



Biotransformação da Progesterona por Fungos Amazônicos: Produção de Derivados Esteroidais com Potencial Farmacológico

Samuel Q. Lopes¹; Patrícia de A. Nóbrega¹; David E. Q. Jimenez¹; Irlon Maciel Ferreira¹.

1 Laboratório de Biocatálise e Síntese Orgânica Aplicada, Universidade Federal do Amapá, Rodovia Josmar Pinto, Bairro Zerão, 68902-280, Macapá, AP, Brasil.

Samuql12@gmail.com

Palavras-Chave: Biocatálise, Esteroides funcionalizados.

Introdução

Os esteroides constituem uma importante classe de compostos bioativos, caracterizados por um núcleo estrutural formado por quatro anéis fundidos e ampla diversidade de grupos funcionais e propriedades biológicas. Esses compostos apresentam grande relevância farmacêutica, sendo utilizados em diferentes aplicações terapêuticas em razão de suas atividades hormonais, anti-inflamatórias, imunossupressoras e outras propriedades de interesse clínico (BERCZELLER; YOUNG; KUPPERMAN, 1964; LIGHTMAN, 1991; KICMAN, 2008; VIGO; LUBIANCA; CORLETA, 2011). A diversidade estrutural dos esteroides possibilita a obtenção de diferentes derivados com aplicações farmacológicas, tornando a modificação seletiva de suas estruturas uma estratégia relevante para o desenvolvimento de compostos de interesse medicinal.

Apesar dos avanços nas metodologias de síntese e modificação química de esteroides, a funcionalização seletiva dessas moléculas pode representar um desafio em razão da complexidade estrutural do núcleo esteroideal, da presença de múltiplos centros estereogênicos e da existência de diferentes posições suscetíveis à modificação. Nesse contexto, a obtenção de derivados estruturalmente definidos requer estratégias capazes de controlar a natureza e a posição das transformações realizadas (BHATTI; KHERA, 2012).

A biotransformação microbiana constitui uma estratégia biocatalítica para a modificação de compostos orgânicos, utilizando microrganismos ou seus sistemas enzimáticos para promover transformações químicas específicas. A utilização de biocatalisadores pode favorecer transformações com elevada quimio-, régio- e estereosseletividade, características particularmente relevantes para a modificação de moléculas estruturalmente complexas, como os esteroides (BORNSCHEUER et al., 2012; FABER, 2018). Além disso, sistemas baseados em células inteiras podem apresentar diferentes atividades enzimáticas capazes de promover transformações do substrato sem a necessidade de isolamento individual das enzimas envolvidas (DE CARVALHO, 2017).



Os fungos filamentosos destacam-se entre os microrganismos empregados em processos de biotransformação devido à sua diversidade metabólica e à capacidade de produzir diferentes sistemas enzimáticos. Fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, por exemplo, apresentam capacidade de promover transformações em moléculas esteroidais por meio de reações como hidroxilação, oxidação e redução (BHATTI; KHERA, 2012). Estudos específicos demonstram a utilização de *Aspergillus niger* na biotransformação da progesterona (KULKARNI; LELE; KULKARNI, 1998), enquanto espécies do gênero *Penicillium* também apresentam capacidade de promover modificações em substratos esteroidais, incluindo a formação de derivados hidroxilados a partir da progesterona (DE PAULA; ROSSET; PORTO, 2021).

A progesterona é um esteroide de relevância biológica e farmacêutica e apresenta uma estrutura suscetível a diferentes modificações promovidas por sistemas biocatalíticos. A biotransformação desse substrato por microrganismos pode resultar na formação de derivados estruturalmente modificados, permitindo investigar diferentes padrões de transformação e a capacidade metabólica dos biocatalisadores empregados (BHATTI; KHERA, 2012). Dessa maneira, a utilização da progesterona como substrato constitui uma abordagem para avaliar a capacidade de fungos filamentosos em promover modificações estruturais em moléculas esteroidais.

