

Hexadepsipeptídeos cíclicos obtidos da cultura de fungos isolados da alga marinha *Caulerpa* sp.

Simone P. de Lira¹ (PG), Mirna H. R. Seleghim^{1,2} (PQ), Aline M. de Vita-Marques¹, Tim S. Bugni³ (PQ), Lara Durães Sette⁴ (PD), Sandra R. P. Sponchiado⁵ (PQ) e 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, Brasil, ²Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, ³Department of Medicinal Chemistry, University of Utah, Salt Lake City, Utah, USA, ⁴Divisão de Recursos Microbianos, CPQBA, Universidade Estadual de Campinas, Caixa Postal 6171, 13083-970, Campinas, SP, e ⁵Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP..

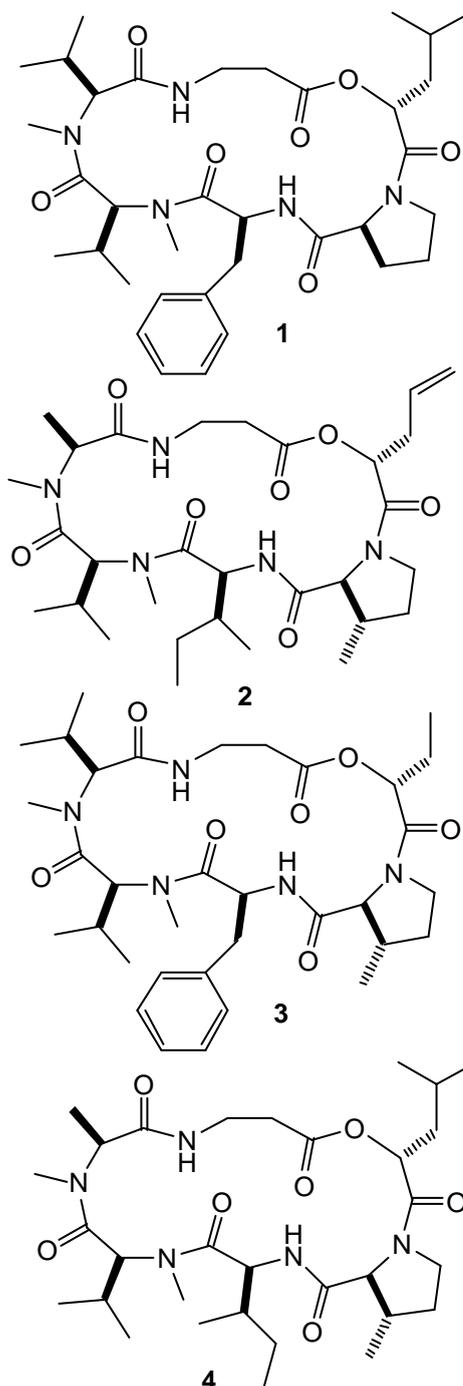
Palavras Chave: peptídeos, fungos marinhos, alga marinha.

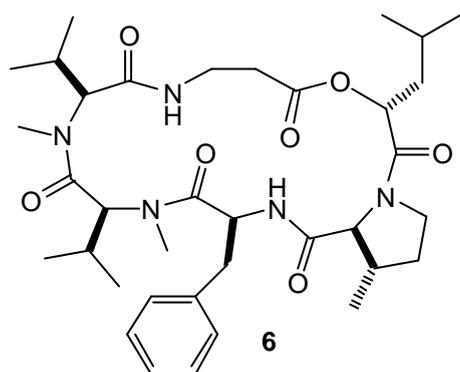
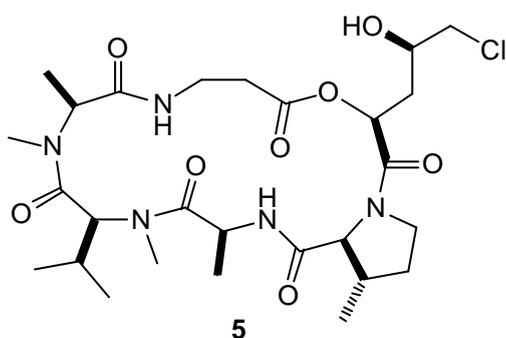
Introdução

Microorganismos marinhos são atualmente considerados uma das fontes mais promissoras de produtos naturais biologicamente ativos. Em particular, fungos marinhos têm se revelado uma fonte extremamente rica de metabólitos secundários.¹ Em 2002 realizamos uma primeira coleta de amostras de algas, invertebrados e sedimentos marinhos, objetivando o isolamento de linhagens de fungos de origem marinha. 57 linhagens foram obtidas e crescidas em escala semi-preparativa, fornecendo extratos brutos os quais foram submetidos a diversos bioensaios. Dentre os extratos brutos testados, dois (AcSS8-E e AcSS13-E) apresentaram atividade citotóxica sobre linhagens de células tumorais. O fracionamento cromatográfico destes dois extratos levou a obtenção de 11 frações similares (segundo análises por RMN-¹H). Destas, seis foram identificadas como sendo hexadepsipeptídeos cíclicos análogos às destruxinas.² Dentre os compostos isolados, quatro são derivados inéditos na literatura, os quais foram completamente identificados por métodos químicos e espectroscópicos.

