

ESTEROIDES PRODUZIDOS POR *Penicillium herquei*, UM FUNGO ENDOFÍTICO ISOLADO DOS FRUTOS DE *Melia azedarach* (MELIACEAE)

Andrey Moacir do Rosario Marinho*

Departamento de Ciências Naturais, Universidade do Estado do Pará, 6113-010 Belém – PA, Brasil

Patrícia Santana Barbosa Marinho e Edson Rodrigues Filho

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

Recebido em 30/4/08; aceito em 18/3/09; publicado na web em 4/8/09

STEROIDS PRODUCED BY *Penicillium herquei*, AN ENDOPHYTIC FUNGUS ISOLATED FROM THE FRUITS OF *Melia azedarach* (MELIACEAE). Six compounds comprising the groups of steroids, the ergosterol, the ergosterol peroxide, the cerevisterol, the neociclocitrinols, the ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one, the 25-hydroxy-ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one, were isolated from *Penicillium herquei* fungus obtained from *Melia azedarach*. The structures were identified by spectral methods of RMN 1D and 2D and MS.

Keywords: steroids, endophytic fungus, *Penicillium*.

INTRODUÇÃO

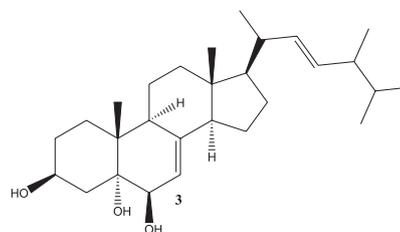
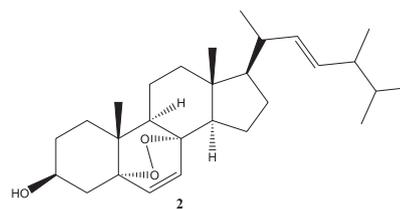
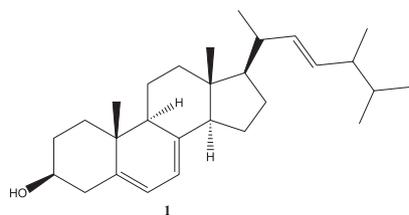
Micro-organismos endofíticos estão presentes nos tecidos internos das plantas onde esta associação pode ocorrer em nível celular. É estimado que cerca de 80% das plantas são hospedeiras de fungos.¹⁻³ A natureza dessas interações tem despertado o interesse de químicos, bioquímicos e biólogos na tentativa de entender essas associações, que é um fascinante e amplo campo de pesquisa. A colonização das plantas por endofíticos pode ser mediada pelo seu metabolismo secundário.⁴ Em geral esses compostos apresentam atividades antimicrobianas e inseticidas, e sua produção pode ser uma forma de proteção da planta hospedeira contra invasões.^{1,4}

Nosso grupo tem estudado a química de micro-organismos associados a plantas da família Meliaceae. Uma grande coleção de fungos tem sido isolada das folhas, frutos, raiz e caule de *Melia azedarach*.⁵ Algumas espécies de *Penicillium* isoladas dessa planta têm produzido metabólitos secundários interessantes pela sua química e atividade biológica.⁶ Este artigo descreve o estudo químico de *P. herquei*, cultivado em arroz, o isolamento e identificação de esteroides.

RESULTADOS

As substâncias **1**, **2** e **3** foram obtidas da fase diclorometânica do extrato metanólico da biomassa produzida por *P. herquei* cultivado em arroz (*Uncle Ben's*). Essas substâncias são sólidas cristalinas e seus dados de RMN e EM são perfeitamente coincidentes com os descritos na literatura para o ergosterol (**1**), peróxido de ergosterol (**2**) e cerevisterol (**3**).⁷⁻⁹

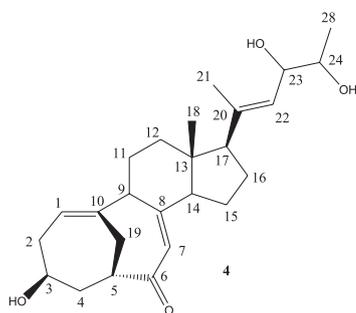
O espectro de RMN ¹H de **4** não apresentou características de um composto com esqueleto esteroidal comum. Seu espectro de EM (APCI) apresentou um *m/z* 401 [M+H]⁺. Foram observados ainda



