

ESTUDOS RECENTES DA BIOTRANSFORMAÇÃO DA PROGESTERONA POR MICRORGANISMOS

Data de aceite: 03/07/2023

Lígia Breda e Vasconcelos

Graduanda em Bacharelado em Química - Ênfase em Ambiental, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo.
<https://lattes.cnpq.br/2432728004645186>.

Samuel Filipe Cardoso de Paula

Doutorando e Mestre em Química Orgânica e Biológica, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo.
<http://lattes.cnpq.br/0236400279872187>.

André Luiz Meleiro Porto

Laboratório de Química Orgânica e Biocatálise, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo.
<http://lattes.cnpq.br/2689760395534218>.

Nota dos Autores: *Este Capítulo foi originado com base nos trabalhos de Iniciação Científica "Estudos de biotransformação de esteroides pelo fungo *Penicillium oxalicum* CBMAI 1996 visando compreender possíveis impactos ambientais", da estudante Lígia B. e Vasconcelos (bolsista FAPESP, Proc. NO. 2021/13179-5); e de outros estudos envolvendo a biotransformação da progesterona, realizados pelo Grupo de Pesquisa do Laboratório de Química Orgânica*

e Biocatálise, como da dissertação "*Estudo da ocorrência de reações de bio-oxidação dos esteroides progesterona e 17 α -etinilestradiol por fungos de ambiente marinho*" de Samuel F. C. de Paula.

RESUMO: Esteroides são compostos orgânicos classificados como hormônios e são produzidos pelas diversas espécies do reino animal, vegetal e fungi protista. São moléculas formadas por cadeias carbônicas tetracíclicas, lipossolúveis, estáveis e apresentam diferentes tipos de grupos funcionais (álcoois, ésteres, cetonas, aldeídos, ácidos carboxílicos, núcleo benzenoide) os quais são responsáveis pelas suas diferentes funções e propriedades físicas e químicas. Dentre os esteroides, a progesterona é um hormônio sexual produzido pelos ovários e é fundamental para a regulação do ciclo menstrual e para a manutenção da gravidez. Com os estudos e o desenvolvimento dos contraceptivos, observou-se que pequenas variações, nas estruturas e nas funções orgânicas dessas moléculas, podem levar a grandes alterações da biodisponibilidade e de suas atividades biológicas. O consumo de contraceptivos, remete posteriormente

na liberação dessas moléculas em corpos hídricos, através do descarte ou da eliminação natural humana. Por serem moléculas lipofílicas e recalcitrantes, essas tendem a se acumular nos tecidos de animais aquáticos (exs. peixes, anfíbios, etc.) causando danos em seus sistemas reprodutivos, o que às classificam como poluentes disruptores endócrinos. Uma das maneiras de se promover alterações nessas moléculas no meio ambiente se dá através de reações naturais, catalisadas pelos sistemas enzimáticos de fungos e bactérias. Assim, este Capítulo apresenta os estudos de biotransformação da progesterona com o fungo de ambiente marinho *Penicillium oxalicum* CBMAI 1996. Este fungo promoveu a hidroxilação da progesterona, formando os derivados 15 β -hidroxiprogestero e a 7 β ,15 β -dihidroxiprogestero, o quais foram isolados, identificados e caracterizados por CG-EM, RMN e por difração de Raios-X. Comumente, enzimas do complexo do citocromo P-450, produzidas pelo fungo *P. oxalicum* CBMAI 1996, foram as que promoveram as reações de hidroxilação da progesterona. Além disso, há uma hipótese que tais moléculas esteroidais, presentes no meio ambiente terrestre e marinho, estão sujeitas às diversas biotransformações microbianas. Assim, podem ocorrer alterações na lipofilicidade, e conseqüentemente, de bioacumulação podendo levar alterações metabólicas em organismos vivos alvos que passam a ter contato com esses compostos xenobióticos e seus derivados. Desta forma, este trabalho apresenta alguns dos estudos recentes de biotransformação da progesterona com o fungo *P. oxalicum* CBMAI 1996.

PALAVRAS-CHAVE: Biotransformação, Esteroides, Fungo Marinho, *Penicillium oxalicum*.

RECENT STUDIES OF THE BIOTRANSFORMATION OF PROGESTERONE BY MICROORGANISMS

ABSTRACT: Steroids are organic compounds classified as hormones and are produced by different species of the animal, vegetable and protist fungi kingdoms. They are molecules formed by tetracyclic carbon chains, liposoluble, stable and have different types of functional groups (alcohols, esters, ketones, aldehydes, carboxylic acids, benzene ring) which are responsible for their different functions and physical and chemical properties. Among steroids, progesterone is a sex hormone produced by the ovaries and is essential for regulating the menstrual cycle and maintaining of the pregnancy. With the studies and development of contraceptives, it was observed that small variations in the structures and organic functions of these molecules can lead to major changes in bioavailability and their biological activities. The consumption of contraceptives subsequently refers to the release of these molecules into water bodies, through disposal or natural human elimination. Because they are lipophilic and recalcitrant molecules, they tend to accumulate in the tissues of aquatic animals (e.g. fish, amphibians, etc.) causing damage to their reproductive systems, which classify them as endocrine-disrupting pollutants. One of the ways to promote changes in these molecules in the environment is through natural reactions, catalyzed by the enzymatic systems of fungi and bacteria. Thus, this Chapter presents the studies of progesterone biotransformation with the marine fungus *Penicillium oxalicum* CBMAI 1996. This fungus promoted the hydroxylation of progesterone, forming the derivatives 15 β -hydroxyprogesterone and 7 β ,15 β -dihydroxyprogesterone, which were isolated, identified and characterized by GC-MS, NMR and X-ray diffraction. Commonly, enzymes of the cytochrome P-450 complex, produced by the fungus *P. oxalicum* CBMAI 1996, were the ones that promoted progesterone hydroxylation

reactions. In addition, there is a hypothesis that such steroidal molecules, present in the terrestrial and marine environment, are subject to various microbial biotransformation. Thus, changes in lipophilicity and, consequently, bioaccumulation may occur, which may lead to metabolic changes in target living organisms that come into contact with these xenobiotic compounds and their derivatives. Thus, this work presents some of the recent studies of progesterone biotransformation by the fungus. *P. oxalicum* CBMAI 1996.

KEYWORDS: Biotransformation, Steroids, Marine Fungi, *Penicillium oxalicum*.

1 | INTRODUÇÃO

1.1 Progesterona

A progesterona é um hormônio esteroidal, lipofílico, derivado do colesterol, caracteriza-se por ser o único progestágeno natural, ou seja, é sintetizada pelo corpo humano, especialmente nos ovários, na placenta e nas glândulas suprarrenais^[1]. Sua estrutura química é formada a partir de um núcleo base composto por 17 átomos de carbono, que compõe um sistema de anéis tetracíclicos (A, B, C e D), denominado de gonano, típico dos esteroides (Figura 1)^[2].

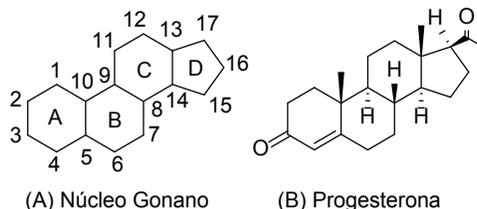


Figura 1. (A) Representação do esqueleto gonano dos esteroides. (B) Representação da estrutura química da progesterona.

A biossíntese da progesterona envolve o citocromo P-450, nas células do ovário, sob a influência dos hormônios hipotalâmico-hipofisários, com a conversão do colesterol à pregnenolona. Esta por sua vez, deve sair da mitocôndria para sofrer a ação das enzimas 3 β HSD ou 17 α -hidroxipregnenolona e 17 α -hidroxilase, presentes no retículo endoplasmático, convertendo-se finalmente à progesterona. A maior parte da progesterona formada é secretada para o sangue, porém uma outra parte é oxidada no carbono C-17, tornando-se um substrato de partida (17 α -hidroxiprogesterona) para a formação de outros hormônios esteroidais (Figura 2)^[3].

A progesterona é um dos hormônios mais importantes da gestação e comunicação materno-fetal, estimulando a secreção uterina de nutrientes que influenciam diretamente no início do desenvolvimento embrionário^[4]. Ainda, a progesterona está relacionada ao processo de ovulação, e com isso, diversos progestágenos vem sendo (bio)sintetizados e comercializados, em combinação com outros hormônios como o estradiol, na forma de contraceptivos^[3].

Durante todo o período menstrual, a expressão dos receptores endometriais para estrogênios e progesterona varia, o que resulta na ciclicidade e formação das condições para a concepção. A progesterona exerce um papel importante na transição da fase proliferativa, ao final da menstruação, quando o endométrio está descamado, com sua menor espessura, para a fase secretora, período fértil, quando o endométrio apresenta sua maior espessura, rico em nutrientes favorecendo a fixação e o sustento do embrião^[3].

