

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL**  
**UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE DOURADOS**  
**CURSO DE QUÍMICA INDUSTRIAL**  
**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**VANESSA ELLEN XAVIER MARTINS**

**BIOTRANSFORMAÇÃO DO ESTEROIDE PROGESTERONA PELO FUNGO DE**  
**ORIGEM MARINHA DA FAMÍLIA *XYLARIACEAE***

**Dourados**

**2016**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL**  
**UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE DOURADOS**  
**CURSO DE QUÍMICA INDUSTRIAL**  
**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**VANESSA ELLEN XAVIER MARTINS**

**BIOTRANSFORMAÇÃO DO ESTEROIDE PROGESTERONA PELO FUNGO DE  
ORIGEM MARINHA DA FAMÍLIA *XYLARIACEAE***

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado como requisito parcial para  
obtenção do título de Bacharel em  
Química Industrial, sob a orientação do  
Prof. Dr. Alex Haroldo Jeller.

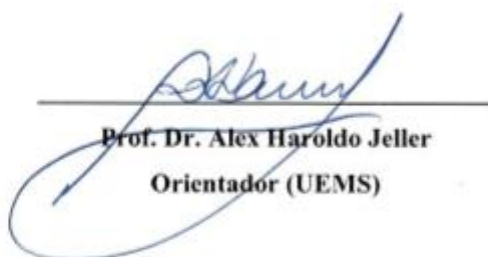
**Dourados**  
**2016**

Vanessa Ellen Xavier Martins

**BIOTRANSFORMAÇÃO DO ESTEROIDE PROGESTERONA PELO FUNGO DE  
ORIGEM MARINHA XYLARIACEAE**

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado como requisito parcial para  
obtenção do título de Bacharel em  
Química Industrial, sob a orientação do  
Prof. Dr. Alex Haroldo Jeller.

**BANCA EXAMINADORA**



**Prof. Dr. Alex Haroldo Jeller**  
Orientador (UEMS)



**Prof. Dr. Cláudio Rodrigo Nogueira (UFGD)**



**Profa. Dra. Silvia Cristina Heredia Vieira (UEMS)**

**Dourados, junho de 2016**

M347b Martins, Vanessa Ellen Xavier

Biotransformação do esteroide progesterona pelo fungo de origem marinha da família *Xylariaceae*/Vanessa Ellen Xavier Martins. Dourados, MS: UEMS, 2016.

39p. ; 30 cm.

Trabalho de Conclusão do Curso– Química Industrial–  
Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2016.  
Orientador: Prof. Dr. Alex Haroldo Jeller.

1.Biotransformação 2.Química orgânica 3.Progesterona I!  
Título.

CDD 23.ed. 547

*Dedico este trabalho aos meus pais,  
Franciangela (in memoriam) e Clindomar.  
Obrigada por serem fonte de inspiração, apoio e carinho.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela oportunidade de vida, saúde, forças e coragem durante toda esta longa caminhada.

Aos meus pais, Franciangela Xavier Martins (*in memoriam*) e Clindomar Moreira Martins, que sempre estiveram, mesmo de longe, apoiando-me nas minhas decisões, e que sem dúvida, foram as pessoas que deram o maior incentivo para conseguir concluir este trabalho. Ao meu querido irmão, Lucas Hiago Xavier Moreira, que sempre me encorajou a chegar até o final.

Em especial ao professor Alex Haroldo Jeller, pela orientação, incentivo, confiança e amizade durante a maior parte dessa jornada.

Aos demais professores do curso, por auxiliarem em minha formação.

Aos amigos que aqui conquistei e com que pude dividir as mais variadas emoções.

E ao meu Lindo, que sempre me deu forças para superar as mais complexas das dificuldades.

Ao laboratório Centro de Pesquisa em Biodiversidade (CPBio), pela oportunidade de realização deste trabalho.

À parceria com Profa. Dra. Hosana M. Debonsi, pela coleta dos fungos marinhos utilizados neste trabalho.

Aos parceiros, a doutoranda Carlise Frota e a Prof. Dra. Claudia Andrea Lima Cardoso pela realização dos espectros e cromatogramas utilizados neste trabalho.

À UEMS, pelas bolsas cedidas pelos programas institucionais PIBIC e PIBEX ao longo da graduação.

À todas as pessoas, que de forma direta ou indireta, me influenciaram e fizeram-me crescer, tanto pessoalmente quanto profissionalmente.

À todos, a minha eterna gratidão.

## RESUMO

Este trabalho visou realizar a biotransformação do esteroide progesterona utilizando fungo de origem marinha da família *Xylariaceae* como biocatalisador na reação. A purificação dos produtos foi realizada por meio de cromatografia em coluna, analisada por cromatografia em camada delgada comparativa. A identificação do produto majoritário foi feita por técnicas de RMN mono e bidimensionais. A avaliação da pureza do produto majoritário foi realizada por meio de análise de cromatografia gasosa, observando um bom grau de pureza. O principal produto de biotransformação da progesterona identificado foi a redução da carbonila não conjugada em hidroxila, o que resultou na obtenção da 20-hidroxiprogesteronona, tendo como rendimento aproximado de 31%. Outro produto foi ainda obtido pela biotransformação, entretanto devido à sua baixa pureza, este não pode ser caracterizado estruturalmente.

**Palavras-chave:** Biotransformação, substâncias esteroideais, fungos marinhos.

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AD	Androstenodiona
CC	Cromatografia em coluna
CCDC	Cromatografia de camada delgada comparativa
CG	Cromatografia gasosa
HAC	Hiperplasia adrenal congênita
HMBC	“Heteronuclear Multiple Bond Correlation”
HMQC	“Heteronuclear Multiple Quantum Coherence”
<i>m</i>	Multiplete
MHz	Megahertz
PDA	Potato Dextrose Ágar
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão
Rf	Fator de retenção
RMN de <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN de <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
rpm	Rotação por minutos
<i>s</i>	Singleto
T68	Fungo <i>Xylariaceae</i>
T69	Fungo <i>Penicillium waksnanii</i>
TMS	Tetrametilsilano
<i>t<sub>R</sub></i>	Tempo de retenção (min)
UV	Ultravioleta
$\alpha$	Alfa
$\delta$	Deslocamento químico



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Exemplos de alcaloides e flavonoides, e seus respectivos usos.....	14
<b>Figura 2</b>	Exemplos de terpenoides apresentando suas classes e principais usos.....	15
<b>Figura 3</b>	Exemplos de esteroides e suas respectivas ações biológicas.....	16
<b>Figura 4</b>	Estrutura do hormônio natural progesterona.....	17
<b>Figura 5</b>	Hidroxilação microbiana da progesterona em escala industrial.....	19
<b>Figura 6</b>	Hidroxilação da progesterona por bactéria termofílica.....	20
<b>Figura 7</b>	Hidroxilação da progesterona pelo fungo <i>Mucor griseocyanus</i> .....	20
<b>Figura 8</b>	Crescimento do fungo marinho T68 em meio sólido.....	27
<b>Figura 9</b>	Crescimento do fungo marinho T69 em meio sólido.....	27
<b>Figura 10</b>	Placa cromatográfica após a reação de biotransformação com o fungo T68, as amostras A até T são referentes aos possíveis produtos biotransformados, X (à esquerda) progesterona pura.....	28
<b>Figura 11</b>	Placa cromatográfica das substâncias A (progesterona pura), B o produto 1 e C o produto 2 obtidos (solventes utilizados na eluição= hexano:acetato de etila 7:3, revelador: $\text{KMnO}_4$ ).....	29
<b>Figura 12</b>	Cromatograma A obtido por CG da progesterona pura mostrando $t_R = 38,3$ min.....	29
<b>Figura 13</b>	Cromatograma obtido por CG de B do produto 1, mostrando $t_R = 38,9$ min; e o cromatograma C do produto 2 apresentando o primeiro pico com $t_R = 34,8$ min e outro em $t_R = 38,3$ min.....	30
<b>Figura 14</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ a (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do produto 1.....	31
<b>Figura 15</b>	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ a (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do produto 1.....	32
<b>Figura 16</b>	Espectro de HMQC (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do produto 1.....	33
<b>Figura 17</b>	Espectro de HMBC (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do produto 1.....	33
<b>Figura 18</b>	Estrutura do possível produto 1 e os acoplamentos de HMBC(azul) e HMQC (vermelho).....	34
<b>Figura 19</b>	Reação de biotransformação da progesterona realizada pelo fungo marinho <i>Xylariaceae</i> sp.....	34

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Dados espectrométricos de $^{13}\text{C}$ do produto <b>1</b> (P1) em comparativo com os sinais da progesterona obtidos em literatura (L1 = HU, GENAIN e AZERAD, 1995; L2 = HABIBI <i>et al.</i> , 2012).....	<b>31</b>
<b>Tabela 2</b>	Dados espectrométricos de RMN de $^1\text{H}$ , de $^{13}\text{C}$ , HMQC e HMBC referentes ao produto <b>1</b> .....	<b>33</b>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
	1.1 Biotecnologia e biotransformação .....	12
	1.2 Metabólitos secundários .....	13
	1.3 Esteroides.....	17
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>24</b>
	3.1 Fungos marinhos.....	24
	3.2 Crescimento dos fungos marinhos .....	24
	3.2.1 Composição de sais para preparo da água do mar artificial .....	24
	3.2.2 Ativação dos fungos marinhos.....	24
	3.3 Composição e preparo dos meios de cultura.....	25
	3.3.1 Meio sólido de malte 2%.....	25
	3.3.2 Repique e crescimento dos fungos no meio sólido .....	25
	3.3.3 Meio líquido de malte 2%.....	25
	3.3.4 Repique e crescimento dos fungos no meio líquido.....	25
	3.4 Reação de biotransformação .....	26
	3.5 Análise por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) .....	26
	3.6 Isolamento e purificação por cromatografia em coluna .....	26
	3.7 Identificações por análises espectroscópicas de RMN unidimensionais e bidimensionais e análise de CG .....	27
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>28</b>
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>36</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>37</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Biotecnologia e biotransformação

A história da biotecnologia confunde-se com a história da própria humanidade. Desde os primórdios da civilização, os micro-organismos são utilizados na produção de alimentos. Registros arqueológicos indicaram que bebidas alcoólicas obtidas pela fermentação de grãos de cereais eram conhecidas pelos sumérios e babilônios antes do ano 6000 a.C. (JUBE e BORTHAKUR, 2006; VILLEN, 2009), sem que houvesse conhecimento sobre as bases científicas que regem o bioprocessos. Entretanto, foi somente a partir de 1665, quando Robert Hooke descobriu a existência de células em um pedaço de cortiça, no que o homem começou a despertar interesse para o mundo microscópico, com isso, iniciou-se uma série de descobertas e inovações na biologia (BLACK, 2002).

No contexto atual, os bioprocessos são definidos quando em alguns procedimentos são utilizados agentes biológicos. Nestes bioprocessos são empregados um conjunto de operações que efetuam o tratamento da matéria-prima/resíduo, o preparo dos meios de cultura para os micro-organismos, como a esterilização (quando o processo demandar) e a transformação do substrato em produtos por rota bioquímica, seguida de processos de separação e purificação de produtos (PEREIRA Jr, BON e FERRARA, 2008).

