

**POLICETÍDEOS ISOLADOS DE *Penicillium herquei***

**Andrey Moacir do Rosario Marinho\* e Patrícia Santana Barbosa Marinho**

Faculdade de Química – Universidade Federal do Pará, 66075-970, Belém – PA, Brasil

**Edson Rodrigues Filho**

Departamento de Química – Universidade Federal de São Carlos, 13565-905, São Carlos – SP, Brasil

**Izabel Cristina Piloto Ferreira**

Departamento de Análises Clínicas – Universidade Estadual de Maringá, 87020-900 – Maringá – PR, Brasil

[andrey@ufpa.br](mailto:andrey@ufpa.br)

RESUMO

---

POLICETÍDEOS ISOLADOS DE *Penicillium herquei*. Neste trabalho estamos portando o isolamento dos policetídeos citreoserina (1), emodina (2), janthinona (3), dihidrocitrinona (4) e citrinina H-1 (5). Os compostos foram isolados por procedimentos cromatográficos e identificados por métodos espectrais de RMN 1D e 2D e EM. Os compostos 1, 2 e 3 foram testados sobre promastigotas de *Leishmania brasiliensis*.

Palavras chaves: policetídeos, penicillium, atividade leishmanicida

**INTRODUÇÃO**

A busca de substâncias com atividades biológicas úteis ao homem é um dos campos mais estudados na ciência como um todo, seja em nível acadêmico como até mesmo em indústrias farmacêuticas, agroquímicas, entre outras. Existe sempre a necessidade de se renovar o arsenal de compostos ativos, devido os parasitas adquirir resistência as drogas já existentes no mercado e também devido ao aparecimento de novas doenças.

Os fungos são bons produtores de metabólitos secundários, muitos com atividade biológica útil [1-4]. Os fungos endofíticos geralmente produzem substâncias com alguma atividade biológica, onde estas podem ajudar a planta hospedeira no combate a infestações por outros fungos, vírus e bactérias [5,6]. Por esta razão é de grande importância o estudo das atividades biológicas de substâncias produzidas por fungos endofíticos.

Neste trabalho estamos reportando o isolamento de cinco policetídeos dos extratos de *P. herquei* as antraquinonas citreorseina (1), emodina (2) e janthinona (3), diidrocitrinona (4) e citrinina H-1 (5). Foram ainda realizados ensaios leishmanicidas com as substâncias 1, 2 e 3 frente as formas promastigota de *Leishmania brasiliensis*.

## MATERIAS E MÉTODOS

### *Procedimentos Gerais*

O espectro de IV foi medido em um espectrofotômetro BOMEN MB-102 em pastilha de KBr. Os dados de APCIMS foram adquiridos no modo negativo usando um instrumento MICROMASS QUATTRO-LC equipado com uma fonte de íons ESI/APCI do tipo “Z-spray”. Os experimentos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram obtidos em um espectrômetro BRUKER DRX-400 em  $\text{CDCl}_3$  com TMS como padrão interno.

### *Micro-organismo*

*P. herquei* foi obtido de uma coleção do Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Micro-organismos do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos. Esta coleção contém isolados de *Melia azedarach* [7].

### *Cultura de P. herquei em arroz e isolamento dos policetídeos.*

Quarenta e cinco frascos de Erlenmeyer (500 mL), contendo 90g de arroz ("Uncle Been's") e 75 mL de água destilada por frasco, foram autoclavados por 45 min a 121 °C. Pequenos cubos de meio BDA contendo o micélio de *P. herquei* foram adicionados em 42 frascos de Erlenmeyer sob condição estéril. Três frascos foram utilizados como controle. Após 20 dias de crescimento a 25 °C a biomassa obtida foi macerada com diclorometano, acetato de etila e metanol. Da fase diclorometânica, após sucessivos fracionamentos em coluna cromatográfica de sílica gel eluída com hexano, acetona e metanol, em gradiente de polaridade, foram obtidos os policetídeos citreoroseina (1), emodina (2), janthinona (3), diidricitrinona (4) e citrinina H-1 (5).

#### *Ensaio leishmanicida*

#### *Cultura e manutenção do parasita*

Formas promastigota de *Leishmania viannia braziliensis* MHOM/BR1987/M11272 foram cultivadas a 25 °C em meio Schneider's Drosophila suplementado com 10 % de soro bovino fetal (FCS). Células foram coletadas na fase logarítmica, ressuspensas em meio fresco, contadas em câmara de Neubauer e a concentração ajustada par  $4 \times 10^6$  cel/mL.