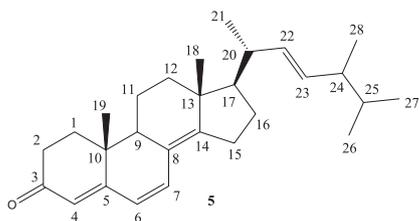
os *m/z* 383, 365 e 347 indicando a perda de três moléculas de água, sugerindo uma molécula tri-hidroxilada. O espectro de RMN ¹H apresentou sinais para três hidrogênios carbinólicos H-3 (δ 3,24), H-23 (δ 4,18/4,04) e H-24 (δ 3,60/3,47); estas informações corroboram com as perdas de água no espectro de massas e observa-se ainda no espectro de RMN ¹³C um sinal típico de carbonila em δ 207,8 (C-6). Foram evidentes alguns sinais duplicados com relação 1:1 de intensidade. Estes dados sugeriram a presença de uma mistura epimérica. Após análise dos dados de RMN e EM concluímos que **4** é a mistura das formas *23,24-eritro* e *23,24-treo* do esteroide neociclocitrol isolado anteriormente por nós de *Penicillium janthinellum*.¹⁰ Não foi possível separar a mistura por nenhum método de HPLC. Recentemente foi isolada uma série de esteroides neociclocitrinóis de *P. citrinum* e o estudo biossintético realizado neste trabalho corroborara com a nossa proposta de rota bioquímica.^{10,11}

Os espectros de RMN ¹H e ¹³C da substância **5** apresentaram características de um composto esteroidal. No espectro de RMN ¹H observamos o sinal de grupo metila CH₃-18 (δ 0,95, *s*, 3H) ligada a um carbono quaternário. Seguindo as correlações para esta metila foi possível determinar os sinais dos carbonos C-12 (δ 35,7), C-13 (δ 44,1), C-14 (δ 156,0) e C-17 (δ 55,8). O sinal δ 0,98 foi atribuído à metila CH₃-19 e tem correlações de HMBC com C-2 (δ 34,2),

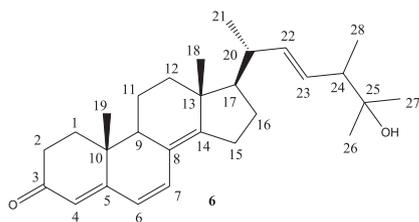
*e-mail: andreymoacir@yahoo.com.br



C-10 (δ 36,8), C-9 (δ 44,5) e C-5 (δ 164,2). Os hidrogênios H-6 (δ 6,01) e H-7 (δ 6,60) apresentaram constante de acoplamento $J = 9,6$ Hz e devem estar *cis* relacionados. As correlações de HMBC e COSY para CH_3 -18, CH_3 -19, H-6 e H-7 permitiram definir um sistema conjugado 4,6,8(14) nos anéis A, B e C. O sinal em δ 5,72 apresentou correlação no HMBC com os carbonos C-5, C-6, C-10 e foi atribuído a H-4. Esta atribuição pode ser confirmada através da correlação com a carbonila α,β -insaturada localizada em C-3 (δ 199,3). Através das análises dos dados de RMN, EM e comparações com os dados descritos na literatura concluímos que a substância **5** é o ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona.



A substância **6** apresentou o mesmo padrão de correlações no HMBC, HSQC e COSY para os anéis A, B, C e D da substância **5**. Porém ao invés de quatro sinais dubletos de metila como em **5** foram observados dois sinais dubletos e quatro sinais singletos na região de metilas no espectro de RMN ^1H de **6**. No espectro de RMN ^{13}C de **6** observou-se ainda um sinal referente a um carbono carbinólico em δ 72,5. Como os anéis A, B, C e D são idênticos aos de **5**, o carbono carbinólico foi localizado na cadeia lateral. Já que no espectro de RMN ^1H são observados quatro sinais referentes a singletos de metila, o grupo hidroxila foi posicionado em C-25, que é o único local na cadeia lateral que contempla o padrão espectral observado. Essa proposta foi confirmada através da correlação da metila CH_3 -28 no HMBC com C-23 e δ 72,5 (C-25). As metilas CH_3 -26 e CH_3 -27 apresentaram correlação com C-24 (δ 49,0) e com C-25 confirmando a estrutura de **6**. Assim, **6** foi identificado como 25-hidroxi-ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona.



As substâncias **5** e **6** foram isoladas anteriormente de uma espécie de Ascomiceto encontrado em uma esponja.^{12,13} Esta é a primeira ocorrência desses esteroides em espécies de *Penicillium*. Os dados de RMN ^1H e ^{13}C de **5** e **6** estão dispostos da Tabela 1.

