



# **BIOTRANSFORMAÇÃO DE FITOESTERÓIS EM ANDROSTENEDIONA – UM ESTUDO DE PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA**

Nathália de Castro Vanzellotti

Victor Oliveira Nunes

## **Projeto Final de Curso**

### **Orientadores:**

Prof. Tatiana Felix Ferreira, *DSc*

Prof. Priscilla Filomena Fonseca Amaral, *DSc*

**Dezembro de 2020**

# **BIOTRANSFORMAÇÃO DE FITOESTERÓIS EM ANDROSTENEDIONA – UM ESTUDO DE PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA**

*Nathália de Castro Vanzellotti*

*Victor Oliveira Nunes*

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Química.

Aprovado por:

---

Ivaldo Itabaiana Jr., DSc

---

Aline Souza Tavares, MSc

---

Suzana Borschiver, DSc

Orientado por:

---

Tatiana Félix Ferreira, DSc

---

Priscilla Filomena Fonseca Amaral, DSc

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Dezembro de 2020

Vanzellotti, Nathália de Castro. Nunes, Victor Oliveira.

Biotransformação de Fitoesteróis em Androstenediona – Um Estudo de Prospecção Tecnológica / Nathália de Castro Vanzellotti. Victor Oliveira Nunes. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2020.

xi, 75 p.; il.

Monografia – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2020.

Orientadores: Tatiana Felix Ferreira e Priscilla Filomena Fonseca Amaral.

1. 4-Androstenediona. 2. Fitoesterol. 3. Biossíntese. 4. Monografia. (Graduação – UFRJ/EQ). 5. Tatiana Felix Ferreira e Priscilla Filomena Fonseca Amaral.

I. Biotransformação de Fitoesteróis em Androstenediona – Um Estudo de Prospecção Tecnológica.

Aos nossos pais, por todo carinho e dedicação.

*Nada te perturbe, nada te amedronte.  
Tudo passa, a paciência tudo alcança.  
A quem tem Deus nada falta.  
Só Deus basta!*

Santa Teresa D'Ávila

Resumo do Projeto de Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Química.

## **BIOTRANSFORMAÇÃO DE FITOSTERÓIS EM ANDROSTENEDIONA – UM ESTUDO DE PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA**

Nathália de Castro Vanzellotti  
Victor Oliveira Nunes

Dezembro, 2020.

Orientadores: Prof. Tatiana Felix Ferreira, DSc.  
Prof. Priscilla Fonseca Amaral, DSc

Androstenediona é um intermediário chave do metabolismo de esteroides. Pertence à família de esteroides 17-keto e é um precursor na produção de diversos esteroides como testosterona, estradiol, etinilestradiol, testolactona, progesterona, cortisona, cortisol, prednisona e prednisolona. AD possui propriedades estruturais e farmacológicas semelhantes à testosterona, sendo considerado um esteroide anabólico. Durante muito tempo, AD foi o material de partida para síntese de drogas androgênicas e anabólicas e recentemente, para a produção de espironolactona. O tamanho do mercado mundial de AD e ADD excede 1000 toneladas por ano e por este motivo, a indústria farmacêutica vem buscando matérias-primas mais novas e baratas que contenham esteróis naturais para a produção de compostos esteroides. Seguindo essa tendência, esse estudo tem como objetivo realizar uma prospecção tecnológica da biossíntese de androstenediona a partir de fitoesterol através do mapeamento de artigos científicos e de solicitações e concessões de patentes. Utilizou-se a base de dados SCOPUS para busca de artigos e o banco de dados USPTO para busca de patentes. Foi possível observar uma grande variedade de artigos e patentes publicadas envolvendo androstenediona e fitoesterol, indicando a relevância da temática do trabalho. Os documentos estudados revelam diferentes metodologias para a biossíntese de androstenediona utilizando microrganismos mutantes, em sua maior parte, do gênero *Mycobacterium*, com discussões relacionadas à otimização para aumento do rendimento de 4-AD. Observou-se ainda que são citadas diversas aplicações da molécula, por exemplo, como intermediário na produção de outros esteróides, além de sua importância na elaboração de compostos farmacêuticos para o tratamento de distúrbios hormonais. De maneira geral, os resultados obtidos no presente estudo de prospecção tecnológica foram fundamentais para mapear as possibilidades de otimização dos processos de biossíntese de 4-AD já existentes, assim como identificar tecnologias e metodologias emergentes neste cenário.

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	1
2.	OBJETIVO.....	3
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1.	Hormônios Esteroides .....	4
3.1.1	4-Androstenediona .....	6
3.1.1.1.	Aplicações de Androstenediona .....	8
3.2.	Síntese de Androstenediona.....	9
3.2.1.	Insumos para síntese de androstenediona.....	9
3.2.1.1.	Fitoesterol .....	12
3.2.2.	Rota química.....	13
3.2.3.	Rota bioquímica.....	14
4.	PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA.....	19
4.1.	A prospecção tecnológica e sua importância.....	19
4.2.	Análise de cenários .....	20
4.3.	Entrevistas com especialistas.....	20
4.4.	Análise SWOT.....	21
4.5.	<i>Brainstorming</i> .....	22
4.6.	Metodologia <i>Delphi</i> .....	23
4.7.	A análise de artigos científicos e patentes como ferramentas no estudo de prospecção tecnológica .....	24
5.	METODOLOGIA DE PESQUISA .....	26
5.1.	Estratégias de busca de artigos científicos .....	26
5.2.	Estratégias de busca de patentes .....	29
6.	RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	31
6.1.	Artigos Científicos.....	31
6.1.1.	Análise Macro dos Artigos Publicados .....	31
6.1.2.	Análise Meso dos Artigos Publicados .....	37
6.1.3.	Análise Micro dos Artigos Publicados .....	40
6.1.3.1.	Tecnologias/Rotas .....	40
6.1.3.2.	Aprimoramento.....	43
6.2.	Patentes.....	45
6.2.1.	Patentes Concedidas .....	46
6.2.1.1.	Análise Macro das Patentes Concedidas .....	46
6.2.1.2.	Análise Meso das Patentes Concedidas.....	50

6.2.1.3.	Análise Micro das Patentes Concedidas .....	52
6.2.1.3.1.	Microrganismos .....	52
6.2.1.3.2.	Substratos .....	54
6.2.1.3.3.	Condições de Processo .....	55
6.2.1.3.4.	Etapas de Identificação de 4-AD .....	56
6.2.2.	Patentes Solicitadas .....	58
6.2.2.1.	Análise Macro das Patentes Solicitadas .....	58
6.2.2.2.	Análise Meso das Patentes Solicitadas .....	60
6.2.2.3.	Análise Micro das Patentes Solicitadas .....	63
6.2.2.3.1.	Microrganismos .....	63
6.2.2.3.2.	Substratos .....	64
6.2.2.3.3.	Condições de Processo .....	64
6.2.2.3.4.	Etapas de Identificação de 4-AD .....	64
7.	CONCLUSÕES .....	65
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	67



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Núcleo esteroide.....	4
Figura 2: Esquema da esteroidogênese adrenal.....	6
Figura 3: Fórmula estrutural da androstenediona (4-AD). ....	7
Figura 4: Estruturas das sapogeninas: (A) hecogenina, (B) diosgenina e (C) solasodina .....	10
Figura 5: Estruturas químicas de esteróis e etanóis comparadas ao colesterol. ....	13
Figura 6: Matriz de Forças, Oportunidades, Fraquezas e Ameaças. ....	22
Figura 7: Visão geral da Metodologia Delphi. ....	24
Figura 8: Fluxograma das etapas da metodologia selecionada. ....	25
Figura 9: Evolução temporal de artigos científicos publicados que abordam a biossíntese de androstenediona. ....	32
Figura 10: Países com artigos científicos publicados entre os anos 2000 e 2020 que abordam a biossíntese de androstenediona. ....	33
Figura 11: Parcerias mais recorrentes entre países que publicaram artigos científicos que abordam a biossíntese de androstenediona. ....	35
Figura 12: Origem dos artigos científicos publicados que abordam a biossíntese de androstenediona. ....	36
Figura 13: Distribuição dos artigos científicos publicados que abordam a biossíntese de androstenediona de acordo com as taxonomias definidas. ....	38
Figura 14: Evolução temporal dos artigos científicos publicados que abordam a biossíntese de androstenediona, segundo as taxonomias definidas na classificação Meso. .....	40
Figura 15: Distribuição dos artigos científicos publicados que abordam a biossíntese de androstenediona utilizando fitoesteróis como substrato, classificados com a taxonomia “Tecnologias/Rotas”. ....	41
Figura 16: Distribuição dos artigos científicos publicados que abordam a biossíntese de androstenediona utilizando fitoesteróis como substrato, classificados com a taxonomia “Aprimoramento”. ....	43
Figura 17: Evolução temporal do número de patentes concedidas que abordam a biossíntese de androstenediona, concedidas entre 1976 e março de 2020. ....	47
Figura 18: Distribuição dos países com patentes concedidas que abordam a biossíntese de androstenediona. ....	49
Figura 19: Distribuição das patentes concedidas que abordam a biossíntese de androstenediona, de acordo com suas taxonomias definidas na classificação Meso. ....	50
Figura 20: Evolução temporal das patentes concedidas que abordam a biossíntese de androstenediona, segundo as taxonomias definidas na classificação Meso. ....	52
Figura 21: Distribuição das patentes concedidas que abordam a biossíntese de androstenediona, classificadas com a taxonomia Micro “Microrganismos”. ....	53
Figura 22: Distribuição das patentes concedidas que abordam a biossíntese de androstenediona, classificadas com a taxonomia Micro “Substratos”. ....	54
Figura 23: Evolução temporal do número de patentes solicitadas que abordam a biossíntese de androstenediona, entre 2001 e março de 2020. ....	58
Figura 24: Distribuição dos documentos solicitados que abordam a biossíntese de androstenediona, de acordo com suas taxonomias Meso. ....	61

Figura 25: Evolução temporal das patentes solicitadas que abordam a biossíntese de androstenediona, segundo as taxonomias definidas na classificação Meso. .... 63

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades físico-químicas da substância androstenediona. ....	7
Tabela 2: Diferentes substratos e biocatalisadores utilizados na produção de 4-AD e ADD por clivagem da cadeia lateral.....	11
Tabela 3: Estratégias utilizadas por alguns autores a fim de otimizar o processo de biotransformação de fitoesterol em AD e ADD. ....	17
Tabela 4: Principais players do mercado global de androstenediona. ....	18
Tabela 5: Combinações de palavras-chave utilizadas na busca de artigos científicos realizada na base de dados SCOPUS.....	27
Tabela 6: Combinações de palavras-chave da busca de patentes na base de dados USPTO. ....	29
Tabela 7: Combinações de palavras-chave utilizadas na busca de artigos científicos na base de dados SCOPUS após refinamento da busca. ....	31
Tabela 8: “Outros” países com artigos científicos publicados entre 2000 e 2020 que abordam a biossíntese de androstenediona. ....	34
Tabela 9: Artigos científicos publicados por empresas de 2000 a 2020, que abordam a biossíntese de androstenediona.....	36
Tabela 10: Universidades com três ou mais artigos científicos publicados de 2000 a 2020, que abordam a biossíntese de androstenediona. ....	37
Tabela 11: Combinações de palavras-chave utilizadas na busca de patentes realizada na base de dados USPTO após o refinamento das buscas.....	46
Tabela 12: Principais empresas com patentes concedidas que abordam a biossíntese de androstenediona. ....	49
Tabela 13: Patentes concedidas que abordam a biossíntese de androstenediona divididas por Microrganismo e Substrato utilizados, classificadas com a taxonomia Micro “Condições de Processo”.....	55
Tabela 14: Etapas dos métodos de identificação de 4-AD nos processos que utilizaram sitosterol, campesterol, colesterol e estigmasterol como substratos.....	57
Tabela 15: Etapas dos métodos de identificação de 4-AD no processo que utilizou o complexo ciclodextrina-colesterol como substrato. ....	57
Tabela 16: Instituições com patentes solicitadas que abordam a biossíntese de androstenediona. ....	60
Tabela 17: Rendimentos de 4-AD/ADD variando o substrato e o microrganismo selecionado na patente solicitada 20040152153.....	64

# 1. INTRODUÇÃO

Hormônios esteroides são substâncias químicas produzidas pelo corpo humano extremamente importantes na regulação de uma variedade de processos fisiológicos normais, incluindo metabolismo, desenvolvimento e reprodução (WARD e REIGEL, 2013). O intermediário esteroide androstenediona, também conhecido como 4-AD ou somente AD, é um andrógeno produzido pelo corpo humano nas glândulas suprarrenais, assim como nos testículos e nos ovários (C. HINDMARSH e GEERTSMA, 2017). Sua importância está relacionada à capacidade do corpo humano em convertê-lo em outros hormônios, como testosterona e estrogênio (RODAKE et al., 2017).

O 4-AD no corpo humano é produzido a partir do colesterol. Fora do corpo, pode também ser produzido a partir de fitoesteróis por rota química ou por rota bioquímica, que através de processos de biotransformação que utilizam microrganismos, que podem ser geneticamente modificados visando aumentar a taxa de conversão (RODAKE et al., 2017).

Ainda de acordo com Rodake et. al (2017), existem limitações na utilização de fitoesteróis como substrato para a produção de 4-AD. Entre estes fatores estão a baixa solubilidade de fitoesteróis em água e a degradação nucleica de 4-AD em ADD ou 9-hidroxi-androstenediona (9-OHAD). Desta maneira, é importante o estudo de técnicas e avanços biotecnológicos que visem aumentar a produtividade de 4-AD.

Uma das aplicações de destaque de 4-AD é na produção de medicamentos esteroides, sendo estes utilizados em casos de reposição hormonal ou até mesmo como anabolizantes devido à sua capacidade de ser convertido em testosterona no organismo. Estas substâncias são amplamente utilizadas por pessoas que visam maior performance muscular e que desejam cultivar o aspecto físico. No entanto, o uso exagerado de anabolizantes pode causar efeitos adversos no corpo humano (ROCHA et. al, 2014).

A produção de medicamentos esteroides que utilizam 4-AD como matéria-prima representa uma grande porcentagem do mercado na indústria farmacêutica (RODAKE et al, 2017). De acordo com a empresa de consultoria *360 Research Reports*, a China detém a maioria dos principais *players* no mercado de 4-AD.

Levando em consideração diferentes estratégias de prospecção tecnológica citadas na literatura, é possível traçar um planejamento estratégico, identificando as oportunidades e ameaças de um setor e o desenvolvimento de tecnologias promissoras e

emergentes, que auxiliam as tomadas de decisão que têm potencial para gerar sucesso científico, econômico e social. Desta maneira, o presente trabalho visa identificar e apresentar um panorama das oportunidades de produção de 4-AD, através do estudo de artigos científicos publicados entre janeiro de 2000 à fevereiro de 2020, patentes concedidas entre janeiro de 1976 e março de 2020 e patentes solicitadas entre janeiro de 2001 à março de 2020.

## 2. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo identificar e apresentar um panorama da biossíntese de 4-androstenediona, através da metodologia de mapeamento de artigos científicos e de solicitações e concessões de patentes, como ferramenta de prospecção, identificando o estado da arte e as tecnologias e aplicações mais utilizadas assim como, os principais países e instituições envolvidas.

Deste modo, os objetivos específicos foram:

- Elaborar um panorama geral dos artigos científicos publicados abordando a biossíntese de 4-AD, utilizando a base de dados SCOPUS;
- Elaborar um panorama geral das patentes solicitadas e concedidas abordando a biossíntese de 4-AD, utilizando a base de dados USPTO – *United States Patent and Trademark Office*;
- Identificar as principais técnicas de biossíntese de 4-AD em nível industrial utilizando fitoesterol como substrato.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Hormônios Esteroides

Hormônios esteroides são compostos orgânicos sintetizados pelo organismo a partir do colesterol, especificamente, pelo córtex da suprarrenal ou pelas gônadas. Exercem grande papel no controle do metabolismo, como a adaptação ao estresse, regulação da função reprodutiva e do equilíbrio hidroeletrolítico (SOARES, 2013)

De acordo com Nelson e Michael (2014), esteroides são compostos orgânicos que possuem em sua estrutura um núcleo esteroide. A estrutura de um núcleo esteroide é composta por 4 anéis fundidos entre si, sendo três deles formados por seis átomos de carbono e um formado por cinco átomos de carbono (Figura 1).

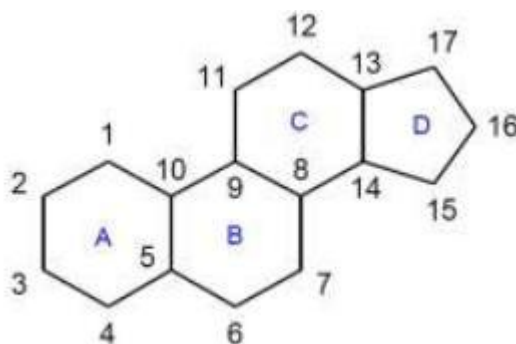


Figura 1: Núcleo esteroide. Fonte: Soares, 2013.

De acordo com Redondo (2007), os hormônios esteroides podem ser classificados em quatro grupos: andrógenos, estrógenos, progestógenos e corticosteroides. Sendo que, no ponto de vista de Antonow et al. (2007), os corticosteroides são formados por dois grupos: glicocorticoides e mineralcorticoides. Classificações estas, que remetem a suas propriedades fundamentais e sua origem endócrina. Existe também, outra classificação que considera os hormônios esteroides como derivados do estrano (18 átomos de carbono), androstano (19 átomos de carbono) e pregnano (21 átomos de carbono).

O progestógenos podem ser naturais ou sintéticos, sendo a progesterona o único progestógeno natural. Os progestógenos sintéticos são denominados progestinas, na

maioria das vezes são sintetizados a partir de moléculas de testosterona e progesterona (VIGO et al., 2011).

Os glicocorticóides são hormônios esteróides, sintetizados no córtex da glândula adrenal, que afetam o metabolismo dos carboidratos e reduzem a resposta inflamatória (GOODMAN e GILMAN, 2003), sendo o cortisol o exemplo de glicocorticoide natural. Blecometasona, dexametasona, betametasona, prednisolona, metilprednisolona e triancinolona são os principais glicocorticoides sintéticos (BAVARESCO et al., 2005).

Já os mineralocorticoides possuem a função de regular água e sódio (FERNANDES-ROSA e ANTONINI, 2007), sendo adrenalona o mineralocorticoide natural mais importante citado na literatura, o qual também possui papel importantíssimo no controle eletrolítico e da pressão arterial (MIRANDA e FONTOURA, 2013).

Os hormônios que se enquadram nos grupos andrógenos e estrógenos são conhecidos também como hormônios masculinos e femininos, respectivamente. Macêdo e Fernandes (2003) atribuem a estes hormônios as mudanças nas características sexuais primárias e secundárias durante a puberdade.

Além de serem considerados os hormônios masculinos, os andrógenos favorecem a síntese proteica, exercendo importante função anabólica associada ao ganho de massa muscular (ROCHA et al., 2007). De acordo com Silva et al. (2002), a testosterona é considerada como principal hormônio andrógeno, apesar dos testículos expelirem traços de 5- $\alpha$ -diidrotestosterona, desidroepiandrosterona (DHEA) e androstenediol.

De acordo com a literatura, existem três estrogênios naturais: estrona, estriol e 17 $\beta$ -estradiol; sendo o último o que possui maior atividade estrogênica (Ignacio et al., 2009). Os estrogênios possuem diversas funções como controlar o ciclo menstrual e promover as características sexuais femininas (PINTO e CHAPETA, 1995).

A Figura 2 apresenta um esquema contendo as rotas de síntese de alguns esteroides, apresentando um exemplo de cada grupo de hormônios esteroides citados anteriormente.