A produção de progesterona nos ovários é induzida por hormônios produzidos no hipotálamo e pela glândula hipófise, na segunda metade do ciclo menstrual, antes da ovulação. O hormônio é capaz de ligar-se aos receptores de estrogênio, presentes nas células epiteliais do estroma e miométrio, de maneira supressora. Desta forma, na fase ovulatória, quando se observa uma alta liberação de estrogênio, tem-se de forma simultânea um aumento exponencial da concentração de receptores da progesterona, localizados nas células epiteliais do endométrio. Isso faz com que a progesterona esteja menos biodisponível e não realize sua função supressora. Durante a fase lútea o nível de progesterona no sangue encontra-se em torno de 20 a 30 mg/dia, enquanto fora desta fase fica próximo a 1 mg/dia^[5].

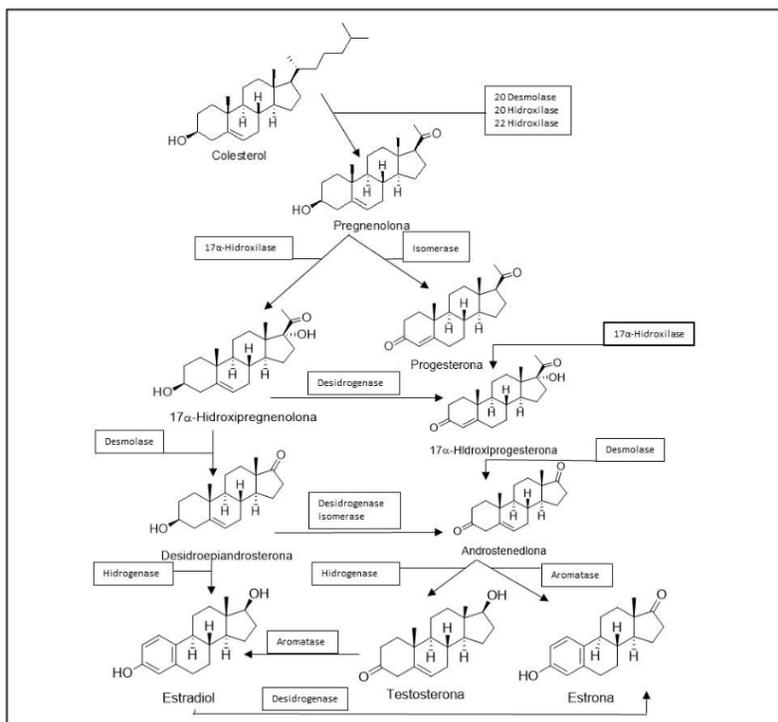


Figura 2. Biossíntese de hormônios esteroidais a partir das células do ovário.

Fonte: Adaptado da ref. ORIZABA-CHÁVEZ, B; *et. al.* Farmacocinética de la progesterona. Revista Hospital Juarez México, México, vol. 60, 1, 59-66, 2013.

A progesterona é metabolizada de forma rápida, em sua primeira passagem pelo fígado. O principal metabólito da progesterona é o pregnanediol (Figura 3), que em seqüência se conjuga com o ácido glicurônico, formando o pregnanediol glicuronídeo. Esse metabólito é então eliminado pela urina. Como esse processo ocorre na primeira passagem hepática, a progesterona possui um curto tempo de meia-vida de eliminação de apenas 5 minutos. Seus derivados, em sua maioria, possuem um tempo de meia vida de eliminação muito maior, como o acetato de medroxiprogesterona (Figura 4) que chega a 24 horas, e por isso são mais utilizados na composição dos contraceptivos^[5].

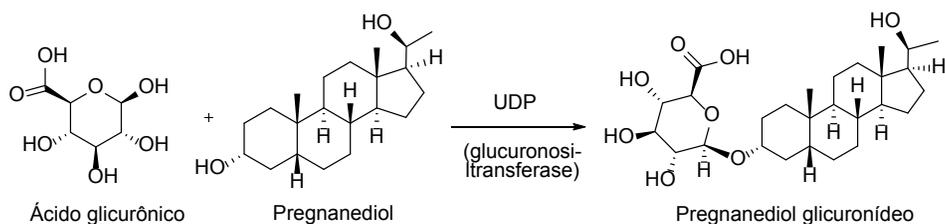


Figura 3. Reação de conjugação do pregnanediol glicuronídeo nas células hepáticas^[6].

Além do baixo tempo de meia vida de eliminação da progesterona, outros fatores levaram ao desenvolvimento de derivados esteroidais para aplicação em métodos contraceptivos. As progestinas são moléculas sintetizadas a partir da progesterona, sendo estas derivadas da 17 α -hidroxiprogesterona e norprogesterona. Estas possuem atividades semelhantes à progesterona e podem ser administradas de forma terapêutica por via oral^[3]. Estão dispostas na Tabela 1 as estruturas de algumas progestinas utilizadas em tratamentos contraceptivos e seu ano de introdução do mercado^[7].

As progestinas também estão sendo empregadas em terapias hormonais para mulheres que sofrem com os efeitos da menopausa. Estudos localizaram receptores de progesterona em osteoblastos (células onde se formam os ossos). A partir de testes *in vitro* verificou-se o efeito benéfico promovido pelas terapias com progestágenos, que aumentaram a proliferação de osteoblastos, levando a uma diminuição da perda óssea (consequência da menopausa)^[8].

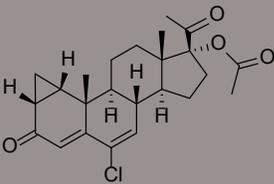
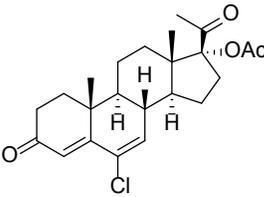
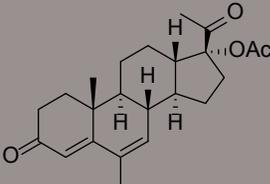
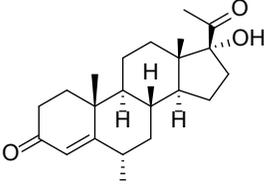
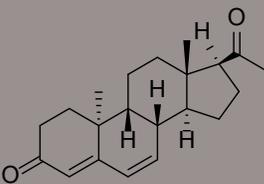
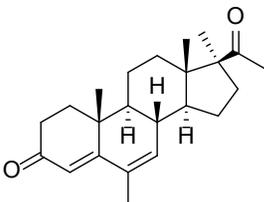
Nome	Estrutura	Ano de introdução no mercado
Acetato de ciproterona		1961
Clormadinona		1959
Acetato de Megestrol		1959
Medroxiprogesterona		1957
di-Hidrogesterona		1959
Medrogestona		1964

Tabela 1. Classificação dos compostos derivados da progesterona utilizados nos tratamentos contraceptivos e seu ano de introdução no mercado.

Fonte: REGIDOR, P. A. The clinical relevance of progestogens in hormonal contraception: Present status and future developments. **Oncotarget**, Ismaning, Germany, vol. 9, 77, 34628-34638, 2018.

1.2 Contaminação ambiental por compostos esteroidais

O consumo dos contraceptivos hormonais cresce progressivamente desde a década de 1960. Segundo a declaração da posição das terapias hormonais de 2022, da Sociedade Norte Americana da Menopausa (*The North American Society of Menopause*), além do uso para prevenção da concepção, os hormônios apresentam resultados altamente eficazes para o tratamento de sintomas vasomotores, da síndrome geniturinária e da perda óssea, sintomas da menopausa^[9].

Dados da literatura tem mostrado, assim como a maioria dos fármacos, que apenas uma pequena parte do princípio ativo dos anticoncepcionais e reguladores hormonais é absorvida pelo organismo, enquanto uma outra parcela é metabolizada ou eliminada diretamente na urina. Estudos apontaram a presença em águas subterrâneas de até 66 ng L⁻¹ de 17 β -estradiol e até 50 μ g L⁻¹ de 17 α -etinilestradiol (ambos esteroides presentes em contraceptivos) ^[10].

As águas residuais domésticas e industriais passaram a apresentar concentrações consideráveis de compostos hormonais e seus derivados de metabolização. Tal situação torna-se crítica e preocupante em função do forte potencial disruptivo endócrino desses esteroides, e da ausência de tecnologias eficientes para a remoção e a identificação de moléculas orgânicas em baixas concentrações nas estações de tratamento de águas residuais^[11].

Devido a incipiência dos métodos de tratamentos de água e esgoto frente a tais substâncias, essas acabam influenciando o comportamento dos organismos vivos em vários aspectos. Estudos mostraram que peixes fêmeas, na presença de determinados compostos esteroidais, passaram a apresentar aspectos andrógenos, ou seja, desenvolvimento induzido de órgãos reprodutivos masculinos, mesmo quando presentes em concentrações mínimas (valores inferiores a ng/L)^[12].

