

**DIVERSIDADE DE POLICETÍDEOS PRODUZIDOS POR ESPÉCIES DE *Penicillium* ISOLADAS DE *Melia azedarach* E *Murraya paniculata***

**Renata Pastre, Andrey M. R. Marinho e Edson Rodrigues-Filho\***

Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, CP 676, 13565-905 São Carlos – SP, Brasil

**Antônia Q. L. Souza e José Odair Pereira**

Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, CP 676, 13565-905 São Carlos – SP, Brasil

Recebido em 25/9/06; aceito em 23/5/07; publicado na web em 9/11/07

DIVERSITY OF POLYKETIDES PRODUCED BY *Penicillium* SPECIES ISOLATED FROM *Melia azedarach* AND *Murraya paniculata*. Eight compounds comprising four groups of polyketides, the xanthone fusarindin, the mixed peptide alkaloid-polyketide GKK1032, the anthraquinones crisophanol, citreoveridin and janthinone, and the azaphylones dihydrocitrinone, citrinin and citrinin H-1, were identified in *Penicillium* species isolated as endophytic fungi from *Melia azedarach* and *Murraya paniculata*. The antibacterial activity of the azaphylones was tested and showed that citrinin H-1 is more active than citrinin.

Keywords: polyketide, endophytic fungus; *Penicillium*.

## INTRODUÇÃO

Os policetídeos de origem fúngica constituem uma grande classe de metabólitos secundários, apresentando uma das maiores diversidades estruturais entre os produtos naturais<sup>1</sup>. A maioria desses compostos é ativa em diversos sistemas biológicos<sup>2</sup>. Portanto, a busca de policetídeos em microorganismos vem sendo apontada como uma boa estratégia para pesquisas de substâncias bioativas.

Os policetídeos são biossintetizados por um conjunto de enzimas usualmente denominadas de “policetídeo sintases” (ou PKS, “Polyketide Synthase”). Segundo Hertweck<sup>2</sup>, as enzimas, cetosintase (KS), aciltransferase (AT), proteína carregadora de grupo ácido (ACP), cetoreductase (KR) e desidratase (DH) devem fazer parte do conjunto PKS. A ação dessas enzimas em conjunto ou uma expressão diferenciada de alguma delas deve resultar em diferentes classes de policetídeos. Dada a grande importância dos policetídeos, esforços vêm sendo feitos para se conseguir a expressão controlada dos genes que codificam as enzimas PKS<sup>2</sup>. Na natureza, a expressão dos genes PKS é dependente de uma série de fatores ainda pouco conhecidos. Conforme a atuação do conjunto das enzimas PKS durante a biossíntese, os policetídeos podem ser compostos aromáticos poli-hidroxilados (como a maioria dos pigmentos fúngicos), compostos alifáticos pouco oxigenados (ou policetídeos parcialmente reduzidos, como a lovastatina) e alifáticos altamente reduzidos (e.g. ácidos graxos)<sup>3,4</sup>. O entendimento de como esses fatores de expressão gênica atuam é um grande desafio. A busca por policetídeos em cepas fúngicas selvagens pode auxiliar nesses estudos, além de apontar novas fontes para compostos de reconhecida importância pelas atividades biológicas.

Em trabalhos anteriores relacionados ao estudo do metabolismo secundário de microorganismos endofíticos isolados de *Melia azedarach*, foram isolados vários policetídeos bioativos do fungo *Penicillium janthinellum*<sup>5</sup>. Um desses compostos, a citrinina, mostrou importante atividade inibitória de crescimento de *Leishmania mexicana*, e outros compostos mostraram significativos efeitos inibidores do crescimento de bactérias. Na busca por uma maior diversidade estrutural desses compostos em fungos, está sendo re-

latada agora a identificação dos policetídeos emodina (1), citreoseína (2), janthinona (3), diidrocitrinona (4) e citrinina H-1 (6) produzidos por *P. herquei*, isolados de *M. azedarach*, citrinina (5), e fusarindina (7), e GKK1032 (8), produzidos por dois isolados de *Penicillium* encontrados em *Murraya paniculata*. Uma comparação do efeito antibiótico entre citrinina (5) e citrinina H-1 (6), mostrou que a última é um forte bactericida para *Escherichia coli*.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Procedimentos experimentais gerais