Embora a biotransformação de esteroides por fungos filamentosos seja descrita na literatura, estudos direcionados à utilização de fungos provenientes de ambientes amazônicos como biocatalisadores para transformações esteroidais ainda são menos frequentes. A Amazônia brasileira apresenta elevada diversidade de fungos e constitui uma fonte potencial de microrganismos com características de interesse biotecnológico (MENDOZA et al., 2022). Nesse contexto, fungos filamentosos isolados de ambientes amazônicos submetidos a condições ambientais específicas, incluindo solos associados a atividades de mineração, podem representar uma fonte de diversidade microbiana com potencial para aplicações biotecnológicas. Estudos recentes demonstram o isolamento e a identificação de fungos filamentosos provenientes de solos de mineração amazônicos com capacidade de tolerância a diferentes metais, contribuindo para o conhecimento da diversidade e das características desses microrganismos (NÓBREGA et al., 2024).

Diante desse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial biocatalítico de quatro fungos filamentosos isolados de solo amazônico na biotransformação da progesterona, investigando a influência de diferentes condições reacionais sobre a formação de derivados esteroidais e sua caracterização estrutural.

Material e Métodos

Foram utilizadas as linhagens *Aspergillus pseudoviridinutans* CBMAI 2755, *Aspergillus niger* CBMAI 2756, *Penicillium rolfssii* CBMAI 2753 e *Penicillium* sp. cf. *guaibinense* CBMAI 2758, previamente isoladas de solo amazônico do município de Mazagão, Amapá, e identificadas por Nóbrega *et al.* (2024). Inicialmente, as linhagens foram cultivadas em meio sólido contendo extrato de malte e ágar a 2% (m/v), pH 5,0, a 28 °C, durante sete dias em incubadora BOD.

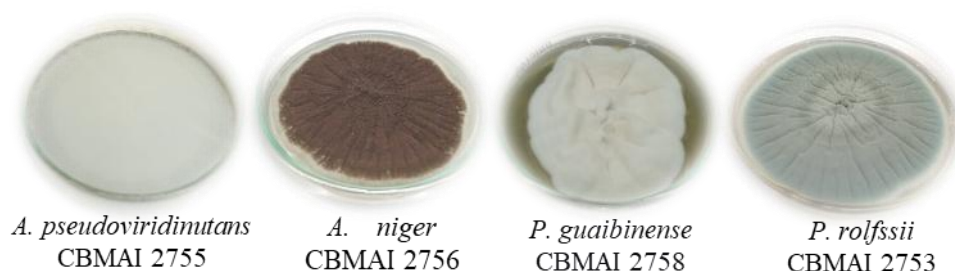


Figura 1-Fungos isolados de solo com elevado teor de metais, no município de Mazagão/AP.

Posteriormente, foram transferidas para meio líquido contendo extrato de malte a 2% (m/v), pH 5,0, permanecendo cinco dias sob agitação orbital a 130 rpm para obtenção da biomassa. As células miceliais foram recuperadas por filtração, obtendo-se aproximadamente 5 g de biomassa. Todas as manipulações foram realizadas em condições assépticas, em capela de fluxo laminar.

As reações de biotransformação foram conduzidas utilizando células miceliais inteiras suspensas em tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹) nos pH 5,0, 7,0 e 9,0 e, separadamente, o sobrenadante livre de células obtido após a remoção da biomassa. Os tampões foram preparados com fosfato dissódico (Na₂HPO₄) e fosfato monopotássico (KH₂PO₄). Em cada reação foram adicionados 50 mg de progesterona previamente solubilizada em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). As reações foram conduzidas a 28 °C e 150 rpm durante sete dias. A cinética foi acompanhada por coletas a cada 24 h, nos tempos de 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h.

