

## Constituintes Químicos de *Penicillium sp*, um Fungo Endofítico Isolado de *Murraya paniculata* (Rutaceae)

### Chemical components of *Penicillium sp*, an endophytic fungus from *Murraya paniculata* (Rutaceae)

**Andrey Moacir do Rosário Marinho**

Departamento de Química  
Universidade Federal de São Carlos  
*andreymoacir@yahoo.com.br*

**Patrícia Santana Barbosa Marinho**

Departamento de Química  
Universidade Federal de São Carlos

**Edson Rodrigues Filho**

Departamento de Química  
Universidade Federal de São Carlos

**Resumo:** *Penicillium sp*, isolado como um fungo endofítico de *Murraya paniculata*, foi cultivado por 20 dias em arroz autoclavado de onde as substâncias ergosterol (1), peróxido de ergosterol (2), cerivisterol (3), uracila (4), dulcitol (5) e lactona do ácido mevalônico (6) foram produzidas e isoladas por procedimentos cromatográficos clássicos e identificadas por estudos espectroscópicos, principalmente EM e RMN 1D e 2D.

**Palavras-chaves:** penicillium; fungo endofítico; metabólitos secundários.

**Abstract:** *Penicillium sp*, isolated as an endophytic fungus from *Murraya paniculata*, was cultivated over 20 days on autoclaved rice, where the substances ergosterol (1), ergosterol peroxide (2), cerivisterol (3), uracile (4), dulcitol (5) e mevalonic acid lactone (6) were produced and isolated by classical chromatographic procedures and identified by MS and 1D and 2D NMR spectroscopic data.

**Key words:** penicillium; endophytic fungus; secondary metabolites.

## Introdução

Normalmente as plantas encontram-se associadas a outros tipos de organismos e este fato tem despertado o interesse tanto de biólogos, bioquímicos e químicos na tentativa de se entender em os mecanismos dessas interações.

Os microorganismos podem exibir diversos tipos de interações com as plantas às quais eles estão associados. Essas associações podem ser benéficas, negativas ou neutras. A relação em que os dois organismos são beneficiados recebe o nome de simbiose, enquanto que as relações em que um organismo invade de maneira adversa o habitat de outro recebe o nome de antagonismo<sup>1,2</sup>. Entre os microorganismos, os fungos são os que se encontram, mais frequentemente, associados a plantas.

Durante muito tempo os fungos foram considerados como vegetais. Somente a partir de 1969 eles passaram a ser classificados em um reino à parte. Os fungos apresentam um conjunto de características próprias que determinam sua diferenciação das plantas: não sintetizam clorofila, não têm celulose na sua parede celular, exceto alguns fungos aquáticos, e não armazenam amido como substância de reserva. Os fungos são seres eucarióticos, com um só núcleo, como as leveduras, ou multinucleados, como se observa em alguns fungos filamentosos ou bolores. São heterótrofos e nutrem-se de matéria orgânica morta - fungos saprofitos, ou viva- fungos parasitários.

Fungos endofíticos são fungos que, durante certo período de suas vidas, colonizam os tecidos internos de plantas sem causar sintomas a estas<sup>3</sup>. É estimado que cerca de 80% das plantas são hospedeiras de fungos<sup>4</sup>. A associação com fungos endofíticos pode ser benéfica à planta, pois esses são capazes de produzir metabólitos secundários que podem auxiliar o sistema imunológico da planta no combate a insetos, com produção de toxinas<sup>5</sup> e contra outros fungos patogênicos, com produção de fitoalexinas.

Existem ainda relatos de um possível “aprendizado” conhecido por “transferência genética horizontal” entre fungo e planta, que seria a capacidade de os organismos associados produzirem a mesma classe de substâncias<sup>6</sup>. Como exemplo há o fungo *Gibberella fugikuroi* que, associado à planta *Cucumbita maxima*,

produz derivados do ácido giberélico<sup>7</sup>, um diterpeno com atividade hormonal no crescimento de planta. A planta *Baccharis megapotonica* (exclusivamente a planta fêmea) que, associada aos fungos *Fusarium* e *Myrothecium*, produz micotoxinas da classe dos trichotecenos macrocíclicos<sup>8</sup>. Várias espécies de fungos endofíticos em *Taxus brevifolia* (*Taxosmyces andenea*, *Alternaria alternata*, *Fusarium graminearum*, etc) produzem taxol<sup>9,10</sup>, um diterpeno com potente atividade anticâncer.

