UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo químico e atividades biológicas de extratos obtidos de culturas
de *Penicillium verrucosum* Dierck

Barbara Casellato Elias

Ribeirão Preto
2003

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo químico e atividades biológicas de extratos obtidos de culturas
de *Penicillium verrucosum* Dierck

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para a obtenção do título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de
concentração: Fármacos e Medicamentos**

Orientada: Barbara Casellato Elias

Orientadora: Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo

Ribeirão Preto
2003

FICHA CATALOGRÁFICA

ELIAS, Barbara Casellato

Estudo químico e atividades biológicas de extratos obtidos de culturas de *Penicillium verrucosum* Dierck

186 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

Orientadora: Pupo, Mônica Tallarico

1. *Penicillium verrucosum*
2. Metabólitos secundários
3. Atividade tripanocida

Autor: Barbara Casellato Elias

Título: Estudo químico e atividades biológicas de extratos obtidos de culturas de *Penicillium verrucosum* Dierck

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo
Orientadora

Trabalho defendido e aprovado pela Comissão Julgadora em ____/_____/2003

**O presente trabalho foi realizado sob orientação da Profa. Dra.
MÔNICA TALLARICO PUPO**

**Laboratório de Química Farmacêutica
Departamento de Ciências Farmacêuticas**

Dedico este trabalho,

Aos meus Pais Munir e Vera, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e incentivando! Obrigada por me ensinarem a amar e a nunca desistir dos sonhos!

“Maravilhar-se é o primeiro passo para o descobrimento!”

(Louis Pauster, químico biólogo francês, 1822-1895)

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dr. Mônica Tallarico Pupo, que me introduziu à Química de Produtos Naturais com ensinamentos de vida e bancada, sendo um exemplo de profissionalismo, amizade e confiança.

À Prof. Dra. Suraia Said, pela dedicação à pesquisa e pela disposição em sempre tirar as dúvidas e aconselhar.

Ao Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira, pelas valiosas contribuições na realização deste trabalho, amizade e pela discussão de vários espectros de RMN.

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes, pelas conversas de apoio, amizade e execução dos espectros de massas.

Ao Prof. Dr. Fernando Batista da Costa, pelas atenciosas contribuições e divertidas conversas.

À Profa. Dra. Ivone Carvalho, Prof. Dr. Gino Del Ponte e Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos pela amizade, ensinamentos e dedicação.

Ao Rubens, pelo amor, carinho, companheirismo e amizade, fundamentais para ser feliz e viver em paz.

Aos meus irmãos Zema e Luís pela eterna união e pelas gostosas gargalhadas.

À Cris, um agradecimento especial pela grande amizade, longas conversas, intermináveis risadas e pela maravilhosa foto, que é a capa deste trabalho.

Aos amigos dos laboratórios de QF, Gnosia, QO, Enzimologia e PN: Anderson, Luciano, Netto, Lílian, Vanessa, Fernando, Vitor, Peterson, Bárbara, Warley, Daniela, Montinho, Dílson, Adriane, Nini, Pedrega, Demá, Niltinho, Juliana, Janice, Sergião, Ricardo, Paulão, Milady, Miller, Pierre, Michel, Gobbo, Fabiana, Renata, Andréa, Cris, Tati, Ana Paula, Pati, Djalma, Pati, Artur, Sally, Alessandra, Lisandra, Rejane, Rodrigo, pelas alegres conversas, sugestões e pelo grande aprendizado.

À Tati e Nini, pelo fundamental apoio e amizade, me ensinando detalhadamente as técnicas microbiológicas fundamentais para realização deste trabalho.

Ao Djalma, pela amizade, paciência e competência ao ensinar a usar o HPLC que foi imprescindível para isolamento das substâncias e finalização deste trabalho.

Aos técnicos: Cláudia, Áurea, Edi, Gelly, Valtinho, Zé Luís, Eli, Thomás, Diógenes e Virgínea, pela paciência e por estarem sempre dispostos a ajudar.

À Cláudia, em especial por sempre alegre e com alto astral realizar os ensaios de um “screening” enorme frente a GAPDH, descrito neste trabalho.

Sobre tudo, agradeço à Deus, que está sempre ao meu lado, iluminando, permitindo e ensinando. Obrigado senhor!

