

CONSTITUINTES QUÍMICOS DA ASCÍDIA *Didemnum psammotodes* (SLUITER, 1895) COLETADA NA COSTA CEARENSE

Renata Takeara, João Luis Callegari Lopes* e Norberto Peporine Lopes

Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. do Café, s/n, 14040-903 Ribeirão Preto - SP, Brasil

Paula Christine Jimenez e Letícia Veras Costa-Lotufo

Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, CP 3157, 60430-270 Fortaleza - CE, Brasil

Tito Monteiro da Cruz Lotufo

Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, CP 12168, 60455-760 Fortaleza - CE, Brasil

Recebido em 7/7/06; aceito em 9/11/06; publicado na web em 14/5/07

CHEMICAL CONSTITUENTS FROM THE ASCIDIAN *Didemnum psammotodes* (SLUITER, 1895) COLLECTED ON THE SHORES OF CEARA STATE. Chemical investigation of the methanolic extract of the ascidian *Didemnum psammotodes* has led to the identification of the nucleosides 2'-deoxyuridine (**1**), thymidine (**2**), 2'-deoxyinosine (**3**) and 2'-deoxyguanosine (**4**), the steroids cholestanol, cholestanone and stigmaterol in mixture and batyl alcohol plus two analogs, 1-heptadecyloxy-2,3-propanediol and 1-nonadecyloxy-2,3-propanediol in mixture. Their structures were proposed by NMR, MS and comparison with literature data and GC-MS analysis.

Keywords: chemical constituents; *Didemnum psammotodes*; tunicate.

INTRODUÇÃO

O ambiente marinho é considerado uma rica fonte de compostos com atividades biológicas interessantes, como agentes anti-tumorais, anti-inflamatórios, analgésicos, imunomodulatórios, alergênicos e antivirais¹. As ascídias são invertebrados marinhos produtores de uma gama destes compostos, sendo a maioria deles derivados de aminoácidos^{2,3}. Alguns destes derivados e alguns alcalóides de ascídias encontram-se em fase de triagem clínica como agentes anti-tumorais^{1,4}.

Didemnidae é a maior família de ascídias em termos de número de espécies e tem provado ser uma grande fonte de compostos naturais com diversidade química e potente propriedade biológica. Várias espécies do gênero *Didemnum* já foram investigadas quanto à composição química, encontrando-se predominância de alcalóides^{5,6}, muitos deles com atividade citotóxica^{5,7-10}.

Didemnum psammotodes apresenta ampla distribuição geográfica, com registros em praticamente todos os mares tropicais, sendo particularmente abundante no litoral brasileiro¹¹. Pouca coisa é conhecida acerca de suas propriedades biológicas. Um estudo preliminar que descreveu a atividade citotóxica do extrato bruto das 10 espécies de ascídias mais abundantes da costa do Ceará mostrou que *D. psammotodes* possui atividade antimetabólica sobre ovos de ouriço do mar¹². Entretanto, não há relatos na literatura sobre a composição química desta espécie. Sendo assim, o presente trabalho descreve os principais componentes químicos da ascídia *D. psammotodes*.

PARTE EXPERIMENTAL

Instrumentação e procedimentos gerais

Os espectros de RMN ¹H foram obtidos em aparelhos de RMN Bruker DRX-400, operando em 400 MHz para ¹H e 100 MHz para ¹³C, respectivamente, com as amostras solubilizadas em CDCl₃,

DMSO deuterado e D₂O. Os espectros bidimensionais de HMQC e HMBC foram obtidos em aparelho DRX-500.

Os espectros de massas foram obtidos em aparelho da Micromass, modelo Micromass Quattro LC com ionização por electrospray a 45 eV.

Para identificação dos esteróides foi utilizado cromatógrafo com fase gasosa acoplado a espectrômetro de massas, marca Shimadzu, modelo QP 2010, com coluna capilar HP-1, com 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm de espessura de filme, utilizando-se as seguintes condições: temperatura do injetor: 260 °C; gás de arraste: He; temperatura inicial do forno: 200 °C por 5 min, velocidade de aquecimento a 5 °C/min até 280 °C, permanecendo nessa temperatura por 30 min. O espectro de massas foi obtido por impacto de elétrons a 70 eV. O banco de dados utilizado foi o Wiley Mass Spectral Database.

