

Brás Heleno de Oliveira

Departamento de Química - UFPR - CP 19081 - 81531-990 - Curitiba - PR

Deise Dias Bueno

Departamento de Química - UEM - 87020-900 - Maringá - PR

Recebido em 28/6/95; aceito em 19/10/95

**THE BIOTRANSFORMATION OF STEROLS.** In this work we describe the isolation of a Gram-positive bacterium from a soil sample and its ability to transform  $\beta$ -sitosterol into androst-4-en-3,17-dione, a valuable intermediate in the synthesis of steroids.

**Keywords:** sterols; steroids; biotransformation.

## 1. INTRODUÇÃO

Esteróis são substâncias orgânicas encontradas abundantemente na natureza, usualmente em frações não saponificáveis de gorduras de animais e plantas. Todos possuem o esqueleto básico peridrociclopentanofenantreno (1).

Os esteróis mais comuns, tais como o colesterol (2) (encontrado em praticamente todos os organismos eucariotes),  $\beta$ -sitosterol (3) e estigmasterol (4) (encontrados em 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.

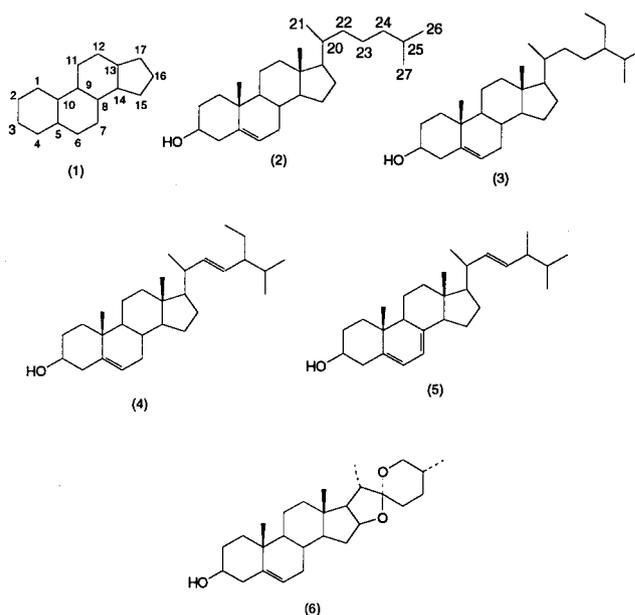
Esteróides, tais como os esteróis, são substâncias orgânicas que também possuem um núcleo peridrociclopentanofenantreno. Eles diferem dos esteróis, por possuírem uma menor ou nenhuma cadeia lateral na posição C-17, e por possuírem um ou mais grupos carbonílicos ligados aos anéis do esqueleto esteroidal. São compostos de grande importância médica e usados na terapêutica anti-inflamatória e anti-concepcional, entre outras.

A maioria dos processos industriais de produção de esteróides utiliza matérias-primas obtidas de fontes naturais<sup>1</sup>. Por exemplo, as sapogeninas esteroidais são substâncias glicosídicas encontradas em alguns vegetais. Elas são as principais matérias-primas utilizadas na produção de hormônios esteroidais. A sapogenina de maior importância econômica, a diosgenina (6), pode ser obtida à partir das raízes de algumas espécies de Dioscoreaceae<sup>2</sup>.

A síntese total de esteróides é também possível, apesar de não ser economicamente viável<sup>3</sup>.

Recentemente, tem havido um grande interesse pela procura de métodos alternativos para a obtenção de esteróides. O problema maior é a disponibilidade da principal matéria-prima, a diosgenina, cujo suprimento tem sido inferior ao requerido pela indústria farmacêutica<sup>4</sup>. Devido à sua grande abundância natural e semelhança estrutural com os esteróides, os esteróis tem sido apontados como candidatos potenciais como precursores para síntese<sup>5</sup>. O  $\beta$ -sitosterol (3), que pode ser isolado da fração insaponificável de óleos vegetais, é uma matéria-prima alternativa na produção desses intermediários<sup>6</sup>. No Brasil, principalmente no Paraná, existe um grande número de indústrias de óleos vegetais, principalmente do óleo de soja; portanto é considerável a quantidade de fitoesteróis disponível.