SUMÁRIO

Lista de símbolos e abreviaturas	i
Lista de tabelas	iii
Lista de figuras	v
Resumo	ix
Summary	x
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1. Doenças parasitárias	1
1.2. Produtos naturais como fontes para novos fármacos	13
1.3. Obtenção de metabólitos secundários de fungos via processos fermentativos	16
1.4. Gênero <i>Penicillium</i>	17
1.5. <i>Penicillium verrucosum</i>	22
2. OBJETIVOS	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. Materiais	28
3.1.1. Fases estacionárias para cromatografia	28
3.1.2. Solventes	28
3.1.3. Equipamentos	29
3.1.4. Microrganismos	31
3.2. Métodos	31

3.2.1. Condições de cultivo	31
3.2.2. Obtenção dos extratos brutos	36
3.2.3. Perfis cromatográficos via CLAE	39
3.2.4. Aumento da produção dos extratos Ac47 e Me59	39
3.2.5. Fracionamento cromatográfico	40
3.2.6. Reações químicas efetuadas em algumas substâncias	49
3.2.7. Elucidação estrutural	50
3.2.8. Ensaio antiparasitário <i>in vitro</i> para avaliação da atividade tripanocida	50
3.2.9. Ensaio de inibição das atividades enzimáticas	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1. Seleção da espécie de <i>Penicillium</i> frente a conidiogênese	55
4.2. Triagem dos extratos de <i>P. verrucosum</i> pelos ensaios, <i>in vitro</i> , sobre a forma tripomastigota do parasita e bioquímicos sobre a enzima GAPDH de <i>T. cruzi</i> e APRT de <i>L. tarentolae</i>	58
4.2.1. Ensaio sobre a forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i>	59
4.2.2. Ensaio bioquímico	61
4.3. Considerações gerais sobre o isolamento das substâncias	67
4.4. Substâncias isoladas	73
4.4.1. Alcalóide dicetopiperazínico (F1)	74
4.4.2. Ácidos graxos (M2)	89
4.4.3. Triglicerídeos (M6)	96

4.4.3. Manitol (M3)	104
4.4.4. α,α -Trealose (M4)	114
4.4.5. Glicerilfosfocolina (M5)	126
4.5. Atividade tripanocida das substâncias isoladas	140
4.6. Análise da influência das condições de cultivo de <i>P. verrucosum</i> na produção de metabólitos secundários, via perfis cromatográficos	140
5. CONCLUSÕES	155
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	157
Anexos	178

Lista de símbolos e abreviaturas

δ	- Deslocamento químico
ϕ	- Diâmetro da coluna
AcOEt	- Acetato de etila
AcOH	- Ácido acético
APRT	- Adenina-fosforribosil-transferase
CCDA	- Cromatografia em camada delgada analítica
CCDP	- Cromatografia em camada delgada preparativa
CDCl_3	- Clorofórmio deuterado
Dc	- Diclorometano
CG	- Cromatografia gasosa
CG-EM	- Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CLAE	- Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE - R	- Cromatografia líquida de alta eficiência - Reciclante
CLV	- Cromatografia líquida a vácuo
conid/mL	- Conídios por mL
COSY ^1H - ^1H	- <i>Correlation spectroscopy</i>
<i>d</i>	- Dubleto
<i>dd</i>	- Duplo dubleto
<i>ddd</i>	- Duplo duplo dubleto
DEPT	- <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMSO	- Dimetilsulfóxido
D_2O	- Água deuterada
ESI-EM	- Espectrometria de massas (ionização por <i>electrospray</i>)
FE	- Fase estacionária
FM	- Fase móvel
Fr.	- Fração
GAPDH	- Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
h.	- Altura
Hex	- Hexano

HGPRT	- Hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase
HMBC	- <i>Heteronuclear multiple bond coherence</i>
HMQC	- <i>Heteronuclear multiple quantum coherence</i>
Hz	- Hertz
J	- Constante de acoplamento (em Hz)
PRTases	- Fosforribosil-transferases
<i>m</i>	- Multipleteo
MeOH	- Metanol
Me ₂ CO	- Acetona
MHz	- Mega Hertz
MPF	- Meio pré-fermentativo
<i>m/z</i>	- Relação carga massa
n-BuOH	- <i>n</i> -Butanol
NOE-diff	- <i>Nuclear Overhauser Effect - differential</i>
PDA	- <i>Potato dextrose agar</i>
PRPP	- 5'-Fosforribosil-1-pirofosfato
RMN ¹³ C	- Ressonância magnética nuclear de carbono - 13
RMN ¹ H	- Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ³¹ P	- Ressonância magnética nuclear de fósforo - 31
<i>s</i>	- Singleto
<i>s/</i>	- Singleto largo
<i>t</i>	- Tripleto
t _R	- Tempo de retenção
UV	- Ultravioleta
XPRT	- Xantina-fosforribosil-transferase