Separações por CLAE foram realizadas em aparelho Shimadzu LC-6A, com detector de UV-visível modelo SPD-6A, colunas Shim-pack ODS-C₁₈ 4,6 x 250 mm (analítica) e 20 x 250 mm (preparativa).

Nas separações por cromatografia em coluna (CC) foram utilizadas colunas de vidro de dimensões variadas e como fase estacionária, sílica gel 60 (70-230 mesh ASTM, Sigma) e Sephadex LH-20 (25-100 μ, Pharmacia) como suporte, na proporção média de 1:100 entre amostra:adsorvente para sílica e Sephadex LH-20.

Nas análises por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) foram utilizadas placas de vidro contendo sílica gel GF₂₅₄ (Merck) e como reveladores foram utilizadas luzes UV com comprimentos de onda de 254 e 366 nm e nebulização com ácido sulfúrico seguida de aquecimento.

Solventes comerciais foram utilizados para cromatografias em coluna e em camada delgada comparativa, e grau cromatográfico para as purificações em CLAE.

Estudo químico da ascídia *Didemnum psammotodes*

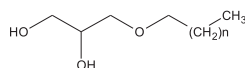
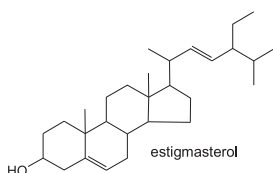
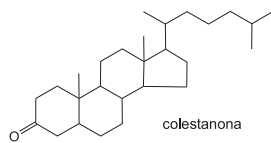
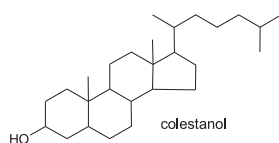
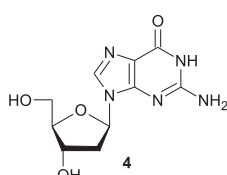
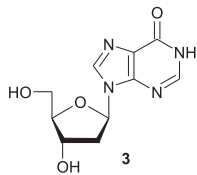
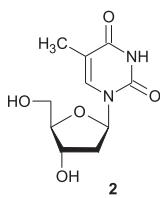
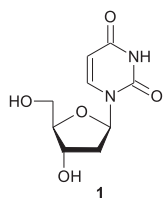
Exemplares de *D. psammotodes* (606 g de massa úmida) foram coletados manualmente na zona entre-marés da Praia de Ponta Grossa, Icapuí, estado do Ceará.

*e-mail: joaoluis@usp.br

Após a coleta, os animais foram lavados com água do mar para remoção de contaminantes, colocados em metanol e mantidos em freezer até o momento da extração. As amostras foram homogêneas em um volume de metanol 3 vezes superior à massa úmida total e o material foi, então, filtrado em papel de filtro e seco em evaporador rotativo, sob pressão reduzida, para remoção do metanol, sendo obtidos 12,15 g de extrato bruto (cerca de 2%).

Foram suspensos 8,41 g de extrato em metanol. O precipitado insolúvel foi removido por centrifugação. A parte solúvel em metanol (2,70 g) foi fracionada por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (MeOH) fornecendo 13 frações. A fração 8 foi posteriormente refracionada por cromatografia em Sephadex LH-20, fornecendo 5 frações. A subfração 8.2, segunda fração desta coluna, foi purificada por CLAE (coluna ODS preparativa; solvente: MeOH/H₂O 1:9; fluxo: 9 mL/min; detecção: 250 nm), fornecendo 1 mg de 2'-deoxiuridina (**1**), 2 mg de 2'-deoxiinosina (**3**) e 1 mg de timidina (**2**). Na subfração 8.3, terceira da coluna, formou-se precipitado branco, o qual foi separado do sobrenadante por filtração. O precipitado (7 mg) foi identificado como 2'-deoxiguanosina (**4**). Na fração 9 também formou precipitado branco, o qual foi separado do sobrenadante por filtração. O precipitado (4 mg) foi identificado também como 2'-deoxiguanosina (**4**).

