

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS HIDROSSOLÚVEIS PRODUZIDOS EM CULTURA PELO FUNGO *Hypocrea* sp.

Matheus Gotha

Felipe Hilário, Marcelo Rodrigues de Amorim

Orientador: Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck

Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo (USP)

matheusgotha@alumni.usp.br

Objetivos

- Detectar peptaibóis ou outros metabólitos secundários presentes na fração aquosa do extrato bruto do meio de cultivo utilizando-se screening por HPLC-UV-ELSD-MS e por UPLC-MS/MS.
- Desenvolver um método para o isolamento dos peptídeos detectados em frações ainda não investigadas produzidas pelo *Hypocrea* sp.
- Identificar e caracterizar os peptídeos isolados utilizando-se técnicas de UPLC-MS, MS/MS e RMN-1D e -2D.

Métodos e Procedimentos

O fungo *Hypocrea* sp. (AT1) foi crescido em placas de Petri em meio sólido PDA, as quais foram incubadas por 14 dias a 28°C. O micélio foi então transferido para um tubo Falcon para preparação de inoculação em meio líquido. O inóculo foi incubado em 15 litros do meio líquido SDB distribuídos em frascos Schott®. A glicose do meio de cultura foi medida até a depleção total no oitavo dia, interrompendo-se então o crescimento fúngico.

O meio de crescimento foi então filtrado a vácuo, e submetido à partição líquido/líquido com AcOEt, resultando nas frações aquosa e orgânica. A fração aquosa foi adsorvida em uma mistura de resinas XAD-2, 4 e 7. Após 24 horas, a mistura de resinas foi filtrada, as resinas foram recuperadas e dessorbidas com MeOH/acetona 1:1. O solvente de dessorção

foi evaporado e seco, obtendo-se a fração aquosa-XADs (AT1B).

A fração AT1B foi submetida a uma separação por cromatografia em coluna com gel de Sephadex® LH-20, utilizando-se 1:1 MeOH/H₂O como fase móvel. As frações obtidas foram submetidas a análises cromatográficas e espectroscópicas por HPLC-UV-ELSD-MS e reunidas por similaridade química.

A fração AT1BX (obtida da separação em Sephadex LH-20) foi submetida a novo fracionamento por cromatografia de coluna de fase reversa (C18) em coluna pré-empacotada de extração em fase sólida (SPE) Waters® Sep-Pak. A coluna foi eluída com um gradiente de MeOH em H₂O. Assim, obteve-se as frações AT1BXA até AT1B XK, as quais foram submetidas a análises cromatográficas e espectroscópicas por HPLC-UV-ELSD-MS.

Por fim, as frações AT1BXA e AT1BXC foram purificadas utilizando-se um sistema cromatográfico Waters® acoplado a um detector espectrofotométrico de UV (detecção em dois comprimentos de onda entre 200 e 600 nm). Os dados foram processados e adquiridos pelo software Empower 2.0 (Waters®).

Resultados

O peptaibol trichokonina VI tipicamente apresenta uma fragmentação no resíduo Pro na posição 14, gerando um fragmento em *m/z*

774,4503 e outro fragmento em m/z 1163,6783 [1].

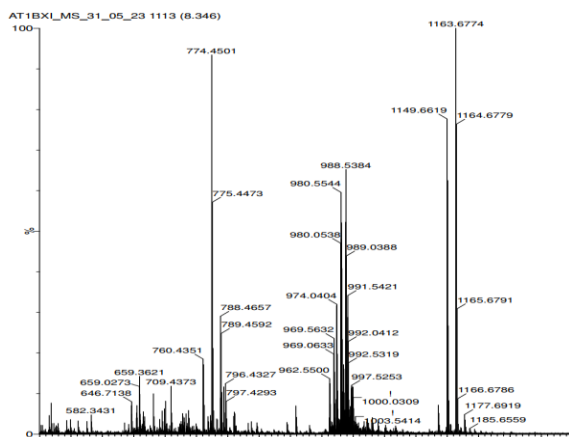


Figura 1. Espectro de massas de alta resolução da fração AT1BXI.

Durante o estudo das frações AT1BXI, AT1BXJ e AT1BXK, observou-se a presença de íons protonados entre m/z 1163 e 1164 e entre m/z 774 e 775. Esse resultado é compatível com o esperado para o peptaibol trichokonina VI.

Além disso, a partir da purificação das frações aquosas selecionadas, obteve-se três compostos puros isolados. Esses foram identificados por meio das técnicas de UPLC-MS e RMN-1D e -2D.

A partir da purificação da fração AT1BXA3, obteve-se o composto identificado como dipeptídeo tirosina-prolina.

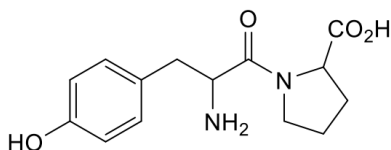


Figura 2. Proposta de estrutura para o composto derivado da fração AT1BXA3 (tirosina-prolina).

A partir da purificação da fração AT1BXC8, obteve-se o composto identificado como o dipeptídeo fenilalanina-prolina.

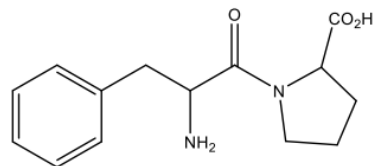


Figura 3. Proposta de estrutura para o composto derivado da fração AT1BXC8 (fenilalanina-prolina).

Por fim, a partir da purificação da fração AT1BXC7, obteve-se o composto identificado como dicetopiperazina ciclo[Pro-Phe].

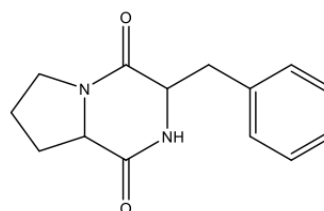


Figura 4. Proposta de estrutura para o composto derivado da fração AT1BXC7 (ciclo[Pro-Phe]).

Conclusões

O subsequente fracionamento por cromatografia em coluna de fase reversa C18 e várias purificações por HPLC-UV levaram à obtenção de três compostos isolados. Pela análise dos espectros de RMN e dos espectros de massa de alta resolução desses compostos, identificou-os como sendo o dipeptídeo tirosil prolina, a dicetopiperazina ciclo[Phe-Pro] e o dipeptídeo linear fenilalanina-prolina.

Além disso, obteve-se sinais m/z compatíveis com o esperado para o peptaibol trichokonina VI nas frações AT1BXI, AT1BXJ e AT1BXK.

Referências

- [1] BERTONHA, A. F. *Isolamento, síntese de análogos e estudo da relação estrutura atividade de metabólitos secundários*. 2018. Tese (Doutorado em Química Orgânica e Biológica) - Instituto de Química de São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2018.