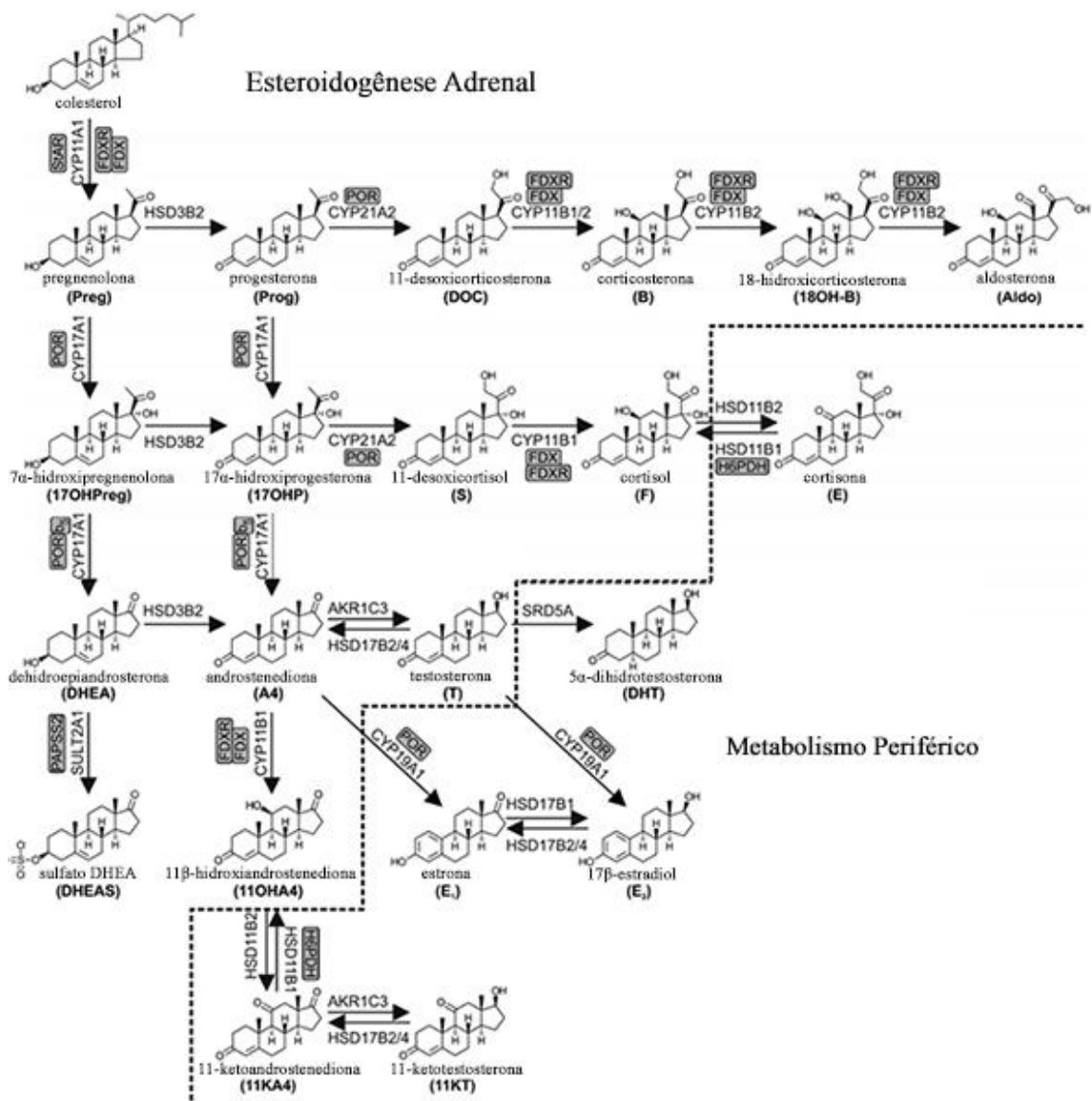


Figura 2: Esquema da esteroidogênese adrenal. Fonte: Schiffer et al., 2019.

### 3.1.1 4-Androstenediona

Androstenediona, 1,4-androstenediona ou androst-4-en-3, 17-diona, neste trabalho denominada de 4-AD, é um composto de 19 átomos de carbono que faz parte da família de esteroides 17-keto, sendo produzido nas glândulas adrenais e nas gônadas. 4-AD atua como precursor na biossíntese de hormônios esteroides como testosterona, estrona e estradiol. É considerado um “pró-hormônio”, pois antes de ser convertida em outros hormônios possui ações androgênicas fracas no corpo humano (MALVIYA e

GOMES, 2008). Sua fórmula molecular é  $C_{19}H_{26}O_2$  e sua massa molar é  $286,4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . A Figura 3 apresenta a fórmula estrutural do 4-AD.

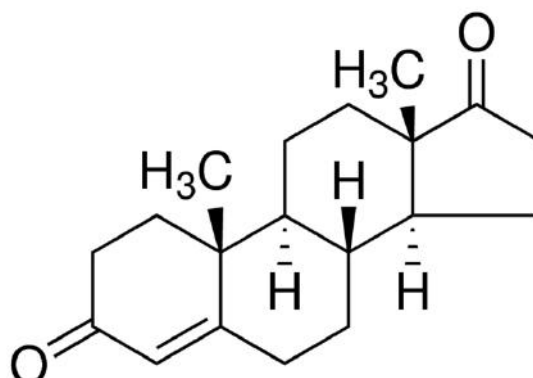


Figura 3: Fórmula estrutural da androstenediona (4-AD). Fonte: Sigma-Aldrich.

O colesterol é o ponto de partida para a produção de hormônios esteroides no corpo humano. A produção de androstenediona nas glândulas adrenais é regida pelo hormônio adenocorticotrófico (ACTH), enquanto a produção nas gônadas ocorre pela ação das gonadotrofinas. Depois de produzido, o 4-AD é transformado em testosterona pela ação da enzima  $17\beta$ -hidroxisteroide desidrogenase ou em estrona pela ação da enzima aromatase (MALAVIYA e GOMES, 2008).

A Tabela 1 apresenta as principais propriedades da substância androstenediona.

Tabela 1: Propriedades físico-químicas da substância androstenediona. Fonte: PubChem.

Fórmula Molecular	$C_{19}H_{26}O_2$
Peso Molecular	$286,4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$
Ponto de Fusão	$170^\circ\text{C}$
Ponto de Ebulição	$200^\circ\text{C}$
Solubilidade em $H_2O$	$66,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} (20^\circ\text{C})$
Pressão de Vapor	$7,35 \times 10^{-9} \text{ mmHg} (20^\circ\text{C})$
Densidade	$1,18 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3} (20^\circ\text{C})$

### **3.1.1.1. Aplicações de Androstenediona**

4-AD é um precursor para a maioria dos esteroides farmacologicamente ativos como testosterona, testolactona, estradiol, etinilestradiol, progesterona, cortisona, cortisol, prednisona e prednisolona (WESTFECHTEL e BEHLER, 2006). Esses hormônios são importantes no controle da fertilidade humana, osteoporose, menopausa e regulação da pressão sanguínea (RODAKE et al., 2017).

4-AD possui diversas funções clínicas, de forma que a determinação da sua concentração no organismo auxilia no diagnóstico de distúrbios hormonais responsáveis por diferentes doenças (HINDMARSH e GEERSTMA, 2017).

O aumento da concentração de 4-AD em mulheres pode ajudar no diagnóstico de hirsutismo, que é o crescimento excessivo de pelos em regiões do corpo comuns aos homens. No sexo masculino, esse aumento pode estar associado a uma redução na síntese da enzima que transforma androstenediona em testosterona, levando a um quadro de desenvolvimento incompleto das características masculinas. Por outro lado, a diminuição da concentração do hormônio a níveis fisiológicos associada a outros sintomas pode sugerir o desenvolvimento da hiperlapsia adrenal congênita (HAC), que está relacionada à limitação da produção de hormônios nas glândulas adrenais afetando o crescimento e o desenvolvimento de uma criança (WHEELER, 2013).

As grandes semelhanças das propriedades estruturais e farmacológicas da androstenediona em relação a testosterona, faz com que ela seja considerada um esteroide anabolizante apesar de sua atividade anabólica representar um quinto da atividade presente na testosterona. Logo, 4-AD possui as mesmas aplicações comumente encontradas nestes esteroides, como tratar pacientes com deficiência hormonal e aqueles que sofrem com atrofia muscular causada pelo aparecimento de câncer ou HIV (SHAHIDI, 2001).

Industrialmente, androstenediona é essencial para a produção de hormônios sintéticos e medicamentos esteroides orais ou injetáveis na área farmacêutica. Os corticosteroides sintéticos, por exemplo, podem ser utilizados para substituir hormônios em pessoas que não produzem uma quantidade adequada no corpo, pois possuem a capacidade de reproduzir as ações dos corticosteroides naturais, além de serem utilizados no tratamento de diversas doenças (BARNES, 2006). Segundo Antonow et al. (2007), os corticosteroides podem ser divididos em glicocorticoides e mineralocorticoides.

Os glicocorticoides são principalmente utilizados no tratamento inflamações e de doenças relacionadas ao sistema imunológico como artrite, asma, bronquite, colite, alergias que envolvem inflamação do nariz e dos olhos e casos que envolvem erupções cutâneas. Essa classe de corticosteroides também é utilizada no tratamento de lúpus sistêmico, psoríase grave, linfomas e anemia hemolítica autoimune (BARNES, 2006). A prednisona e a prednisolona são exemplos de glicocorticoides derivados de androstenediona (RODAKE et al., 2017).

Os mineralocorticoides possuem aplicações voltadas para sua capacidade de retenção de sal, importante no tratamento de doenças como hiperlupsia adrenal congênita. A fludrocortisona, derivada da cortisona, é um exemplo de mineralocorticoide oral que possui androstenediona como hormônio intermediário (BARNES, 2006).

De acordo com Rocha et al. (2014), os esteroides andrógenos anabolizantes (EAA) também estão na gama de aplicações de androstenediona, por esta ser uma precursora da produção de testosterona. Como a testosterona tem efeito androgênico fraco, existe uma margem para abuso por parte dos consumidores, que visam a melhoria de performance atlética, da aparência física, de ganho de energia ou da capacidade trabalho. Estes medicamentos induzem o aumento de massa muscular e consequentemente ganho de força. No entanto, apresentam efeitos colaterais que podem atingir diversos órgãos, causando distúrbios severos.

Apesar de suas repercussões morais, os EAA são clinicamente úteis em casos de queimaduras severas, anemia aplástica, catabolismo crônico em pacientes com HIV, tratamento de osteoporose e de algumas neoplasias e insuficiência renal crônica (ROCHA et al., 2014).

## **3.2. Síntese de Androstenediona**

### **3.2.1. Insumos para síntese de androstenediona**

As indústrias em geral, estão sempre demandando matérias-primas novas e baratas a fim de aumentar sua produtividade e minimizar custos. O mesmo acontece com a indústria farmacêutica: há uma grande busca de matérias-primas que contenham esteróis naturais para a produção de compostos esteroides.

Apesar de o colesterol proveniente da cera de lã e de gordura animal ter sido muito usado como matéria-prima na produção de esteroides, a indústria farmacêutica tem buscado outros insumos como alternativa a existência de diversas reações secundárias que reduzem o rendimento do processo de produção (MALAVIYA e GOMES, 2008).

Fitoesteróis e sapogeninas como hecogenina, diosgenina e solasodina (Figura 4) são compostos que possuem a estrutura nomeada como ciclopentano-perhidrofenantreno, que é usada como núcleo na síntese de esteroides, servindo então, como matéria-prima para a síntese de androstenediona MALAVIYA e GOMES, 2008).

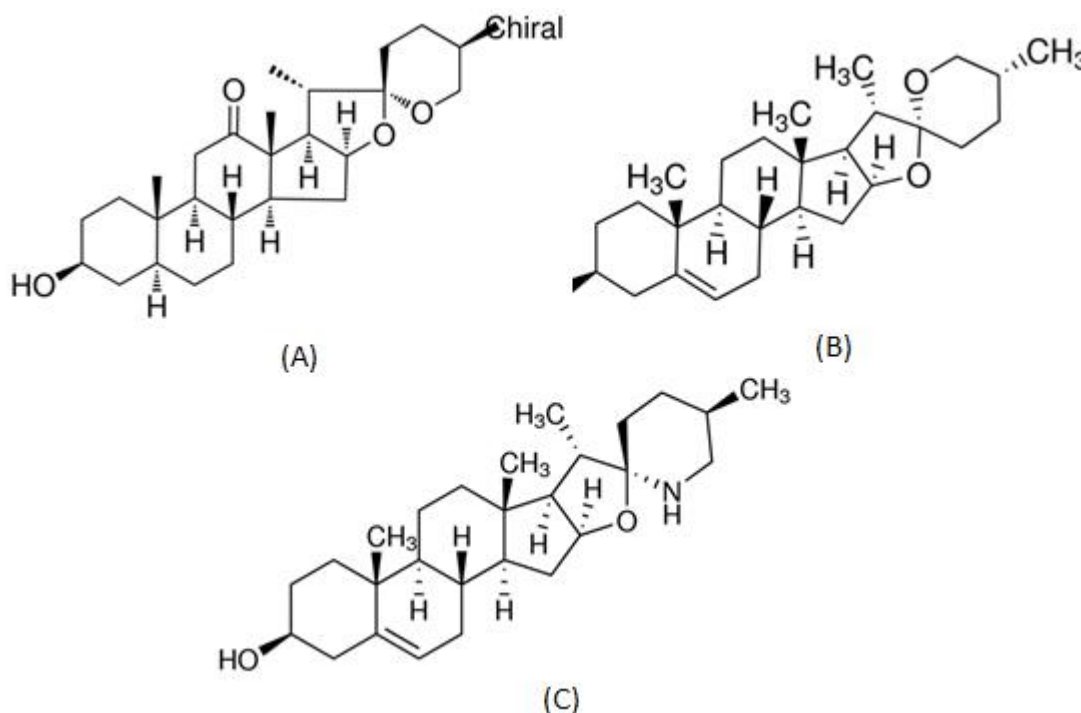


Figura 4: Estruturas das sapogeninas: (A) hecogenina, (B) diosgenina e (C) solasodina.  
Fonte: Sigma Aldrich.

Até a década de 70, a diosgenina, sapogenina encontrada no barbasco mexicano (*Dioscorea composita*), era um dos compostos mais utilizados como insumo na síntese de esteroides. Entretanto, o aumento da sua indisponibilidade e consequentemente valorização do preço, tornou sua utilização inviável favorecendo o uso de outros substratos como o ácido desoxicólico obtido na bile bovina (HINKE,2008).

Ultimamente, o substrato mais cotado para produção de esteroides são os fitoesteróis em razão do seu baixo custo e fácil conversão em intermediários esteroides. É reportado na literatura que mais de 100 fitoesteróis foram encontrados em plantas, sendo o campesterol, estigmasterol e  $\beta$ -sistosterol os encontrados em maior abundância.

Os esteróis são encontrados nas plantas na forma de álcoois livres, ácidos graxos, glicosídeos esterilizados e esterilglicosídeos acilados; em óleos comestíveis como o óleo de soja, são encontrados na forma livre e esterificada (FERNANDES e CABRAL, 2007).

Na Tabela 2 pode-se observar alguns dos esteróis citados anteriormente, os quais podem ser utilizados como substrato pelos respectivos microrganismos na síntese de androstenediona.

Tabela 2: Diferentes substratos e biocatalisadores utilizados na produção de 4-AD e ADD por clivagem da cadeia lateral. Fonte: Malaviya e Gomes, 2008.

<b>Substrato</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Produto</b>
Colesterol	<i>Mycobacterium</i> sp. NRRL B 3805 (Sripalakit et al., 2006)	AD
Colesterol	<i>Arthrobacter simplex</i> (Lee et al., 1993)	AD
	<i>Mycobacterium</i> sp. NRRL B 3683 (Lee et al., 1993)	ADD
Colesterol	<i>Rhodococcus equi</i> (Ahmad and Johri, 1992)	ADD
Colesterol	<i>Mycobacterium</i> sp. (Smith et al., 1993)	AD, ADD
Colesterol	<i>Mycobacterium smegmatis</i> (Mahato and Mukherjee, 1984)	AD, ADD
Colesterol	<i>Mycobacterium parafortuitum</i> MC1-0801 (Mahato and Mukherjee, 1984)	AD, ADD
Colesterol	<i>Brevibacterium lipolyticum</i> (Mahato and Mukherjee, 1984)	AD, ADD
Colesterol	<i>Nocardia ahena</i> (Mahato and Mukherjee, 1984)	AD, ADD
Sitosterol	<i>Mycobacterium</i> sp. NRRL B 3683 (Lee et al., 1993)	ADD
Sitosterol	<i>Arthrobacter simplex</i> (Mathur et al., 1992)	AD, ADD
Sitosterol	<i>Mycobacterium vaccae</i> (Mahato and Garai, 1997)	AD
Sitosterol	<i>Pseudomonas</i> sp. NCIB 10590 (Owen et al., 1985)	AD
Sitosterol	<i>Mycobacterium fortuitum</i> (Wovcha and Biggs 1981)	AD, ADD
Sitosterol	<i>Mycobacterium flavum</i> (Mahato and Mukherjee, 1984)	ADD
Sitosterol	<i>Mycobacterium</i> sp. NRRL B 3805 (Shukla et al., 1992)	AD
Pregn-4-ene-3,20-diona	<i>Aspergillus aureofulgens</i> (Mahato and Mukherjee, 1984)	AD
Pregn-4-ene-3,20-diona	<i>Curvularia lunata</i> (Mahato and Mukherjee, 1984)	ADD
Colesterol, Sitosterol, Stigmasterol, Ergosterol	<i>Mycobacterium</i> sp. NRRL B 3805 and <i>Mycobacterium</i> sp. NRRL B 3683 (Sripalakit et al., 2006)	AD, ADD

### 3.2.1.1. Fitoesterol

Os fitoesteróis são esteróis formados por 27 a 29 átomos de carbono e possuem grande semelhança ao colesterol em relação a funcionalidade e estrutura fisiológica, diferenciando-se deste pela adição de substituintes alquil tais como metil e etil ou na inserção de duplas ligações nas posições C-22 e C-24 (YANKAH,2006). Os mesmos têm ocorrência abundante em vegetais, inclusive nas espécies marinhas (CLIFTON, 2002).

Esses esteróis são obtidos, principalmente, das frações insaponificáveis de óleos vegetais, como os óleos de soja, canola e girassol. O óleo de soja possui em sua composição cerca de 330 mg de fitoesterol/100g de óleo, já o óleo de canola possui uma concentração de fitoesterol duas vezes maior que o óleo de soja, cerca de 500-1000mg de fitoesterol/100g de óleo. Os fitoesteróis representam de 30 a 60% da fração insaponificável desses óleos, sendo o  $\beta$ -sitosterol o composto presente em maior abundância, representando cerca de 50 a 80% do conteúdo do óleo (ITO,2007).

Assim como os óleos vegetais, o “tal oil”, também chamado de resina líquida, é considerado a principal matéria-prima para se obter fitoesteróis em larga escala. É reportado na literatura que misturas de fitoesteróis podem ser obtidas a partir de fontes extremamente rentáveis como soja, brotos de bambu e colza, até mesmo de resíduos das indústrias de papel e cana-de-açúcar (MALAVIYA e GOMES, 2008).

A biossíntese dos fitoesteróis pode ser dividida em duas etapas: via do mevalonato e processos enzimáticos específicos (FELDMAN, 2012). Sua síntese ocorre no citoplasma celular. Nas plantas, a via de produção do fitoesterol consiste em mais de 30 reações enzimáticas, sendo estas enzimas encontradas nas membranas das plantas. Embora tenham o mesmo ponto de partida, a biossíntese e o metabolismo dos esteróis animais são diferentes do produzidos por vegetais. A partir do acetil-CoA, o qual vai originar o esqualeno, forma-se o colesterol no homem, enquanto nas plantas o produto final é o cicloartenol (RODRIGUES, 2009).

Os fitoesteróis podem ser classificados em esteróis ou estanóis, de acordo com a existência ou ausência de insaturações na molécula, respectivamente. Na Figura 5 estão ilustrados exemplos dos esteróis (stigmasterol, campesterol e sitosterol) e dos estanóis

(sitostanol e campestanol). Os estanois são raramente encontrados na forma natural, no entanto, podem ser obtidos através do processo de hidrogenação dos esteróis vegetais (BREDA, 2010).

A paridade dos fitoesteróis em relação ao colesterol não se dá devido apenas a fatores estruturais, mas também a funcionalidades básicas que estes compostos exercem nas plantas que se assemelham às desempenhadas pelo colesterol nas células animais. Os fitoesteróis participam de processos essenciais dentro das plantas, como interferir diretamente na fluidez e permeabilidade da membrana celular. São responsáveis também, pela estabilização da membrana além de serem precursores da síntese de hormônios esteroides (WANG et al., 2011).

Assim como o colesterol é o substrato na produção de esteroides pelas gônadas e córtex adrenal, o fitoesterol é utilizado para a produção de 4-AD por diversos microorganismos que são capazes de utilizá-lo como fonte de carbono e energia. Essa propriedade é um ponto primordial na produção de precursores de esteroides e, portanto, pode ser estudada a fim de tornar o processo de produção de 4-AD economicamente viável (ROKADE et al., 2018).

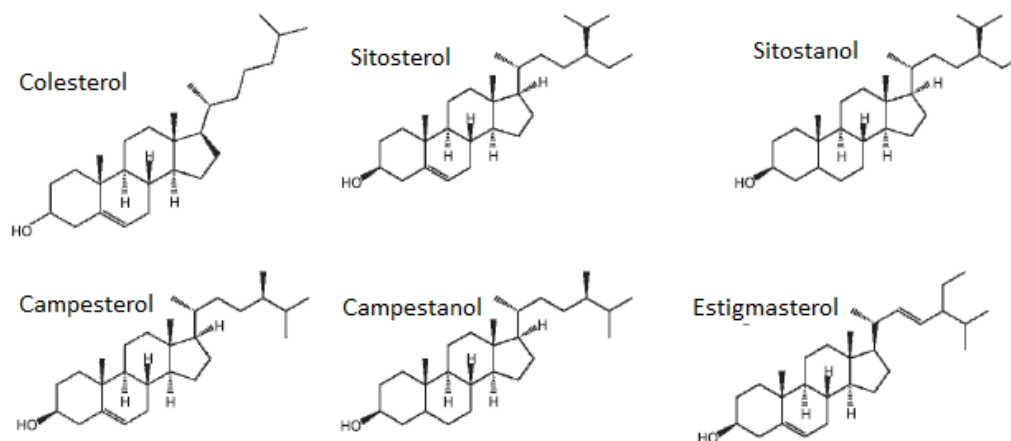


Figura 5: Estruturas químicas de esteróis e estanois comparadas ao colesterol.  
Fonte: Kidambi e Patel, 2015.

