

BIOTRANSFORMAÇÃO DE PROGESTERONA USANDO O *PENICILLIUM PAXILLIN*, ISOLADO DE AMÊNDOAS DE *BERTHOLLETIA EXCELSA*

Kaio C. de Maria¹; Samuel Q. Lopes²; Janaina de A. E. Dourado³; Irlon F. Maciel^{4*}

¹Universidade Federal do Amapá (UNIFAP) – kaiouimica21@gmail.com

²Universidade Federal do Amapá (UNIFAP) – samuql12@gmail.com

³Universidade federal do Amapá (UNIFAP) – evangelistajanaina@gmail.com

^{4*}Universidade Federal do Amapá (UNIFAP)– irlon.ferreira@gmail.com

Palavras-Chave: Esteroides; Fungos Amazônicos; Fungo Endófito.

Introdução

A progesterona é um hormônio sexual, um esteróide natural produzido pelo corpo humano e participa em vários processos fisiológicos relacionados ao sistema reprodutor feminino, é essencial para transformação do endométrio no útero no momento da ovulação e na manutenção da gravidez (DI RENZO; TOSTO; TSIBIZOVA, 2020; PATIL; MAHESHWARI; WAIRKAR, 2023).

Os fungos são conhecidos por conduzir uma ampla gama de reações de biotransformação em vários compostos orgânicos, como relata (BIROLI ET AL., 2015). Porém o uso de fungos endófitos da Amazônia ambiental brasileira ainda não foram avaliados em reações de biotransformação para converter a progesterona em esteroides hidroxilados.

Na literatura já foram relatados alguns estudos de biotransformação utilizando-se de micro-organismos fúngicos, como por exemplo a produção de nanopartículas de prata a partir de células inteiras de *Trichoderma sp.*, *Aspergillus sp.* e *Trichoderma sp.* realizado por (RAMOS ET AL., 2020). Também já foram utilizados na biodegradação do cloranfenicol, com taxas que variam de 35 a 95%. ao longo de um período de 28 dias (HOLANDA ET AL., 2019). Além disso, já foram apresentados estudos que mostram que fungos endofíticos associados a castanha-do-brasil pode representar uma fonte promissora de compostos bioativos. Por exemplo, o efeito do extrato de *Trichoderma asperellum* isolado de castanhas-do-brasil na melanogênese em peixe-zebra descrito por (FERREIRA ET AL., 2023A, 2023B), e na atividade larvicida contra *Aedes aegypti* relatada por (ARAÚJO ET AL., 2022).

Portanto, essa pesquisa tem como objetivo, investigar o potencial do fungo isolado da *Bertholletia excelsa* (castanha do Brasil), mais em específico o fungo *penicillium paxillin*, no processo de biotransformação da progesterona.

Material e Métodos

As amêndoas de *Bertholletia excelsa* foram coletadas e atribuídas pelo Brasil Empresa de Pesquisa Agropecuária – Amapá, Brasil, na área localizada em 1 - W 52 ° 18'20.976 " and S 0 ° 33'44.44 " e 2 - W 51 ° 57'53.338 " and S 0 ° 25'21.39 " (estado do amapá, Brasil). O fungo endofítico utilizado neste estudo foi isolado da amêndoa e armazenado de acordo com as protocolo descrito por (HOLANDA ET AL., 2019), e seguindo a metodologia usada por

(ARAÚJO ET AL., 2022). As placas foram avaliadas diariamente até o desenvolvimento das colônias fúngicas.

As identificações iniciais foram baseadas na observação direta através de microscópio óptico (OLYMPUS ® BX41). O fungo endofítico *Penicillium paxilli* utilizado neste trabalho, foi identificado por métodos convencionais e moleculares no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA, <https://cbmai.cpqba.unicamp.br>) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), SP, Brasil.

