

Meroterpenos da esponja *Callyspongia* sp. são potentes inibidores da enzima adenosina fosforribosil transferase de *Leishmania tarentolae*

Simone P. Lira¹ (PG), Chris Gray² (PD), Marcio Silva³ (PQ), Eli F. Pimenta^{1,3} (PG), Otávio H. Thiemann³ (PQ), Glaucius Oliva³ (PQ), Eduardo Hajdu⁴ (PQ), Raymond J. Andersen² (PQ) Roberto G. S. Berlinck^{1*} (PQ). Email: rgsberlinck@iqsc.usp.br

¹Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 780, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brazil,

²Department of Chemistry and Department of Earth and Ocean Sciences, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, V6T 1Z1 Canada, ³Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brazil and ⁴Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Quinta da Boa Vista, s/n, 20940-040, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Palavras Chave: meroterpenos, esponja, *Leishmania*

Introdução

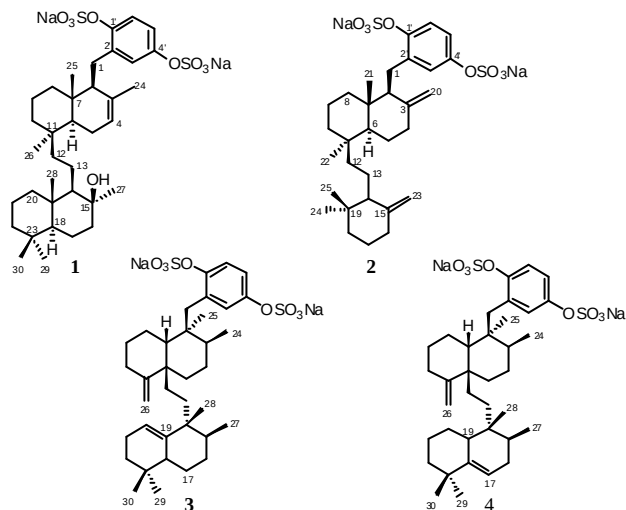
Meroterpenos dissulfatados constituem uma classe de metabólitos marinhos típicos de esponjas marinhas. Meroterpenos são biogeneticamente constituídos por unidades isoprênicas que dão origem a um esqueleto terpênico, o qual por sua vez se encontra conectado a um anel benzênico de origem policetídic. Nesta classe de metabólitos, dois dos substituintes aromáticos são grupos sulfato, os quais conferem alta polaridade e também atividades biológicas a estes compostos, tais como: os sulfatos de sarcohidroquinonas isolados da esponja *Sarcotragus spinulosus*, inibidores da Na⁺,K⁺-ATPase;¹ os shaagrockóis, toxiusol e toxicóis, isolados da esponja *Toxiclona toxius* que inibem a transcriptase reversa do vírus HIV1 além de apresentarem atividade antifúngica;²⁻⁴ o bis-(sulfato) do ciclosifonodictiol isolado da esponja *Syphonodictyon coralliphagum*, que inibe a ligação do leucotrieno B4 à neutrófilos humanos;⁵ a akaterpina isolada de *Callyspongia* sp., inibidora da fosfatidilinositol fosfolipase C;⁶ e os adociasulfatos isolados da esponja *Haliclona (Adocia)* sp., que inibem kinesinas e a H⁺ ATPase.⁷⁻¹⁰

Durante o nosso screening de extratos de organismos marinhos, detectamos atividade inibidora da enzima adenosina fosforribosil transferase de *Leishmania tarentolae* (L-APRT) no extrato da esponja *Callyspongia* sp. da região de São Sebastião (SP). No presente trabalho, relatamos o isolamento, determinação estrutural e atividades biológicas de dois merotriterpenos sulfatados, o ilhabelanol (**1**) e a isoakaterpina (**3**), e de um meroesterterpeno sulfatado, o ilhabreno (**2**), isolados de *Callyspongia* sp.

Resultados e Discussão

Após ser desengordurado com hexano, o extrato MeOH da esponja *Callyspongia* sp. foi concentrado, dissolvido em H₂O e submetido à cromatografia em 29^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química

coluna de fase reversa C₁₈ (Waters Sep-Pak), com um gradiente de MeOH em H₂O. As frações ativas foram purificadas por HPLC em coluna C₁₈ (3:2 MeCN/0.1 M NaClO₄), seguido de dessalinização por cromatografia em coluna de fase reversa C₁₈ (Waters Sep-Pak) eluída com H₂O (25 mL) e MeOH (50 mL), e cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (MeOH), fornecendo 0.7 mg de ilhabelanol (**1**), 0.3 mg de ilhabreno (**2**) e 1.2 mg de isoakaterpina (**3**). As estruturas destes compostos foi estabelecida por análises de RMN a 500 e 600 MHz, bem como por EM de alta resolução.