Resultados e Discussão

As linhagens AcSSF-8 e AcSSF-13 foram crescidas em 250 mL de meio MF (glicose 2%, amido 1%, soytone 2%, peptona 0,5%, extrato de carne 0,3%, extrato de levedura 0,5%, rifampicina 0,03%) à temperatura ambiente por 30 dias, sem agitação. Após este período, os meios de cultura foram extraídos com butanona. Após filtração, a mistura foi submetida à partição líquido-líquido, a fase orgânica orgânica evaporada, seca e submetida à cromatografia de coluna em sílica gel (Waters Sep-Pak) com um gradiente de MeOH em CH₂Cl₂, seguido de purificação por HPLC em coluna de fase reversa C₁₈ (eluente: MeCN-H₂O 45:55). Assim, foram obtidos a destruxina B (1), a roseotoxina (2) e mais 4 hexadepsipeptídeos cíclicos inéditos na literatura, (3 – 6).





As estruturas de todos os peptídeos 1 – 6 foram estabelecidas através da análise detalhada de seus espectros de RMN-¹H, -¹³C, COSY, TOCSY, HMQC, HMBC e NOESY. A natureza peptídica dos compostos isolados pôde ser facilmente verificada observando-se sinais típicos nos seus respectivos espectros de ¹³C: seis sinais para cada composto, observados entre δ 165 e 175 indicaram a presença dos grupos carbonila de amida e éster; 4 ou 5 sinais entre δ 50 e 70 indicaram a presença dos carbonos α dos aminoácidos, e um sinal para cada composto acima de δ 70 indicou a presença de um α-hidroxiácido, típico de depsipeptídeos. Os sinais de ¹³C remanescentes foram atribuídos para os carbonos das cadeias laterais de cada aminoácido. A estratégia de determinação estrutural destes compostos é relativamente simples. A análise dos espectros COSY e TOCSY indicam os hidrogênios acoplados em série para cada aminoácido e α-hidroxiácido, formando sistemas de spin isolados de cada uma das cadeias laterais de cada aminoácido. Estas atribuições são confirmadas pela análise do espectro HMBC. A conexão entre os aminoácidos é estabelecida observando-se as correlações à longa distância entre o hidrogênio α de um determinado aminoácido com duas carbonilas: uma pertencente ao próprio aminoácido e a outra pertencente ao aminoácido vizinho, ligado ao primeiro através da ligação peptídica. A atribuição da carbonila pertencente ao próprio aminoácido é estabelecida observando-se correlações à longa distância entre esta e os hidrogênios ligados aos carbonos β e/ou γ da respectiva cadeia lateral. Desta maneira estabelece-se a seqüência dos aminoácidos conectados em série. A observação de correlações à

longa distância entre carbonilas e carbonos α com os hidrogênios dos grupos NH de ligações peptídicas, ou de grupos N-Me quando estes nitrogênios encontram-se metilados, confirmam as conexões em série entre os aminoácidos. Desta maneira foi possível estabelecer as estruturas planares de todos os seis peptídeos 1 – 6. As estereoquímicas absolutas dos aminoácidos foi estabelecida pela análise de Marfey,³ que consiste em hidrólise dos peptídeos, derivatização com o reagente de Marfey tanto do hidrolisado como de aminoácidos puros com configuração absoluta conhecida, e subsequente análise por HPLC. No caso do composto 5, a estereoquímica absoluta da cadeia lateral do α-hidroxiácido (ácido 5-cloro-2,4-dihidroxipentanóico) foi estabelecida observando-se primeiramente as constantes de acoplamento ²J_{H-¹³C} e ³J_{H-¹³C} entre o hidrogênio α e os carbonos C-3 e C-4 da cadeia lateral.⁴ Em seguida realizou-se a derivatização do peptídeo 5 com o (R)-MPA-Cl em CH₂Cl₂ e piridina, a qual forneceu o produto derivatizado que foi analisado por RMN-¹H em CDCl₃ em diferentes temperaturas, de acordo com método descrito na literatura.⁵ Os resultados obtidos indicaram a configuração absoluta do α-hidroxiácido do peptídeo 5 como sendo a do ácido 2(S),4(R)-5-cloro-2,4-dihidroxipentanóico. No momento, estruturas de outros 5 peptídeos estão sendo analisadas por métodos espectroscópicos e químicos, bem como as atividades biológicas de todos os compostos isolados.

Este trabalho constitui o primeiro isolamento de derivados de destruxinas isolados de fungos obtidos do meio marinho.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao CEBIMar-USP pelo suporte técnico e apoio logístico durante as coletas de amostras, à FAPESP pelo apoio financeiro (03/08899-0) e pela bolsa concedida à S.P.L. e à USP pelo programa PROCONTES.

- ¹ Bugni, T. S., Ireland, C. M., *Nat. Prod. Rep.*, **2004**, *21*, 143-163.
- ² Pedras, M. C. S. C., Zaharia, L. I., Ward, D. E., *Phytochemistry*, **2002**, *59*, 579-596.
- ³ Furtado, N.A. J.C., Pupo, M.T., Carvalho, I., Campo, V.L., Duarte, M.C.T., Bastos, J.K., *J. Braz. Chem. Soc.*, **2005**, *16*, 1448-1553.
- ⁴ Nobuaki Matsumori, N., Kaneno, D., Murata, M., Nakamura, H., Tachibana, K., *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 866-876.
- ⁵ Latypov, S. K.; Seco, J. M.; Quinoa, E.; Riguera, R., *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 877-882.