Foram realizados testes com peixes alevinos da espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo), os quais foram expostos por um período de 1 a 4 semanas aos hormônios esteroidais 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol. As concentrações de esteroides avaliadas variavam de 250 ng L⁻¹ a 1 mg L⁻¹. Concluiu-se que as concentrações hormonais do meio influenciaram diretamente no peso, comprimento e na sobrevivência dos indivíduos. Observou-se o desenvolvimento de indivíduos intersexos e com malformações, principalmente na região da cabeça ou encefálica^[13].

O Fator de Bioconcentração - FBC (*Bioconcentration Factor*) trata-se de um número que remete a afinidade que um determinado composto apresenta em se bioacumular em tecidos animais ou vegetais^[14]. Mediu-se o FBC de progestágenos (grupo de hormônios sexuais que atuam nos receptores da progesterona) em indivíduos da espécie *Danio rerio* (peixes-zebra) que possuíam de 9 a 12 meses de vida. Os testes foram realizados com um período de exposição aos esteroides de 28 dias. Os resultados apresentaram

um intervalo de FBC = 7, relativo ao hormônio contraceptivo Dienogeste, até FBC = 128, relativo ao hormônio Acetato de Medroxiprogesterona. Avaliou-se, que a exposição aos hormônios levou alterações bioquímicas, gerando respostas não lineares dos biomarcadores analisados. Além disso observou-se uma intensa alteração na produção de proteínas do grupo das vitelogeninas, sugerindo um risco para o processo reprodutivo destes indivíduos ^[15].

Os esteroides liberados no meio ambiente tendem a comportar-se de acordo com suas propriedades físico-químicas as quais são hidrofóbicos, apresentam baixa volatilidade e são bastante estáveis e recalcitrantes ^[16]. Por consequência, causam acumulação em sedimentos ambientais, bem como em tecidos adiposos de animais e outros organismos presentes na biota local os quais têm contato com essas substâncias.

Com o decorrer do tempo pode-se observar um processo de bioacumulação, em que essas substâncias esteroidais se concentram progressivamente nos tecidos dos organismos a eles expostos. Simultaneamente a esse processo, desenrolam-se os ciclos naturais predatórios das cadeias alimentares, nos quais surgem as tendências dos acúmulos dos contaminantes nos tecidos dos organismos consumidores do topo da cadeia alimentar via processo de biomagnificação^[17].

Em contrapartida, os microrganismos presentes nos ambientes de disseminação de tais substâncias interagem com estes compostos podendo biotransformá-los em novas moléculas, comumente mais hidrofílicas. O etinil estradiol, por exemplo, é parcialmente metabolizado no corpo humano gerando derivados conjugados, os quais são regenerados por bactérias *E. coli* retornando a sua estrutura original^[18].

A contaminação ambiental por esteroides é emergente, sendo relevantes os estudos da ocorrência e a concentração de tais compostos e de seus derivados de biotransformação (mesmo que em escalas de ng L^{-1}) ^[19]. Além disso, deve-se buscar compreender como a biota local interage com os esteroides, para se avaliar as possíveis formas de biodegradação ou a obtenção de novos derivados e as suas possíveis consequências. Contudo, é um trabalho complexo, de difícil interpretação e de conclusão das hipóteses, devido às inúmeras variáveis que envolvem todo o processo de biotransformação dos esteroides no meio ambiente.

Ressalta-se que os produtos de biotransformação dos esteroides, que estão sendo obtidos no meio ambiente, podem ser classificados como mais ou menos tóxicos, ou ainda, como novos compostos com potencial atividade para uso em humanos. Diversas moléculas comerciais foram obtidas a partir do metabolismo natural de plantas, animais e fungos, ou por processos de biotransformação^[20]. Destaca-se, com isso, a importância e a relevância dos estudos de biotransformação de esteroides.

1.3 Biotransformação de esteroides

Durante o desenvolvimento e o crescimento de microrganismos (fungos, bactérias, algas) no meio ambiente ou em condições de laboratórios são biossintetizadas uma diversidade de enzimas, as quais podem ser excretadas, isoladas, imobilizadas e utilizadas para promover a biotransformação e a biodegradação de compostos xenobióticos. Em estudos laboratoriais, para promover a biotransformação de compostos esteroidais, conhecer os metabólitos produzidos e as enzimas envolvidas, podem ser utilizados os sistemas biológicos constituídos de células totais ou o caldo enzimático obtido dos meios de cultura em que foram cultivados e crescidos os microrganismos^[21].

Os microrganismos empregados nas biotransformações encontram-se distribuídos no meio ambiente em todos os tipos de biomas. Consequentemente, as condições empregadas nos meios reacionais para a biotransformação de xenobióticos são brandas e próximas das CNTP, além do meio líquido de cultivo laboratorial utilizar a água e sais minerais. Com isso, estudos nessa área convergem com os princípios da Química Verde, uma vez que levam ao desenvolvimento de técnicas e metodologias que exigem um baixo consumo de energia e reduzem o uso de substâncias nocivas à saúde humana e ao meio ambiente e que sejam de fontes renováveis^[22].

A biotransformação remete a qualquer mudança promovida em moléculas na presença de um agente biológico vivo, a qual leva às alterações nas propriedades físicas e químicas do material de partida, cujo produto(s) pode(m) ser extraído(s) após o processo. A biodegradação, em contrapartida, remete às transformações que causam a fragmentação total dos compostos (comumente de interesse os compostos xenobióticos tóxicos) em estruturas químicas mais simples como gás carbônico, água e outras moléculas voláteis^[23].

Estudos na literatura, por exemplo, mostraram que o fungo *Aspergillus niger* N402 promoveu a obtenção de uma mistura de produtos via reações de hidroxilação da progesterona, produzindo a 11 α -hidroxiprogesterona, a 6 β ,11 α -di-hidroxiprogesterona e a 21-hidroxiprogesterona (desoxicorticosterona). A adição de íons metálicos (Cu²⁺, Cd²⁺ e Co²⁺) aos meios reacionais levou a inibição das enzimas que promoveram a hidroxilação, o que remete na possibilidade de se controlar a biotransformação^[24].

A biotransformação da progesterona pelo fungo *Aspergillus brasiliensis* por 7 dias levou a obtenção da 11 α -hidroxiprogesterona, da 14 α -hidroxiprogesterona e da 21-hidroxiprogesterona. Ressalta-se que a 21-hidroxiprogesterona é utilizada como fármaco, na forma do seu derivado acetato, para o tratamento de doenças de Addison, Miastenia Gravis, dentre outras^[25].

As monoxigenases promovem reações de oxidação (ex. hidroxilação) dos esteroides, gerando uma vasta gama de produtos, sendo estes muitas vezes regioisômeros. A consequência disso, é que muitas vezes, dificulta a purificação do(s) produto(s) alvo(s). Nestes casos, pode-se utilizar microrganismos como plataformas para a expressão

heteróloga das enzimas. Por exemplo, empregar células microbianas hospedeiras, como de bactérias (*Escherichia coli*) e de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*). Assim, obtêm-se as enzimas fúngicas de interesse com um alto nível de expressão e com melhor rendimento de biotransformação frente ao(s) produto(s) desejado(s)^[26].

A origem dos microrganismos que podem ser utilizados nas reações de biotransformação é altamente diversa, já que estes ocupam todos os ambientes, independente das condições de temperatura, pressão e composição nutricional. Fungos endofíticos, por exemplo, vivem dentro dos tecidos vegetais, sem causar danos à planta hospedeira. O fungo endofítico *Talaromyces* sp., isolado das folhas de *Handroanthus impetiginosus* (Ipê-roxo) reduziu a ligação dupla sp² dos carbonos C-4 e C-5 (Anel A), além de promover oxidação no carbono C-17 com hibridação sp³ (Anel C) da progesterona produzindo derivados diferentes^[27].

Na literatura foi avaliado o potencial de biotransformação da progesterona com microrganismos presentes no lodo ativado de tratamento de efluentes. Observou-se várias reações (metilação, hidrogenação, hidroxilação, etc.), com uma amostra microbiológica do efluente. Neste estudo, realizou-se o teste do efluente resultante após a biotransformação da progesterona com peixes-zebra. Embora não tenha se observado a morte de indivíduos, verificou-se interferências na atividade de transcrição gênica evidenciando que os resíduos da biotransformação continuaram possuindo atividade endócrina e biológica, possivelmente devido à presença dos esteroides biotransformados pela microbiota^[28].

O potencial de biotransformação da progesterona por 12 linhagens de fungos isolados de ambiente marinho foram investigados entre 3 a 7 dias. Os melhores resultados foram obtidos após 7 dias, cuja conversão da progesterona foi superior a 99%, em diferentes produtos de biotransformação. Tais resultados foram promovidos pelas linhagens de *Aspergillus sydowii* CBMAI 935, que produziu a testosterona, o *Penicillium oxalicum* CBMAI 1185, que produziu a testololactona e o *Cladosporium* sp. CBMAI 1237, que produziu a 11-hidroxiprogesterona^[29].