O ilhabelanol (**1**) apresentou ($[\alpha]_D^{22} -26^\circ$) e fórmula C₃₆H₅₄Na₂O₉S₂ (HRESIMS: m/z 763.2892). Seu espectro de RMN-¹H apresentou sinais de um sistema aromático 1,2,4-trissubstituído, do tipo hidroquinona [δ H 7.04 (1H, dd, J = 8.8 & 2.5 Hz), 7.30 (1H, d, J = 2.4 Hz) & 7.37 (1H, d, J = 8.8 Hz)] o qual demonstrou estar ligado através de um grupo metilênico [δ H 2.73 (1H, d, J = 16.0 Hz) & 2.90 (1H, dd, J = 16.1 & 9.4 Hz)] a um sistema hexaprênico insaturado [δ H 0.85 (3H, s), 0.88 (3H, s), 0.95 (3H, s), 0.96 (3H, s), 0.99 (3H, s), 1.13 (3H, s), 1.43 (3H, br s)]

& 5.33 (1H, br s)] que deve ser tetracíclico de acordo com sua fórmula molecular. Tais hipóteses foram confirmadas pela análise de seu espectro de RMN-¹³C, que indicou a presença de oito carbonos sp² [δ 120.1 (d), 123.0 (d), 123.3 (d), 123.6 (d), 137.1 (s), 139.3 (s), 148.8 (s) & 150.9 (s)], além de um carbono carbinólico terciário [δ 74.2 (s)]. A análise dos espectros de RMN do tipo HMBC, TOCSY e COSY indicou que a parte terpênica do ilhabelanol consiste de dois sistemas bicíclicos do tipo drimano, ligados entre si através de um grupo metilênico. Embora tenha sido muito difícil observar diversas correlações ¹H-¹³C à longa distância no espectro HMBC de **1**, a análise detalhada do espectro COSY permitiu a construção completa de seu esqueleto de carbono.

As posições do grupo hidroxila e da dupla ligação em **1** foram estabelecidas pela análise de seu espectro HMBC, que indicou correlações entre os hidrogênios benzílicos e o metino C-2 [δ 56.4 (d)] e o carbono olefínico C-3 [δ 137.1 (s)], indicando a localização da dupla ligação na junção cíclica do anel D. Esta atribuição foi confirmada pela observação de correlações à longa distância entre o grupo metila vinílico [δ 1.43 (3H, br s)] e C-2, entre H-2 [δ 2.41 (1H, br d, J = 8.9 Hz)] e C-3, de correlações recíprocas C-24 e C-4 [δ 123.0 (d); δ 5.33 (1H, br s)], bem como de correlação ¹H-¹H entre os hidrogênios alílicos [δ 1.97 (2H, m)] e H-4. Correlações à longa distância observadas entre H₂C-13, H₂C-16, H₂C-17 e o grupo metila H₃C-27 com o carbono carbinólico indicaram a localização deste em C-15. As estereoquímicas relativas dos dois sistemas decalina do ilhabelanol (**1**) foram estabelecidas pela análise do espectro NOESY. Observou-se correlações nOe entre H-1 e H₃C-25, entre H₃C-25 e H₂C-12, que indicaram orientação 1,3-*trans*-diaxial entre C-12 e C-5, e uma relação 1,2-*cis* entre C-1 e C-21. Correlações NOESY observadas entre H-2 e o proton axial H-8a e H-6, bem como entre H-6 e a metila equatorial H₃C-22 confirmaram a estereoquímica relativa de C-2 e a junção cíclica *trans* entre os anéis C e D de **1**. Correlações similares foram observadas para os substituintes dos anéis A e B. Em conjunto com as correlações nOe entre H₃C-27 e H₂C-13, entre H-14 e H₂C-16, tais resultados indicaram que os anéis A e B também apresentam junção *trans*, com substituição axial em C-14 e substituição axial em C-15. Desta maneira, foi possível estabelecer a estrutura completa de **1**, inclusive sua estereoquímica relativa.