Para serem utilizados como intermediários esteroidais, os esteróis precisam ter a cadeia lateral clivada seletivamente em C-17 ou C-20, dando origem a esteróides C<sub>19</sub> ou C<sub>21</sub>. Não há método químico eficiente que execute tal transformação. Por isso vários grupos têm procurado métodos microbiológicos para



realizar tal transformação, e vários casos bem sucedidos são relatados na literatura, utilizando *Brevibacterium* sp<sup>7</sup>, *Rhodococcus* sp<sup>8</sup>, *Rhodococcus corallina*<sup>9</sup>, *Mycobacterium fortuitum*<sup>10,11</sup>, *Mycobacterium* sp<sup>12</sup>, *Mycobacterium vaccae*<sup>13</sup>, *Pseudomonas* sp<sup>14</sup>. Muitos se tornaram processos de uso industrial<sup>5</sup>. Para tal, técnicas especiais de fermentação têm sido empregadas, tais como a imobilização de microorganismos<sup>15-17</sup>.

O presente trabalho teve como meta a obtenção de intermediários de síntese de hormônios esteroidais, à partir do  $\beta$ -sitosterol (3). Para isso procuramos inicialmente isolar, à partir de solo e sementes de soja (*Glycinia max*), microorganismos capazes de utilizar colesterol (2) como única fonte de carbono e, com os microorganismos obtidos, realizar experimentos de degradação do  $\beta$ -sitosterol (3) para tentar obter algum intermediário esteroidal.

## 2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.1 Obtenção de microorganismos degradadores de esteróis

O solo contém um número considerável de classes de microorganismos. Considerando que o óleo de soja contém esteróis, imaginamos que o solo utilizado para o cultivo daquela

leguminosa poderia ter maior chance de conter microorganismos capazes de utilizar aqueles triterpenos. Por este motivo utilizamos amostras de solo de um campo onde havia recentemente sido colhida uma safra de soja, assim como grãos daquela leguminosa deixados no solo após a colheita.

As amostras de solo e de sementes de soja (total de 60) foram incubadas em "Meio A1" o qual continha colesterol como única fonte de carbono<sup>18,19</sup>.

Os frascos foram então mantidos à temperatura e velocidade de agitação constantes, por 7 dias. Após este tempo, uma alíquota de cada frasco foi transferida para novos frascos contendo o mesmo meio de cultura e estes foram submetidos ao mesmo tratamento dos primeiros. Este processo foi executado por um total de 15 vezes.

Através deste procedimento, ocorre um processo de pressão seletiva, em que sobrevivem apenas aqueles microorganismos com maior habilidade de utilizar o colesterol como única fonte de carbono. Os que não tiverem tal habilidade são eliminados gradativamente.

Ao final das inoculações sucessivas, todos os frascos apresentaram desenvolvimento microbiano, indicando que todos continham microorganismos degradadores. Como era inviável trabalhar com todos os frascos, decidiu-se escolher aqueles que continham os microorganismos degradadores mais eficientes.

Para fazer a seleção, os frascos contendo os microorganismos foram incubados em "Meio B1", um meio de cultura rico em nutrientes, para rápida proliferação microbiana. Após um período de 7 dias, uma alíquota da cultura foi transferida para um frasco contendo "Meio A1", e colesterol como única fonte de carbono e então incubado novamente durante 7 dias, sob agitação. Ao final deste processo, as 60 amostras incubadas contendo colesterol supostamente degradado, foram extraídas com acetato de etila e os extratos submetidos a uma determinação espectrofotométrica<sup>25</sup>, a fim de se verificar a concentração de colesterol remanescente em cada frasco.

Os resultados dos 20 frascos com menor teor de colesterol remanescente são resumidos nas tabelas 1 e 2.

Até esta fase, os frascos poderiam conter mais de uma espécie de microorganismo. Para isso seria necessário fazer o isolamento de cada uma delas em cada frasco selecionado. Por uma questão de tempo, optou-se por fazer apenas o isolamento da espécie de microorganismo predominante da amostra 10(S), tendo em vista a maior degradação de colesterol por esta amostra (cf. tabelas 1 e 2).