Geralmente os bioprocessos empregam diferentes micro-organismos para produção de substâncias de interesse comercial como: antibióticos, ácidos orgânicos, solventes, enzimas e biocombustíveis por processos fermentativos, entre outros. Os micro-organismos também são produtos, como a fabricação de levedura de panificação e de inoculantes agrícolas; as células microbianas podem ser aplicadas em processos de biotransformação, por exemplo, para a produção de esteroides, aromas e fragrâncias. Também podem ser muito utilizados em processos de tratamento de resíduos, efluentes urbanos e industriais; na recuperação de metais ou em processos de biorremediação de solos contaminados (PEREIRA Jr, BON e FERRARA, 2008).

Segundo Pinheiro (2006), dentro da Biotecnologia encontra-se a biocatálise e/ou biotransformação, as quais utilizam sistemas biológicos como células íntegras (livres ou imobilizadas), extratos de enzimas ou enzimas isoladas para a catálise e transformação de substâncias naturais ou xenobióticos. Porém, estas podem ser confundidas com o processo de fermentação, que é um processo de obtenção de energia que ocorre sem a presença de

gás oxigênio, portanto, trata-se de uma via de produção de energia anaeróbia, necessitando-se de um substrato adequado.

A biotransformação acontece quando ocorre a modificação estrutural de uma substância. Um exemplo são as substâncias denominadas metabólitos secundários, das quais é possível obter uma série de substâncias para diagnóstico, sendo essas substâncias produtos da biotransformação, as quais são utilizadas, por exemplo, no controle e no tratamento de doenças. Este processo de biotransformação é um dos mais adequados para a produção de isômeros opticamente puros, que são intermediários importantes a serem usados em química fina. Portanto, a partir da biotransformação é possível preparar, obter e produzir vitaminas, inseticidas, fragrâncias, aromatizantes e fármacos como os hormônios esteroidais e anticoncepcionais, entre outros produtos de grande interesse industrial (MERGULHÃO *et al.*, 2009).

## 1.2 Metabólitos secundários

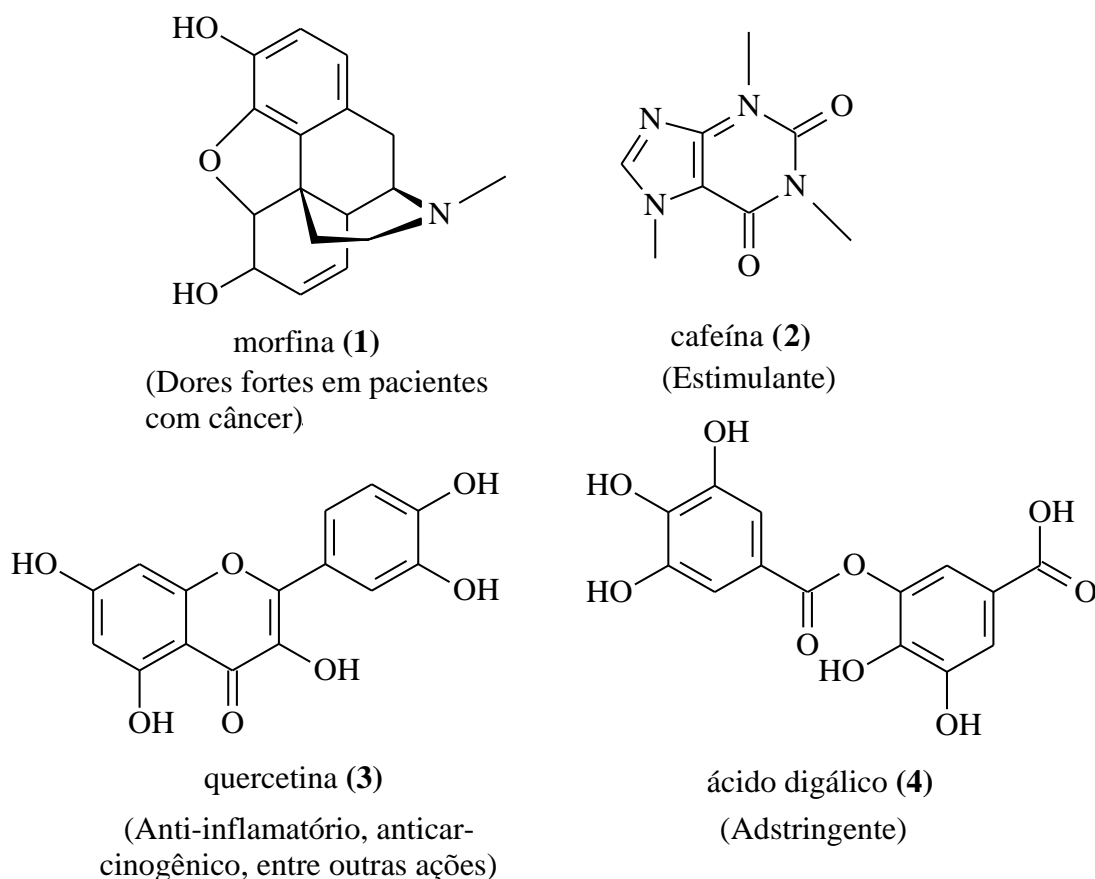
O metabolismo pode ser definido como uma série de reações nos organismos que são catalisadas por enzimas resultando na produção e utilização de substâncias presentes nos organismos vivos. O metabolismo primário, que é praticamente igual em todos os tipos de organismos, são aqueles em que as substâncias resultantes são utilizadas em funções vitais no organismo, como a fotossíntese e a respiração das plantas por exemplo. Por outro lado, o metabolismo secundário é caracterizado pela produção de substâncias que não são usadas diretamente para a sobrevivência do organismo, mas que podem ajuda-lo a adaptar-se melhor ao ambiente em que vive, atuando também como mecanismo de defesa, como por exemplo, das plantas (BENNET e BENTLEY, 1989).

Segundo Harborne (1989) os metabólitos secundários possuem classes, que se dividem em substâncias fenólicas, terpenos e alcaloides; em que estes são denominados de acordo com sua via biossintética. Essas substâncias fenólicas são metabólitos que apresentam um anel aromático, e que possuem uma ou mais hidroxilas ligadas aos anéis, responsáveis por várias funções, como de defesa da planta, pela cor das flores. Estes compostos oxidam facilmente, gerando produtos que formam complexos com proteínas inibindo a atividade enzimática (CROTEAU, KUTCHAN e LEWIS, 2000).

Os alcaloides constituem o grupo de metabólitos secundários que contém o maior número de substâncias com atividades biológicas variadas. Até o momento, mais de 12.000 alcaloides foram isolados e as suas estruturas identificadas (CROTEAU, KUTCHAN e

LEWIS, 2000; YAZAKI, 2004). Os alcaloides são compostos orgânicos heterocíclicos, que possuem um ou mais nitrogênios em seu esqueleto carbônico, encontram-se em 15% das plantas vasculares pertencentes a mais de 150 famílias. No entanto, estas substâncias também ocorrem nas plantas inferiores, animais e micro-organismos. Essas substâncias possuem funções de proteção das plantas contra insetos e herbivoria, atuando na forma de “substâncias de reserva” capazes de fornecer azoto ou outros elementos necessários ao desenvolvimento (BHAT, NAGASAMPAGI e SIVAKUMAR, 2005). Na figura 1 estão apresentados alguns exemplos de substâncias alcalóidicas e fenólicas.

**Figura 1** - Exemplos de alcaloides (1 e 2) e flavonoides (3 e 4), e seus respectivos usos.



**Fonte:** EMERY, SANTOS e BIANCHI (2010).

As fragrâncias características dos perfumes foram obtidas durante muito tempo exclusivamente a partir de óleos essenciais extraídos de flores, folhas e raízes. Os óleos essenciais são metabólitos secundários produzidos pelas plantas, pois possuem a essência, ou seja, aquilo que confere as plantas seu odor característico, e geralmente essas substâncias são voláteis (STEWART, 2006). Todos os órgãos de uma planta podem

acumular componentes voláteis, sua composição pode variar segundo a localização (SIMÕES *et al.*, 2004).

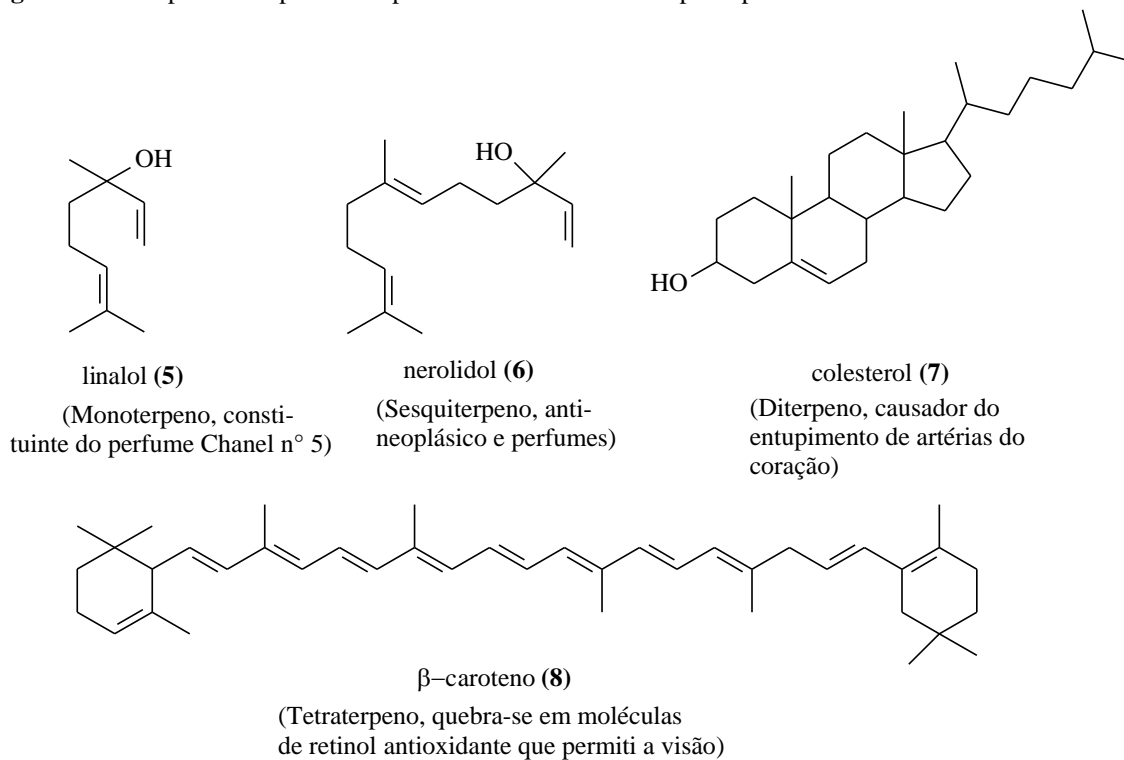
Embora os óleos essenciais sejam geralmente obtidos a partir de fontes naturais, estes têm sido substituídos cada vez mais por terpenos sintetizados, os quais são utilizados nas indústrias de fragrâncias e sabores artificiais, devido o diferencial custo no mercado causado pela falta de pesquisa das composições, princípios ativos e toxicidade dos componentes naturais, que ainda assim, são impedidos de serem utilizados em escala industrial segundo Stewart (2006) e Jakiemiu (2008).