2 | BIOTRANSFORMAÇÃO DA PROGESTERONA PELO FUNGO *PENICILLIUM OXALICUM* CBMAI 1996

Em nossos estudos foi avaliado o fungo o *Penicillium oxalicum* CBMAI 1996, frente às reações de biotransformação da progesterona. Esse fungo foi isolado de uma esponja (*Chelonaplysilla erecta*) coleta do litoral norte do estado de São Paulo^[30]. O objetivo de estudar os fungos de ambiente marinho em biotransformações, pois o mar é um dos destinos finais dos esteroides e muitas outras moléculas.

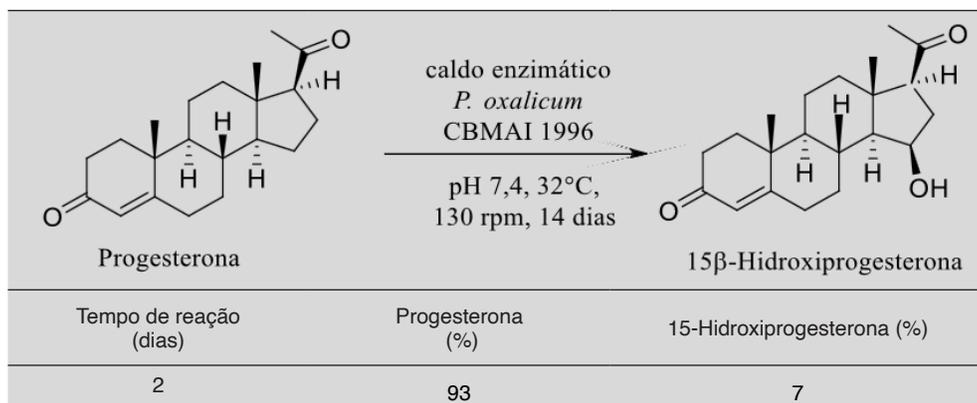
Para realização da reação, primeiramente cultivou-se o fungo *P. oxalicum* CBMAI 1996 em placas de Petri contendo o meio de cultura sólido de extrato de malte esterilizado, por 7 dias à temperatura de 32°C. O meio de cultura foi preparado a partir de uma solução

de água do mar sintética composta de sais [$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,36 g/L), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (9,68 g/L) NaCl (30g/L), NaH_2PO_4 ($1,4 \times 10^{-4}$ g/L), Na_2SO_4 (3,47 g/L), NaHCO_3 (0,17 g/L), KBr (0,10 g/L), $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,04g/L) e do ácido H_3BO_4 (0,03 g/L)]. Além destes componentes, foi adicionado o extrato de malte (20 g/L), agar (20 g/L) e o pH do meio foi ajustado (pH = 7).

Após o crescimento do *P. oxalicum* CBMAI 1996 em meio de cultura sólido, foram inoculados os esporos/micélios transferindo-se 7 discos em meio de cultura líquido esterilizado e o pH foi ajustado para 7,4. Os frascos Erlenmeyer foram tampados com estofos de algodão/gaze e mantidos para o crescimento celular em agitador orbital (7 dias, 130 rpm, 32°C).

Após os 7 dias de crescimento do *P. oxalicum* CBMAI 1996 separou-se, através de uma filtração em funil de Buchner, a massa micelial fúngica do caldo enzimático (produzido durante seu período de crescimento). Para as reações de biotransformação da progesterona adicionou-se 100 mL do caldo fúngico cultivado (filtrado) em um frasco Erlenmeyer de 250 mL e adicionou-se 1 mL de solução de progesterona dissolvida em dimetilsufóxido (50 mg/mL). Enquanto que para as reações com a massa micelial fúngica umidecida adicionou-se 3 g (micélios/esporos) em 100 mL de meio de cultura líquido de extrato de malte recém preparado e e adicionou-se 1 mL de solução de progesterona dissolvida em dimetilsufóxido (50 mg/mL).

Realizou-se o acompanhamento das reações a cada 24 h, coletou-se alíquotas de 2 mL dos meios, adicionou-se 2 mL de acetato de etila em tubos Falcon e agitou-se por 2 minutos em Vórtex. Os tubos Falcon foram levados para centrifuga (6000 rpm, 6 minutos). Coletou-se a fase orgânica, a qual foi filtrada em presença de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4). Transferiu-se 2 mL desta solução para frascos de 2 mL os quais foram injetados e analisados por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM). Através da integração dos picos obtidos nos cromatogramas, pode-se observar a evolução da reação tanto no caldo enzimático (14 dias) quanto com os micélios/esporos (21 dias). Os dados estão apresentados nas Tabelas 2 e 3 e nas Figuras 4 e 5.



4	86	14
5	83	17
6	81	19
7	75	25
8	64	36
9	64	36
10	68	32
11	65	35
12	77	23
13	56	44
14	56	44

Tabela 2. Monitoramento da reação de biotransformação da progesterona pelo caldo enzimático produzido pelo fungo *Penicillium oxalicum* CBMAI 1996 por 14 dias.

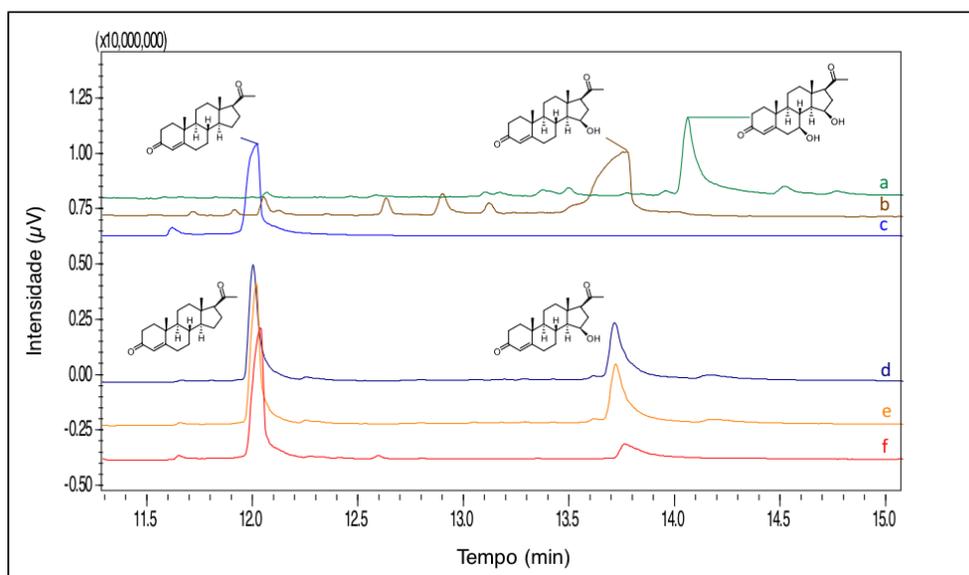


Figura 4. Cromatogramas obtidos a partir das análises por CG-EM (IE, 70 eV) da reação de biotransformação da progesterona pelo caldo enzimático do fungo *P. oxalicum* CBMAI 1996 por 14 dias. (a) Padrão da 7β,15β-di-hidroxiprogesterona. (b) Padrão da 15-hidroxiprogesterona. (c) Padrão da progesterona. (d) Reação em 14 dias. (e) Reação em 8 dias. (f) Reação em 4 dias.

Tempo de reação (dias)	Progesterona (%)	15-Hidroxiprogesterona (%)	7,15-di-Hidroxiprogesterona (%)
2	93	7	0
3	60	38	2
4	16	58	26
5	7	35	58
6	1	23	76
7	1	19	81
8	0	19	81
9	0	12	88
10	0	9	91
11	0	9	91
12	0	9	91
13	0	8	92
14	0	6	94
15	0	6	94
16	0	6	94
17	0	6	94
18	0	6	94
19	0	6	94
20	0	6	94
21	0	7	93

Tabela 3. Monitoramento da reação de biotransformação da progesterona em meio reacional com massa a micelial/espores do fungo *Penicillium oxalicum* CBMAI 1996 por 21 dias.

