



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**



JOSINEIDE SILVA MOREIRA

**TRIAGEM DE MICRORGANISMOS ISOLADOS NO ESTADO
DA BAHIA PARA BIOTRANSFORMAÇÃO DE COMPOSTOS
ESTEROIDAIIS**

Feira de Santana, BA
2009

JOSINEIDE SILVA MOREIRA

**TRIAGEM DE MICRORGANISMOS ISOLADOS NO ESTADO
DA BAHIA PARA BIOTRANSFORMAÇÃO DE COMPOSTOS
ESTEROIDAIIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.
Orientador (a): Prof^ª. Dr^ª. Angélica M. Lucchese.
Co-orientadores: Prof^ª. Dr^ª Ana Paula T. Uetanabaro e Prof^º Dr^º. Aristóteles Góes Neto.

Feira de Santana, BA
2009

Dedico esta dissertação ao meu exemplo de vida, Neide, minha Mãe, que sempre me estimulou a dar este grande passo. Esta pessoa com muita sabedoria, discernimento e dedicação sempre esteve ao meu lado, mesmo estando longe, me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória.

Obrigada por ser fonte de inspiração, apoio e carinho. Obrigada por ser Meu Pai e Minha Mãe!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por estar sempre ao meu lado fazendo com que trilhasse esse caminho para que pudesse descobrir que quando queremos, somos capazes de tudo.

Quero agradecer algumas pessoas extremamente especiais. Pessoas que acompanharam as alegrias e aflições do processo de desenvolvimento deste trabalho. Em alguns momentos, aconselhando e guiando e, em outros, apenas ouvindo e apoiando silenciosamente. Essas pessoas foram essenciais para mim.

Minha família, obrigada por vocês existirem! Obrigada por depositarem em mim a confiança para todas as horas. Sei que vocês se orgulham por eu ter atingido uma etapa que nenhum outro de nós tinha atingido antes. Mas este orgulho que sentem por mim, converto numa obrigação de a cada dia ser mais digna de representá-los.

Mãe, obrigada pela existência que me proporcionou. Seu amor sempre me ensinou e sempre ensinará. Meus irmãos, Cida, Rosalvo, Olavo e João um beijo em cada um de vocês. Meus amados sobrinhos, vocês também fazem parte desta história e muito contribuíram com o amor e carinho que me dedicam.

Meu irmão Dielson e meu avô Olavo, meus anjos-da-guarda, sempre presentes em minha memória guiando os meus passos em mais uma conquista.

Minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Angélica Maria Lucchese, presente em mais uma etapa de minha vida acadêmica. Agradeço não só pela notável orientação científica e pelos seus ensinamentos, mas, particularmente, pelo permanente incentivo, disponibilidade e amizade demonstrada. A confiança que sempre me transmitiu e a ajuda constante e incansável, especialmente nos momentos mais difíceis, permitiu-me continuar a acreditar no sucesso desta dissertação. O seu empenho, a experiência ímpar e o mérito científico foram fundamentais para a conclusão deste trabalho. Por tudo isto, pela grande mestra e amiga que se revelou, o meu mais sincero obrigado.

Aos meus amigos, minha segunda família, que estiveram sempre ao meu lado para amparar, incentivar com suas palavras, suas contribuições com minhas dificuldades e com minhas angústias. Obrigada pelo carinho, companhia, atenção e alegrias que me proporcionaram.

À Prof^a. Dr^a. Ana Paula Trovatti Uetanabaro e o Prof^o. Dr^o. Aristóteles Góes Neto pela amizade, orientação, disponibilidade, compreensão e colaboração.

Às amigas do LAPRON (Laboratório de Produtos Naturais e Bioativos), Edna Peralta e Sérly Santiago, especialmente pela ajuda no desenvolvimento da pesquisa experimental, pelo apoio, conversas e pelas brincadeiras.

Ao Prof^o Márcio Henrique Zaim pela disponibilização das amostras de compostos esteroidais.

À estagiária Girlene pela ajuda e disponibilidade durante o desenvolvimento da pesquisa laboratorial.

Aos meus colegas de trabalho do HGCA (Hospital Geral Clériston Andrade), em especial a Coordenadora do Serviço de Farmácia, Graça Pamponet, pelo apoio e compreensão nas ausências ao trabalho.

À Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) e ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC) por ter me proporcionado ensino de qualidade e gratuito, contribuindo no meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos (LAPRON) e ao Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM) por toda a estrutura para a realização deste trabalho.

Enfim, a todos àqueles que de algum modo fizeram e fazem parte de meus projetos de vida, registro o eterno agradecimento pela compreensão e pelo amor dedicado.

Muito Obrigada!

“As pessoas sempre culpam as circunstâncias por aquilo que são. Eu não acredito em circunstâncias. Quem se sai bem neste mundo são as pessoas que saem à procura das circunstâncias que desejam e, se não as encontram, criam-nas”.

George Bernard Shaw

RESUMO

A indústria farmacêutica está atualmente introduzindo processos biotecnológicos em grande escala e, assim, substituindo múltiplos estágios das sínteses químicas. Os microrganismos são eficientes biocatalisadores de muitos processos, entre os quais a conversão de compostos esteroidais, que possuem grande importância para a síntese de fármacos. Os esteróides são substâncias orgânicas com importância médica, que possuem um núcleo peridrociclopentanofenantreno, usados na terapêutica antiinflamatória e anticoncepcional, entre outras. Este trabalho teve por objetivo selecionar microrganismos isolados no estado da Bahia capazes de catalisarem conversões em compostos esteroidais. Para esta triagem foram utilizados dois substratos, uma mistura de fitoesteróis contendo β -sitosterol, estigmasterol e campesterol e um esteróide, a 19-nor-4-androsteno-3,17-diona. Como biocatalisadores foram utilizadas culturas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas em cachaçarias do estado da Bahia, rizobactérias isoladas no sul da Bahia e fungos endofíticos. Os produtos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, para verificar a degradação dos substratos. No caso dos fitoesteróis, das 10 leveduras, 10 bactérias e 7 fungos avaliados, apenas o fungo endofítico CDC86 foi capaz de degradar a mistura de campesterol, estigmasterol e β -sitosterol. Na triagem utilizando o esteróide 19-nor-4-androsteno-3,17-diona, dos 22 microrganismos avaliados (5 leveduras, 10 bactérias e 7 fungos), 19 foram capazes de atuarem como biocatalisadores, com exceção das reações com a bactéria I68, e com os fungos MDF77 e CDC86. Foram observados diversos produtos com taxas de bioconversão de até 76%, dependendo do microrganismo utilizado e do tempo reacional. Dois esteróides, a nandrolona e estrona, foram identificados. Os resultados indicaram o potencial biocatalítico dos microrganismos isolados no estado da Bahia, assim investigações complementares devem ser realizadas visando a otimização do processo.

Palavras-chave: Biotransformação, compostos esteroidais, microrganismos.

ABSTRACT

The pharmaceutical industry is now introducing biotechnological processes in large scale and thus replacing multiple stages of chemical syntheses. Microorganisms are efficient biocatalysts of many processes as the conversion of steroidal compounds, which have great importance for the synthesis of pharmaceuticals. Steroids are organic substances with medical importance that have a cyclopentanophenanthrene nucleus, and are used in anti-inflammatory therapy and contraception, among others. This study aimed to select microorganisms in the state of Bahia capable of catalyzing conversions of steroids compounds. For this screening we used two substrates, a mixture of phytosterols containing β -sitosterol, stigmasterol and campesterol and a steroid, the 19-nor-4-androstene-3,17-dione. As biocatalysts it were used cultures of *Saccharomyces cerevisiae* from sugar cane brandy distilleries of Bahia state, rhizobacteria isolated in south of Bahia and endophytic fungi. The products were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry to verify the degradation of substrates. In the case of phytosterols, from 10 yeasts, 10 bacteria and 7 fungi evaluated, only the endophyte fungi CDC86 was able to degrade a mixture of campesterol, stigmasterol and β -sitosterol. In the screening using the steroid 19-nor-4-androstene-3, 17-dione, the 22 microorganisms evaluated (5 yeasts, 10 bacteria and 7 fungi), 19 were able to act as biocatalysts, with the exception of reactions with the bacteria I68 and fungi MDF77 and CDC86. Several products were observed with rates of bioconversion up to 76% depending on the microorganism used and the reaction time. Two steroids, nandrolone and estrone, were identified. The results indicated the biocatalytic potential of microorganisms isolated in the state of Bahia, so further investigation should be performed to optimize the process.

Keywords: Biotransformation, steroidal compounds, microorganisms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Meio reacional de Biotransformação	15
Figura 2 – Núcleo esteroidal e esteróis de ocorrência natural	21
Figura 3 – Biotransformação de esteróis	22
Figura 4 – Compostos esteróides derivados do colesterol	23
Figura 5 – Redução de 17 cetoesteróides a 17 β -hidroxiesteróides aplicados na fabricação dos hormônios esteroidais	24
Figura 6 – Biotransformação da deoxicorticosterona	24
Figura 7 – Biotransformação da progesterona	25
Figura 8 – Hormônios esteroidais do estrano, androstano e série pregnano	26
Figura 9 – Biotransformação de fitoesteróis	33
Figura 10 – Fluxograma do Processo de Biotransformação	38
Figura 11- Câmara Incubadora com Agitação Orbital (Shaker)	39
Figura 12 – Cromatógrafo a Gás acoplado a Espectrômetro de Massa (CGMS)	40
Figura 13 – Estruturas dos fitoesteróis presentes no reagente empregado	41
Figura 14 – Perfil cromatográfico da mistura de fitoesteróis empregada	41
Figura 15 – Esteróides esperados resultantes da clivagem da cadeia lateral dos fitoesteróis	42
Figura 16 – Perfil cromatográfico da bioconversão por espécies de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (E5)	43
Figura 17 – Perfil cromatográfico da reação catalisada pelo fungo CDC86	43
Figura 18 – Espectro de massas e padrão de fragmentação sugerido para a sitostenona	45
Figura 19 – Espectro de massas e padrão de fragmentação sugerido para a campestenona	46
Figura 20 - Espectro de massas e padrão de fragmentação sugerido para a espinasterona	47

Figura 21 - Perfil cromatográfico do 19-nor-4-androsteno-3,17-diona	48
Figura 22 – Espectro de massas da Nandrolona	50
Figura 23 – Perfil cromatográfico de P15	50
Figura 24 – Perfil cromatográfico de P35	50
Figura 25 – Perfil cromatográfico de T1	51
Figura 26 – Perfil cromatográfico de T5	51
Figura 27 – Perfil cromatográfico de T10	51
Figura 28 – Biotransformação da 19-nor-4-androsteno-3,17-diona a nandrolona	52
Figura 29 - Biotransformação da 19-nor-4-androsteno-3,17-diona a Estrona	54
Figura 30 - Espectro de massas da Estrona produzida por <i>Rhizobium</i> sp (I67)	54
Figura 31 – Espectro de massas do esteróide em TR=20,75 min e m/z 288 produzido por <i>Rhizobium</i> sp (I67)	55
Figura 32 – Espectro de massas do esteróide em TR=20,40 e m/Z 288 produzido por <i>Agrobacterium</i> sp (I07)	56
Figura 33 – Espectro de massas do esteróide em TR=20,75 min e m/z 288 produzido por <i>Agrobacterium</i> sp (I07)	56
Figura 34 – Perfil cromatográfico de <i>Pseudomonas</i> sp (I30)	57
Figura 35 – Perfil cromatográfico de <i>Ochrobactrum</i> sp (I116)	57
Figura 36 – Perfil cromatográfico de <i>Paenibacillus</i> sp (I85)	57
Figura 37 – Perfil cromatográfico de <i>Paenibacillus</i> sp (I68)	58
Figura 38 – Perfil cromatográfico de <i>Rhizobium</i> sp (I67)	58
Figura 39 – Perfil cromatográfico de <i>Enterobacter</i> sp (B34)	58
Figura 40 – Perfil cromatográfico de <i>Agrobacterium</i> ou <i>Rhizobium</i> sp (I07)	59
Figura 41 – Perfil cromatográfico de <i>Pandorea</i> sp (B08)	59
Figura 42 – Perfil cromatográfico de <i>Bacillus</i> sp (B18)	59

Figura 43 – Perfil cromatográfico de <i>Brevibacillus</i> sp (021)	60
Figura 44 – Espectro de massas do esteróides em TR=21,90 min e m/z 288, produzido por <i>Myrothecium</i> sp (CDC26)	61
Figura 45 – Perfil cromatográfico de MDF92	62
Figura 46 – Perfil cromatográfico de <i>Fusarium</i> sp (MDF77)	62
Figura 47 – Perfil cromatográfico de FX45	62
Figura 48 – Perfil cromatográfico de CDC86	63
Figura 49 – Perfil cromatográfico de <i>Glomerella cingulatta</i> sp (FX127)	63
Figura 50 – Perfil cromatográfico de <i>Myrothecium</i> sp (CDC26)	63
Figura 51 – Perfil cromatográfico de <i>Glomerella cingulatta</i> sp (MDF36)	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Vantagens e Desvantagens no uso de biocatalisadores	17
Tabela 2 – Biotransformação de esteróides por <i>T. hamatum</i>	30
Tabela 3 – Reagentes utilizados	35
Tabela 4 – Equipamentos utilizados	36
Tabela 5 – Linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
Tabela 6 – Caracterização morfológica das bactérias	37
Tabela 7 – Espécies de fungos filamentosos	38
Tabela 8 – Taxa de biotransformação do 19-Nor-4-androsteno-3,17-diona por linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	49
Tabela 9 – Biotransformação do 19-nor-4-androsteno-3,17-diona por bactérias	53
Tabela 10 – Biotransformação do 19-nor-4-androsteno-3,17-diona por fungos filamentosos	60

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Objetivos	14
1.1.1	Objetivo geral	14
1.1.2	Objetivos específicos	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	Biotransformação	15
2.2	Importância dos microrganismos nos processos de biotransformação	18
2.3	Biotransformação de compostos esteroidais	20
2.4	Dificuldades para biotransformação de compostos esteroidais	31
		35
3	MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1	Instalações do experimento	35
3.2	Solventes e reagentes	35
3.3	Equipamentos	35
3.4	Microrganismos	36
3.5	Biotransformação	38
3.5.1	Seleção dos melhores microrganismos	38
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	Biotransformação de fitoesteróis	41
4.2	Biotransformação de 19-nor-4-androsteno-3,17-diona	48
4.2.1	Biotransformação utilizando leveduras	48
4.2.2	Biotransformação utilizando rizobactérias	52
4.2.3	Biotransformação utilizando fungos endofíticos	60
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
	REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

A biotransformação ou biocatálise é um processo biotecnológico que permite obter uma série de compostos para diagnóstico, controle e tratamento de doenças, pela modificação de um composto orgânico em outro por enzimas isoladas ou presentes em células íntegras de organismos vivos (microrganismos ou plantas). Este processo é um dos mais adequados para a produção de isômeros ópticamente puros, intermediários importantes em química fina para a produção de vitaminas, inseticidas, fragâncias, aromatizantes e fármacos como os hormônios esteroidais e anticoncepcionais, entre outros produtos de interesse industrial.

Dentre as diversas estruturas de interesse farmacêutico estão os esteróides, que são substâncias orgânicas com um núcleo peridrosciclopentanofenantreno. São compostos de grande importância médica e usados na terapêutica antiinflamatória e anticoncepcional, entre outras. A obtenção de esteróides pode ser realizada a partir dos esteróis, pois sua síntese total não é economicamente viável. Os esteróis por sua vez são substâncias orgânicas encontradas abundantemente na natureza, usualmente em frações não saponificáveis de gorduras de animais e plantas. Assim como os esteróides, todos possuem o núcleo peridrosciclopentanofenantreno. A diferença básica de esteróides e esteróis é que os primeiros ou possuem cadeia lateral pequena na posição C17 ou a mesma é ausente, com um ou mais grupos carbonílicos ligados aos anéis do esqueleto esteroidal. Assim para a conversão de esteróis a esteróides é necessário que a cadeia em C17 seja clivada seletivamente. Como não há método químico eficaz para tal conversão, a procura por métodos enzimáticos é intensa, com várias rotas já em uso na indústria farmoquímica.

Além disso, a demanda por compostos enantiomericamente puros tem crescido notavelmente, tendo em vista o efeito da especificidade de cada isômero presente em uma mistura racêmica. A busca de culturas “puras” mais eficientes como a utilização de microrganismos em síntese orgânica, tem aumentado devido à alta versatilidade e as condições suaves de temperatura e pH em que se realizam as reações. Os microrganismos por serem identificados como catalisadores muito eficientes e ecologicamente corretos se adaptam bem a novos ambientes e apresentam altas velocidades de crescimento, o que facilita o seu cultivo e uso em grande escala com baixo custo.

A maior parte da região semi-árida brasileira é coberta pelo bioma Caatinga, que se estende por mais de 800.000 km², em nove Estados, ocupando 70% do Nordeste e 11% do território nacional. Esse bioma, exclusivamente brasileiro, é hoje reconhecido pela riqueza em espécies animais e vegetais. No entanto, considerando a grande extensão do semi-árido, é

necessária a ampliação do conhecimento sobre a diversidade microbiana para melhor compreensão da relação com o ambiente neste bioma de características particulares (MERGULHÃO et al, 2009).

A região do semi-árido baiano é parte da diversidade biológica ainda pouco explorada no Brasil e possui características para apresentar organismos resistentes a condições extremas de temperatura e umidade e, em consequência, enzimas de grande potencial para aplicação em processos industriais (SENA et al, 2006). A Coleção de Cultura de Microrganismos da Bahia (CCMB) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) possui, atualmente, uma coleção de bactérias, fungos filamentosos e leveduras, isolados de diversas regiões e substratos do semi-árido baiano, que pode ser uma fonte potencial de enzimas com aplicação industrial (UETANABARO e GÓES-NETO, 2006).

O potencial biocatalítico de microrganismos isolados no estado da Bahia por sua vez é pouco conhecido. Assim a investigação da atuação catalítica de microrganismos do estado da Bahia em compostos esteroidais é de importância, pois permitirá elevar o conhecimento da atuação destes microrganismos em transformações seletivas no esqueleto esteroide, podendo proporcionar precursores adequados para a preparação de fármacos ou compostos ativos de interesse para a indústria farmacêutica, bem como fornecer novos biocatalisadores.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Selecionar microrganismos isolados no estado da Bahia capazes de realizar conversão biocatalítica em compostos esteroidais.

1.1.2 Objetivos específicos

- Investigar a conversão dos fitoesteróis: β -sitosterol, campesterol e estigmasterol, e do esteróide 19-nor-4-androsteno-3,17-diona por fungos, leveduras e bactérias isolados no estado da Bahia.
- Identificar os microrganismos mais adequados para cada bioconversão.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIOTRANSFORMAÇÃO

A biotransformação é um processo biológico pelo qual um composto orgânico é modificado para um produto recuperável, mediante reações simples, quimicamente definidas, catalisadas por enzimas celulares (LIMA, 2001). Estas enzimas podem ser encontradas na forma isolada ou no interior de microrganismos e vegetais (células íntegras) (COMASSETO, 2002). As enzimas são proteínas responsáveis pela química da vida. A ação enzimática de uma proteína está sempre associada a um sítio ativo ou a um ponto para “prender” substratos através de forças intermoleculares, conferindo a esta proteína uma especificidade catalítica (LEHNINGER, 2000). Segundo Vieira (2006), a aplicação de enzimas em síntese representa uma alternativa viável, chamada “química ecologicamente correta” (green chemistry), principalmente pelo controle ambiental.

A versatilidade de reações catalisadas por enzimas e microrganismos é de particular interesse devido às várias vantagens apresentadas pela biocatálise. A biocatálise envolve trabalhos sobre o aproveitamento do potencial catalítico de microrganismos e enzimas para desenvolvimento de produtos energéticos, alimentícios e farmacêuticos (STINSON, 1994 apud VIEIRA, 2006). Originou-se nos primórdios da nossa civilização quando povos primitivos utilizavam processos fermentativos para transformar uma matéria em outra, como fabricação de pães, de bebidas alcoólicas e de derivados do leite.



Figura 1- Meio reacional de Biotransformação

(Fonte: SINTMOLB, 2009)

Os estudos científicos atuais das biotransformações estão sendo impulsionados como um suporte para sínteses químicas, ou seja, para ampliações, degradações ou resoluções racêmicas de compostos naturais ou sintéticos (STINSON, 1994 apud VIEIRA, 2006). Considerando que a química orgânica moderna está predominantemente fundamentada em

métodos sintéticos altamente seletivos, especialmente os enantiosseletivos, que dependem de reagentes e/ou catalisadores quirais, a biotransformação ou biocatálise é uma ferramenta sintética de importância (ELIEL; WILEN; MANDER, 1994 apud VIEIRA, 2006).

Segundo Sato (2001), os sistemas biológicos também obedecem às leis da química. Não obstante, as biotransformações frequentemente têm preferência sobre os processos químicos quando se requer alta especificidade para atacar um sítio específico sobre o substrato, e para preparar um único isômero do produto. Isso é justificado pelo alto rendimento, típico das conversões biológicas, que frequentemente excedem 90% com células microbianas. As biotransformações são realizadas a temperaturas de 20 a 40°C e sob pressão ambiente, uma vantagem sobre os processos químicos, que requerem um significativo aporte de energia e que, geralmente, são realizadas em meio aquoso, que produz menos contaminação que os solventes orgânicos utilizados nas conversões químicas. Por outro lado, as diluições em que operam as biotransformações constituem uma desvantagem.

A biotransformação é uma ferramenta alternativa que com grande potencial especialmente para o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis para a produção de drogas e outras substâncias químicas, isto é, química verde. A produção biotecnológica de produtos químicos por biocatálise é geralmente um processo limpo sem formação de subprodutos e diminuindo o impacto ambiental de muitos poluentes que podem ser gerados em processo químicos convencionais (SALOMON & WENDHAUSEN, 2007).