Os produtos foram extraídos três vezes com 50 mL de acetato de etila, secos com sulfato de sódio anidro e concentrados sob pressão reduzida. As análises foram realizadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), utilizando Shimadzu GC-2010 Plus/MS-2010 Plus, ionização por impacto de elétrons (70 eV) e coluna DB-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm). O forno foi programado de 120 °C (1 min) a 300 °C a 20 °C min⁻¹, permanecendo nessa temperatura por 15 min. O injetor e a linha de transferência foram mantidos a 270 °C; as amostras (1 µL) foram injetadas em modo split (15:1), com hélio a 3,0 mL min⁻¹, e faixa de aquisição de m/z 40–500. Os metabólitos foram identificados por comparação dos espectros de massas com biblioteca de referência. Os metabólitos majoritários foram isolados e caracterizados por RMN de ¹H e ¹³C (Agilent Technologies

400/54 Premium Shielded), e um dos compostos foi confirmado por difração de raios X de monocristal (XtaLAB Synergy Dualflex, Rigaku).

Os percentuais apresentados correspondem à área relativa dos picos cromatográficos obtidos por CG-EM, não representando rendimento gravimétrico ou conversão determinada por curva analítica. Não foram realizados controles experimentais nem replicatas independentes; portanto, não foi aplicada análise estatística aos resultados.

Resultados e Discussão

As linhagens amazônicas *Aspergillus pseudoviridinutans* CBMAI 2755 e *Aspergillus niger* CBMAI 2756 apresentaram capacidade de biotransformação da progesterona, com perfis de produtos distintos. Em sistema tamponado a pH 7,0, células inteiras de *A. pseudoviridinutans* produziram 11 α -hidroxiprogesterona (2) e 11 α ,15 β -di-hidroxiprogesterona (3), enquanto o sobrenadante livre de células apresentou perfil distinto de produtos. Para *A. niger*, também foram observadas diferenças no perfil metabólico entre células inteiras e sobrenadante livre de células. Esses resultados indicam que o sistema empregado influenciou o perfil dos produtos formados nas condições avaliadas.

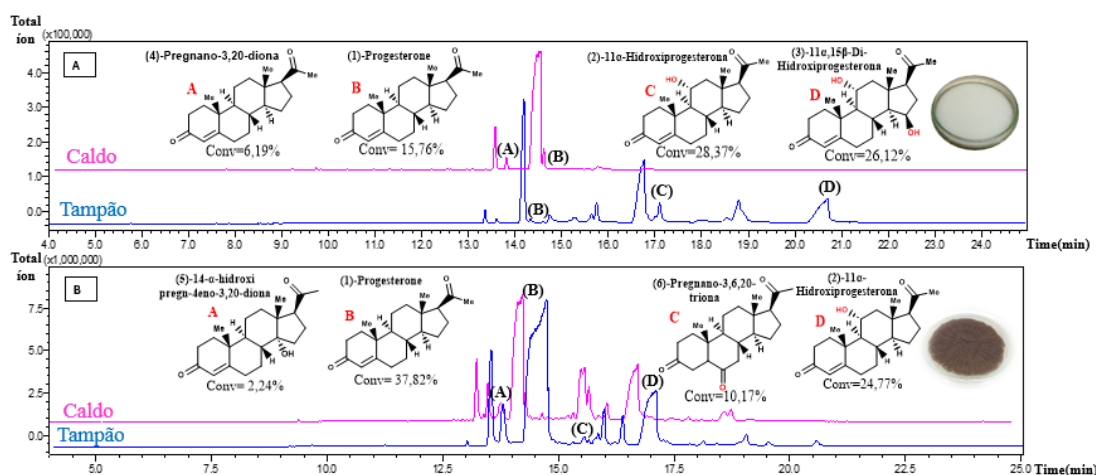


Figura 2- cromatogramas CG-EM de biotransformação por *A. niger* e *A. pseudoviridinutans*.

Nos cromatogramas de *A. pseudoviridinutans* (Figura 2A), foram identificados progesterona (1; tR = 14,28 min), 11 α -hidroxiprogesterona (2; tR = 16,68 min), 11 α ,15 β -di-hidroxiprogesterona (3; tR = 20,37 min) e pregnan-3,20-diona (4). As áreas relativas observadas foram de 15,76% para progesterona, 28,37% para 11 α -hidroxiprogesterona, 26,12% para 11 α ,15 β -di-hidroxiprogesterona e 6,19% para pregnan-3,20-diona. Para *A. niger* (Figura 2B), foram identificadas 14 α -hidroxipregnan-3,20-diona (5; 2,24%), progesterona (1; 37,82%), pregnan-3,6,20-triona (6; 10,17%) e 11 α -hidroxiprogesterona (2; 24,77%).