Lista de Tabelas

Tabela 1	Estruturas dos dois fármacos atuais contra a Doença de Chagas e do único agente quimioprolático encontrado no mercado	4
Tabela 2	Metabólitos secundários isolados de espécies de <i>Penicillium</i>	18
Tabela 3	Metabólitos secundários isolados de <i>P. verrucosum</i>	23
Tabela 4	Constituintes dos meios de cultura semi-sólidos	32
Tabela 5	Constituintes dos meios líquidos de cultura	33
Tabela 6	Quantidade dos 115 extratos brutos obtidos das 23 condições de cultivo de <i>P. verrucosum</i>	38
Tabela 7	Produção em diferentes escalas do extrato bruto Ac47 e Me59	40
Tabela 8	Contagem de conídios dos fungos incubados por 7 dias	55
Tabela 9	Contagem de conídios dos fungos incubados por 10 dias	55
Tabela 10	Contagem de conídios dos fungos incubados por 16 dias	56
Tabela 11	Extratos testados com a forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i> .	58
Tabela 12	Comparação da atividade tripanocida em diferentes concentrações	61
Tabela 13	Resultados obtidos no ensaio da atividade enzimática da GAPDH do <i>T. cruzi</i> frente aos extratos brutos obtidos	61
Tabela 14	Comparação dos extratos com atividade superior a 15% de inibição da enzima GAPDH com a % de lise da forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i>	65
Tabela 15	Ensaio da atividade enzimática da APRT de <i>L. tarentolae</i> frente aos extratos brutos obtidos de culturas de <i>P. verrucosum</i>	65
Tabela 16	Dados de RMN ¹ H e RMN ¹³ C para a substância F1	77
Tabela 17	Alcalóides dicetopiperazínicos isolados de espécies de	79

Penicillium

Tabela 18	Principais absorções observadas no espectro no infravermelho da fração Me59.2.8	89
Tabela 19	Dados obtidos via CG-EM para os ésteres metílicos dos ácidos graxos	90
Tabela 20	Dados obtidos via CG e CG-EM para os ésteres metílicos dos ácidos graxos que esterificam o glicerol	97
Tabela 21	Principais absorções observadas no espectro no infravermelho da substância M3	104
Tabela 22	Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C para a substância M3	105
Tabela 23	Dados de RMN ^{13}C dos carbonos carbinólicos da substância M3a	106
Tabela 24	Principais absorções observadas no espectro no infravermelho da substância M4a	115
Tabela 25	Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C para a substância M4	116
Tabela 26	Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C para a substância M4a	117
Tabela 27	Principais absorções observadas para a substância M5 no espectro no infravermelho	128
Tabela 28	Dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C para a substância M5	129
Tabela 29	Atividade tripanocida das substâncias isoladas	140
Tabela 30	Massas miceliais úmidas obtidas na pré-cultura de <i>P. verrucosum</i>	153
Tabela 31	Efeito das condições de cultivo sobre a produção de massa micelial seca por <i>P. verrucosum</i>	154