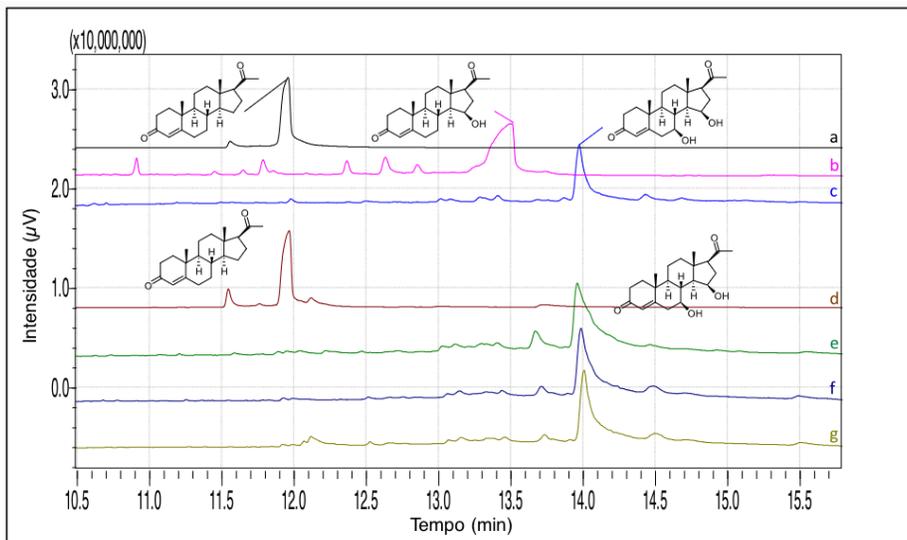


Figura 5. Cromatogramas obtidos a partir das análises por CG-EM (IE, 70 eV) da reação de biotransformação da progesterona em meio reacional com massa micelial do fungo *P. oxalicum* CBMAI 1996 por 21 dias. (a) Padrão da progesterona. (b) Padrão da 15 β -hidroxiprogesterona. (c) Padrão da 7 β ,15 β -di-hidroxiprogesterona. (d) Reação em 1 dia. (e) Reação em 7 dias. (f) Reação em 14 dias. (g) Extrato final/total da reação (21 dias).

A partir dos dados obtidos das reações de biotransformação da progesterona com o *P. oxalicum* CBMAI 1996, observou-se que com caldo enzimático obteve-se majoritariamente o produto mono-hidroxilado (15-hidroxiprogesterona) com conversão de 44% no 13^o dia (Tabela 2, Figura 4). Ao avaliar os dados da reação em meio aos micélios/ esporos, observou-se a formação do composto 15-hidroxiprogesterona no primeiro dia de reação (24 h), com concomitante decaimento do pico (13,7 min) referente a progesterona. O surgimento do pico (14,0 min) referente à formação do composto di-hidroxilado (7,15-dihidroxiprogesterona) ocorreu no 3^o dia e evoluiu de forma crescente até o 14^o dia de reação, a partir do qual se manteve estável até se completar os 21 dias (Tabela 3, Figura 5).

Na reação com os micélios/esporos a concentração relativa do produto mono-hidroxilado atingiu um valor de 58%, a partir do 4^o dia. Porém, após este período passou a decair, constatando que este composto poderia ser um intermediário da reação na formação produto di-hidroxilado. Observou-se ainda que no 8^o dia de reação todo o substrato (progesterona) foi biotransformado pelo *P. oxalicum* CBMAI 1996 (Tabela 3, Figura 5).

Concluiu-se que através deste conjunto de reações que o aumento do tempo de reação em meio micelial/esporos de 14 dias para 21 dias não promoveu uma melhoria no rendimento do produto di-hidroxilado. Constatou-se também que em 4 dias de reação, com o uso da massa micelial fúngica, obteve-se um rendimento relativo de 58% para o composto mono-hidroxilado, ou seja, 15% mais eficiente do que a reação com caldo enzimático, que levou 14 dias para obter uma conversão de 44% (Tabelas 3 e 4, Figuras 4 e 5).

Ao final das reações de biotransformação da progesterona (caldo enzimático e micélios/espores) com o fungo *P. oxalicum* CBMAI 1996 realizaram-se as extrações com acetato de etila (Figura 6). Os extratos finais obtidos foram purificados por cromatografia em coluna cromatográfica, cuja fase estacionária foi composta de sílica gel de porosidade de 230-400 mesh. A fase móvel se iniciou com uma mistura de hexano e acetato de etila (7:1), que com o decorrer da eluição dos compostos foi sendo enriquecida na composição de acetato de etila até ser composta de 100%.

O processo de purificação por cromatografia em coluna foi monitorado por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando cromatofolhas em alumínio (TLC Sílica Gel 60 F₂₅₄ Merck) a fim de se verificar os possíveis grupos de frações semelhantes que continham os compostos de biotransformação para serem reunidos. Uma vez determinados estes grupos de frações por CCD, foram analisadas por CG-EM e as frações obtidas com os produtos 7 β ,15 β -di-hidroxiprogesterona e 15 β -hidroxiprogesterona foram pesadas e os rendimentos foram determinados. As amostras foram dissolvidas em clorofórmio deuterado (CDCl₃) e analisadas por RMN de ¹H (400 MHz) e RMN de ¹³C (100 MHz) (Tabelas 4 e 5, Figuras 7 e 8).

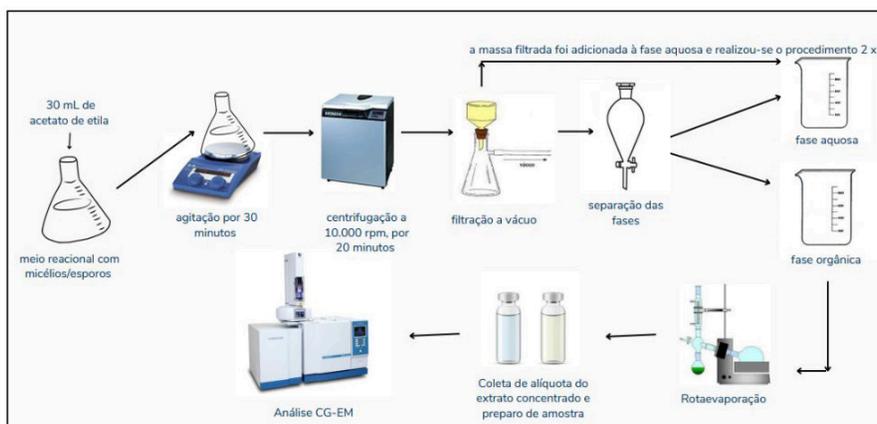


Figura 6. Etapas do processo de extração dos compostos hidroxilados nas reações de biotransformação da progesterona com o fungo *Penicillium oxalicum* CBMAI 1996.

Fonte: Lígia Breda e Vasconcelos.

2.1 Caracterização dos produtos de biotransformação da progesterona

Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C dos produtos isolados foram interpretados e comparados com os espectros da progesterona. Observou-se, a presença coincidente de todos os picos característicos dos carbonos da progesterona, exceto àqueles referentes aos carbonos onde ocorreu(ram) a(s) hidroxilação (ões), que apresentaram valores com descolamentos químicos específicos devidos às inserções dos grupos hidroxilas (Figuras 7 e 8).

Os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos C-7 e C-15 na progesterona foram de 32,0 ppm e 24,4 ppm, respectivamente. O valor de deslocamento químico do carbono C-7 para o produto di-hidroxilado foi de 74,3 ppm. Enquanto para o carbono C-15 foi de 70,2 ppm e 71,6 ppm, para os produtos mono-hidroxilado e di-hidroxilado, respectivamente (Tabelas 4 e 5).

A caracterização espectral completa dos compostos mono-hidroxilado e di-hidroxilado por Ressonância Magnética Nuclear, Infravermelho e Espectrometria de Massas encontram-se na literatura^{[21],[23],[29]}.

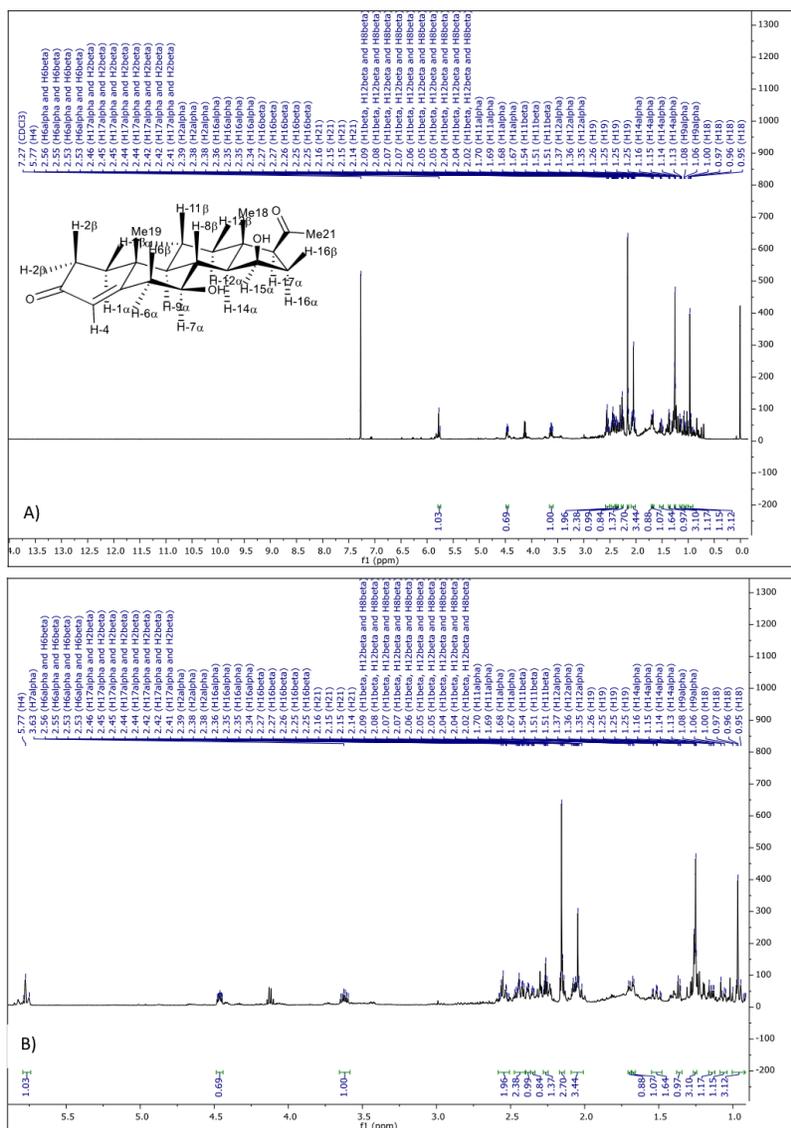


Figura 7. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) e suas ampliações da $7\beta,15\beta$ -di-hidroprogesterona. (a) Espectro completo. (b) Ampliação na região entre 0,92 – 5,94 ppm.