Os metabólitos 11 α -hidroxiprogesterona (2) e 11 α ,15 β -di-hidroxiprogesterona (3), obtidos a partir da biotransformação por *A. pseudoviridinutans*, foram isolados por

cromatografia em coluna. A caracterização por RMN de ^1H e ^{13}C foi compatível com as estruturas propostas para os derivados hidroxilados, incluindo a hidroxilação em C11 para o metabólito (2) e em C11 e C15 para o metabólito (3). A estrutura da $11\alpha,15\beta$ -dihidroxiprogesterona foi adicionalmente confirmada por difração de raios X de monocristal.

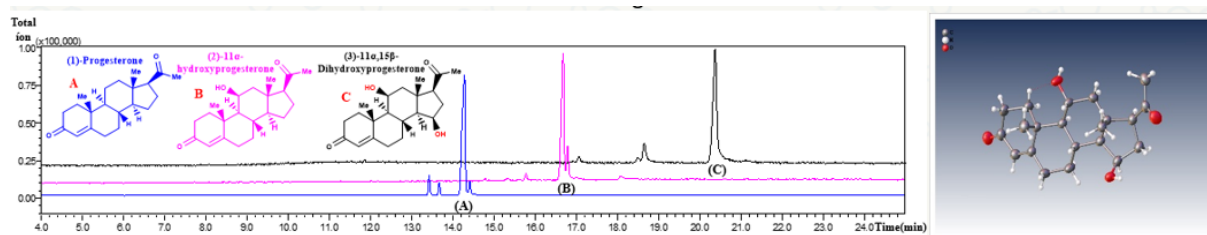


Figura 3. Metabólitos isolados das cepas do gênero *Aspergillus* e estrutura da $11\alpha,15\beta$ -Dihidroxiprogesterona por cristalografia.

A cinética da biotransformação foi acompanhada por análises realizadas a cada 24 h durante 168 h. Para apresentação dos cromatogramas, foram selecionados os tempos de 48 e 96 h para *A. pseudoviridinutans* e 48 e 120 h para *A. niger* (Figura 4), por representarem momentos nos quais foram observadas alterações mais relevantes no perfil cromatográfico. Nos demais intervalos, as alterações observadas foram menos expressivas. Em *A. pseudoviridinutans*, a formação de 11α -hidroxiprogesterona foi observada em 48 h e apresentou aumento da área relativa ao longo da reação, sendo observada também a formação de $11\alpha,15\beta$ -di-hidroxiprogesterona em períodos posteriores. Em *A. niger*, a formação de produtos ocorreu de forma mais evidente em períodos posteriores, com alterações observadas entre 48 e 120 h. Esses resultados indicam diferenças no comportamento temporal da biotransformação entre as duas linhagens. Entretanto, por se tratar de experimentos sem replicatas independentes, os resultados representam as condições experimentais avaliadas e não permitem estabelecer diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens.