Uma grande contribuição da química sintética tem sido a possibilidade de preservação de certas espécies animais e vegetais que correm o risco de extinção devido à procura desenfreada de óleos essenciais. Outra contribuição é o barateamento dos perfumes e medicamentos, permitindo seu uso por uma fatia mais ampla da população (SILVA e DIAS, 1996).

Os terpenos é o grupo mais diversificado dos metabólitos secundários, e já foram identificados mais de 55.000 compostos (CHANG *et al.*, 2010). São formados por condensações repetitivas de unidades  $C_5$  ramificadas, com base na molécula de isopreno, um dos voláteis mais abundantes liberados de tecidos fotossinteticamente ativos. Dependendo do número das unidades de isopreno, os terpenos podem ser denominados de hemiterpenos ( $C_5$ ), monoterpenos ( $C_{10}$ ), sesquiterpenos ( $C_{15}$ ), diterpenos ( $C_{20}$ ), triterpenos ( $C_{30}$ ), tetraterpenos ( $C_{40}$ ), também chamados de carotenos, e politerpenos ( $(C_5)_n$  sendo  $n > 8$  conhecidos por borrachas) (CROTEAU, KUTCHAN e LEWIS, 2000; YAZAKI, 2004).

Os monoterpenos ( $C_{10}$ ) são constituídos por duas unidades de isopreno. Devido a sua baixa massa molecular, estes costumam ser muito voláteis, atuando na atração de polinizadores, sendo que estes têm sido empregados nas indústrias de perfumes e fragrâncias, produção de especiarias, culinária e condimentos. Os sesquiterpenos ( $C_{15}$ ) são encontrados nos óleos essenciais e em hormônios vegetais, constituindo a maior classe de terpenoides (OLIVEIRA, GODOY e COSTA, 2003) Os triterpenos ( $C_{30}$ ) compreendem um grande grupo de substâncias não voláteis, que após oxidação gera produtos que possuem variedade de atividades diferentes, que incluem os hormônios e agentes anticancerígenos, também denominados esteroides (CROTEAU, KUTCHAN e LEWIS, 2000; OLIVEIRA, GODOY e COSTA, 2003). Na figura 2 são representados alguns exemplos das classes dos terpenoides citados anteriormente.

**Figura 2** - Exemplos de terpenoides apresentando suas classes e principais usos.



**Fonte:** EMERY, SANTOS e BIANCHI, (2010).

A biotransformação de terpenos é de interesse porque ele permite a produção de sabores puros e fragrâncias sob condições de reações suaves. Os produtos fabricados por processos de biotransformação são considerados como naturais, pois utilizam enzimas como biocatalisadores, sendo elas extratos celulares e células inteiras de bactérias, cianobactérias, leveduras, microalgas, fungos ou plantas (CARVALHO e FONSECA, 2006). A maioria dos terpenos têm propriedades hidrofílicas com o solvente orgânico, que auxilia na redução de sua toxicidade para os micro-organismos serem utilizados para a biotransformação (CARVALHO e FONSECA, 2002).

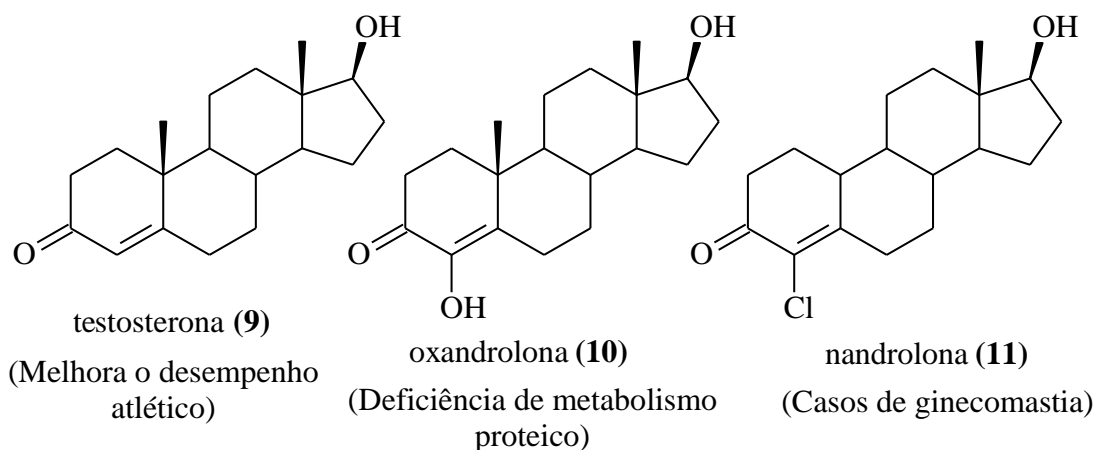
Os diterterpenos podem ser utilizados como substrato nessas reações, devido a sua maior quantidade de carbonos ligados aos anéis aromáticos, como por exemplo, a substância **7**, que faz com que dificulte a volatilização da substância evitando, assim, perdas de material no decorrer do procedimento da reação. Dentro da classe dos diterpenos, têm-se os esteroides, que são componentes dos lipídios de membrana e precursores de hormônios esteroides em mamíferos (progesterona, testosterona), em plantas (brassinosteroides) e também para insetos (ecdiesteroides) (DIENER *et al.*, 2000). Com isso, os esteroides tornaram-se muito interessantes em estudos que envolvem reação de biotransformação.



### 1.3 Esteroides

Segundo Constanzo (1999), hormônios são substâncias químicas secretadas, em pequenas quantidades na circulação sanguínea, que são transportados até os tecidos-alvos e produzem uma resposta fisiológica. Sendo estes quimicamente classificados como aminas, proteínas/peptídeos e esteroides. Os hormônios esteroidais incluem os hormônios adrenocorticais, os metabólitos ativos da vitamina D e aqueles produzidos pelas gônadas, sendo o colesterol o precursor comum desta classe (BERNE e LEVY, 2000; SILVA, DANIELSKI e CZEPIELEWSKI, 2002; CUNHA *et al.*, 2004). Na figura 3 a seguir estão apresentados alguns exemplos de hormônios esteroidais.

**Figura 3** - Exemplos de esteroides e suas respectivas ações biológicas.



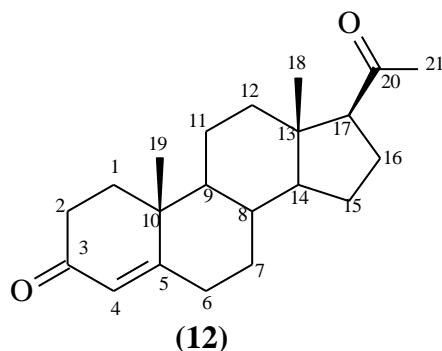
**Fonte:** CUNHA *et al.* (2004).

Os hormônios esteroidais possuem um núcleo básico derivado da estrutura química do colesterol, portanto são hormônios de natureza lipídica. A biossíntese, dos hormônios esteroidais é restrita a alguns tecidos, como o córtex das glândulas adrenais e gônadas, os quais expressam diferentes formas do complexo enzimático P-450, responsável pelo processamento da molécula de colesterol. Os esteroides são classificados em corticosteroides, andrógenos, estrógenos e progestágenos responsáveis por algumas funções no organismo, tais como, controle metabólico, hidro-salino e sexual (BIANCO e RABELO, 1999).

Os progestágenos são hormônios esteroides que podem ser sintéticos ou naturais. A progesterona (Figura 4) é o único natural, produzido pelo corpo lúteo ovariano (glândula endócrina que secreta o hormônio) após a ovulação, pela placenta durante a gestação, pelas

adrenais e pelo sistema nervoso. Os progestágenos sintéticos tentam mimetizar o efeito da progesterona, e são chamados de progestinas (SITRUK-WARE, 2006; VIGO, LUBIANCA e CORLETA, 2011).

**Figura 4** - Estrutura do hormônio natural progesterona.



A progesterona possui diversas atividades biológicas, mantém a gestação por meio de seus efeitos antiestrogênicos, transforma o endométrio (mucosa do útero) em um tecido secretor, permitindo a implantação do embrião e evitando um novo episódio de ovulação por seu efeito antigonadotrófico, que tem poder contraceptivo quanto ao hormônio, como afirma Sitruk-Ware (2004). A progesterona natural vem ganhando atenção no uso de terapia hormonal, pois, além de proteger o endométrio, causa menor sangramento vaginal e menor impacto no perfil lipídico (STANCZYK, 2002).

As substâncias esteroidais estão entre os produtos mais produzidos na indústria farmacêutica. Estes são submetidos em reações altamente específicas requeridas para produzir compostos funcionais com uso terapêutico e com algum valor comercial. A estrutura complexa da molécula de esteroide requer esquemas complicados, utilizando múltiplas etapas para a síntese química, produzindo frequentemente derivados intermediários com grupos protegidos e ocorrendo sua regeneração subsequente. A reação pretendida ocorre, porém limitando o rendimento total do processo e elevando o valor do custo e o tempo gasto nesse processo (FERNANDES *et al.*, 2003).

Segundo Fernandes *et al.* (2003) a síntese química das substâncias esteroidais requer o uso dos reagentes tais como piridina, trióxido de enxofre ou dióxido de selênio que são nocivos à saúde e constituem um problema ambiental para o descarte. As conversões microbianas esteroidais são executadas em condições suaves de temperatura e de pressão, fornecendo assim uma alternativa eficiente à síntese química para o desenvolvimento de processos de produção, uma vez que as limitações encontradas

frequentemente de níveis insatisfatórios de produtividade e/ou de purificação dos produtos de conversão são superadas. A indústria de esteroides acopla assim o produto químico e aproximações biológicas e faz exame das vantagens dos melhores aspectos de cada um.

A complexidade de moléculas com núcleo esteroidal torna o uso da biotransformação particularmente interessante, devido a régio e a estéreo-seletividade elevada das reações a serem executadas. Estas características, junto com as circunstâncias suaves requeridas para a bioconversão, conduziram ao desenvolvimento dos processos de produção biológico de rendimento elevado, que são mais amigáveis ao ambiente do que os processos químicos de síntese, uma característica que desperta um interesse principal da indústria farmacêutica (FERNANDES *et al.*, 2003; MOREIRA, 2009).

Segundo Oliveira e Oliveira (2012) a maioria dos processos industriais de produção de esteroides utilizam matérias-primas obtidas de fontes naturais, devido sistemas microbianos apresentarem flexibilidade na produção de substâncias largamente utilizadas na indústria farmacêutica. Recentemente, tem havido um grande interesse pela procura de métodos alternativos na produção de esteroides. A alta disponibilidade da principal matéria-prima, a diosgenina, é preocupante devido o baixo suprimento requerido pela indústria. Devido a sua grande abundância natural e semelhança estrutural com os esteroides, esteróis como o  $\beta$ -sitosterol que pode ser isolado da fração insaponificável de óleos vegetais, é uma matéria-prima alternativa na produção de novos esteroides intermediários como a androstenodiona (AD), um importante intermediário nessa indústria como repositores hormonal.