Contudo, o número de diversidade de aplicações são ainda modestos, considerando a grandiosa disponibilidade de utilidade dos microrganismos e um largo alcance de reações que podem produzir (BORGES et al, 2009). No processo de biotransformação os microrganismos superam as células vegetais ou animais em vários aspectos, a sua alta relação superfície-volume confere-lhes um crescimento rápido e altas velocidades de metabolismo, que conduzem a uma eficiente transformação dos substratos que os alimenta (SATO, 2001). O mundo microbiano, rico em espécies, proporciona uma grande variedade de enzimas para uma grande variedade de reações sobre muitas classes de compostos, e facilidade de adaptar-se ao ambiente artificial imposto pelas necessidades técnicas e econômicas (SATO, 2001). A grande diversidade de processos metabólicos, condições brandas de reações, natureza régio, quimio e enantiosseletiva, número não limitado de microrganismos na natureza são alguns privilégios evidentes em sínteses orgânicas.

As reações com células íntegras de microrganismos representam uma alternativa mais acessível do que o uso de enzimas isoladas, uma vez que seu sistema enzimático contém os

cofatores necessários, bem como os caminhos metabólicos para a sua regeneração, pois, a utilização de enzimas isoladas, especialmente as intracelulares, que requerem a adição destas moléculas, torna estas reações menos atrativas do ponto de vista econômico (NAKAMURA, NAKAJIMA, OHNO, 1991). Além disso, os microrganismos apresentam como vantagem uma taxa de crescimento rápida e um sistema multienzimático de fácil formação e alta tolerância à concentração do substrato embora sua ampla aplicação apresente algumas limitações como o fato da maioria dos substratos orgânicos serem de baixa solubilidade em água, entre outros fatores elencados na Tabela 1 (ISHIGE et al., 2005; VIEIRA, 2006).

Tabela 1 – Vantagens e Desvantagens no uso de biocatalisadores

Vantagens	Desvantagens
Catalisadores eficientes: catalisam reações freqüentemente mais rápido do que a correspondente reação não catalisada (FERREIRA, 2002).	Sensíveis a condições energéticas: requerem sempre condições brandas de operação.
Ecologicamente corretos: não geram resíduos de alta toxicidade e são degradados pelo meio ambiente.	Alto custo e de difícil recuperação após reação.
Condições reacionais suaves: efetuam a catálise na faixa de 5-8 de pH e em temperaturas de 20°C a 40°C em pressão atmosférica.	Atividade máxima em água: a maioria dos substratos orgânicos é insolúvel ou bem pouco solúvel em água.
Alta tolerância aos substratos: aceitam uma grande variedade de substratos não naturais.	Muitas enzimas isoladas necessitam cofatores: os cofatores são caros e de difícil recuperação.
Atividade catalítica em meios não convencionais.	
Catalisam uma ampla faixa de reações químicas.	
Seletividade: Podem realizar reações difíceis de obter por métodos tradicionais em química orgânica, tornando-os recomendáveis na síntese de compostos enantioméricamente puros. Isto se deve a aspectos de seletividade das reações enzimáticas (FABER, 2004). São elas: Quimiosseletividade, Regiosseletividade ou Diastereosseletividade e Enantioseletividade.	

Fonte: VIEIRA, 2006

2.2 IMPORTÂNCIA DOS MICRORGANISMOS NOS PROCESSOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO.

Os microrganismos desempenham funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos (CANHOS, 2003 apud PINHEIRO, 2004). Os microrganismos e invertebrados constituem aproximadamente 90% das espécies da Terra e desempenham um papel fundamental no funcionamento de ecossistemas. Embora se conheça 80% das plantas e mais de 90% dos vertebrados existentes na natureza, conhecemos menos de 1% das bactérias e vírus e menos que 5% dos fungos. Em termos das bactérias (STALEY, 2003 apud PINHEIRO, 2004) conhece-se menos do que 5.000 bactérias embora estima-se de que existam entre 100.000 a mais de um milhão. Já segundo PELCZAR *et al.* (1993) apud PINHEIRO, 2004, existem no solo, aproximadamente entre 3 milhões a 500 milhões de bactérias; 1 milhão a 20 milhões de actinomicetos; 5 mil a 900 mil fungos; e mil a 100 mil leveduras.

O Brasil é o país com maior biodiversidade com aproximadamente 10-20% do número total de espécies de microrganismos do planeta. O mesmo autor relata que a biodiversidade brasileira ainda não é conhecida totalmente devido à sua grande complexidade, que está diretamente relacionada às dimensões continentais do país e de sua enorme plataforma marinha. Mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microrganismos no território estão sob a jurisdição brasileira (DIAS, 2003 apud PINHEIRO, 2004).

Os microrganismos caracterizados, existentes no planeta, são os responsáveis pelos avanços da biotecnologia moderna e da agricultura, como consequência das descobertas nas áreas de genética, fisiologia e metabolismo de microrganismos. A participação dos produtos obtidos a partir das atividades microbianas no mercado global pode atingir US\$ 40 bilhões ao ano (CANHOS, 2003 apud PINHEIRO, 2004), sendo essa exploração ainda incipiente.

O desenvolvimento de novos métodos biocatalíticos está em constante crescimento na área da química, microbiologia e engenharia genética devido ao fato de serem biocatalisadores seletivos, frequentemente reações de biotransformação são quimio, régio e estereoseletivas produzindo uma ampla variedade de compostos químicos, que são intermediários e/ou drogas, ingredientes alimentícios e intermediários agroquímicos. Um composto particular é modificado por transformação em grupos funcionais com ou sem degradação do esqueleto carbônico, estas modificações resultam na formação de novos e úteis

produtos que são difíceis ou impossíveis de obtenção com os métodos químicos convencionais (BORGES et al, 2009).

Os microrganismos apresentam potencial para a utilização na obtenção de produtos biotecnológicos como: a produção de antibióticos (estreptomicina, penicilina), produção de alimentos (cogumelos), processamentos de alimentos (queijo, iogurte, vinagre), bebidas alcoólicas (vinho, cerveja), ácidos orgânicos (cítrico e fumárico), álcoois (etanol), alimentos fermentados (molho de soja), tratamento e/ou remediação de resíduos (esgotos domésticos, lixo); na agricultura, na fertilização de solos (fixação biológica de nitrogênio) e controle biológico de pragas e doenças (controle da lagarta da soja, da cigarrinha da cana-de-açúcar) e produção de compostos de aromas (anisaldeído, álcool 2 - feniletanol, cumarinas, benzaldeído) (CANHOS, 2003; BERGER, 1995 apud PINHEIRO, 2004).

Segundo Sato (2001), os microrganismos servem como fonte de enzimas para uso em sistemas analíticos e as transformações microbianas exercem um papel importante nos estudos do metabolismo que deve acompanhar as avaliações clínicas das drogas. Os modelos microbianos são úteis para diagnosticar, e às vezes necessários, na preparação de metabólitos derivados das drogas administradas aos animais e ao homem.

A seleção de microrganismos apresenta-se como uma das principais etapas nos processos de biotransformação segundo KIELISCH (1984) e CHEETAM (1997) apud PINHEIRO (2004). Esse fato está relacionado aos substratos utilizados nas reações de biotransformação, os quais são insolúveis em meio aquoso. Além disso, essas biotransformações precisam ser economicamente mais viáveis do que quando comparadas aos processos químicos.

Os passos de seleção dos microrganismos é uma das etapas fundamentais do processo, podendo as cepas ser identificadas através de análise de dados de literatura e obtidas em coleções de culturas de microrganismos de instituições de pesquisa, ou serem identificadas através de um processo empírico de seleção (triagem) de fungos, leveduras e bactérias isoladas da natureza. Nesta triagem realizam-se experimentos em pequena escala com os microrganismos selecionados e analisam-se os metabólitos produzidos frente a um experimento controle sem o substrato escolhido (GLAZER E NIKALDO, 1995).

Os estudos de biotransformação receberam maior atenção desde o desenvolvimento da hidroxilação microbiana para esteróides bioativos e produtos intermediários para a síntese de corticosteróides. A 11 α -hidroxilação da progesterona em uma única etapa microbiana usando *Rhizopus arrizus* foi descrito em 1952. Esta reação é muito importante economicamente para

a síntese de hormônios adrenocorticais (corticosterona, cortisona e hidrocortisona) e permitiu interessantes possibilidades na preparação de derivados bioativos (prednisona, prednisolona e hidrocortisona) (BORGES et al, 2009).

2. 3 BIOTRANSFORMAÇÃO DE COMPOSTOS ESTEROIDAIIS

Os compostos esteróides estão entre os produtos mais extensamente produzidos no mercado da indústria farmacêutica. Reações altamente específicas são requeridas para produzir compostos funcionais com uso terapêutico e valor comercial. A estrutura complexa da molécula de esteróides requer esquemas complicados e múltiplas etapas para a síntese química de compostos esteróides. Envolve frequentemente a preparação de derivados intermediários com grupos protegidos e sua regeneração subsequente, uma vez que a reação pretendida ocorre, limitar o rendimento total do processo e fazer o custo e o tempo consumindo. Além disso, o anel básico da estrutura de alguns derivados esteroidais é sensível à clivagem por uma variedade larga de produtos químicos. A síntese química requer também o uso dos reagentes tais como piridina, trióxido de enxofre ou dióxido de selênio que são perigosos à saúde da equipe de funcionários da produção e constituem um problema ambiental sério de descarte. As conversões microbianas esteroidais são executadas em condições suaves de temperatura e de pressão e podem fornecer 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 esteróides acopla assim o produto químico e aproximações biológicas e faz exame das vantagens dos melhores aspectos de cada um (FERNANDES et al, 2003).

A complexidade de moléculas com núcleo esteroidal torna o uso da biocatálise 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 biológicos 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). Embora algumas destas bioconversões sejam bem estabelecidas, os esforços são contínuos a fim de aumentar a eficiência dos processos existentes tanto quanto para identificar novos biocatalisadores.

A história do desenvolvimento dos esteróides é uma das mais fascinantes e destacadas no campo da medicina, química e microbiologia industrial. O fato de vários esteróides diferentes, como os ácidos biliares, os hormônios sexuais, etc., serem essenciais para os processos biológicos, indica que ocorrem reações enzimáticas de esteróides (SATO, 2001). A produção de drogas e hormônios esteroidais é um dos melhores exemplos da aplicação bem sucedida da tecnologia microbiana em processos industriais de larga escala (FERNANDES et al, 2003).

Esteróis são substâncias orgânicas encontradas abundantemente na natureza, usualmente em frações não saponificáveis de gorduras de animais e plantas (OLIVEIRA e BUENO, 1995). A base do esqueleto molecular de esteróis consiste em quatro anéis de átomos de carbono ligados entre si, o núcleo peridrociclopentanofenantreno (esterano) (1) (FERNANDES et al, 2003). Os esteróis mais comuns (Figura 2), como o colesterol (2), encontrado em praticamente todos os organismos eucariontes; β -sitosterol (3) e estigmasterol (4), encontrados em vários óleos vegetais, e ergosterol (5), encontrado em leveduras e outras fontes microbiológicas, diferem entre si principalmente quanto à natureza da cadeia lateral ligada ao C-17 (OLIVEIRA e BUENO, 1995).

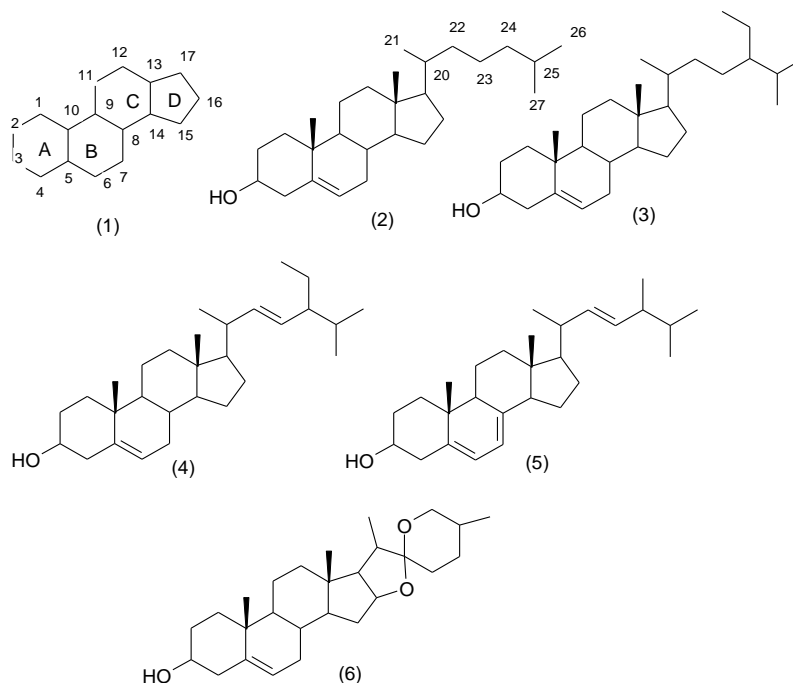


Figura 2 – Núcleo esteroidal e esteróis de ocorrência natural

Fonte: OLIVEIRA e BUENO, 1995.

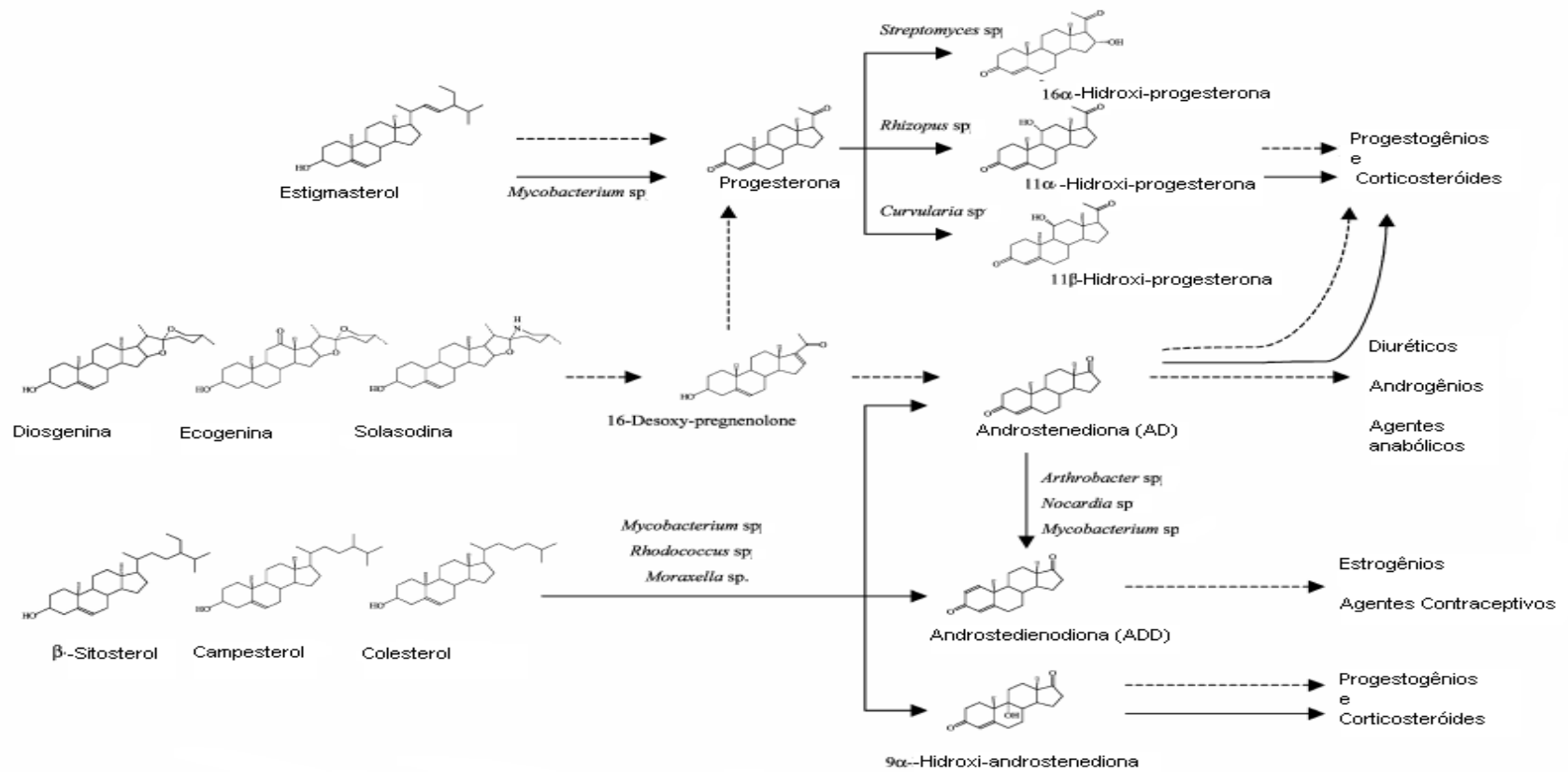


Figura 3 – Biotransformação de esteróis

Fonte: FERNANDES et al, 2003.

A maioria dos processos industriais de obtenção de esteróides utiliza-se de matérias-primas de origem natural. Como os esteróis ocorrem abundantemente na natureza e possuem semelhança estrutural com os esteróides, estes vêm sendo indicados como candidatos potenciais como precursores para a sua síntese. (OLIVEIRA e BUENO, 1995; PIZARRO et al., 1999).

Os esteróis são preferidos, pela sua abundância na natureza e pela sua facilidade de transformação em intermediários essenciais. O estigmasterol, de feijão de soja, tem uma dupla ligação entre C22 e C23 e é convertido facilmente, mediante 4 etapas químicas, em progesterona (Figura 3) (FERNANDES et al, 2003). O β -sitosterol, o mais universal dos esteróis de plantas e o campesterol, ambos de feijão de soja, podem ser biotransformados numa etapa única em dois intermediários-chaves, androstenodiona e a androstadienodiona (Figura 3) (FERNANDES et al, 2003).

Esteróides, tais como os esteróis, são substâncias orgânicas que também possuem o núcleo peridro-ciclopentanofenantreno (Figura 4). Eles diferem dos esteróis por possuírem uma menor ou nenhuma cadeia lateral na posição C17, e por possuírem um ou mais grupos carbonílicos ligados aos anéis do esqueleto esteroidal (OLIVEIRA e BUENO, 1995). Os compostos produzidos a partir de esteróides têm uma ampla escala de finalidades terapêuticas, tais como antiinflamatórios, imunossupressores, progesteracionais, agentes diuréticos, anabólicos e contraceptivos (FERNANDES et al., 2003).

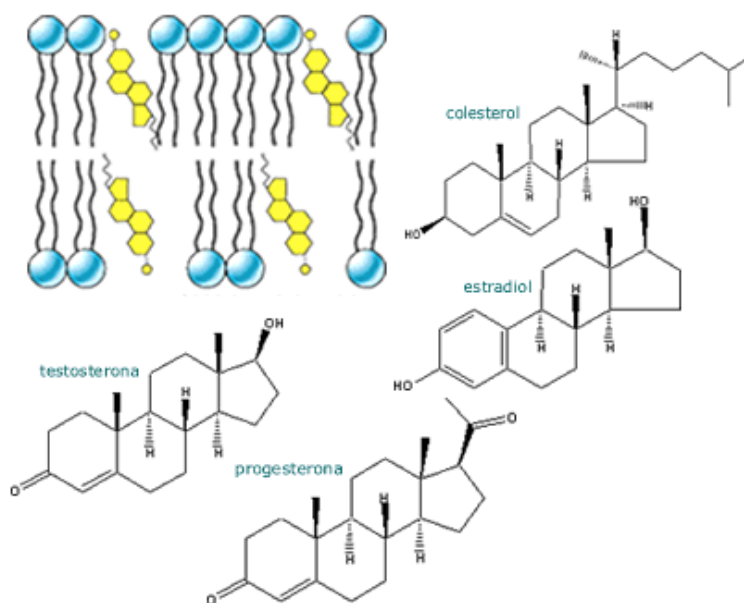


Figura 4 – Compostos esteróides derivados do colesterol

Fonte: QMCWEB, 2009.

Os esteróides ocupam uma importante posição entre preparações farmacêuticas usadas para o tratamento e prevenção de doenças em vários grupos em endocrinologia, oncologia, reumatologia, ginecologia, etc. A produção de drogas esteróides e hormônios esteróides é baseada na combinação de tecnologia microbiana e síntese química (DONOVA, 2007).

Os esteróides representam um marco histórico nos estudos de biocatálise. As primeiras tentativas, com sucesso, de transformação de esteróides foram realizadas por Mamoli e Vercellone em 1937, os quais constataram que uma hidroxila nuclear podia ser obtida a partir de uma cetona por ação de uma levedura. Essa observação, de que a levedura durante a fermentação pode reduzir 17-cetoesteróides a 17 β -hidroxiesteróides (Figura 5) levou a mais importante aplicação das biotransformações, a produção de hormônios esteroidais (SATO, 2001).

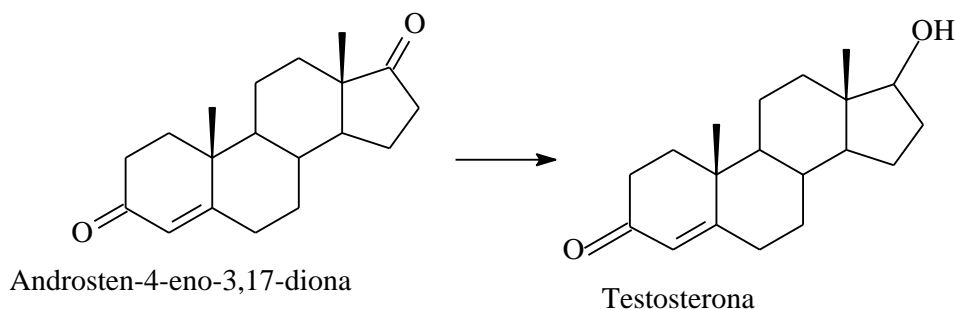


Figura 5 – Redução de 17-cetoesteróides a 17 β -hidroxiesteróides aplicados na fabricação dos hormônios esteroidais.

Fonte: SATO, 2001.

Em 1949, pesquisadores conseguiram produzir a corticosterona (derivado da cortisona), através da ação de microrganismos na deoxicorticosterona, conforme Figura 6. A corticosterona possui ação antiinflamatória, por isso esta metodologia obteve aplicação nas indústrias farmacêuticas (CHARNEY e HERZOG, 1967).