#### *Ensaio leishmanicida*

O ensaio foi realizado *in vitro* com as formas promastigotas do parasita. As substâncias foram adicionadas nas culturas de promastigotas com  $4 \times 10^6$  cel/mL nas concentrações de 320 a 0,125 µg/mL solubilizados em DMSO e incubados a 25 °C por 24 h. Após esse período os parasitas sobreviventes foram contados em câmara de Neubauer e comparados com controles, os quais continham somente DMSO. Isetionato de pentamidina (Eurofarma®) foi usado como fármaco controle. O valor da LD50/24 foi determinado pela análise de regressão linear do percentual de inibição com erro estatístico de 10%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *Identificação dos policetídeos*

As substâncias **1**, **2** e **3** foram identificadas por análise dos espectros de RMN 1D e 2D, EM e por comparação com a literatura e mostraram total similaridade para os policetídeos citreoroseina (**1**), emodina (**2**) e janthinona (**3**) [8-10].

A substância **1** foi obtida na forma de cristais vermelhos através de cromatografia em coluna. Seu espectro de RMN  $^1\text{H}$  apresentou sinais para sistema aromático com hidrogênios *meta* relacionados  $\delta$  6,67 (*d*,  $J = 2,0$  Hz) e  $\delta$  7,27 (*d*,  $J = 2,0$  Hz),  $\delta$  7,31 (*sl*) e  $\delta$  7,75 (*sl*), além de um sinal singlete em  $\delta$  4,78 (*s*,  $\text{CH}_2$ ). O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  apresentou 15 sinais, sendo os  $\delta$  182,3 e  $\delta$  191,9 atribuídos as carbonilas C-9 e C-10 de antraquinonas. O espectro de massas ESI (-) apresentou um  $m/z$  285  $[\text{M-H}]^-$ , onde juntamente com os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  pode-se propor a fórmula molecular  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$  para **1**. Através das correlações de HSQC e HMBC foi possível atribuir todos os sinais de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  corretamente. Os dados de **1** são concordantes com os dados descritos na literatura para a citreoroseina [8]. As substâncias **1** e **2** foram identificadas em um trabalho anterior [10].

A substância **4** apresenta um espectro de RMN  $^1\text{H}$  muito parecido com o obtido para citrinina isolada anteriormente por nós [10]. Os dois dubletos para hidrogênios metílicos a  $\delta$  1,25 ( $J = 7,2$  Hz) e 1,33 ( $J = 6,7$  Hz), juntamente com o singlete a  $\delta$  2,06, e os dois quadrupletos em  $\delta$  3,04 ( $J = 7,2$  Hz) e 4,73 ( $J = 6,7$  Hz) são as principais características vistas no espectro. No entanto, o sinal em  $\delta$  8,25 referente a H-1 da citrinina (**6**) não está presente neste espectro. Com auxílio dos dados de espectrometria de massas obtidos por ESI-MS/MS no modo negativo ( $[\text{M-H}]^-$  a  $m/z$  265), e comparação com os dados relatados na literatura, concluiu-se que esse policetídeo é a diidrocitrinona (**4**) [11,12].

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **S-5** foram observados quatro sinais referentes a dubletos de metila em  $\delta$  1,23 (*d*,  $J = 6,3$  Hz),  $\delta$  1,30 (*d*,  $J = 7,2$  Hz),  $\delta$  1,31 (*d*,  $J = 6,9$  Hz) e  $\delta$  1,37 (*d*,  $J = 6,2$  Hz). Também foram observados dois sinais singletos em  $\delta$  2,11 e  $\delta$  2,14. Além dos sinais

referentes as metilas observaram-se ainda os sinais  $\delta$  2,94 (*dq*,  $J = 7,3$  e  $4,5$  Hz),  $\delta$  3,19 (*dq*,  $J = 10,1$  e  $7,2$  Hz),  $\delta$  4,00 (*dq*,  $J = 6,3$  e  $4,5$  Hz),  $\delta$  5,25 (*s*),  $\delta$  5,45 (*dq*,  $J = 10,1$  e  $6,2$  Hz),  $\delta$  6,59 (*s*) e  $\delta$  7,94 (*s*). A comparação destes dados do espectro de massas APcI (-)  $m/z$  425 [M-H]<sup>-</sup> com observados no RMN <sup>13</sup>C que apresentou sinais para 24 carbonos e alguns sinais com valores de deslocamento químico semelhantes para citrinina como  $\delta$  80,5 (C-3 da citrinina),  $\delta$  162,9 (valor próximo ao de C-1 da citrinina) e  $\delta$  185,7 (semelhante a carbonila C-6 da citrinina) nos levou a concluir que **S-5** viesse a ser um dímero da citrinina. As correlações observadas no HMBC de H-1 com os carbonos C-4', C-5' e C-6' foram fundamentais para localizar o ponto de junção entre as duas unidades de citrinina, bem como a correlação observada no espectro de HMBC entre o hidrogênio a  $\delta$  7,94 (*s*, H-12') e o carbono a  $\delta$  73,2 (C-9'), estabelecendo a posição do grupo formiato no policetídeo, foram determinantes para identificação do policetídeo como citrinina H-1. Uma análise comparativa dos dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C com aqueles registrados na literatura ratificou essa proposta estrutural [13].