Uma possível prova desse “aprendizado” tem sido demonstrada com a transferência de tricodieno sintetase de fungos de gênero *Fusarium* para a planta *Nicotina tabacum*. Essa transferência leva a planta a produzir tricodieno<sup>11</sup>.

*M. paniculata* é pertencente à ordem Sapindales, sendo esta constituída pelas famílias Bierbersteiniaceae, Kirkiaceae, Rutaceae, Meliaceae, Simaroubaceae, Anacardiaceae, Burseraceae, Sapindaceae, Nitrariaceae<sup>12</sup>. Originalmente asiática, foi introduzida no Brasil por paisagistas, conhecida como “murta” ou “murta do campo” é muito encontrada nas ruas e praças das cidades do estado de São Paulo.

Várias partes da planta são utilizadas na medicina tradicional chinesa por atribuírem a ela, propriedades analgésica, antifebril, antidesintérica e contraceptiva. A atividade contraceptiva é atribuída à presença do alcaloide yuehchukeno nas raízes e caule da planta<sup>13</sup>.

No laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos foram feitas tentativas de isolamento desses alcaloides de uma espécie de *M. paniculata* coletada no estado de São Paulo, BR. No entanto estas substâncias não foram encontradas, sendo isolados somente cumarinas e flavonoides polimetoxilados<sup>14</sup>.

A biogênese de flavonoides e cumarinas (C6-C3) e alcaloides (derivados do triptofano) tem um ponto em comum. A ação da enzima fenilalanina-amônio-liase (PAL) transforma fenilalanina em derivados do ácido cinâmico que leva à formação de cumarinas, flavonoides e lignanas. Por outro lado, o ácido corísmico pode ser transformado em ácido antranílico que levaria ao triptofano, precursor dos alcaloides<sup>15</sup>.

Então surgiu a hipótese de que os fungos endofíticos seriam responsáveis pela não ocorrências dos alcaloides em espécies de *Murraya* coletadas no Brasil. Devido ao

alto grau de infestação de fungos na planta, estes estaria bloqueando a rota que leva aos alcaloides para potencializar a rota dos flavonoides que, como se sabe, são fitoalexinas e ajudariam a planta no combate às infestações. Então, na tentativa de responder a esse questionamento, resolveu-se estudar os fungos endofíticos da planta. Vários fungos endofíticos foram isolados dos tecidos de *M. paniculata* confirmando a hipótese de que a planta está altamente investada por fungos<sup>16</sup>.

## **Parte experimental**

### **Isolamento de *Penicillium sp***

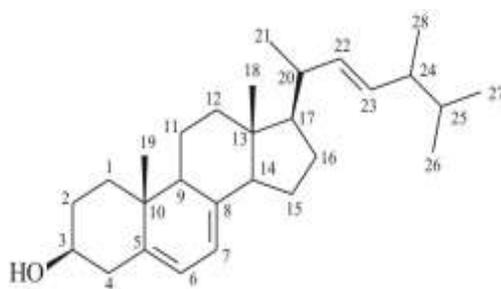
Os fungos endofíticos foram isolados utilizando-se imersões sucessivas em hexano, hipoclorito de sódio e etanol, a fim de eliminar as ceras e os fungos epifíticos. Posteriormente o material vegetal foi inoculado em placa de Petri contendo meio de cultura BDA (batata, dextrose, agar) para crescimento das colônias. Foram realizados repiques sucessivos para isolamento dos fungos. Uma cepa do fungo *Penicillium sp* está depositada na coleção do Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microorganismos (LaBioMMI) do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)

### **Cultura de arroz e de *Penicillium sp* e isolamento dos constituintes químicos**

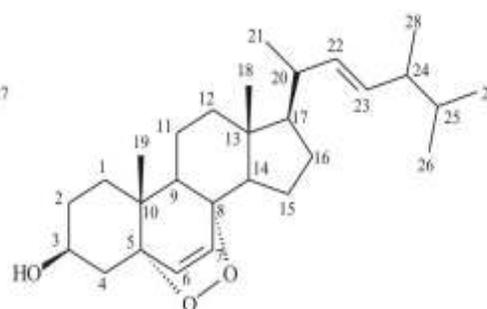
45 frascos de Erlenmeyer (500 mL), contendo 90g de arroz (Uncle Ben's) e 75 mL de água destilada em cada frasco, foram autoclavados por 45 minutos a 121°C. Pequenos cubos de meio BDA contendo o micélio de *P. herquei* foram adicionados em 42 frascos de Erlenmeyer sob condição estéril. Três frascos foram utilizados como controle. Após vinte dias de crescimento a 25°C foi adicionado metanol (300 mL) em cada frasco de Erlenmeyer e, após cinco horas, esse metanol foi filtrado por gravidade. O metanol foi evaporado sob pressão reduzida, onde se obteve 10,4g de extrato. Esse extrato foi particionado em hexano e metanol.