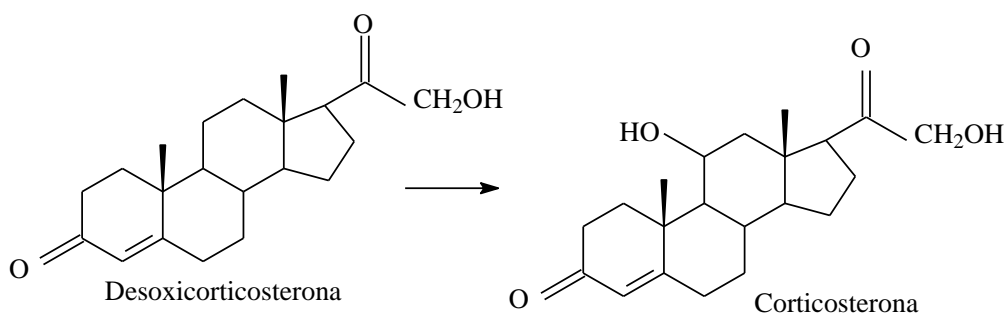


Figura 6 – Biotransformação da deoxicorticosterona

Fonte: CHARNEY e HERZOG, 1967.

Os esforços neste campo da pesquisa foram intensificados a partir de 1950, com a descoberta dos efeitos farmacológicos do cortisol e da progesterona, dois esteróides endógenos, e com a identificação da atividade de hidroxilação no C11 de uma espécie de *Rhizopus*, representando uma etapa decisiva para o desenvolvimento da síntese prática dos esteróides com atividade biológica útil (HOGG, 1992).

A síntese de hormônios adrenocorticóides tornou-se economicamente viável após os estudos realizados por Peterson e Murray em 1952, onde realizaram a hidroxilação na posição 11- α -progesterona (Figura 7) com o fungo *Rhizopus nigricans*, que levou a formação da 11- α -hidroxiprogesterona (STOUDT, 1960). Essa reação foi decisiva para a síntese econômica de hormônios adrenocorticóides, e permitiu amplas possibilidades para a preparação de derivados.

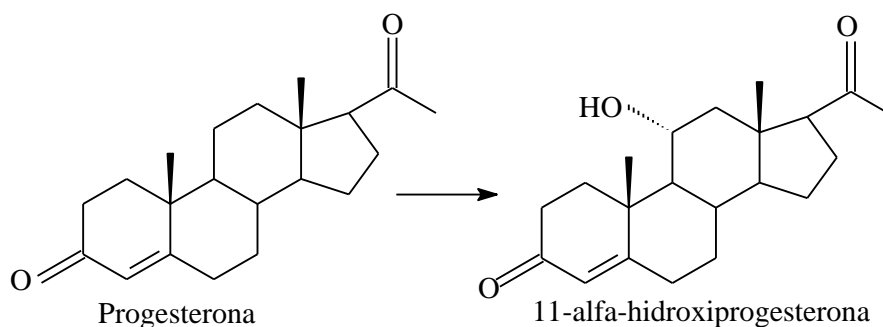


Figura 7 – Biotransformação da progesterona.

Fonte: STOUDT, 1960

Os microrganismos têm demonstrado serem também úteis na preparação de outros hormônios esteroidais (Figura 8), os estrógenos ou hormônios femininos (estrone, estradiol) e os andrógenos ou hormônios masculinos (testosterona). Pode-se ampliar a faixa de matérias-primas úteis, incluindo os esteróis como o β -sitosterol, que não podem servir de substratos para os processos químicos e facilitam a preparação de produtos intermediários-chaves na síntese de derivados úteis (SATO, 2001).

Para que os esteróis possam ser utilizados como precursores de esteróides a cadeia lateral precisa ser clivada seletivamente em C-17 ou C-20, dando origem a esteróides C19 ou C21, 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, 1995; FABER, 2004).

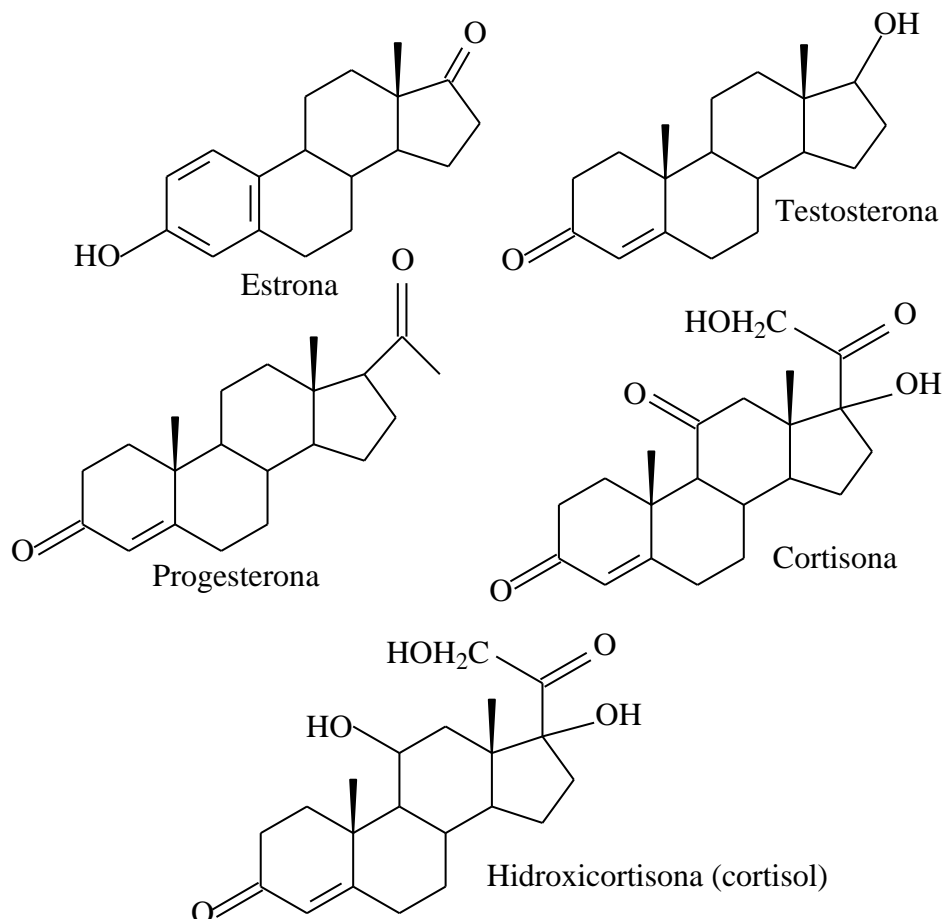


Figura 8 – Hormônios esteroidais do estrano, androstano e série pregnano.

Fonte: SATO, 2001.

Enzimas isoladas de *Bacillus megaterium* demonstraram um grande potencial para a hidroxilação de alcanos, ácidos graxos e compostos aromáticos com alta atividade (URLACHER et al., 2004). Recentemente, Yazdi et al. (2005) demonstraram a habilidade de *Fischerella ambigua* em bioconverter a hidroxicortisona a 11- β ,17- α ,20- β ,21-tetrahidroxipregn-4-en-3-ona e 11- β -hidroxiandrost-4-en-3,17-diona.

Essas biotransformações, associados na maior parte às etapas da síntese química, forneceram ferramentas adequadas para a produção natural em larga escala de análogos naturais ou modificados de esteróides. Os últimos são favorecidos atualmente quando comparados aos seus complementos naturais devido a algumas vantagens terapêuticas, tais

como um aumento da potência, uma longa meia-vida nos fluidos sanguíneos, métodos mais simples de distribuição e efeitos colaterais reduzidos (BORTOLINI; MEDICI; POLI, 1997).

Os compostos produzidos a partir de esteróides têm uma ampla escala de finalidades terapêuticas, tais como antiinflamatórios, imunossupressores, progestacionais, agentes diuréticos, anabólicos e contraceptivos (KOD et al, 2000). Foram aplicados também com sucesso para o tratamento de algumas formas de câncer de mama e próstata e osteoporose, como agente de reposição na insuficiência adrenal (WALSH, 1998), prevenção de doenças do coração (KUTNEY, NOVACK, JONES, 1998), como agentes antifúngicos (CHUNG et al, 1998), como ingredientes ativos nos agentes antiobesidade (SUZUKI et al, 1998), e na inibição do HIV íntegro, prevenção e tratamento de infecções por HIV (DOMBRONSKT et al, 2000). Um glicosídeo esteroideal, torvoside H, isolado das frutas do *Solanum turvum*, exibiu a atividade antiviral no tipo Simplex 1 do vírus da herpes (ARTHAN et al, 2002).

O desenvolvimento de pesquisas conduziu à identificação e uma disposição vasta de compostos esteróides potencialmente úteis, excedendo possivelmente 5.000, os esforços são contínuos para a descoberta de novos compostos esteroidais e isolamento de microrganismos capazes de executar as requeridas transformações esteroidais (BORTOLINI et al, 1997). O aperfeiçoamento da atividade de biotransformação esteroideal de cepas atualmente usadas, bem como a manipulação de métodos de produção de esteróis através de cepas e técnicas de engenharia genética, estão sendo executados, junto com esforços de pesquisa em direção ao aumento na compreensão do mecanismo de transporte de esteróis através de biocatalisadores de membrana. Desenvolvimentos atuais no nível de produtividade de processos inclui projetos reacionais de meios de fermentação, melhorias na solubilidade de substratos lipofílicos e imobilização biocatalítica, facilitando processos contínuos e montagem de processos contínuos de reações (FERNANDES et al, 2003).

A hidroxilação e a desidrogenação são as transformações microbianas utilizadas atualmente em escala industrial. A 11 α -hidroxilação da progesterona é realizada com *Rhizopus nigricans* e produz mais de 85% de 11 α -progesterona. *Rhizopus arrhizus* tem também uma enzima 6-hidroxilase forte e, em incubações prolongadas, transforma o 11-hidroxiderivado na indesejada 6 β ,11 α -dihidroprogesterona. Muitos outros fungos podem também α -hidroxilar na posição 11 (SATO, 2001).

A ampla especificidade de substrato dos sistemas de hidroxilases é uma grande vantagem nesses processos, que permitem a seleção de intermediários ótimos para a hidroxilação numa seqüência de etapas químicas e microbiológicas até o produto final

desejado. As hidroxilações microbianas implicam na substituição direta do átomo de hidrogênio sobre um intermediário carbono. O átomo de oxigênio no grupo hidroxila deriva de oxigênio molecular gasoso, não da água, e o grupo hidroxila assim formado retém sempre a configuração estereoquímica do átomo de hidrogênio substituído. As hidroxilases são enzimas extremamente sensíveis; há relativamente poucos trabalhos bem sucedidos com sistemas acelulares. As enzimas são induzíveis e dependentes de NADPH e O₂ (SATO, 2001).

A desidrogenação em C1 (introduzindo uma dupla ligação) tem sido observada em reações empregando os microrganismos *Cylindrocarpon radicola*, *Streptomyces lavendulae*, *Streptomyces fradiae* e em *Fusarium solani* e *Fusarium caucasicum* como biocatalisadores, porém estes microrganismos também degradam amplamente a cadeia lateral (quando existe). *Septomyxa affinis* e *Arthrobacter (Corynebacterium) simplex* são atualmente preferidos, dando rendimentos mais altos do produto C1 desidrogenado. As C1 desidrogenases são também enzimas induzíveis e várias têm sido purificadas. Não se requer oxigênio, porém geralmente adiciona-se ao extrato acelular um aceptor de hidrogênio, como metassulfato de fenazina. Em conídios de *Septomyxa affinis*, a desidrogenase C1 não é induzível, porém a reação é reprimida ou inibida por glicose (SATO, 2001).

Muito embora vários destes processos tenham se tornado industriais, empregando técnicas especiais de fermentação, a procura por novos microrganismos capazes de hidroxilar ou oxidar regio e estereoseletivamente centros inativos em hidrocarbonetos, sem reações colaterais indesejadas é ainda um grande desafio (FABER, 2004).

Segundo SATO (2001), a indústria de esteróides consome atualmente 2.000 toneladas de equivalente de diosgenina para produzir, por processos químicos e microbiológicos, produtos com um valor bem superior a milhões de dólares. Os corticóides e os contraceptivos representam respectivamente 85 e 5% do mercado em volume ou 55 e 35% em valor monetário. O diurético espironolactona, os estrógenos conjugados (de urina de égua prenha) e o antibiótico ácido fusídico complementam os valores. A biotransformação de esteróides é somente a segunda depois da produção de antibióticos como contribuição vital dos microrganismos à produção de produtos farmacêuticos.

Espécies de *Trichoderma hamatum* KCh25 foram estudados como biocatalisador para uma série de transformações de 3-oxoesteróides. Este potencial não foi anteriormente examinado, as cepas promovem 1-desidrogenação que é raramente observada em culturas de fungos. Outras rotas de biotransformação dos substratos por este microrganismo incluem: hidroxilação nas posições equatoriais 11 α , 6 α e 12 β , hidrólise da ligação éster, oxidação do

grupo 17 α -hidroxil, cisão da ligação C17/C20 e lactonização do anel D. Os produtos das bioconversões realizadas por esta espécie são listados na tabela 2 (BARTMANSKA; DMCHOWSKA-GLADYSZ; 2007).

Androstenodiona (AD) é um intermediário chave no metabolismo microbiano de esteróides (MALAVIYA e GOMES, 2008). AD é um membro representante da família de 17-ceto esteróides, que por sua vez podem ser utilizados para a produção de diversos derivados esteróides, tais como a testosterona, estradiol, etinilestradiol, testolactona, progesterona, cortisona, cortisol, prednisona e prednisolona (WESTFECHTEL e BEHLER, 2006). Trata-se de um hormônio esteróide que ocorre naturalmente e é produzido na gônada ou ovário. AD é um precursor imediato da testosterona em homens e estradiol e estrona em fêmeas. A testosterona e a diidrotestosterona são os hormônios sexuais masculinos (androgênios) mais potentes, e o estradiol o hormônio sexual feminino (estrogênios) mais potente (MALAVIYA e GOMES, 2008).

A androstenodiona é um composto que tem estruturas e propriedades farmacológicas semelhante com testosterona. Sua atividade anabolizante é de cerca de um quinto da testosterona sendo considerado um esteróide anabolizante (MALAVIYA e GOMES, 2008). Esteróides anabolizantes são comumente usados para tratar pacientes que tenham uma deficiência hormonal e que sofrem de atrofia muscular causada pelo aparecimento de câncer ou HIV (SHAHIDI, 2001).

Androstenodiona pode ser produzida pela clivagem microbiana na cadeia lateral de fitoesteróis, que é uma alternativa para multi-etapas na síntese química. Por um longo tempo AD foi a matéria-prima para a preparação de drogas andrógenas e anabolizantes e mais recentemente para a produção de espirolactona. Outros compostos quimicamente e farmacologicamente relacionados com a AD incluem 5-AD, 4-androstenodiol, 19-norandrost-4-enodiona, 19-norandrost-5-enodiol e 19-norandrost-4-enodiol (MALAVIYA e GOMES, 2008).

Tabela 2 – Biotransformação de esteróides por *T. hamatum*

Substrato	Tempo (dias)	Produtos	Rendimento (% por CG)
Testosterona	8	11 α -Hidroxiandrost-1,4-dien-3,17-diona	77
		1-Desidrotestolactona	12
		6 α -Hidroxiandrost-1,4-dien-3,17-diona	5
Propionato de testosterona	4	Androsta-1,4-dien-3,17-diona	51
		11 α -Hidroxiandrost-1,4-dien-3,17-diona	26
		6 α -Hidroxiandrost-1,4-dien-3,17-diona	8
		1-Desidrotestolactona	5
Androstenediona	6	11 α -Hidroxiandrost-1,4-dien-3,17-diona	63
		11 α -Hidroxiandrostenediona	16
		1-Desidrotestolactona	13
		6 α -Hidroxiandrost-1,4-dien-3,17-diona	5
19-Nortestosterona	14	11 α -Hidroxiandrost-1,4-dien-3,17-diona	32
		Estra-1,4-dien-3,17-diona	26
		11 α -Hidroxi-19-nortestosterona	16
17α-Metiltestosterona	14	11 α -Hidroxi-17 α -metiltestosterona	37
		12 β -Hidroxidianabol	26
		11 α -Hidroxidianabol	22
		Dianabol	11
1-Desidrotestosterona	6	11 α -Hidroxiandrost-1,4-dien-3,17-diona	83
		6 α -Hidroxiandrost-1,4-dien-3,17-diona	14
Dianabol	14	11 α -Hidroxidianabol	37
		12 β -Hidroxidianabol	22
		11 α -Hidroxiandrost-1,4-dien-3,17-diona	20
		Material não identificado	10
17α-Etiltestosterona	14	Nenhum	
Noretandrolona	14	1-Desidronoretandrolona	35
		Material não identificado	56
Progesterona	3	11 α -Hidroxiandrost-1,4-dien-3,17-diona	70
		11 α -Hidroxi-1-dehidrotestolactona	15
		11 α -Hidroxitestolactona	5
Cortexolona	14	1-Dehidrocortexolona	89

Fonte: BARTMANSKA; DMCHOWSKA-GLADYSZ; 2007.

O mercado mundial de AD e ADD excede 1000 toneladas por ano (SCHMID, 2001). Assim, processos para a produção de AD e ADD são mais baratos a partir de substratos esteróis, tais como o colesterol ou sitosterol, tornando-se bastante importante e com imensa aplicação comercial (MALAVIYA e GOMES, 2008). Atualmente, a Schering (Berlim e Bergkamen, Alemanha) usa substratos fitoesteróis para produzir AD e ADD. AD pode ser obtido por métodos de síntese orgânica ou pela degradação da cadeia lateral de esteróis. Os estrangulamentos na produção de AD (D) por degradação da cadeia lateral de esteróis, que continuam a ser abordados são: (i) degradação do núcleo esteróide (ii) inibição da degradação da cadeia lateral pela reação dos produtos (AD ou ADD) e (iii) baixa solubilidade de esteróis em meio aquoso (MALAVIYA e GOMES, 2008).

2.4. DIFICULDADES PARA BIOTRANSFORMAÇÃO DE COMPOSTOS ESTEROIDAIIS.

A maioria dos microrganismos capazes de degradar o esterol decompõe a molécula completamente. Para clivar seletivamente a cadeia lateral de esteróis, a degradação do núcleo esteroidal tem que ser inibida, isto pode ser conseguido pela inibição da enzima 9α -hidroxilase, responsável pela clivagem do núcleo. Estudos revelaram que uma série de inibidores, tais como α,α -dipiridil, ortofenantrolina, 8-hidroxiquinolina, são eficientes para inibir a enzima 9α -hidroxilase, impedindo assim, a degradação do núcleo esteroidal (OLIVEIRA e BUENO, 1995).

Esteróis como β -sitosterol e colesterol, de cadeia lateral saturada e que são resistentes à degradação química seletiva, são usualmente considerados de baixo valor ou até como resíduo (DIAS et al, 2002). Por causa da utilização de cepas de *Mycobacterium sp.* que podem degradar a cadeia lateral de esteróis e produzir 17-ceto-esteróides, β -sitosterol, o mais abundante fitoesterol, tornou-se uma importante matéria-prima (WANG et al, 2006). O colesterol da gordura de lã tem um custo maior, pois só pode ser utilizado após um processo de purificação de alto valor. Uma vez que importantes precursores esteróis podem ser encontrados em plantas vasculares como estigmasterol, β -sitosterol e campesterol (KIELICH, 1985), os fitoesteróis foram estabelecidos na indústria farmacêutica como matérias-primas (WANG et al, 2006c).

A clivagem seletiva da cadeia lateral fitoesteróis naturais por cepas de *Mycobacterium sp.* na produção de androstenodiona (AD) e androstadienodiona (ADD), que são importantes

intermediários da indústria farmacêutica, é uma biotransformação industrial importante (WANG et al, 2006c). A disponibilidade das matérias-primas é um dos principais fatores que afetam a economia deste processo. Diosgenina e estigmasterol podem ser utilizados por métodos químicos, uma vez que são as principais matérias-primas para a indústria produzindo esteróides (WANG et al, 2006c).

Além da disponibilidade das matérias-primas, o custo do processo de biotransformação é também um fator-chave (WANG et al, 2006c). Em geral, o processo de biotransformação para produzir ADD é baseado na incubação do substrato esterol em uma cultura microbiana crescente (PEREZ et al, 2005). No entanto, a possibilidade de se variar a densidade celular é menor e a alta complexidade do meio de transformação limitam os efeitos do processo (WANG et al, 2006c).

Os esteróis, especialmente, são marcados como substâncias hidrofóbicas de baixa solubilidade em água e o substrato/produtos são potenciais inibidores sobre o microrganismo na biotransformação (BEILEN et al, 2003). Muitas técnicas têm sido desenvolvidas para lidar com isso, como a adsorção em sólidos transportadores (LEE e LIU, 1992), células magneticamente imobilizadas (FIYGARE e LARSSON, 1987), bioconversão direta no meio sólido (PEREZ et al, 2005), etc.

Um dos mais ativos métodos de investigação sobre o problema é a utilização de um sistema de partição em duas fases de solvente aquoso-orgânico como meio reacional (FERNANDES; CABRAL; PINHEIRO; 1998). No entanto, no processo de biotransformação de células inteiras, a toxicidade do solvente é muitas vezes um fator limitante (WANG et al, 2006c). A combinação da utilização de solventes orgânicos e biocatalisadores imobilizados fornece uma ferramenta para a biotransformação de esteróis, porque alta concentração de substrato pode ser utilizado e uma proteção ambiental à toxicidade do solvente é prestada. Esta abordagem é muitas vezes limitada pela resistência na transferência de massa e riscos explosivos (FERNANDES; CABRAL; PINHEIRO; 1998).