Os dados de espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (1D e 2D) foram obtidos em um espectrômetro Bruker DRX400 operando a 400 MHz para o núcleo de <sup>1</sup>H e em 100 MHz para o núcleo de <sup>13</sup>C; Acetona-d<sub>6</sub> ou CDCl<sub>3</sub> foram usados como solvente e TMS como referência interna. Os espectros de massas foram obtidos usando um espectrômetro de massas de baixa resolução da Waters - Modelo QuattroLC, com ionização por electrospray. As separações cromatográficas por CLAE em escala analítica foram realizadas em equipamento Shimadzu (bombas LC10Ad) conectado a um detector de arranjos de diodos (Sil10Ad), utilizando coluna analítica Phenomenex Sinergy (250 x 4,60 mm; 5 μm). Nas separações cromatográficas em escala preparativa foram usadas colunas abertas sob pressão atmosférica empacotadas com sílica gel (45 – 60 μm) e Sephadex LH-20 (Merck). Os espectros de absorção no UV foram obtidos em solução (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) usando um aparelho da Hewlett Packard (modelo 8452-A); os espectros de absorção no infravermelho foram obtidos em um aparelho Bomen modelo MB-102 em pastilhas de KBr.

### Material vegetal e cepas fúngicas

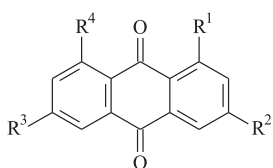
O fungo *P. herquei*, isolado de *Melia azedarach*, bem como as duas cepas de *Penicillium* [*Penicillium* sp(a) e *Penicillium* sp(b)] isoladas de *Murraya paniculata*, foram obtidas da coleção do Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microorganismos (LaBioMMi) do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). As plantas *Melia azedarach* e *Murraya*

\*e-mail: edson@dq.ufscar.br

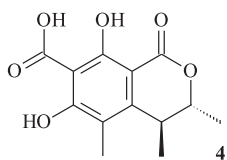
*paniculata* foram coletadas no campus da UFSCar. As amostras (folhas, caule e frutos) foram submetidas aos procedimentos de isolamento dos microorganismos endofíticos imediatamente após a coleta. Santos<sup>6</sup> e Souza<sup>7</sup> descreveram detalhadamente os procedimentos experimentais envolvidos na obtenção e identificação dos fungos.

### Cultivo dos microrganismos e isolamento dos policetídeos

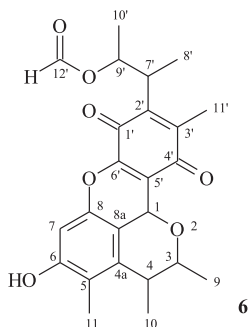
45 frascos de erlenmeyer (500 mL), contendo 90 g de arroz (Uncle's beans) e 75 mL de água destilada por frasco, foram autoclavados duas vezes consecutivas a 121 °C por 40 min. Pequenos discos de meio BDA em placa de Petri contendo micélios dos *Penicillium* foram transferidos sob condições estéreis para 42 frascos de erlenmeyer contendo milho esterilizado. Três frascos foram mantidos como controle. Depois de 20 dias de crescimento a 25 °C, metanol (200 mL) foi adicionado a cada frasco e deixado sob repouso por 5 h e, então, filtrados sob gravidade. O metanol foi evaporado sob pressão reduzida, produzindo um resíduo amarelo (17,5 g). Parte desse resíduo (8,0 g), foi submetido à separação cromatográfica em coluna empacotada com sílica gel e eluída de forma gradiente com *n*-hexano, acetato de etila e metanol. As frações de polaridade média foram recromatografadas em colunas de sílica [*n*-hexano:acetato de etila:metanol (60:35:05), isocrático] e cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) [clorofórmio:metanol (96:04)]. Dessas frações foram isolados os policetídeos emodina (**1**) (32,1 mg), citreoseina (**2**) (2,8 mg), janthinona (**3**) (5,3 mg), diidrocitrinona (**4**) (9,3 mg) e citrinina H-1 (**6**) (23,2 mg) produzidos *P. herquei*, e fusarindina (**7**) (2,2 mg), citrinina (**5**) (93,2 mg) e GKK1032 (**8**) (19,3 mg) produzidos por *Penicillium* sp, encontrado em *M. paniculata*.