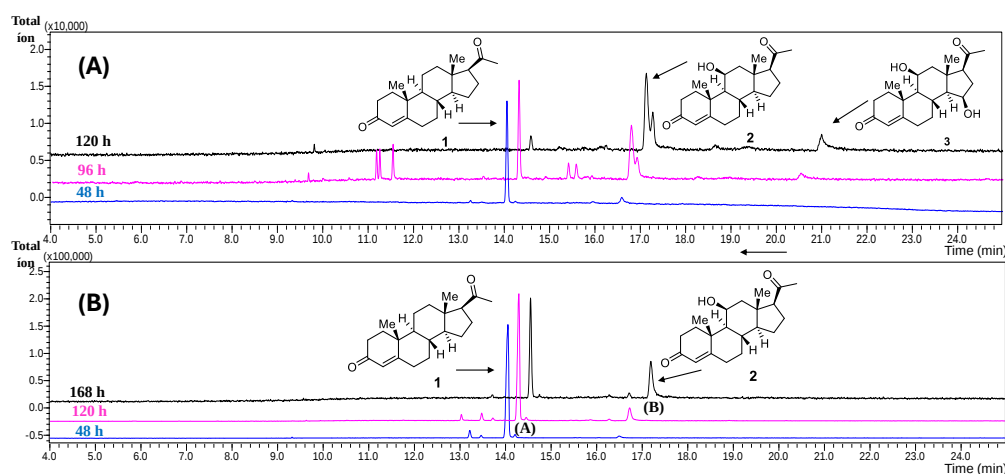


Figura 4-Cinética reacional das reações do gênero *Aspergillus*.

A influência do pH apresentou comportamento distinto entre as linhagens (Figura 5). *A. pseudoviridinutans* apresentou formação de 11α -hidroxiprogesterona em pH 5,0, enquanto

em pH 9,0 foi detectada apenas a progesterona, indicando ausência de produtos de biotransformação detectáveis nas condições básicas avaliadas. Em *A. niger*, a 11 α -hidroxiprogesterona foi observada tanto em pH 5,0 quanto em pH 9,0. Dessa forma, os resultados sugerem que o pH influencia a formação dos metabólitos e que as duas linhagens apresentam respostas distintas às condições avaliadas. A ausência de produtos em determinada condição não permite, entretanto, afirmar diretamente a ocorrência de inativação enzimática ou perda de estabilidade do sistema catalítico.

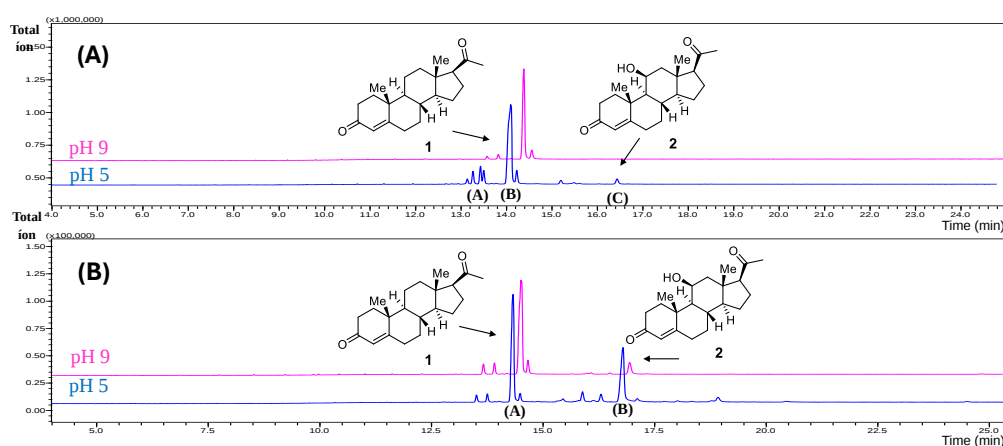


Figura 5-Estudo de variação de pH.

As linhagens *Penicillium rolfsii* CBMAI 2753 e *Penicillium* sp. cf. *guaibinense* CBMAI 2758 também promoveram a formação de derivados da progesterona, apresentando diferenças entre células inteiras e sobrenadante livre de células. Em *P. rolfsii*, foram identificados androstenediona (7), testosterona (8) e testololactona (9) (Figura 6). Nas células inteiras, a androstenediona apresentou área relativa de 22,88%, enquanto o sobrenadante livre de células apresentou testosterona (13,81%) e testololactona (14,04%). A formação desses produtos é compatível com transformações estruturais da progesterona, incluindo modificações da cadeia lateral, redução do grupo carbonila em C17 e lactonização. Contudo, os dados não permitem identificar diretamente as enzimas envolvidas nessas transformações.