Recentemente, foi relatada a possibilidade de separar o processo de biotransformação do crescimento microbiano (WANG et al, 2005b) e o crescimento celular na biotransformação do colesterol em ADD por *Mycobacterium sp.* NRRL B-3683 em um novo sistema de meio (WANG et al, 2004a). Trata-se de uma solução de micélios em surfactante aquosa aniônico, em um temperatura acima do seu ponto de fusão ou na presença de certos aditivos, a separação de fases ocorre de modo a formar uma fase de surfactante diluído e uma fase rica em surfactante (WANG et al, 2004a). Este sistema é normalmente conhecido como sistema de

ponto de fusão e pode ser utilizado como uma prática potencial de meio de biotransformação para substratos hidrofóbicos (WANG et al, 2005b).

Wang et al (2006c) estudaram a biotransformação de fitoesteróis (uma mistura de estigmasterol, β -sitosterol e campesterol) em um sistema de ponto de fusão de células em repouso, em que β -sitosterol e campesterol pode ser transformado em ADD como segue na Figura 9:

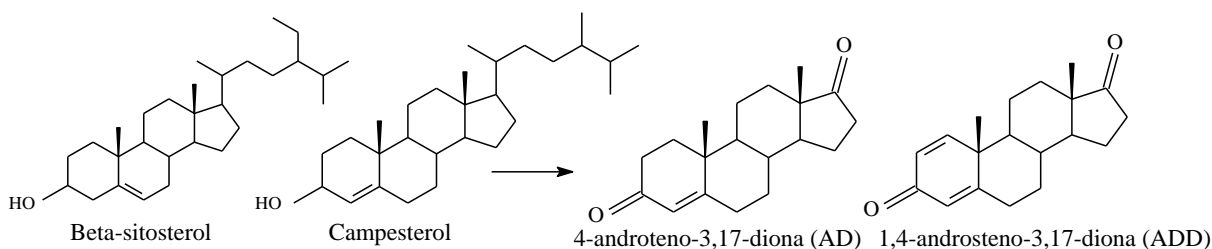


Figura 9 – Biotransformação de fitoesteróis

Fonte: Wang et al (2006c).

O estudo tratou parâmetros da operação de biotransformação operação, bem como algumas condições básicas de crescimento de células incluindo os efeitos da idade celular e constituintes do meio de cultura celular em atividade biocatalítica de células em repouso (WANG et al, 2006c).

O problema da clivagem seletiva de cadeias laterais de esteróis mantendo intacto o núcleo esteróide pode ser tratado empregando-se melhoramento de cepas bacterianas, inibindo a atividade 9α -hidroxilase de todas células biocatalisadoras e modificando a estrutura do substrato (KIESLICH, 1985; SZENTIRMAI, 1990; AHMAD ET AL., 1992).

O desenvolvimento de novos processos empregando substratos econômicos, meios bifásicos orgânico-aquosos, agentes celulares permeabilizantes e catalisadores imobilizados são atualmente áreas de ativas investigações. A baixa solubilidade de substratos em sistemas aquosos devido a sua natureza hidrofóbica é um desafio para a indústria na produção de esteróides incluindo AD (D) por clivagem da cadeia lateral de esteróis. Esta é a razão pela qual a maior parte das investigações em produção de esteróides por biotransformação é orientada para concepção e otimização dos procedimentos. Desde a modificação seletiva da cadeia lateral de fitoesteróis, sem degradar o núcleo esteróide que é difícil realizar, a produção de esteróides por múltiplas reações químicas tem baixa eficiência, baixo rendimento e alto custo (MALAVIYA e GOMES, 2008).

A baixa solubilidade de esteróis em sistemas aquosos é um problema crítico, uma vez que limita o rendimento do produto (MALAVIYA e GOMES, 2008). A solubilidade em meios aquosos de compostos esteróides e de esteróis está geralmente abaixo de 0.1mM e 1 M, respectivamente. Isto limita consideravelmente a produtividade de sistemas de biotransformação, onde a concentração inicial do substrato quase nunca excede 10–20 mM. Além disso, os substratos pulverizados adicionadas ao meio do fermentação tendem a aglomerar e são difíceis de dispersar-se. Assim, o rendimento da biotransformação de esteróides em meio aquoso depende não somente da atividade específica do biocatalisador, mas também da taxa de dissolução contínua do substrato (FERNANDES et al, 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 INSTALAÇÕES DO EXPERIMENTO

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos - LAPRON e no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia – LAPEM da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

3.2 SOLVENTES E REAGENTES

Os compostos esteroidais foram adquiridos comercialmente, o β -sitosterol 40% obtido de soja contendo β -sitosterol, estigmasterol e campesterol (SIGMA) e 19-nor-4-androsteno-3,17-diona (SHANGHAI DESANO). Os demais reagentes utilizados também foram obtidos comercialmente, abaixo estão relacionados os reagentes utilizados e suas respectivas origens.

Tabela 3 – Reagentes utilizados

REAGENTE	FABRICANTE	PUREZA
Acetato de Etila	VE TEC	P.A.
Acetona	VE TEC	P.A.
Ágar-Ágar	HIMEDIA	P.A.
Extrato de Levedura	HIMEDIA	P.A.
Glucose anidra	QUIMEX	P.A.
19-Nor-4-androsteno-3,17-diona	SHANGHAI DESANO	P.A.
Peptona	HIMEDIA	P.A.
Sílica	MERCK	P.A.
β-Sitosterol	SIGMA FARMA	P.A.

3.3 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados estão listados na tabela seguinte.

Tabela 4 – Equipamentos utilizados

EQUIPAMENTO	MARCA	MODELO
Agitador magnético	Quimis	Q261-22
Autoclave Vertical	Phoenix	AV 75
Balança semi-analítica	Bel	Mark 160
Balança Analítica	Shimadzu	AY 220
Estufa de Secagem	Nova Ética	410/5
Shaker (incubadora com agitação orbital)	Marconi	MA-420
Vortex (agitador de tubos)	Biomixer	QL-901
CGMS	Shimadzu	QP2010
Capela de Fluxo Laminar	Filtex	Compact Biologic Class II-A

3.4 MICRORGANISMOS

Os microrganismos utilizados compreendem a seleção de 7 fungos filamentosos, 10 leveduras e 10 bactérias oriundos da Coleção de Cultura de Microrganismos do Estado da Bahia (CCMB/UEFS). As espécies de leveduras são originadas de coletas realizadas em três cachaçarias do Estado da Bahia: Cachaça Engenho Bahia (município de Ibirataia), Cachaça Poço da Pedra (município de Caculé) e Cachaça Tombadouro (Rio de Contas), e estas linhagens foram identificadas como *Saccharomyces cerevisiae* (SILVA, 2009).

Tabela 5 – Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

LEVEDURAS	ORIGEM
P15	Cachaça Poço da Pedra
P35	Cachaça Poço da Pedra
T1	Cachaça Tombadouro
T5	Cachaça Tombadouro
T10	Cachaça Tombadouro
E1-E5	Cachaça Engenho Bahia

As bactérias testadas pertencem aos seguintes gêneros: *Rhizobium* sp, *Pseudomonas* sp, *Ochrobactrum* sp, *Agrobacterium/Rhizobium* sp, *Brevibacillus* sp, *Enterobacter* sp, *Pandorea* sp, *Paenibacillus* sp e *Bacillus* sp, são oriundas de nódulos do sistema radicular de *Arachis pintoii* Krapov. & W. C. Gregory (amendoim forrageiro) coletadas na região Sul da Bahia na Estação de Zootecnia do extremo Sul da CEPLAC em Itabela, e nas Fazendas Ubirajara e São Francisco em Belmonte na Região Sul da Bahia (ROCHA, G., 2007).

Tabela 6 – Bactérias utilizadas

Código	Bactérias
I30	<i>Pseudomonas</i> sp
I116	<i>Ochrobactrum</i> sp
I85	<i>Paenibacillus</i> sp
I68	<i>Paenibacillus</i> sp
I67	<i>Rhizobium</i> sp
B34	<i>Enterobacter</i> sp
I07	<i>Agrobacterium</i> sp ou <i>Rhizobium</i> sp
021	<i>Brevibacillus</i> sp
B08	<i>Pandorea</i> sp
B18	<i>Bacillus</i> sp

Os fungos filamentosos foram os seguintes: *Fusarium* sp. (MDF077), duas espécies de *Glomerella cingulata* (FX127 e MDF36), *Myrothecium* sp (CDC26) e três espécies que serão identificadas MDF92, FX45, CDC86. Os fungos endofíticos foram coletados a partir de ramos laterais da copa de árvores seringueira (*Hevea brasiliensis*) pertencentes aos cultivares FX3864, CDC312 e MDF180 no município de Igrapiúna, na região sudoeste da Bahia (ROCHA, A., 2007).

Tabela 7 – Espécies de fungos filamentosos

Código	Identificação
MDF077	<i>Fusarium</i> sp
FX127	<i>Glomerella cingulatta</i>
MDF36	<i>Glomerella cingulatta</i>
CDC26	<i>Myrothecium</i> sp
MDF92	*
FX45	*
CDC86	*

* Estas espécies ainda não foram identificadas.

3.5 BIOTRANSFORMAÇÃO



Figura 10 – Fluxograma do Processo de Biotransformação

3.5.1 Seleção dos melhores microrganismos

Os microrganismos foram pré-cultivados em meio de cultura Ágar Müller Hinton sob diferentes tempos e temperaturas de acordo com o grupo microbiano: leveduras 36 h a 28°C, bactérias 24 h a 37°C e fungos filamentosos 7 dias a 28°C. Depois do tempo de crescimento dos microrganismos, prepararam-se suspensões microbianas com concentrações definidas

para leveduras (5×10^5 UFC/mL) e para bactérias ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Para os fungos filamentosos foi realizado um teste preliminar para verificar a concentração adequada de material fúngico para a reação de biocatálise onde foi utilizada uma variação de 1 a 5 plugues (circunferência com 6 mm de diâmetro) adicionados ao meio de cultura YPD (Broth Yeast Extract Peptone Dextrose, 10 g de levedura, 20 g de peptona, 20 g dextrose e 1L de água destilada) contendo o substrato esteroidal. A quantidade de plugues escolhida foi de 3 unidades para cada meio reacional.

Os microrganismos foram inoculados (500 μ L de leveduras e 100 μ L de bactérias e 3 plugues de fungos filamentosos) em frascos de vidro com capacidade de 250 mL, contendo 25 mL do meio de cultura YPD (10 g extrato de levedura; 20 g peptona; 20 g dextrose; 1 L água destilada) e 30 mg do substrato dissolvido em 1 mL de acetona. Estes frascos foram colocados em numa câmara incubadora com agitação orbital (Shaker; Marconi modelo MA-420) (Figura 11) a 120 rpm: a 28°C para leveduras e fungos filamentosos e 37°C para bactérias, durante 14 dias. A cada 7 dias alíquotas de 2 mL foram retiradas do meio reacional e filtradas em algodão estéril para separação do meio de cultura e os micélios. Em seguida, procedeu-se a extração com acetato de etila por três vezes.



Figura 11- Câmara Incubadora com Agitação Orbital (Shaker)

As amostras foram concentradas por evaporação do solvente sob temperatura ambiente em capela de fluxo laminar e analisadas por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas utilizando um cromatógrafo a gás (CGMS - QP2010 SHIMADZU) (Figura 12) com coluna capilar CP-Sil-5CB-MS, WCOT de sílica fundida, 30 m x 0,25 mm ID x 0,25 μ m

(Varian), à temperatura inicial de 170°C, com razão de aquecimento de 5°/min e temperatura final de 300°C permanecendo por 15 min.



Figura 12 – Cromatógrafo a Gás acoplado a Espectrômetro de Massa (CGMS)

A identificação dos componentes foi com base na comparação dos espectros de massas da biblioteca CLASS-VP software NIST-107 - library registry of mass spectral data - (através de busca automática e manual), bem como pela comparação com padrões autênticos quando disponíveis. A taxa de conversão dos compostos foi calculada com base na soma total da área dos picos encontrados na amostra, como segue na equação abaixo:

$$TC_x = AP_x \times 100 / AT$$

Onde:

TC_x = Taxa de conversão do pico X;

AP_x = Área do pico X;

AT = Área total dos picos da amostra.

Todos os testes foram realizados em triplicata. Foi realizado controle microbiológico, através de repique em placas, durante as duas coletas para extração dos produtos de biotransformação e controle com os substratos e o meio de cultura.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 BIOTRANSFORMAÇÃO DE FITOESTERÓIS

Para investigação da clivagem da cadeia lateral de esteróis por microrganismos do estado da Bahia foi utilizado como reagente uma mistura comercial de fitoesteróis, contendo β -sitosterol, campesterol e estigmasterol (Figura 13), com o mesmo núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno, apresentando variações estruturais apenas no substituinte alquílico do carbono C-17.

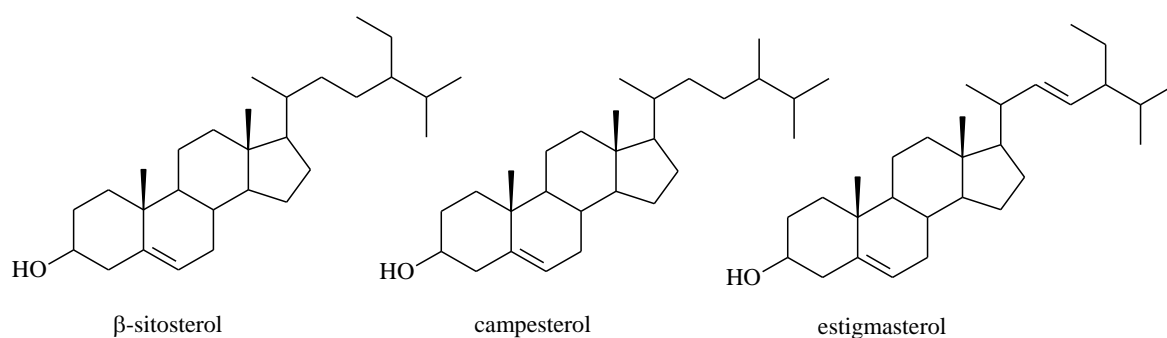


Figura 13 – Estruturas dos fitoesteróis presentes no reagente empregado

Pela análise por cromatografia a gás acoplado a espectrometria de massas (CG-EM), este reagente empregado apresentou três picos com os seguintes tempos de retenção (t_R): 27,29 min; 27,75 min e 28,66 min correspondentes a campesterol (16%), estigmasterol (24%) e β -sitosterol (60%), respectivamente, conforme perfil cromatográfico apresentado na Figura 14, e os cálculos de conversão foram realizados com base na área total das três substâncias acima mencionadas.

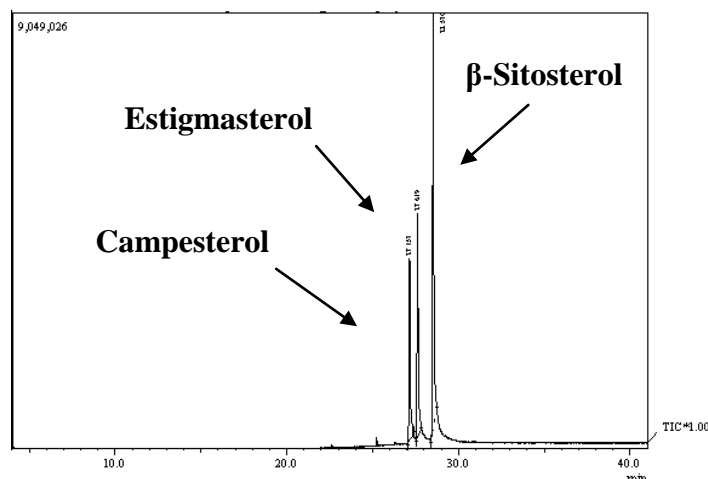


Figura 14 – Perfil cromatográfico da mistura de fitoesteróis empregada

Os produtos das biotransformações por leveduras, dos fungos e bactérias foram analisados por CG-EM, em dois períodos de tempo de reação (7 e 14 dias) para avaliação da possível clivagem da cadeia lateral dos fitoesteróis, com o objetivo de selecionar linhagens capazes de produzir 4-androsteno-3,17-diona, 1,4-androstadieno-3,17-diona e testosterona, a partir do β -sitosterol, campesterol e estigmasterol, conforme demonstrado na Figura 15. Devido a presença de estigmasterol nesta mistura, a formação de progesterona também era esperada, pois, segundo Fernandes et al (2003), a dupla em C22 na molécula do estigmasterol pode reduzir a degradação específica da cadeia lateral em C17 pela maioria das enzimas das cepas microbianas mais empregadas.

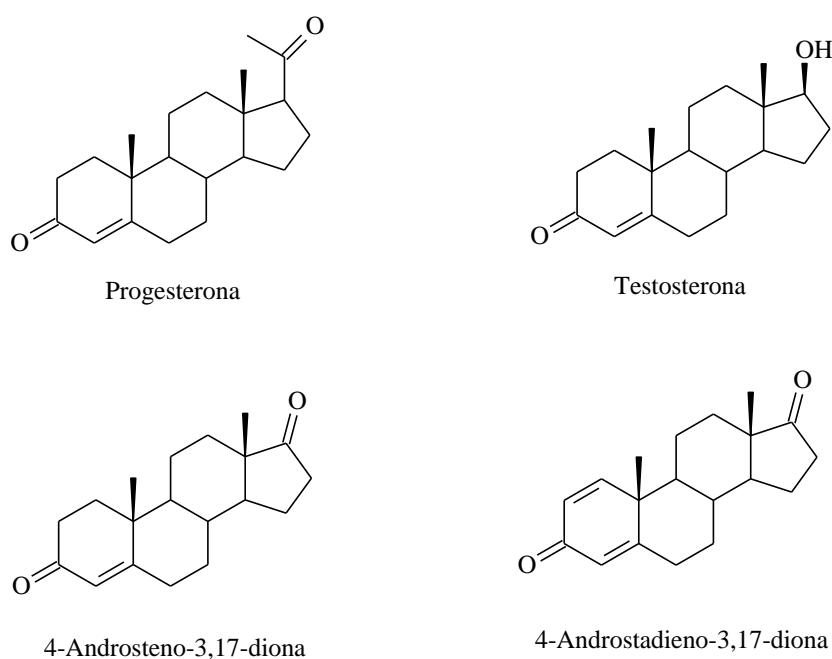


Figura 15 – Esteróides esperados resultantes da clivagem da cadeia lateral dos fitoesteróis

Comparando o tempo de retenção nos cromatogramas obtidos dos produtos de biotransformação com os das androstenonas previstas, assim como seus espectros de massas, nenhuma conversão dos fitoesteróis aos esteróides esperados foi observada, indicando que as células microbianas não foram capazes de degradar a cadeia lateral. A Figura 16 apresenta o perfil cromatográfico da reação para a linhagem E5 de *Saccharomyces cerevisiae* (E5), onde é demonstrado que não ocorreu a formação de nenhum produto.

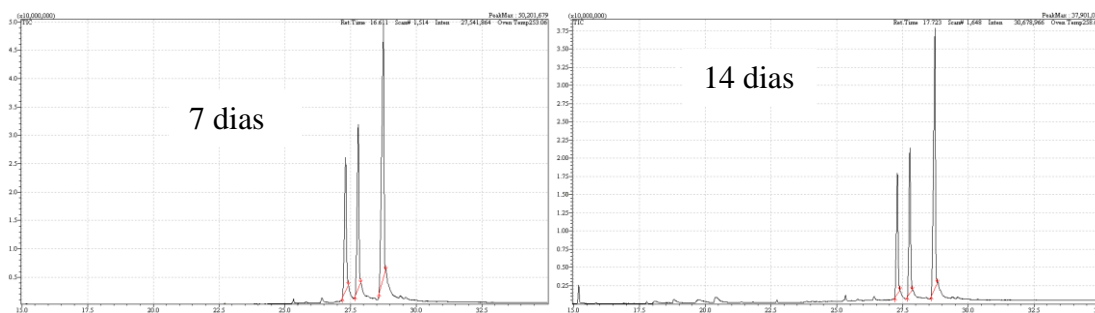


Figura 16 – Perfil cromatográfico da bioconversão por espécies de *Saccharomyces cerevisiae* (E5)

Na reações com as linhagens de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 16), assim como para as bactérias: *Rhizobium* sp, *Pseudomonas* sp, *Ochrobactrum* sp, *Agrobacterium* sp, *Brevibacillus* sp, *Enterobacter* sp, *Pandorea* sp, *Paenibacillus* sp e *Bacillus* sp, e fungos: *Fusarium* sp. (MDF077), duas espécies de *Glomerella cingulatta* (FX127 e MDF36) e *Myrothecium* sp (CDC26), MDF92, FX45, os reagentes foram recuperados após o período de 14 dias.

No caso da reação empregando o fungo CDC86 como biocatalisador, três produtos com tempo de retenção superior ao dos fitoesteróis foram obtidos, em 29,22 min (1), 29,78 min (2) e 30,88 min (3), conforme perfil cromatográfico da conversão apresentado na Figura 17.

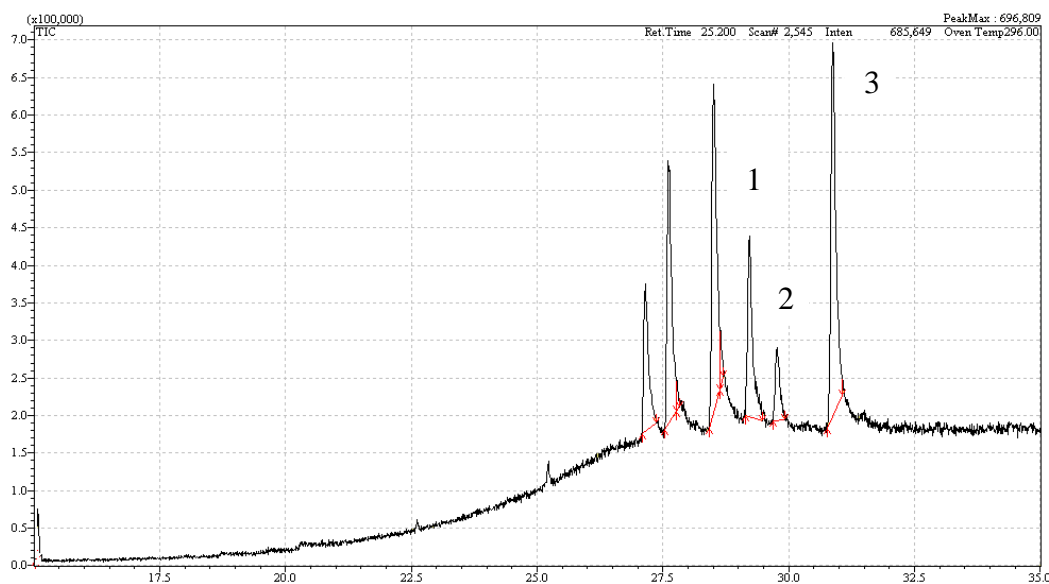


Figura 17 – Perfil cromatográfico da reação catalisada pelo fungo CDC86

Pelos espectros de massas dos três produtos (Figura 18) e comparação do tempo de retenção com padrões, há indicação de oxidação dos fitoesteróis empregados, levando a produtos de oxidação do campesterol (tempo de retenção = 29,22 min, íon molecular em m/z 398), estigmasterol (tempo de retenção = 29,78 min, íon molecular em m/z 410) e β -sitosterol (tempo de retenção = 30,88 min, íon molecular em m/z 412), com taxa de conversão total de 47%, após 14 dias de reação.