Da fase hexânica, após fracionamento em coluna cromatográfica de sílica gel eluída com hexano, acetona e metanol, foram obtidos os esteroides ergosterol (1) e peróxido de ergosterol (2), o esteroide cerivisterol (3), a base nitrogenada uracila (4), o poliol dulcitol (5) e lactona do ácido mevalônico (6).

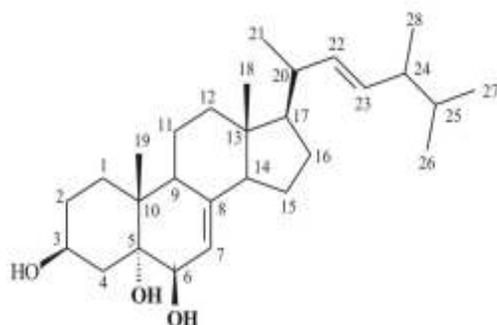
### Procedimentos gerais



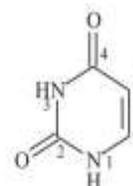
1



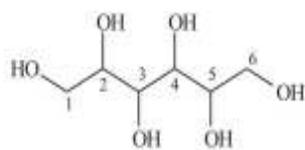
2



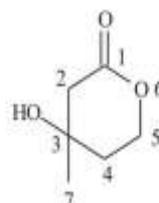
3



4



5



6

A rotação óptica foi medida em um polarímetro PERKIN ELMER 241. O espectro de UV foi obtido em solução de MeOH em um espectrofotômetro HEWLETT PACKARD 8452-A, e 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 o instrumento MICROMASS QUATTRO-LC equipado com ESI/APCI "Z-spray" ion source. Os experimentos de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C foram obtidos em um espectrômetro BRUKER DRX-400 em D<sub>2</sub>O, MeOD e CDCl<sub>3</sub> com TMS como padrão interno

## Resultados

As substâncias 1 e 2 foram obtidas da fase hexânica do extrato metanólico da biomassa produzida por *P. herquei* cultivado em arroz (Uncle Ben's). Estas substâncias são sólidas cristalinas. Os seus dados de RMN e EM são perfeitamente coincidentes para os descritos na literatura para o ergosterol (1) e peróxido de ergosterol (2)<sup>17, 18</sup>.

Para a substância 3 foram observados em seu espectro de RMN <sup>1</sup>H sinais para dois hidrogênios carbinólicos H-3 ( $\delta$  3,61, m, 1H) e H-6 ( $\delta$  4,07, m, 1H), o maior deslocamento químico de H-6 e a presença de sinais para hidrogênios olefínico H-22 ( $\delta$  5,17, m, 1H), H-23 ( $\delta$  5,20, m, 1H) e H-7 ( $\delta$  5,35, m, 1H) sugere a presença de um grupamento álcool alílico na estrutura. No espectro de RMN <sup>13</sup>C foram observados sinais para três carbonos carbinólicos C-5 ( $\delta$  76,0), C-3 ( $\delta$  67,8) e C-6 ( $\delta$  73,6), como no espectro de RMN <sup>1</sup>H são observados apenas sinais para dois hidrogênios carbinólicos uma das hidroxilas deve estar ligada a um carbono quaternário. Os dados de RMN e EM de 3 foram confrontados com dados disponíveis na literatura para o cerivisterol e mostraram total similaridade<sup>19</sup>. Os dados de RMN de 1, 2 e 3 estão na tabela 1.