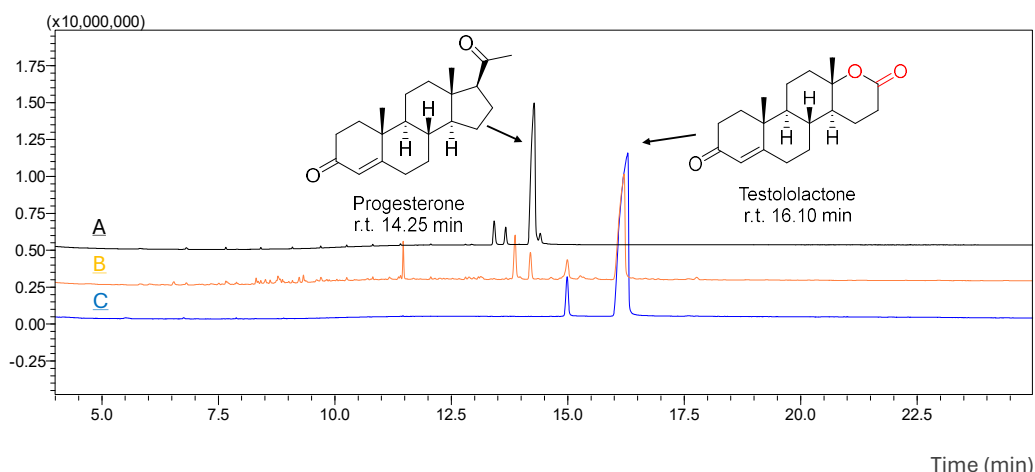
Para realizar a biotransformação utilizando o fungo, Todos os materiais e meios de cultura utilizados, foram autoclavados por 20 minutos a 121 °C. Pequenos discos com diâmetro de 5 mm da colônia micelial foram transferidos para frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio líquido de malte a 2%. Os frascos foram incubados em um agitador orbital (150 rpm, 28 °C) por 5 dias. Os micélios de *Penicillium paxilli* foram coletados por filtração de Buchner e suspensos em 100 mL de solução tampão (pH=7) em frascos Erlenmeyer de 250 mL. Após 50 mg (0,160 mmol) de progesterona dissolvida em 1000 µL de DMSO foi adicionado ao erlenmeyer contendo a solução tampão, a reação foi incubada em um agitador orbital por 5 dias (150 rpm, 28 °C). Após o período de reação, a cultura foi filtrada com aparelho de Buchner, e a massa micelial obtida foi suspensa em 100 mL de água e acetato de etila (1:1). A mistura foi vigorosamente agitada magneticamente por 30 minutos e filtrada novamente com funil de Buchner. O sobrenadante foi extraído em três etapas com acetato de etila. A fase orgânica foi evaporada em um rota-vapor sob vácuo, e após, seca com sulfato de sódio anidro.

Para caracterizar o produto da biotransformação, foi realizada uma caracterização através de técnicas espectroscópica de ressonância magnética de hidrogênio e carbono 13 (RMN ¹H e ¹³C), e a cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

Resultados e Discussão

A capacidade de biotransformação de *Penicillium paxilli*, isolada de amêndoas de *Bertholletia excelsa*, foi investigada após 5 dias de reação. A progesterona foi convertida em testololactona com 92% (área de pico por GC-MS), um único produto isolado com um rendimento de 60%, como é possível de visualizar na **figura 1**, sugerindo a presença de várias enzimas, como as monooxigenases de Baeyer-Villiger, e que a cepa pode ser um biocatalisador útil para transformação esteroideal.

FIGURA 1: Cromatogramas de GC-MS da biotransformação de progesterona usando células inteiras de *P. paxilli* (A) Progesterona em repouso tempo de retenção (t.r). (t.r. 14,25 min); (B) Biotransformação de reação; (C) Testololactona isolada por cromatografia em coluna (t.r. 16,10 min).