O produto com tempo de retenção 30,88 min, obtido com taxa de conversão de 54% a partir do β -sitosterol, foi identificado como a sitostenona, pela injeção com padrão e pelo seu espectro de massas (Figura 18). Este espectro apresenta o pico do íon molecular em m/z 412, e os fragmentos em m/z 397 (M-CH₃), em m/z 370 (M-C₃H₆ e M-C₂H₂O), em m/z 271 (M-C₁₀H₂₁), indicativo da perda do grupo alquila em C17, em m/z 229 (M-C₁₃H₂₇), resultante da clivagem do anel D entre C13-C17 e C14-C15, em m/z 176 (M-C₁₇H₃₃), pela clivagem do anel C entre C12-C12 e C8-C14. Um dos tipos mais comuns de fragmentação em compostos esteroidais substituídos em C17 é a perda deste substituinte mais 42 unidades de massa, e segundo Biemann (1962) este íon em m/z 229 é formado pela clivagem das duas ligações em C13-C17 e C14-C15 no anel D, simultaneamente com uma migração de um átomo de H ao fragmento neutro. O pico base, em m/z 124, é característico de 3-ceto esteróides α,β -insaturados com a ligação dupla na posição Δ^4 , pela clivagem do anel B.

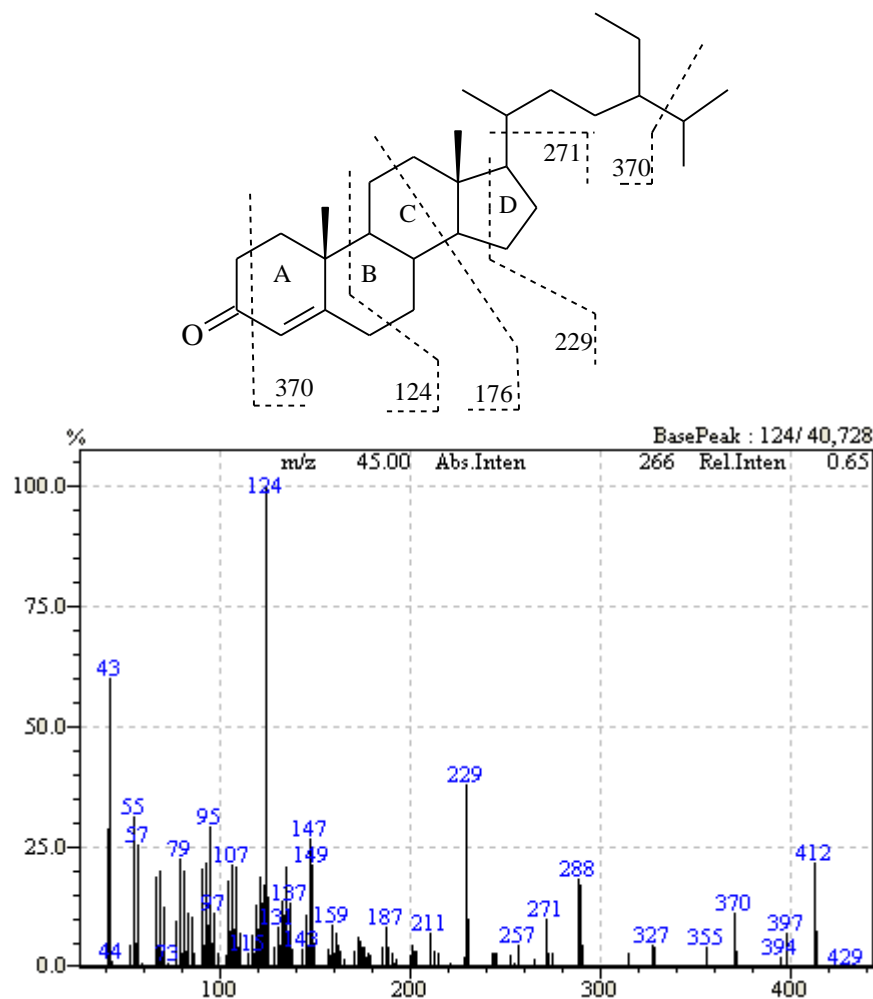


Figura 18 - Espectro de massas e padrão de fragmentação sugerido para a sitostenona

O produto com tempo de retenção em 29,22 min, apresenta em seu espectro de massas (Figura 19) o pico de íon molecular em m/z/ 398, e os fragmentos em m/z 383 (M-CH₃), em m/z 356 (M-C₃H₆ e M-C₂H₂O), em m/z 271 (M-C₉H₁₉), indicativo da perda do grupo alquila em C17, e demais fragmentos com padrão de fragmentação similar a sitostenona. O pico base em m/z 124 também indica que este composto é um 3-ceto esteróide α,β -insaturado com a ligação dupla na posição Δ^4 , sugerindo assim a presença da campestenona, obtida a partir do campesterol com taxa de conversão de 56%.

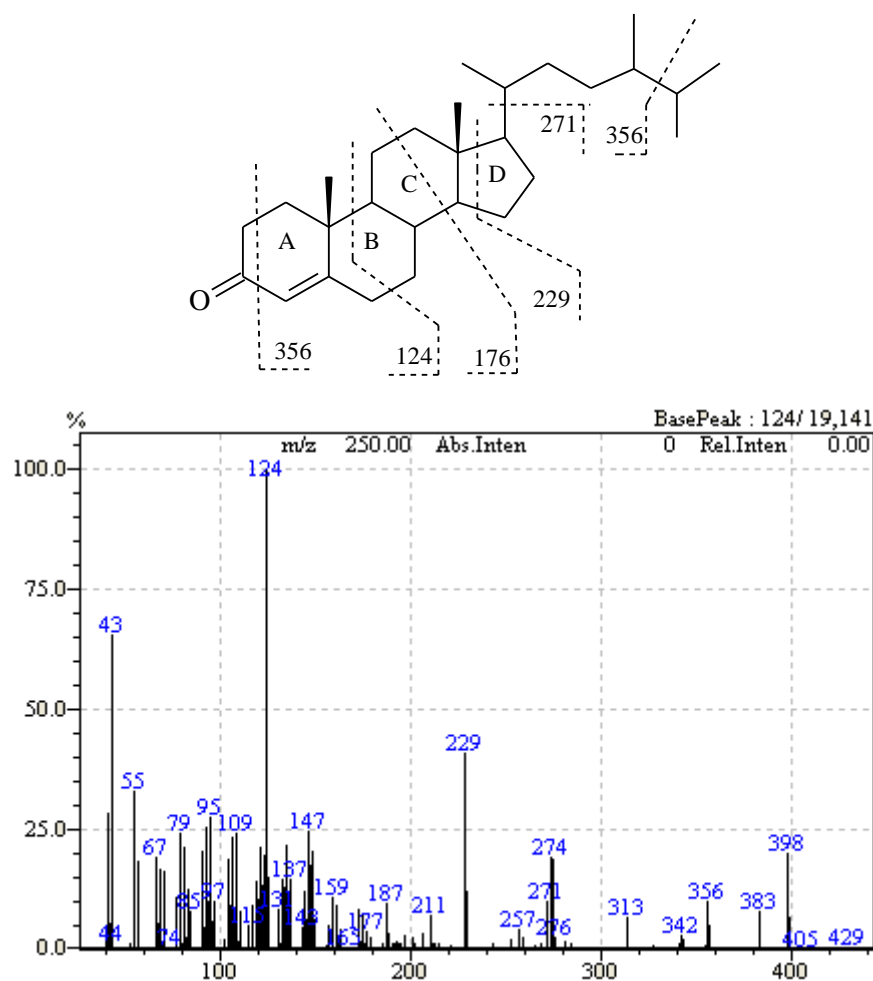


Figura 19 - Espectro de massas e padrão de fragmentação sugerido para a campestenona

Já o produto com tempo de retenção em 29,78 min, pelo seu espectro de massas (figura 20) apresenta íon molecular em m/z 410. Os fragmentos em m/z 367 (M-C₃H₇), devido a perda de uma isopropila, característica de esteróides Δ^{22} insaturados, e do fragmento em m/z 271 (M-C₁₀H₁₉), relativo a perda do substituinte em C17, sugerem que este esteróide é derivado do estigmasterol. A clivagem do anel D também é observada pela formação do fragmento em m/z 229. A presença do pico base em m/z 55 é indicativo da presença de uma acetona cíclica alifática e este íon é gerado pela clivagem de uma ligação adjacente a carbonila, com migração de um H para o fragmento neutro. O padrão de fragmentação, em comparação com dados da literatura (Chaves et al, 2004) e com a biblioteca do equipamento, indica a presença da espirastenona, obtida a partir do estigmasterol com 21% de taxa de conversão.

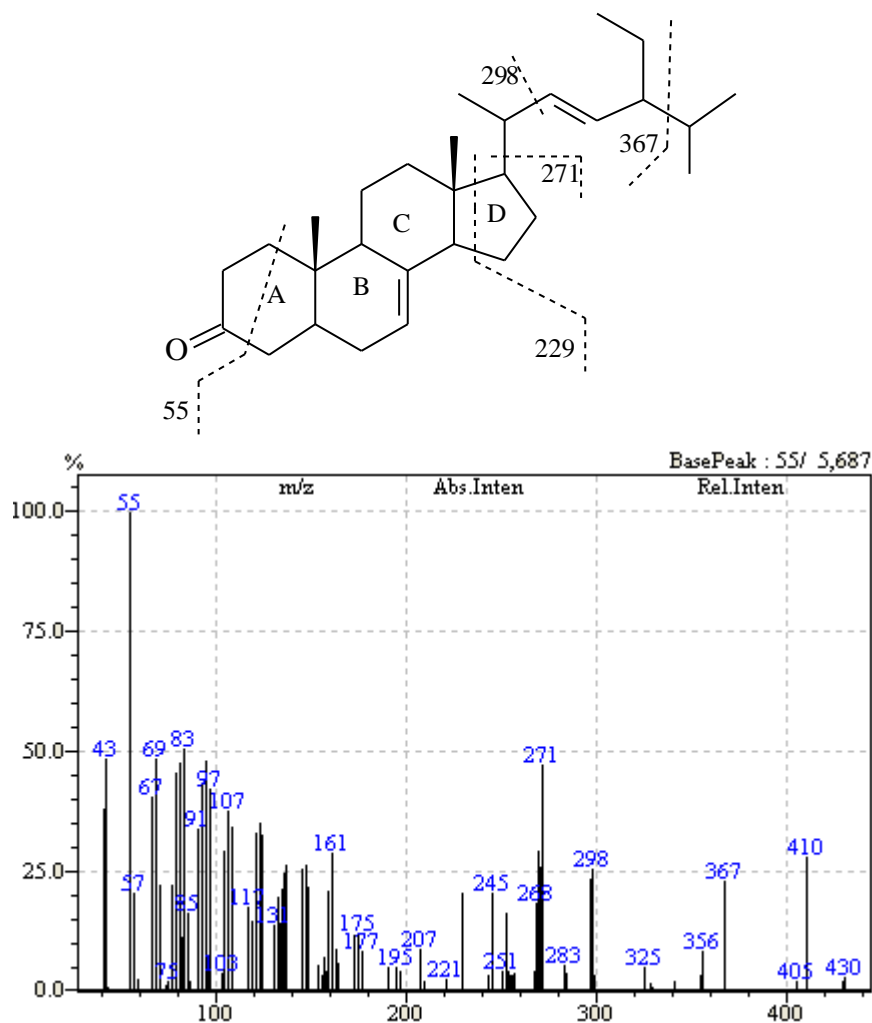


Figura 20 - Espectro de massas e padrão de fragmentação sugerido para a espiostenona

A formação de cetonas α,β -insaturadas a partir de esteróis por ação de microrganismos também foi observada por Yadzi et al (2000), que utilizou *Agrobacterium* sp M4 isolada de amostras do solo na degradação de colesterol, com taxas de 99%, sendo o principal metabólito detectado a colesteno. Da mesma forma, Omata et al (1979) ao usar células imobilizadas de *Norcadia rhodocrous* em reações com colesterol, β -sitosterol e estigmasterol, obteve os correspondentes 3-ceto- Δ^4 esteróides.

4.2 BIOTRANSFORMAÇÃO DO 19-NOR-4-ANDROSTENO-3,17-DIONA

Além da clivagem seletiva da cadeia lateral de esteróis naturais, outras modificações no núcleo dos esteróides são de importância biotecnológica, como a desidrogenação, hidroxilação, redução de cetonas, entre outras (DONOVA, 2007). Desta forma para se

analisar o potencial biocatalítico dos microrganismos selecionados, o esteróide 19-nor-4-androsteno-3,17-diona foi selecionado como substrato para avaliação. A análise do substrato 19-nor-4-androsteno-3,17-diona por CG-EM apresentou um pico com o seguinte tempo de retenção 18,7 min, com pureza de 99%, conforme perfil cromatográfico apresentado na Figura 21.

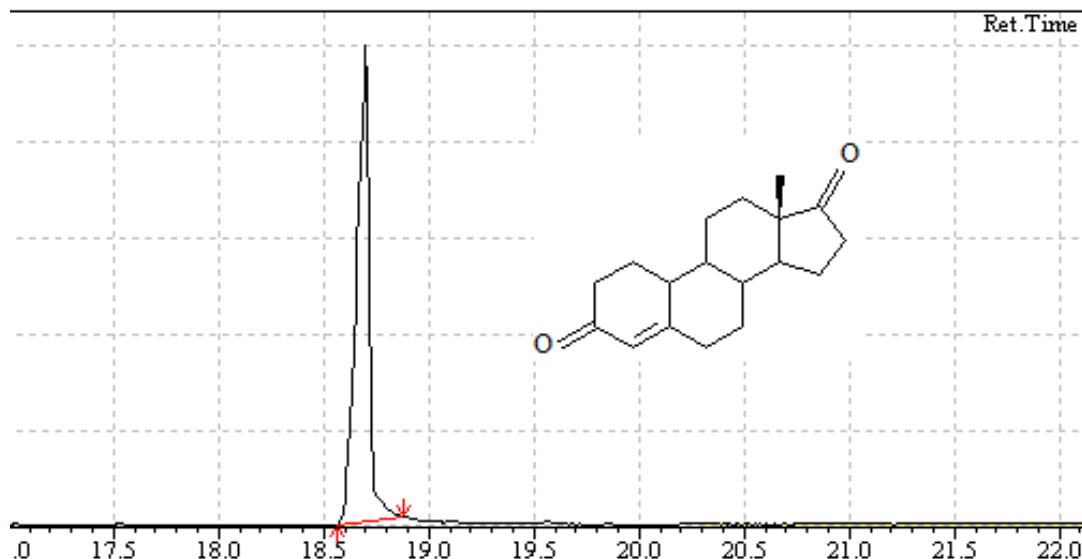


Figura 21 – Perfil cromatográfico do 19-nor-4-androsteno-3,17-diona

4.1.1 Biotransformação utilizando leveduras

As cepas de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (P15, P35, T1, T5, T10) foram testadas como biocatalisadores, e os produtos formados analisados por CG-EM. A relação entre a área do substrato 19-nor-4-androsteno-3,17-diona e dos produtos formados foi utilizada para os cálculos de taxa de conversão, que são apresentadas na Tabela 8. Durante os sete primeiros dias as taxas de bioconversões para todas as leveduras variaram entre 15 e 56%. A linhagem P15 foi a que apresentou a maior taxa de bioconversão do substrato com 7 dias, 56% e a linhagem T10 a menor taxa de bioconversão, 15%. Decorridos os 14 dias as conversões apresentaram aumento significativo, entre 23 e 73%, sendo que a linhagem T5 apresentou a maior taxa de bioconversão, 73% e a linhagem T1 a menor taxa, 23%.

Tabela 8 – Taxa de biotransformação do 19-Nor-4-androsteno-3,17-diona por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

Microrganismos	Tempo (dias)	Produtos	Taxa de bioconversão (%)*
P15	7	Nandrolona	56
	14	Nandrolona	67
P35	7	Nandrolona	27
	14	Nandrolona	61
T1	7	Nandrolona	17
	14	Nandrolona	23
T5	7	Nandrolona	49
	14	Nandrolona	73
T10	7	Nandrolona	15
	14	Nandrolona	47

*Média de 2 ou 3 amostras

Os produtos da bioconversão destas espécies analisadas apresentaram perfis cromatográficos semelhantes. Todas estas linhagens de leveduras apresentaram como produto o mesmo composto com tempo de retenção de 18,75 min, e espectro de massas idêntico. Embora as taxas de conversão não tenham sido elevadas (entre 23 a 73%), as reações foram regioseletivas pois levaram a formação de um único composto, a nandrolona, por redução da carbonila em C-17. O composto foi identificado pelos dados de espectrometria de massas e por injeção com um padrão autêntico. Pela análise do espectros de massas é possível verificar a presença do íon molecular m/z 274, que após eliminação de água devido a presença de uma hidroxila, leva ao fragmento m/z 256. O pico base, em m/z 110, é resultante da clivagem do anel B que é característica de 3-ceto esteróides α,β -insaturados com a ligação dupla na posição Δ^4 .

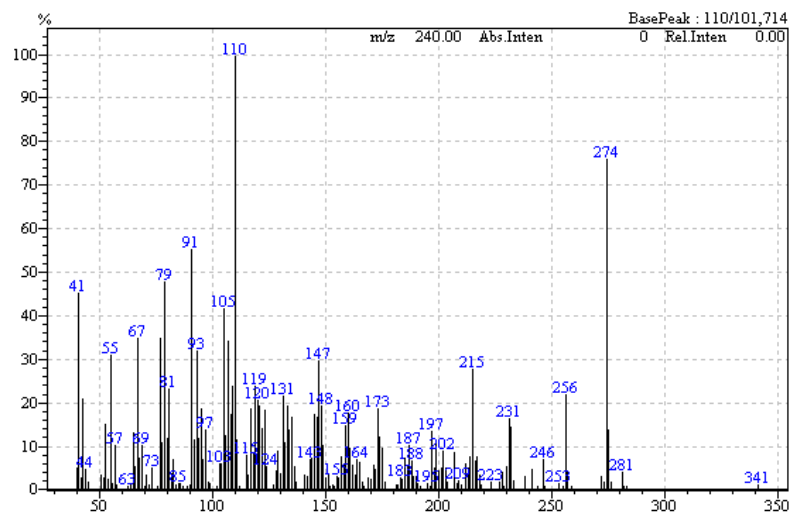


Figura 22 – Espectro de massas da nandrolona

Os perfis cromatográficos dos produtos da bioconversão dos esteróis pelas linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (P15, P35, T1, T5 e T10) nos tempos reacionais de 7 e 14 dias são apresentados a seguir (Figura 23 a 27).