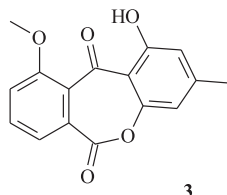
- 1: R<sup>1</sup> = R<sup>3</sup> = R<sup>4</sup> = OH; R<sup>2</sup> = CH<sub>3</sub>  
 2: R<sup>1</sup> = R<sup>3</sup> = R<sup>4</sup> = OH; R<sup>2</sup> = CH<sub>2</sub>OH



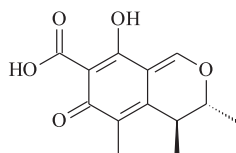
4



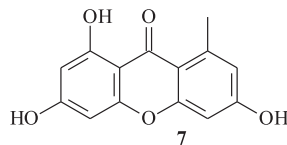
6



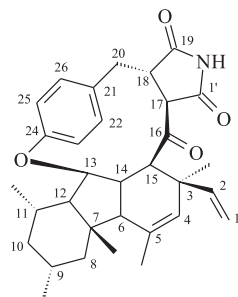
3



5



7



8

### Análises por CLAE

Alíquotas dos extratos brutos obtidos conforme descrito foram submetidos à extração ácido/base para análise de policetídeos ácidos. A uma suspensão contendo cerca de 100 mg de cada extrato foram adicionados 2,0 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio 1,0 mol L<sup>-1</sup>. Essa solução alcalina foi lavada com 2,0 mL de clorofórmio. A fase aquosa alcalina foi separada, acidificada com ácido clorídrico 1,0 mol L<sup>-1</sup> e extraída com 1,0 mL de acetato de etila. A solução acetofílica, a qual apresentou coloração amarelo-avermelhada, foi evaporada, redissolvida em metanol/acetoneitrila (1:1) e analisada por CLAE. O solvente acetoneitrila, utilizado nas análises por CLAE, foi filtrado em membrana de nylon (0,45 μm), enquanto a água utilizada foi purificada em um aparelho Millipore Milli-Q; ambos foram posteriormente imersos em banho em ultra-som por 30 min. Foi utilizada eluição gradiente de acetoneitrila (B) e água (A), em 50 min, iniciando a 40% do solvente B até 100%, aguardando-se um tempo de 20 min entre cada injeção para a estabilização da coluna. Todas as análises foram feitas utilizando-se um fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, injeção de 50 μL de amostra.

### Ensaio de inibição de bactérias

As suscetibilidades de microorganismos aos policetídeos foram determinadas pelo método de diluições sucessivas em caldo, conforme recomendado pelo "Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing" do "US National Committee for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS)<sup>8</sup>. O bioensaio foi realizado em placas de 96 poços com 100 μL de caldo Mueller Hinton (MHB), 100 μL de solução de composto teste e 5 μL de suspensão da bactéria teste a 1.0 x 10<sup>7</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, seguido por incubação a 37 °C (24 h). As substâncias teste obtidas das culturas dos fungos foram dissolvidas em dimetilsulfóxido a uma concentração inicial de 500 μg mL<sup>-1</sup>. Os microorganismos testados foram *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis* (obtidos da Universidade Estadual de Maringá - PR, Brasil). A bioatividade foi registrada como ausência de coloração nos poços depois da adição de 10 μL de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (2,0%). Os microorganismos testados foram subcultivados em meio MHB. As atividades dos compostos testados foram classificadas como bacteriostática ou bactericida, de acordo com o comportamento do microorganismo na subcultura. Penicilina, vancomicina e tetraciclina (25 μg mL<sup>-1</sup> cada um) foram usados como controle positivos; o cultivo em meio MHB, sem aditivos, foi usado como controle negativo.

*Diidrocitrinona* (**4**), sólido amarelo amorfo, RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, Acetona-d<sub>6</sub>): δ 1,25 (d, *J* 7,2 Hz, H-10), 1,33 (d, *J* 6,7 Hz, H-9), 2,06 (s, CH<sub>3</sub>-11), 3,04 (q, *J* 7,1 Hz, H-4), 4,73 (q, *J* 6,6 Hz, H-3), ESIMS (Full scan): *m/z* 265 ([M-H]<sup>-</sup>, 100%).