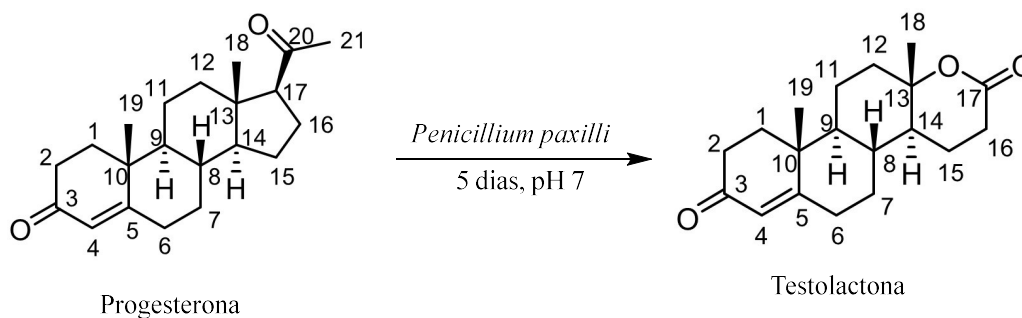


Fonte: Autor (2024)

O cromatograma obtido pela análise CG-MS (Figura 1A), mostrou a presença de progesterona como padrão (r.t. 14,25 min), e produto da biotransformação (Figura 1B), picos indicativos de testolactona (r.t. 16,10 min), e a Figura 1 C mostrou a testolactona após purificação. O pico base observado para progestogênios quando analisados por GC-MS (EI, 70 eV) corresponde a um íon molecular em m/z 314, dando íons de fragmentos principais em m/z 124, indicando a reação de clivagem do anel B como descrito por (JEILANI; CARDELINO; IBEANUSI, 2011; ZARETSKII; WULFSON; ZAIKIN, 1967), e m/z 43 e perda de um e C_2H_3O . Para a testolactona, mostrou 84% de similaridade com o íon molecular e pico de base em m/z 302, deu íons de fragmento em m/z 177, indicando a reação de clivagem do anel C.

A análise por dados de RMN de ^{13}C pode ser visualizada na **tabela 1**, onde a testolactona mostrou um desaparecimento do carbono em δ 209,3 (carbonílico) e δ 31,5 (metino), e isso foi acompanhado pelo aparecimento de um δ 171,1 característico do carbono δ -lactona - carbono 17 (atribuição de tipo numérico para átomos de carbono e hidrogênio de acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) e a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC). não sei se precisa desta parte Apoiando ainda mais essa alegação na formação da testolactona, o espectro de RMN de 1H revelou uma perda do tripleto em δ 2,54 (t, 8,6) e concomitante com a perda do grupo metil em δ 2,13 (s). Este resultado estava de acordo com ambos os dados descritos por (ILOVAISKY ET AL., 2020).

TABELA 1: Dados experimentais de RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz) para progesterona e testolactona.



Numero	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)			
	Progesterona		Testolactona	
	This work	Ref [30]	This work	Ref [31]
1	35.6	35.9	35.5	35.5
2	34.0	34.3	33.8	33.8
3	199.4	199.8	199.0	199.0
4	123.9	124.3	124.1	124.1
5	170.9	171.3	169.2	169.2
6	32.8	32.2	32.3	32.3
7	32.0	33.1	30.4	30.4
8	35.6	36.1	38.0	38.0
9	53.7	54.0	52.5	52.5
10	38.7	39.0	38.5	38.5
11	21.0	21.4	21.8	21.8
12	38.6	38.9	39.0	38.0
13	43.9	44.3	82.7	82.7
14	56.0	56.4	45.7	45.7
15	24.4	24.7	19.9	19.9
16	22.9	23.2	28.5	28.5
17	63.5	63.8	171.1	171.1
18	13.3	13.7	20.1	20.1
19	17.4	17.7	17.4	17.4
20	209.3	209.7	-	-
21	31.5	31.9	-	-

A formação de testololactona a partir da progesterona foi relatada em outros estudos. Ao longo do tempo, fungos de diferentes ambientes foram usados nessa biotransformação, por exemplo, células inteiras de fungos marinhos brasileiros, como *Penicillium oxalicum* CBMAI 1996 usada por (MELO DE QUEIROZ et al., 2024) e *Aspergillus sydowii* CBMAI 935 usada por (DE PAULA; ROSSET; PORTO, 2021) produziram 26% e 36%, respectivamente, de testololactona.