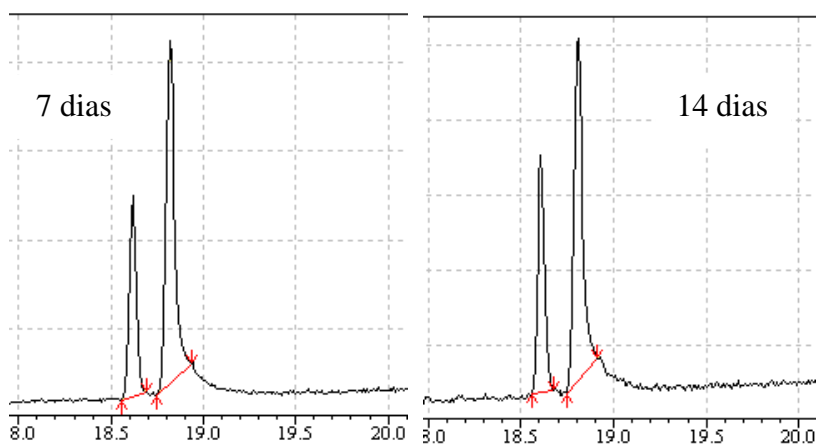


Figura 23 – Perfil cromatográfico de P15

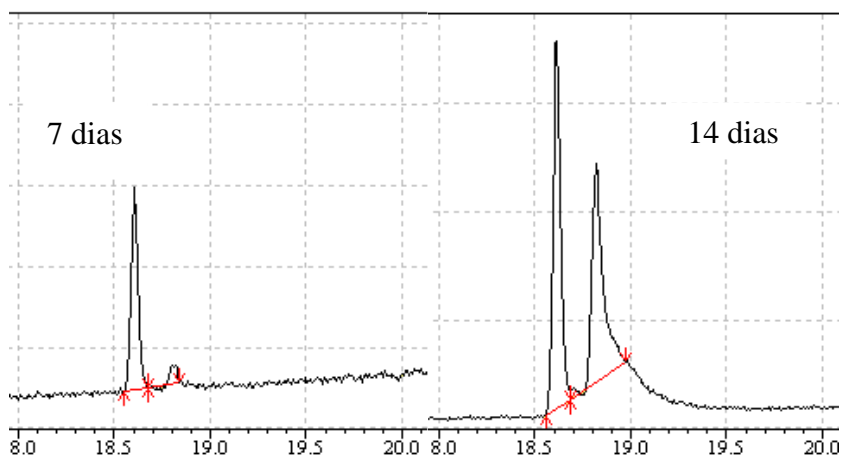


Figura 24 – Perfil cromatográfico de P35

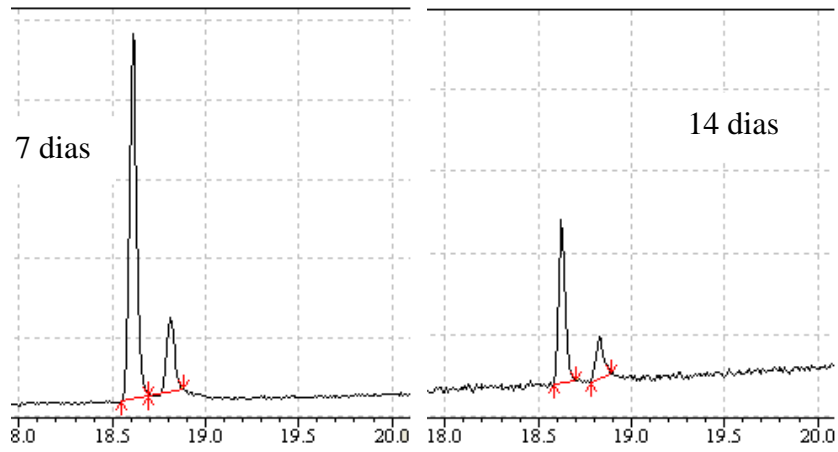


Figura 25 – Perfil cromatográfico de T1

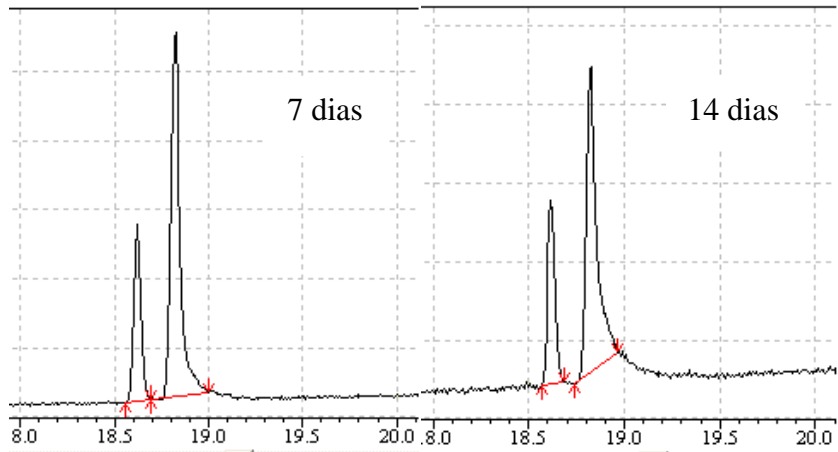


Figura 26 – Perfil cromatográfico de T5

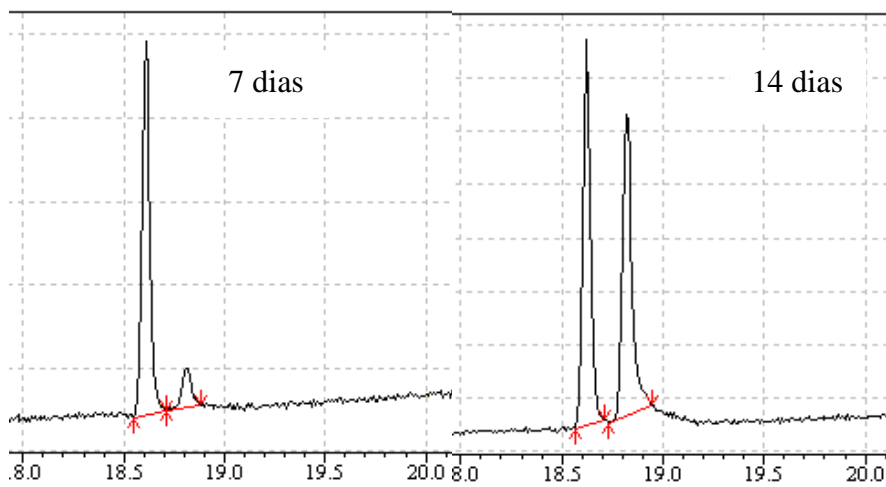


Figura 27 – Perfil cromatográfico de T10

A nandrolona é um esteróide de importância, sendo um anabolizante mais seguro e potente que a testosterona. Conhecida simplesmente como “Deca” em quase todo o mundo, é um esteróide derivado da testosterona, estruturalmente bastante similar, exceto a ausência de um átomo de carbono na posição dezenove, exatamente por isso é também chamada de 19-nortestosterona (SABINO, 2004).

A capacidade de 17β -redução de 17-oxaesteróides é característico de muitas leveduras e actinobactérias (*Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*, etc), embora as actinobactérias sejam menos eficientes quando comparadas com as leveduras, que realizam a reação com maior especificidade. A redução do grupo carbonila por actinobactéria na posição C17 está associada a processos de clivagem da cadeia lateral de esteróis e pregnano. Métodos biotecnológicos de obtenção de 17β -hidroxisteróides não foram utilizados na indústria farmacêutica por um longo período, pois as sínteses químicas são mais vantajosas em termos de custo e de rendimento do produto final. Mas o interesse em tecnologias microbianas vem crescendo constantemente ao longo dos últimos 10 a 20 anos pela necessidade de substituição por métodos mais limpos (DONOVA, 2007).

4.2.2 Biotransformação utilizando rizobactérias

Os produtos das biotransformações do lote de bactérias também foram analisados por CG-EM e suas respectivas taxas de bioconversão são apresentadas na Tabela 9. Somente um das reações com a espécie *Paenibacillus* sp. (I68) não apresentou produto de bioconversão durante os 14 dias de reação. Com 7 dias de reação as espécies *Brevibacillus* sp (021) e *Agrobacterium* (I07) também não apresentaram produto de bioconversão. A espécie *Pseudomonas* sp. (I30) apresentou a maior taxa de bioconversão durante os 7 e 14 dias de reação, 33% e 38%, respectivamente.

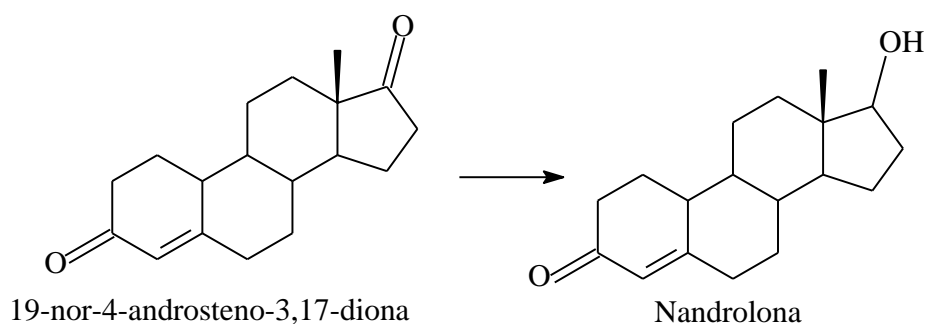


Figura 28- Biotransformação da 19-nor-4-androsteno-3,17-diona a nandrolona

Tabela 9 – Biotransformação do 19-nor-4-androsteno-3,17-diona por bactérias

Microrganismos	Tempo (dias)	Produtos	Bioconversão (%)*
<i>Pseudomonas</i> sp (I30)	7	Nandrolona	33
	14	Nandrolona	38
<i>Ochrobactrum</i> sp (I116)	7	Nandrolona	2
	14	Nandrolona	11
<i>Paenibacillus</i> sp (I85)	7	Nandrolona	31
	14	Nandrolona	36
<i>Paenibacillus</i> sp (I68)	7	Sem produto	0
	14	Sem produto	0
<i>Rhizobium</i> sp (I67)	7	Nandrolona	32
	14	Nandrolona	10
		Estrona	3
		Mistura de esteróides t _R 20,20 a 20,60 min	2
		Esteróide t _R 20,75 min	3
<i>Enterobacter</i> sp (B34)	7	Nandrolona	4
	14	Nandrolona	20
<i>Agrobacterium</i> sp ou	7	Sem produto	0
<i>Rhizobium</i> sp (I07)	14	Estrona	2
		Esteróide t _R 20,40 min	3
		Esteróide t _R 20,75 min	9
<i>Brevibacillus</i> sp (021)	7	Sem produto	0
	14	Nandrolona	14
<i>Pandorea</i> sp	7	Nandrolona	3
	14	Nandrolona	17
<i>Bacillus</i> sp (B18)	7	Nandrolona	21
	14	Nandrolona	34

*Média de 2 ou 3 amostras, t_R = Tempo de retenção

As reações com as espécies *Pseudomonas* sp (I30), *Ochrobactrum* sp (I116), *Paenibacillus* sp (I85), *Rhizobium* sp (I67), *Enterobacter* sp (B34), *Brevibacillus* sp (021), *Pandorea* sp (B08) e *Bacillus* sp (B18) apresentaram perfis cromatográficos semelhantes. Todas estas espécies de bactérias levaram a nandrolona como produto de reação (Figura 28), enquanto na reação com a espécie *Paenibacillus* sp (I68) não houve nenhum produto de bioconversão.

Na reação com a espécie *Rhizobium* sp (I67) também foi formado a nandrolona, mas após 14 dias de reação, outros produtos foram detectados, entre eles a estrona (Figura 29), uma mistura de esteróides co-eluídos com tempos de retenção entre 20,20 min e 20,60 min, bem como um esteróide com tempo de retenção de 20,75 min.

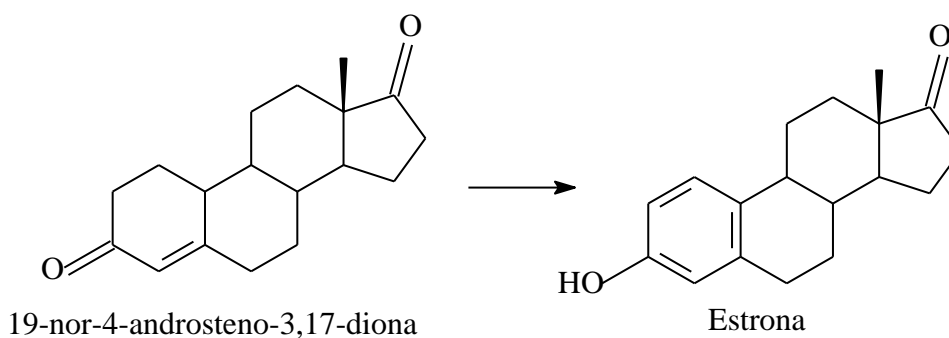


Figura 29 - Biotransformação da 19-nor-4-androsteno-3,17-diona a estrona

A estrona foi identificada pela injeção com um padrão para comparação do tempo de retenção e pelos dados de espectrometria de massas, através da comparação de seu padrão de fragmentação com a biblioteca do equipamento e com os dados da literatura. Pelo seu espectro de massas o íon molecular foi detectado em m/z 270, e o fato do pico do íon molecular ser também o pico base é indicativo da presença da estrutura fenólica, assim como a presença do íon m/z 107 ($M-C_{11}H_{13}O$) referente a clivagem do anel B com migração de um átomo de hidrogênio ao fragmento. O íon em m/z 213 ($M-C_3H_4O$) é proveniente da clivagem do anel D, com migração de um átomo de H ao fragmento neutro. A estrona é um metabólito de interesse, pois é um dos três principais hormônios estrogênicos, juntamente com estradiol e estriol, sendo utilizada como fármaco no tratamento da reposição hormonal (SILVA, 2006).

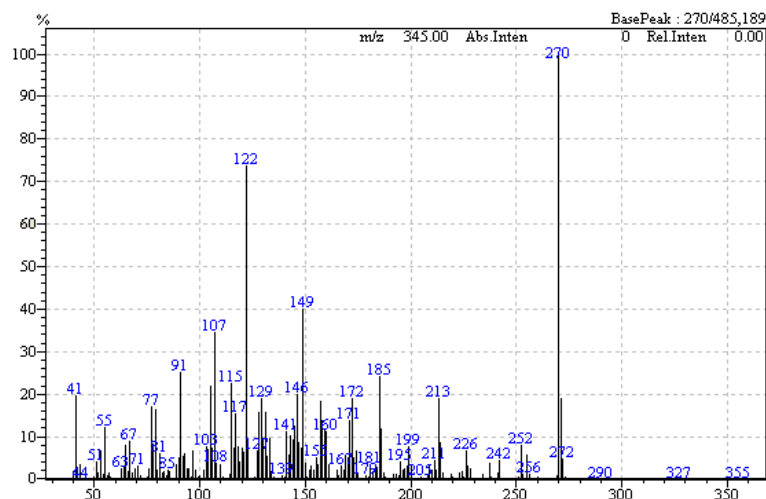


Figura 30 – Espectro de massas da estrona produzida por *Rhizobium* sp (I67)

Para o composto com tempo de retenção de 20,75 min e m/z 288 há indicação, pelos seus padrões de fragmentação, que se trata de um esteróide hidroxilado, devido ao fragmento (M-18), em m/z 270, que é indicativo da perda de uma molécula de água, embora não tenha sido possível identificar sua estrutura apenas pelos dados de massas.

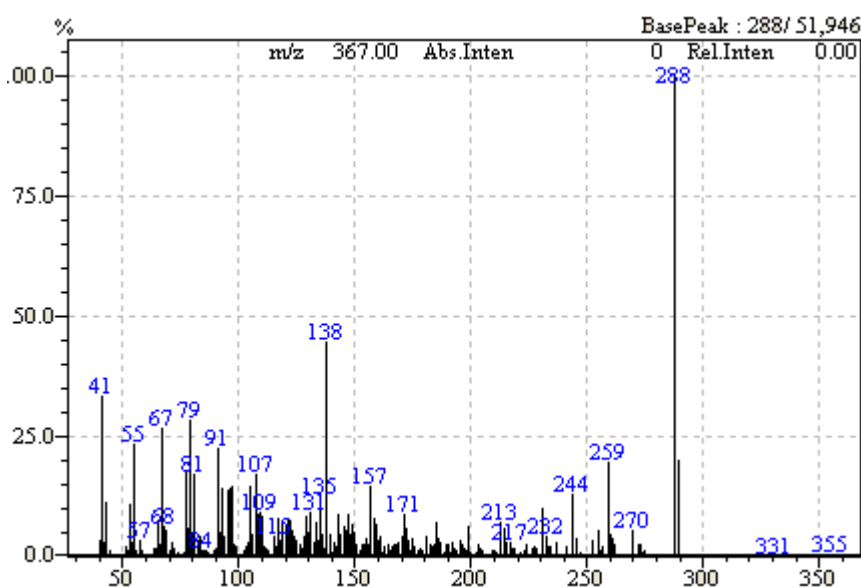


Figura 31 – Espectro de massas do esteróide em $t_R = 20,75$ min e m/z 288 produzido por *Rhizobium* sp (I67)

Na reação com a espécie *Agrobacterium* sp (I07) também foi possível detectar produto de bioconversão diferente de todas as espécies, o composto estrona (Figura 29) e dois esteróides com íon molecular m/z 288, com tempos de retenção em 20,40 e 20,75 min.

Embora estes esteróides não puderam ser identificados apenas através dos dados de espectrometria de massas, há indicação, pelos seus padrões de fragmentação, que se tratam de esteróides hidroxilados. Em m/z 270, o fragmento (M-18) é indicativo da perda de uma molécula de água.

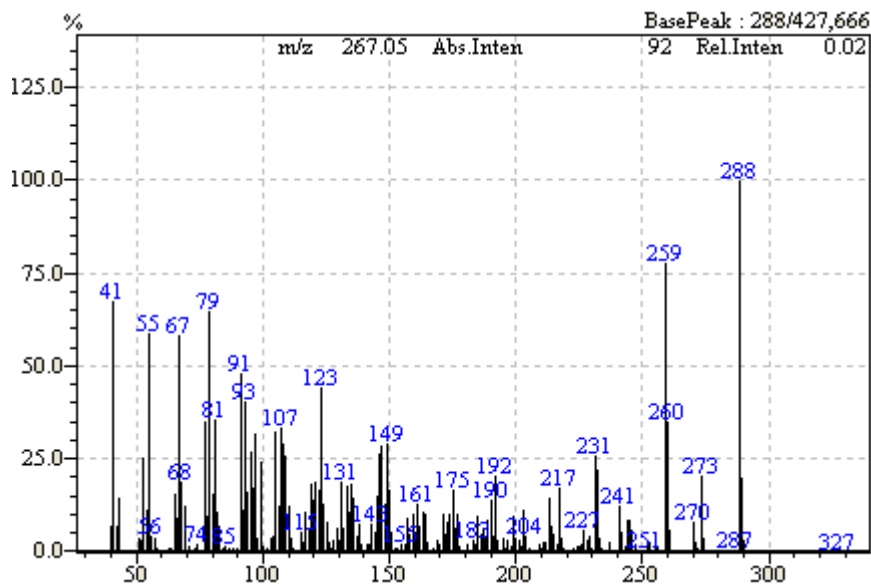


Figura 32 – Espectro de massas do esteróide em $t_R = 20,40$ e m/z 288 produzido por *Agrobacterium* sp ou *Rhizobium* sp (I07)

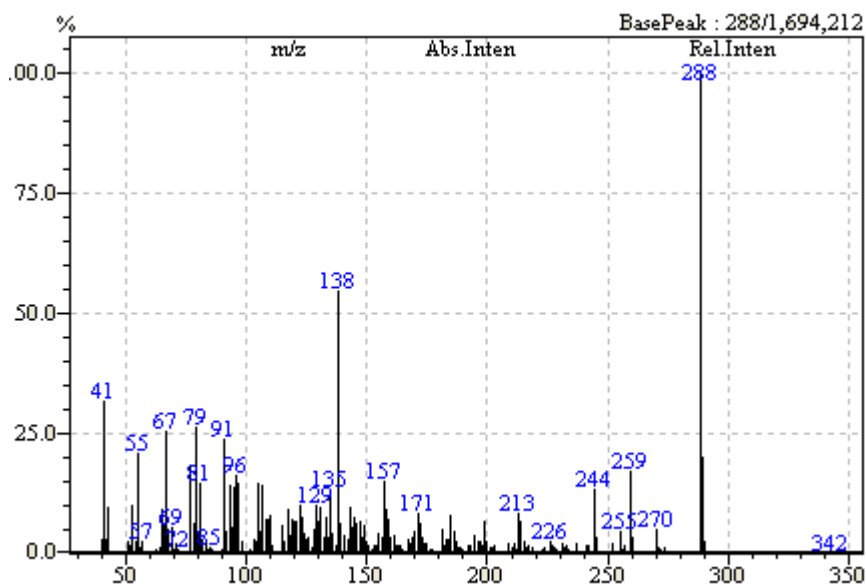


Figura 33 – Espectro de massas do esteróide em $t_R = 20,75$ min e m/z 288 produzido por *Agrobacterium* sp ou *Rhizobium* sp (I07)

Os perfis cromatográficos destas bioconversões são apresentados a seguir (Figura 34 a 43).