*Citrinina H-1* (**6**), sólido vermelho, UV λ<sub>max</sub>/nm (EtOH): 271, 322 e 423; IV ν<sub>max</sub>/cm<sup>-1</sup>: 3404, 2971, 2928, 1716, 1653, 1638, 1595, 1259, 1186, 1133 and 1112 (KBr), RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) e <sup>13</sup>C (100 MHz) em Acetona-d<sub>6</sub>: Tabela 1, APCI-MS/MS (15 eV): *m/z* 425 ([M-H]<sup>-</sup>, 28%), 381 (18), 335 (100); (APCI-MS/MS (20 eV): *m/z* 335 (100%), 320 (77), 305 (42), 253 (15).

*Fusarindina* (**7**), sólido alaranjado, RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, Acetona-d<sub>6</sub>): δ 2,77 (s, CH<sub>3</sub>-10), 6,45 (d, *J* 2,0 Hz, H-5), 6,70 (d, *J* 2,6 Hz, H-4), 6,79 (d, *J* 2,6 Hz, H-2), 7,35 (d, *J* 2,0 Hz, H-7); ESIMS (Full scan): *m/z* 257 ([M-H]<sup>-</sup>, 100%).

*GKK1032* (**8**), sólido branco amorfo; UV λ<sub>max</sub>/nm (EtOH): 204, 229,

269;  $\text{IV } \nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$ : 3404, 2971, 2928, 1716, 1653, 1638, 1595, 1259, 1186, 1133 and 1112 (KBr); RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) em  $\text{CDCl}_3$ ; Tabela 1; ESI-MS/MS (30 eV):  $m/z$  500 ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ ; 65%), 394(100), 323 (28).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

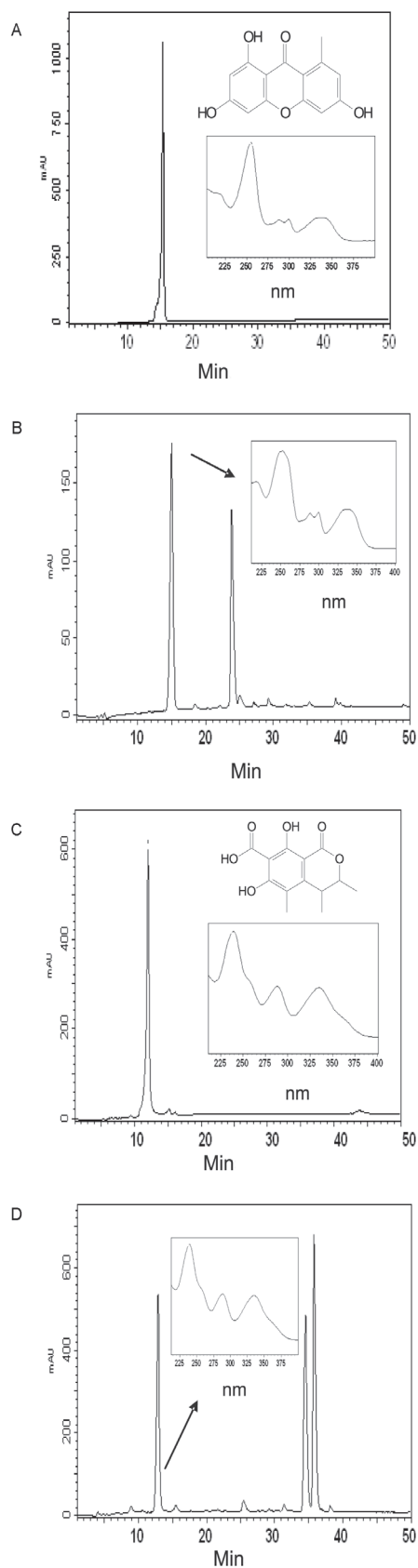
Neste trabalho, relatamos estudos químicos de cepas fúngicas isoladas de folhas de *Murraya paniculata* e *Melia azedarach*. As cepas isoladas de *M. paniculata* apresentaram caracteres morfológicos visivelmente distintos e, embora não se tenha uma conclusão definitiva da identificação das espécies, são espécies diferentes. Nenhuma das duas plantas é muito boa produtora de policetídeos. Os constituintes principais descritos para *M. azedarach* são terpenoídicos<sup>9</sup>, com destaque para os limonóides, os quais são importantes inseticidas naturais. Por sua vez, *Murraya paniculata*, espécie introduzida no Brasil para ornamentação de vias públicas, é boa produtora de flavonóides e cumarinas<sup>9</sup>.