A substância AD é um membro representante da família de 17- ceto esteróides, que por sua vez pode ser utilizada para a produção de diversos derivados esteróides, tais como a testosterona, estradiol, etinilestradiol, testolactona, progesterona, cortisona. Trata-se de um hormônio que ocorre naturalmente e é produzido na gônada ou no ovário. A testosterona é o hormônio sexual masculino (androgênios) mais potente e o estradiol é o hormônio sexual feminino mais potente denominado estrogênio (WESTFECHTEL e BEHLER, 2006).

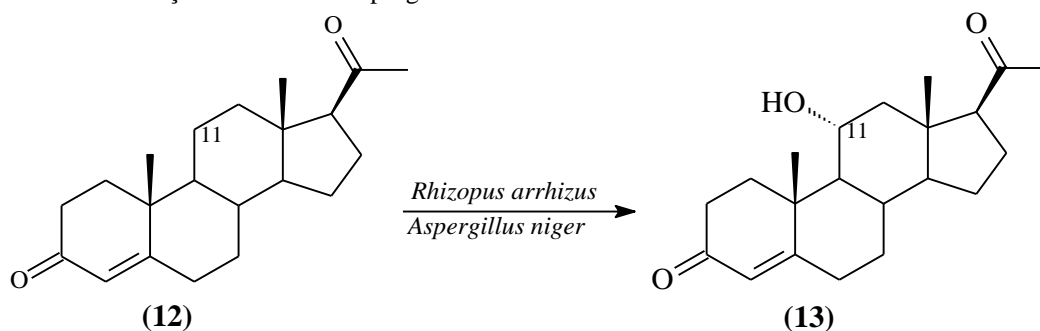
Neste sentido, a transformação de esteroides se difundiu principalmente para produção de novos fármacos e hormônios, em que são mais utilizados como anti-inflamatórios, diuréticos, contraceptivos e agentes anticâncer, entre outros. Diversos estudos são realizados com um grande número de micro-organismos diferentes, que apresentam resultados interessantes nas reações de biotransformação, certificando assim um alto poder de transformação desses esteroides (MAHATO e MAJUMDAR, 1993).

A variedade de aplicações e atividade de terpenoides possuem tentativas de modificar a sua estrutura de base para melhorar suas propriedades, tanto por síntese química que não é um método ambientalmente correto, mas existe a biotransformação que é um processo alternativo, em que os metabólitos formados possuem propriedades diferentes das drogas originais, com características mais hidrofílicas, tendo por objetivo facilitar a excreção pelo organismo (MEYER, 1996; KURIATA-ADAMUSIAK, STRUB e LOCHYNSKI, 2012).

A primeira etapa da degradação metabólica de substratos orgânicos são as reações de oxidação. Por isso, que as reações de oxigenação devem ser acompanhadas frequentemente, por possibilidade de ocorrerem transformações subsequentes dos produtos gerados resultando em baixos rendimentos. Quando as células que contém as enzimas ficam intactas, seriam a chave para se conseguir elevados rendimentos nas reações de oxigenação, ação denominada de bloqueio seletivo das etapas metabólicas (PETERSEN, 2006).

Como por exemplo, pode-se citar a hidroxilação régio-seletiva do esteroide progesterona **12**, que é muito utilizado em escala industrial. A hidroxilação da substância **13** na posição 11 $\alpha$ , efetuada por *Rhizopus arrhizus* ou *Aspergillus niger* (PETERSON, MURRAY e EPPSTEIN, 1952) (Figura 5) elimina cerca da metade das 37 etapas da síntese do esteroide, resultando em uma redução considerável dos custos da sua produção.

**Figura 5** - Hidroxilação microbiana da progesterona em escala industrial.

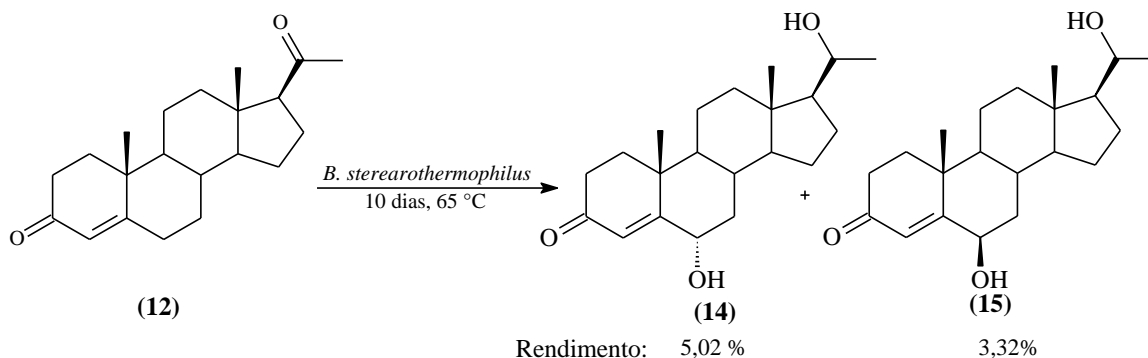


Fonte: PETERSON, MURRAY e EPPSTEIN (1952).

Outro estudo evidencia a biotransformação da progesterona com a bactéria *Bacillus stearothermophilus*, ocorrendo à formação de dois produtos, como apresentado na figura 6 a seguir. O produto **14** é o 6 $\beta$ ,20 $\alpha$ -di-hidroxiprogesterona e o **15** o 6 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -di-hidroxiprogesterona obtiveram respectivamente, 5,02 e 3,32% de rendimento conforme

cita Al-Awadi Afzal e Oommen (2002). Estes resultados comprovam que bactérias termofílicas possuem grande potencial microbiano para transformação de esteroides.

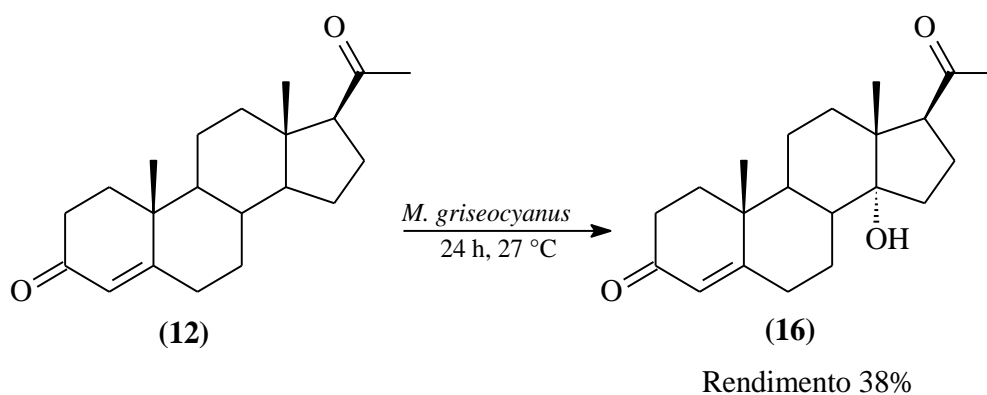
**Figura 6** - Hidroxilação da progesterona por bactéria termofílica.



Fonte: AL-AWADI AFZAL e OOMMEN (2002).

Segundo Hu, Genain e Azerad (1995) o fungo *Mucor griseocyanus* utilizando o substrato progesterona, foi transformado de forma mais efetiva, ou seja, obteve maior produção após as 24 h de reação, convertendo-se no produto 14α-di-hidroxiprogesterona (16) com rendimento próximo de 39% como mostra a figura 7 a seguir. Entretanto, este produto foi convertido rapidamente em produtos mais polares como o 6β,14α-di-hidroxiprogesterona e o 7α,14α-di-hidroxiprogesterona após 96 h. Este estudo também evidencia que os fungos possuem grandes atividades microbianas para transformação de esteroides, por causa da sua alta seletividade e por apresentar um maior rendimento dos produtos em menor tempo reacional.

**Figura 7** - Hidroxilação da progesterona pelo fungo *Mucor griseocyanus*.



Fonte: HU, GENAIN e AZERAD (1995).

Para que os esteróis possam ser utilizados como precursores de esteroides a cadeia lateral precisa ser clivada seletivamente em C-17 ou C-20, dando origem a esteroides C-19 ou C-21, bem como hidroxilas em posições como C-11 ou C-7 e oxidado em C-3 e C-7. Como não há método químico eficiente para esta conversão sem degradação da molécula, métodos microbiológicos têm sido empregados para estas conversões, utilizando *Brevibacterium* sp., *Rhodococcus* sp., *Rhodococcus corallina*, *Mycobacterium* sp., *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium vaccae*, *Pseudomonas* sp. como biocatalisadores (OLIVEIRA e BUENO, 1996; FABER, 2011)

Um estudo da progesterona através da ação da enzima 17 $\alpha$ -hidroxilase transforma-se em 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona e esta, por sua vez, influenciada pela enzima C17-20-liase, converte-se no hormônio androstenediona, ou seja, produtos de biotransformação segundo Toniollo *et al.*, (1998). Este estudo foi uns dos precursores para combater a hiperplasia adrenal congênita (HAC) é uma doença que se origina de mutações no gene codificador de enzimas que compõem a via de síntese dos glicocorticoides como o hormônio cortisol na glândula adrenal. O diagnóstico precoce da HAC só é possível pela realização do exame de triagem neonatal, conhecido como teste do pezinho em que é dosada uma quantidade da 17-hidroxiprogesterona que aumenta quando a produção do corticoide está bloqueada como afirma Nobrega *et al.* (2004). Este exame laboratorial evidencia que atualmente os produtos de biotransformação, neste caso da progesterona, já estão sendo usados para diagnóstico de casos que afetam o crescimento e desenvolvimento de crianças.

## 2 OBJETIVOS

- Crescimento dos fungos marinhos;
- Biotransformação da progesterona empregando o fungo marinho *Xylariaceae*;
- Identificação por análises espectroscópicas para caracterização estrutural dos produtos biotransformados.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Fungos marinhos

A coleta dos fungos marinhos utilizados neste trabalho foi realizada pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Química Orgânica de Produtos Naturais, coordenado pela Profa. Dra. Hosana M. Deboni (USP/Ribeirão Preto).

As cepas fúngicas identificadas são: *Cladosporium* sp. (M60); *Eytypella* sp. (M23); *Hydrospisphaera* sp. (M27); família *Xylariaceae* (T68); *Penicillium waksnanii* (T69); *Nigrospora oryzae* (T65); *Fungal* sp. (T70); *Acremonium implicatum* (T73) e *Nectriceae* (M63).

