração área versus concentração de (9-[5'-desoxi-5'-(metiltio)- β -D-xilofuranosil]adenina **8**, utilizando-se 5 concentrações diferentes da substância pura isolada de *D. aff. verrucosa*, com $n = 5$ injeções para cada concentração (faixa de concentração: 5,7 mg/mL até $1,5 \times 10^{-4}$ mg/mL; coeficiente de correlação: $0,999 \pm 0,001$). A injeção de 10 μ L de uma solução 0,24 mg/mL do extrato bruto indicou uma concentração de 0,4% de (9-[5'-desoxi-5'-(metiltio)- μ -D-xilofuranosil]adenina **8** na postura de *D. aff. verrucosa*.

(9-[5'-desoxi-5'-(metiltio)- β -D-xilofuranosil]adenina **8:** sólido vítreo. $[\alpha]_D^{25} - 19^\circ$ ($c = 0,57$, MeOH) {lit. $[\alpha]_D^{25} - 270^\circ$ ($c = 0,39$, piridina)¹⁹} UV (MeOH) λ_{max} 260 nm. IV (filme líquido em pastilha de sílica): 3343, 3210, 2922, 1645, 1600, 1476, 1418, 1334, 1299, 1246, 1208, 1092, 837 cm^{-1} . FABMS m/z (abundância relativa): 298 ($M+H^+$, 25%), 184 (100%), 136 (91%). RMN-¹H (400 MHz, CD₃OD) ver Tabela 1. RMN-¹³C (100.1 MHz, CD₃OD): ver Tabela 1.

Isolamento da fração esteroidal de *Doris aff. verrucosa*

A fração Dv.1 (0,0400g) obtida anteriormente foi separada por cromatografia em coluna de sílica-gel (Waters Sep Pak, 2g) com um gradiente de acetato de etila (AcOEt) em hexano. Após a evaporação, as frações foram analisadas por ccd (hexano/AcOEt 9:1; revelador: solução de ácido fosfomolibdico) e reunidas de acordo com o seu padrão cromatográfico. Obteve-se 2 frações: Dv.1-A ($m = 0,0138g$), Dv.1-B ($m = 0,0123g$). A fração Dv.1-A foi novamente submetida à cromatografia em coluna de sílica gel (Waters Sep Pak, 2g) com um gradiente de AcOEt em hexano. Obteve-se 2 frações: DV.1-A1 ($m = 0,0084g$), DV.1-A2 ($m = 0,0067g$), DV.1-A.3 ($m = 0,00015g$). A fração DV.1-A1 mostrou ser constituída por uma mistura de esteróis (por RMN-¹H), e foi analisada por cromatografia gasosa acoplada a um espectrometro de massas, utilizando-se as condições descritas em "generalidades" (acima), utilizando-se o colesterol como padrão para as análises. Resultados da identificação dos esteróis: ver abaixo.

Isolamento da fração esteróidica de *Hymeniacion aff. heliophila*

A esponja *Hymeniacion aff. heliophila* (74,3 g) preservada em etanol foi separada por decantação, re-extraída com metanol, os extratos combinados e evaporados. Após a evaporação parcial do extrato, obteve-se uma suspensão metanólico-aquosa, a qual foi particionada com hexano. Obteve-se 0,3085 g do extrato apolar (hexano) e 0,9380 g do extrato polar (MeOH-H₂O). O extrato hexânico (0,3085 g) foi separado por cromatografia em coluna de sílica-gel (Waters Sep Pak 2g) com um gradiente de AcOEt em hexano. As frações obtidas foram analisadas por ccd (hexano/ AcOEt 7:3; revelador: solução de ácido fosfomolibdico) e reunidas de acordo com o seu padrão cromatográfico. Obteve-se 5 frações: Hy.1 ($m = 0,2601g$), Hy.2 ($m = 0,0038g$), Hy.3 ($m = 0,0035g$), Hy.4 ($m = 0,0021g$), Hy.5 ($m = 0,0077g$). A fração Hy.1 foi submetida a uma segunda cromatografia em coluna de sílica-gel (Waters Sep Pak 2g), nas mesmas condições. As frações foram analisadas por CCD e reunidas de acordo com o seu padrão cromatográfico. Obteve-se 4 frações: Hy.1A ($m =$

$0,0432g$), Hy.1B ($m = 0,0522g$), Hy.1C ($m = 0,0076g$), Hy.1D ($m = 0,0003g$). A fração Hy.1B foi analisada por cromatografia gasosa acoplada a um espectrometro de massas, utilizando-se as mesmas condições empregadas para a análise dos esteróis de *Doris aff. verrucosa*.

Colesterol t.r.r. 1,000; EIMS [m/z (intensidade relativa)]: 386 (4%, M^{++}), 302 (8%), 273 (6%), 257 (7%), 175 (3%), 149 (12%), 95 (35%), 55 (100%).