Em outros trabalhos, foi constatado que microorganismos isolados de *M. azedarach* produzem policetídeos quando cultivados em milho e arroz como substratos<sup>5</sup>. Assim, as espécies de *Penicillium* escolhidas para este estudo foram cultivadas em arroz autoclavado. Após uma extração dirigida para a obtenção dos compostos ácidos e fenólicos (extração ácido/base) e análise comparativa dos extratos, usando CLAE, foi observado que os fungos produzem uma série de policetídeos. Dois cromatogramas típicos são mostrados na Figura 1. Uma amostra padrão de fusarindina (**7**) produz um pico intenso, cujo espectro de absorção no UV apresenta máximos de absorção a 235, 250, 288, 298 e 345 nm. Uma substância com idêntico comportamento cromatográfico é detectada também em um dos extratos. Por sua vez, citrinina (**5**), cujos máximos de absorção ocorrem em 245, 280 e 330 nm, é prontamente identificada no extrato. Usando essa estratégia, vários compostos puderam ser rapidamente identificados nos extratos fúngicos.

Os extratos brutos obtidos foram submetidos a procedimentos cromatográficos de separação usando uma combinação de cromatografia em coluna e em camada delgada. Por esses procedimentos, os compostos **1-8** foram isolados e identificados usando outros dados físicos como IV, EM e RMN. Uma descrição da identificação dos compostos **1-3** e **5** foi feita em um trabalho prévio<sup>5</sup>.

A substância **4** apresenta um espectro de RMN  $^1\text{H}$  muito parecido com o obtido para citrinina (**5**). 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 quadretos 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 a c.a.  $\delta$  8,25 referente a H-1 da citrinina (**5**) não está presente neste espectro. Com auxílio dos dados de espectrometria de massas obtidos por ESI-MS/MS no modo negativo ( $[\text{M}-\text{H}]^-$  a  $m/z$  265), e comparação com os dados relatados na literatura, concluiu-se que esse policetídeo é a diidroctitrinona (**4**)<sup>10,11</sup>.

A metilxantona **7**, foi detectada por CLAE nos extratos obtidos de uma cepa de *Penicillium* (spA) isolada de *M. paniculata*. A presença de quatro sinais para hidrogênios aromáticos formando dois sistemas de spins, os dois em posições relativas *meta* em dois anéis aromáticos diferentes [ $\delta$  7,35 e 6,79 ( $J = 2,6$  Hz);  $\delta$  6,70 e 6,45 ( $J = 2,0$  Hz)], bem como o sinal dos hidrogênios metílicos benzílicos a  $\delta$  2,77 (s), indicaram rapidamente a presença de um núcleo xantônico. Essa substância tem uma massa molecular de 258 Da, conforme determinado por espectrometria de massas ( $[\text{M}-\text{H}]^-$  a  $m/z$  257). Uma busca na literatura revelou que essa xantona foi isolada de *Penicillium patulum*<sup>12</sup> e seus dados de RMN  $^{13}\text{C}$  são idênticos aos descritos por Sundholm<sup>13</sup>.



**Figura 1.** Ilustração de uma das estratégias usadas para a identificação dos policetídeos: A) cromatograma e espectro de absorção no UV para a xantona; B) detecção da xantona em extratos de *Penicillium* sp; C) cromatograma de uma amostra padrão de citrinina; D) detecção da citrinina em extratos de *Penicillium herquei*

Uma substância apresentando espectro de absorção parecido com aquele observado para citrinina (**5**) (Figura 1), mas com um tempo de retenção bem maior quando analisada por CLAE, foi isolada dos extratos de *Penicillium herquei*. Sua massa molecular (426 Da), determinada após a interpretação do espectro de massas por electrospray ([M-H]<sup>+</sup> a *m/z* 425), com auxílio dos dados de RMN (onde foram contados os números de núcleos de carbono e hidrogênio presentes na molécula), permitiu supor C<sub>24</sub>H<sub>26</sub>O<sub>7</sub> como uma possível fórmula molecular para **6**. Uma busca no *Chemical Abstracts* revelou a citrinina H-1 como provável estrutura para esse policetídeo. Uma análise comparativa dos dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (Tabela 1) com aqueles registrados na literatura<sup>14</sup> ratificou essa proposta estrutural. Os sinais referentes aos hidrogênios metílicos em δ 1,23 (H-9, d, *J* = 6,3 Hz com H-3 a δ 4,00), 1,30 (H-10, d, *J* = 7,2 Hz com H-4 a δ 2,94), 1,31 (H-8', d, *J* = 6,9 com H-7' a δ 3,19) e 1,37 (H-10', d, *J* = 6,2 Hz com H-9' a δ 5,45), quando comparados com os relatados na literatura, bem como a correlação observada no espectro de gHMBC entre o hidrogênio a δ 7,94 (s, H-12') e o carbono a δ 73,2 (C-9'), estabelecendo a posição do grupo formiato no policetídeo, foram determinantes para identificação do policetídeo como citrinina H-1. A citrinina H-1 é relatada na literatura como um produto de dimerização da citrinina (**5**) quando ela é aquecida em metanol acima de 100 °C<sup>14-16</sup>. No entanto, no presente trabalho, os extratos foram obtidos por evaporação do