Lista de Figuras

Figura 1	Formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
Figura 2	Metabolismo da glicose e do glicerol no glicossomo	8
Figura 3	Estrutura da enzima nativa gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) de <i>T. cruzi</i>	9
Figura 4	Estrutura da enzima adenina-fosforribosil-transferase (APRT), da via de recuperação de purinas de <i>L. tarentolae</i>	12
Figura 5	Via de recuperação e interconversão de purinas, em células de mamíferos.	13
Figura 6	<i>P. verrucosum</i> . A - colônia em meio semi-sólido, B - conidióforos	23
Figura 7	Fluxograma de seleção do meio de cultura semi-sólido que favorece a conidiogênese para cada espécie de <i>Penicillium</i> estudada	33
Figura 8	Fluxograma das condições de cultivo de <i>P. verrucosum</i>	36
Figura 9	Fluxograma de obtenção dos extratos brutos intra e extracelulares	37
Figura 10	Fluxograma de fracionamento do extrato Ac47 _i	41
Figura 11	Fluxograma de fracionamento de Ac47.9.9 _i e Ac47.9.10 _i	41
Figura 12	Fluxograma de fracionamento do extrato Ac47	42
Figura 13	Fluxograma de fracionamento de Ac47.9.2	43
Figura 14	Fluxograma de fracionamento de Ac47.9.3	43
Figura 15	Fluxograma de isolamento da substância F1	44
Figura 16	Fluxograma de partição líquido-líquido do extrato Me59	45
Figura 17	Fluxograma de fracionamento de Me59.1	46
Figura 18	Fluxograma de fracionamento de Me59.2	47
Figura 19	Fluxograma de fracionamento de Me59.3	48

Figura 20	Fluxograma de fracionamento de Me59.4	48
Figura 21	Resumo das melhores condições de conidiogênese das 5 espécies de <i>Penicillium</i>	56
Figura 22	Extratos com atividade antiparasitária significativa no ensaio biológico, <i>in vitro</i> , realizado com a cepa Y da forma tripomastigota do <i>T. cruzi</i>	60
Figura 23	Comparação da estrutura monomérica nativa da GAPDH de <i>T. cruzi</i> e complexada com o inibidor chalepina	64
Figura 24	Cromatograma da fração AC47.9.4.4 em CLAE-R no tempo de retenção 0 a 150 minutos.	70
Figura 25a	Cromatograma da fração AC47.9.4.5 em CLAE-R no tempo de retenção 0 a 450 minutos	71
Figura 25b	Continuação - Cromatograma da fração AC47.9.5. em CLAE-R no tempo de retenção 450 a 860 minutos.	72
Figura 26	Espectro de RMN ^1H da substância F1	82
Figura 27	Mapa de contornos COSY ^1H - ^1H da substância F1	83
Figura 28	Espectro de RMN ^{13}C da substância F1	84
Figura 29	Mapa de contornos HMQC da substância F1	85
Figura 30	Mapa de contornos HMBC da substância F1	86
Figura 31	Ampliação do Mapa de contornos HMBC da substância F1	87
Figura 32	Ampliação do Mapa de contornos HMBC da substância F1	88
Figura 33	Espectro no infravermelho da fração Me59.2.8	91
Figura 34	Espectro de RMN ^1H dos ésteres metílicos (M2b) obtidos	92
Figura 35	Cromatograma dos ésteres metílicos da mistura M2b	93
Figura 36	Espectro de massas dos picos 1, 2, 3 e 4, via CG-EM	94
Figura 37	Espectro de massas dos picos 5, 6, 7 e 8, via CG-EM	95
Figura 38	Espectro de RMN ^1H dos triglicerídeos	98

Figura 39	Cromatograma dos ésteres metílicos da mistura M6b via CG-EM	99
Figura 40	Espectro de massas dos picos 1, 2, 3 e 4 via CG-EM	100
Figura 41	Espectro de massas dos picos 5, 6 e 7 via CG-EM	101
Figura 42	Cromatograma dos ésteres metílicos da mistura M6b via CG	102
Figura 43	Cromatograma dos padrões de ésteres metílicos via CG	103
Figura 44	Espectro no infravermelho da substância M3	107
Figura 45	Espectro de RMN ^1H da substância M3	108
Figura 46	Espectro de RMN ^{13}C da substância M3	109
Figura 47	Espectro de DEPT da substância M3	110
Figura 48	Espectro de RMN ^1H da substância M3a	111
Figura 49	Espectro de RMN ^{13}C da substância M3a	112
Figura 50	Mapa de contornos COSY ^1H - ^1H da substância M3a	113
Figura 51	Espectro de RMN ^1H da substância M4	119
Figura 52	Espectro de RMN ^{13}C da substância M4	120
Figura 53	Espectro no infravermelho para a substância M4a	121
Figura 54	Espectro de RMN ^1H obtido da substância M4a	122
Figura 55	Espectro de RMN ^{13}C da substância M4a	123
Figura 56	Espectro de massas, no modo positivo, da substância M4a , via ESI-EM	124
Figura 57	Espectro de massas, no modo negativo, da substância M4a , via ESI-EM	125
Figura 58	Espectro no infravermelho da substância M5	131
Figura 59	Espectro de RMN ^1H da substância M5	132
Figura 60	Espectro de RMN ^{13}C da substância M5	133
Figura 61	Espectro de DEPT da substância M5	134