Para *Penicillium* sp. cf. *guaibinense* CBMAI 2758, o sobrenadante livre de células apresentou androstenediona (7; 5,15%), androsta-4-en-3-ona-17-(acetiloxi) (10; 15,85%) e testololactona (9; 22,03%), enquanto as células inteiras apresentaram predominância relativa de testololactona. Esses resultados indicam que a utilização de células inteiras ou da fração extracelular influenciou o perfil dos produtos detectados nas condições avaliadas.

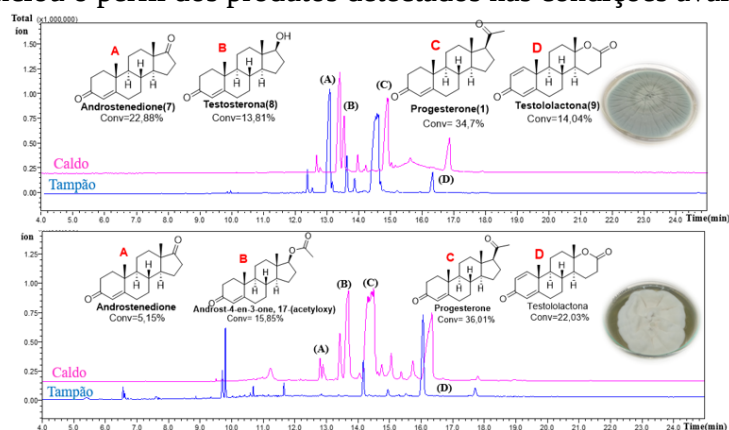


Figura 6- Cromatogramas CG-EM da biotransformação por *Penicillium*.

Os principais produtos obtidos pelas linhagens de *Penicillium* foram purificados por cromatografia em coluna utilizando sílica gel e mistura de hexano e acetato de etila (1:1). Foram isolados androstenediona, testosterona e testololactona, cujas estruturas foram caracterizadas por RMN de ^1H e ^{13}C . A formação desses compostos demonstra que as linhagens avaliadas foram capazes de promover diferentes modificações estruturais da progesterona nas condições experimentais empregadas, indicando seu potencial como fontes de biocatalisadores para transformações de esteroides.

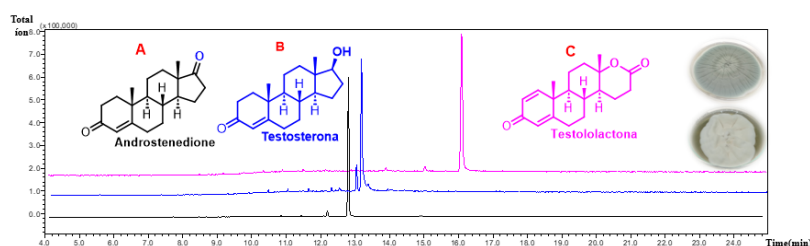


Figura 7- produtos isolados da biotransformação feita por *Penicillium*.

Conclusões

Os resultados demonstraram a capacidade de quatro linhagens de fungos filamentosos isoladas de solo amazônico em promover a biotransformação da progesterona, utilizada como substrato modelo. As linhagens dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* apresentaram perfis distintos de produtos de transformação, evidenciando diferenças na capacidade de modificação da estrutura esteroidal nas condições experimentais avaliadas. Diferentes produtos foram identificados por CG-EM, dos quais cinco foram isolados e caracterizados estruturalmente por espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C .

As linhagens de *Aspergillus* apresentaram formação de derivados hidroxilados da progesterona. *Aspergillus pseudoviridinutans* CBMAI 2755 produziu 11α -hidroxiprogesterona e $11\alpha,15\beta$ -di-hidroxiprogesterona, indicando a ocorrência de modificações de hidroxilação na molécula de progesterona. *Aspergillus niger* CBMAI 2756 também produziu 11α -hidroxiprogesterona, além de outros produtos de transformação, apresentando perfil metabólico distinto. A variação do pH influenciou a formação dos produtos: *A. pseudoviridinutans* apresentou formação de 11α -hidroxiprogesterona em pH 5,0, enquanto em pH 9,0 não foram observados produtos de biotransformação além da progesterona nas condições avaliadas. *A. niger* apresentou formação de 11α -hidroxiprogesterona tanto em pH 5,0 quanto em pH 9,0.

