

Derivados cumarínicos da esponja *Axinella* cf. *corrugata*. Isolamento, determinação estrutural e síntese.

Mirna H. R. Selegim^{1,2} (PQ), Simone P. de Lira¹ (PG), David E. Williams³ (PQ), Frederic Marion³ (PD), Raymond J. Andersen³ (PQ), Roberto G. S. Berlinck^{1*} (PQ), e Eduardo Hajdu⁴ (PQ). Email: rgsberlinck@iqsc.usp.br

¹Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 780, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brasil, ²Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, ³Department of Chemistry and Department of Earth and Ocean Sciences, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, V6T 1Z1 Canada e ⁴Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Quinta da Boa Vista, s/n, 20940-040, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Palavras Chave: esculetina, esponja, *Axinella corrugata*

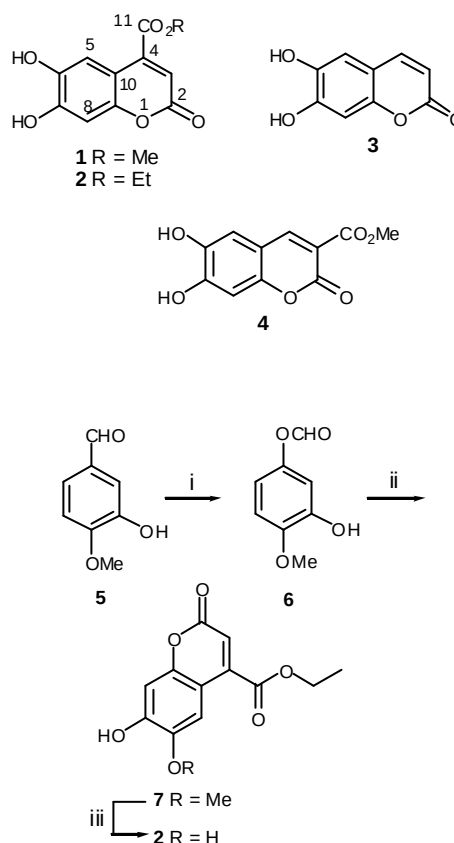
Introdução

Embora esponjas marinhas sejam reconhecidamente uma das fontes biológicas que apresentam produtos naturais com maior diversidade química, não se conhece derivados fenilpropanoídicos oriundos destes animais.¹ Durante screening realizado com mais de 200 extratos de esponjas, observamos que o extrato MeOH da esponja *Axinella* cf. *corrugata* apresentou significativa atividade citotóxica. O fracionamento biomonitorado deste extrato indicou a perda de atividade de todas as frações obtidas após duas etapas cromatográficas. Todavia, a análise das frações por cromatografia líquida de alto desempenho utilizando um detector de arranjo de diodos (HPLC-PDA) indicou que algumas frações obtidas apresentavam um padrão de absorção no UV pouco usual. O fracionamento destas frações monitorado por UV levou ao isolamento de dois compostos majoritários, o éster metílico do ácido 4-carboxiesculetínico (**1**) e o éster etílico do ácido 4-carboxiesculetínico (**2**). Levando-se em conta que a esponja foi originalmente preservada em EtOH, e subsequentemente extraída com MeOH, provavelmente estes dois compostos são artefatos de isolamento oriundos da condensação do ácido 4-carboxiesculetínico (**3**), o qual é inédito na literatura e constitui o primeiro exemplo de derivado cumarínico isolado de uma esponja marinha.

Resultados e Discussão

A esponja *Axinella* cf. *corrugata* coletada na região de São Sebastião (SP) foi imediatamente imersa em EtOH. Posteriormente o EtOH foi removido por filtração e o material sólido foi re-extraído com MeOH. Ambos extratos MeOH e EtOH foram reunidos e evaporados até se obter 500 mL de uma suspensão aquosa, a qual foi particionada com AcOEt. O extrato AcOEt (0,5736 g) foi submetido a uma série de separações cromatográficas, incluindo cromatografia em coluna de Sephadex LH20 (MeOH), cromatografia em coluna de sílica gel (Waters Sep-Pak, gradiente

de EtOAc-MeOH 1:1 em CH₂Cl₂), e purificação por HPLC em coluna de sílica gel derivatizada com grupos fenila usando MeOH/0,1% TFA 4:6 como eluente, fornecendo 3,9 mg do éster metílico do ácido 4-carboxiesculetínico (**1**) e 4,5 mg do éster etílico do ácido 4-carboxiesculetínico (**2**).