### 3.2.2. Rota química

A síntese química de compostos esteroides se dá através de diversas etapas de reação. Marsh (1985) comprovou esse fato através da demonstração da síntese química



de androstenediona. Welzel et al. (1983) também relataram a síntese química de 4-AD através da clivagem da cadeia lateral de fitoesteróis.

AD pode ser produzida através da adição de reagentes tiol específicos a intermediários dienona. Durante a síntese química é de extrema importância que ocorra a proteção do núcleo esteroide já que os mesmos são sensíveis a determinadas temperaturas e produtos químicos, se o contrário, a funcionalidade dos esteroides C19, como a androstenediona, é prejudicada (ROKADE et al., 2018).

Essas limitações tornam o processo mais lento e sensível, agrega custos adicionais e rendimentos baixos. Além disso, como citado anteriormente, a síntese química demanda a utilização de substâncias tóxicas e nocivas, como a piridina que pode acarretar grandes problemas para a saúde e meio ambiente através do seu descarte. Consequentemente, métodos menos nocivos de produção de 4-AD estão sendo estudados, como a síntese bioquímica (ROKADE et al., 2018).

### 3.2.3. Rota bioquímica

Inúmeros autores reportaram na literatura (SIH et al., 1968; OWEN et al., 1983, 1985) a utilização de esteróis como substrato por bactérias além da identificação dos intermediários da via metabólica. Diversas espécies foram citadas por Arima et al. (1969) por produzir androstenediona através da clivagem da cadeia lateral do sitosterol, como espécies dos gêneros *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Coryne-bacterium*, *Nocardia*, *Brevibacterium*, *Serratia* e *Protoaminobacter*.

No entanto, a clivagem da cadeia lateral ramificada presente no sitosterol se tornou evidente apenas após a conversão do ácido 3-oxo-24-etilcolesterol-4-eno-26-óico em AD e ácido 3-oxocol-4-eno-26-óico, usando extrato de *Mycobacterium* sp. NRRL B-3805 (FUJIMOTO et al., 1982).

Para que a quebra da cadeia lateral do sitosterol ocorra de forma eficiente é necessário que haja a regeneração de cofatores. O ataque se inicia pela parte final apolar da molécula de sitoesterol, em seguida, um grupo hidroxila é adicionado ao grupamento metila terminal C27 que é então oxidado a uma carbonila. Posteriormente, ocorre a carboxilação do carbono C28. Tais etapas são catalisadas por enzimas e induzidas pela própria presença de sitoesterol (MALVIYA e GOMES, 2008).

Na primeira etapa de reação, há a presença de um grupo de três enzimas que também podem ser induzidas pela baixa tensão de oxigênio durante o período de indução, assim como por alguns derivados de oligoisoprenos saturados (MALAVIYA e GOMES, 2008).

Já a segunda etapa enzimática da reação é influenciada pela concentração de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) dissolvida no meio de cultivo. A presença de CO<sub>2</sub> no meio reacional afeta positivamente a biotransformação de β-sitosterol a AD. Foi reportado que cerca de 1% de CO<sub>2</sub> na saída de ar já é vantajoso. No entanto, excesso de aeração restringe o rendimento do processo (MALAVIYA e GOMES, 2008).

De acordo com Szentirmai (1990), a clivagem completa do sitosterol gera 18 moléculas de NADH e 7 moléculas de FADH<sub>2</sub>. Se seus respectivos equivalentes redutores forem contabilizados, mais de 80 moléculas de ATP podem ser produzidas a partir de uma molécula de β-sitosterol.

A partir do estudo da biossíntese de AD e ADD a partir de fitosteróis e da publicação de pelo menos 18 patentes descrevendo as etapas da biotransformação, Wovcha et al., 1982 comentam que o processo pode variar de cerca de 72 horas a 15 dias ou mais. Os autores também relatam que a temperatura de incubação pode variar de cerca de 25°C a cerca de 37°C, e que a utilização de ar esterilizado e agitação facilitam o crescimento do microrganismo e a eficácia do processo de biotransformação.

Existem três grandes empecilhos na biotransformação de fitoesteróis: a degradação do núcleo esteroide, a solubilidade do substrato e a inibição da clivagem da cadeia lateral pela presença de produtos da reação como androstenediona e/ou 4-androsten-3,17-dione (ADD). Esses fatos podem ser contornados através da inibição química da enzima 9α-hidroxilase pela adição de agentes quelantes de Fe<sup>2+</sup> e por *screening* e aprimoramento dos microrganismos para maior rendimento de AD (MALAVIYA e GOMES, 2008).

Pendharkar e colaboradores reportaram em 2014, a biotransformação de fitoesterol em AD catalisada por *Mycobacterium fortuitum* subsp. *fortuitum* NCIM 5239. Devido à insolubilidade do fitoesterol ao meio aquoso, foram realizados testes utilizando solventes orgânicos miscíveis e imiscíveis com água com a finalidade de aumentar a biodisponibilidade do substrato.

Em 2007, Noh et al. publicam uma patente (7.241.589) que se refere a um método de preparar AD/ADD com alto rendimento, no qual esteróis emulsionados ou complexos de ciclodextrina-colesterol extraídos do leite são utilizados como substratos.

A ciclodextrina é conhecida como um aditivo explorado na fabricação de leite com baixo teor de colesterol. O colesterol é removido do leite e é retido na forma de complexos ciclodextrina-colesterol. Essa descoberta possui aplicabilidade industrial e, por sua vez, fornece um método de aumentar a produtividade de AD/ADD, que será discutido com mais detalhes nas análises das patentes concedidas.

Com avanço da bioinformática e da engenharia metabólica, diversas cepas foram geneticamente modificadas para otimizar o processo de biotransformação de fitoesterol em AD. Na Tabela 3 pode-se observar alguns exemplos das estratégias utilizadas por diferentes autores.

Tabela 3: Estratégias utilizadas por alguns autores a fim de otimizar o processo de biotransformação de fitoesterol em AD e ADD. Fonte: Adaptado (Wei, et al., 2010; Su et al, 2018; Zhou et al., 2019; Zhang et al., 2018)

<b>Substrato</b>	<b>Produto</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Processo</b>
Fitoesteróis de soja (estigmasterol, campesterol, $\beta$ -sitosterol)	AD, ADD	<i>Mycobacterium neoaurum</i> NwIB-01	Superexpressão de KstD para aumentar produção e pureza de ADD
Mistura de fitoesteróis (51,7% de $\beta$ -sitosterol, 22,7% de stigmasterol, 17,1% de campesterol e 4% de brassicasterol)	AD, ADD	<i>Mycobacterium neoaurum</i> TCCC 11978	Superexpressão de CYP125-3
Fitoesteróis de melão de cana não tratado	AD, 9OH-AD	<i>Mycobacterium neoaurum</i> TCCC 11978; <i>Mycobacterium fortuitum</i> TCCC 111744	Co-expressão da subunidade beta do PCC e NDH-2
Fitoesteróis	AD	<i>Mycobacterium neoaurum</i> TCCC 11978; <i>Mycobacterium fortuitum</i> TCCC 111744	Superexpressão de NDH-2, fermentação em batelada
Fitoesteróis	AD	<i>Mycobacterium neoaurum</i> TCCC 11978	Repressão do metabolismo do propionil-CoA. Superexpressão do prpDBC da via do ciclo do 2-metilcitrato e deleção do regulador de transcrição de nitrogênio GInR

### 3.3 Um panorama do mercado de 4-AD

Atualmente, a produção de esteróides representa um dos maiores setores de produtos médicos fabricados pela indústria farmacêutica (GERBER et al, 2015). A produção global de androstenediona (AD) e androstadienediona (ADD) excede 1000 toneladas por ano (SCHMID, 2001).

De acordo com a consultoria “360 Research Reports”, o mercado global de androstenediona para 2020 foi avaliado em 198 milhões de dólares, com expectativa de atingir 209,5 milhões de dólares no final de 2026. Além disso, é previsto um crescimento no CAGR (*Compound Annual Growth Rate*) de 0,8% durante o período de 2021 a 2026, índice este, que representa a taxa de retorno de um investimento.

Na Tabela abaixo é possível observar os principais *players* do mercado global de androstenediona:

Tabela 4: Principais players do mercado global de androstenediona. Fonte:360 Research Reports.

BIOVET (Holanda)	Jiufu (China)
Xi'an Gaoyuan Bio-Chem (China)	Kaizen (Japão)
Indo Phytochemicals (Índia)	Yongning Pharma (China)
Goto Pharmaceutical (China)	Dongyao Pharmaceutical (China)
Tianjin King York (China)	Danjiangkou Danao (China)
SITO Bio (China)	DaRui (China)
Jiangxi Hongyuan Pharmaceutical (China)	Dahua Pharmaceutical (China) Huazhong Pharmaceutica (China)

O crescimento do mercado de androstenediona ao longo dos anos tem se dado principalmente por fatores como aumento dos níveis de testosterona, da libido e da busca incessante da sociedade por atingir o físico perfeito e metas rigorosas de condicionamento físico, fazendo com que o consumo de androstenediona por jovens e até atletas cresça cada vez mais (*Transparency Market Research*).

## 4. PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA

### 4.1. A prospecção tecnológica e sua importância

A literatura fornece diferentes conceitos para o termo prospecção tecnológica. De acordo com Teixeira (2013), os estudos prospectivos constituem ferramenta básica de planejamento estratégico, pois fundamentam escolhas e tomadas de decisão para a estruturação de futuros possíveis com base em fatos presentes, variáveis socioeconômicas, culturais, ambiente legal e institucional, entre outras circunstâncias.

Os estudos de prospecção tecnológica, também chamados de estudos de futuro, ou *forecast* (inglês), *foresight* (inglês) ou *future studies*, fornecem as principais tendências no contexto mundial sendo possível segmentar estas tecnologias por setor da economia. Estes estudos auxiliam a identificação de tecnologias promissoras, úteis para uma determinada organização, bem como apontam para possibilidades de negócios e parcerias (BORSCHIVER e DA SILVA, 2016).

Para Santos et al. (2010), os exercícios prospectivos ou de prospecção tecnológica têm sido considerados fundamentais para promover a criação da capacidade de organizar sistemas de inovação que respondam aos interesses da sociedade. A partir de intervenções planejadas em sistemas de inovação, fazer prospecção significa identificar quais são as oportunidades e necessidades mais importantes para a pesquisa e desenvolvimento (P&D) no futuro.

Teixeira (2013) resume que o objetivo geral da prospecção tecnológica é identificar áreas de pesquisa estratégica e as tecnologias genéricas emergentes que têm a propensão de gerar os maiores benefícios econômicos e sociais. Além de diferentes definições, a literatura também fornece métodos variados para a realização dos estudos de prospecção tecnológica, tais como análise de cenários, entrevista com especialistas, construção da matriz SWOT, técnica de *brainstorming*, metodologia *Delphi*, entre outras. No presente trabalho, serão adotadas duas metodologias prospectivas: a análise qualitativa e quantitativa de artigos e patentes, também conhecida como bibliometria e patentometria (BORSCHIVER e DA SILVA, 2016).

## **4.2. Análise de cenários**

A análise de cenários se caracteriza como o estudo criativo ou imaginativo sobre o futuro com abordagem e metodologia próprias. Os elementos principais que compõe a técnica são os mesmos do teatro moderno: cenários, cenas, trajetórias e atores (MORITZ et al., 2008). A utilização desta técnica ocorre pela primeira vez como um método de planejamento militar, após a Segunda Guerra Mundial. Nos anos 60, Herman Kahn aprimorou os cenários como ferramenta para uso comercial.

Os cenários são conjuntos formados pela descrição de situações futuras. Um cenário é uma sequência de eventos hipotéticos, o qual é construído com o objetivo de focar os processos determinantes e os pontos críticos para a tomada de decisão. Os cenários são definidos como conjuntos razoáveis e factíveis de futuros possíveis, devidamente estruturados. Eles são construídos através da explicitação das várias interpretações dos eventos que orientam a estrutura do ambiente de negócio (REALPE, 2016).

Salienta-se algumas características importantes dos cenários: visão plural do futuro, ênfase no aspecto qualitativo e capacidade de quebra de modelos mentais. Após a elaboração de um cenário, é necessário verificar sua consistência, ou seja, sua coerência interna - se existe compatibilidade entre a filosofia, a trajetória e as cenas que o integram (MORITZ et al., 2008).

Dentro do espectro dos cenários prospectivos, observa-se a existência de diversas metodologias. As principais são propostas por Michel Godet; General Electric; Schwartz e Global Business Network (GBN); Michel Porter, e seus cenários industriais; e Raul Grumbach. Tais metodologias buscam analisar o microambiente, a organização, o indivíduo e suas visões de futuro (MORITZ et al., 2008).

## **4.3. Entrevistas com especialistas**

As entrevistas são mecanismos de coletas de dados. Esta técnica é utilizada quando há a necessidade de obter informações mais complexas e precisas. Através da entrevista, podem-se obter informações relevantes para a conclusão do estudo que não constam em documentos oficiais. As entrevistas seguem um método padrão através do

qual as perguntas são preestabelecidas (REALPE, 2016). A seguir, aponta-se algumas regras básicas para se ter um bom processo de entrevista (VAN DER HEIJDEN, 1997; PIO, 2004):

- Iniciar a entrevista explicando os seus objetivos.
- Explicar qual será o fim das informações geradas e garantir o anonimato da organização e da pessoa entrevistada.
- Não fazer perguntas específicas pré-elaboradas, mas perguntas genéricas que possam ser utilizadas como alavanca para possíveis novos questionamentos.
- Escutar de maneira efetiva e interativa.
- Gerar um ambiente de confiança entre entrevistado e entrevistador.
- Não gravar a entrevista.

#### **4.4. Análise SWOT**

A análise SWOT (*Strength, Weakness, Opportunity e Threaten*) identifica e avalia fatores internos e externos que geram influência num determinado setor ou empresa. Sendo os fatores internos denominados como forças e fraquezas, e os externos como oportunidades e ameaças.

As forças e fraquezas são determinadas pela posição atual da tecnologia. Conceitua-se força como recurso ou capacidade da organização que pode ser utilizado para que a mesma alcance seus objetivos. Fraquezas são limitações ou falhas de determinada organização dificultando ou até mesmo impedindo que esta atinja seus objetivos. Importante ressaltar que alguns autores consideram que a força de uma organização pode se tornar fraqueza, desde que o contexto do ambiente externo seja alterado (REALPE, 2016).

Já as oportunidades e ameaças podem ser consideradas antecipações do futuro. As oportunidades são “tendências de situações ou acontecimentos externos à organização, que podem auxiliá-la no alcance de seus objetivos e de sua missão”. As ameaças são “tendências de situações ou acontecimentos que podem prejudicar a organização na busca de seus objetivos e de sua missão”. A fim de identificar os fatores externos de forma efetiva deve-se levar em consideração: os impactos e as consequências desses fatores, a probabilidade de ocorrência e o horizonte de tempo para a ocorrência.



Após a identificação dos fatores internos e externos, estes serão analisados na matriz abaixo (Figura 6) com o objetivo de verificar a existência de alguma relação entre eles.

	Oportunidades	Ameaças
Forças	Quadrante I	Quadrante II
Fraquezas	Quadrante III	Quadrante IV

Figura 6: Matriz de Forças, Oportunidades, Fraquezas e Ameaças.  
Fonte: Adaptado de BORSCHIVER, 2016.

Dos quadrantes gerados, pode-se definir o quadrante I como o de potencialidade de ação ofensiva por parte da organização, isto é, seus pontos fortes possibilitam o aproveitamento das oportunidades que o ambiente externo disponibiliza. O quadrante II indica o potencial defensivo da organização, ou seja, a capacidade de neutralizar e minimizar ameaças através das suas forças. O quadrante III demonstra a debilidade ofensiva da organização, indicando o quanto suas fraquezas dificultam de aproveitar ou conquistar as oportunidades. E por fim, o quadrante IV exprime a vulnerabilidade da organização, demonstrando o quanto suas fraquezas acentuam os riscos de as ameaças impactarem ou impedirem o aproveitamento de oportunidades futuras (PIO, 2004; BORSCHIVER, 2016).

A análise SWOT é amplamente utilizada como base para gestão e planejamento estratégico, mas podendo, devido a sua simplicidade, ser utilizada para análise de cenários. Esse tipo de análise tem a capacidade de demonstrar de forma simples, quais áreas do ambiente são mais críticas à organização (REALPE, 2016).

#### **4.5. Brainstorming**

A técnica de *brainstorming* é, sem dúvidas, uma das ferramentas de prospecção mais simples. É uma técnica de trabalho em equipe que tem como objetivo produzir o maior volume de informações possíveis a fim de identificar, por exemplo, pontos fortes e fracos de uma organização, fatores críticos de um determinado ambiente e soluções para dado problema (REIS et al., 2015).

O *brainstorming* é iniciado com a formação do grupo de trabalho e a definição do tópico a ser trabalhado. Salienta-se a importância da heterogeneidade do grupo. Inicialmente, orienta-se a equipe quanto ao objetivo do trabalho e as “regras do jogo”. Um ponto focal iniciará o processo de coleta de informações enquanto um auxiliador toma nota das mesmas em algum local de fácil visão (*flip-chart*, quadro negro/branco etc). Após a coleta desse grande volume de dados, pode-se realizar um filtro das informações geradas. O *brainstorming*, como uma ferramenta de prospecção, gera uma lista de informações que podem servir como base de análise de forma a orientar organizações na construção de possíveis cenários (PIO, 2014; BORSCHIVER, 2016).

#### **4.6. Metodologia Delphi**

A metodologia *Delphi* foi difundida no começo dos anos 60 por Olaf Helmes e consiste em uma técnica que busca o consenso de opiniões de um grupo de especialistas a respeito de eventos futuros (WRIGHT e GIOVINAZZO, 2000).

O método é realizado através da aplicação de questionários em rodadas sucessivas, e devem ser respondidos individualmente e de forma anônima, sendo estas rodadas administradas por uma equipe coordenadora.

O processo se inicia com a definição do objetivo do estudo. Em seguida, iniciam-se as análises exploratórias que consistem na busca de informações sobre o tema de estudo em literaturas específicas e através de entrevistas com profissionais especializados no assunto, os quais foram previamente selecionados (DIAS, 2007).

É indicado para situações em que ainda não se desenvolveu conhecimento teórico suficiente, quando não existem informações precisas ou dados históricos, ou em situações nas quais se deseja estimular novas ideias (WRIGHT e GIOVINAZZO, 2000). As primeiras aplicações da ferramenta se deram no estudo das tendências de longo prazo na sociedade e seu efeito sobre si mesmo, com especial ênfase na ciência e na tecnologia. Na Figura 7, observa-se uma visão holística da metodologia *Delphi*.

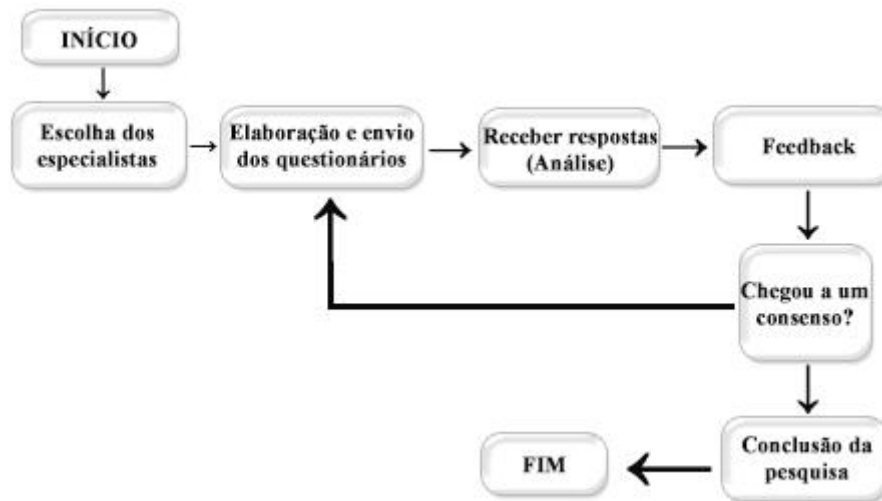


Figura 7: Visão geral da Metodologia Delphi.  
 Fonte: Barbalho, Fernandes e Correia (2018).

#### 4.7. A análise de artigos científicos e patentes como ferramentas no estudo de prospecção tecnológica

De acordo com Porter et al. (1991), citado por Santos et al. (2010), o monitoramento e sistemas de inteligência constituem fontes básicas de informação relevante e são comumente utilizados em estudos prospectivos. Ainda segundo os autores, o monitoramento em si não é uma técnica de prospecção, mas é fundamental pelo seu uso na busca de todas as fontes de informação a fim de produzir um variado conjunto de dados. Dentre estas principais fontes destacam-se artigos científicos e patentes.

Os artigos científicos por apresentarem resultados de estudos realizados por pesquisadores, apresentam-se como fonte de conhecimento para o desenvolvimento tecnológico. Estes documentos servem de literatura base para corroborar os estudos já existentes e inspirar novas pesquisas (BORSCHIVER e DA SILVA, 2016).