solvente sob pressão reduzida a 45 °C. Se a substância **6** é um artefato oriundo de **5**, o processo de dimerização deve ter sido outro diferente daquele observado por Hirota<sup>15</sup>.

A substância **8** foi detectada nas análises por CLAE, porém mostrou um espectro de absorção no UV bastante diferenciado dos demais policetídeos, apresentando máximos de absorção em comprimentos de onda curtos (269 nm). Seu espectro de RMN <sup>13</sup>C apresentou trinta e dois sinais sendo dez deles típicos de carbonos hibridizados na forma sp<sup>2</sup>, envolvidos em duplas ligações carbono-carbono, e três carbonílicos. No espectro de RMN <sup>1</sup>H, com o auxílio do mapa de contornos obtidos via gHSQC, contam-se claramente, através da integração dos sinais, trinta e oito núcleos de hidrogênio. Um hidrogênio adicional, ligado a heteroátomo, conforme observado pela absorção na região do infravermelho a 3404 cm<sup>-1</sup>, foi considerado na fórmula molecular. A análise cuidadosa desses dados, avaliando os deslocamentos químicos dos núcleos de <sup>13</sup>C no espectro de RMN, juntamente com a interpretação do espectro de massas obtido por electrospray no modo negativo ([M-H]<sup>-</sup> a *m/z* 500) permitiu sugerir a fórmula molecular C<sub>32</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>4</sub> (501 Da) para essa substância. Uma busca no *Chemical Abstracts* para substâncias com essa fórmula retornou inúmeras sugestões estruturais, entre as quais a estrutura **8** que foi a que se mostrou compatível com os dados físicos obtidos, principalmente os dados de RMN (Tabela 1). Essa substância foi isolada de uma espécie de

**Tabela 1.** Dados de RMN <sup>1</sup>H\* (400 MHz) e <sup>13</sup>C (100 MHz) de citrinina H-1 (**6**) e GKK1032 (**8**) em acetona-d<sub>6</sub> e CDCl<sub>3</sub>, respectivamente; δ (ppm)