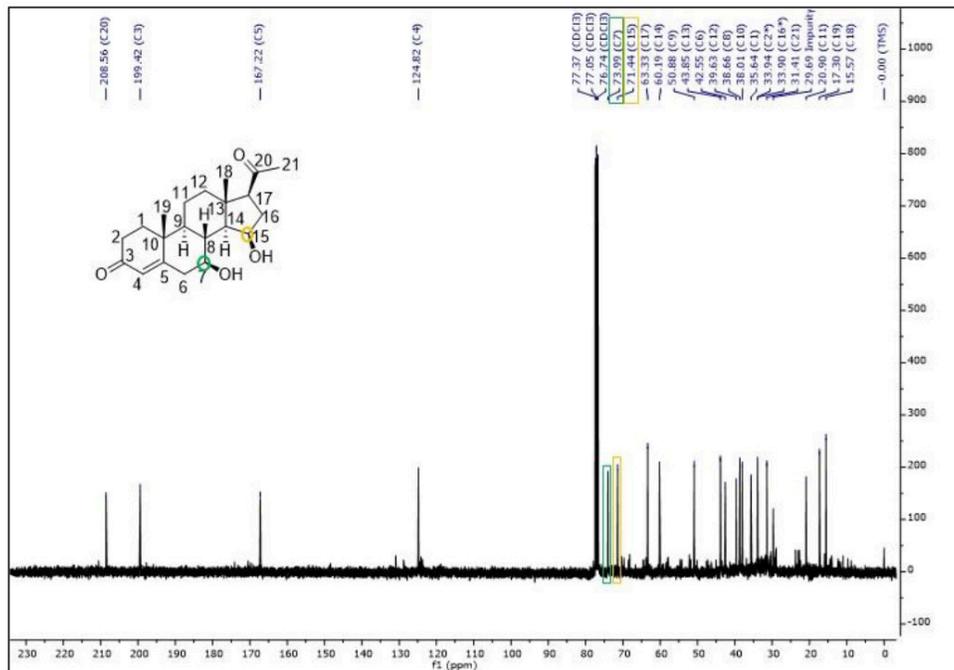


Figura 8. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da 7 β ,15 β -di-hidroprogesterona.

Numeração do carbono segundo IUPAC/IUBMB	δ_{H} da Progesterona (ppm)	δ_{H} 15 β -Hidroprogesterona (ppm)	δ_{H} 7 β ,15 β -di-Hidroprogesterona (ppm)
1 α	1,71 (m)	1,74 (dd; 4,8, 13,2)	1,68 (d; 4,1)
1 β	2,03 (dd; 3,3, 5,1)	2,05 (m)	2,04 (m)
2 α	2,33 (m)	2,33 (m)	2,41 (m)
2 β	2,45 (m)	2,41 (dd; 4,9)	2,44 (m)
4	5,76 (s)	5,75 (s)	5,77 (m)
6 α	2,32 (ddd; 4,1, 5,5, 14,7)	2,38 (m)	2,55 (m)
6 β	2,40 (m)	2,49 (m)	2,55 (m)
7 α	1,08 (ddd; 1,2, 4,4, 12,7)	1,14 (dd; 4,0, 13,5)	3,63 (ddd; 6,6, 9,7 9,7)
7 β	1,85 (m)	2,15 (m)	-
8 β	1,55 (ddd; 3,8, 8,3 10,8)	2,05 (m)	2,02 (m)
9 α	0,99 (m)	1,05 (m)	1,06 (m)
11 α	11,63 (m)	1,64 (m)	1,70 (m)
11 β	11,44 (m)	1,52 (m)	1,59 (m)
12 α	1,48 (m)	1,47 (m)	1,40 (m)
12 β	2,07 (m)	2,05 (m)	2,04 (m)
14 α	1,14 (m)	1,05 (m)	1,14 (dd; 5,6, 10,8)
15 α	1,71 (m)	4,32 (ddd; 3,1, 6,0, 6,1)	4,47 (m)

15 β	1,28 (m)	-	-
16 α	1,68 (m)	2,26 (m)	2,34 (m)
16 β	2,18 (m)	2,26 (m)	2,27 (m)
17 α	2,54 (t; 8,6)	2,49 (m)	2,44 (m)
18	0,67 (s)	0,94 (s)	0,97 (m)
19	1,19 (s)	1,22 (m)	1,25 (m)
21	2,13 (s)	2,15 (m)	2,14 (s)

* As multiplicidades dos sinais foram descritas como: “s” para singlete; “t” para triplete; “dd” para duplo-dublete; “ddd” para duplo-duplo-dublete; “m” para multiplete. Os valores dispostos após a indicação da multiplicidade referem-se às constantes de acoplamento em Hz.

Tabela 4. Dados de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da progesterona, da 15 β -hidroxiprogesterona e da 7 β ,15 β -di-hidroxiprogesterona.

Numeração do carbono segundo IUPAC/IUBMB	δ_c da Progesterona (ppm)	δ_c 15 β -Hidroxiprogesterona (ppm)	δ_c 7 β ,15 β -di-Hidroxiprogesterona (ppm)
1	35,6	35,7	35,7
2	34,0	33,9	33,9
3	199,4	199,4	199,1
4	123,9	123,9	125,0
5	170,9	170,9	166,5
6	32,8	32,7	42,6
7	32,0	31,1	74,3
8	35,6	31,7	38,6
9	53,7	54,0	50,9
10	38,7	38,7	38,0
11	21,0	20,9	20,8
12	28,6	40,12	39,6
13	43,9	43,6	43,9
14	56,0	60,3	60,1
15	24,4	70,2	71,6
16	22,9	36,2	34,2
17	63,5	63,7	63,3
18	13,3	15,9	15,6
19	17,4	17,3	17,3
20	209,3	208,1	208,3
21	31,5	31,3	31,4

Tabela 5. Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da progesterona, da 15 β -hidroxiprogesterona e da 7 β ,15 β -di-hidroxiprogesterona.

Ao final desse processo, obteve-se cristais dos produtos isolados das respectivas frações, os quais foram submetidos para as análises de Raios-X em colaboração com o Prof. Dr. Javier Alcides Ellena (IFSC-USP), coordenador do Laboratório Multiusuário de Cristalografia Estrutural (LaMuCrEs) que integra o Grupo de Cristalografia do Instituto de Física de São Carlos (IFSC). Os dados inéditos de cristalografia de Raios-X para os compostos 15 β -hidroxiprogesterona e 7 β ,15 β -di-hidroxiprogesterona serão publicados em um periódico específico.

As enzimas envolvidas nas reações de hidroxilação da progesterona nos carbonos C-7 e C-15, não são totalmente elucidadas na literatura. Em geral, trata-se de hidroxilação enzimática de carbonos não ativados eletronicamente nos esteroides. As enzimas envolvidas são monoxigenases do citocromo P-450, como a esteroide 15 β -monoxigenase EC 1.14.15.8, que produz a 15 β -hidroxiprogesterona^[21].

2.2 Avaliação da lipofilicidade e ecotoxicidade da 15 β -hidroxiprogesterona e da 7 β ,15 β -di-hidroxiprogesterona

O efeito de um composto químico sobre um determinado organismo pode ser agudo, quando sua dose letal é liberada em um único evento e rapidamente absorvida, ou crônico, quando o composto é liberado em eventos periodicamente sucessivos, em doses subletais, durante um determinado período de tempo^[31].