Uma alíquota do extrato insolúvel em metanol (2,0 g) foi suspensa em diclorometano, ocorrendo solubilização de 0,218 g, o qual foi submetido à cromatografia em coluna (CC) de sílica gel, utilizando-se como eluentes diclorometano, misturas de diclorometano/MeOH e MeOH em gradiente de polaridade, fornecendo 9 frações. A fração 3 (obtida em diclorometano/MeOH 9:1) foi identificada como uma mistura dos esteróides colestanol, colestanona e estigmasterol (28 mg) por CG-EM, cujos dados são citados abaixo. A fração 4 (obtida em diclorometano/MeOH 9:1) foi purificada por CC de sílica gel utilizando-se como eluentes misturas de hexano/AcOEt e MeOH em gradiente de polaridade, resultando em álcool batílico e seus análogos 2,3-propanodiol, 1-heptadeciloxi e 2,3-propanodiol, 1-nonadeciloxi, obtidos e analisados em mistura (5 mg).



n=15 - 2,3-propanodiol, 1-heptadeciloxi
n=16 - 2,3-propanodiol, 1-octadeciloxi
n=17 - 2,3-propanodiol, 1-nonadeciloxi

Colestanol

t.r. 22,437 min; EIMS [*m/z* (intensidade relativa)]: 388 (45%, M⁺), 373 (38%), 355 (15%), 331 (5%), 262 (17%), 233 (87%), 215 (100%), 165 (41%), 95 (64%), 81 (64%), 55 (61%).

Colestanona

t.r. 22,938 min; EIMS [*m/z* (intensidade relativa)]: 386 (35%, M⁺), 371 (13%), 231 (100%), 217 (31%), 163 (20%), 95 (38%), 81 (37%), 55 (45%).

Estigmasterol

t.r. 24,708 min; EIMS [*m/z* (intensidade relativa)]: 412 (16%, M⁺), 281 (10%), 273 (53%), 255 (35%), 161 (40%), 149 (53%), 137 (52%), 121 (29%), 107 (37%), 97 (50%), 83 (84%), 69 (100%), 55 (77%).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fracionamento do extrato metanólico da ascídia *D. psammotodes* resultou no isolamento e identificação dos nucleosídeos 2'-deoxiuridina (**1**), timidina (**2**), 2'-deoxiinosina (**3**) e 2'-deoxiguanosina (**4**), na identificação da mistura dos esteróides colestanol, colestanona e estigmasterol e da mistura do álcool batílico e seus análogos 2,3-propanodiol, 1-heptadeciloxi e 2,3-propanodiol, 1-nonadeciloxi. As estruturas dos nucleosídeos 2'-deoxiuridina^{13,14} (**1**), timidina^{14,15} (**2**), 2'-deoxiinosina^{13,14} (**3**) e 2'-deoxiguanosina¹⁴ (**4**) e do álcool batílico¹⁴ e seus dois análogos 2,3-propanodiol, 1-heptadeciloxi¹⁶ e 2,3-propanodiol, 1-nonadeciloxi¹⁷ foram elucidadas com base nas análises dos dados de EM, RMN ¹H e ¹³C e espectros bidimensionais COSY ¹H-¹H, HMQC e HMBC, além de comparação com dados publicados anteriormente. Os esteróides foram identificados através de análises por CG-EM, comparando-se os espectros obtidos com os espectros existentes no banco de dados Wiley Mass Spectral Database e com padrões autênticos existentes no laboratório.