#### 3.2 Crescimento dos fungos marinhos

##### 3.2.1 Composição de sais para preparo da água do mar artificial

Para o preparo de 1 L de solução de água do mar artificial foi utilizando de água destilada (1 L) e balança analítica (SHIMADZU), foram pesadas as seguintes substâncias:  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (1,36 g),  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (9,68 g), KCl (0,61 g), NaCl (30,0 g),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,014 mg),  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (3,47 g),  $\text{NaHCO}_3$  (0,17 g), KBr (100,0 mg),  $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (40,0 mg),  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (30,0 mg), as quais foram homogeneizadas com o auxílio de um agitador magnético.

##### 3.2.2 Ativação dos fungos marinhos

Para a ativação dos fungos (conservado em óleo mineral) foi preparado um meio nutritivo proveniente da mistura de Potato Dextrose Agar (PDA) (ACUMEDIA) (39,0 g) e água do mar artificial (1 L), o qual foi equalizado, então, autoclavado a 127 °C durante 20 min.

Posteriormente, aproximadamente 30 mL do meio PDA foi transferido para placa de Petri, em capela de fluxo laminar (PACHANE), e após solidificação do meio, as cepas fúngicas foram repicadas a placa com o auxílio de bisturi. As placas foram então seladas com parafilm<sup>®</sup> e levadas à estufa (QUIMIS) por um período de 7-10 dias a 25 °C para o crescimento. Esse procedimento foi realizado em triplicata.

Após este período, as placas foram conservadas em geladeira, sendo utilizadas posteriormente para o repique do meio sólido de malte 2% (itens 3.3.1 e 3.3.2) para crescimento.



### **3.3 Composição e preparo dos meios de cultura**

#### **3.3.1 Meio sólido de malte 2%**

O meio sólido foi preparado em Erlenmeyer de 1 L, adicionando 1 L de água do mar artificial, 20 g de extrato de malte e 15 g de ágar (HIMEDIA). O pH da solução foi ajustado utilizando um pHmetro (HANNA) para 8,0 com NaOH (0,4 mol.L<sup>-1</sup>), o meio foi posteriormente autoclavado (PHOENIX) à temperatura de 127 °C por 20 min.

Placas de Petri foram usadas para a transferência do meio de malte 2%, que inicialmente foram limpas com etanol 70% e posteriormente esterilizadas. Após este processo, antes que a solução de meio sólido de malte 2% esfriasse, as placas de Petri foram colocadas em capela de fluxo laminar, para as quais foram transferidos cerca de 30 mL do meio de malte 2% para cada placa. Após solidificação, o que levou cerca de 10 min, as placas foram seladas com parafilm<sup>®</sup>, e em seguida, conservadas em geladeira, para posterior repique dos fungos.

#### **3.3.2 Repique e crescimento dos fungos no meio sólido**

A partir das placas contendo os fungos ativados em meio PDA, foram realizados os repiques destes para as placas de Petri contendo o meio sólido de malte 2%. Estes fungos foram cortados, com bisturi esterilizado em bico de Bunsen, cerca de 5 fragmentos de micélios fúngicos (0,5 x 0,5 cm), sendo posteriormente fechadas com parafilm<sup>®</sup> e encobertos por insulfilme. Posteriormente, foram mantidos em estufa por 10 dias, em temperatura de 25°C, para o crescimento.

#### **3.3.3 Meio líquido de malte 2%**

O meio líquido foi preparado adicionando em um frasco Erlenmeyer de 1 L água do mar artificial (1 L) e extrato de malte (20 g). O pH da solução foi ajustado com o pHmetro em 8,09 com NaOH (0,4 mol.L<sup>-1</sup>) e o meio foi posteriormente autoclavado em temperatura de 127 °C por 20 min. Após a solução ser resfriada, a mesma foi utilizada para o meio de cultura dos fungos.

#### **3.3.4 Repique e crescimento dos fungos no meio líquido**

Em Erlenmeyers de 250 mL foi feita a transferência do meio líquido, que inicialmente foram limpos com etanol 70% e posteriormente esterilizados. Estes Erlenmeyers foram colocados na capela de fluxo laminar, nos quais foram transferidos cerca de 100 mL do meio líquido, sempre em triplicata para cada espécie. Posteriormente,

com o auxílio de bisturi esterilizado, foram colocados cerca de 5 fragmentos de micélios dos fungos (0,5 x 0,5 cm) provenientes do crescimento em meio sólido de malte 2%. Estes foram devidamente tampados. Após este processo, os frascos foram colocados no agitador rotativo (CIENTEC) para crescimento, sendo mantido à temperatura de 25 °C e 125 rpm por 8 dias.

### **3.4 Reação de biotransformação**

Para a reação de biotransformação, foram pesados 202 mg da progesterona (Sigma Aldrich), e esta foi solubilizada em 1,3 mL de acetato de etila. Esta solução foi dividida em 20 (máxima capacidade de Erlenmeyers no agitador rotativo) e adicionado ao fungo desenvolvido em meio líquido. Posteriormente, estes Erlenmeyers foram mantidos em agitação para que ocorresse biotransformação por 10 dias.

Após esse período, os frascos de Erlenmeyers foram retirados do agitador rotativo. Para separar os micélios da fase líquida, primeiramente foram adicionados 10 mL de acetato de etila em cada frasco, em seguida, estes foram colocados em ultrassom por 10 min cada. Posteriormente foi feita separação sólido-líquido a vácuo, depois de filtrado o líquido foi separado por extração líquido-líquido, empregando acetato de etila (3 vezes de 20 mL) (SYNTH) e sequencialmente em clorofórmio (3 vezes de 20 mL) (SYNTH).

Após a separação da fase orgânica, foi adicionado sulfato de sódio, e em seguida, a mesma foi levada a capela para evaporação completa. Por fim, as amostras foram analisadas por meio de cromatografia em camada delgada comparativa.

### **3.5 Análise por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)**

A reação de biotransformação foi analisada por CCDC de sílica gel 60 (F<sub>254</sub>). Para isso, as amostras foram aplicadas, com o auxílio de capilar, nas placas e estas foram eluídas utilizando o sistema solvente hexano/acetato de etila, na proporção 7:3 v/v, respectivamente. Posteriormente, foram visualizadas em câmara com luz ultravioleta (UV) (254 nm), e em seguida, reveladas com permanganato de potássio.

### **3.6 Isolamento e purificação por cromatografia em coluna**

Após a análise de CCDC, as amostras foram purificadas por CC. Primeiramente, foi feito o empacotamento da coluna com sílica, utilizando sistema de hexano/acetato de etila. Para aplicar a amostra, esta foi dissolvida em clorofórmio e misturada com sílica, sendo então seca. Após, foi transferida para a coluna, e esta foi eluída com diferentes

proporções de hexano/acetato de etila (95:5, 9:1, 8:2 e 7:3), sendo coletadas cerca de 170 frações, sendo que foi reunido as frações (78 à 91) para o produto 1 e (1 à 43) para o produto 2 . Após secagem dos solventes das frações coletadas, estas foram analisadas por CCDC, e reunidas por semelhança de  $R_f$ .

### **3.7 Identificações por análises espectroscópicas de RMN unidimensionais e bidimensionais e análise de CG**

As análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$ , de  $^{13}\text{C}$ , HMBC e HMQC (400 MHz, Bruker) foram realizadas em um espectrômetro conforme parceria com a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), aos cuidados da doutoranda Carlise Frota. Foi utilizado o padrão interno de referência TMS (tetrametilsilano) e o solvente clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ).

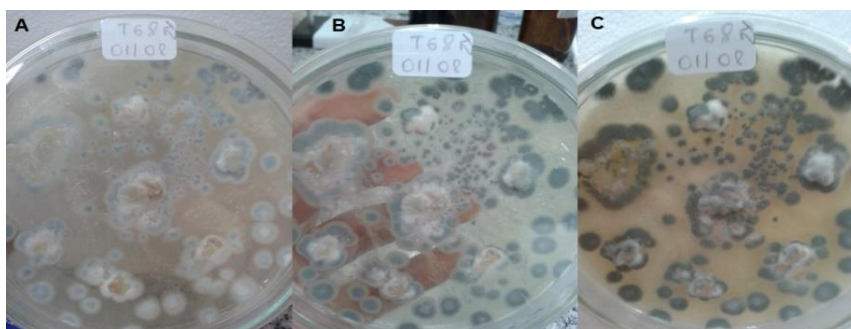
As análises de CG foram realizadas em equipamento (SHIMADZU, QP2010) localizado no laboratório CPBIO/UEMS, sob os cuidados da Profa. Dra. Cláudia Andrea Lima Cardoso.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos, foi possível evidenciar que somente os fungos *Xylariaceae* (T68) e *Penicillium wasksnanii* (T69) obtiveram melhor desenvolvimento. Com isso, foi realizada a ativação de todos os fungos para que pudessem ser usados em experimentos futuros.

Estes fungos foram, portanto, cultivados e monitorados por fotografias, a seguir são apresentados seus crescimentos em estágios diferentes (Figuras 8 e 9).

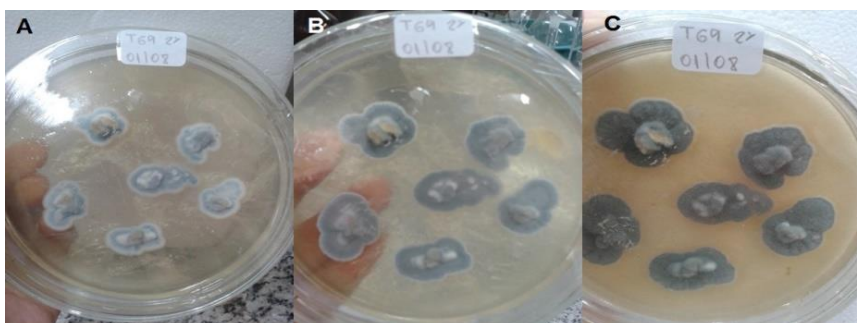
**Figura 8** - Crescimento do fungo marinho T68 (*Xylariaceae*) em meio sólido de malte 2%.



A: 4 dias de crescimento; B: 6 dias; C: 10 dias.

Fonte: Arquivo pessoal.

**Figura 9** - Crescimento do fungo marinho T69 (*Penicillium wasksnanii*) em meio sólido de malte 2%.



A: 4 dias de crescimento; B: 6 dias; C: 10 dias.

Fonte: Arquivo pessoal.

Como demonstrado nas figuras anteriores, estes fungos obtiveram um melhor desenvolvimento celular, sendo observado um aumento dos halos em seus crescimentos. Este crescimento acabou por possibilitar o aumento das células em meio líquido, melhorando os resultados nos experimentos de biotransformação. Esta observação não foi constatada nos demais fungos pesquisados.

Foram realizados experimentos de biotransformação em meio líquido para ambas as espécies (T68 e T69), empregando a progesterona como substrato. Posteriormente, por

meio de análises em CCDC, verificou-se que a espécie T68 apresentou produtos diferentes à progesterona.

No intuito de obter uma quantidade maior de massa de produtos biotransformados, para que pudesse realizar o isolamento e identificação estrutural, foram realizados experimentos em meio líquido usando 20 frascos de Erlenmeyers (250 mL) para o fungo T68.