A toxicidade de compostos é avaliada a partir das taxas de mortalidade, de imobilização ou de inibição de crescimento, dos indivíduos a eles expostos^[32]. Enquanto a ecotoxicidade avalia os efeitos que os compostos químicos apresentam sobre um ecossistema, considerando suas interações entre os indivíduos, as comunidades e as populações, inclusive ao homem. Compreende-se, dessa forma, como a molécula estudada (matéria e energia) interage com toda a cadeia trófica que coexiste no ambiente em que se encontra.

A partir das ferramentas computacionais do *site* “Chemicalize”^[33], estimou-se o logaritmo do coeficiente de partição octanol/água ($\log K_{ow}$) da progesterona e dos produtos de biotransformação obtidos nesse estudo (15 β -hidroxiprogesterona e 7 β ,15 β -di-hidroxiprogesterona). Esse coeficiente refere-se à razão entre a afinidade que um composto apresenta entre um meio orgânico e o meio aquoso. Quanto maior este valor, maior é a afinidade de uma molécula pelo octanol (composto apolar) e, conseqüentemente, mais lipofílica e bioacumulativa é o composto. Pela análise dos dados obtidos, pode-se concluir que a biotransformação promoveu uma diminuição da lipofilicidade. Os produtos mono-hidroxilado e di-hidroxilado foram aproximadamente 20 e 420 vezes menos lipofílicos, respectivamente, do que a progesterona (Tabela 6).

Composto	log K_{ow}
Progesterona	4,15
15 β -Hidroxiprogesterona	2,84
7 β ,15 β -Hidroxiprogesterona	1,53

Tabela 6. Dados de log de K_{ow} da progesterona e de seus produtos de biotransformação com o fungo *Penicillium oxalicum* CBMAI 1996^[32].

Chemaxon. Chemicalize. “Disponível em: <https://chemicalize.com/app/calculation>”. “Acesso em: 07/06/2023.”

Com o auxílio do Programa ECOSAR 2.0 (*Ecological Structure Activity Relationships*) da EPA (*United States - Environmental Protection Agency*; Em português - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos), foram realizadas simulações da ecotoxicidade dos compostos mono-hidroxilado e di-hidroxilado (Figura 9)^[34]. O programa gera dados baseando-se no efeito causado em uma cadeia trófica, a partir de algas verdes (produtores) dafinídeos (espécie de crustáceos pequenos, consumidores primários) peixes (consumidores secundários).

Primeiramente, obtiveram-se os valores dos efeitos agudos: EC_{50} (em $mg L^{-1}$), a concentração do composto capaz de gerar efeitos tóxicos a 50% dos indivíduos testados (algas verdes) e LC_{50} (em $mg L^{-1}$), a concentração letal para 50% dos indivíduos testados (dafinídeos e peixes). Em seguida, obtiveram-se os ChV, ou seja, as concentrações dos compostos capazes de causar efeitos crônicos estatisticamente significativos^[35].

Pôde-se inferir com a simulação, que a biotransformação da progesterona promoveu uma diminuição do seu efeito ecotóxico (Figura 9). A 15 β -hidroxiprogesterona e a 7 β ,15 β -hidroxiprogesterona foram, aproximadamente, 10 e 100 vezes menos ecotóxicos (ecotoxicidade aguda), respectivamente, do que a progesterona. Em relação à ecotoxicidade crônica, observou-se, aproximadamente, o mesmo cenário. Como esperado, as concentrações estimadas que causam efeitos crônicos foram bem menores do que as necessárias para causar os efeitos agudos.

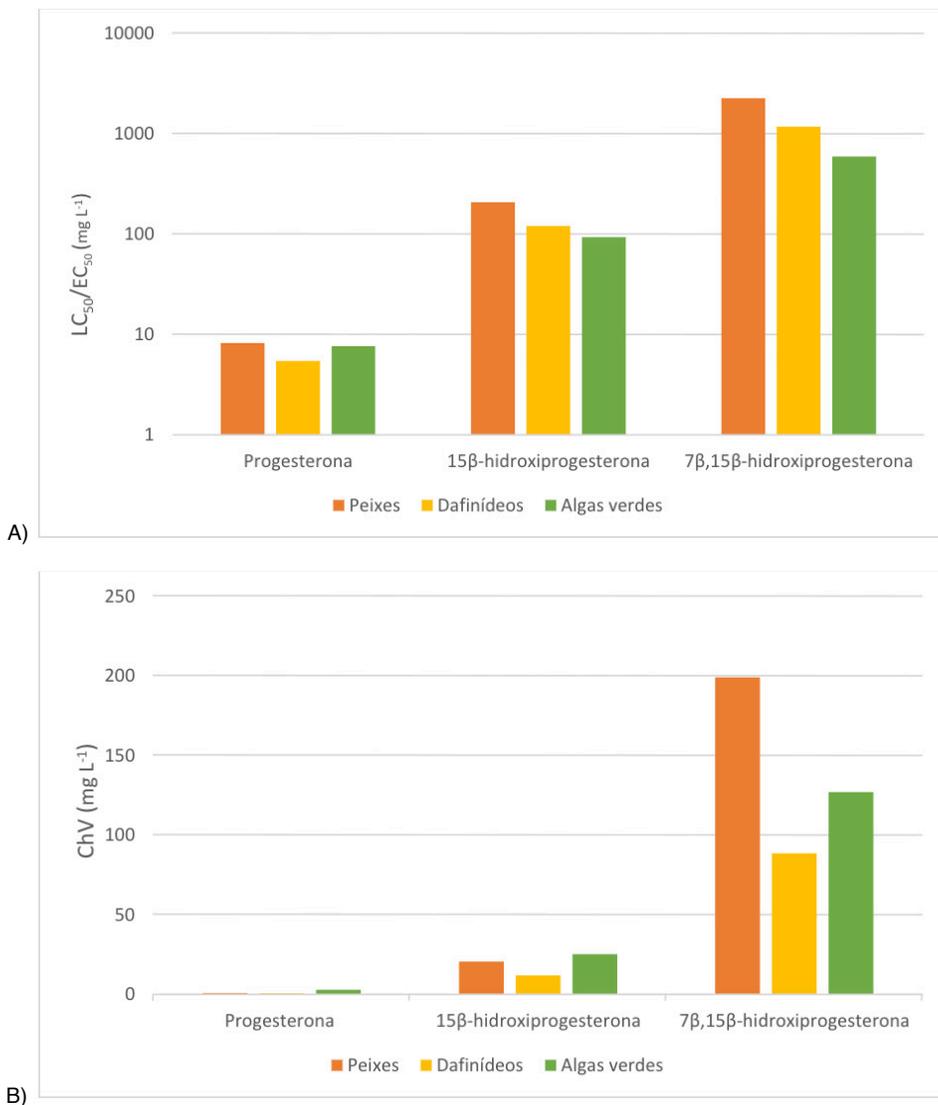


Figura 9. Simulação de ecotoxicidade da progesterona e seus produtos de biotransformação pelo programa ECOSAR 2.0. (A) Ecotoxicidade aguda. (B) Ecotoxicidade crônica.

3 | CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Pequenas mudanças em moléculas com uma atividade biológica intensa, como os esteroides, podem promover diversos resultados. As progestinas, derivadas da progesterona, são muito mais utilizadas em fármacos que a própria progesterona, devido ao aumento de sua biodisponibilidade e a forma como interagem com os receptores nos organismos. Dessa forma, os estudos de biotransformação podem levar a obtenção de moléculas com novas propriedades biológicas.

O emprego de fungos em reações de biotransformação, como o *P. oxalicum* CBMAI 1996 foi promissor em nossos estudos frente ao esteroide progesterona. Tratam-se de reações altamente específicas e seletivas, pois são catalisadas por enzimas e que apresentam um amplo potencial biotecnológico, uma vez que funcionalizaram carbonos não reativos eletronicamente (hidridação sp³).

Vale ressaltar que as reações de biotransformação, na maioria das vezes, ocorrem à temperatura ambiente e em meio aquoso. Com isso o estudo da reação de biotransformação se mostra como potencial para a Química Verde e para a obtenção de novos compostos de difícil obtenção por vias químicas sintéticas.

A partir destes estudos sugere-se que a progesterona pode continuar sendo biotransformada no meio ambiente, formando derivados hidroxilados. Assim, o fungo *P. oxalicum* CBMAI 1996 está sendo capaz de metabolizar a progesterona em derivados com menor potencial de bioacumulação e com menores efeitos tóxicos ao ecossistema.

A atividade biológica dos derivados de biotransformação obtidos neste estudo será avaliada em trabalhos futuros. E, as análises de raios-X, dos produtos de biotransformação foram obtidos, confirmando inequivocamente suas estruturas, bem como a estereoquímica absoluta dos centros estereogênicos formados, cujos dados serão publicados na literatura científica.

AGRADECIMENTOS

LBV agradece à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Proc. N0. 2021/13179-5) pela bolsa de Iniciação Científica, período de 01/01/2022 a 30/06/2023.

SFP agradece à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Finance Code 001, Proc.133633/2014-4).

ALMP agradece ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Proc. 301987/2013-0) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP/Proc. 2016/20155-7) pelo financiamento da pesquisa e bolsa de estudos.