Os nucleosídeos observados no presente estudo já foram identificados em diversos organismos marinhos, incluindo ascídias, sendo que timidina já foi encontrada anteriormente no gênero *Didemnum*¹⁸. 2'-deoxiuridina, timidina e 2'-deoxiinosina foram isoladas da ascídia *Trididemnum cereum*¹³, da ascídia *Aplidium pantherinum*¹⁹ e da esponja *Carteriospongia* sp.²⁰; 2'-deoxiuridina e timidina foram isoladas da esponja *Phakellia mauritiana*²¹; timidina foi encontrada na esponja *Crambe crambe*²², na esponja *Mycale tenuispiculata*²³, na ascídia *Eudistoma* sp.²⁴ e na ascídia *Atrium robustum*²⁵; 2'-deoxiuridina foi isolada da esponja *Spongia* sp.²⁶ e 2'-deoxiguanosina foi encontrada nos briozoários marinhos *Cellaria* spp.²⁷.

Diversas espécies de ascídias foram anteriormente analisadas e mostraram conter misturas com colesterol como componente majoritário²⁸⁻³⁰. O colestanol foi encontrado na túnica da ascídia *Phallusia nigra*³¹; na ascídia *Microcosmus sulcatus*²⁸; na ascídia *Polizoa opuntia*³⁰ e nas ascídias *Styela* sp. e *Phallusia* sp.³². A colestanona foi identificada na ascídia *Styela* sp.³² A presença de esteróides vegetais em ascídias, como estigmasterol, pode ser proveniente de fontes dietéticas planctônicas, por serem animais filtradores^{30,31} ou podem ser provenientes de simbiontes³⁰.

O álcool batílico e seus análogos também foram encontrados em outras fontes marinhas. O 2,3-propanodiol, 1-heptadeciloxi foi encontrado anteriormente na esponja *Haliclona* sp.¹⁶. O álcool batílico também foi isolado da esponja *Ulosa ruetzleri*³³; da esponja *Tedania ignis*³⁴, da esponja *Haliclona* sp.¹⁶, da esponja *Suberites vestigium*³⁵ e da esponja *Mycale mytilorum*³⁶. O 2,3-propanodiol, 1-nonadeciloxi foi encontrado anteriormente na esponja *Suberites vestigium*³⁵.

Assim, as substâncias encontradas não são inéditas e estão coerentes com o perfil químico do gênero *Didemnum*, sendo este o primeiro estudo sobre a composição química da espécie *D. psammatotodes*.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP pela bolsa de pós-graduação concedida e ao CNPq, pelos auxílios (Projeto Milênio, processo nº 420015/05-1) e bolsas concedidas.