Inicialmente este fungo foi submetido ao crescimento celular, em agitação rotativa, e após 8 dias de desenvolvimento foi adicionado a progesterona, permanecendo novamente em agitação durante 10 dias. Após este período de biotransformação, foi realizado a extração dos produtos, e então analisado via CCDC, foi observado que nos diferentes frascos de Erlenmeyers o fungo T68 não realizou a mesma reação (Figura 10).

**Figura 10** - Placa cromatográfica após a reação de biotransformação com o fungo T68, as amostras A até T são referentes aos possíveis produtos biotransformados, X (à esquerda) progesterona pura.



**Fonte:** Arquivo pessoal.

Mesmo estas frações não apresentando completa semelhança, e este foram reunidos para obtenção de uma massa maior, e em seguida foi feito o isolamento das substâncias utilizando CC, sendo monitorado por CCDC. As frações obtidas foram reunidas por semelhanças dos constituintes químicos presentes nelas, secas em capela de exaustão, sendo obtido massa igual a 63 mg para cada produto (A e B) (rendimento de aproximadamente 31% para cada). A figura 11 a seguir demonstra a placa cromatográfica do isolamento dos produtos biotransformados da reação.

**Figura 11** - Placa cromatográfica das substâncias A (progesterona pura), B o produto 1 e C o produto 2 obtidos (solventes utilizados na eluição= hexano:acetato de etila 7:3 v/v, revelador:  $\text{KMnO}_4$ ).

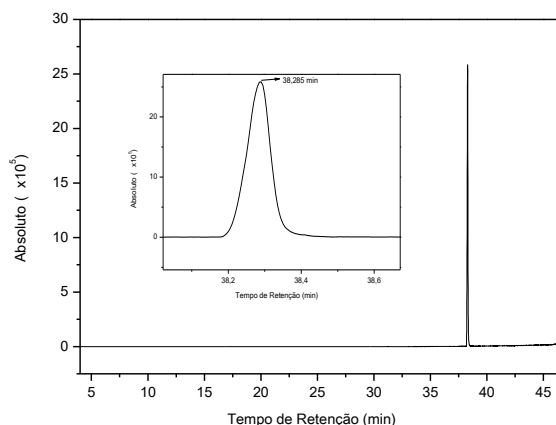


**Fonte:** Arquivo pessoal.

De acordo com os ensaios obtidos pela CCDC foi possível sugerir uma boa pureza, a qual foi confirmada para o produto 1. No intuito de confirmar esta pureza do produto 1, foi realizada ainda análise por CG, para então posteriormente realizar análises espectroscópicas de RMN, confirmando a pureza deste produto (Figura 13B).

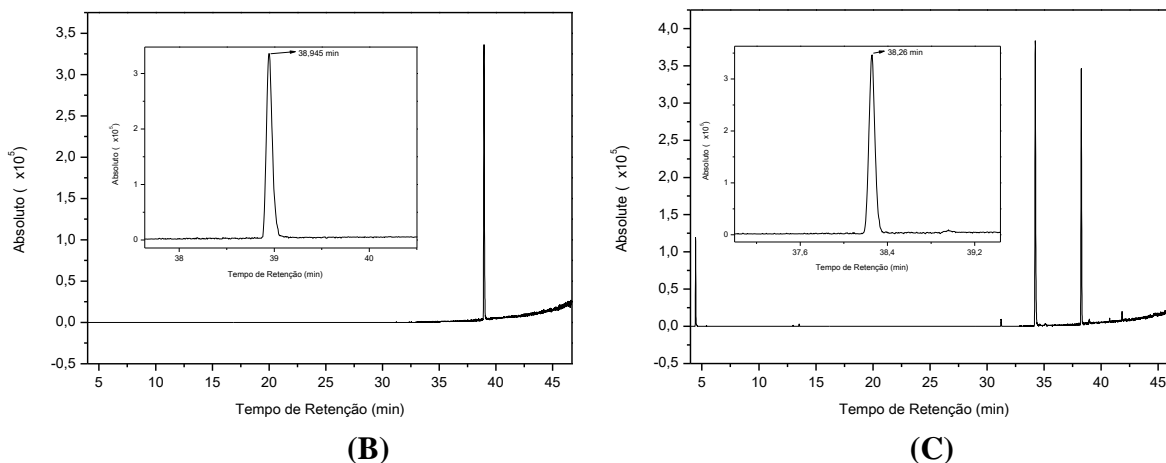
Por meio das análises observadas, tais como CCDC (Figura 11C) e CG (Figura 13C), foi verificado que o produto 2 não estava em boa pureza para que pudesse ser realizada a identificação estrutural, de acordo com a comparação realizada com o cromatograma da progesterona pura (Figura 12). Com esta amostra realizou então a purificação via cromatografia em camada delgada preparativa, entretanto após a realização não foi obtido massa o suficiente para dar continuidade aos estudos.

**Figura 12** - Cromatograma A obtido por CG da progesterona pura mostrando  $t_R = 38,3$  min.



**(A)**

**Figura 13** - Cromatograma obtido por CG de **B** do produto 1, mostrando  $t_R = 38,9$  min; e o cromatograma **C** do produto 2 apresentando o primeiro pico com  $t_R = 34,8$  min e outro em  $t_R = 38,3$  min.



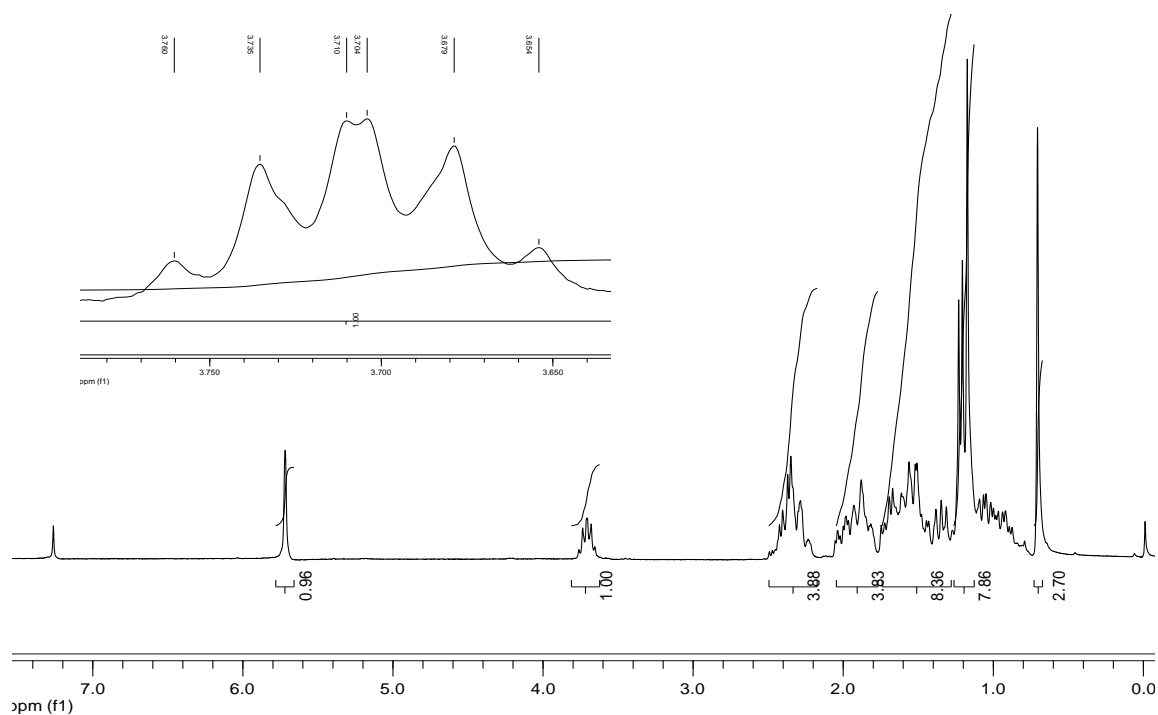
A caracterização do produto **1** foi feita por meio de técnicas de RMN. No espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 14) foi observado um singleto em  $\delta_H$  5,72 (1H), o qual foi caracterizado como o hidrogênio em ligação dupla em C-4. Foi observado um multipletto em  $\delta_H$  3,71 (1H), o qual foi caracterizado como o hidroximetínico da redução da carbonila de C-20 da progesterona. Foi caracterizado ainda a metila em  $\delta_H$  1,27 (3H) (C-21), como um dubleto, corroborando a redução da carbonila para hidroxila de C-20. Ainda foi caracterizado dois singletos, em  $\delta_H$  0,71 e 1,17, atribuídos às metilas em C-18 e C-19, respectivamente. Os demais sinais não foram possíveis de serem caracterizados devido à molécula possuir vários hidrogênios metínicos e metilênicos.

A confirmação da redução da carbonila da progesterona foi feita por análise de RMN de <sup>13</sup>C (Figura 15), realizando comparações como os sinais dos carbonos do produto **1** com os dados obtidos em literatura da progesterona. Com isso foi observado que a maioria dos sinais referentes ao produto **1** coincidem com aqueles descritos da literatura. A tabela 1 a seguir apresenta os sinais de <sup>13</sup>C para o produto **1** em comparativo com literaturas (L1 = HU, GENAIN e AZERAD, 1995; L2 = HABIBI *et al.*, 2012).

**Tabela 1-** Dados espectrométricos de  $^{13}\text{C}$  do produto **1** (P1) em comparativo com os sinais da progesterona obtidos em literatura (L1 = HU, GENAIN e AZERAD, 1995; L2 = HABIBI *et al.*, 2012).