A análise de patentes é baseada no pressuposto que o aumento do interesse por novas tecnologias se refletirá no aumento da atividade de P&D e que isso, por sua vez, se refletirá no aumento do depósito de patentes. Assim, presume-se que se podem identificar novas tecnologias pela análise dos padrões de pedidos de patentes em determinados campos (SANTOS et al., 2010, p.209).

De acordo com Borschiver (2016), o crescimento anual aproximado no depósito de patentes no mundo é de 600 mil documentos. Além disso, destacam-se a abrangência de todos os campos tecnológicos, onde 80% das tecnologias possuem divulgação exclusiva por patentes, e a acessibilidade destes documentos por meios eletrônicos.

Ainda de acordo com Borschiver, esta metodologia se divide nos tópicos apresentados no fluxograma a seguir.

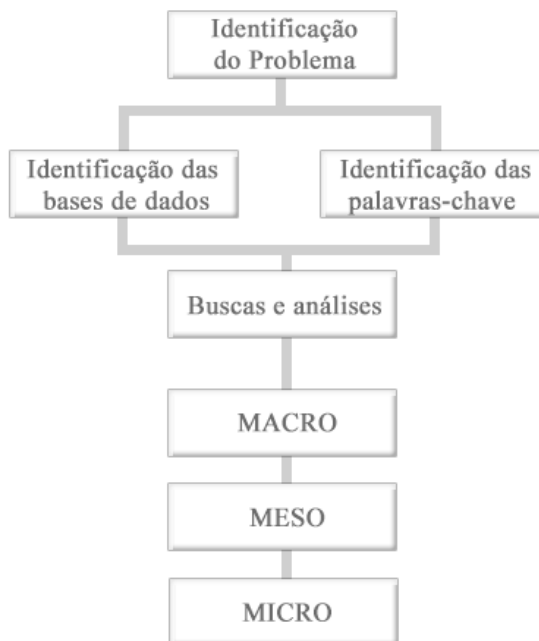


Figura 8: Fluxograma das etapas da metodologia selecionada.

Fonte: Slides de aula “Gestão Tecnológica e Propriedade Industrial”, prof.<sup>a</sup>: Suzana Borschiver, 2019.

A etapa de identificação do problema consiste em definir qual o assunto e os tipos de informações desejadas dentro da pesquisa nas bases de dados. De acordo com Borschiver (2016), é fundamental que esta fase seja bem definida para selecionar as melhores combinações de palavras-chave a fim de obter os melhores resultados nas buscas. As palavras-chave são escolhidas de forma que as buscas resultem no maior número de documentos possíveis e evitando perder informações relevantes dentro das bases de dados.

As etapas de análise se dividem em três níveis de detalhe: macro, meso e micro. Borschiver (2016) define que o nível macro consiste em uma análise geral sobre o determinado assunto, incluindo série histórica, origem dos depósitos e publicações e tipo de depositante (empresa, governo, centros de pesquisa, universidade, etc.). No nível

meso, os documentos são analisados individualmente e são categorizados de acordo com os aspectos mais relevantes de cada tema. A análises dos documentos podem ser em torno do título, do resumo, das reivindicações (no caso de patentes) ou mesmo no corpo do texto, e assim são criadas taxonomias que se referem ao foco de cada patente ou artigo. Em seguida, é realizada a análise micro de cada documento, onde são identificadas, detalhadas e analisadas as particularidades de cada taxonomia do nível meso. Nesta etapa, é feita uma descrição das taxonomias meso também na forma de “*drivers*”, onde é definida uma palavra que classifica algum detalhe mais recorrente do assunto estudado.

O estudo destes dois tipos de documentos e a interpretação das buscas realizadas permitem gerar uma base de dados sobre a biossíntese ou biotransformação de androstenediona, assim como, listar as principais rotas de síntese já existentes e as com potencial de desenvolvimento. Desta forma, este foi o método selecionado para o estudo de prospecção tecnológica no presente trabalho.

## **5. METODOLOGIA DE PESQUISA**

### **5.1. Estratégias de busca de artigos científicos**

A metodologia de busca de artigos científicos se baseou na busca de palavras-chave na base de dados *Scopus*, um produto da Editora *Elsevier*. É o maior banco de dados de referências técnicas e científicas revisado por pares, permitindo uma visão holística sobre o tema em estudo (<https://www.elsevier.com/pt-br/research-platforms>). Por meio dos mecanismos de busca, é possível encontrar as publicações realizadas segundo o autor, título ou assunto escolhido durante um período selecionado. Desta maneira, esta base de dados foi selecionada devido ao seu grande alcance, por ter rápido *download* e acesso aos documentos e ser de fácil manuseio, facilitando as análises posteriores.

Anteriormente a fase pré-prospectiva, uma pesquisa geral sobre 4-androstenediona foi realizada, a fim de buscar os artigos, *reports* e *reviews* mais atuais que abordavam a biossíntese de 4-AD. As palavras-chave (*biotransformation, biosynthesis, phytosterol, microbial, androstenedione, 4-androstenedione e androst-4-ene-3,17-dione*) encontradas com frequência nesses documentos foram utilizadas, posteriormente, na fase pré-prospectiva do presente trabalho.

Na fase pré-prospectiva, a busca foi realizada a partir das combinações de palavras-chave, citadas anteriormente, de acordo com a Tabela 5, filtrando apenas os documentos em que tais combinações apareciam somente no título (TITLE), resumo (ABS) e palavras-chave (KEY). Inicialmente, não foi realizado nenhum tipo de restrição quanto ao período de busca prospectado, sendo retornado pela pesquisa 352 documentos. Dos 352 artigos, 73 foram descartados devido à ausência de resumo e/ou duplicidade.

Tabela 5: Combinações de palavras-chave utilizadas na busca de artigos científicos realizada na base de dados SCOPUS.

<b>Palavras-chave</b>	<b>Resultados</b>
<b>TITLE-ABS-KEY ("biotransformation" AND "4-androstenedione")</b>	Documentos: 9
<b>TITLE-ABS-KEY ("biosynthesis" AND "4-androstenedione")</b>	Documentos: 46
<b>TITLE-ABS-KEY ("biosynthesis AND androst-4-ene-3,17-dione")</b>	Documentos: 61
<b>TITLE-ABS-KEY ("biotransformation" AND "androst-4-ene-3,17-dione")</b>	Documentos: 61
<b>TITLE-ABS-KEY ("phytosterol" AND "androst-4-ene-3,17-dione")</b>	Documentos: 14
<b>TITLE-ABS-KEY ("androstenedione" AND "microbial" AND biotransformation")</b>	Documentos: 88

TITLE: título; ABS: resumo; KEY: palavras-chave

Após a leitura dinâmica destes documentos, foram identificados um grande número de documentos não relevantes, ou seja, artigos que não abrangem a temática geral do trabalho, isto é, a biossíntese da androstenediona.

Sendo assim, realizou-se uma nova estratégia de busca restringindo o período de busca de janeiro de 2000 a fevereiro de 2020, já que um número considerado de documentos relevantes se enquadrava dentro desse período.

Toda a fase de busca e leitura dinâmica dos documentos foi realizada no período do dia 09 de novembro de 2019 a 23 de fevereiro de 2020. Após a análise dos documentos, estes foram classificados no nível Macro, Meso e Micro.

**Análise Macro:** foram listados os dados primários de cada documento. Os critérios utilizados foram: ano, país, local onde foi publicado, autores, universidade/centro de pesquisa, parceira entre países e competência (farmacêutica, biotecnologia, etc.).

**Análise Meso:** foram definidas as taxonomias para classificar cada documento analisado. Essa classificação se baseou na leitura dos resumos para identificar o assunto principal de cada artigo. As taxonomias definidas estão listadas a seguir.

- **Tecnologias/Rotas:** documentos que detalham algum método/rota para a produção de 4-AD, assim como as tecnologias, substratos, meios de cultivo e microrganismos utilizados.

- **Aplicações/Usos da Molécula:** documentos que listam diferentes aplicações da molécula, seja no tratamento de alguma doença ou como intermediário para a produção de outra substância.

- **Intermediário Metabólico:** documentos que abordam a participação do composto no metabolismo, como por exemplo, para estimular a produção de algum outro hormônio ou substância, até mesmo que descrevem a produção de 4-AD *in vivo*.

- **Aprimoramento de processo:** documentos que citam aprimoramentos/melhorias em algum processo de produção de 4-AD, como por exemplo, engenharia genética com intuito de aumentar a produtividade do processo.

- **Outros:** documentos que aparecem em pouca quantidade e que não se encaixam em nenhuma das taxonomias anteriormente citadas.

**Análise Micro:** foram detalhadas as particularidades de cada documento pertencente a duas taxonomias Meso, sendo definidas taxonomias Micro para classificar os documentos segundo os assuntos mais recorrentes.

Durante a análise Macro e Meso, as quais foram realizadas em paralelo, identificou-se a necessidade de classificar os artigos em “irrelevantes” e “de interesse” a fim de reduzir o volume de documentos que, posteriormente, seriam analisados a nível micro. A classificação “de interesse” abrange os artigos que abordam a biossíntese da androstenediona utilizando fitoesteróis como substrato.

Salienta-se que a análise Micro foi realizada apenas para os documentos de interesse já que é incoerente ir tão afundo na análise de artigos que não abordam a síntese de interesse. Além disso, é importante ressaltar que cada documento pode ser enquadrado em mais de uma taxonomia tanto no nível Meso como no Micro.

## 5.2. Estratégias de busca de patentes

A metodologia de busca de patentes consistiu no emprego de combinações de palavras-chave na base de dados USPTO (*United States Patent and Trademark Office*). Esta base americana apresenta mais de 7 milhões de patentes com texto completo, contendo a maior parte dos depósitos de patentes, possibilitando uma grande variedade de resultados.

A estratégia de escolhas de palavras-chave levou em consideração a possibilidade de cruzar mais de duas palavras dentro da base de dados USPTO, utilizando a função “*Advanced Search*” dentro das opções de pesquisa. Focando no tema do trabalho que gira em torno da biotransformação ou biossíntese de 4-AD, as palavras-chave escolhidos para realizar as buscas foram “*androstenedione AND (biotransformation OR biosynthesis)*” e “*andros-4-ene-3,17-dione AND (biotransformation OR biosynthesis)*”. Desta maneira, dentro de uma mesma busca, encontram-se resultados referentes a biotransformação e biossíntese, apenas variando a escrita de 4-AD. Vale ressaltar que a busca com as palavras “*4-androstenedione AND (biotransformation OR biosynthesis)*” apresenta poucos resultados, que estão dentro dos obtidos na busca com “*androstenedione AND (biotransformation OR biosynthesis)*”, que apresentou uma quantidade de patentes consideravelmente maior.

As combinações de palavras-chave para a busca de patentes (Tabela 6) foram diferentes das utilizadas na busca de artigos, a fim de, através da uma pesquisa avançada no site da USPTO, permitir uma maior quantidade no número de documentos. O período selecionado para a busca de patentes concedidas foi de janeiro de 1976 a março de 2020, enquanto para a busca de patentes solicitadas foi de janeiro de 2001 a março de 2020. O campo de busca das pesquisas foi de “busca avançada”, que leva em consideração todo o texto das patentes.

Tabela 6: Combinações de palavras-chave da busca de patentes na base de dados USPTO.

<b>Palavras-chave</b>	<b>Resultados</b>
<b>androstenedione AND (biotransformation OR biosynthesis)</b>	Concedidas: 573 Solicitadas: 728
<b>androst-4-ene-3,17-dione AND (biotransformation OR biosynthesis)</b>	Concedidas: 60 Solicitadas: 41

A pesquisa apontou 633 patentes concedidas e 769 patentes solicitadas. Analisando os documentos previamente, observou-se que a grande maioria não era de



interesse dentro da proposta do trabalho, que é a biotransformação ou biossíntese de 4-AD. Para selecionar os documentos de interesse, analisou-se o título e o resumo de cada documento potencial. Após a leitura do conteúdo de cada um, os documentos selecionados foram classificados utilizando a mesma metodologia citada anteriormente para os artigos (Nível Macro, Meso e Micro).

Salienta-se que em relação a análise Meso, as patentes foram classificadas em apenas três taxonomias: Tecnologias/ Rotas; Aplicações/ Uso da molécula; e Intermediário Metabólico. Além disso, no caso das patentes, todas as análises (macro, meso e micro) foram realizadas apenas para o grupo de documentos os quais foram classificados como “de interesse”.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 6.1. Artigos Científicos

Com o refinamento da estratégia de busca, foram retornados 179 artigos, sendo 41 classificados como de interesse, isto é, aqueles que abordam a biossíntese da androstenediona utilizando fitoesteróis como substrato, e 138 irrelevantes.

Importante salientar que as análises Macro e Meso foram realizadas para todos os 179 artigos, sendo a Micro realizada apenas para os 41 artigos classificados como de interesse.

Tabela 7: Combinações de palavras-chave utilizadas na busca de artigos científicos na base de dados SCOPUS após refinamento da busca.

Palavras-chave	Número de documentos	
	Irrelevantes	De interesse
<b>TITLE-ABS-KEY</b> ("biotransformation" AND "4-androstenedione")	6	0
<b>TITLE-ABS-KEY</b> ("biosynthesis" AND "4-androstenedione")	18	0
<b>TITLE-ABS-KEY</b> ("biosynthesis AND androst-4-ene-3,17-dione")	9	5
<b>TITLE-ABS-KEY</b> ("biotransformation" AND "androst-4-ene-3,17-dione")	46	7
<b>TITLE-ABS-KEY</b> ("phytosterol" AND "androst-4-ene-3,17-dione")	8	6
<b>TITLE-ABS-KEY</b> ("androstenedione" AND "microbial" AND "biotransformation")	51	23
<b>TOTAL</b>	138	41

#### 6.1.1. Análise Macro dos Artigos Publicados

A análise macro está relacionada com a série histórica das publicações, a quantidade de publicações por país ao longo do período estudado e a distribuição de artigos por universidades, centros de pesquisa e até mesmo empresas farmacêuticas que

produzem/comercializam hormônios esteroides como ao intermediário androstenediona.

Como citado no item 5.1 do Capítulo 5, a análise macro foi realizada para todo o volume de artigos retornados pela estratégia de busca definida, compreendendo um total de 179 artigos.

A primeira análise realizada foi a evolução de publicações de artigos ao longo dos anos, desde os anos 2000 até 2020, conforme mostra a Figura 9, ressaltando que as buscas foram realizadas do dia 09 de novembro de 2019 a 23 de fevereiro de 2020, o que justifica o baixo número de artigos no ano atual. Através da Figura 9 é possível observar a oscilação de publicações ao longo dos anos, ocorrendo um pico de 23 artigos publicados no ano de 2017. A consultoria “*Transparency market research*” (<https://www.transparencymarketresearch.com/androstenedione-market.html>) abordou, em um dos seus estudos sobre o mercado global de androstenediona, que a taxa de controle de fertilidade caiu 16% nos Estados Unidos durante o ano de 2017, gerando a expansão do mercado de androstenediona. Desta maneira, justifica-se o pico de publicações ocorridos em 2017, já que o aumento dos níveis de androstenediona em mulheres é considerado pelos estudiosos (MORAES et al., 2002; NORMANDO et al., 2003), um grande fator para doenças que impedem a gravidez como endometriose e ovários policísticos.

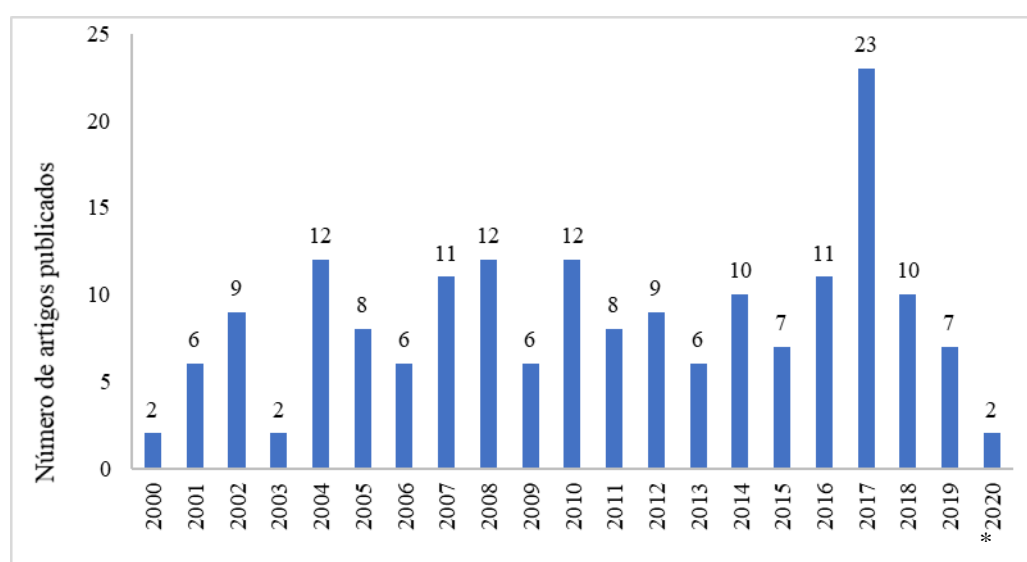


Figura 9: Evolução temporal de artigos científicos publicados que abordam a biossíntese de androstenediona. Fonte: Elaboração própria a partir da base de dados SCOPUS. \*Até fevereiro de 2020.

Outra ótica de análise refere-se à origem das publicações, onde é possível identificar os países com maior volume de publicações sobre a temática. A Figura 10 traz a distribuição de artigos publicados de acordo com o país. É possível notar que o país com maior publicação de artigos no período de estudo é a China. Esse número é mais de três vezes maior em relação ao segundo colocado, sendo que 22 destes artigos abordam rotas e tecnologias envolvidas na produção de androstenediona. Os Estados Unidos se encontram em segundo lugar com 17 artigos publicados e a Rússia aparece em terceiro lugar com 16 publicações.

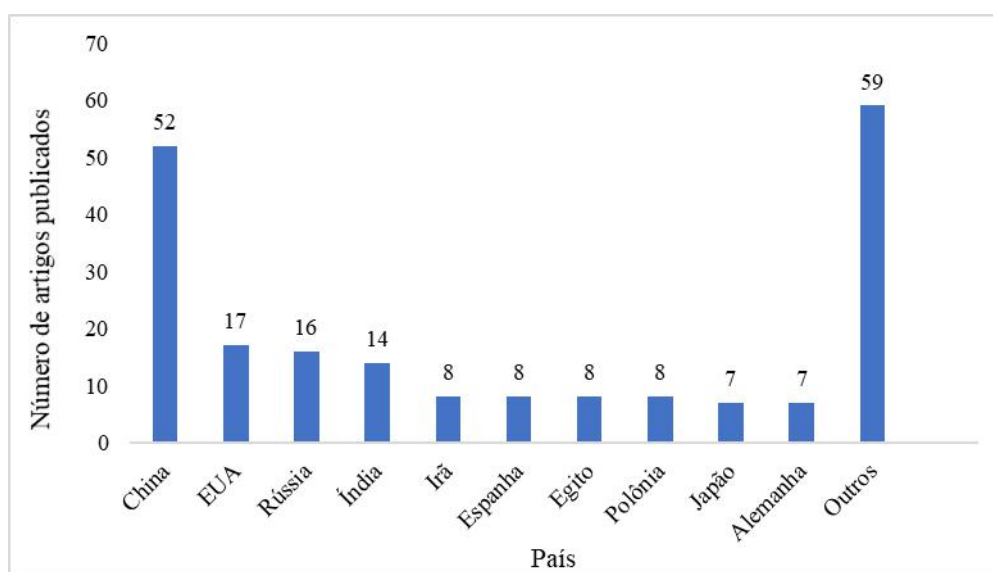


Figura 10: Países com artigos científicos publicados entre os anos 2000 e 2020 que abordam a biossíntese de androstenediona. Fonte: Elaboração própria a partir da base de dados SCOPUS.

Importante ressaltar que o Brasil, de acordo com a metodologia de busca para o período pesquisado, publicou apenas um artigo científico, intitulado “*Non-terpenoid biotransformations by Mucor species*”. Os autores são pesquisadores da Universidade de São Paulo em parceria com pesquisadores da Universidade de Cádiz na Espanha. O foco do trabalho é realizar uma revisão sobre a biotransformação por fungos *Mucor spp* de compostos não terpenóides como esteroides, cumarinas, flavonoides, drogas pesticidas etc. São reportadas duas espécies de fungos (*M. racemosus* e *M.piriformis*) que são capazes de gerar hidroxisteróides de grande importância para indústria farmacêutica a partir de androstenediona, como derivados de 7 $\alpha$ -hydroxy (7 $\alpha$ -hydroxyandrost-4-en-3,17-dione) os quais podem ser usados na produção de compostos diuréticos e são extremamente difíceis de serem sintetizados por via química.

(FARAMARZI *et al.*, 2008) (KRISHNAN *et al.*, 1991). Na denominação “Outros” foram enquadrados os países que alcançaram 6 publicações ou menos, conforme apresentado na Tabela 8:

Tabela 8: “Outros” países com artigos científicos publicados entre 2000 e 2020 que abordam a biossíntese de androstenediona. Fonte: Elaboração própria a partir da base de dados SCOPUS.