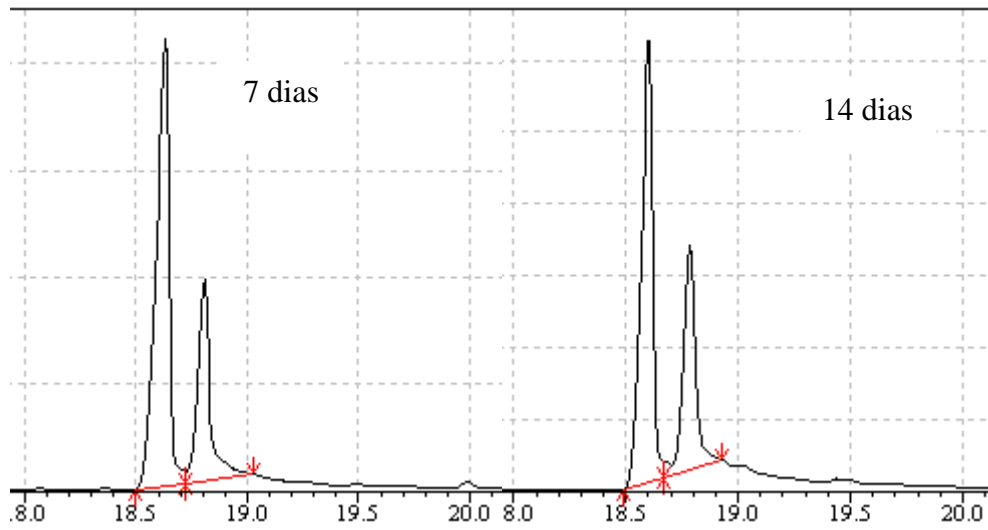


Figura 34 – Perfil cromatográfico de *Pseudomonas* sp (I30)

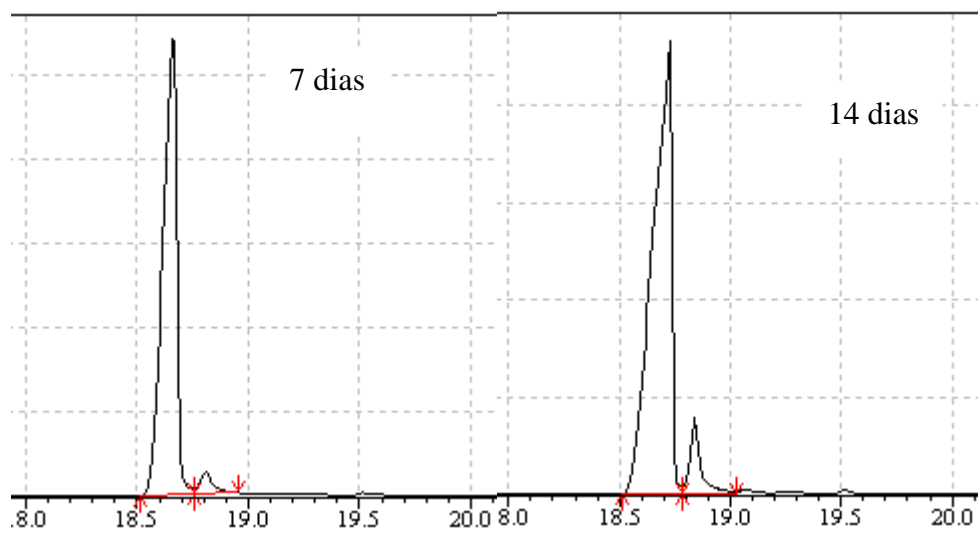


Figura 35 – Perfil cromatográfico de *Ochrobactrum* sp (I116)

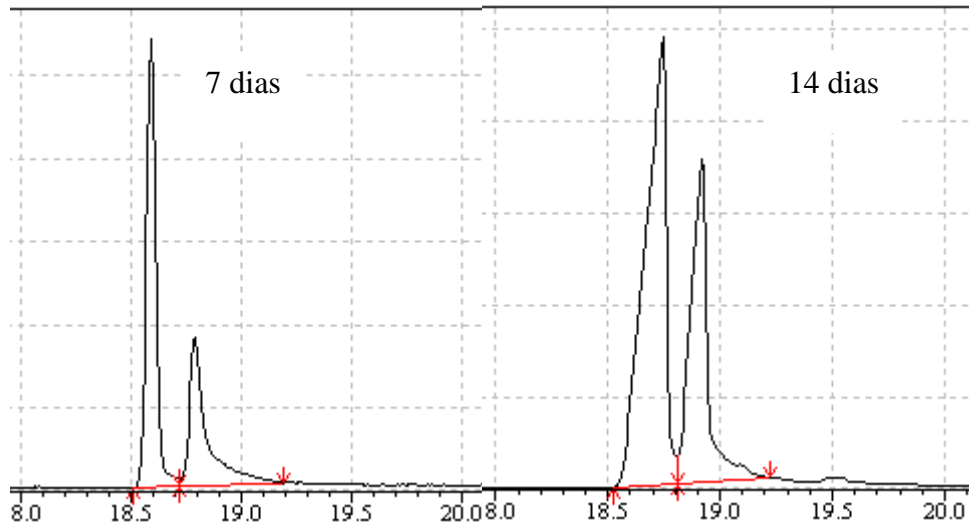


Figura 36 – Perfil cromatográfico de *Paenibacillus* sp (I85)

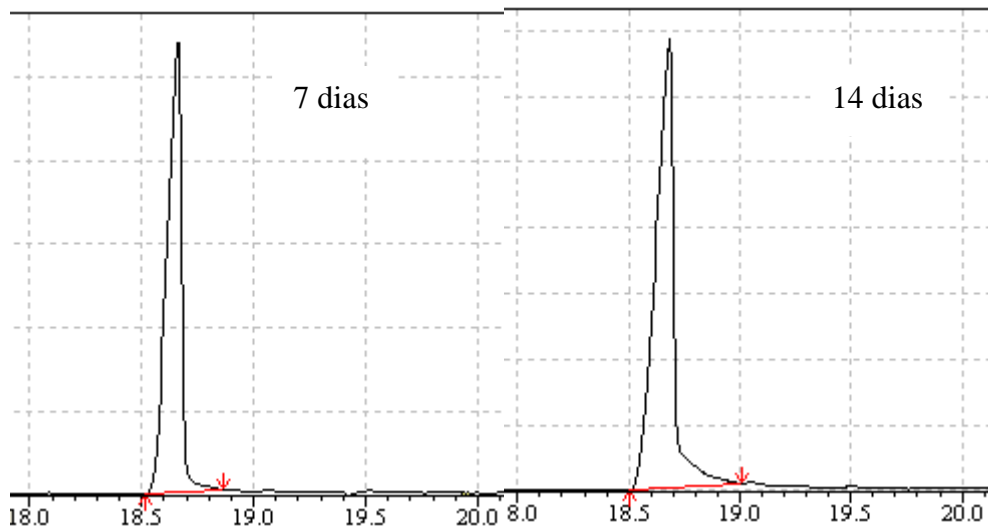


Figura 37 – Perfil cromatográfico de *Paenibacillus* sp (I68)

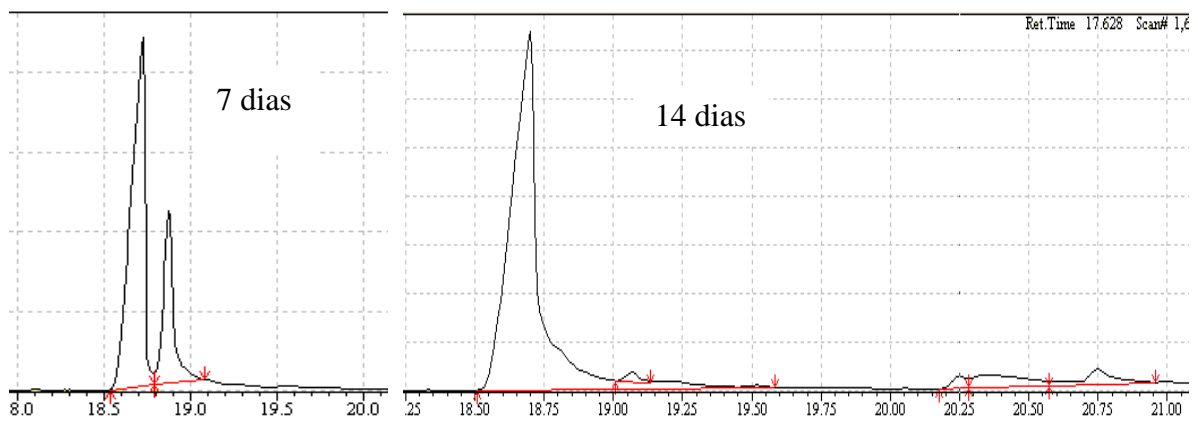


Figura 38 – Perfil cromatográfico de *Rhizobium* sp (I67)

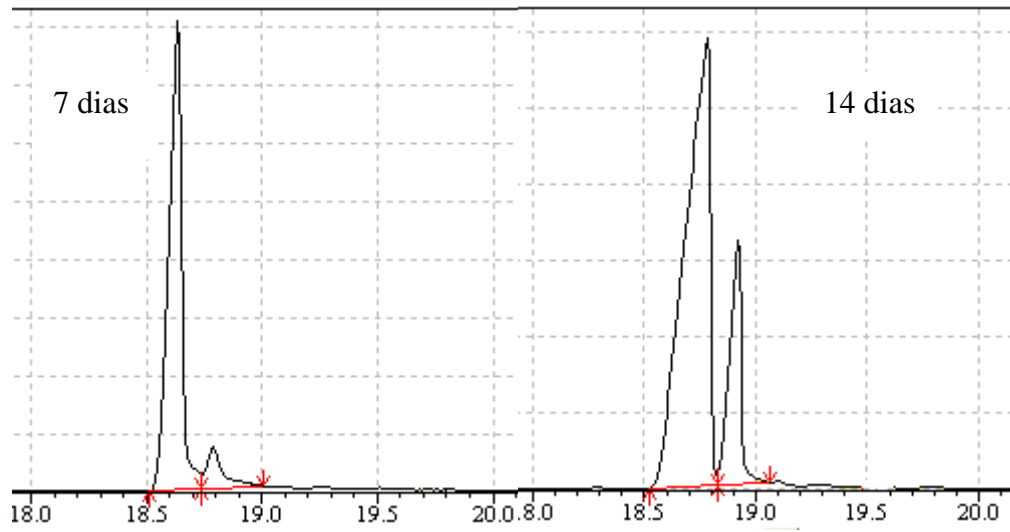


Figura 39 – Perfil cromatográfico de *Enterobacter* sp (B34)

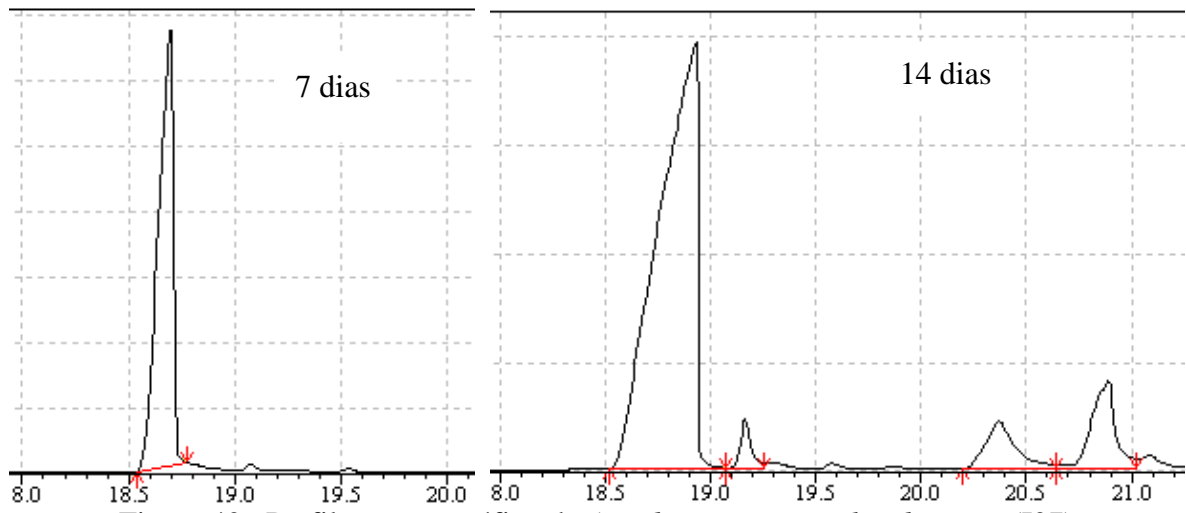


Figura 40– Perfil cromatográfico de *Agrobacterium ou Rhizobium* sp (I07)

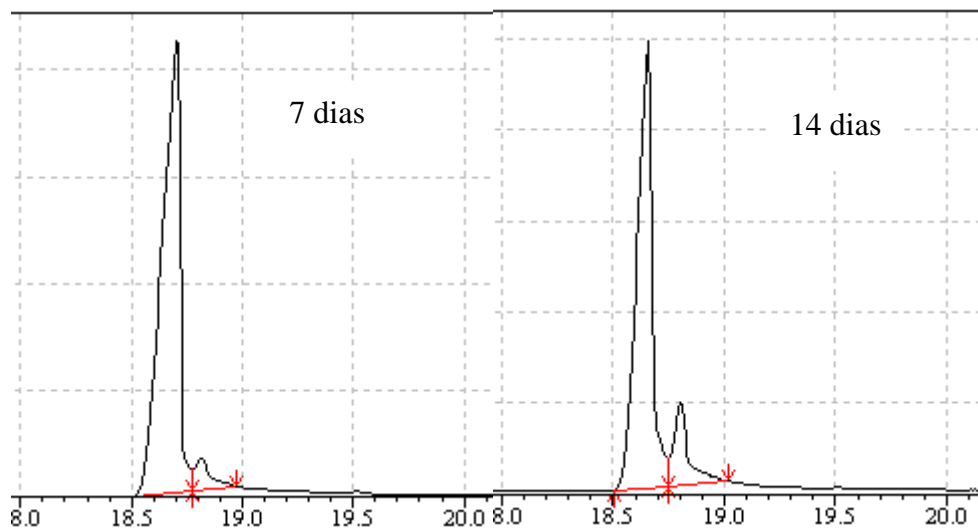


Figura 41 – Perfil cromatográfico de *Pandorea* sp (B08)

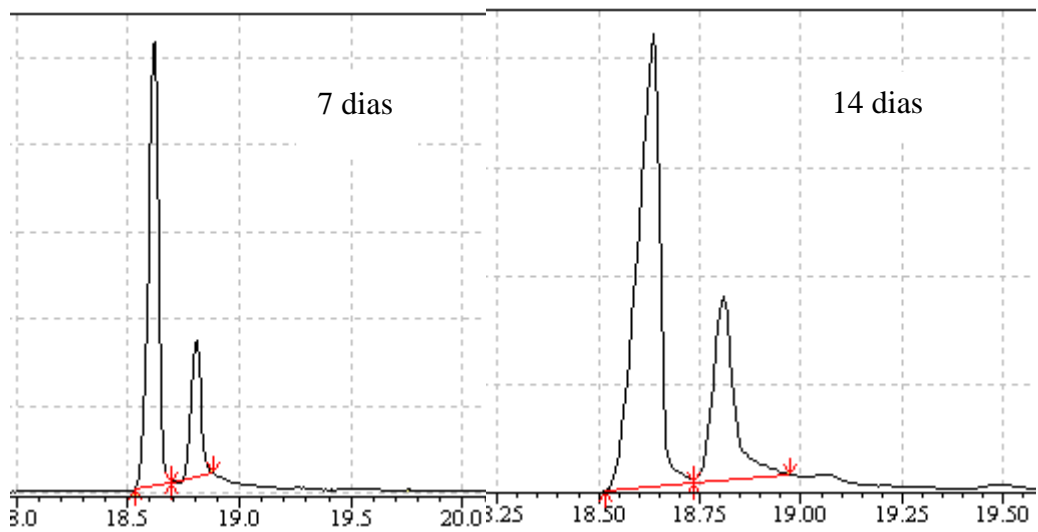


Figura 42 – Perfil cromatográfico de *Bacillus sp* (B18)

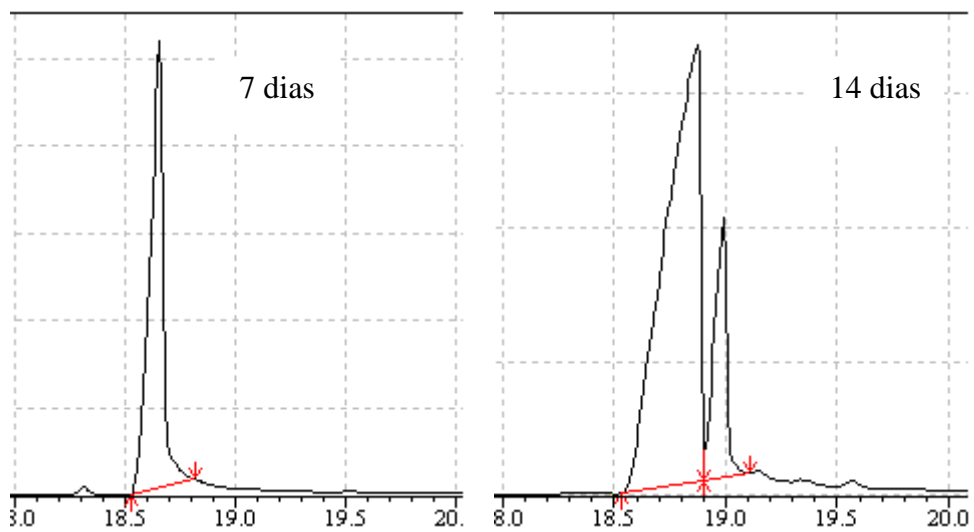


Figura 43 – Perfil cromatográfico de *Brevibacillus sp* (021)

4.2.3 Biotransformação utilizando fungos endofíticos

Os produtos das biotransformações por fungos endofíticos foram analisados por CG-EM e suas respectivas taxas de bioconversão são apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10 – Biotransformação do 19-nor-4-androsteno-3,17-diona por fungos filamentosos

Microorganismos	Tempo (dias)	Produtos	Bioconversão (%)*
MDF 92	7	Sem produto	0
	14	Nandrolona	12
<i>Fusarium</i> sp (MDF77)	7	Sem produto	0
	14	Sem produto	0
FX45	7	Nandrolona	54
	14	Nandrolona	76
CDC86	7	Sem produto	0
	14	Sem produto	0
<i>Glomerella cingulatta</i> (FX127)	7	Nandrolona	15
	14	Nandrolona	14
<i>Myrothecium</i> sp (CDC26)	7	Sem produto	0
	14	Esteróide t_R 21,90 min	70
<i>Glomerella cingulatta</i> (MDF36)	7	Nandrolona	14
	14	Nandrolona	27

*Média de 2 ou 3 amostras, t_R = tempo de retenção

As reações com as espécies *Fusarium* sp (MDF77) e CDC86 não apresentaram produto de bioconversão durante os 14 dias de reação. O fungo filamentoso FX45 foi o que levou a maior taxa de bioconversão, 76%. Com a espécie *Glomerella cingulatta* (FX127) taxas de bioconversões similares foram obtidas durante os 7 primeiros dias e com 14 dias (15% e 14%, respectivamente), entretanto, com a MDF36, após 14 dias, taxas de conversão de 29% foram alcançadas.

As espécies FX45, *Glomerella cingulatta* (FX127) e (MDF36) levaram a formação de nandrolona, durante os 7 primeiros dias e os 14 dias totais. A espécie MDF92 apresentou a nandrolona somente após os 14 dias de reação. A espécie *Myrothecium* sp (CDC26) apresentou um comportamento peculiar, levando a formação de somente um esteróide em tempo de retenção de 21,90 min, com íon molecular m/z 288, com 70% de taxa de conversão.

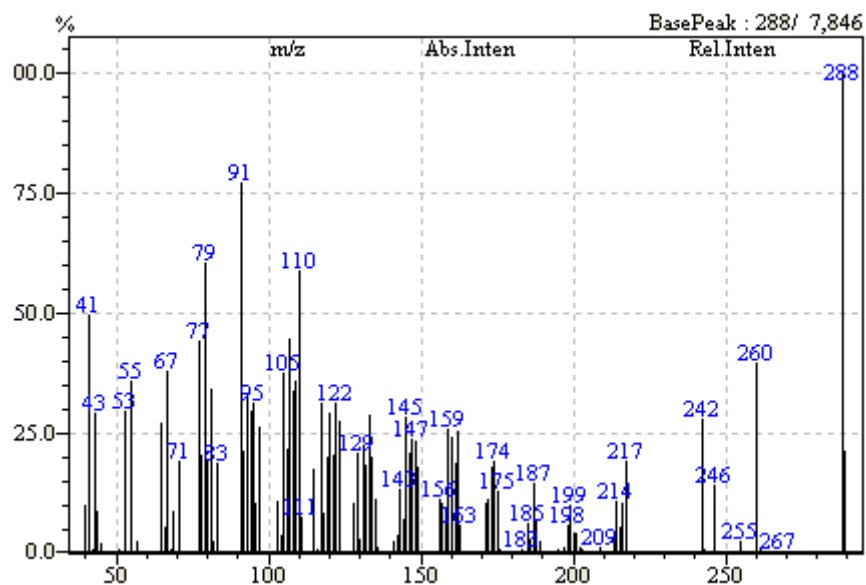


Figura 44 – Espectro de massas do esteróide em $t_R = 21,90$ min e m/z 288, produzido por *Myrothecium* sp (CDC26)

Os perfis cromatográficos destas bioconversões são apresentados a seguir (Figura 45 a 51):

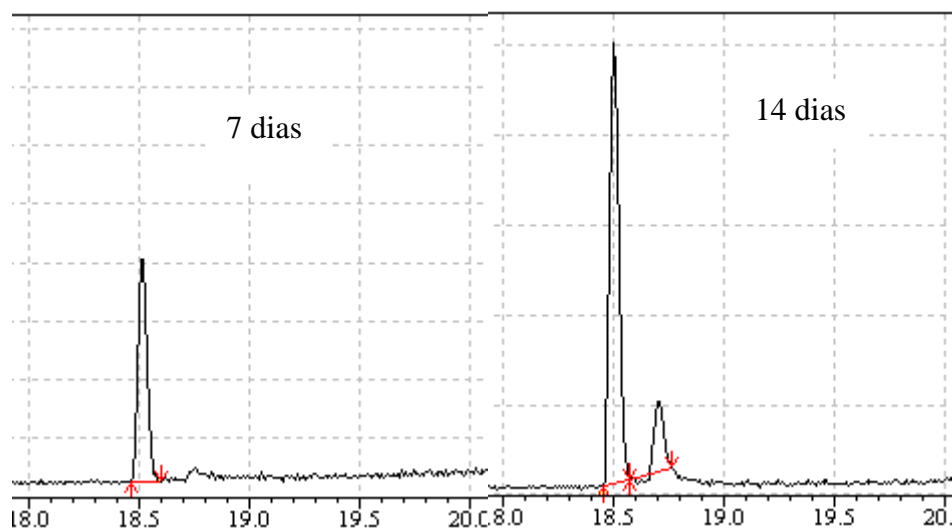


Figura 45 – Perfil cromatográfico de MDF92

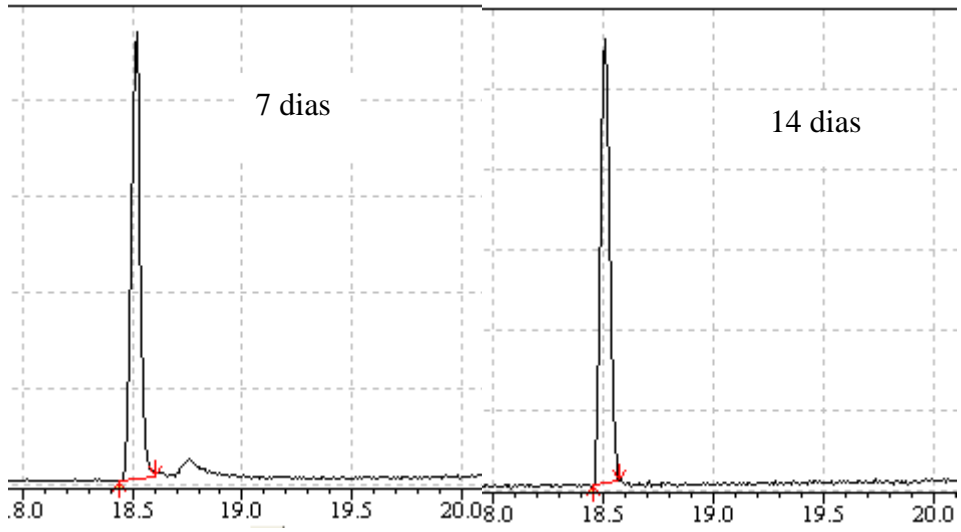


Figura 46 – Perfil cromatográfico de *Fusarium* sp (MDF77)