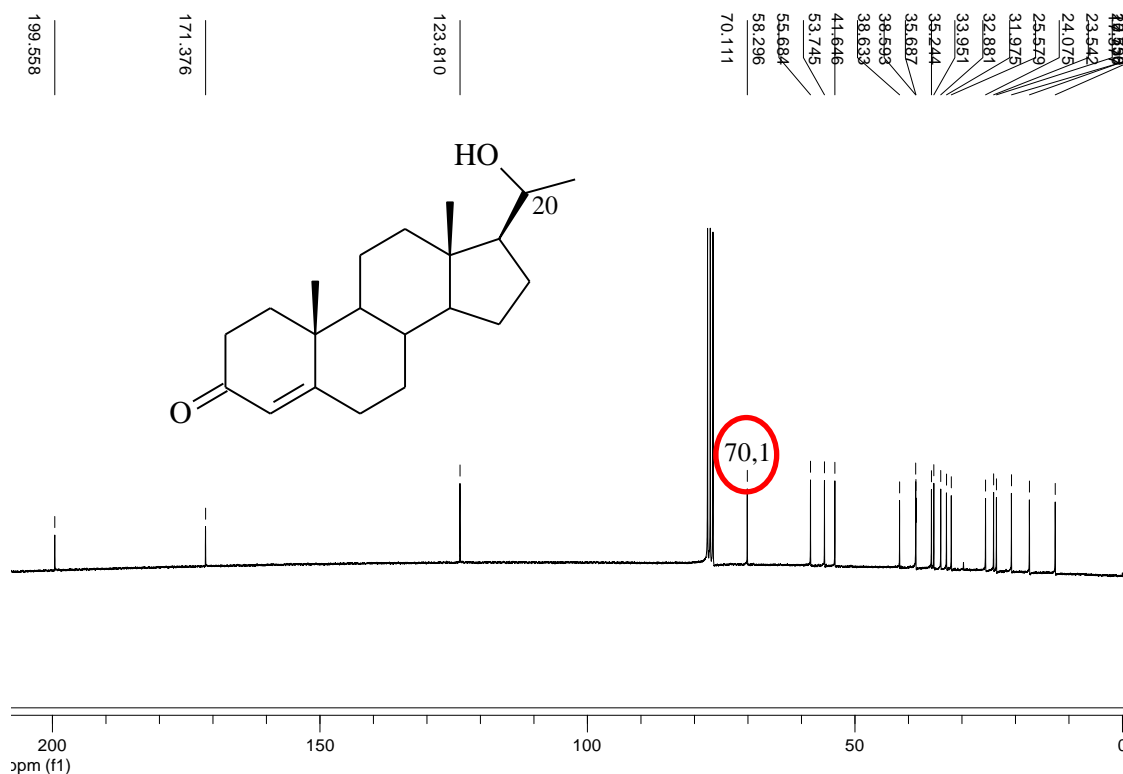
POSIÇÃO (C)	P1 C ( $\Delta$ )	L1 C ( $\Delta$ )	L2 C ( $\Delta$ )
1	35,7	35,6	35,9
2	33,9	33,8	34,3
3	199,6	198,5	199,8
4	123,8	123,7	124,3
5	171,4	169,8	171,3
6	32,0	32,6	32,2
7	32,9	31,8	33,1
8	35,2	35,4	36,1
9	53,7	53,5	54,0
10	38,6	38,5	39,0
11	20,7	21,0	21,4
12	38,5	38,5	39,8
13	41,6	43,7	44,3
14	55,7	55,9	56,4
15	24,1	24,2	24,7
16	23,5	22,8	23,2
17	58,3	63,3	63,8
18	12,5	13,2	13,7
19	17,3	17,3	17,7
20	70,1	208,3	209,7
21	25,6	31,3	31,9

**Figura 14 -** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do produto **1**, e ampliação do sinal em  $\delta_{\text{H}}$  3,71.



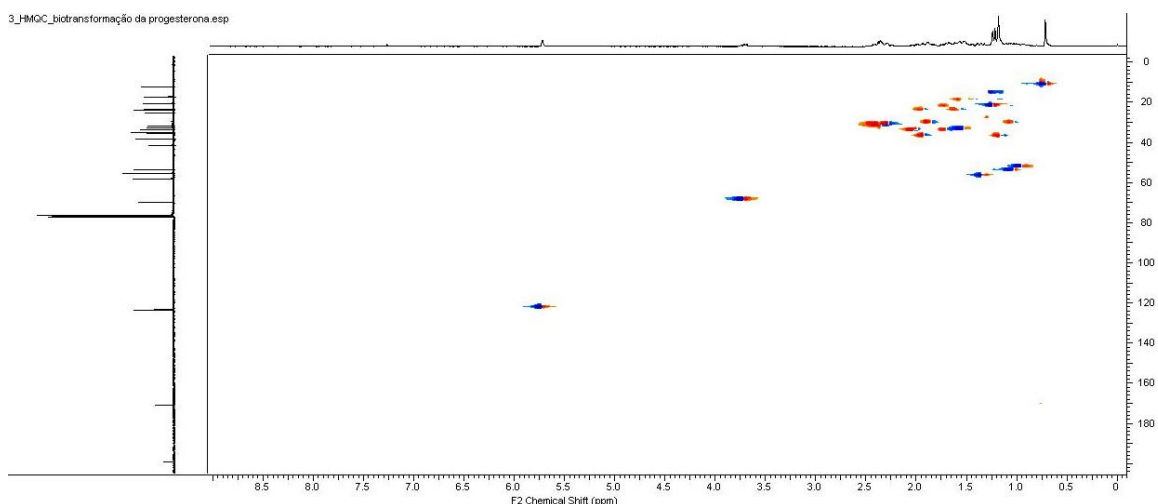
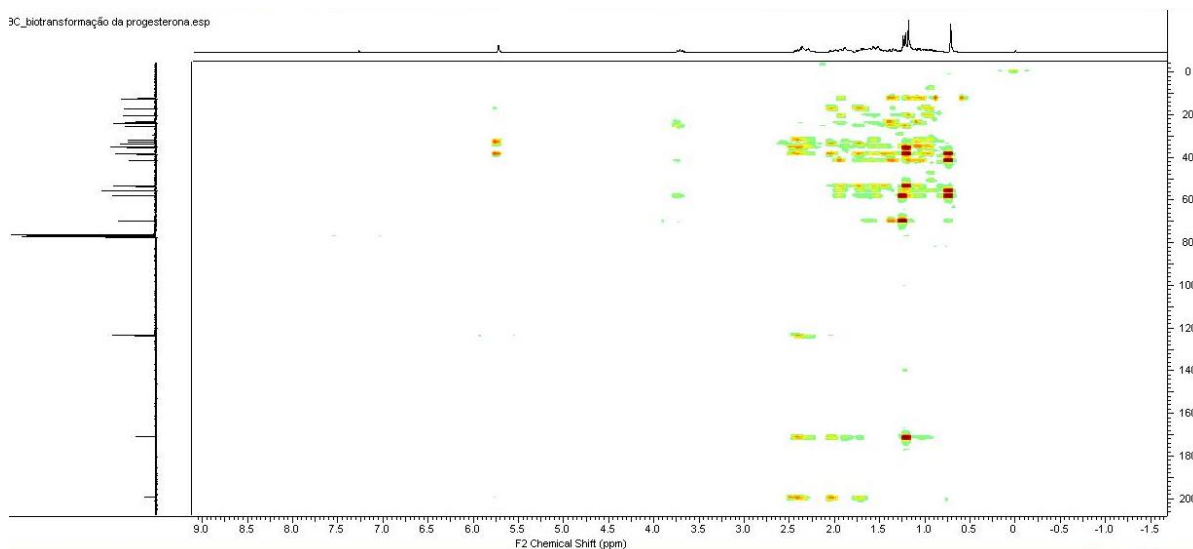


**Figura 15** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do produto **1**.



Conforme a Tabela 1, anteriormente apresentada, o produto **1** demonstrou um sinal diferente no C-20 comparado aos valores mostrados nas literaturas para a progesterona. Conforme está apresentado na figura 15 o sinal  $\delta_{\text{C}}$  70,1 (destacado) é correspondente a redução da carbonila no C-20 da estrutura da progesterona, sendo deslocamento químico característico  $\text{HC-OH}$ , o qual ocorre normalmente  $\delta$  40-80 (Pavia *et al.*, 2010).

Além da caracterização estrutural feita pelas análises dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , foram feitos ainda experimentos de HMBC e HMQC (Figura 16 e 17). Estes experimentos permitiram confirmar a estrutura proposta para o produto da biotransformação da progesterona, sendo reduzido o carbono C-20 à hidroxila. As análises de todos os espectros estão apresentadas na Tabela 2.

**Figura 16** - Espectro de HMQC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do produto 1.**Figura 17** - Espectro de HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do produto 1.**Tabela 2** - Dados espectrométricos de RMN de <sup>1</sup>H, de <sup>13</sup>C, HMQC e HMBC referentes ao produto 1.

Posição	H(δ)	C (δ)	HMQC (δ)	HMBC (δ)
4	5,72 ( <i>s</i> , 1H)	123,8	123,8	33,9 (C-2); 32,9 (C-7); 38,6 (C-10)
18	0,71 ( <i>s</i> , 3H)	12,5	12,5	58,3 (C-17); 55,7 (C-14); 41,6 (C-13); 38,6 (C-12)
19	1,17 ( <i>s</i> , 3H)	17,3	17,3	53,7 (C-9); 35,7 (C-1)
20	3,71 ( <i>m</i> , 1H)	70,1	70,1	58,3 (C-17); 25,6 (C-21)
21	1,27 ( <i>d</i> , 3H)	25,6	25,6	70,1 (C-20); 58,3 (C-17)

Conforme Tabela 2, foi observado no espectro de HMQC que o sinal em  $\delta_H$  5,72, integrando para 1H, foi caracterizado como o hidrogênio em dupla ligação no C-4, o qual

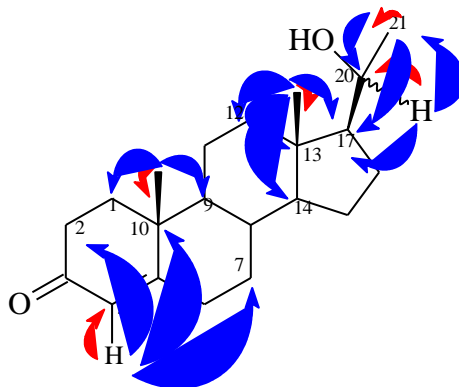
apresentou correlação direta com o sinal em  $\delta_c$  123,8, característico de carbono  $sp^2$ . No espectro de HMBC este sinal em  $\delta_H$  5,72 apresentou correlação à longa distância com os carbonos C-2, C-7 e C-10 (Figura 18).

O carbono C-20 mostrou acoplamento com o hidrogênio  $\delta_H$  3,71 (m, 1H) conforme o espectro de HMQC, e também acoplamentos à longa distância com os carbonos C-17 e C-21 no espectro de HMBC (Figura 18).

O carbono da metila em C-21 mostrou acoplamento no espectro de HMQC dos hidrogênios  $\delta_H$  1,27 com  $\delta_c$  25,6. Pelo espectro de HMBC, pode-se confirmar novamente a redução da carbonila da progesterona para hidroxila pela correlação dos hidrogênios da metila em C-21 com o carbono hidroximetínico de C-20 ( $\delta_c$  70,); e ainda observou a correlação com o C-17.

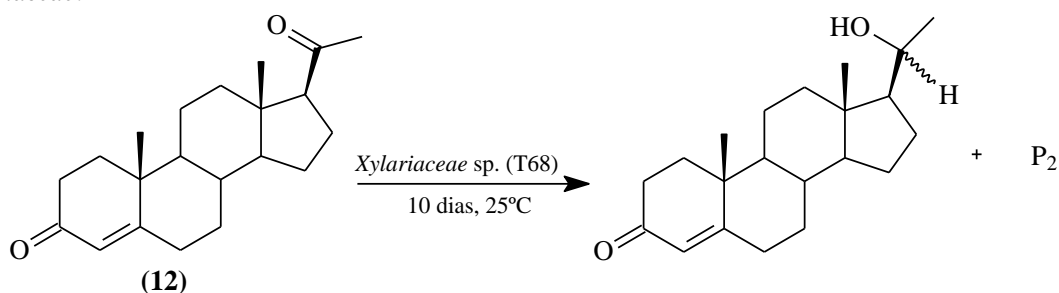
Os sinais das metilas em C-18 e C-19 também puderam ser devidamente correlacionados nos espectros de HMQC e HMBC, e estes dados encontram-se reportados na Tabela 2, e devidamente representados por meio da Figura 18.

