

## Produção de destruxinas modificadas através da incorporação de arginina, tirosina e 4-hidroxiprolina pelo fungo *Beauveria felina*.

Raquel Peres de Morais Urano\*<sup>1</sup> (PG), Mirna H. R. Selegim<sup>2</sup> (PQ), Aristeu G. Tininis<sup>3</sup> (PQ), Roberto Gomes de S. Berlinck<sup>1</sup> (PQ). E-mail: raquelperes@iqsc.usp.br

<sup>1</sup>Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 780, CEP 13560-970, São Carlos, SP, <sup>2</sup>Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, <sup>3</sup>Centro Federal de Educação Tecnológica de Rio Verde, Rio Verde, GO.

Palavras Chave: destruxinas modificadas, *Beauveria felina*, fungos marinhos, quimiometria

### Introdução

O fungo *Beauveria felina* produz as destruxinas, depsipeptídeos cíclicos biossintetizados a partir de aminoácidos existentes no meio de cultivo. Porém não há relatos de destruxinas apresentando os aminoácidos tirosina, 4-hidroxiprolina e arginina. O presente trabalho teve como objetivo realizar experimentos de crescimento e produção de destruxinas modificadas por *B. felina*, com a adição dos aminoácidos arginina, tirosina e 4-hidroxiprolina ao meio de cultivo.

### Resultados e Discussão

O fungo *B. felina* foi crescido em 50 mL de meio de cultura, utilizando-se uma condição ótima de crescimento estabelecida através de métodos quimiométricos. Em experimentos separados, foram adicionados 10 mM de cada um dos aminoácidos<sup>2</sup> arginina, tirosina e 4-hidroxiprolina. Após o período de incubação foi realizada a filtração e extração dos metabólitos secundários, por extração em fase sólida (SPE) do meio de cultura líquido e extração com MeOH do micélio do fungo. As 4 frações de SPE, o extrato metanólico e os padrões de destruxinas (roseotoxina B, [Phe<sup>3</sup>, N-Me-Val<sup>5</sup>] destruxina B e pseudodestruxina C) foram analisados por HPLC-PDA-ELSD-MS, utilizando-se uma coluna C<sub>18</sub>, com um gradiente de MeOH/ACN/H<sub>2</sub>O com 0,1% de ácido fórmico, fluxo de 1 mL/min e MS no modo ES<sup>+</sup>.

A análise por HPLC-PDA-ELSD-MS das frações obtidas indicou que as frações 1 (H<sub>2</sub>O/MeOH 75:25) e 2 (H<sub>2</sub>O/MeOH 1:1) provenientes do experimento de crescimento de *B. felina* na presença de 4-hidroxiprolina, apresentaram um pico de íon pseudo-molecular [M+H]<sup>+</sup> de *m/z* 637, bem como seu aduto de sódio análogo [M+Na]<sup>+</sup> de *m/z* 660. Tal pico foi atribuído à uma possível destruxina (2) que resultaria da substituição do aminoácido prolina pela 4-hidroxiprolina na estrutura da destruxina análoga à da pseudodestruxina B (figura 1).

Para confirmar a incorporação da 4-hidroxiprolina em 2, a amostra foi purificada por HPLC e enviada para análise por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-<sup>1</sup>H) em 600 MHz e de massas (MS/MS) para sua caracterização estrutural.

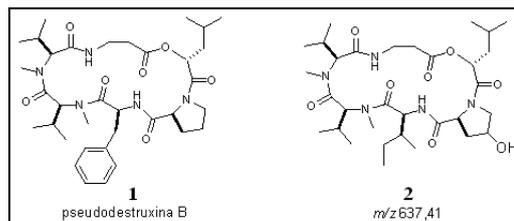


Figura 1.

A análise dos dados obtidos indica a presença de 4-hidroxiprolina em um ciclodepsipeptídeo do tipo destruxina, uma vez que a massa molecular medida para a amostra enviada para os EUA (638.3759, M+H<sup>+</sup>) situa-se na mesma faixa das destruxinas previamente isoladas. Adicionalmente, a fórmula molecular observada (C<sub>31</sub>H<sub>52</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>) indica 2 oxigênios a mais do que o número de oxigênios presentes nas destruxinas, o que mostra um maior grau de oxidação em dois dos possíveis resíduos de aminoácidos ou do α-hidroxiácido. A prolina e o alfa-hidroxiácido são os dois resíduos mais propensos a apresentarem maior grau de oxidação. A análise dos espectros de RMN (<sup>1</sup>H e gCOSY) indicam a presença de sinais típicos da 4-hidroxiprolina no composto isolado. Todavia, levando-se em conta a quantidade isolada (50 µg), análises adicionais foram requeridas para que possamos estabelecer a estrutura completa do composto isolado.

### Conclusões

Neste trabalho foi realizado, pela primeira vez, um estudo de incorporação de aminoácidos que não são comumente usados para a biosíntese de destruxinas, de maneira a induzir a produção de destruxinas modificadas pelo fungo *B. felina*. Os resultados obtidos indicam que talvez tenha ocorrido uma pequena incorporação do aminoácido 4-hidroxiprolina pelo fungo *B. felina*.

### Agradecimentos

À FAPESP e ao CEBIMar-USP.

<sup>1</sup> Pedras, M. C. S.; Zaharia, L. I.; Ward, D. E. *Phytochemistry*. **2002**, *59*, 579.

<sup>2</sup> Xu, Y.; Zhan, J.; Wijeratne E. M. K.; Burns, A. M.; Gunatilaka, A. A. L.; Molnar, I. J. *Natural Products* **2007**, *70*, 1467.