<b>País</b>	<b>Nº de artigos publicados</b>
Bulgária	5
Paquistão	5
Turquia	5
Reino Unido	4
França	3
Holanda	3
Itália	3
Portugal	3
Taiwan	3
Arábia Saudita	2
Austrália	2
Bélgica	2
Canadá	2
Chile	2
Coreia do Sul	2
Inglaterra	2
Tailândia	2
Vietnã	2
Bielorrússia	1
Brasil	1
Eslovênia	1
Hungria	1
Kuwait	1
Noruega	1
Sri Lanka	1

Quanto a parceria entre países, foram levantadas um total de 21. A Figura 11 mostra as parcerias mais recorrentes entre países, isto é, que aparecem duas ou mais vezes. É possível observar que cerca de 60% envolvem colaborações entre a China e os EUA, evidenciando o domínio científico desses países no cenário global. Um dos artigos incluídos nessa parceria intitulado “*Efficient androst-1,4-diene-3,17-dione production by co-expressing 3-ketosteroid- $\Delta$ 1-dehydrogenase and catalase in *Bacillus subtilis**”, aborda uma metodologia para aumentar a produtividade de ADD utilizando AD como

substrato. A enzima 3-ketosteroid-D1-dehydrogenase (KSDD), dependente do dinucleótido de flavina-adenina (FAD), catalisa a conversão de AD em ADD. No entanto, a baixa atividade da KSDD e os efeitos tóxicos do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) produzido através da regeneração do FAD impactam a produtividade da bioconversão de AD em ADD. Neste estudo, foram implementados mecanismos de otimização de códons a fim de aumentar a atividade enzimática, além de utilizar co-expressão da KSDD e catalase no micro-organismo *Bacillus subtilis*. A combinação dessas técnicas com a estratégia da bioconversão em batelada alimentada levou a atingir a maior produtividade reportada até o ano de 2016, 0,175 g l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

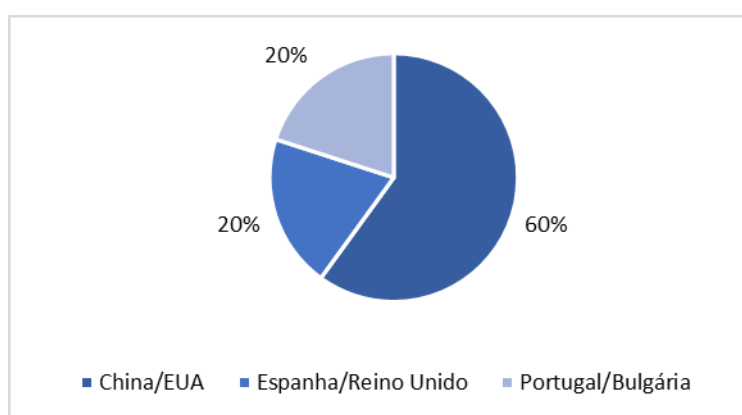


Figura 11: Parcerias mais recorrentes entre países que publicaram artigos científicos que abordam a biossíntese de androstenediona. Fonte: Elaboração própria a partir da base de dados SCOPUS. EUA: Estados Unidos da América.

Quando analisado o tipo de autor (Universidade, Centro de Pesquisa e/ou Empresa) é possível observar que a maioria dos artigos científicos publicados é oriunda de universidades, conforme a Figura 12. Nota-se que 70% foram publicados por universidades, 28% por centros/institutos de pesquisa e apenas 2% por empresas. Dentre os 2% existem 4 empresas, sendo elas detalhadas na Tabela 9.

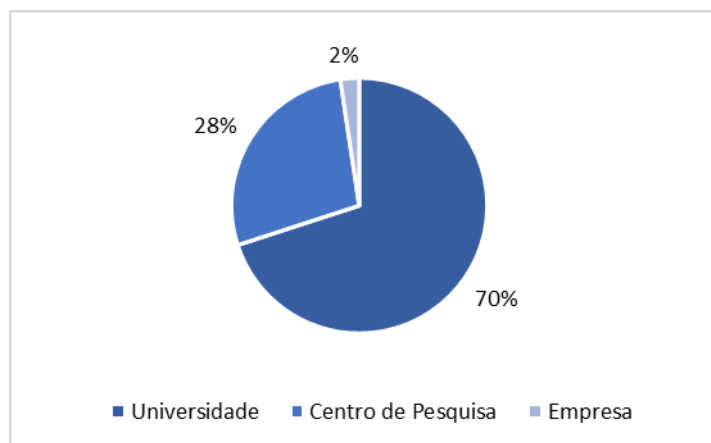


Figura 12: Origem dos artigos científicos publicados que abordam a biossíntese de androstenediona. Fonte: Elaboração própria a partir da base de dados SCOPUS.

Uma das empresas, com 2 artigos publicados, sendo 1 destes publicados em 2017 e 1 em 2020, é a Pharmins, uma empresa privada fundada em 2011 que nasceu do “*Laboratory of Microbial Transformation of Organic Compounds*” dentro da “*Russian Academy of Sciences*”. A Pharmins é especialista em desenvolver biocatalisadores industriais além de produzir insumos farmacêuticos ativos (API’s) e intermediários chaves como AD, ADD, DHEA e etc. As demais empresas estão em segundo lugar, começando pela Balkanpharma, com 1 artigo publicado em 2006, que está situada na Moldávia, país do leste europeu, e se auto intitula como uma das empresas mais confiáveis e seguras do mercado farmacêutico produzindo desde hormônios anabólicos/androgênicos até antiestrogênicos. Em seguida, com um artigo publicado em 2017, tem-se a Hunan Yuxin Pharmaceutical Co. Fundada em 2002 e localizada na China, a Hunan é um importante *player* do mercado internacional de esteroides. Por último, com uma publicação em 2017, tem-se a Gadea Biopharma que faz parte de um grupo farmacêutico espanhol composto por outras duas companhias (Crystal Pharma e Bioraw)

Tabela 9: Artigos científicos publicados por empresas de 2000 a 2020, que abordam a biossíntese de androstenediona. Fonte: Elaboração própria a partir da base de dados SCOPUS.

<b>Empresa</b>	<b>Nº de artigos publicados</b>
Pharmins Ltd	2
Balkanpharma	1
Hunan Yuxin Pharmaceutical Co. Ltd	1
Gadea Biopharma	1

A Tabela 10 lista as universidades com mais de 3 artigos publicados, o país e o número de artigos publicados por cada uma delas. A *Tianjin University of Science and*

*Technology* se encontra em primeiro lugar com 16 artigos publicados, seguida pela *East China University of Science and Technology* e pela *University of Wrocław*, ambas com 7 artigos.

Das 84 publicações com origem em universidades listadas abaixo, cerca de 39% provêm de instituições chinesas, o que ratifica o monopólio científico da China na área de compostos esteroides já anteriormente sinalizado.

Tabela 10: Universidades com três ou mais artigos científicos publicados de 2000 a 2020, que abordam a biossíntese de androstenediona. Fonte: Elaboração própria a partir da base de dados SCOPUS.

<b>Universidade</b>	<b>País</b>	<b>Nº artigos publicados</b>
<b>Tianjin University of Science and Technology</b>	China	16
<b>East China University of Science and Technology</b>	China	7
<b>University of Wrocław</b>	Polônia	7
<b>Sakarya University</b>	Turquia	5
<b>University of Karachi</b>	Paquistão	5
<b>Sakarya University</b>	Turquia	5
<b>Cairo University</b>	Egito	4
<b>Devi Ahilya University</b>	Índia	4
<b>Jiangnan University</b>	China	4
<b>Laval University Hospital Research Center</b>	Canadá	4
<b>Lomonosov Moscow State University</b>	Rússia	4
<b>Zhejiang University</b>	China	3
<b>Shanghai Jiao Tong University</b>	China	3
<b>National Taiwan University</b>	Taiwan	3
<b>Instituto Superior Técnico</b>	Portugal	3
<b>The Ohio State University</b>	EUA	3
<b>Bulgarian Academy of Sciences</b>	Bulgária	3
<b>Univ. Lusofona Humanidades Tecnol</b>	Portugal	3

### **6.1.2. Análise Meso dos Artigos Publicados**

A Figura 13 apresenta a análise Meso dos artigos científicos baseada em cinco taxonomias distintas, as quais foram previamente descritas na metodologia do presente trabalho. Ao analisar a Figura 13, é possível observar que a taxonomia “Tecnologias/Rotas” de produção de 4-AD é o mais presente nos artigos estudados. Dos 179 documentos analisados, em 43 deles há informações sobre a “Aplicação” de 4-AD como intermediário na produção de outros compostos; 23 deles abrangem técnicas de



aprimoramento/melhorias no processo de produção de 4-AD e 18 documentos discorrem sobre a atuação do composto no metabolismo ou descrevem sobre a sua produção *in vivo*. Olhando apenas para as duas taxonomias mais frequentes, “Tecnologia/Rotas” e “Aplicações”, tem-se um total de 124 artigos, cerca de 69% do total de documentos, o que evidencia o movimento da academia na busca do desenvolvimento de tecnologias e rotas de produção de 4-AD e até mesmo seu uso como precursor de outros compostos de interesse industrial.

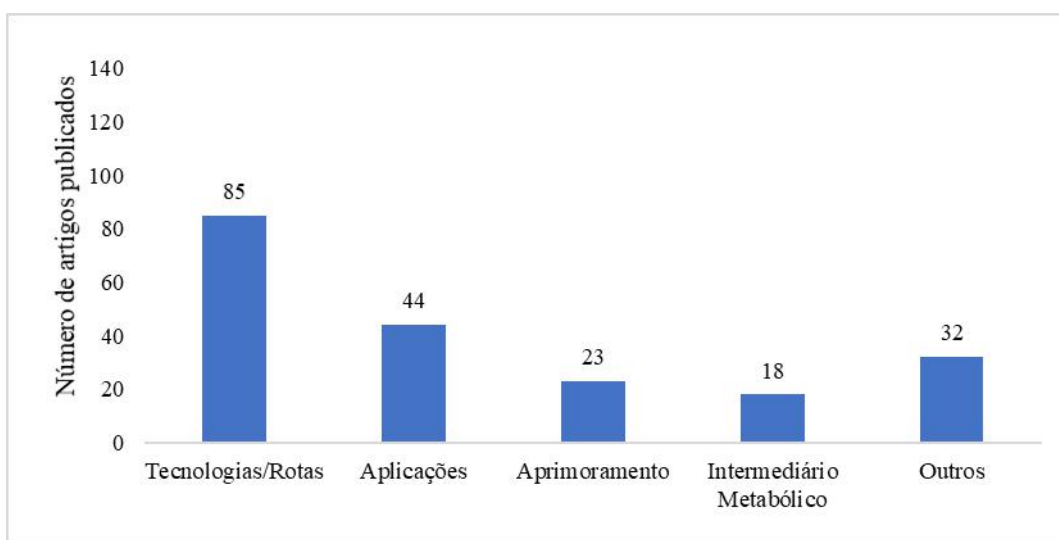


Figura 13: Distribuição dos artigos científicos publicados que abordam a biossíntese de androstenediona de acordo com as taxonomias definidas. Fonte: Elaboração própria a partir da base de dados SCOPUS.

Ao analisar os resumos dos artigos que se enquadram na taxonomia “Tecnologias/Rotas”, observa-se que estes abordam as variáveis de processo envolvidas na produção de 4-AD, como por exemplo, controle de oxigenação, rotação, temperatura, concentração de substrato etc. Além disso, são citados os micro-organismos produtores de 4-AD, sendo os mais recorrentes *Mycobacterium neoaurum* e *Mycobacterium sp*; processos de purificação (extração, absorção e precipitação); utilização de fontes diversas de fitoesterol como óleos de soja, girassol e milho; e também, estratégias de produção como uso de sistema bifásico.

Em relação aos documentos incluídos na taxonomia “Aplicações”, nota-se que em sua grande maioria, dissertam sobre a utilização de androstenediona como substrato na produção de ADD, boldenona e até mesmo testosterona. Além destes compostos, a bioconversão de AD gerou diversos outros compostos como: 6 $\beta$ , 17 $\beta$ -Dihydroxyandrost-4-en-3,16-diona, 15 $\alpha$ -hidroxiandrosta-1,4-dien-17-ona, 17 $\beta$ -hidroxiandrosta-1,4-dien-3-

ona,  $11\alpha$ -hidroxiandrost-4-eno-3,17-diona,  $11\alpha$ ,  $17\beta$ -dihidroxiandrost-4-en-3-ona e etc; inclusive ácido testólico e testoslactona, sendo este último comercializado com o nome de TESLAC, considerado como um medicamento pioneiro no tratamento de câncer de mama devido ao sua capacidade de inibição da aromatase (LONE e BHAT, 2015). Nestes documentos também são realizados inúmeros testes com variados micro-organismos a fim de identificar os produtos gerados a partir da biotransformação de AD.

Já na taxonomia “Aprimoramento de processo”, grande parte dos documentos abordam a ampliação da bioconversão de fitoesteróis em AD por meio do aumento da permeabilidade da membrana celular e solubilidade dos esteroides através do uso de substâncias como: D,L-norleucina, m-fluorofenialanina, etambutol, óleo de soja, solventes orgânicos, por exemplo, etanol; e ciclodextrina, sendo este último, o mais citado entre os artigos estudados. Além disso, foram utilizadas diversas estratégias de engenharia genética em *Mycobacterium neoaurum*, como por exemplo, a fim de aumentar a produção de AD. Foi demonstrado também que a deleção de dois genes em *Mycobacterium smegmatis mc<sup>2</sup>155* tornou essa espécie capaz de assimilar fitoesterol ao invés de somente colesterol e produzir 4-AD (GALÁN et al., 2017).

Os documentos que se enquadram na taxonomia “Intermediário Metabólico” avaliam, em sua maioria, as vias de produção de andrógenos em pacientes com doenças como câncer de próstata e ovário, hiperplasia congênita grave e hiperplasia benigna da próstata (BPH), a fim de identificar mecanismos de inibição da enzima envolvida na biossíntese de andrógenos, a  $5\alpha$ -redutase. É amplamente discutido em alguns destes artigos, a utilização de dutasterida e finasterida, sendo este último um antiandrógeno conhecido e nomeado comercialmente como “PROSCAR” (YAMANA, LABRIE e LUU-THE, 2010). Além disso, são estudados também a biossíntese de andrógenos como 4-AD em animais, tal como, a ingestão de alimentos mofados por cavalos com o intuito de verificar se a digestão do mesmo leva a produção de esteroides anabólicos.

Na taxonomia “Outros” se encontram documentos os quais não se enquadraram em nenhuma das taxonomias apresentadas. A maior parte deles somente cita androstenediona como exemplo no resumo, porém, destoando completamente dos assuntos aqui abordados sendo dispensável uma abordagem mais aprofundada já que não corrobora com o presente trabalho.

A Figura 14 apresenta a evolução temporal dos artigos publicados, de acordo com a classificação Meso. É possível observar que, em todos os anos, o número de publicações com o tema “Tecnologia/Rotas” foi superior aos demais. No ano de 2017,

ocorreram os maiores números de publicações por taxonomia, corroborando com a evolução temporal discutida na análise Macro, que mostrou que a comunidade acadêmica acompanhou o movimento do mercado global de androstenediona.

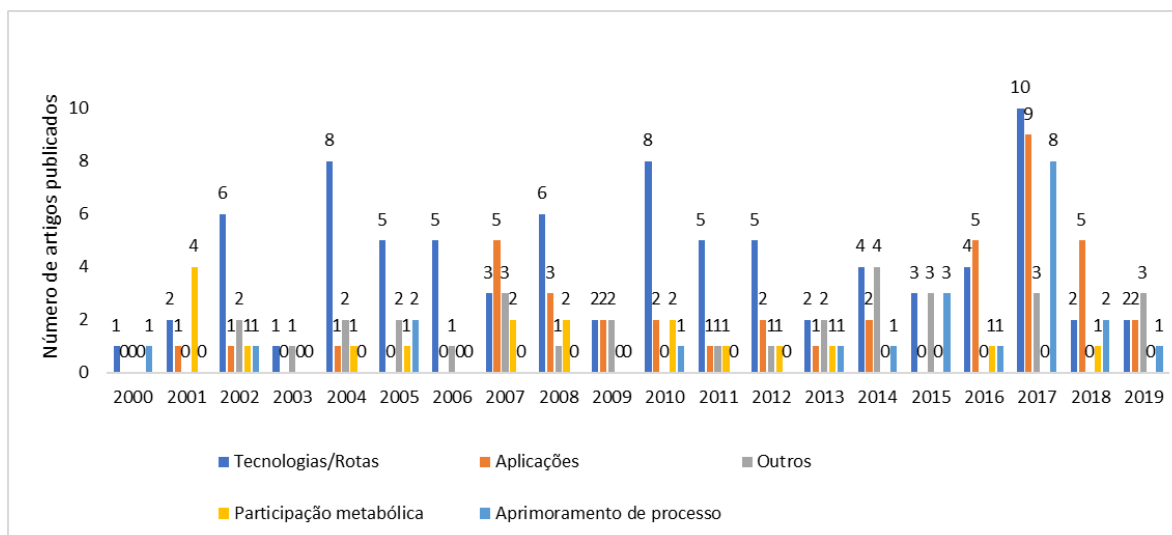


Figura 14: Evolução temporal dos artigos científicos publicados que abordam a biossíntese de androstenediona, segundo as taxonomias definidas na classificação Meso. Fonte: Elaboração própria a partir da base de dados SCOPUS.

### 6.1.3. Análise Micro dos Artigos Publicados

Na análise micro obtém-se o detalhamento das taxonomias definidas na Análise Meso. Importante ressaltar que, no caso dos artigos, a Análise Micro foi realizada apenas para os documentos que abordam a biossíntese de androstenediona a partir de fitoesteróis, isto é, os documentos classificados como de interesse. Dentre as taxonomias definidas na análise Meso apenas duas foram destrinchadas na análise Micro, sendo elas: “Tecnologias/Rotas” e “Aprimoramento”, pois o maior interesse do trabalho se encontra na biossíntese de AD a partir de fitoesteróis e não na aplicação de AD.

#### 6.1.3.1. Tecnologias/Rotas

A Figura 15 traz a distribuição de documentos classificados na taxonomia “Tecnologias/Rotas”. A maioria dos artigos especifica e realiza testes com diversos micro-organismos a fim de identificar se os mesmos produzem androstenediona. Além

disso, especificam também os substratos utilizados e realizam testes de variação dos mesmos.

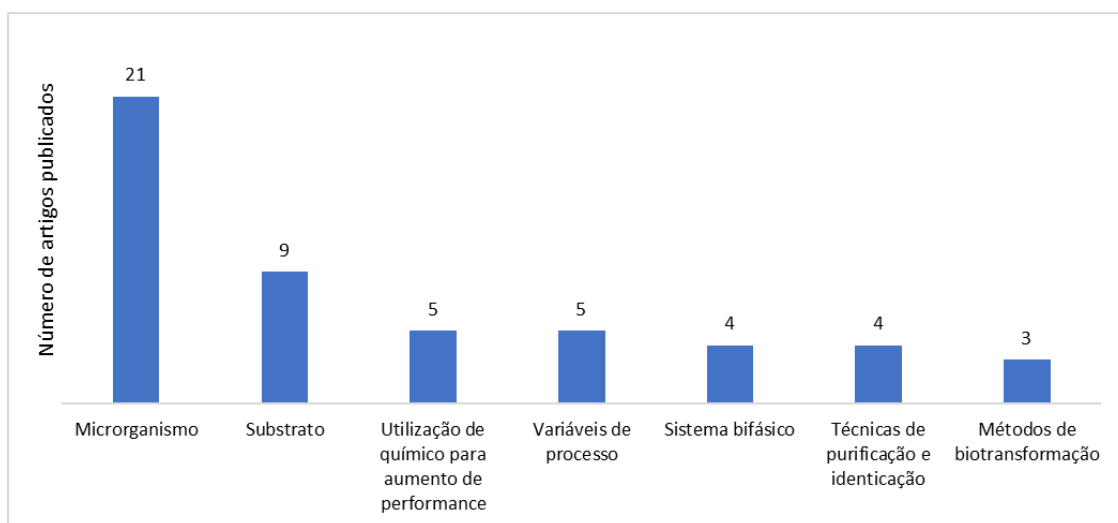


Figura 15: Distribuição dos artigos científicos publicados que abordam a biossíntese de androstenediona utilizando fitoesteróis como substrato, classificados com a taxonomia “Tecnologias/Rotas”. Fonte: Elaboração própria a partir da base de dados SCOPUS.