### *Ensaio leishmanicida*

As substâncias foram adicionadas a culturas de promastigota de *L. brasiliensis* a 25°C e os resultados obtidos após 24h foram comparados ao controle.

A substância **2** inibiu 50% dos parasitas a uma concentração de 320  $\mu\text{g/mL}$ , mostrando um resultado promissor. Já as substâncias **1** e **3** inibiram cerca de 20% e 22% dos parasitas a uma concentração de 320  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Parece que a hidroxilação da metila reduziu a atividade da substância **1** em mais de 50%. Os resultados obtidos nos ensaios leishmanicidas com as substâncias **1**, **2** e **3** nos levam a sugerir que para a ocorrência de atividade as posições C-3 e C-6 devem estar uma oxidada e a outra reduzida, pois quando ambas as posições estão oxidadas ou reduzidas há um decréscimo significativo na atividade apresentada.

## CONCLUSÃO

As substâncias isoladas de *P. herquei* são pertencentes à classe dos policetídeos e estão de acordo com a rota biossintética do acetato que é a preferida pelos fungos. A substância **2** apresentou atividade leishmanicida moderado, já as substâncias **1** e **3** perderam metade da atividade quando comparadas a **1** demonstrando uma possível relação estrutura-atividade.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

## REFERÊNCIAS

- [1] Petrini, O.; Sieber, T. N.; Toti, L. & Viret, O. *Naturl Toxis*. 1 (1992), 185.
- [2] Jarvis, B. B. & Miller, J. D. “Natural Products, Complexity and Evolution” IN: *Phytochemical Diversity and Redundancy in Ecological Interacions*. Romeo et al. New York, Plenum Press. (1996), 265.
- [3] Li, J. Y.; Sidhu, R. S.; Ford, E.; Hess, W. M.; Strobel, G. A. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 20 (1998), 259.
- [4] Stierle, A.; Strobel, G.; Stierle, D.; Grothaus, P. And Bignami, G. *J. Nat. Prod.* 58(9) (1995), 1315.
- [5] Rizzo, I.; Varsavky, M.; Haidukowski, M.; Frade, H.; *Toxicon*. 35(5) (1997), 753.

- [6] Huang, E. X.; Huang, T. L.; Wildung, M. R.; Croteau, R., Scott, A. I.; *Prot. Expr. Pur.* 13 (1998), 90.
- [7] Santos, R. M. G.; Rodrigues-Fo, E.; Rocha, W. C.; Teixeira, M. F. S.; *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19 (2003), 767.
- [8] Fujimoto, H.; Nakamura, E.; Okuyama, E.; Ishibashi, M.; *Chem. Pharm. Bull.* 52(8) (2004), 1005.
- [9] Cohen, P. A. & Towers, G. H. N. *Phytochemistry.* 40(3) (1995), 911.
- [10] Marinho, A. M. do R.; Rodrigues-Fo, E.; Santos, L. S.; Moitinho, M. L. R.; *J. Braz. Chem. Soc.* 16(2) (2005), 280.
- [11] Petterson, M. F.; Damoglou, A. P.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26 (1987), 574.
- [12] Dunn, B. B.; Stack, M. E.; Park, D. L.; Joshi, A.; *Environmental Helth.* 12(2&3) (1983), 283.
- [13] Trevedi, A. B.; Hirota, M.; Dóí, E.; Kitabatake, N.; *J. Chem. Soc. PT1* (1993), 2167.

## ABSTRACT

---

POLYKETIDES ISOLATED FROM *Penicillium herquei*. In this work we are reporting the isolation of polyketides citreoserine (1), emodin (2), janthinone (3), dihydrocitrinone (4) and citrinin H-1 (5). The compounds were isolated by chromatographic procedures and identified by spectral methods of NMR 1D and 2D and MS. The compounds 1, 2 and 3 were tested against promastigotes of *Leishmania brasiliensis*.

Key Words: polyketides, *penicillium*, leishmanidal activity.