REFERÊNCIAS

1. Newman, D. J.; Cragg, G. M.; *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1216.
2. Davidson, B. S.; *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1771.
3. Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R.; *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 26.
4. Rinehart, K. L.; *Med. Res. Rev.* **2000**, *20*, 1.
5. Segreaves, N. L.; Lopez, S.; Johnson, T. A.; Said, S. A.; Fu, X.; Schmitz, F. J.; Pietraszkiewicz, H.; Valeriote, F. A.; Crews, P.; *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 3471.
6. Krishnaiah, P.; Reddy, V. L. N.; Venkataramana, G.; Ravinder, K.; Srinivasulu, M.; Raju, T. V.; Ravikumar, K.; Chandrasekar, K.; Ramakrishna, S.; Venkateswarlu, Y.; *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1168.
7. Carroll, A. R.; Bowden, B. F.; Coll, J. C.; Hockless, D. C. R.; Skelton, B. W.; White, A. H.; *Aust. J. Chem.* **1994**, *47*, 61.
8. Rudi, A.; Aknin, M.; Gaydou, E. M.; Kashman, Y.; *Tetrahedron* **1998**, *54*, 13203.
9. Ham, J.; Kang, H.; *Bull. Korean Chem. Soc.* **2002**, *23*, 163.
10. Reddy, S. M.; Srinivasulu, M.; Satyanarayana, N.; Kondapi, A. K.; Venkateswarlu, Y.; *Tetrahedron* **2005**, *61*, 9242.
11. Lotufo, T. M. C.; *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2002.
12. Jimenez, P. C.; Fortier, S. C.; Lotufo, T. M. C.; Pessoa, C.; Moraes, M.E.A.; Moraes, M. O.; Costa-Lotufo, L. V.; *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **2003**, *287*, 93.
13. Demattè, N.; Guerriero, A.; De Clauser, R.; De Stanchina, G.; Lafargue, F.; Cuomo, V.; Pietra, F.; *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* **1985**, *81*, 479.
14. Pouchert, C. J.; Behnke, J.; *The Aldrich library of ¹³C and ¹H FT NMR spectra*, Aldrich Chemical Company, 1993, vol. 3.
15. Kitajima, J.; Ishikawa, T.; Tanaka, Y.; Ida, Y.; *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47*, 988.
16. Parameswaran, P. S.; Das, B.; Kamat, S. Y.; *Indian J. Chem., Sect. B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.* **1994**, *33*, 99.
17. Han, A. R.; Song, J. I.; Jang, D. S.; Min, H. Y.; Lee, S. K.; Seo, E. K.; *Arch. Pharmacol. Res.* **2005**, *28*, 290.
18. Mitchell, S. S.; Pomerantz, S. C.; Concepción, G. P.; Ireland, C. M.; *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 1000.
19. Kim, J.; Pordesimo, E. O.; Toth, S. I.; Schmitz, F. J.; Altena, I. V.; *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 1813.
20. König, G. M.; Wright, A. D.; *Planta Med.* **1999**, *65*, 679.
21. Pettit, G. R.; McNulty, J.; Herald, D. L.; Doubek, D. L.; Chapuis, J. C.; Schmidt, J. M.; Tackett, L. P.; Boyd, M. R.; *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 180.
22. Berlinck, R. G. S.; *Quim. Nova* **1994**, *17*, 167.
23. Venkatesham, U.; Rao, M. R.; Venkateswarlu, Y.; *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1318.
24. Schupp, P.; Pochner, T.; Edrada, R.; Ebel, R.; Berg, A.; Wray, V.; Proksch, P.; *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 272.
25. Kehraus, S.; Gorzalka, S.; Hallmen, C.; Iqbal, J.; Müller, C. E.; Wright, A. D.; Wiese, M.; König, G. M.; *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2243.
26. Cao, S.; Gao, Z.; Thomas, S. J.; Hecht, S. M.; Lazo, J. S.; Kingston, D. G. I.; *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1716.
27. Anthoni, U.; Larsen, C.; Nielsen, P. H.; Christophersen, C.; Lidgren, G.; *Comp. Biochem. Physiol.* **1989**, *92B*, 711.
28. Kljajic, Z.; Dogovic, N.; Gasic, M.J.; *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* **1983**, *75*, 519.
29. D'Auria, M. V.; Minale, L.; Riccio, R.; *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1839.
30. Palermo, J. A.; Brasco, M. F. R.; Hughes, E. A.; Seldes, A. M.; Balzaretto, V. T.; Cabezas, E.; *Steroids* **1996**, *61*, 2.
31. Zelnik, R.; Matida, A. K.; Djerassi, C.; Khalil, M. W.; De Freitas, J. C.; *An. Acad. Bras. Cienc.* **1981**, *53*, 733.
32. Slantchev, K.; Yalçin, F.; Ersöz, T.; Nechev, J.; Çahs, I.; Stefanov, K.; Popov, S.; *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.* **2002**, *57*, 534.
33. Cardelina II, J. H.; Graden, C. J.; Greer, B. J.; *Lipids* **1983**, *18*, 107.
34. Schmitz, F. J.; Vanderah, D. J.; Hollenbeak, K. H.; Enwall, C. E. L.; Gopichand, Y.; Sengupta, P. K.; Hossain, M. B.; Van der Helm, D.; *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 3941.
35. Mishra, P. D.; Wahidullah, S.; D' Souza, L. D.; Kamat, S. Y.; *Indian J. Chem., Sect. B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.* **1997**, *36*, 719.
36. Reddy, G. B. S.; Dhananjaya, N.; *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 27.