



Isolamento e identificação de um novo metabólito hexapeptídico linear produzido por um *Streptomyces* sp. brasileiro

Elías L. Vargas¹ (PG)*, Anna B. S. Campos¹ (PG), Lucas R. M. Jesus¹ (PG), Marcos Vinícios da Silva¹ (PG), Stefany A. Souza¹ (PG), Tiago Venâncio² (PQ), Antonio G. Ferreira² (PQ), Sérgio S. Thomasi¹ (PQ)

¹ Departamento de Química ICN- Universidade Federal de Lavras (UFLA), Caixa postal 3037. CEP 37203-202, Lavras-MG.

² Departamento de Química-DQ, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), Caixa Postal 1676. CEP 13565-905, São Carlos-SP.

elias.vargas@estudante.ufla.br

RESUMO

Este trabalho relata o isolamento e a caracterização de um novo metabólito hexapeptídico linear com potencial bioativo produzido por um microrganismo marinho (*Streptomyces* sp. SS99BA-2), utilizando técnicas de extração líquido-líquido, cromatografia líquida acoplada a extração em fase sólida (LC-SPE), além de RMN e espectrometria de massas de alta resolução.

Palavras-chave: Microrganismo Marinho, Metabólito secundário, Peptidíio, RMN, HRMS.

Introdução

O estudo da química de produtos naturais provenientes de plantas, animais e microrganismos tem resultado na descoberta de inúmeros compostos orgânicos com aplicações relevantes, incluindo fármacos, pesticidas, antibióticos e antifúngicos. Nesse contexto, o ambiente marinho, que representa mais de 95% da biosfera terrestre, tem se mostrado uma fonte promissora de metabólitos secundários com potencial bioativo. Microrganismos marinhos, em particular, têm despertado crescente interesse por sua capacidade de produzir compostos inéditos e pela facilidade de cultivo e escalonamento em comparação com organismos maiores.

O *Streptomyces* sp. SS99BA-2, isolado de sedimentos marinhos coletados no Canal de São Sebastião (litoral norte do Estado de São Paulo, Brasil), tem se revelado uma fonte valiosa de novos metabólitos. Trabalhos anteriores com essa cepa resultaram na identificação de quatro pirazinonas (1) e dois poliquetídeos fosforilados (2) com estruturas inéditas. Dando continuidade a essa linha de investigação, o presente estudo descreve o isolamento e a caracterização de um novo metabólito hexapeptídico linear produzido por essa mesma cepa, empregando técnicas de extração líquido-líquido, cromatografia líquida acoplada a extração em fase sólida (LC-SPE) e análises espectroscópicas avançadas (RMN e espectrometria de massas de alta resolução).

Experimental

O *Streptomyces* sp. marinho SS99BA-2 foi cultivado em meio GYM (glicose, extrato de malte e extrato de levedura, pH 7,2). A reativação do microrganismo foi realizada em frascos Erlenmeyer contendo meio de reativação, inoculados com culturas preservadas em criotubos. As culturas foram mantidas em agitador a 28 °C por 24 horas, sendo o crescimento visualizado por alterações na turbidez, cor e formação de biofilme. Em seguida, o

cultivo foi escalonado para frascos maiores contendo meio GYM, com volume final de 1000 mL, e incubado por 72 horas. Após o cultivo, o caldo fermentativo foi centrifugado para separação celular, e o sobrenadante foi extraído sequencialmente com acetato de etila (AcOEt) e butanol (BuOH). A evaporação do extrato butanólico gerou 10 mg de material seco.

Uma alíquota de 3 mg do extrato foi dissolvida em 1,5 mL de uma mistura 1:1 de água Milli-Q e metanol, filtrada por membrana PVDF e submetida à análise por HPLC. A separação cromatográfica foi realizada em coluna C18 com fase móvel composta por água e acetonitrila, ambas contendo 0,05% de TFA. A análise por HPLC foi realizada com volume de injeção de 20 µL e fluxo de 1,0 mL/min, monitorando o comprimento de onda de 210 nm (selecionado com base na maior absorção detectada por análise DAD-2D). Utilizou-se como fase móvel o eluente A (água Milli-Q com 0,05% de TFA) e o eluente B (acetonitrila com 0,05% de TFA).

O composto foi retido em cartuchos de extração em fase sólida (SPE), utilizando sistema automático. Após 20 injeções sucessivas, os cartuchos foram secos com fluxo de nitrogênio e o composto eluído com CD₃OD diretamente em tubos de RMN, resultando na obtenção de 200 µg do hexapeptídeo.

As análises foram realizadas utilizando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Agilent 1200 series) acoplado a um trocador automático de cartuchos SPE (Bruker Biospin). As análises espectroscópicas incluíram espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), realizada em espectrômetro Shimadzu IR Prestige-21, e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), utilizando um espectrômetro Bruker Avance III (600 MHz) equipado com crioprobe. A caracterização de massas foi realizada por espectrometria de massas MALDI-TOF, utilizando o equipamento Bruker Autoflex Speed.