<b>6</b>			<b>8</b>		
Posição	δ <sup>1</sup> H	δ <sup>13</sup> C	Posição	δ <sup>1</sup> H	δ <sup>13</sup> C
<b>1</b>	5,25 (s)	62,2	<b>1</b>	4,65 (dd, 1,24; 17,6) 4,74 (dd, 1,24; 10,8)	113,9
<b>3</b>	4,00 (qd, 6,3; 1,0)	80,5	<b>2</b>	5,21 (dd, 10,8; 17,6)	145,2
<b>4</b>	2,94 (qd, 7,2; 1,0)	38,6	<b>3</b>		41,7
<b>4a</b>		141,4	<b>4</b>	5,07 (m)	131,7
<b>5</b>		120,9	<b>5</b>		138,5
<b>6</b>		157,0	<b>6</b>	1,95 (m)	53,9
<b>7</b>	6,59 (s)	100,5	<b>7</b>		41,1
<b>8</b>		145,7	<b>8</b>	0,79 (t, 12,1)1,95 (m)	49,3
<b>8a</b>		111,9	<b>9</b>	1,82 (m)	27,8
<b>9</b>	1,23 (d, 6,3)	22,9	<b>10</b>	0,63 (q, 12,7)1,82 (m)	45,1
<b>10</b>	1,30 (d, 7,2)	21,4	<b>11</b>	1,95 (m)	27,1
<b>11</b>	2,14 (s)	10,8	<b>12</b>	1,01 (dd, 6,9; 11,1)	61,3
<b>1'</b>		180,7	<b>13</b>	4,20 (dd, 3,4; 6,9)	93,0
<b>2'</b>		143,2	<b>14</b>	2,18 (ddd, 3,4; 9,7; 12,2)	55,3
<b>3'</b>		143,9	<b>15</b>	3,05 (d, 9,7)	61,4
<b>4'</b>		185,7	<b>16</b>		200,7
<b>5'</b>		116,1	<b>17</b>	2,78 (d, 5,2)	60,2
<b>6'</b>		149,9	<b>18</b>	3,81 (ddd, 5,2; 8,3; 11,2)	43,4
<b>7'</b>	3,19 (qd, 7,1)	41,2	<b>19</b>		176,6
<b>8'</b>	1,31 (d, 7,1)	15,6	<b>20</b>	2,40 (dd, 11,2; 12,7) 3,66 (dd, 8,3, 12,7)	34,7
<b>9'</b>	5,45 (qd, 7,1)	73,2	<b>21</b>		133,9
<b>10'</b>	1,37 (d, 7,1)	19,2	<b>22</b>	7,21 (dd, 2,0; 8,3)	131,9
<b>11'</b>	2,11 (s)	12,2	<b>23</b>	6,70 (dd, 2,5; 8,3)	126,7
<b>12'</b>	7,94 (s)	161,3	<b>24</b>		159,6
			<b>25</b>	7,03 (dd, 2,5; 8,5)	120,6
			<b>26</b>	6,94 (dd, 2,0; 8,5)	133,4
			<b>1'</b>		170,0
			<b>3-Me</b>	1,17 (s)	19,7
			<b>5-Me</b>	1,89 (s)	20,4
			<b>7-Me</b>	1,17 (s)	24,9
			<b>9-Me</b>	0,90 (d, 6,2)	22,7
			<b>11-Me</b>	1,16 (d, 5,6)	16,3

\*Multiplicidades e constantes de acoplamento (*J*), em Hz, entre parênteses.



**Tabela 2.** Crescimento de bactérias na presença de diferentes concentrações de policetídeos produzidos por *Penicillium herquei*

C ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Substância teste					
	Citrinina	Citrinina H-1	Citrinina	Citrinina H-1	Citrinina	Citrinina H-1
500,00	=	=	=	=	-	=
250,00	+	=	=	-	-	=
125,00	+	=	=	-	-	=
62,50	+	=	-	-	-	-
31,25	+	=	+	+	-	+
15,63	+	=	+	+	+	+
7,81	+	+	+	+	+	+

Bactéria	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>
----------	----------------	----------------------	--------------------

“+” : Crescimento igual ao controle; “-” : efeito bacteriostático (cresce em subcultura); “=” : efeito bactericida (não cresce em subcultura).

*Penicillium*, de origem não informada, e foi denominada GKK1032<sup>17</sup>. Sua origem biossintética foi elucidada recentemente<sup>18</sup>, revelando que GKK1032 é formada a partir do aminoácido tirosina, condensada com uma cadeia policetílica e alquilada com metionina. A unidade oriunda da tirosina é incorporada formando um sistema aromático *para*-dissubstituído. No entanto, os dados de RMN (Tabela 1) mostram que esse sistema é atípico em GKK1032. Em geral, hidrogênios em uma estrutura parcial deste tipo formam um sistema de spins do tipo *aa'bb'*. No entanto, neste policetídeo os hidrogênios são observados formando dois sistemas AX, com os quatro sinais bastante visíveis no espectro de RMN <sup>1</sup>H, assim como os seis átomos de carbono do anel aromático são detectados em sinais individuais no espectro de RMN <sup>13</sup>C (Tabela 1). Isso é justificado pelo fato de que o anel aromático faz parte de um ciclo de nove membros, com rotação restrita em torno das ligações benzílicas. Os demais sinais de RMN descritos na Tabela 1 para **8** estão de acordo com o relatado para GKK1032.