Uma alíquota do frasco 10(S) foi espalhada sobre "Meio B1 sólido" em placas de Petri. Após incubação, foi isolada da amostra a espécie de microorganismo predominante a qual, após

**Tabela 1.** Degradação de Colesterol por Microorganismos Provenientes da Amostragem 1. (S = amostra de semente; So = amostra de solo). Concentração inicial de colesterol = 200 mg%

Amostra	Absorbância(**)	Colesterol Remanescente (mg %)	Colesterol Degradado (%)
10 (S)(*)	0,113	93,96	53,02
25 (S)	0,118	98,15	50,92
8 (So)	0,123	102,35	48,82
14 (S)	0,125	104,03	47,98
7 (S)	0,147	122,48	38,76
28 (S)	0,149	124,16	37,92
5 (So)	0,153	127,52	36,24
26 (S)	0,154	128,36	35,82
15 (S)	0,158	131,71	34,14
6 (S)	0,160	133,39	33,30

(\*) amostra utilizada nos experimentos de degradação do  $\beta$ -sitosterol; (\*\*) após tratamento com ácido sulfúrico concentrado e leitura a 560 nm; para detalhes veja referência 25.

**Tabela 2.** Degradação de Colesterol por Microorganismos Provenientes da Amostragem 2. (S = amostra de semente; So = amostra de solo). Concentração Inicial de colesterol = 200 mg%

Amostra	Absorbância(*)	Colesterol Remanescente (mg %)	Colesterol Degradado (%)
1 (S)	0,122	101,51	49,24
3 (So)	0,126	104,86	47,57
25 (S)	0,134	111,58	44,21
24 (S)	0,137	114,09	42,95
21 (So)	0,143	119,13	40,43
20 (S)	0,155	129,19	35,40
28 (So)	0,156	131,71	34,14
23 (S)	0,163	135,91	32,04
22 (S)	0,166	138,42	30,79
5 (So)	0,168	140,10	29,95

(\*) após tratamento com ácido sulfúrico concentrado e leitura a 560 nm; para detalhes veja referência 25.

coloração de Gram e observação ao microscópio, mostrou ser um bacilo Gram negativo.

Após o isolamento, a bactéria foi utilizada para experimentos de fermentação em escala preparativa, utilizando desta vez  $\beta$ -sitosterol como substrato.

## 2.2 Biotransformações

As fermentações em escala preparativa foram realizadas nos meios de cultura "Meio A3" e no "Meio B2", ambos contendo 2g/L de  $\beta$ -sitosterol além de  $\alpha, \alpha'$ -dipiridil. A diferença entre eles é que o segundo é um meio de cultura complexo e, por isso, muito mais nutritivo que o primeiro que contém apenas sais minerais além dos componentes citados acima. Todas as fermentações foram realizadas em micro-fermentador, com capacidade para 1 litro.

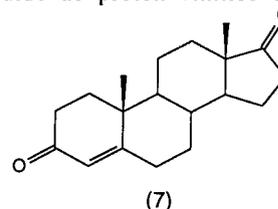
Para clivar seletivamente a cadeia lateral de esteróis, a degradação do núcleo esteroidal tem que ser inibida, visto que a maioria dos microorganismos capazes de degradar o esteroil decompõe a molécula completamente. Isto pode ser conseguido pela inibição da enzima  $9\alpha$ -hidroxilase, responsável pela clivagem do núcleo<sup>20,21</sup>.

Estudos revelaram que uma série de inibidores, tais como  $\alpha, \alpha'$ -dipiridil, ortofenantrolina, 8-hidroxiquinolina, são eficientes para inibir a enzima  $9\alpha$ -hidroxilase, impedindo assim, a degradação do núcleo esteroidal<sup>22</sup>. Outra abordagem para o problema é a do uso de microorganismos mutantes<sup>20</sup>.

Para o isolamento dos produtos de degradação, foram utilizadas as frações neutra e ácida provenientes da fermentações, obtidas através da extração do extrato bruto com uma solução de bicarbonato de sódio. As frações ácidas, após esterificação com diazometano etéreo, não forneceram nenhum produto referente à biotransformação.

A fração neutra do "Meio B2", entretanto, forneceu um produto (12,9 mg), o qual foi também obtido da fração neutra da fermentação em "Meio A3". Este produto foi caracterizado como androst-4-eno-3,17-diona ou AD (7) com base nos dados espectrométricos.