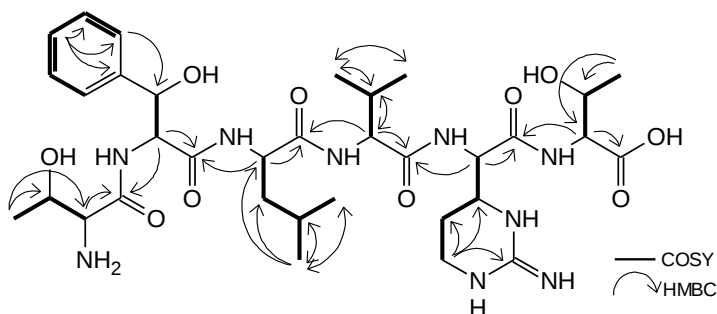


Resultados e Discussão

A identificação do composto majoritário na fração B5GP foi realizada por meio da análise detalhada dos espectros de RMN de ^1H e das correlações bidimensionais gCOSY, gHSQC e gHMBC. Os dados indicaram que trata-se de um hexapeptídeo modificado, uma classe comum de metabólitos secundários produzidos por estreptomicetos, porém com uma estrutura inédita. A espectrometria de massas de alta resolução permitiu determinar a fórmula molecular do composto com base no íon molecular observado. O sinal correspondente ao íon $[\text{M}+\text{H}]^+$ foi detectado em m/z 750,4117, compatível com a massa exata de uma molécula protonada. A partir desse valor, foi atribuída como fórmula molecular mais provável $\text{C}_{34}\text{H}_{56}\text{O}_{10}\text{N}_9$, condizente com a estrutura proposta do hexapeptídeo e com os dados espectroscópicos obtidos por RMN.

Todos os aminoácidos foram elucidados após análise extensiva dos dados de RMN. A identificação da unidade de capreomicidina, por exemplo, na estrutura do hexapeptídeo foi realizada por meio da análise cuidadosa dos deslocamentos químicos e das correlações observadas nos espectros bidimensionais de RMN. Na região de hidrogênios metilênicos, foram detectados dois sinais magneticamente não equivalentes em δ_{H} 1,82–1,91 e 2,05–2,12 ppm, conectados ao mesmo carbono em δ_{C} 23,0 ppm, confirmados por correlações gCOSY. Esses hidrogênios exibiram correlações adicionais com outros hidrogênios metilênicos e metínicos, incluindo um hidrogênio metínico em δ_{H} 4,82–4,87 ppm (δ_{C} 57,0 ppm). Um hidrogênio em δ_{H} 3,33 ppm também apresentou correlação gHMBC com um carbono em δ_{C} 156,3 ppm, cuja deslocamento químico é incompatível com carbonilas típicas de amidas, mas consistente com um grupo guanidínico. Esses dados, alinhados ao conhecimento prévio da biossíntese da capreomicidina como uma ciclização da L-arginina, permitiram atribuir esse resíduo raro e estruturalmente complexo ao hexapeptídeo isolado. A estrutura final proposta é apresentada na Figura 1.

Figura 1. Estrutura do hexapeptídeo identificado bem como suas correlações ^1H - ^1H COSY (em negrito) e principais correlações HMBC para a estrutura proposta.



A conexão exata entre os resíduos aminoacídicos e a ordem em que estão ligados na cadeia peptídica foram confirmadas pela combinação das correlações de longo alcance observadas no espectro HMBC e pela análise complementar de espectrometria de massas de alta resolução. Essas técnicas forneceram evidências robustas da sequência peptídica, consolidando a estrutura completa do novo hexapeptídeo modificado produzido pelo *Streptomyces* sp. SS99BA-2.

Conclusões

Neste trabalho, foi isolado e caracterizado um novo hexapeptídeo linear produzido por *Streptomyces* sp. SS99BA-2, por meio de técnicas de LC-SPE, espectroscopia de RMN e espectrometria de massas. Foram identificados seis resíduos de aminoácidos, incluindo o raro capreomicidina, e a sequência peptídica foi estabelecida por correlações HMBC e dados de massas. A estrutura representa um novo membro da classe dos hexapeptídeos modificados, destacando o potencial de microrganismos marinhos como fonte de novas moléculas bioativas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Federal de Lavras (UFLA) pelo suporte institucional, à Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) pela colaboração acadêmica, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de pós-graduação que viabiliza o desenvolvimento deste trabalho.

Referências

1. Thomasi SS, Granato AC, Romano LH, Dhooghe L, do Nascimento ESP, Badino AC, da Silva MFGF, Ferreira AG, Venâncio T, Natural Product Communications. **2014**, 9 (9), 1275-1278.
2. Thomasi SS, Ladeira C, Ferreira D, Sprenger RF, Badino AC, Ferreira AG, Venâncio T, Helv Chim Acta. **2016**, 99 (3), 281-285.