Os policetídeos **1-8** são todos biologicamente ativos. Entre outras atividades, os compostos **1, 2, 3, 4, 6 e 7** são antibióticos. Citrinina (**5**) é uma micotoxina bastante tóxica aos seres humanos e é considerada um dos grandes contaminantes de origem biológica em alimentos, principalmente em cereais<sup>19</sup>. Embora essa substância tenha boas propriedades antibióticas, uma série de estudos vem sendo feita visando a diminuição da sua toxicidade. Citrinina H-1 (**6**) é considerada um produto menos tóxico da citrinina (**5**)<sup>15</sup>. No entanto, sua ação antibiótica ainda não foi avaliada. No presente estudo, as substâncias **5 e 6** foram testadas frente a três bactérias (*Escherichia coli*, *Pseudomonas auruginosa* e *Bacillus subtilis*). Conforme mostra a Tabela 2, para *E. coli* a citrinina H-1 (**6**) é bactericida até a concentração de 15,63  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Para as outras bactérias, sua atividade é comparável àquela apresentada pela citrinina (**5**).

O policetídeo **8** é um dos compostos conhecidos por apresentar atividade biológica mista antibiótica-anticâncer<sup>18</sup>. Embora o processo de obtenção esteja patentado, sua síntese *in vitro* vem sendo tentada<sup>20</sup> devido ao baixo rendimento na produção pela cepa de *Penicillium* usada. Por isso, novas fontes dessa substância devem ser investigadas.

## CONCLUSÕES

As análises cromatográficas e o isolamento e identificação dos compostos produzidos pelas cepas de *Penicillium* estudadas mostraram que esses fungos produzem uma grande diversidade de policetídeos. Os compostos **1, 2 e 3** são antraquinonas, embora **3** seja diferenciado por uma lactonização; os compostos **4-6** são azafilonas e o composto **7** é uma xantona. Os compostos **1-7** são policetídeos que não sofreram a ação de enzimas redutoras. Já a produção de **8** foi

acompanhada da expressão da enzima cetoreductase (KR).

A produção desses policetídeos aparentemente não é discriminada pela origem da cepa, uma vez que os policetídeos antraquinônicos e as azafilonas são produzidos pelas três cepas de *Penicillium* estudadas. Uma análise mais detalhada, usando uma técnica de detecção mais sensível como a espectrometria de massas, deve ser empregada na pesquisa de policetídeos do tipo **8** nas demais cepas.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo suporte financeiro e bolsas de estudo.

## REFERÊNCIAS

- Hertweck, C.; Schuman, J.; *J. Biotech.* **2006**, *124*, 690.
- Weissman, K. J.; *Philos. Transact A Math Phys Eng Sci* **2004**, *362*, 2671.
- Kealey, J. T.; *Front. Biosci.* **2003**, *8c*, 1.
- Mann, J.; *Chemical Aspects of Biosynthesis*, 1<sup>st</sup>. ed.; Oxford University Press Inc., 1994.
- Marinho, A. M. R.; Rodrigues-Filho, E.; Moitinho, M. L. R.; Santos, L. S.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, *16*, 280.
- Santos, R. M. G.; Rodrigues-Filho, E.; Rocha, W. C.; Teixeira, M. F. S.; *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **2003**, *19*, 767.
- Souza, A. Q. L.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 2006.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards; *Methods for dilution and antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*, NCCLS Approved Standard M7-A4. Wayne, P. A., 1997.
- Waterman, P. G.; Grundon, M. F.; *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales*, Academic Press: London, 1983.
- Petterson, M. F.; Damoglou, A. P.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1987**, *26*, 574.
- Dunn, B. B.; Stack, M. E.; Park, D. L.; Joshi, A.; *Environmental Health* **1983**, *12*, 283.
- Broadbent, D.; Mabelis, R. P.; Spencer, H.; *Phytochemistry* **1975**, *14*, 2082.
- Sundholm, E. G.; *Acta Chemica Scandinavica* **1978**, *B32*, 177.
- Trevedi, A. B.; Hirota, M.; Dóí, E.; Kitabatake, N.; *J. Chem. Soc. PT1* **1993**, 2167.
- Hirota, M.; Menta, A. B.; Yoneyama, K.; Kitabatake, N.; *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2002**, *66*, 206.
- Benjamin, C. R.; Capon, R. J.; Lacey, E.; Tennant, S.; Gill, J. H.; *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1520.
- Hasegawa, A.; Koizumi, F.; Takahashi, Y.; Ando, K.; Ogawa, T.; Hara, M.; Yoshida, M.; *Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu* **2001**, *43*, 467.
- Hideaki, O.; *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 3552.
- Hajjaj, H.; Klabebe, A.; Loret, M. O.; Goma, G.; Blanc, P. J.; François, J. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 311.
- Asano, M.; Inoue, M.; Katoh, T.; *Synlett* **2005**, *17*, 2599.