Figura 62	Espectro de RMN ^{31}P da substância M5	135
Figura 63.	Mapa de contornos COSY ^1H - ^1H da substância M5	136
Figura 64	Mapa de contornos HMQC da substância M5	137
Figura 65	Mapa de contornos HMBC da substância M5	138
Figura 66	Espectro de massas da substância M5 via ESI-EM	139
Figura 67	Cromatograma do extrato Ac47	143
Figura 68	Cromatograma do extrato Ac107	143
Figura 69	Cromatograma do extrato Ac48	144
Figura 70	Cromatograma do extrato Ac108	144
Figura 71	Cromatograma do extrato Ac2	145
Figura 72	Cromatograma do extrato Ac62	145
Figura 73	Cromatograma do extrato Ac3	146
Figura 74	Cromatograma do extrato Ac63	146
Figura 75	Cromatograma do extrato Ac32	147
Figura 76	Cromatograma do extrato Ac92	147
Figura 77	Cromatograma do extrato Ac33	148
Figura 78	Cromatograma do extrato Ac93	148
Figura 79	Cromatograma do extrato Ac17	149
Figura 80	Cromatograma do extrato Ac77	149
Figura 81	Cromatograma do extrato Ac18	150

RESUMO

A ausência de tratamento eficaz contra a doença de Chagas e Leishmaniose justifica a pesquisa de novas substâncias efetivas no controle destas doenças. As enzimas GAPDH de *T. cruzi* e a APRT de *L. tarentolae* são fundamentais para o ciclo de vida dos parasitas, representando alvos terapêuticos específicos que permitem a busca racional de agentes antiparasitários. As fontes naturais produzem grande diversidade estrutural em substâncias químicas com amplo potencial biológico. Espécies de *Penicillium* são conhecidas por produzir diversas classes de metabólitos secundários bioativos, incluindo atividade antiparasitária.

A triagem com os 115 extratos brutos obtidos das culturas de *P. verrucosum*, indicou os extratos MeOH da massa micelial e AcOEt do fluido da cultura como os mais ativos no ensaio sobre *T. cruzi*. Estes extratos são oriundos do meio pré-fermentativo 24 horas e meio fermentativo Takeuchi 72 horas. Nos ensaios enzimáticos nenhum extrato apresentou inibição acima de 35%. As diferentes atividades biológicas e análises dos perfis químicos de extratos, via CLAE, demonstraram que a produção de metabólitos secundários varia em função das condições de cultivo do fungo.

Dos extratos selecionados foram isolados ácidos graxos, triglicerídeos, manitol, α,α -trealose, glicerilfosfocolina e um alcalóide dicetopiperazínico, que até o momento parece não ter sido isolado de *Penicillium* ou outra fonte natural.

SUMMARY

The absence of an effective treatment for Chagas' disease and Leishmaniasis stimulates the search for new active compounds. The enzymes GAPDH from *T. cruzi* and APRT from *L. tarentolae* are attractive targets for rational search of antiprotozoal agents, taking part in essential pathways of the pathogens.

Natural products are rich in structural diversity and biological activities. *Penicillium* is known to produce different groups of bioactive secondary metabolites, including antiprotozoal activity.

In the trypanocidal screening of the 115 crude extracts from different cultures of *P. verrucosum*, the MeOH extracts from the mycelium and EtOAc extracts from the culture broth were the most active. These extracts were obtained from 24h in a preculture and for an additional 72h in Takeuchi medium. In the enzymatic assays, the highest inhibitory activity was 35%.

Besides the differences observed in the biological activities, the extracts showed different chemical profiles in HPLC analysis. So, the production of secondary metabolites by *P. verrucosum* is dependent on the culture conditions.

The chemical study of the selected extracts led to the isolation of fatty acids, triacylglycerols, mannitol, α,α -threulose, glycerylphosphocholine and one diketopiperazine alkaloid. This alkaloid has not previously been reported from *Penicillium* or other natural source.