

METABÓLITOS HIDROSSOLÚVEIS ISOLADOS DE UMA LINHAGEM DE FUNGO MARINHO

Gabriel Cósia Junqueira

Marcelo R. Amorim

Roberto G. S. Berlinck

Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo

gabrielcosica@usp.br; rgsberlinck@iqsc.usp.br

Objetivos

Diversos estudos demonstraram que os fungos marinhos são uma excelente fonte para a descoberta de novos metabólitos secundários bioativos [1]. Contudo, a maioria destes estudos apresentam um foco maior no isolamento de produtos naturais de média polaridade encontrados em extratos orgânicos, enquanto que os metabólitos de elevada polaridade e hidrossolúveis compõem apenas uma pequena fração das substâncias estudadas a partir de culturas de fungos marinhos [2]. Deste modo, o presente trabalho tem os seguintes objetivos:

- Crescimento em escala ampliada da linhagem fúngica M3 para a produção de quantidade suficiente de cultura para o isolamento de metabólitos hidrossolúveis;
- Realização do isolamento e purificação das substâncias de interesse produzidas pelo fungo M3. Para tanto serão realizadas diferentes etapas de separação cromatográfica e purificação por HPLC;
- Realizar a completa identificação dos metabólitos isolados através de análises de RMN e espectrometria de massas (MS) de alta resolução.

Métodos e Procedimentos

O fungo filamentoso M3, espécie ainda não identificada, foi isolado a partir das vísceras do

caranguejo *Pilumnus dasypodus* Kingslay e cultivado em placas contendo o meio de cultura *marine agar*. As placas foram incubadas a 28 °C por 7 dias. Este inóculo serviu para preparar culturas do fungo M3 em 9,4 L de meio de cultura líquido composto por PDB (potato dextrose broth) e sais inorgânicos para simular água do mar. O crescimento do fungo foi acompanhado a partir do monitoramento da queda da concentração de glicose do meio.

A incubação foi interrompida depois de 42 dias. Após este período, o meio de cultura foi filtrado para a remoção do micélio e o meio de crescimento foi submetido a uma série de etapas de fracionamentos cromatográficos (figura 1).

O extrato aquoso foi dessalinizado utilizando-se uma mistura de resinas XAD. A fração dessalinizada foi fracionada por cromatografia por exclusão de tamanho em uma coluna de Sephadex LH-20 (eluente: MeOH/H₂O 1:1). As frações obtidas foram analisadas por HPLC-ELSD-UV-MS e reunidas de acordo com sua similaridade cromatográfica.

A fração mais promissora das obtidas foi selecionada para ser fracionada através de uma extração em fase sólida (SPE) em um cartucho pré-empacotado com C₁₈. A extração foi feita com um gradiente de H₂O e MeOH.

Após isso, as frações de interesse foram purificadas por HPLC-UV em fase reversa e modo isocrático com MeOH, MeCN e H₂O como eluentes.

Os compostos isolados tiveram suas estruturas identificadas através de análises de RMN de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC, bem como determinação de sua massa exata por espectrometria de massas de alta resolução e pela identificação de fragmentos formados por MS/MS.

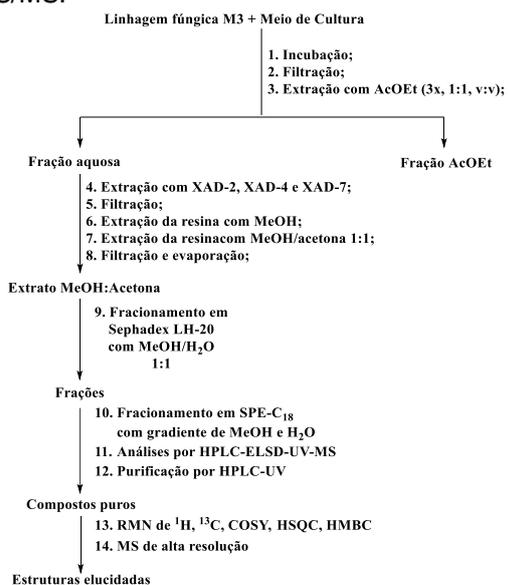


Figura 1: Procedimento adotado para o fracionamento do extrato aquoso do fungo M3.

Resultados

O extrato orgânico obtido a partir da partição com acetato de etila (AcOEt) foi codificado como M3O (4,4891 g). O extrato aquoso obtido a partir da dessalinização com a mistura de resinas XAD foi identificado como M3R (18,8279 g).

Após o fracionamento de M3R em Sephadex LH-20 e análises em HPLC-ELSD-UV-MS, foram obtidas cinco frações principais, sendo que M3RA (645,7 mg) era a que apresentava uma maior quantidade de metabólitos secundários e foi a escolhida para ser fracionada por SPE-C₁₈, gerando nove frações de menor complexidade.

Uma das frações obtidas foi M3RA2 (43,3 mg), que foi a escolhida para ser purificada por HPLC-UV, já que era uma das frações de maior massa e também com uma boa variedade de produtos naturais em sua composição. Alguns

dos compostos isolados e identificados estão apresentados na figura 3. O composto **1** é o ciclo(tirosil-prolil), já conhecido. Os compostos **2** e **3** são derivados de triptofano. **2** é muito comum em plantas, mas não em fungos filamentosos. Após uma revisão na literatura, concluímos que **3** é um produto natural inédito.

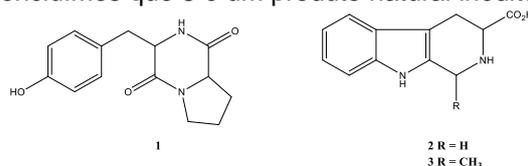


Figura 2: Alguns compostos isolados do extrato aquoso da linhagem de fungo M3.

Conclusões

O crescimento em escala ampliada da linhagem de fungo M3 permitiu a obtenção de uma grande quantidade de fração hidrossolúvel a partir da adsorção da fração aquosa em resinas do tipo XAD-2, XAD-4 e XAD-7. A partir do fracionamento desta fração dessalinizada por cromatografia de exclusão por tamanho e análises por HPLC-ELSD-UV-MS foi possível observar que o extrato M3R apresenta uma grande variedade de metabólitos secundários de interesse para serem estudados.

Após uma série de etapas de separação cromatográfica, conseguimos isolar alguns destes metabólitos e observamos que se tratava de derivados de aminoácidos de natureza aromática. Dentre os compostos isolados, destacamos **3**, um produto natural inédito.

Agradecimentos

Gabriel C. Junqueira e Roberto G. S. Berlinck agradecem à FAPESP (2019/17721-9) pelo apoio financeiro.

Referências

- [1] Saleem, M.; et al. *Natural Product Reports*, 2007, 24, p. 1142-1152.
- [2] Berlinck, R. G. S.; et al. *Natural Products Reports*, 2022, 39, p. 596-669.