O ilhabreno (**2**) apresentou [α]_D²² -15° e fórmula molecular C₃₁H₄₄Na₂O₈S₂ (HRESIMS: *m/z* 677.2170), indicando ser um merosesterterpeno. A análise detalhada de seus dados de RMN indicaram apenas 28 sinais no espectro de RMN-¹³C; todavia, 3 outros sinais foram detectados através da análise de seus espectros de HSQC e HMBC [δ 27.3 (q), 33.4 (t) & 37.3 (s)]. O espectro de RMN-¹³C indicou claramente a presença da hidroquinona dissulfatada [δ 120.1 (d), 123.3 (d), 123.6 (d), 139.3 (s), 148.8 (s) & 150.9 (s)] bem como de duas duplas ligações exocíclicas [δ

151.5 (s), 149.2 (s), 109.6 (t) & 108.9 (t)], requerendo a presença de um sistema tricíclico para satisfazer a fórmula molecular estabelecida por EM. Devido a pequena quantidade de material isolado (0.3 mg), os espectros de HMBC de **2** mostraram ser pouco informativos. Todavia, correlações chave observadas para os grupos metila [δ 0.80, 0.85, 0.90 & 0.92], para os dois grupos metileno exocíclicos [δ 4.54, 4.63, 4.69 & 4.78] e para o metileno benzílico [δ 2.92 (2H, d, J = 7.1 Hz)], em conjunto com as correlações estabelecidas pela análise dos espectros TOCSY e COSY, permitiram estabelecer a estrutura planar de **2**. Correlações nOe observadas no espectro NOESY de **2** entre H-12 e H₃C-21; entre H₃C-21 e H-1; entre H-2, H-4a, H-8a e H-6; e entre H-6 e H₃C-21 permitiram estabelecer a estereoquímica do sistema decalina como sendo *trans*.

Já a isoakaterpina (**3**) apresentou [α]_D²² +37° e fórmula C₃₆H₅₂Na₂O₈S₂ estabelecida por HRESIMS, isomérica à da akaterpina (**4**) isolada anteriormente de uma esponja do gênero *Callyspongia*.⁷ A análise espectroscópica detalhada de **3** indicou ser esta um isômero de dupla ligação em Δ^{19,20} enquanto que a akaterpina apresentou a dupla endocíclica Δ^{17,18}.

A isoakaterpina (**3**) apresentou inibição da L-APRT com IC₅₀ de 1,15 nM, enquanto que a fração Ca6f2 a partir da qual foram isolados os compostos **1** e **2** apresentou inibição da L-APRT a uma dose de 0,8 μg/mL. Desta maneira, os meroterpenos isolados de *Callyspongia* sp. são os mais potentes inibidores da L-APRT isolados até o momento presente.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao CEBIMar-USP pela ajuda e suporte logístico durante as coletas realizadas, e à FAPESP pelo apoio financeiro (01/03095-5) e à bolsa outorgada à S.P.L.

- Isaacs, S.; Kashman, Y., *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 2227-2230.
- Isaacs, S.; Hizi, A.; Kashman, Y. *Tetrahedron*, **1993**, 49, 4275-4282.
- Loya, S.; Tal, R.; Hizi, A.; Issacs, S.; Kashman, Y.; Loya, Y., *J. Nat. Prod.* **1993**, 56, 2120-2125.
- Loya, S.; Bakhanashvili, M.; Kashman, Y.; Hizi, A. *Biochemistry (Mosc)*. **1995**, 34, 2260-2266.
- Killday, K. B.; Wright, A. E.; Jackson, R. H.; Sills, M. A., *J. Nat. Prod.*, **1995**, 58, 958-960.
- Fukami, A.; Ikeda, Y.; Kondo, S.; Naganawa, H.; Takeuchi, T.; Furuya, S.; Hirabayashi, Y.; Shimoiike, K.; Hosaka, S., *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 38, 1201-1202.
- Blackburn, C. L.; Hopmann, C.; Sakowicz, R.; Berdelis, M. S.; Goldstein, L. S. B.; Faulkner, D. J., *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 5565-5570.
- Kalaitzis, J. A.; de Leone, P.; Harris, L.; Butler, M. S.; Ngo, A.; Hooper, J. N. A.; Quinn, R. J., *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 5571-5574.
- Sakowicz, R.; Berdelis, M. S.; Ray, K.; Blackburn, C. L.; Hopmann, C.; Faulkner, D. J.; Goldstein, L. S. B., *Science*, **1998**, 280, 292-295.
- Blackburn, C. L.; Faulkner, D. J., *Tetrahedron*, **2000**, 56, 8429-8432.