Conclusões

O fungo endófito *penicillium paxillin* demonstrou ser capaz de biotransformar a progesterona, convertendo a mesma em 92 % de testolactona, e com um isolamento de 60% de rendimento do produto final. Indicando assim a sua utilização em processos de biotransformação da progesterona para formação de testolactona.

Agradecimentos

Agradecimentos a Universidade Federal do Amapá, através do Departamento de Extensão pelo apoio por meio do auxílio viagem e pelo Departamento de Ações Comunitárias e Estudantis pelo apoio de registro de crédito recebido.

Referências

- ARAÚJO, I. F. et al. Larvicidal activity against *Aedes aegypti* and molecular docking studies of compounds extracted from the endophytic fungus *Aspergillus* sp. isolated from *Bertholletia excelsa* Humm. & Bonpl. **Biotechnology Letters**, v. 44, n. 3, 2022.
- BIROLI, W. G. et al. Biocatalysis and biotransformation in Brazil: An overview. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 481–510, 1 set. 2015.
- DE PAULA, S. F. C.; ROSSET, I. G.; PORTO, A. L. M. Hydroxylated steroids in C-7 and C-15 positions from progesterone bio-oxidation by the marine-derived fungus *Penicillium oxalicum* CBMAI 1996. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 37, 2021.
- DI RENZO, G. C.; TOSTO, V.; TSIBIZOVA, V. Progesterone: History, facts, and artifacts. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 69, p. 2–12, 1 nov. 2020.
- FERREIRA, A. M. et al. Anti-Melanogenic Potential of Natural and Synthetic Substances: Application in Zebrafish Model. **Molecules**, v. 28, n. 3, p. 1053, 20 jan. 2023a.
- FERREIRA, A. M. et al. *Trichoderma asperellum* Extract Isolated from Brazil Nuts (*Bertholletia excelsa* BONPL): In Vivo and In Silico Studies on Melanogenesis in Zebrafish. **Microorganisms**, v. 11, n. 4, p. 1089, 21 abr. 2023b.
- HOLANDA, F. H. E. et al. Study of biodegradation of chloramphenicol by endophytic fungi isolated from *Bertholletia excelsa* (Brazil nuts). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 20, p. 101200, 1 jul. 2019.
- ILOVAISKY, A. I. et al. Regioselective Baeyer–Villiger Oxidation of Steroidal Ketones to Lactones Using BF₃/H₂O₂. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2020, n. 3, p. 402–405, 23 jan. 2020.
- JEILANI, Y. A.; CARDELINO, B. H.; IBEANUSI, V. M. Hydrogen rearrangement and ring cleavage reactions study of progesterone by triple quadrupole mass spectrometry and density functional theory. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 46, n. 7, 2011.
- MELO DE QUEIROZ, T. et al. Bio-oxidation of progesterone by *Penicillium oxalicum* CBMAI 1185 and evaluation of the cytotoxic activity. **Steroids**, v. 205, 2024.
- PATIL, N.; MAHESHWARI, R.; WAIRKAR, S. Advances in progesterone delivery systems: Still work in progress? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 643, p. 123250, 25 ago. 2023.
- RAMOS, M. M. et al. Silver nanoparticle from whole cells of the fungi *Trichoderma* spp. isolated from Brazilian Amazon. **Biotechnology Letters**, v. 42, n. 5, 2020.
- ZARETSKII, V. I.; WULFSON, N. S.; ZAIKIN, V. G. Mass spectrometry of steroid systems—X: Determination of the configuration at C-17 in the pregnene-3,20-dione series. **Tetrahedron**, v. 23, n. 9, p. 3683–3686, 1 jan. 1967.