Esquema 1 Condições reacionais: i) *m*-CPBA, CH₂Cl₂, 70%; ii) SDO, H₂PO₄, 46%; iii) BBr₃, CH₂Cl₂, 84%

O composto **1** foi isolado como um sólido vítreo de coloração verde, o qual apresentou pico de íon quase molecular em *m/z* 495, correspondente ao aduto de sódio dimerizado (TOF/ESI-MS). Uma medida de massa exata em *m/z* 495.0544 (calc. 495.0539)

indicou a fórmula $C_{22}H_{16}O_{12}Na$. Levando-se em conta o espectro de RMN- ^{13}C de **1**, o qual apresentou sinais de apenas 11 carbonos, foram consideradas duas possibilidades: a) ou o composto **1** apresentava simetria interna, ou; 2) o composto **1** foi detectado por TOF/ESI-MS através de seu íon quase-molecular dimerizado. A segunda hipótese demonstrou ser verdadeira após completarmos a síntese do composto **2**, o qual também apresentou pico de íon quase molecular dimerizado.

Sete dos onze carbonos do composto **1** demonstraram ser carbonos sp^2 quaternários, de acordo com a análise do espectro de RMN- ^{13}C DEPT (δ 164.4, 159.9, 150.9, 148.8, 143.0, 142.5, 107.0). Três dos carbonos remanescentes demonstraram ser sp^2 metínicos (δ 113.5, 110.3, 102.9) e um metílico (δ 53.0). O espectro de RMN- 1H de **1** apresentou 6 singletos, dos quais, de acordo com as correlações observadas no espectro HSQC, dois foram atribuídos a hidrogênios fenólicos (δ 10.44 e 9.60), três sendo hidrogênios vinílicos e/ou aromáticos (δ 7.46, 6.80 e 6.60) conectados aos seus respectivos carbonos sp^2 em δ 110.3, 102.9 e 113.5, e um grupo metoxila em δ 3.92 (δ 53.0).

O espectro COSY de **1** indicou um acoplamento fraco (longa-distância) entre os sinais de 1H em δ 7.46 e 6.80, sugerindo serem hidrogênios aromáticos com uma relação 1,4 entre estes. Considerando-se que o espectro HMBC apresentou correlações à longa distância entre ambos hidrogênios em δ 7.46 e 6.80 com os carbonos em δ 150.9 e 148.8, os quais por sua vez apresentaram correlação à longa-distância com os hidrogênios fenólicos em δ 10.44 e 9.60, pudemos definir a parte aromática de **1** como sendo um anel benzeno 1,2,4,5-tetrassubstituído, com dois grupos hidroxila vicinais. O hidrogênio vinílico remanescente em δ 6.59 apresentou correlações à longa distância com dois carbonos carbonílicos em δ 164.4 e 160.0. Como o grupo metila em δ 3.92 (s) também apresentou correlação à longa distância com o carbono em δ 164.4, foi atribuído a um grupo éster metílico. Levando-se em conta o número de oito não-saturações para o composto **1**, estabelecido considerando-se metade da fórmula molecular observada por EM, bem como o número de carbonos sp^2 detectados por RMN- ^{13}C , o grupo carbonila remanescente δ 160.0 foi atribuído a uma lactona de um esqueleto do tipo cumarínico.