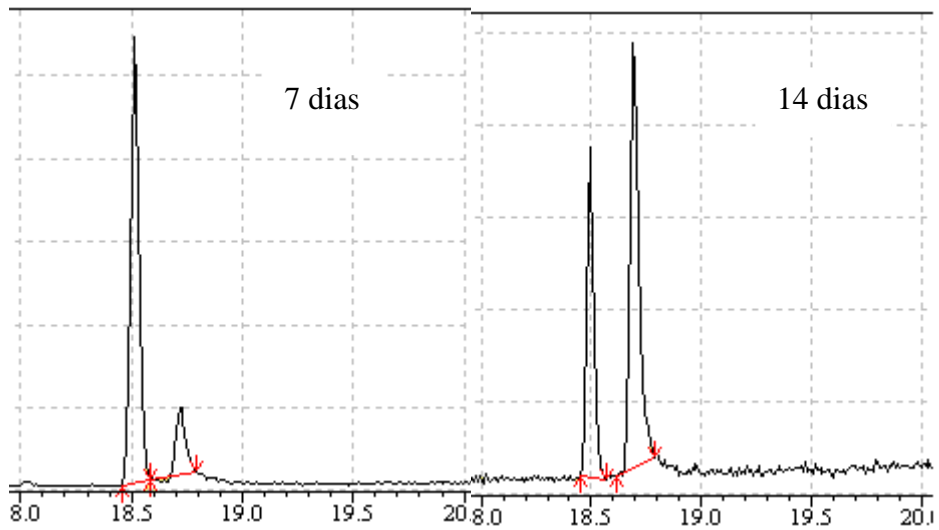


Figura 47 – Perfil cromatográfico de FX45

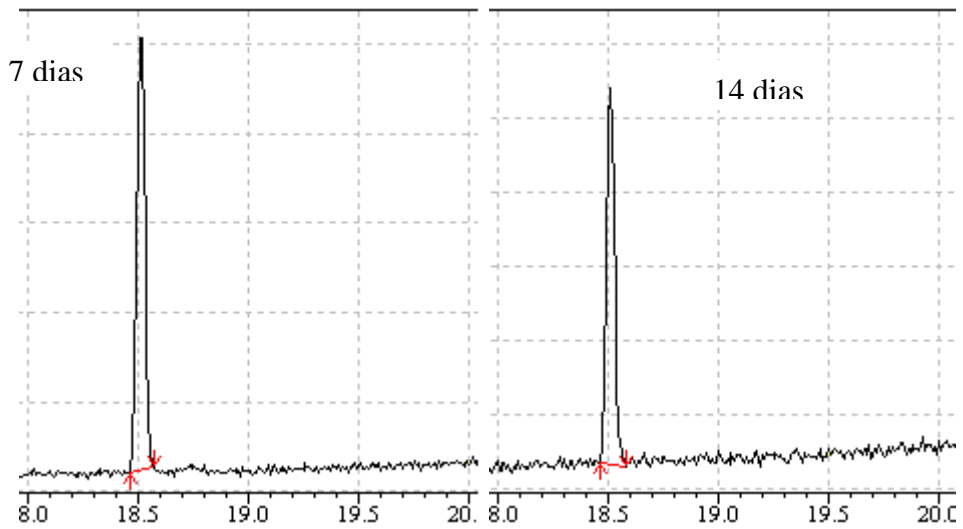


Figura 48 – Perfil cromatográfico de CDC86

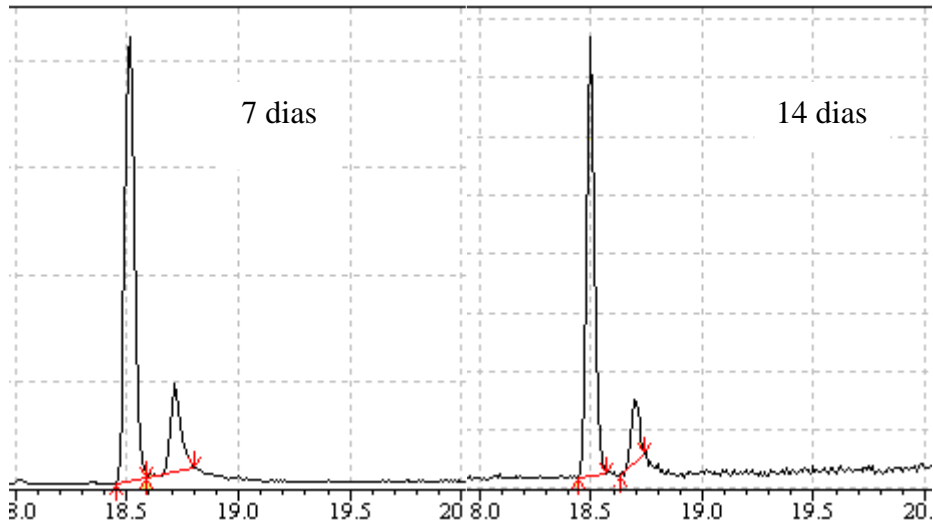


Figura 49 – Perfil cromatográfico de *Glomerella cingulatta* sp (FX127)

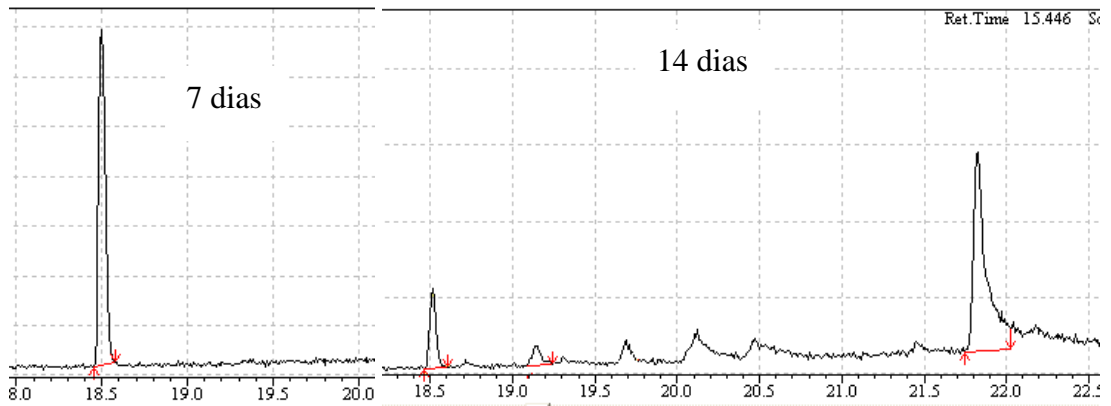


Figura 50 – Perfil cromatográfico de *Myrothecium* sp (CDC26)

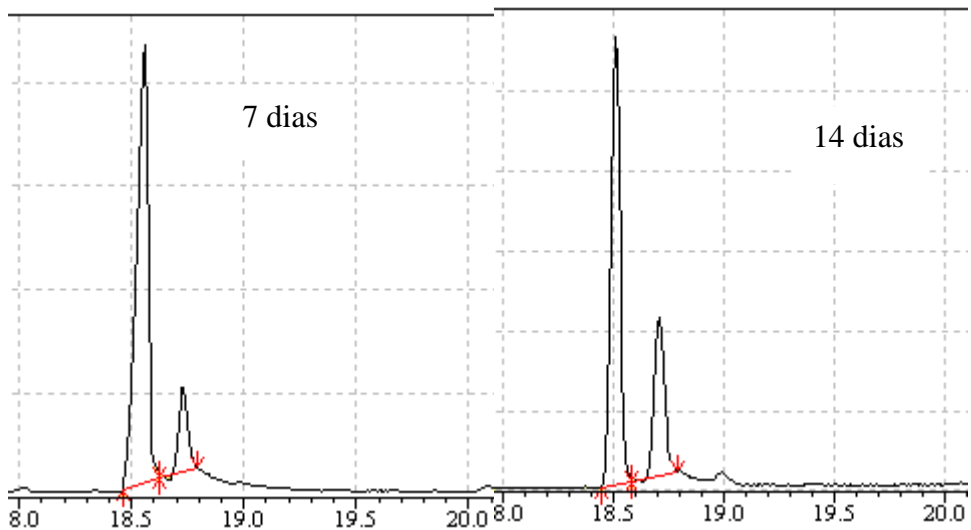


Figura 51 – Perfil cromatográfico de *Glomerella cingulatta* sp (MDF36)

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A investigação realizada da atuação de microrganismos isolados no Estado da Bahia como biocatalisadores demonstrou que os mesmos possuem potencial biocatalítico para a conversão de fitoesteróis e esteróides.

No caso dos fitoesteróis, das 10 leveduras, 10 bactérias e 7 fungos avaliados, apenas o fungo endofítico CDC86 foi capaz de degradar a mistura de campesterol, estigmasterol e β -sitosterol, levando a formação de produtos de oxidação, com identificação das cetonas α,β -insaturadas sitostenona, campestenona e espinastenona, com taxas de conversão de 54%, 56% e 21%, respectivamente.

Na triagem para conversão do esteróide 19-nor-4-androsteno-3,17-diona, dos 22 microrganismos avaliados (5 leveduras, 10 bactérias e 7 fungos), 19 foram capazes de atuarem como biocatalisadores, com exceção das reações com a bactéria I68, e com os fungos MDF77 e CDC86. Foram observados diversos produtos com taxas de bioconversão de até 76%, dependendo do microrganismo utilizado e do tempo reacional, dos quais dois foram identificados, a nandrolona e estrona. A nandrolona foi o produto de maior ocorrência entre as reações de biotransformação, pois somente nas reações catalisadas pelas bactérias I07 e I68, bem como para o fungo CDC26, este esteróide não foi observado. A estrona foi produto de bioconversão de somente duas rizobactérias, as I67 e I07. A presença de outros esteróides não identificados também foi detectada em três das reações avaliadas, nas quais o fungo CDC26 e as bactérias I67 e I07 foram utilizados como catalisadores.

Os resultados aqui obtidos indicaram o potencial biocatalítico de algumas linhagens avaliadas, pois embora as taxas de conversão não tenham sido elevadas 77% das reações foram regioseletivas, com formação apenas de um produto de reação. Dos microrganismos avaliados destacam-se os fungos CDC26, FX45 e as leveduras P15 e T5, que degradaram o esteróide 19-nor-4-androsteno-3,17-diona com maiores taxas de conversão e o fungo CDC86, único microrganismo capaz de converter a mistura de fitoesteróides. Assim testes de otimização das condições reacionais com estas espécies mais promissoras podem ser futuramente realizados para um aumento das taxas de conversão.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, S. et al. Biotransformation of sterols: selective cleavage of the side chain. **Biotechnol**, nº10, 1992. p.1-67.
- ARTHAN, D. et al. Antiviral isoflavonodisulfate and steroidal glycosides from the fruits of *Solanum turvum*. **Phytochemistry**, nº59, 2002. p. 459-463.
- AZERAD, R. Microbial models for drug metabolism. In: **Advances in Biochemical Engineering biotechnology**. v.63, p.169-218, 1998.
- BARTMANSKA, A; DMOCHOWSKA-GLADYSZ, J; HUSZCZA, E. Steroid`s transformations in *Penicillium notatum* culture. **Steroids**, nº70, 2005. p.193-198.
- BARTMANSKA, A; DMOCHOWSKA-GLADYSZ, J. Transformation of steroids by *Trichoderma hamatum*. **Ezyme and Microbial Technology**, v.40, 2007. p.1615-1621.
- BEILEN, J. B. V. et al. Practical issues in the application of oxygenases. **Trends Biotechnol**, nº21, v.4, 2003. p.170-177.
- BIEMANN, K. **Mass Spectrometry: Applications to Organic Chemistry**, Mc Graw-Hill Book Co., Inc:New York, 1962, p. 345.
- BORGES et al. Stereoselective bitransformations using fungi as biocatalysts. **Tetrahedrom – Assymetry** XXX, 2009.
- BORTOLINI, O.; MEDICI, A.; POLI, S. Biotransformations of the steroid nucleus of bile acids. **Steroids**, nº62, 1997. p.564-577.
- CHARNEY, W. & HERZOG, H.L. **Microbial transformations of steroids – A handbook**. New York: Academic Press, 1967
- CHATTERJEE, P.; KOUZI, S.A.; PEZZUTTO, J.M; HAMANN, M.T. Biotransformation of the antimelanoma agent betulinic acid by *Bacillus megaterium* ATCC 13368. **Applied Environmental Microbiology**. v.66, p.3850-3855, 2000.
- CHAVES, M. H. et al. Steroids and Flavonoids of *Porcelia macrocarpa*. **J. Braz. Sol.** v.15, n. 4, 2004. p. 608-613.
- CHUNG, S.K. et al. Synthesis and bioactivities of steroid derivates as antifungal agents. **Tetrahedron**, nº54, 1998. p.5899-5914.
- COMASSETO, J.V. **Apostila do Workshop em Biocatálise**. Instituto de química UNICAMP, 2002.
- DIAS, A. C. P. et al. Isolation of a biodegradable sterol-rich fraction from industrial wastes. **Biores Technol**, nº82, 2002. p.253-260.
- DOMBROWSKI, A. W. et al. HIV- integrase-inhibitors. **WO Patent** 0036132, 2000.

DONOVA, M. V. Transformation of steroids by actinobacteria: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 43, n° 1, pp.1-14, 2007.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. 5 ed. Springer: Berlin, 2004.

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, 2003. p.688-705.

FERNANDES, P.; CABRAL, J. M. S.; PINHEIRO, H. M. Influence of some operational parameters on the bioconversion of β -sitosterol with immobilized whole cells in organic medium. **J. Mol Catal B-Enzym**, n°5, 1998. p.307-310.

FERREIRA, J.P. M, **Segredos da catálise enzimática**. Boletim de Biotecnologia. Universidade Católica Portuguesa, Porto, p.22, 2002.

FIYGARE, S. LARSSON, P. O. Steroid transformation using magnetically immobilized *Mycobacterium* sp. **Enzyme Microb Technol**, n°9,1987. p.494-499.

GLAZER, A. N. & NIKALDO, H. **Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology**. 2 ed. New York: W. H. Freeman, 1995.

HOGG, J. A. Steroids, the steroid community, and Upjohn in perspective: a profile of innovation. **Steroids**, 1992. p.593-616.

IKAN, R. **Natural products: a laboratore guide**. 2 ed. Academic press: San Diego-California, 1991.

ISHIGE, T.; HONDA, K.; SHIMIZU S. Whole organism biocatalysis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, p.174–180, 2005.

KIESLICH, K. Microbial side-chain degradation of sterols. **J. Basic Microbiol**, n°7, 1985. p.461-474.

KO, D. et al. New steroid anti-inflammatory ante drugs: methyl-21-desoxy-21-chloro-11 β , 17 α -dihydroxy-3,20-dioxo-1,4-pregnadien-16 α -carboxylate, methyl-21-desoxy-21-chloro-11 β -hydrixy-3,20-dioxo-1, 4-pregnadien-16 α -carboxylate, and their 9 α -fluoro derivates. **Steroids**, n°65, 2000. p.210-218.

KUTNEY, J. P.; NOVAK, E.; JONES, P. J. Process of isolating a phytosterol composition from pulping soap. **US Patent**, n°5, 1998. p.749-770.

LEE, C. Y.; LIU, W. H. Production of androst-4-ene-3, 17-dione from cholesterol using immobilized growing cell of *Mycobacterium* sp. NRRL B-3683 adsorbed on solid carriers. **Appl Microbiol Biotechnol**, n°36, 1992. p. 598-603.

LEHNINGER, A.L. N, D.L; **Princípios da Bioquímica**.2° ed., Sarvier, SP, 2000.

LIMA, U. de A. **Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Blucher, 2001. 593p

MALAVIYA, A.; GOMES, J. Androstenedione production by transformation of phytosterols. **Bioresource Technology**, nº99, 2008. p.6725-6737.

MANOSROI, J.; SRIPALAKIT, P.; MANOSROI, A. Enzyme Microb. **Technol**, nº33, 2003. p.320.

MERGULHÃO, A. C. E. S. et al. Hospedeiros e ciclos sucessivos de multiplicação afetam a detecção de fungos micorrízicos arbusculares em áreas impactadas por mineração gesseira. **Revista Árvore**, v. 33, nº2, 2009.

MUROHISA, T.; IIDA, M. J. Ferment. **Bioeng**, nº76, 1993. p.74.

NAKAMURA, K.; NAKAJIMA, Y.; KAWAI, Y.; OHNO, A. **Method for controlling the enantioselectivity of reduction with baker's yeast**. Journal of Organic Chemistry, 56, 15, 1991.

OLIVEIRA, B. H.; BUENO, D. D. Biotransformação de esteróides. **Química Nova**, v.19, n. 3, p.233-236, 1995.

OMATA, T. et al. Transformation of steroids by gel-entrapped *Nocardia rhodocrous* cells in organic solvent. **European J. Appl. Microbiol Biotechnol**. n.8, 1979. p.143-158

PEREZ, C. et al. Bioconversion of phytosterols to androstanes by Mycobacteria growing on sugar cane mud. J. Ind. **Microbiol Biotechnol**, nº32, v.3, 2005. p.83-86.

PINHEIRO, D. M.. **Biotransformação de terpenos em compostos de aroma**. 2003. 227 f. Dissertação (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, SP:

PIZARRO, A. P. B.; OLIVEIRA FILHO, A. M; PARENTE, J. P., MELO, C. E. S. E LIMA, P. R. **O aproveitamento do resíduo da indústria do sisal no controle de larvas de mosquitos**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical v. 32, n.1, p. 23-29, 1999.

QMCWEB. Rev. Eletrônica do Departamento de Química da UFSC. Ano 4, Florianópolis. Disponível em: < <http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/lipidios/lipidios.html>>. Acesso em: 11/07/2009, 12:11.

ROCHA, A. C. S. **Antagonismo *in vitro* de fungos endofíticos, isolados de *Hevea brasiliensis*, contra o *Microcyclus ulei* (fungo causador do mal das-folhas na seringueira)**. 2007. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia.

ROCHA, G. P. **Bactérias associativas e simbiotes dos nódulos de *Arachis pintoi* (leguminosae)**. 2007. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia.

SABINO, C. **O peso da forma: cotidiano e uso de drogas em fisiculturistas**, 2004. 366p. Tese (Doutorado em Sociologia e Antropologia). Instituto de Filosofia e Ciências Sociais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SATO, S. Produção de esteróides. In: LIMA, U. de A. **Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Blucher, 2001. p 179-197

SALOMON, A. L.; WENDHAUSEN, R. Estudo da biorredução de cetonas pró-quirais conduzida em sistemas bifásicos em biorreatores. **Dynamis revista tecno-científica**. v. 13, n. 1, 2007. p 39-45.

SCHIMID, A. et al. Industrial biocatalysis today and tomorrow. **Nature**, nº409, 2001. p.258-268.

SENA, A. R. et al. Seleção de fungos do semi-árido baiano secretores de hidrolases de interesse em alimentos. **Sitientibus**, Feira de Santana, nº35, 2006. P.91-98.

SHAHIDI, N. T. A review of the chemistry , biological action and clinical application anabolic-androgenic steroids. **Clin. Ther.** nº9, 2001. p.1355-1390.

SILVA, A.F. **Caracterização genética de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* isolada de fermentações artesanais de cachaça da Bahia**. 2009. 117f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia.

SILVA, P. (Org.) **Farmacologia**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SINTMOLB- Laboratório de Biotransformações e Biocatálise. Grupo de Pesquisa em Síntese e Transformações de Moléculas Orgânicas para Emprego Biológico. Departamento de Química – UFMS. Disponível em: < <http://www.dqi.ufms.br/lp4/labbio.htm>>. Acesso em: 11/07/2009, 11:15.

SRIPALAKIT, P.; WICHAI, U.; SARAPHANCHOTIWITTHAYA, A. Biotransformation of various natural sterols to androstenones by *Mycobacterium sp.* and some steroid-converting microbial strains. **Journal of Molecular Catalysis**, nº41, 2006.p.49-54.

STOUDT, T.H The microbiological transformation of steroids. In **Advanced Applied Microbiology**. 2a.ed., 1960.

SUZUKI, K. et al. Anti-obesity agents. **US Patent**, nº5, 1998. p.846-962.

SZENTIRMAI, A. Microbial physiology of side chain degradation of sterols. **J. Ind. Microbiol**, nº6, 1990. p.101-106.

UETANABARO, A. T.; GÓES-NETO, A. Importance of Culture Collections of Microorganisms (CCMs) for the conservation of microbial biotechnological resources of the Brazilian Semi-arid Region. In: QUEIROZ, L. P.; RAPINI, A.; GIULIETTI, A. M. **Towards greater knowledge of the Brazilian Semi-arid Biodiversity. Brazilian Biodiversity Research Programme**. Ministério da Ciência e Tecnologia, Brasília, 2006. p.41-43.

URLACHER, V.B.; LUTZ-WAHL, S.; SCHMID, R.D. Microbial P450 enzymes in biotechnology, **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 64, pp. 317–325, 2004.

VERMUÊ, M.H., TRAMPER, J. **Biocatalysis in non-conventional media: medium engineering aspects.** **Pure and Appl Chem.** 67(2): 345-373, 1995.

VIEIRA, M. R. **Estudo da Biorredução de compostos carbonílicos por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* sp.** 2006. 95f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências, da Universidade Regional de Blumenau (FURB), Blumenau, Santa Catarina.

YAZDI, M. T.; et al. Cholesterol-degrading bacteria isolation, characterization and bioconversion. **World Journal of Microbiology & Biotechnology.** n.16, 2000. p.103-105..

WALSH, G. **Biopharmaceuticals: biochemistry and biotechnology.** Chichester: Wiley, 1998.

WANG, Z. et al. Microbial transformation of hydrophobic compound in cloud point system. **J. Mol Catal B-Enzym,** n°27, 2004. p.147-153.

WANG, Z. et al. Cloud point system as a tool to improve the efficiency of biotransformation. **Enzyme Microb Technol,** n°36, 2005. p.589-594.

WANG, Z. et al. Biotransformation of phytosterol to produce androsta-dieno-diona por células em repouso de *Mycobacterium* em sistema de ponto de fusão. **Process Biochemistry,** v.41, 2006. p.557-561.

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