Tabela 1. Dados de RMN ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) de **5** e **6** em CDCl_3

Posição	5		6	
	δ ^1H	δ ^{13}C	δ ^1H	δ ^{13}C
1		34,1		34,1
2		34,2		34,2
3		199,3		199,5
4	5,72 (s)	123,1	5,74 (s)	123,5
5		164,2		164,3
6	6,01 (d, 9,4)	124,5	6,04 (d, 9,7)	124,5
7	6,60 (d, 9,4)	133,9	6,60 (d, 9,7)	134,0
8		124,5		124,4
9		44,5		44,5
10		36,8		36,8
11		19,0		19,0
12		35,7		35,6
13		44,1		44,1
14		156,0		156,0
15		25,4		25,4
16		27,7		27,7
17		55,8		56,1
18	0,95 (s)	19,0	0,97 (s)	19,0
19	0,98 (s)	16,7	1,00 (s)	16,2
20		39,2		39,6
21	1,05 (d, 6,7)	21,2	1,08 (d, 6,7)	21,1
22	5,22 (m)	135,0	5,37 (m)	138,2
23	5,22 (m)	132,6	5,37 (m)	129,9
24		42,9		49,0
25		33,1		72,5
26	0,82 (d, 6,8)	20,0	1,15(s)	27,0
27	0,84 (d, 6,8)	19,7	1,18(s)	26,3
28	0,92 (d, 6,8)	17,6	1,01 (d, 6,9)	15,5

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

PARTE EXPERIMENTAL

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 positivo usando um instrumento Micromass Quattro-LC equipado com uma fonte de íons ESI/APCI do tipo *Z-spray*. Os experimentos de RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos em um espectrômetro Bruker DRX-400 em MeOD e 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*.⁵

Cultura de *P. herquei* em arroz e isolamento dos esteroides

Quarenta e cinco frascos de Erlenmeyer (500 mL), contendo 90 g 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 foi adicionado metanol (300 mL) em cada frasco de Erlenmeyer, e após 5 h esse metanol foi filtrado por gravidade. O metanol foi evaporado sob pressão reduzida, onde se obteve 10,4 g de extrato. Esse extrato foi fracionado em coluna sob pressão reduzida usando hexano, diclorometano e metanol como eluentes. Da fase diclorometânica, após fracionamento em coluna cromatográfica de sílica gel eluída com hexano, acetona e metanol, em gradiente de polaridade, foram obtidos os esteroides ergosterol (**1**), peróxido de ergosterol (**2**), cerevisterol (**3**), neociclocitrinois (**4**), ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (**5**) e 25-hidroxi- ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (**6**).

Dados físicos e espectrais dos compostos

Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (**5**): sólido amarelo pálido; RMN ¹H e ¹³C (CDCl₃, 400 MHz) ver Tabela 1; APCIMS (*full scan*, modo positivo): *m/z* (rel. int): 393 [M+H]⁺ (100), 346 (31), 306 (75), 252 (52).

25-hidroxi-ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona (**6**): sólido amarelo pálido; RMN ¹H e ¹³C (CDCl₃, 400 MHz) ver Tabela 1; APCIMS (*full scan*, modo positivo): *m/z* (rel. int): 409 [M+H]⁺ (100); APCIMS (íons filhos, 30 eV): 409 [M+H]⁺ (20), 391 (35), 349 (28), 333 (38), 253 (88), 235 (65), 225 (100), 211 (38), 199 (38).

AGRADECIMENTOS

À 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. Rizzo, I.; Varsavsky, M.; Haidukowski, M.; Frade, H.; *Toxicon* **1997**, *35*, 753.
2. Stierle, A.; Strobel, G.; Stierle, D.; *Science* **1993**, *260*, 214.
3. Zhang, W.; Wendel, J. F.; Clark, L. G.; *Mol. Phylogent. Evol.* **1997**, *8*, 205.
4. Huang, E. X.; Huang, T. L.; Wildung, M. R.; Croteau, R.; Scott, A. I.; *Prot. Expr. Pur.* **1998**, *13*, 90.
5. Santos, R. M. G.; Rodrigues-Fo, E.; Rocha, W. C.; Teixeira, M. F. S.; *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *19*, 767.
6. Marinho, A. M. do R.; Rodrigues-Fo, E.; Santos, L. S.; Moitinho, M. L. R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, *16*, 280.
7. Breitmaier, E.; Voelter, W.; *Carbon-13 NMR Spectroscopy: High Resolution Methods and Applications in Organic Chemistry and Biochemistry*, 3rd ed., VCH: Weinheim, 1987.
8. Yue, J.; Chen, S.; Lin, Z.; Sun, H.; *Phytochemistry* **2001**, *56*, 801.
9. Kawagishi, H.; Katsumi, R.; Sazawa Takashi, M.; Hagiwara, T.; Nakamura, T.; *Phytochemistry* **1988**, *27*, 2777.
10. Marinho, A. M. R.; Rodrigues-Fo, E.; Ferreira, A. G.; Santos, L. S.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, *16*, 1342.
11. Du, L.; Zhu, T.; Fang, Y.; Gu, Q.; Zhu, W.; *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1343.
12. Fujimoto, H.; Nakamura, E.; Okuyama, E.; Ishibashi, M.; *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, *52*, 1005.
13. Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Magno, S.; Mangoni, A.; *J. Nat. Prod.* **1989**, *52*, 1331.