O espectro de RMN<sup>1</sup>H (500 MHz) mostrou um singlete em 5,76 ppm atribuído ao próton vinílico H-4, bem como os



singletes em 1,22 e 0,92, atribuídos aos prótons das metilas em C-19 e C-18, respectivamente.

O espectro de RMN<sup>13</sup>C (125 Mhz) mostrou 19 absorções. As ressonâncias a 13,7 e 17,4 ppm foram atribuídas aos carbonos 18 e 19 (grupamento metila), enquanto que as ressonâncias a 199,2 e 220,2 ppm foram atribuídas aos carbonos carbonílicos 3 e 17. A ressonância do carbono olefínico 4 e 5 foram observadas a 124,2 e 170,2 ppm. O espectro é comparável ao da literatura<sup>23</sup>.

**Tabela 3.** RMN<sup>13</sup>C do produto obtido (androst-4-eno-3,17-diona).

C	δ
1	35,7
2	33,9
3	199,2
4	124,2
5	170,2
6	32,6
7	31,3
8	35,2
9	53,8
10	38,6
11	20,3
12	30,8
13	47,5
14	50,9
15	21,7
16	35,7
17	220,2
18	13,7
19	17,4

O espectro no infravermelho apresentou 5 bandas principais: 2870-2940 cm<sup>-1</sup>, atribuídas aos grupos metila C-18 e C-19; 1749 cm<sup>-1</sup> atribuída à carbonila C-17 e, em 1670 cm<sup>-1</sup>, absorvância atribuída à carbonila C-3. A absorvância referente à dupla ligação entre C-4 e C-5 foi observada em 1620 cm<sup>-1</sup>. O espectro no ultravioleta apresentou absorvância típica de uma cetona α,β-insaturada em 238 nm.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 Equipamentos e Materiais

Agitador-incubador orbital Ética; Microfermentador "New Brunswick Scientific Co", modelo MF-202 F, com capacidade útil para 1 litro de mosto (doação da University of Sussex, Inglaterra); Espectrofotômetro UV-VIS Varian modelo 634; Autoclave vertical Phoenix; Espectrofotômetro UV/VIS HP, mod. 8450 A. (Laboratório Central da Companhia Paranaense de Energia Elétrica - LAC-COPEL); Espectrômetro Brucker RMN WM 500 (500 MHz) (University of Sussex-Inglaterra); Espectrômetro no Infra-Vermelho Bomem, FT-IR, MB-100.

Para cromatografia em coluna, utilizou-se sílica 60 (70-230 mesh ASTM). Os solventes de grau comercial foram tratados e purificados. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

#### 3.2 Meios de Cultura

Meio Seubert: (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1,0 g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 g/L; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,25 g/L; NaCl 0,005 g/L; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,001 g/L)

"Meio A1": Meio Seubert adicionado de colesterol (2,0 g/L).

"Meio A2": Meio Seubert de β-sitosterol (2,0 g/L)

"Meio A3": semelhante ao "Meio A2", adicionado de α,α'-dipiridil (0,3 mM)

"Meio B1": Meio Seubert adicionado de glicose (10,0 g/L), extrato de levedura (1,0 g/L) e caldo nutriente (8,0 g/L)

"Meio B1 sólido": semelhante ao "Meio B1" contendo ágar-ágar (20 g/L)

"Meio B2": semelhante ao "Meio B1" adicionado de β-sitosterol (2,0 g/L) e α,α'-dipiridil (0,3 mM)

Após a preparação dos meios, o pH foi ajustado para 7,00 e, após distribuição em frascos apropriados, os mesmos foram autoclavados a 121°C por 20 minutos.

### 3.3 Metodologia

#### 3.3.1 Amostragem

Amostragem 1- Amostras de solo (5 X 5g) e amostras de sementes de soja (25 X 5g), foram coletadas em uma área de cultivo de soja próximo ao aeroporto da cidade de Maringá-PR, cuja colheita havia sido feita há 10 dias. Esta coleta foi realizada em março de 1990.

Amostragem 2- Amostras de solo (10 X 5g) e amostras de semente de soja (20 X 5g) foram coletadas no mesmo local da primeira coleta, 20 dias depois.