Dos 21 documentos prospectados na categoria “Microorganismo”, 9 artigos abordam variações da espécie *Mycobacterium sp.* e 5 sobre *Mycobacterium neoaurum*. Os demais artigos citam as seguintes espécies como possíveis produtoras de 4-AD: *Alkalibacterium olivoapovliticus*, *Mycobacterium spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium fortuitum subsp*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nidulans* e *Mycobacterium vaccae*. Como exemplo dessa taxonomia, Donova et al. (2005) no artigo intitulado “*Mycobacterium sp. mutant strain producing 9 $\alpha$ -hydroxyandrostenedione from sitosterol*”, realizaram a mutagênese da cepa parental *Mycobacterium sp.* VKM Ac-1815D por agentes químicos e irradiação UV combinado com uma pressão de seleção por sitoesterol, com o objetivo de identificar micro-organismos produtores de AD e 9-OH-AD a partir de sitoesterol. A cepa *Mycobacterium sp.* VKM Ac-1815D teve como seu produto majoritário 4-AD (73% de rendimento molar) e o mutante selecionado (*Mycobacterium sp.* 2-4 M) foi capaz de produzir 9-OH-AD como produto majoritário (50% de rendimento molar), além de 4-AD (22% de rendimento molar), outros metabólitos 9 $\alpha$ -hidroxilados com quebra parcial da cadeia lateral foram identificados.

Nove publicações referem-se à classificação “Substratos”. Nestes documentos verifica-se a utilização de diversos tipos de fitoesteróis na sua forma pura e também diretamente da matéria-prima como: óleos de soja, canola, coco, palma, milho e até da

matéria insaponificável do óleo de farelo de arroz. Sripalakit e Saraphanchotiwitthaya (2016) avaliaram a viabilidade e os benefícios da utilização de fitoesteróis contidos em óleos vegetais. Foi confirmado que o óleo de canola é o que apresenta maior produção de AD e ADD em comparação aos outros óleos vegetais e que a estrutura do fitoesterol impacta na eficiência da bioconversão.

Yuan *et al.* (2017) investigaram a biocompatibilidade de 13 tipos de líquidos iônicos (LI) com células no estado de repouso de *Mycobacterium sp.*, para a produção de AD a partir de fitoesteróis, além de verificar algum tipo de alteração na performance da bioconversão. Foi observada a biocompatibilidade da espécie aos LI's com ânions [PF<sub>6</sub>] e [NTf<sub>2</sub>], e verificou-se que o sistema bifásico (LI/meio aquoso) contendo [PrMIM][PF<sub>6</sub>] foi o que promoveu uma maior produção de AD (cerca de 2,35 g.L<sup>-1</sup>) após 12 horas de ensaio, uma redução de tempo de 10x em comparação a pesquisa anterior realizada em 2016 pelos próprios autores. A utilização de sistema bifásico é bastante promissora pois, além do aumento da produtividade da produção de AD, os IL's são considerados solventes verdes, sendo uma alternativa aos solventes orgânicos pois possuem pressão de vapor insignificante, alta termoestabilidade e propriedades físico-químicas ajustáveis, não são inflamáveis e possuem alta capacidade de dissolução (GHAEDIZADEH *et al.*, 2016; QUIJANO *et al.*, 2010; AMARASEKARA, 2016; MARQUES *et al.*, 2010; LOU *et al.*, 2006).

Stefanov e colaboradores (2006), estudaram os efeitos das variações das condições de processo na biotransformação de fitoesterol em AD e ADD por *Mycobacterium sp. MB3683* num sistema bifásico. Os efeitos da velocidade de agitação, da idade e quantidade de inóculo, da temperatura e de algumas outras fontes adicionais de carbono foram investigadas. Foi observada uma maior taxa de conversão de 10-15% com ensaio utilizando inóculo numa idade de 16-20h, com temperatura entre 34-35 °C e agitação de 400 rpm. Além disso, foi verificado que meios contendo altas concentrações de carboidratos têm um impacto negativo na bioconversão devido a preferência do micro-organismo por esses tipos de fontes orgânicas de carbono ao invés de fitoesterol.

Cinco publicações relatam o emprego de agentes químicos para aumento da performance na biotransformação de fitoesteróis em 3,17-diketoesteróides (AD, ADD e 9-OH-AD). Josefsen *et al.* (2017), por exemplo, testaram estratégias para superar os desafios da insolubilidade de substrato (fitoesterol) e produto (AD, ADD) em água, como por exemplo a utilização de ciclodextrina modificada (Me-β-CD e HP-β-CD).

Quatro artigos prospectados dissertam sobre técnicas de purificação e extração de 4-AD do meio de cultivo. Josefsen *et al.* (2017) utilizaram acetato de etila e Thygs e Merz (2017) realizaram a técnica de extração em fluxo cruzado com etanol para extrair o produto. Já Huang *et al.* (2006) adicionaram a resina Amberlite XAD-7 ao meio de cultivo agindo como um adsorvente; posteriormente AD e ADD foram purificados utilizando cromatografia em coluna de sílica gel, sendo o efluente, em seguida, evaporado por despressurização do sistema. Por último, Gulla e colaboradores (2008) realizaram a extração de AD e ADD com clorofórmio e depois evaporação do mesmo utilizando vácuo.

Três documentos apresentam novas técnicas e métodos de bioconversão de fitoesteróis em AD que vem sendo reportados na literatura. Malavya e Gomes (2008) fizeram uma revisão das metodologias de biotransformação, dentre elas estão: biotransformação em meio aquoso, em sistema bifásico, em sistema de ponto de nuvem, usando catalizadores imobilizados e microemulsões e lipossomas. A técnica de microdispersão aquosa de fitoesteróis com tamanho de partícula de 370nm é estudada por Mancilla e colaboradores (2017). Já Cruz *et al.* (2004) abordam a utilização de Di(2-etilhexil) ftalato (DEHP) como meio reacional na biotransformação de  $\beta$ -sitoesterol em AD a partir de células livres suspensas de *Mycobacterium sp.* NRRL B-3805.

### 6.1.3.2. Aprimoramento

A Figura 16 traz a quantidade e os assuntos dos artigos classificados na taxonomia “Aprimoramento”.

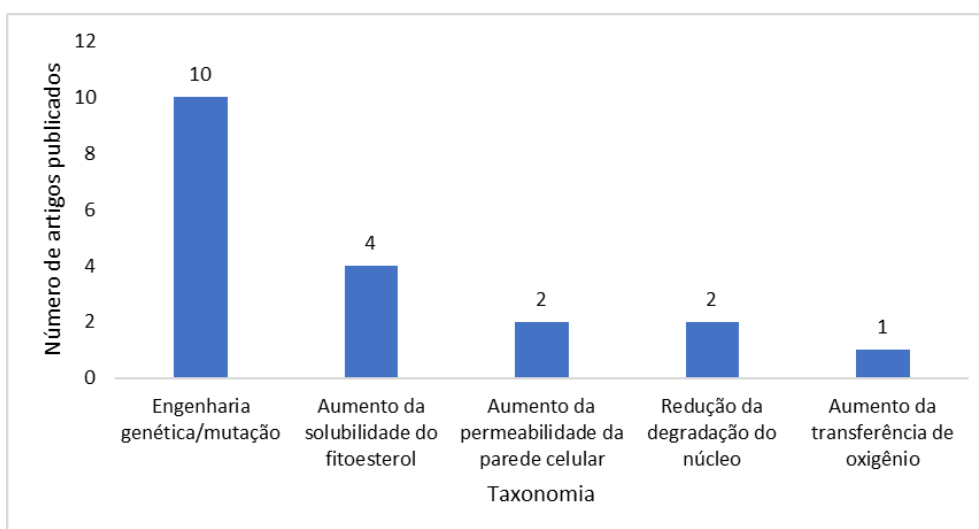


Figura 16: Distribuição dos artigos científicos publicados que abordam a biossíntese de androstenediona utilizando fitoesteróis como substrato, classificados com a taxonomia “Aprimoramento”. Fonte: Elaboração própria a partir da base de dados SCOPUS.

O destaque, compreendendo mais de 50% dos artigos, são as publicações que abordam Engenharia genética e mutações com o intuito de aumentar a performance da biotransformação de fitoesteróis em androstenediona. Su *et al.* (2018), por exemplo, realizaram a superexpressão do gene *cyp125-3* em *Mycobacterium neoaurum* TCCC 11978 com o objetivo de aumentar a produtividade de AD, já que a produção de AD aumenta quando a cepa possui uma razão  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  alta e tal gene está envolvido diretamente na via de degradação de fitoesterol e conseqüentemente, na geração de  $\text{NAD}^+$ .

Quatro publicações dissertam sobre alternativas para aumento da solubilidade de fitoesteróis no meio reacional. Nestes trabalhos, são utilizados sistemas bifásicos, ciclodextrinas e diversos tipos de solventes orgânicos como agente dispersante a fim de mitigar o problema da hidrofobicidade dos fitoesteróis. Xu *et al.* (2015) utilizaram 6 tipos de solventes orgânicos e 8 tipos de ciclodextrina para aumentar a dissolução do fitoesterol na biotransformação por *Mycobacterium sp. MB 3863*. Os solventes orgânicos que obtiveram maior performance como solubilizante foram o etanol e acetona; a melhor opção relacionada a ciclodextrina foi seu derivado metilado ( $\beta$ -Me-CD). Pendharkar *et al.* (2014) também realizaram testes com diversos solventes orgânicos, porém, utilizando a cepa *Mycobacterium fortuitum subsp fortuitum* NCIM 5239 e chegaram a mesma conclusão: o etanol seria o melhor solvente para aumentar a biodisponibilidade do fitoesterol para as células bacterianas.

Dois artigos prospectados abordam mecanismos para aumentar a permeabilidade celular. De acordo com Barry (2001), interferir na estrutura e na arquitetura física da parede celular de micobactérias resulta em mudanças em sua permeabilidade. Com isso, Korycka-Machala *et al.* (2005) trataram a micobactéria *Mycobacterium vaccae* utilizando etanobutol (EMB), um inibidor da biossíntese de arabinogalactana – polissacarídeo que compõe a estrutura da parede celular de micobactérias, a fim de melhorar a performance de degradação intracelular de  $\beta$ -sitosterol. Observou-se que o ensaio com  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  EMB na presença de rifampicina (antibiótico) resultou num maior acúmulo de AD em relação ao ensaio controle, comprovando a teoria que o EMB induziu o aumento da sensibilidade celular a antibióticos, aumentando, conseqüentemente, a permeabilidade celular e a produtividade de AD. Com o mesmo objetivo, Rumijowska-Galewicz *et al.* (2000) também utilizaram inibidores da biossíntese de compostos da parede celular de micobactérias sendo eles: m-fluorofenilalanina e D,L-norleucina.

Dois documentos abordam estratégias para reduzir a degradação do núcleo esteroide já que se a mesma não for controlada, não é possível atingir altas concentrações do produto de interesse, nesse caso, AD. Xu *et al.* (2015) verificaram a influência da temperatura na degradação do núcleo esteróide. Comprovaram que ao reduzir a temperatura de 37 para 30°C a degradação do núcleo foi reduzida de 39,9 para 17,6%, possivelmente, devido a inibição da atividade de KstD putativo e Ksh – enzimas chaves do catabolismo microbiano de compostos esteroides. Além disso, comprovaram que a degradação de fitoesteróis em *Mycobacterium* sp segue a via AD-ADD-‘9-OH-ADD’.

Wang e colaboradores (2019) propuseram um bioprocesso com dois estágios com o mesmo objetivo: reduzir a degradação do núcleo esteroide na bioconversão de fitoesteróis porém, neste caso, o agente do processo de fermentação é a actinobactéria *Mycobacterium neoaurum* NwIB-R10<sub>hds4A</sub>. Foi observado que a inibição das enzimas responsáveis pela oxidação do núcleo (KstDs) ocorreu a 37° C como comprovado por Xu *et al.* (2015) em *Mycobacterium* sp, porém, a atividade enzimática foi retomada quando o micro-organismo foi cultivado a 37°C. Por este motivo, criaram um bioprocesso em dois estágios: a cultura celular foi realizada a 30 °C e bioconversão a 37°C; resultando numa redução de degradação do núcleo para 17,6%, assim como reportado anteriormente por Xu *et al.* (2015).

Por fim, um artigo aborda alternativas para aumentar a transferência de oxigênio para dentro da célula bacteriana. Su *et al.* (2017) investigaram a utilização de óleo de soja como carreador de oxigênio a fim de aumentar a produção de AD por *Mycobacterium neoaurum* TCCC 11979. Foi observado que com a adição de 16% de óleo de soja, houve um aumento de 44% do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $K_{La}$ ) e atingiu-se um pico de 55,76% de rendimento molar de AD. Esses resultados indicam um bom método para aumentar a performance da biocatálise aeróbia de esteroides.

## 6.2. Patentes

Após filtrar os documentos encontrados, o número total de patentes de interesse reduziu consideravelmente e está apresentado na tabela a seguir.



Tabela 11: Combinações de palavras-chave utilizadas na busca de patentes realizada na base de dados USPTO após o refinamento das buscas.

<b>Palavras-chave</b>	<b>Resultados</b>
<b>androstenedione AND (biotransformation OR biosynthesis)</b>	Concedidas: 15 Solicitadas: 2
<b>androst-4-ene-3,17-dione AND (biotransformation OR biosynthesis)</b>	Concedidas: 19 Solicitadas: 1

Na Tabela 11 é possível perceber que apenas uma pequena quantidade de documentos é considerada relevante para o trabalho. Além disso, as 15 patentes concedidas relevantes na primeira busca estão entre as 19 consideradas relevantes na segunda busca, o que torna o número de documentos selecionados ainda menor.

Entre as patentes consideradas não relevantes destaca-se a presença do termo “androstenedione” ou “androst-4-ene-3,17-dione” no resumo ou no texto do documento sem nenhum foco na biotransformação ou biossíntese da substância.

Desta maneira, considerando a interseção dos documentos concedidos nas duas diferentes buscas e os documentos solicitados, os resultados discutidos a seguir são para um total de 22 patentes.

Salienta-se que, apesar de utilizada a metodologia proposta de prospecção tecnológica também para as patentes solicitadas, não é possível obter uma conclusão assertiva a respeito do tema, por se tratar de uma quantidade muito pequena de documentos disponíveis.

## **6.2.1. Patentes Concedidas**

### **6.2.1.1. Análise Macro das Patentes Concedidas**

A Figura 17 ilustra a evolução anual do número de patentes concedidas relevantes entre 1976 e março de 2020.

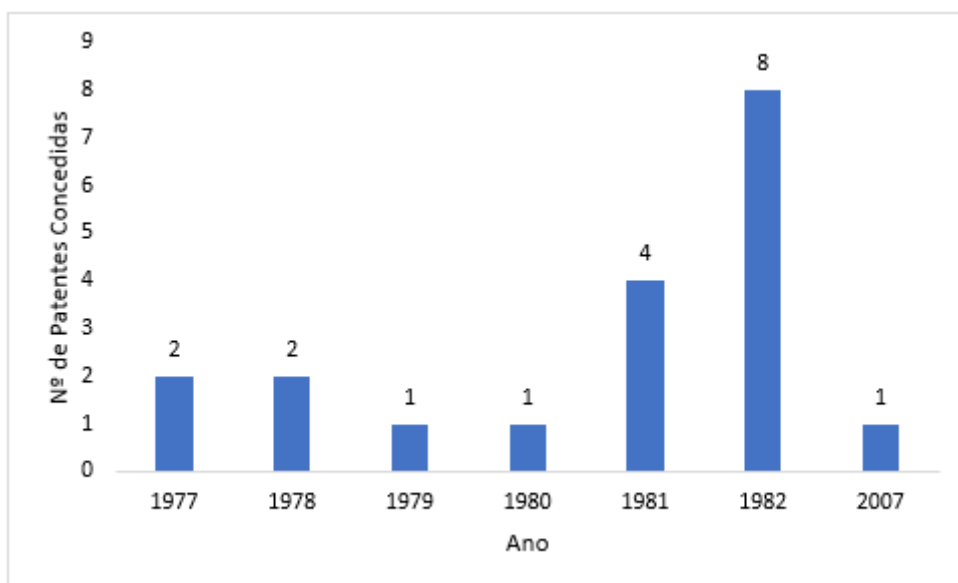


Figura 17: Evolução temporal do número de patentes concedidas que abordam a biossíntese de androstenediona, concedidas entre 1976 e março de 2020. Fonte: Elaboração própria a partir de dados da base USPTO.

Pelo gráfico verifica-se uma quantidade tímida de patentes concedidas entre os anos de 1977 e 1980, ocorrendo, a partir de 1981, um aumento na concessão de patentes no escritório de patentes e marcas norte-americano. É importante ressaltar, novamente, que o perfil observado nos gráficos apresentados é em relação aos resultados considerados relevantes para o trabalho.

As poucas patentes concedidas nos quatro primeiros anos apresentados no gráfico acima (4.039.381, 4.042.459, 4.097.335, 4.098.647, 4.176.123, 4.329.432 e 4.211.841) discorrem acerca de compostos preparados por transformação microbiana para degradar seletivamente esteroides com ou sem cadeias laterais 17-alquil de 2 a 10 átomos de carbono. Tais compostos podem atuar como intermediários para produzir outros esteroides úteis. Estes documentos se diferem apenas pelo microrganismo degradador dos esteróis selecionados como substratos, como por exemplo, a androstenediona.

A partir de 1981 começam a surgir patentes que, além de discutirem os diferentes microrganismos mutantes com potencial de degradação seletiva de esteroides, tratam o 4-AD como produto, não mais como substrato como observado nas patentes dos anos anteriores. De todos os 13 documentos, 12 foram concedidos à farmacêutica *The Upjohn Company* (4.296.644, 4.293.645, 4.293.646, 4.304.860, 4.328.315, 4.329.432, 4.339.539, 4.345.029, 4.345.030, 4.345.033, 4.345.044 e 4.358.538) e discutem a influência de diferentes substratos e diferentes microrganismos na obtenção essencialmente de 4-AD,

ou de AD com ADD (androsta-1,4-dieno-3,17-diona) como subproduto em diferentes proporções, assim como os métodos de separação destes dois compostos.

Seguindo o perfil de concessão de patentes que visam a bioprodução de 4-AD, em 1982 o número de documentos dobrou em relação ao ano anterior, e todos foram concedidos à mesma empresa farmacêutica. As 8 patentes se diferiram por variar as condições de processo e os microrganismos mutantes utilizados na transformação de diferentes substratos em 4-AD ou de 4-AD com ADD. O documento 4.345.030, por exemplo, apresenta diferentes substratos como sitosterol, campesterol, estigmasterol e colesterol; assim como diferentes gêneros de microrganismos para a preparação do mutante, como *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Nocardia*, *Protaminobacter*, *Serratia* e *Streptomyces*.

Após o crescimento no número de patentes nos anos 1981 e 1982, foram 25 anos sem que nenhum outro documento abordando a biossíntese ou biotransformação de 4-AD fosse aprovado pelo escritório americano, até que em julho de 2007 uma patente foi concedida a farmacêutica coreana *Eugene Science Inc.* A patente 7.241.589 discorre sobre o uso de colesterol e do complexo emulsificado colesterol e ciclodextrina-colesterol para obter 4-AD/ADD com alto rendimento. Este foi o último documento relevante dentro da pesquisa de patentes concedidas entre o ano de 1976 e março de 2020.

A Figura 18 demonstra a distribuição das patentes concedidas de acordo com os países. Os Estados Unidos aparecem como o maior detentor das patentes, com aproximadamente 95% do total documentos. Este destaque norte-americano pode ser atribuído, dentre outros fatores, a grande quantidade de documentos depositados e concedidos à farmacêutica *The Upjohn Company*, fundada em 1886 e instalada em Michigan. O único documento que não se encontra no domínio norte-americano é o depositado e concedido à *Eugene Science Inc.*, que atua no setor farmacêutico e de biotecnologia.

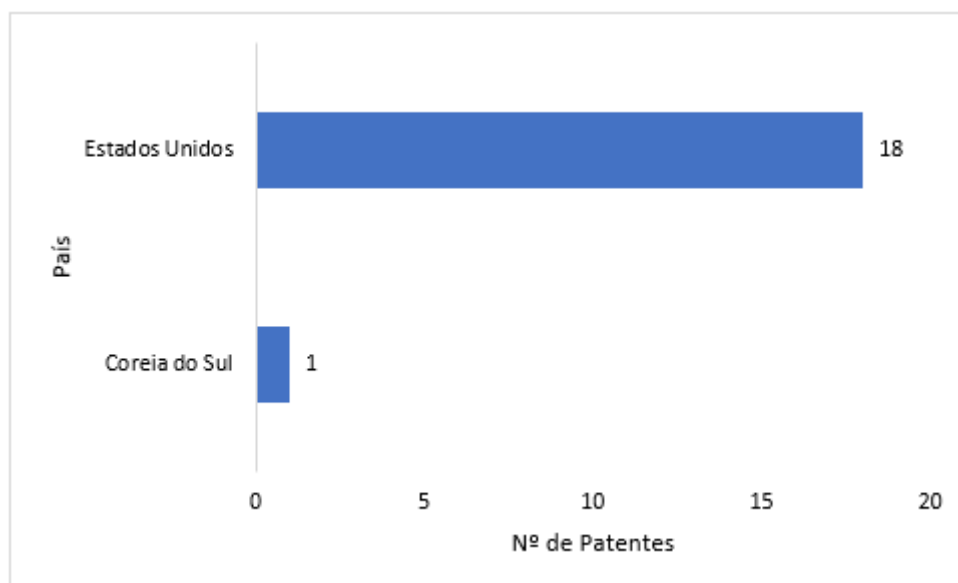


Figura 18: Distribuição dos países com patentes concedidas que abordam a biossíntese de androstenediona. Fonte: Elaboração própria a partir de dados da base USPTO.