A avaliação cinética demonstrou alterações no perfil cromatográfico ao longo do período de reação, com diferenças entre as linhagens quanto ao momento de aparecimento e à formação dos produtos. Esses resultados indicam que o tempo de reação e o pH são fatores que influenciam a biotransformação da progesterona pelas linhagens de *Aspergillus* avaliadas.



As linhagens de *Penicillium* promoveram transformações mais amplas da progesterona, com formação de androstenediona, testosterona, testololactona e outros derivados esteroidais. Os produtos identificados são compatíveis com transformações estruturais envolvendo modificações da cadeia lateral da progesterona, alterações no grupo funcional em C17 e processos de lactonização. Entretanto, os resultados obtidos não permitem determinar diretamente as enzimas responsáveis por essas transformações. A comparação entre células miceliais inteiras e o sobrenadante livre de células demonstrou diferenças nos perfis dos produtos detectados, indicando que o sistema reacional empregado influencia as transformações observadas.

De maneira geral, os resultados indicam que as linhagens de fungos amazônicos avaliadas apresentam capacidade de promover modificações estruturais seletivas da progesterona sob condições reacionais brandas. A obtenção de diferentes derivados esteroidais evidencia o potencial dessas linhagens como fontes de biocatalisadores para transformações de interesse biotecnológico. Os resultados também contribuem para ampliar o conhecimento sobre a diversidade metabólica de fungos isolados de ambientes amazônicos e sobre seu potencial para aplicações em processos de biotransformação de esteroides.

Agradecimentos

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, nº 88881.716142/2022-01) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, nº 402635/2023-0, 445078/2024-3 e 444009/2024-8).

Referências

BERCZELLER, Peter H.; YOUNG, Iven S.; KUPPERMAN, Herbert S. The therapeutic use of progestational steroids. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, v. 5, n. 2, p. 216–225, 1964.

BHATTI, Haq Nawaz; KHERA, Rasheed Ahmad. Biological transformations of steroidal compounds: a review. *Steroids*, v. 77, n. 12, p. 1267–1290, 2012.

BORNSCHEUER, Uwe T. et al. Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature*, v. 485, n. 7397, p. 185–194, 2012.

DE CARVALHO, Carla C. C. R. Whole cell biocatalysts: essential workers from nature to the industry. *Microbial Biotechnology*, v. 10, n. 2, p. 250–263, 2017.

DE PAULA, Samuel Filipe Cardoso; ROSSET, Isac George; PORTO, André Luiz Meleiro. 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, p. 102167, 2021.

FABER, Kurt. *Biotransformations in organic chemistry*. Cham: Springer International Publishing, 2018.

KICMAN, A. T. Pharmacology of anabolic steroids. *British Journal of Pharmacology*, v. 154, n. 3, p. 502–521, 2008.



KULKARNI, Aparna G.; LELE, Smita S.; KULKARNI, Pushpa R. Improved adsorption of *Aspergillus niger* 589 spores on high-density polyethylene for progesterone biotransformation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 86, n. 5, p. 510–512, 1998.

LIGHTMAN, Susan. Use of steroids and immunosuppressive drugs in the management of posterior uveitis. *Eye*, v. 5, n. 3, p. 294–298, 1991.

MENDOZA, Anita Yris Garcia et al. Potencialidades biotecnológicas dos fungos da Amazônia brasileira: uma revisão sistemática. *Diversitas Journal*, v. 7, n. 4, 2022.

NÓBREGA, Patrícia de A. et al. Isolation and identification of iron, chromium, and manganese tolerant filamentous fungi from mining soil. *Current Biotechnology*, v. 13, 2024.

VIGO, Francieli; LUBIANCA, Jaqueline Neves; CORLETA, Helena von Eye. Progestógenos: farmacologia e uso clínico. *Femina*, v. 39, p. 127–137, 2011.