#### 3.3.2 Obtenção de microorganismos degradadores de colesterol

Cada uma das 60 amostras foi individualmente incubada em erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de "Meio A1"<sup>18</sup>. Os frascos foram agitados, durante 7 dias, à 30°C. Após este período, alíquotas de 10 mL de cada erlenmeyer foram inoculadas em novos frascos contendo 100 mL do mesmo meio de cultura, os quais também foram incubados sob as mesmas condições. Este procedimento foi repetido por um total de quinze vezes.

#### 3.3.3 Seleção das melhores amostras degradadoras de colesterol

Alíquotas de 10 mL do 15<sup>o</sup>. inóculo obtido anteriormente, foram inoculadas em 100 mL do "Meio B1"<sup>24</sup>. Os frascos foram incubados sob agitação, durante 24 horas, a 30°C. Após este tempo, alíquotas de 10 mL de cada frasco foram inoculadas em 100 mL do "Meio A1". Os frascos foram novamente incubados sob agitação, durante 7 dias, a 30°C. Após este tempo, as amostras foram acidificadas até pH = 1-2 com ácido sulfúrico 10% e submetidas a quatro extrações com porções de 20 mL de acetato de etila. O volume de cada extrato foi completado para 100 mL com o mesmo solvente e foi, então, feita a determinação da concentração de colesterol remanescente<sup>25</sup>. Os resultados das 20 amostras que apresentaram menor teor de colesterol estão nas tabelas 1 e 2.

#### 3.3.4 Isolamento de Microorganismos Degradadores

Após aplicação da amostra 10(S), utilizando-se alça de platina, nas placas de Petri contendo o "Meio B1 sólido", estas foram incubadas por 24 horas a 30°C. Ao final deste tempo, as colônias arredondadas de coloração branca foram "fisgadas" da superfície do meio e transferidas para tubos de ensaio contendo o mesmo meio de cultura. Os tubos (em triplicata) foram incubados por 24 horas, a 30°C. Após esse tempo, os isolados foram conservados em geladeira cobertos por uma camada de óleo mineral (Nujol) esterilizado. Obteve-se um isolado de bactéria que foi submetida à coloração de Gram<sup>26</sup>. Análise microscópica revelou ser uma bactéria em forma de bastonete e "Gram negativa".

#### 3.3.5 Biotransformação em Escala Preparativa

A bactéria isolada foi inoculada em um litro de meio de cultura no vaso de fermentação. Foram utilizados o "Meio A3" e o "Meio B2", descritos anteriormente. Foram utilizadas as

seguinte condições; temperatura: 30°C; velocidade de agitação: 140 r.p.m; vazão de ar: 1 v.v.m; volume de meio: 1 l; tempo de fermentação: 7 dias.

Após as fermentações, os mostos foram acidificados até pH = 1-2 com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% e extraídos com acetato de etila (4 X 250 mL). Após secagem dos extratos com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, estes foram concentrados sob pressão reduzida e extraídos com carbonato de sódio 5%. As fases aquosas foram acidificadas e extraídas com acetato de etila. Após secagem com sulfato de sódio anidro e evaporação do solvente, os extratos ácidos foram redissolvidos em metanol e esterificados com diazometano etéreo. Após evaporação do solvente, os resíduos foram cromatografados em coluna de sílica. Não foi obtido nenhum produto de degradação parcial do β-sitosterol.

As frações neutras foram também fracionadas em coluna de sílica, sendo a eluição feita com diferentes proporções de diclorometano e acetato de etila. Do "Meio B2" foi isolada uma substância (12,9 mg) que se mostrou idêntica àquela isolada do "Meio A3" (11,2 mg). Ela foi caracterizada como androst-4-eno-3,17-diona (8). P.f: 164°C (lit<sup>19</sup> 171°C); λ<sub>max</sub>: 1749, 1670, 1620, 2870, 2940 cm<sup>-1</sup>; RMN<sup>1</sup>H (500 MHz): δ ppm (CDCl<sub>3</sub>): 5,76 (1H, s, H-4); 1,22(3H, s, H-19); 0,92 (3H, s, H-18). RMN<sup>13</sup>C (125 MHz): δ ppm (CDCl<sub>3</sub>): 13,7 (C-18), 17,4 (C-19), 199,2 (C-3), 220,2 (C-17), 124,1 (C-4) e 170,2 (C-5)

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq pelo apoio financeiro. Somos também gratos ao Dr. Carlos Kemmelmeier (Dep. Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá) pela ajuda no início do trabalho.