Pela análise da tabela a seguir, observa-se que apenas empresas tiveram patentes concedidas no contexto de bioprodução de 4-AD. Como citado anteriormente, as únicas duas empresas responsáveis por esses documentos foram a *The Upjohn Company* e a *Eugene Science Inc.*

Tabela 12: Principais empresas com patentes concedidas que abordam a biossíntese de androstenediona. Fonte: Elaboração própria a partir de dados da base USPTO.

<b>Empresa</b>	<b>Nº de Patentes Concedidas</b>
<b>Eugene Science Inc.</b>	1
<b>The Upjohn Company</b>	18

Das 18 patentes concedidas à *The Upjohn Company*, 8 discutem a possibilidade de utilizar 4-AD como substrato para que microrganismos mutantes o transformem em outros esteroides, enquanto os documentos restantes visam a produção de 4-AD a partir de diferentes substratos e microrganismos mutantes, que serão detalhados posteriormente na análise micro. Sendo assim, mais da metade destas patentes somadas a que foi concedida à *Eugene Science Inc.* possuem informações relevantes acerca das rotas de biotransformação ou biossíntese de 4-AD.

De acordo com a *American Chemical Society*, em 1990 a *The Upjohn Company* era a principal produtora mundial de intermediários esteroides e medicamentos. Ainda de

acordo com a ACS, o setor de pesquisa e desenvolvimento da empresa permitiu inovações em química medicinal e descobertas de transformações microbiana e química para os seus próprios processos de fabricação de medicamentos esteroides. Vale ressaltar que a companhia foi extinta em 1995, se fundindo com a Pharmacia AB para formar a *Pharmacia & Upjohn*, que atualmente pertence à Pfizer (**Folha de Londrina**, Londrina, 17 de dez. de 1999).

### 6.2.1.2. Análise Meso das Patentes Concedidas

O gráfico a seguir apresenta a distribuição das taxonomias meso para as patentes concedidas, demonstrando que, aproximadamente, 63% dos documentos focam em tecnologias e rotas para a produção de 4-AD, enquanto aproximadamente 37% discorrem acerca da aplicabilidade de 4-AD no processo de produção de outros compostos.

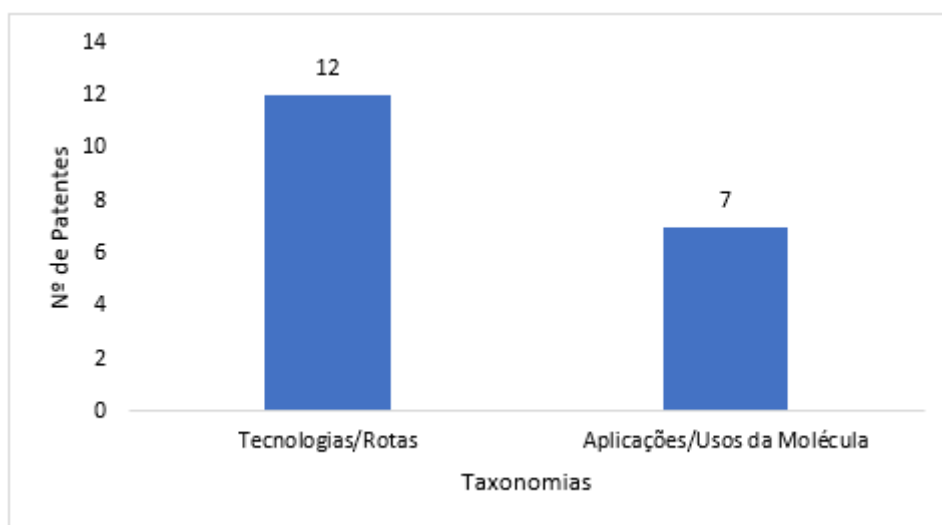


Figura 19: Distribuição das patentes concedidas que abordam a biossíntese de androstenediona, de acordo com suas taxonomias definidas na classificação Meso. Fonte: Elaboração própria a partir de dados da base USPTO.

Os documentos classificados na taxonomia de Tecnologias/Rotas foram os de numeração **7.241.589**, **4.358.538**, **4.345.034**, **4.345.033**, **4.345.030**, **4.345.029**, **4.339.539**, **4.328.315**, **4.304.860**, **4.293.646**, **4.293.645** e **4.293.644**. Como já citado anteriormente, foram analisados o resumo, as reivindicações e a descrição de cada patente. As patentes em questão referem-se a diferentes métodos de preparação de 4-AD e, em alguns casos, de ADD, através da degradação de fitoesteróis, colesterol e outras

composições utilizando microrganismos mutantes que degradam seletivamente esteroides contendo 17 cadeias laterais de alquil de 2 a 10 átomos de carbono.

Os documentos avaliam a influência de diferentes condições de processos, diferentes microrganismos mutantes e diversos substratos no rendimento de cada processo, além de detalharem os processos de preparação dos microrganismos utilizados. Os processos utilizados serão discutidos com um maior nível de detalhamento na análise micro.

Os documentos classificados na taxonomia de Aplicações/Usos da molécula foram os de numeração **4.039.381**, **4.042.459**, **4.097.335**, **4.098.647**, **4.176.123**, **4.329.432** e **4.211.841**. Pela análise do resumo, das reivindicações e da descrição destes artigos, observa-se diversas citações do uso de 4-AD como um intermediário na produção de compostos preparados por transformação microbiana usando microrganismos mutantes.

Os processos discutidos nestas patentes utilizam 4-AD, por exemplo, em uma mistura de esteroides que consiste também em sitosterol, colesterol, estigmasterol, campesterol, entre outros para a produção de 3A.alpha.-H-4.alpha.-[3'-propanol]-7a.beta.-metilhexa-hidro-1,5-indandiona hemicetal, 3A.alpha.-H-4.alpha.-[3'-propanol]-5.alpha.-hydroxy-7a.beta.-methylhexahydro-1-indanone, 3a.alfa.-H-4.alfa.-[ácido 3'-propiónico]-5.alfa.-hidroxi-7a.beta.-metilhexa-hidro-1-indanona-.delta.-lactona e Hemicetal 3a.alfa.-H-4.alfa.-[3'-propanal]-5.alfa.-hidroxi-7a.beta.-metilhexahidro-1-indanona no meio fermentativo, através da biotransformação realizada por diferentes micobactérias mutantes. Os compostos produzidos podem ser usados como intermediários na produção de esteroides úteis. A descrição dos documentos também detalha os processos de preparação dos microrganismos mutantes e comparam os resultados obtidos variando os substratos e os microrganismos utilizados.

A Figura 20 apresenta a evolução temporal das patentes concedidas, de acordo com a classificação meso. Nota-se que ao longo do final da década de 70 e início da década de 80 o número de patentes com o tema “Aplicações/Usos da Molécula” permaneceu pequeno, até que em 1982 foi publicado o último documento dentro desta taxonomia. Por outro lado, os anos de 1981 e 1982 foram responsáveis por maior parte das patentes concedidas com foco na biotransformação de 4-AD, até que em 2007 a *Eugene Science Inc.* depositou uma patente dentro deste tema, como já discutido na análise macro.

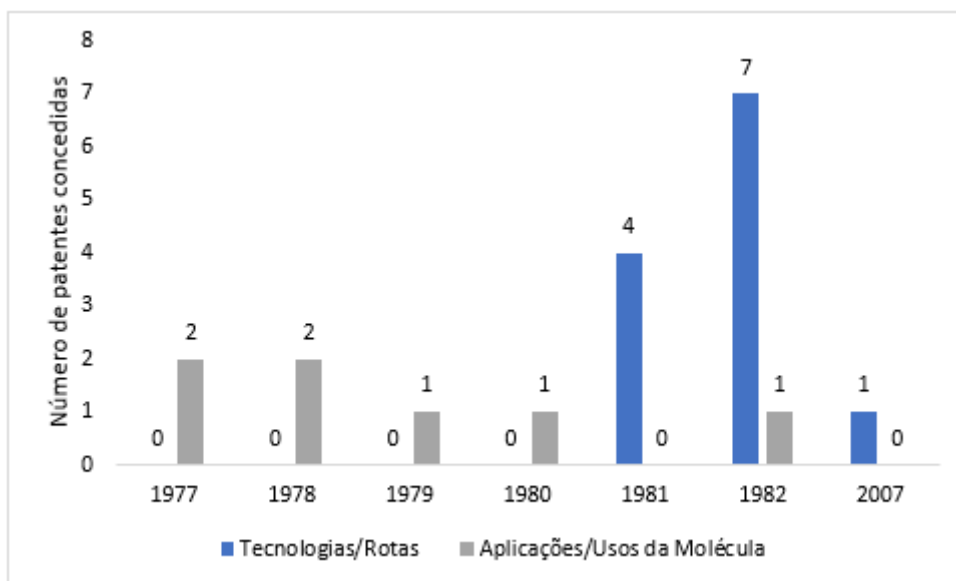


Figura 20: Evolução temporal das patentes concedidas que abordam a biossíntese de androstenediona, segundo as taxonomias definidas na classificação Meso. Fonte: Elaboração própria a partir de dados da base USPTO.

### 6.2.1.3. Análise Micro das Patentes Concedidas

Na análise micro das patentes concedidas obtém-se o detalhamento da taxonomia “Tecnologia/Rotas”, definida na Análise Meso. Nos documentos analisados foram consideradas as seguintes taxonomias Micro: “Microrganismos”, “Substratos”, “Condições de Processo” e “Etapas de Identificação de 4-AD”.

#### 6.2.1.3.1. Microrganismos

A Figura 21 apresenta a distribuição dos documentos em relação ao microrganismo mutante utilizado no processo de produção de 4-AD.

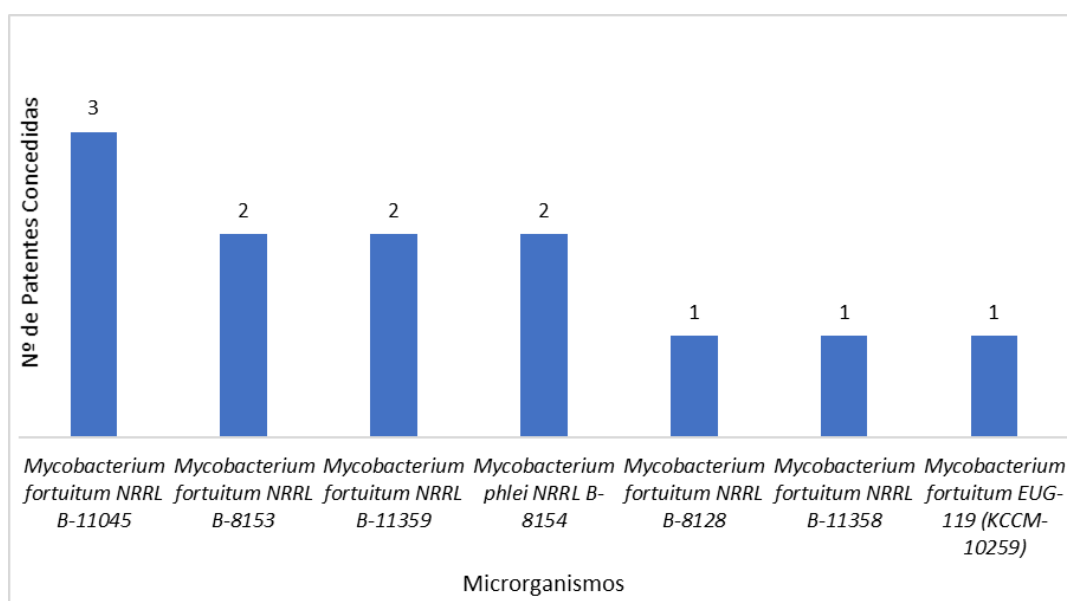


Figura 21: Distribuição das patentes concedidas que abordam a biossíntese de androstenediona, classificadas com a taxonomia Micro “Microorganismos”. Fonte: Elaboração própria a partir de dados da base USPTO.

É possível perceber que todas as patentes utilizaram micobactérias no processo de biotransformação de esteróis em 4-AD. O que diferencia os microrganismos utilizados são os códigos utilizados para cada mutação realizada. *Mycobacterium fortuitum* NRRL B-11045 aparece em maior quantidade de documentos, seguido por *Mycobacterium fortuitum* NRRL B-8153, *Mycobacterium fortuitum* NRRL B-8154 e *Mycobacterium fortuitum* NRRL B-11359, que aparecem em 2 documentos cada uma. São utilizadas também as cepas *Mycobacterium fortuitum* NRRL B-11358, *Mycobacterium fortuitum* NRRL B-8128 e *Mycobacterium fortuitum* EUG-119 (KCCM-10259), todas em apenas 1 documento, onde esta última é a utilizada na única patente concedida à *Eugene Science Inc.*

Todos os microrganismos citados acima são mutantes que possuem a capacidade de melhorar a produção de 4-AD. No caso das patentes concedidas à empresa *The Upjohn Company*, as micobactérias utilizadas são mutantes adaptativos de alguma técnica anterior. O mutante da patente 4.345.034 “*Mycobacterium fortuitum* mutant”, por exemplo, é *Mycobacterium fortuitum* NRRL B-11359, que é obtido de *M. fortuitum* NRRL B-11358, que por sua vez é um mutante adaptativo de *Mycobacterium fortuitum* NRRL B-11045. Em todos os casos, o microrganismo selecionado deve ser capaz de transformar



seletivamente esteroides com cadeias laterais de 17-álquil de 2 a 10 átomos de carbono, inclusive, para render 4-AD como essencialmente único produto formado.

### 6.2.1.3.2. Substratos

A Figura 22 ilustra a distribuição das patentes concedidas em relação aos substratos utilizados nos processos de produção de 4-AD.

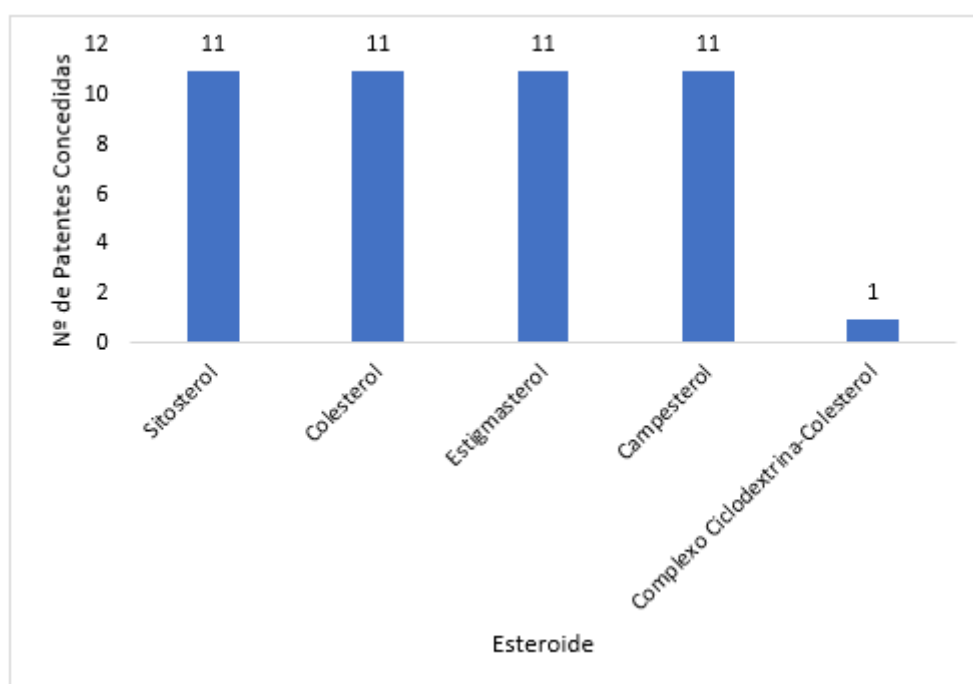


Figura 22: Distribuição das patentes concedidas que abordam a biossíntese de androstenediona, classificadas com a taxonomia Micro “Substratos”. Fonte: Elaboração própria a partir de dados da base USPTO.

Percebe-se que os substratos sitosterol, colesterol, estigmasterol e campesterol apareceram em 11 documentos, que foram concedidos à empresa *The Upjohn Company*. Este perfil se justifica porque nestas patentes é detalhada a produção de 4-AD a partir de sitosterol e sugerem a substituição deste substrato por colesterol, estigmasterol, campesterol ou uma combinação de qualquer um dos esteroides, sendo também possível obter 4-AD como essencialmente o único produto formado.

O complexo ciclodextrina-colesterol é citado em apenas um documento, no ano de 2007. Esta patente relata a descoberta de que a ciclodextrina, que pode ser extraída do leite, é um excelente substrato para a conversão em microrganismos, pois é muito econômica no custo, pode ser facilmente dissolvida e dispersa em um meio de cultura

estando em solução aquosa para microrganismos. A  $\beta$ -ciclodextrina possui uma forte ligação estrutural aos esteroides, então é utilizada para preparar complexos de ciclodextrina-esterol para aumentar a produtividade de 4-AD. Os valores estimados acima na quantidade de AD/ADD produzido a partir deste complexo são cerca de 2,3 vezes maiores do que o método convencional, que utiliza apenas colesterol emulsionado. O documento também ressalta que qualquer esteroide entre sitosterol, estigmasterol, campesterol e ergosterol pode ser utilizado na produção do complexo ciclodextrina-esterol. A patente em questão aponta ainda que o processo utilizando o complexo ciclodextrina-esterol possui aplicabilidade industrial pelo seu alto rendimento e facilidade de preparação do complexo.

### 6.2.1.3.3. Condições de Processo

Todas as patentes analisadas neste trabalho que apresentaram processos de produção de 4-AD por biotransformação forneceram dados em escala de bancada. A Tabela 13 fornece as condições dos testes de cultivo realizados em relação ao substrato e ao microrganismo utilizado.

Tabela 13: Patentes concedidas que abordam a biossíntese de androstenediona divididas por Microrganismo e Substrato utilizados, classificadas com a taxonomia Micro “Condições de Processo”.  
Fonte: Elaboração própria a partir de dados da base USPTO.

<b>Microrganismo</b>	<b>Substrato</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Agitação</b>
<i>Mycobacterium fortuitum</i> NRRL B-11045	Sitosterol, Campesterol, Colesterol e Estigmasterol	30°C	14 dias	-
<i>Mycobacterium fortuitum</i> NRRL B-8153	Sitosterol, Campesterol, Colesterol e Estigmasterol	30°C	14 dias	-
<i>Mycobacterium fortuitum</i> NRRL B-11359	Sitosterol, Campesterol, Colesterol e Estigmasterol	30°C	14 dias	-
<i>Mycobacterium phlei</i> NRRL B-8154	Sitosterol, Campesterol, Colesterol e Estigmasterol	30°C	14 dias	-
<i>Mycobacterium fortuitum</i> NRRL B-8128	Sitosterol, Campesterol, Colesterol e Estigmasterol	30°C	14 dias	-

<i>Mycobacterium fortuitum</i> NRRL B-11358	Sitosterol, Campesterol, Colesterol e Estigmasterol	30°C	14 dias	-
<i>Mycobacterium fortuitum</i> EUG-119 (KCCM-10259)	Complexo Ciclodextrina-Colesterol	30°C	5 dias	200 rpm

Analisando os dados da Tabela 13, percebe-se que independente do substrato escolhido ou do microrganismo utilizado, a temperatura de cultivo foi de 30°C. Os documentos relatam que a temperatura pode variar de cerca de 25°C até 37°C, sendo 30°C a temperatura escolhida facilitar o crescimento do microrganismo e a eficácia do processo de transformação do substrato no produto final.

Por outro lado, observa-se uma mudança significativa em relação ao tempo, sendo que a mudança na escolha do substrato, mais especificamente selecionando o complexo ciclodextrina-colesterol, oferece uma diferença de mais de uma semana no tempo de biotransformação do substrato em 4-AD. Em relação a agitação, todos os testes ressaltaram sua importância, no entanto apenas a empresa *Eugene Science Inc.* forneceu o valor de rotação: 200 rpm.

Desta maneira, temos que todos os documentos fixaram o valor de temperatura em 30°C, 11 patentes (sendo estas as concedidas à *The Upjohn Company*) necessitaram de 14 dias de incubação da mistura inoculada, enquanto apenas a concedida à *Eugene Science Inc.* necessitou de 5 dias de incubação, e todos os testes utilizaram agitação para promover o crescimento submerso do microrganismo e aumentar a eficiência do processo.

#### 6.2.1.3.4. Etapas de Identificação de 4-AD

Após a incubação, as amostras do meio fermentado passam por processos de identificação de 4-AD e subprodutos para avaliar a taxa de conversão e a eficiência do processo. Como os documentos analisados mostram basicamente duas formas de produzir 4-AD em relação aos esteroides utilizados, as etapas utilizadas estão detalhadas nas Tabelas 14 e 15.

### a) Sitosterol, campesterol, colesterol e estigmasterol

A Tabela 14 enumera as etapas de identificação de 4-AD utilizadas nos 11 documentos que utilizaram sitosterol, campesterol, colesterol e estigmasterol. A escolha do microrganismo não influencia os métodos realizados.

Tabela 14: Etapas dos métodos de identificação de 4-AD nos processos que utilizaram sitosterol, campesterol, colesterol e estigmasterol como substratos. Fonte: Elaboração própria a partir de dados da base USPTO.