Colestanol t.r.r. 1,008; EIMS [m/z (intensidade relativa)]: 388 (16%, M^{++}), 331 (2%), 262 (6%), 233 (45%), 215 (58%), 165 (38%), 95 (60%), 55 (100%).

Brassicasterol t.r.r. 1,060; EIMS [m/z (intensidade relativa)]: 398 (6%, M^{++}), 271 (6%), 255 (9%), 213 (6%), 145 (17%), 91 (32%), 55 (100%).

24-Metilcolesterol t.r.r. 1,039; EIMS [m/z (intensidade relativa)]: 400 (2%, M^{++}), 316 (12%), 273 (8%), 233 (6%), 215 (10%), 135 (13%), 95 (38%), 55 (100%).

24-Etilcolesterol t.r.r. 1,605; EIMS [m/z (intensidade relativa)]: 414 (10%, M^{++}), 329 (5%), 314 (5%), 255 (4%), 213 (8%), 145 (21%), 107 (35%), 55 (100%).

AGRADECIMENTOS

Os autores desse trabalho são especialmente gratos ao Dr. Luis Ricardo Simone (Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo) pela a identificação do nudibrânquio, a Michael LeBlanc (Departament of Earth and Ocean Sciences, University of British Columbia, Vancouver, Canadá) pela ajuda na coleta da esponja *Aaptos* sp., e ao Prof. Raymond J. Andersen (Department of Chemistry, University of British Columbia, Vancouver, Canada) pelas análises de espectrometria de massas. Esse trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (96/04316-5), concedido a JCF, RGSB e EH, e pela American Society of Pharmacognosy (1998) concedido a RGSB. Os autores também agradecem à FAPESP, CNPq e CAPES pelas bolsas de pós-graduação (ACG, AM, AS), iniciação científica (BS) e produtividade em pesquisa (RGSB, AGF, JCF, EH, AEM) concedidas.

REFERÊNCIAS

1. Nakamura, H.; Kobayashi, J.; Ohizumi, Y. e Hirata, Y.; *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 5555.
2. Nakamura, H.; Kobayashi, J.; Ohizumi, Y. e Hirata, Y.; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1987**, 173.
3. Rudi, A.; Kashman, Y.; *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 4683.
4. Faulkner, D. J.; Ghiselin, M. T., *Mar. Ecol. Progr. Ser.* **1983**, 13, 295.
5. Avila, C.; *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* **1995**, 33, 487.
6. Faulkner, D. J. in *Ecological Roles of Marine Natural Products*, edited by V. J. Paul, Comstock Publishing Associates, Ithaca, N.Y., 1992, pp. 119-163.
7. Karuso, P., in *Bioorganic Marine Chemistry*, edited by P. J. Scheuer, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, New York, 1987, vol. 1, pp. 31-60.
8. Cimino, G. e Sodano, G.; in *Marine Natural Products - Diversity and Biosynthesis*, ed. by P.J. Scheuer, *Topics in Current Chemistry*, 1993, vol. 167, pp. 77-115.
9. Dumdei, E. J.; Kubanek, J.; Coleman, J. E.; Pika, J.; Andersen, R. J.; Steiner, J. R.; Clardy, J.; *Can. J. Chem.* **1997**, 75, 773.
10. Kubanek, J.; Andersen, R. J.; *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 6327.

11. Kubanek, J.; Graziani, E. I. e Andersen, R. J.; *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7239.
12. Marcus, E.; *Bol. Fac. Fil. Zool.* **1955**, *20*, 89.
13. Budavani, S.; Merck Index, Merck and Co., Inc., New Jersey, 12nd edition, 1996, p. 4769.
14. Cafieri, F.; Fattorusso, E.; Taglialatela-Scafati, O.; *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1171.
15. Matsunaga, S.; Kamimura, T.; Fusetani, N.; *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 671.
16. Beers, J. R.; *Comp. Biochem. Physiol.* **1967**, *21*, 11.
17. Blunden, G.; Gordon, S. M.; *Prog. Phycol. Res.* **1986**, *4*, 39.
18. Bergquist, P. R.; Cambie, R. C.; Kernan, M. R.; *Biochem. System. Ecol.* **1991**, *19*, 289.
19. Cimino, G.; Crispino, A.; De Stefano, S.; Gavagnin, M. e Sodano, G.; *Experientia* **1986**, *42*, 1301.
20. Porcelli, M.; Cacciapuoti, G.; Cimino, G.; Gavagnin, M.; Sodano, G.; Zappia, V.; *Biochem. J.* **1989**, *263*, 635.
21. Avila, C.; Ballesteros, M.; Cimino, G.; Crispino, A. Gavagnin, M. e Sodano, G.; *Comp. Biochem. Physiol.* **1990**, *97B*, 363.
22. Gavagnin, M.; Ungur, N.; Castellucio, F.; Cimino, G.; *Tetrahedron* **1997**, *53*, 1491.