## REFERÊNCIAS

1. Kirk, R. E.; Othmer, D. F.; *Encyclopedia of Chemical Technology*, Interscience, New York, 1951; vol. 7, pp 513-536.
2. Blunden, G.; Culling, M. C.; Jewers, K. *Trop. Sci.*, **1975**, *17*, 139.
3. Zeelen, F. J.; *Nat. Prod. Rep.* **1994**, *11*, 607.
4. Wiechert, R.; *Angew. Chem., Intern. Ed. Engl.* **1970**, *9*, 321.
5. Martin, C. K. A.; *Sterols in: Biotechnology*, Ed. Rehm, H.-J.; Reed, G., Verlag Chemie, Weinheim, 1984; vol 6a, pp 79-95.
6. Cvangros, J.; Liptaj, T., *Czech. CS277473*, 1993.
7. Imata, Y.; Teranishi, Y.; *Jpn. Kokkyo Tokkyo Koho Jp* 54/138192, 1979.
8. Iida, M.; Murohisa, T.; Yoneyama, A.; Iizuka, H.; *J. Ferment. Technol.* **1985**, *63*, 559.
9. Shi, J.; Chu, Z.; Ju, Y.; Mo, G.; Cheng, W.; *Zhongguo Yiyao Gongye Zazhi* **1992**, *23*, 204; *Chem. Abstr.* **1993**, *118*, 5661f.
10. Owen, R. W.; Mason, A. N.; Bilton, R. F.; *Journal of Lipid Research.* **1983**, *24*, 1500.
11. Schulz, H.; Tinney, U.; Hoerhold, C.; Forberg, W.; Raxche, G.; *Ger. (East) DD 294,503* 1991.
12. Marshech, W. J.; Kraychy, S.; Muir, R.; *Appl. Microbiol.* **1972**, *23*, 73.
13. Gottschaldt, B.; Grosse, H. H.; Hoerhold, C.; Wetzker, M.; Naumann, H.; Heller, I.; Birke, M.; Plonka, G.; *Ger. (East) DD 301,740*, 1993.
14. Owen, R. W.; Mason, A. N.; Bilton, R. F.; *J. Steroid Biochem.* **1985**, *23*, 327.
15. Oda, S.; *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 06 00,095* (1994), *Chem. Abstr.* **1994**, *120*, 242682n.
16. Lee, C. Y.; Liu, W. H.; *Chung-kuo Nung Yeh Hua Hsueh Hui Chih* **1990**, *28*, 276; *Chem. Abstr.* **1991**, *114*, 183830k.
17. Roy, P.K.; Khan, A.W.; Basu, S.K.; *Indian J. Biochem. Biophys.* **1991**, *28*, 150.
18. Knight, J. C.; Wovcha, M. G.; *Steroids.* **1980**, *36*, 723.
19. Bhattacharyya, P.K.; Rao, M. K.; Natarajan, D.; Ramgopal, M.; Madyastha, P.; Madyastha, K.M.; *J. Indian Chem. Soc.* **1984**, *111*, 1.
20. Wovcha, M. G.; Antosz, F. J.; Knight, J. C., Kominek, L. A.; *Biochim. Biophys. Acta.*, **1978**, *531*, 308.
21. Martin, C. K. A.; Wagner, F.; *European J. Appl. Microbiol.* **1976**, *2*, 243.
22. Nagasawa, M.; Watanabe, N.; Hashiba, H.; Murakami, M.; Bae, M.; Tamura, G.; Arima, K.; *Agr. Biol. Chem.* **1970**, *34*, 838.
23. Breitmaier, E.; Voelter, W.; *Carbon-13 NMR Spectroscopy*; VCH; New York, 1987; p 344.
24. Wovcha, M. G.; Biggs, C. B.; *US 4,293,644*, 1981.
25. Leffler, H. H.; McDougald, C. H.; *Am. J. Clin. Pathol.* **1963**, *39*, 311.
26. Antunes, G. S.; *Manual de Diagnóstico Bacteriológico*; Editora da Universidade/UFRGS; Porto Alegre, 1991; pp 65-72.