**Figura 18** - Estrutura do possível produto **1** e os acoplamentos de HMBC(azul) e HMQC (vermelho).



A Figura 19 a seguir apresenta a reação de biotransformação da progesterona mediada pelo fungo marinho da família *Xylariaceae*, formando o produto 20-hidroxiprogestero, conforme identificação realizada.

**Figura 19** - Reação de biotransformação da progesterona realizada pelo fungo marinho da família *Xylariaceae*.



## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por meio dos resultados iniciais desta pesquisa foi observado que o fungo marinho da família *Xylariaceae* apresentou melhor desenvolvimento celular, devido o aumento dos halos de crescimento no seu período de cultivo. Este fungo também apresentou produtos diferentes à progesterona, por isso este foi utilizado nos experimentos.

A reação de biotransformação da progesterona utilizando o fungo marinho *Xylariceae* sp. como biocatalisador foi bem sucedida. O produto **1** após purificação por técnicas cromatográficas, obteve 31% de rendimento, e sua identificação estrutural por meio de análises espectroscópicas, permitiu ser caracterizado como sendo o 20-hidroxiprogesterona. O outro produto da reação de biotransformação foi obtido, entretanto devido à impurezas o mesmo não pode ser devidamente identificado.

## 6 REFERÊNCIAS

AL-AWADI, S.; AFZAL, M.; OOMMEN, S. Studies on *Bacillus stearothermophilus* Part. II. Transformation of progesterone. **Journal of Steroid Biochemistry e Molecular Biology**, v. 82, p. 251-256, 2002.

BENNET, J. W.; BENTLEY, R. What's in a name? Microbial secondary metabolism. San Diego: **Advances in Applied Microbiology**, v. 34, p. 1-28, 1989.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N. **As glândulas reprodutoras**. In: BERNE, R. M.; LEVY, M. N. *Fisiologia*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 52, p. 910-956.

BHAT, S. V.; NAGASAMPAGI, B. A.; SIVAKUMAR, M. **Chemistry of natural products**. Springer & Narosa Publishing House, v.1, 1 ed., 2005, 840p.

BIANCO, A. C.; RABELO, R. **Introdução à fisiologia endócrina**. In: AIRES, M. M. *Fisiologia*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, cap. 65, p. 741- 765.

BLACK J. G. **Microbiologia fundamentos e perspectivas**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 4 ed., 2002. 856p.

CARVALHO, C. C. C. R.; FONSECA, M. M. R. Biotransformation of terpenes. **Biotechnology Advances**, n. 24, p. 134–142, 2006.

CARVALHO, C. C. C. R.; FONSECA, M. M. R. Maintenance of cell viability in the biotransformation of (-)-carveol with whole cells of *Rhodococcus erythropolis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.**, n. 19, p. 389– 98, 2002.

CHANG, T-H.; HSIEH, F-L.; KO, T-P.; TENG, K-H.; LIANG, P-H.; WANG, A. H-J. Structure of a heterotetrameric geranyl pyrophosphate synthase from mint (*Mentha piperita*) reveals intersubunit regulation. **The Plant Cell**, v. 22, n. 2, p. 454–467, 2010.

CONSTANZO, L. S. *Fisiologia endócrina*. In: CONSTANZO, L. S. **Fisiologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 9, p. 307-360, 1999.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. **Natural products (secondary metabolites)**. In: *Biochemistry & molecular biology of plants*. American society of plant physiologists. p. 1250-1318, 2000.

CUNHA, T. S.; CUNHA, N. S.; MOURA, M. J. C. S.; MARCONDES, F. K. Esteroides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p. 165-179, 2004.

DIENER, A. C.; LI, H.; ZHOU, W-X.; WHORISKEY, W. J.; NES, W. D.; FINK, G. R. Sterol methyltransferase 1: controls the level of cholesterol in plants. **The Plant Cell**, v.12, p. 853-870, 2000.

EMERY, F. S.; SANTOS, G. B.; BIANCHI, R. C. **A química na natureza**. Química no cotidiano. Sociedade Brasileira de Química, v. 7, 2010. 70p.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. 6 ed. Springer: Berlin, 2011. 423p.

FERNANDES, P.; CRUZ, A.; ANGELOVA, B.; PINHEIRO, H.; CABRAL, J. M. S. Microbial conversion of steroid compounds: recent developments. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 32, p. 688-705, 2003.

HABIBI, Z.; YOUSEFI, M.; GHANIAN, S.; MOHAMMADI, M.; GHASEMI, S. Biotransformation of progesterone by *Absidia griseolla* var *Igachi* and *Rhizomucor pusillus*. **Steroids**, v. 77, p. 1446-1449, 2012.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods**: A guide to modern techniques of plant analysis. Springer Netherlands, 3 ed., 1989. 302p.

HU, S.; GENAIN, G.; AZERAD, R. Microbial transformation of steroids: Contribution to 14 $\alpha$ -hydroxylations. **Steroids**, v. 60, p. 337-352, 1995.

JAKIEMIU, E. A. R. Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.). Dissertação de mestrado em tecnologia de alimentos, Universidade Federal do Paraná, 2008.

JUBE, S.; BORTHAKUR, D. **Recent advances in food biotechnology research**. In: HUI, Y. H.; NIP, W-K.; NOLLET, L. M. L.; PALIYATH, G. SAHLSTROM, S.; SIMPSON, B.K. Food biochemistry and food processing. Blackwell Publishing, p. 35-70, 2006.

KURIATA-ADAMUSIAK, R.; STRUB, D.; LOCHYNSKI, S. Application of microorganisms towards synthesis of chiral terpenoid derivatives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1427-1436, 2012.

MAHATO, S. B.; MAJUNDAR, I. Current Trends. In: Microbial Steroid Biotransformation. **Phytochemistry**, v. 34, p. 883-898, 1993.

MERGULHÃO, A. C. E. S.; FIGUEIREDO, M. V. B; BURITY, H. A; MAIA, L. C. Hospedeiros e ciclos sucessivos de multiplicação afetam a detecção de fungos micorrízicos arbusculares em áreas impactadas por mineração gesseira. **Revista Árvore**, v. 33, n. 2, p. 227-236. 2009.

MEYER, U. Overview of enzymes of drug metabolism. **Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics**, v. 24, p. 449-459, 1996.

MOREIRA, J. S. **Triagem de microrganismos isolados no estado da Bahia para biotransformação de compostos esteroidais**. Feira de Santana, 2009. Dissertação de mestrado em Biotecnologia de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana da Bahia.

NOBREGA, L. H. C.; LIMA, J. G.; NOBREGA, M. L. C.; BRITO, A. L. S.; MENDONÇA, R. P. Hiperplasia adrenal congênita: dosagem da 17-hidroxiprogesterona basal para seleção e casos para realização do teste de estímulo com ACTH sintético. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 26, n. 4, p. 295-298, 2004.

OLIVEIRA, B. H.; BUENO, D. D. Biotransformação de esteróis. **Química Nova**, v. 19, p. 233-236, 1996.

OLIVEIRA, K. B.; OLIVEIRA, B. H. Obtenção de substâncias bioativas através da biotransformação de produtos naturais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 9, p. 89-99, 2012.

OLIVEIRA, R. B.; GODOY, S. A. P.; COSTA, F. B. **Plantas tóxicas: conhecimento e prevenção de acidentes**. Ribeirão Preto: Editora Holos, 2003. 64p.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução a espectroscopia**. São Paulo: Cengage Learning, 4 ed., p.169-174, 2010.

PEREIRA Jr, N.; BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. Tecnologia de Bioprocessos. **Escola de Química**, v. 1, p. 6-9, 2008.

PETERSEN, R. Z. **Biotransformação de terpenoides por culturas de células vegetais e fungos filamentosos**. Porto Alegre, 2006. Tese de doutorado. Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

PETERSON, D. H.; MURRAY, H. C.; EPPSTEIN, S. H. Microbiological transformatio of esterooids: Introducion of oxygen at carbon-11 of progesterone. **Journal of the American Chemical Society**, v. 74, p. 5933-5936, 1952.

PINHEIRO, L. **Multibiorreações e suas aplicações para as sínteses de compostos enantiomericamente puros**. Campinas, 2006. Tese (Doutorado em Ciências) Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.

POLI, M. E. H. Manual de Ginecologia: Anticoncepção. **Sociedade Brasileira de Reprodução Humana**, p. 1-51, 2015. Disponível em:  
[http://www.sbrh.org.br/sbrh\\_novo/guidelines/guideline\\_pdf/guideline\\_contracepcao.pdf](http://www.sbrh.org.br/sbrh_novo/guidelines/guideline_pdf/guideline_contracepcao.pdf). Acessado em março de 2016.

SILVA, P. R. P.; DANIELSKI, R.; CZEPIELEWSKI, M. A. Esteroides anabolizantes no esporte. **Revista Brasileira Medicina do Esporte**, v. 8, n. 6, p. 235-243, 2002.

SILVA, R. R.; DIAS, S. M. Perfumes: uma química inesquecível. **Química e Sociedade**, n. 4, p. 3-6, 1996.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre:Editora UFRGS/ Florianópolis: Editora UFSC, 2004. 1102p.

SINGER, A. C.; CROWLEY, D. E.; THOMPSON, I. P. Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. **Trends in Biotechnology**, v. 21, p. 123-130, 2003.

SITRUK-WARE, R. New progestagens for contraceptive use. **Human Reproduction Update**, v. 12, p. 169-78, 2006.

SITRUK-WARE, R. New progestogens: a review of their effects in perimenopausal and postmenopausal women. **Drugs & Aging**, v. 21, p. 865-883, 2004.

STANCZYK, F. Z. Pharmacokinetics and potency of progestins used for hormone replacement therapy and contraception. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 3, p. 211-242, 2002.

STEWART, D. **The chemistry of essential oils made simple: God's love manifest in molecules**. 2. ed. London: Care, 2006. p. 848.

TONIOLLO, G. H.; VICENTE, W. R. R.; OLIVEIRA, C. A.; MALHEIROS, E. B.; PUBLIESE, A. C. Avaliação dos níveis séricos de 17- $\alpha$ -OH progesterona e androstenediona durante o ciclo estral em marrãs (*Sus scrofa domestica* – Linnaeus, 1758). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 35, n. 5, p. 205-209, 1998.

VIGO F.; LUBIANCA, J. N.; CORLETA, V. E. H. Progestágenos: farmacologia e uso clínico. **Femina**, v. 39, n. 3, p. 127-137, 2011.

VILLEN, R. A. **Biotecnologia – histórico e tendências**. Escola de Engenharia de Mauá: Apostila, 2009. 80p.

WESTFECHTEL, A.; BEHLER, A. Ethercarboxylic acid ester of sterol or stanol. **US Patent**, p. 183-223, 2006.

YAZAKI, K. Natural products and metabolites. In: Handbook of plant biotechnology. Ed: CHRISTOU P., KLEE H. **Wiley & Sons Ltd**, p. 811- 857, 2004.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução a espectroscopia**. São Paulo: Cengage Learning, 4 ed., p.169-174, 2010.