Tabela 1. Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de 1, 2 e 3 (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

<b>C</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
1	38,3	30,1	33,0
2	31,9	34,7	30,9
3	70,4	66,5	67,8
4	40,7	39,3	39,3
5	141,3	82,1	76,0
6	119,6	135,2	73,6
7	116,3	130,7	117,6
8	139,7	79,4	144,0
9	46,2	51,1	43,5
10	37,0	37,0	37,2
11	21,1	20,6	22,1
12	28,2	37,0	39,5
13	42,8	44,6	43,8
14	54,5	51,7	54,8
15	23,0	23,4	22,9
16	39,1	28,6	27,9
17	55,7	56,2	56,0
18	12,0	12,9	12,3
19	16,2	18,2	18,8
20	40,3	39,7	40,4
21	19,6	20,9	19,6
22	132,0	135,4	132,2
23	135,5	132,3	135,4
24	42,8	42,8	42,8
25	19,9	33,1	33,1
26	33,0	19,6	19,9
27	21,0	19,9	21,1
28	17,5	17,5	17,6

Fonte: Autores

A substância 4 apresentou  $m/z$  113  $[\text{M}+\text{H}]^+$  no espectro de massas *full scan* ESI (+). O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 4 apresentou apenas dois sinais dubletos em  $\delta$  5,56 (d,  $J = 7,6$ ) e  $\delta$  7,51 (d,  $J = 7,6$ ), seu espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  mostrou somente quatro sinais sendo dois comumente atribuídos a carbonilas insaturadas  $\delta$  151,7 e  $\delta$  164,4 e outros dois típicos de ligações duplas  $\delta$  100,2 e  $\delta$  142,5. Através da obtenção dos experimentos de HMBC e HSQC e por comparações com a literatura<sup>17</sup> pode-se concluir que 4 tratavam-se da base nitrogenada uracila.

A substância 5 apresentou em seu espectro de RMN  $^1\text{H}$  apenas um sinal multiplete em  $\delta$  3,70. Esse sinal foi atribuído aos hidrogênios carbinólicos presentes na substância. O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  revela três sinais em  $\delta$  63,2,  $\delta$  69,3 e  $\delta$  70,9. No seu espectro de massas ESI (-) foi observado o  $m/z$  181 que levou a proposta da seguinte fórmula molecular  $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$ . Os dados foram comparados com a literatura<sup>17</sup> e observou total similaridade com os dados do ducitol.

A substância 6 foi isolada como um óleo amarelado, que revelava verde azulado em CCDA utilizando-se solução de vanilina como revelador. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  apresentou um sinal ddd em  $\delta$  4,60 ( $J = 11,3; 8,9$  e  $5,9$  Hz, H-5a) e outro sinal ddd em  $\delta$  4,35 ( $J = 11,3; 5,0$  e  $4,4$  Hz, H-5b), ambos integrando para um hidrogênio, no espectro de HSQC verificou-se que estes hidrogênios estavam ligados ao mesmo carbono (C-5,  $\delta$  66,2); um sinal duplo triplete em  $\delta$  2,67 ( $J = 17,4$  e  $1,3$  Hz, H-2a), um dublete em  $\delta$  2,51 ( $J = 17,4$  Hz, H-2b), também integrando para um hidrogênio cada, além de um multiplete em  $\delta$  1,91 (H-4) que integrava para dois hidrogênios e um singlete em  $\delta$  1,39 integrando para três hidrogênios sugerindo a presença de uma metila. O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  mostrou um sinal  $\delta$  171,2 típico de carbonila de lactona, além dos sinais  $\delta$  67,9 e  $\delta$  66,2 que pelo espectro de DEPT verificou-se ser um carbono quaternário e um carbono metinênico, respectivamente. O espectro de massas ESI (+) apresentou um pico  $m/z$  131  $[\text{M}+\text{H}]^+$  sugerindo a fórmula molecular  $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_2$  para a substância. Através das correlações observadas no experimento de HMBC verificou-se que 6 era a lactona do ácido mevalônico<sup>20</sup>. Os dados de RMN de 4, 5 e 6 estão na tabela 2.

Tabela 2. Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de 4, 5 (50 MHz, DMSO e D<sub>2</sub>O) e 6 (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

C	4	5	6
1	-	63,2	171,2
2	151,7	69,3	44,5
3	-	70,9	69,7
4	164,4	70,9	35,7
5	100,2	69,3	66,2
6	142,5	63,2	-
Me	-	-	29,4

Fonte: Autores

## Conclusão

Os esteroides ergosterol (1), peróxido de ergosterol (2) e cerivisterol (3) são comumente isolados de fungos, os dois primeiros apresentam atividade anticancerígena<sup>21,22</sup>. Os compostos uracila (4), dulcitol (5) e lactona (6), apesar de não serem comuns, mostram a diversidade de metabólitos que podem ser obtidos de uma única espécie. Os dados desse trabalho são preliminares e estão em continuidade objetivando isolamento de metabólitos secundários ativos.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES ao CNPq e à FAPESP pelo suporte financeiro.