Desta maneira, as posições dos grupos hidroxila foram estabelecidas como sendo em C-6 e C-7, como na esculetina (**3**). O grupo éster metílico poderia estar localizado tanto em C-3 como em C-4, levando a duas possíveis estruturas, **1** ou **4**, que não puderam ser distinguidas através das correlações à longa distância observadas entre o hidrogênio em δ 6.59 e os grupos carbonila. Todavia, o espectro HMBC apresentou clara correlação dos hidrogênios em δ 6.59 e 6.80 com o carbono quaternário em δ 107.0, a qual é apenas possível de ser observada na estrutura **1**, sendo o sinal em δ 107.0 atribuído a C-4. Além

disso, se o hidrogênio vinílico estivesse localizado em C-4, deveria apresentar maior valor de deslocamento químico, já que estaria situado em posição β de um sistema α,β -insaturado, conjugado com dois grupos carbonila. Os dois sinais de carbono sp^2 em δ 142.5 e 143.0 foram atribuídos a C-9 e C-10, sendo estas atribuições intercambiáveis. Desta maneira, definimos a estrutura do composto como sendo **1**.

O composto **2** também foi isolado como sendo um sólido vítreo esverdeado, que apresentou pico de íon quase molecular do aduto de sódio dimerizado em m/z 523, para o qual uma medida de massa exata indicou a fórmula $C_{24}H_{20}O_{12}Na$. Seus dados de RMN- 1H , ^{13}C e HMBC indicaram a presença de um grupo etoxila (δ^1H 4.35, q, 7 Hz, 2H; $\delta^{13}C$ 62.0; δ^1H 1.33, t, 7 Hz, 3H; $\delta^{13}C$ 13.7) acoplado à longa distância com a carbonila C-11 como sendo a única diferença relativamente ao composto **1**. Sendo assim, ao segundo derivado cumarínico isolado de *Axinella* cf. *corrugata* foi atribuída a estrutura **2**.

Com o intuito de confirmar as hipóteses estruturais apresentadas para os compostos **1** e **2**, decidimos realizar a síntese do composto **2** em três etapas a partir do 3-hidroxi-4-metoxibenzaldeído (Esquema 1), em um rendimento total de 27%.

Ambos compostos **1** e **2** devem muito provavelmente ser artefatos de isolamento. Todavia, o ácido 4-carboxiesculetínico não é conhecido como produto natural, mas já foi sintetizado.² A incorporação de um carbono na posição 4 do esqueleto cumarínico é pouco usual em produtos naturais. Compostos estruturalmente relacionados foram recentemente isolados do fungo *Phellinus igniarius*.³ Considerando-se a pequena quantidade isolada de ambos **1** e **2**, parece razoável propor origem microbiana para estes compostos, embora a ocorrência de compostos cumarínicos em bactérias e fungos não seja comum.⁴ Metabólitos contendo sistema cumarínico foram isolados dos fungos marinhos *Trichoderma virens*⁵ e *Leptosphaeria oraemaris*.⁶

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.

¹ Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R., *Nat. Prod. Rep.*, **2005**, 22, 15-61.

² Hartman, W. J.; Akawie, R. I.; Clark, W. G., *J. Biol. Chem.*, **1955**, 216, 507-530.

³ Mo, S.; Wang, S.; Zhou, G.; Yang, Y.; Li, Y.; Chen, X.; Shi, J., *J. Nat. Prod.*, **2004**, 67, 823-828.

⁴ O banco de dados SciFinder forneceu um número pequeno de artigos de produtos naturais de microrganismos com sistema cumarínico. Ver, por exemplo: (a) Chen, H., Walsh, C. T., *Chem. Biol.*, **2001**, 8, 301-312; (b) Pedras, M. S. C.; Chumala, P. B., *Phytochem.*, **2005**, 66, 81-87.

⁵ Garo, E.; Starks, C. M.; Jensen, P. R.; Fenical, W.; Lobkovsky, E.; Clardy, J., *J. Nat. Prod.*, **2003**, 66, 423-426.

⁶ Guerriero, A.; D'Ambrosio, M.; Cuomo, V.; Pietra, F., *Helv. Chim. Acta*, **1991**, 74, 1445-1450.