Os autores agradecem ao Professor Eduardo A. Bessa (IQSC) pelos cálculos dos estudos de ecotoxicidade e ao Professor Roberto G. S. Berlink pela doação da linhagem fúngica de *P. oxalicum* CBMAI 1996.

REFERÊNCIAS

[1] ARAUJO, A. B. R, *et. al.* ANTICONCEPCIONAIS HORMONAIS CONTENDO APENAS PROGESTÁGENOS E SEUS PRINCIPAIS EFEITOS. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, Belo Horizonte – Minas Gerais, Brasil, vol. 15, No. 1, 75-81, Agosto de 2016.

- [2] GARCÍA, J. L., *et. al.* Biotransformación de esteroides con diferentes microorganismos. **Revista Mexicana de Ciências Farmacêuticas**. Delegación Iztapalapa, México, vol. 46, 1, 17-32, abril de 2015.
- [3] ORIZABA-CHÁVEZ, B; *et. al.* Farmacocinética de la progesterona. **Revista Hospital Juarez México**, México, vol. 60, No. 1, 59-66, 2013.
- [4] CAVICHIOLI, C; *et. al.* EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE PROGESTERONA PÓS INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO NA TAXA DE GESTAÇÃO EM VACAS DA RAÇA NELORE. **VIII Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica**, Maringá, Paraná, Brazil, 2016.
- [5] BATISTA, C. S. Progesterona e progestágenos: síntese, classificação e uso. **Feminina**, vol. 32, No. 8, 639-644, setembro de 2004.
- [6] WATKINS, J. B., KLAASSEN, C. D. Induction of UDP-glucuronosyltransferase activities in guinea, heterozygous, and wistar rat livers by pregnenolone-6 α -carbonitrile. **Drug Metabolism and Disposition**, The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, United States, vol. 10, No. 6, 590-595, 1982.
- [7] REGIDOR, P. A. The clinical relevance of progestogens in hormonal contraception: present status and future developments. **Oncotarget**, Ismaning, Germany, vol. 9, No. 77, 34628-34638, 2018.
- [8] LIU, J. H. What providers need to know about progestogens in hormone therapy. **The Journal of The North American Menopause Society**, Cleveland, Estados Unidos, vol. 28, No. 3, 325-326, 2020.
- [9] **The 2022 hormone therapy position statement of The North American Menopause Society**. The Journal of The North American Menopause Society, United States, vol. 29, No. 7, 767-794, 2022.
- [10] HERMANN, A.; *et. al.* Efeito na saúde humana causados pela exposição a 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol. Em: ARMAS, R. D. e SAFI, D. C. **Atuação do Biomédico e Nutricionista na Atenção Integral à Saúde**. Epitaya E-Books, cap.11, vol. 1, No. 27, 150-162, 2023.
- [11] TARABORRELL, S. Physiology, production and action of progesterone. **ACTA Obstetricia et Gynecologica**, Bologna, Itália, vol. 94, 8-16, 2015.
- [12] BRANDT, G. P.; DE OLIVEIRA, A. P. R.; BURCI, L. M. Anticoncepcionais hormonais na atualidade: um novo paradigma para o planejamento familiar. **Revista Gestão & Saúde**, Rio Grande do Sul, vol. 18, No. 1, p. 54-62, 2018.
- [13] NETO, O. P. P. **Avaliação do efeito dos desreguladores endócrinos 17 β estradiol e 17 α -etinilestradiol no desenvolvimento da tilápia do Nilo (*Piscis*)**. Tese para obtenção do título de doutor em Engenharia Civil, área de saneamento ambiental. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil, 2020.
- [14] NAZ, R. *et. al.* Assessment of phytoremediation potential of native plant species naturally growing in a heavy metal-polluted industrial soils. **Brazilian Journal of Biology**. Pasqu Coast, vol. 84, 2022.
- [15] ACS, A.; *et. al.* Chronic effects of carbamazepine, progesterone and their mixtures at environmentally relevant concentrations on biochemical markers of zebrafish (*Danio rerio*). **Antioxidants**, Péter Károly, Hungria, vol. 11, No. 1776, 2022.

- [16] YING, G.; KOOKANA, R. S.; RU, Y. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. **Environment International**, vol. 28, p. 545-551, 2002.
- [17] BAIRD, C.; CANN, M. Pesticides. In: **Environmental Chemistry**. New York - USA, W. H. Freeman and Company, v. 1, cap. 10, p. 415-468, ed.4, 2000.
- [18] DA CÂMARA, A. G. **Avaliação da degradação de princípio ativo de anticoncepcional feminino via persulfato de sódio ativado por UV**. 2016. Trabalho de conclusão de curso para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química (Bacharelado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Departamento de Engenharia Química, Rio Grande do Sul, 2016.
- [19] SEBEN, D. Avaliação de variáveis de qualidade de água e contaminantes ambientais emergentes em águas de consumo humano no Rio Grande do Sul. Dissertação para obtenção do título de Mestre na área de ciência e tecnologia ambiental. Universidade Federal de Santa Maria, Frederico Westpha, Rio Grande do Sul, Brasil, 2020.
- [20] PARSHIKOV, I. A.; *et. al.* Biotransformation of steroids and flavonoids by cultures of *Aspergillus niger*. **Biochemistry and Biotechnology**, Nova York, United States, vol. 176, 903-923, 2015.
- [21] DE PAULA, S. F. C. **Estudo da ocorrência de reações de bio-oxidação dos esteroides progesterona e 17(alfa)-etinil estradiol por fungos de ambiente marinho**. Dissertação para obtenção de título de Mestre em Ciências (Mestre em Química) - Instituto de Química da São Carlos - USP, São Carlos, 2016.
- [22] LENARDÃO, E. J. *et al.* "Green Chemistry" – Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, vol. 26, p. 123-129, 2003.
- [23] DE PAULA, S. F. C.; PORTO, A. L. M. Cascade reactions of progesterone by mycelia and culture broth from marine - derived fungus *Aspergillus sydowii* CBMAI 935. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, São Carlos – SP, vol. 25, 2020.
- [24] SAVINOVA, O. S.; *et. al.* Biotransformation of progesterone by the *Ascomycete Aspergillus niger* N402. **Biochemistry**, Moscow, vol. 83, No. 1, 26-31, 2018.
- [25] HOSSEINABADI, T.; *et. al.* Biotransformation of progesterone by whole cells of filamentous fungi *Aspergillus brasiliensis*. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, Iran, vol. 14, No. 3, 919-924, 2015.
- [26] SUI, L.; *et. al.* Functional reconstitution of a steroidal hydroxylase from the fungus *Thanatephorus cucumeris* in *Mycolicibacterium neoaurum* for 15 α -hydroxylation of progesterone. **Biochemical Engineering Journal**, China, vol. 193, 2023.
- [27] DOS SANTOS, H. P., *et. al.* Oxidative potential of two Brazilian endophytic fungi from *Handroanthus impetiginosus* towards progesterone. **Steroids**, Salvador, Brasil, vol. 187, 2022.
- [28] HU, X.; *et. al.* Fate of progesterone and norgestrel in anaerobic/anoxic/oxic (A/A/O) process: Insights from biotransformation and mass flow. **Science of the Total Environment**, Jiangsu, China, vol. 856, 2022.

- [29] QUEIROZ, T. M. **Biotransformação de esteroides por fungos de ambiente marinho e semi-síntese da 'beta'-ceto-1,2,3-triazóis derivados de etinilestradiol**. Tese (Doutorado em Química Orgânica e Biológica) – Instituto de Química de São Carlos/Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil, 2022.
- [30] DE PAULA, S. F. C.; ROSSET, I. G.; PORTO, A. L. M. Hydroxylated steroids in C-7 and C-15 positions from progesterone bio-oxidation by the marine-derived fungus *Penicillium oxalicum* CBMAI 1996. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, São Carlos – SP, Brasil, vol. 37, 2021.
- [31] SCHVARTSMAN, S. Intoxicações agudas. No. 4, 355p. São Paulo: Sarvier, 1991.
- [32] DOS SANTOS, P. R. **Aplicação de processos oxidativos e eletroquímicos avançados e avaliação de uma planta efotoeletroquímica solar no tratamento de água cinza**. Tese para obtenção do título de Doutor em Química, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brasil, 2023.
- [33] Chemaxon. Chemicalize. “Disponível em: <https://chemicalize.com/app/calculation>”. “Acesso em: 07/06/2023.”
- [34] LABRIOLA, V, F. *et. al.* Nutrifurantoin removal by the photo-Fenton process: Degradation, mineralization, and biological inactivation. **Environmental Technology**, São Carlos – SP, Brasil, 2023.
- [35] WRIGHT, R. T. *et. al.* **Operation manual... for the Ecological Structure-Activity Relationship Model (ECOSAR) Class Program**. MS-Windows Version 2.2. Washington, United States, 2022.