## Referências

- 1 - PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. *Microbiologia*. São Paulo; Mc Graw-hill, 1981. V 01 e 02.
- 2 - AGRIOS, G. N. *Plant Pathology*. 3. ed. New York: Academic Press, 1988.
- 3 - PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; TOTI, L.; VIRET, O. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural Toxins*, v. 1: p. 185-196, 1992.
- 4 - ZHANG, W. et al. Bamboozled again! Inadverted isolation of fungi rDNA sequences from bamboos (Poaceae: Bambusoideae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. v. 8, n. 2, p. 205-217, 1997.
- 5 - JARVIS, B. B.; MILLER, J. D. Natural Products, Complexity and Evolution In: *Phytochemical Diversity and Redundancy in Ecological Interactions*. Romeo et al. New York: Plenum Press, p. 265-293. 1996.
- 6 - ROHR, J. *Biosynthesis of taxol*. *Angewandte Chemie- International Edition English*. v. 36, n. 20, p. 2190-2195, 1997.
- 7 - MCMILLIAN, J.; SUTER, P. J. *Naturwissenschaften*, v. 45, p. 46, 1958.

- 8 - JARVIS, B. B.; REJALI, N. M.; SCHENKEL, E. P.; BARROS, C. S.; MATZENBACHER, N. I. Trichothecene mycotoxins from Brazilian Baccharis species. *Phytochemistry*, v. 30, n. 3, p. 789-797, 1991.
- 9 - LI, J. Y. et al. The induction of taxol production in the endophytic fungus – *Periconia* sp from *Torreya grandifolia*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. v. 20, p. 259-264, 1998.
- 10 - STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D.; GROTHAUS, P.; BIGNAMI, G. The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the pacific yew, *Taxus brevifolia*. *J. Natural Products*, v. 58, n. 9, p. 1315-1324, 1995.
- 11 - DESJARDINS, A. E.; HOHN, T. M.; MCCORNICK, S. P.; PROCTOR, R. H. *Curr. Top. Plant Physiol.* 15: 211-219, 1995.
- 12 - STEVENS, P. F. Na update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical journal of the Linnean Society*, v. 141, p. 399-436, 2003.
- 13 - KONG, Y. C. et al. Yuehchukeno, a novel anti-implantation índole alkaloid from *Murraya paniculata*. *Planta medica*, v. 304, 1985.
- 14 - FERRACIN, R. J. Estudo fitoquímico de *Murraya paniculata*. 1996. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1996.
- 15 - DEWICK, P. M. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. 2. ed. England: John Wiley & Sons, LTD, 2001.
- 16 - RODRIGUES-Fo, E. (Apostila datilografada).
- 17- BREITMAEIR, E. *Carbon-13 NMR Spectroscopy*. New York: John Wiley & Sons, 1987.
- 18- YUE, J.; CHEN, S.; LIN, Z.; SUN, H. Sterol from the fungus *Lactarium volemus*. *Phytochemistry*, v. 56, p. 801-806. 2001.
- 19- KAWAGISHI, H.; KATSUMI, R.; SAZAWA, TAKASHI, M.; HAGIWARA, T. and NAKAMURA, T. Cytotoxic Steroids from the Mushroom *Agaricus blazei*. *Phytochemistry*, v. 27, p. 2777 – 2779, 1988.

20 - SOUZA, A. D. L. Perfis químicos e metabólitos de fungos endofíticos dos gêneros *Eutypia*, *Trichoderma* e *Pestalotiopsis*, isolados das plantas *Murraya paniculata*, *Pinus taeda* e *Gustavia* CF. *Elliptica*. São Carlos, 2005. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.

21 - TAKEI, T.; YOSHIDA, M.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; KOBORI, M. Ergosterol Peroxide, an Apoptosis-Inducing Component Isolated from *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* v 69, p. 212-215, 2005.

22 – NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat. Prod Rep*, v. 17, p. 215, 2000.