<b>Etapa</b>	<b>Método</b>
<b>1</b>	Extração da mistura com diclorometano.
<b>2</b>	Secagem do extrato em sulfato de sódio anidro e evaporação do solvente por destilação à vácuo.
<b>3</b>	Dissolução do resíduo resultante da etapa anterior em um mínimo de acetato de etilo-ciclohexano (20:80).
<b>4</b>	Cromatografia em sílica gel.
<b>5</b>	Separação dos compostos da sílica em gel por eluição em acetato de etilo-clorofórmio (15:85).
<b>6</b>	Isolamento dos compostos por evaporação do solvente da etapa anterior e recristalização de hexano.

Os documentos não citaram a taxa de conversão nem as quantidades de 4-AD/ADD produzidas.

### b) Complexo ciclodextrina-colesterol

A Tabela 15 enumera as etapas de identificação de 4-AD utilizadas no documento que utilizou o complexo ciclodextrina-colesterol como substrato.

Tabela 15: Etapas dos métodos de identificação de 4-AD no processo que utilizou o complexo ciclodextrina-colesterol como substrato. Fonte: Elaboração própria a partir de dados da base USPTO.

<b>Etapa</b>	<b>Método</b>
<b>1</b>	Extração da mistura com éter etílico e éter de petróleo, na proporção 1:1.
<b>2</b>	Evaporação dos solventes sob pressão reduzida.

- 3 Dissolução do resíduo resultante da etapa anterior em 2-propanol.
  - 4 Cromatografia líquida de alta pressão.
- 

O documento não descreveu as etapas realizadas após a cromatografia líquida de alta pressão. Por outro lado, indicou que a taxa de conversão foi de 62%, obtendo-se 228,8 mg/100 mL de 4-AD/ADD por 0,5 mg/100 mL de colesterol adicionado.

## 6.2.2. Patentes Solicitadas

### 6.2.2.1. Análise Macro das Patentes Solicitadas

A Figura 23 ilustra a evolução anual no número de patentes solicitadas relevantes entre 2001 e março de 2020.

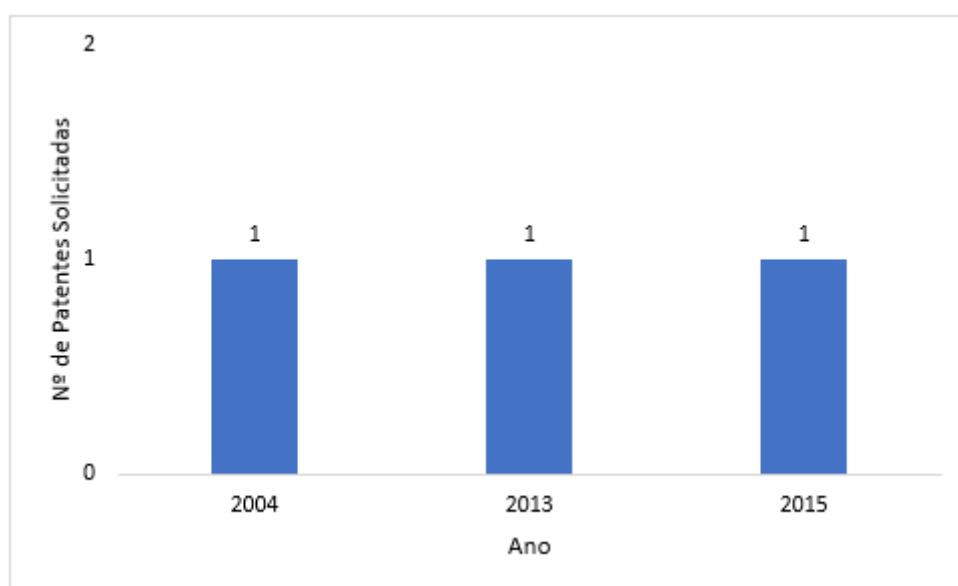


Figura 23: Evolução temporal do número de patentes solicitadas que abordam a biossíntese de androstenediona, entre 2001 e março de 2020. Fonte: Elaboração própria a partir de dados da base USPTO.

É possível observar um total de apenas três patentes solicitadas relevantes, que se distribuem entre os anos de 2004, 2013 e 2015. A pesquisa com a combinação de palavras-chave “*androst-4-ene-3,17-dione AND (biotransformation OR biosynthesis)*” resultou em uma única patente solicitada relevante para o trabalho, que é a de 2004,

enquanto a combinação de palavras-chave “*androstenedione AND (biotransformation OR biosynthesis)*” resultou nos documentos dos anos de 2013 e 2015.

A patente do ano de 2004 refere-se a um método de preparação de 4-AD e de ADD. Esta patente também examina a variação das quantidades de ADD produzidas modificando-se os substratos e as condições de processo. Os documentos de 2013 e 2015 são direcionados ao uso de 4-AD e ADD em compostos farmacêuticos que atuam como inibidores da enzima aromatase e no tratamento de doenças endócrinas, distúrbios hormonais, câncer e outras patologias relacionadas ao estrogênio.

Desta maneira, verifica-se que o depósito e, conseqüentemente, a concessão de patentes que abrangem tecnologias e rotas para a biossíntese ou biotransformação da androstenediona diminuiu consideravelmente ao longo dos anos. Após as patentes que discorreram acerca da biotransformação ou biossíntese de 4-AD na década de 80 comandadas pela farmacêutica *The Upjohn Company*, apenas uma patente foi solicitada com o mesmo foco. É válido ressaltar que são numerosos os documentos que citam a androstenediona em seu texto, no entanto não discutem sobre a produção e as aplicações do hormônio especificamente.

As três patentes solicitadas em questão foram solicitadas pelos Estados Unidos. Diferentemente das patentes concedidas, nenhuma empresa foi responsável pelo pedido de concessão dos documentos, além de se tratar de um número consideravelmente menor de patentes, dificultando uma análise mais detalhada do perfil de pedidos de patentes por país. Por outro lado, de maneira semelhante ao observado nas patentes concedidas, verifica-se a predominância norte-americana em torno dos documentos considerados relevantes para o trabalho.

Pela análise da Tabela 16, observa-se que as patentes de 2013 e 2015 foram solicitadas por uma parceria entre a *Emory University*, *The Research Foundation State of New York* e *Hauptman-Woodward Medical Research Institute*. A parceria consiste em uma universidade americana, uma fundação de pesquisa conectada à Universidade de Nova Iorque e um centro de pesquisas biomédicas. A patente de 2004, que discorre acerca de tecnologias e rotas para biossíntese ou biotransformação de 4-AD tem solicitante desconhecido (o solicitante não foi apresentado no site da USPTO).

Tabela 16: Instituições com patentes solicitadas que abordam a biossíntese de androstenediona. Fonte: Elaboração própria a partir de dados da base USPTO.

<b>Instituições</b>	<b>Nº de Patentes</b>
<b>Desconhecido</b>	1
<b>Emory University, The Research Foundation of State of New York, Hauptman-Woodward Medical Research Institute</b>	2

De acordo com o site da *Hauptman-Woodward Medical Research Institute*, os cientistas do centro de pesquisas trabalham em parcerias com outras instituições e universidades para encontrar causas fundamentais de muitas doenças, analisando a interação da biologia com produtos farmacêuticos novos e aprimorados. Um dos estudos do instituto consiste na inibição de tumores da mama dependentes de hormônios. Nesse sentido, é válido lembrar que androgênios, como a androstenediona, são objetos de estudo de métodos de tratamento para distúrbios relacionados ao estrogênio, como o câncer de mama. Sendo assim, neste nível de análise, pode-se relacionar a solicitação das patentes de 2013 e 2015 ao interesse do centro de pesquisa, em parceria com outras instituições, em estudar formas de tratar este tipo de câncer e outros distúrbios hormonais. A maneira como a androstenediona é apresentada nestes estudos será mais discutida posteriormente na análise meso.

### **6.2.2.2. Análise Meso das Patentes Solicitadas**

A Figura 24 apresenta a distribuição das taxonomias meso para as 3 patentes solicitadas, onde apenas um documento foca em tecnologias/rotas para a produção de 4-AD, enquanto os outros discutem o uso da molécula para a produção de outros compostos. Embora a busca realizada tenha apresentado apenas três documentos solicitados, as duas taxonomias Meso presentes são exatamente as mais representativas nos documentos concedidos, corroborando a relevância desses assuntos para a biossíntese de 4-AD.

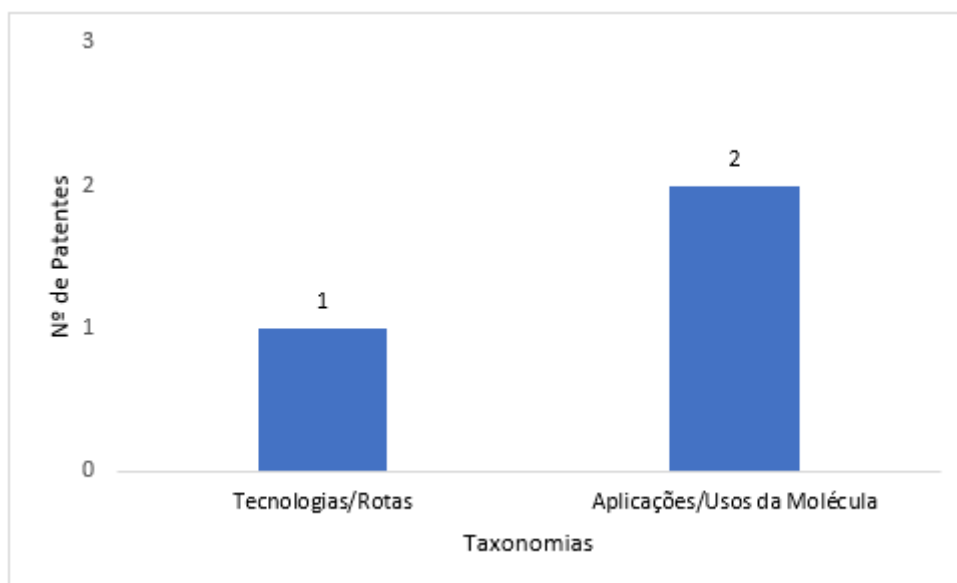


Figura 24: Distribuição dos documentos solicitados que abordam a biossíntese de androstenediona, de acordo com suas taxonomias Meso. Fonte: Elaboração própria a partir de dados da base USPTO.

Os documentos classificados na taxonomia Aplicações/Usos da Molécula foram os de numeração **20150148321** e **20130157988**, que correspondem aos publicados nos anos de 2013 e 2015. Analisando o resumo, a descrição e as reivindicações destas patentes, observa-se que são discutidas a preparação de compostos farmacêuticos que contém 4-AD e o uso destes compostos para o tratamento de distúrbios relacionados com hormônios em mamíferos. Entre os distúrbios discutidos são incluídos cânceres dependentes de hormônio, particularmente os que são causados por níveis elevados de estrogênio e seus intermediários. Os compostos também podem ser usados no tratamento de hiperplasia prostática benigna, doenças cardiovasculares e distúrbios neurodegenerativos.

Para entender a participação da molécula 4-AD na preparação dos compostos citados anteriormente, é necessária uma breve explicação sobre a aromatase e a influência de alguns hormônios em alguns distúrbios. Nas duas patentes em questão, Davies, H. et al. explica que se trata de uma enzima crucial na síntese de estrogênio, através da conversão de andrógenos (como 4-AD e testosterona) em estrógenos. O estrogênio, por sua vez, é um regulador essencial de muitos processos fisiológicos, incluindo a manutenção de órgãos sexuais femininos, o ciclo reprodutivo e várias funções endócrinas. Diversos distúrbios como câncer de mama, endométrio e ovário são sensíveis ao aumento dos níveis de estrogênio, então as estratégias de tratamento visam a inibição da via de síntese deste hormônio. Desta forma, as patentes em questão citam determinados



compostos que interagem com especificidade elevada para a enzima aromatase. Por sua vez, estes compostos estão estruturalmente relacionados com o substrato natural 4-AD, que são inicialmente reconhecidos pela enzima aromatase como um falso substrato competindo com o 4-AD do próprio organismo no sítio ativo da enzima. Os compostos são transformados em intermediários que se ligam irreversivelmente à enzima, causando sua inativação. Com a inibição da enzima, ocorre também a inibição da síntese de estrogênio (DAVIES, H. et al.).

O único documento classificado na taxonomia Tecnologia/Rotas foi o de numeração **20040152153**, referente ao ano de 2004. Esta patente se refere a um método de produção de 4-AD e ADD que compreendem algumas etapas como: a) aquecimento de esteroides e emulsionante para a preparação de uma mistura; b) aquecimento e agitação simultâneos da mistura para obter esteróis emulsionados; c) adição dos esteróis emulsionados ao meio de cultura. Detalhes do processo e dos materiais utilizados serão discutidos na análise micro.

A Figura 25 ilustra a evolução temporal das três patentes em relação às taxonomias meso. Apesar de se tratar de um número muito pequeno de documentos, é possível perceber que o último pedido de patente relacionado à produção de 4-AD através de biotransformação foi no ano de 2004. Somente na década seguinte, nos anos de 2013 e 2015, que foram solicitados documentos relevantes que envolvem 4-AD e suas aplicações.

Outro ponto interessante é que após 2004 não se encontrou registro de solicitação de patente envolvendo a assunto Tecnologias/Rotas. Analisando a evolução temporal das patentes concedidas (Figura 20), a última concessão abordando esse mesmo tema ocorreu em 2007. Após essa data, a busca indicou somente dois documentos solicitados mais recentemente (2013 e 2015), porém que reportam aplicações/ usos de 4-AD.

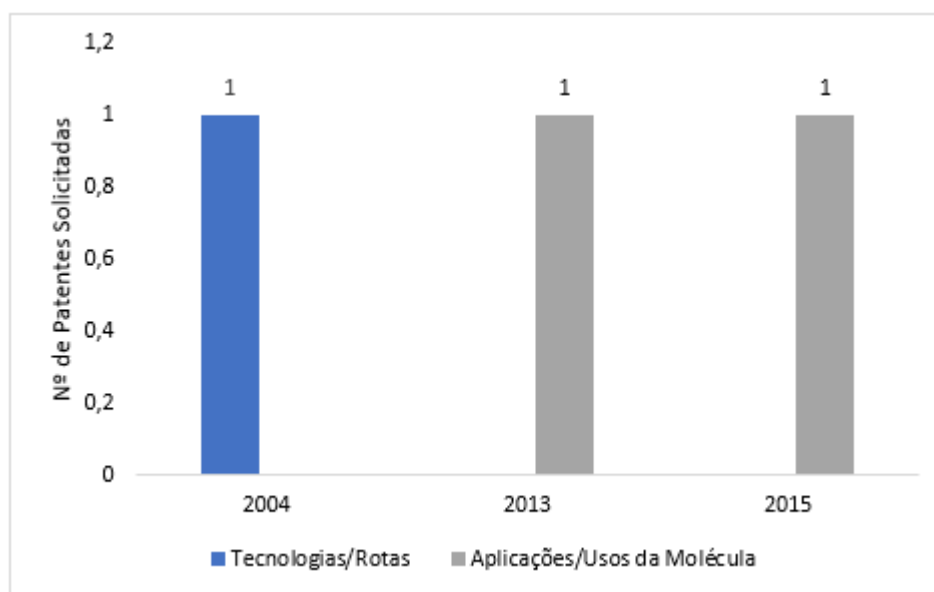


Figura 25: Evolução temporal das patentes solicitadas que abordam a biossíntese de androstenediona, segundo as taxonomias definidas na classificação Meso. Fonte: Elaboração própria a partir de dados da base USPTO.

### 6.2.2.3. Análise Micro da Patente 20040152153

Esta etapa do trabalho consiste na análise de apenas uma patente solicitada, que foi a quantidade de documentos encontrados considerada relevante. Desta maneira, não é possível apresentar gráficos que ilustrem comparações entre diferentes documentos. Os detalhes da patente em questão serão apresentados nos tópicos a seguir.

#### 6.2.2.3.1. Microrganismo

A patente de número **20040152153** utilizou micobactérias, assim como nas patentes concedidas, no processo de transformação do substrato selecionado em 4-AD. No processo analisado, foi selecionado *Mycobacterium fortuitum* EUG-119 (KCCM-10259), sendo a mesma cepa utilizada no documento concedido à *Eugene Science Inc.* em 2007.) A micobactéria em questão é preparada através da mutagênese de *Mycobacterium fortuitum* ATCC 29472, que também é utilizada pela patente em questão, permitindo comparar posteriormente o rendimento de 4-AD/ADD. A mutação de *Mycobacterium fortuitum* ATCC 29472 em *Mycobacterium fortuitum* EUG-119 (KCCM-10259) demonstra excelente eficácia na conversão de esteróis em 4-AD/ADD.

### 6.2.2.3.2. Substratos

Os substratos selecionados consistem em colesterol emulsionado e em complexo ciclodextrina-colesterol. A realização do mesmo processo variando apenas o substrato selecionado e o microrganismo, como citado no tópico anterior, permitem que o documento demonstre as variações no rendimento de 4-AD/ADD. Estas mudanças de rendimento serão discutidas nas etapas de identificação de 4-AD.

### 6.2.2.3.3. Condições de Processo

Analisando os dados fornecidos pelo documento em questão, percebe-se que independente do substrato escolhido ou do microrganismo utilizado, a temperatura de cultivo foi de 30°C, assim como os processos descritos nas patentes concedidas. O tempo de cultivo consistiu em 5 dias, sob agitação de 200 rpm.

As condições de processo, assim como os microrganismos e substratos utilizados são os mesmos da patente concedida à *Eugene Science Inc.*, em 2007. Além disso, os autores de ambas as patentes são os mesmos, sugerindo que entre um documento e outro foram realizadas poucas modificações e apenas um foi concedido à empresa.

### 6.2.2.3.4. Etapas de Identificação de 4-AD

As etapas de identificação de 4-AD na patente em questão foram exatamente as mesmas enumeradas para a patente concedida que utilizou o complexo ciclodextrina-colesterol como substrato, apresentadas na Tabela 15.

O documento citou as quantidades produzidas de 4-AD/ADD nos processos que variaram o microrganismo e o substrato. As taxas de rendimento são apresentadas na Tabela 17.

Tabela 17: Rendimentos de 4-AD/ADD variando o substrato e o microrganismo selecionado na patente solicitada 20040152153. Fonte: Elaboração própria a partir de dados da base USPTO.

<b>Microrganismo</b>	<b>Substrato</b>	<b>Rendimento de 4-AD/ADD</b>
<i>Mycobacterium fortuitum</i> ATCC 29472	Colesterol Emulsionado	130 mg / 100 mL por 0,5 g / 100 mL de colesterol adicionado

<i>Mycobacterium fortuitum</i> ATCC 29472	Complexo Ciclodextrina- colesterol	92,2 mg / 100 mL por 0,5 g / 100 mL de colesterol adicionado
<i>Mycobacterium fortuitum</i> EUG-119 (KCCM-10259)	Colesterol Emulsionado	258,3 mg / 100 ml por 0,5 g / 100 ml de colesterol adicionado
<i>Mycobacterium fortuitum</i> EUG-119 (KCCM-10259)	Complexo Ciclodextrina- colesterol	228,8 mg / 100 ml por 0,5 g / 100 ml de colesterol adicionado

Através da tabela é possível notar o aumento expressivo de rendimento tanto com colesterol emulsionado como com complexo ciclodextrina-colesterol, variando o microrganismo. No caso do colesterol emulsionado, a variação foi de aproximadamente o dobro de 4-AD/ADD produzido após a mutação do microrganismo. No processo utilizando o complexo ciclodextrina-colesterol, a diferença no rendimento de 4-AD/ADD foi de aproximadamente 148%, demonstrando a alta eficácia do microrganismo modificado no processo de transformação.

## 7. CONCLUSÕES

A prospecção tecnológica de artigos científicos na base SCOPUS ao longo dos anos de 2000 até fevereiro de 2020 e das patentes na base USPTO - United States Patent and Trademark Office de 1976 até março de 2020, no que diz respeito à biossíntese de androstenediona a partir de fitoesterol, forneceu uma visão holística das tendências da pesquisa e inovação.

Com base na distribuição dos artigos ao longo dos anos, pode-se observar um pico de publicações no ano de 2017 dando indícios do retorno do interesse no assunto. Os países que mais contribuíram em relação aos artigos foram: China, Estados Unidos, Rússia e Índia. Sendo a China o país com o maior número de artigos publicados, 52 artigos científicos no período estudado. O Brasil publicou apenas um artigo científico, o que indica a necessidade do desenvolvimento de pesquisas com foco na produção de androstenediona a partir de fitoesteróis. No caso das patentes, tanto as concedidas quanto as solicitadas, os Estados Unidos são o maior detentor de documentos.

Quanto as taxonomias estudadas, artigos e patentes mostraram algumas semelhanças, reforçando tendências, características e particularidades do processo de biossíntese de AD.

Analisando os artigos foi possível perceber um perfil de estudos voltado para otimização de processo e não para a descoberta de novos processos de produção de AD a partir de fitoesterol. Os assuntos mais abordados dentro desse contexto foi a utilização de engenharia genética, manipulação das variáveis de processo, alternativas para aumento da solubilidade do fitoesterol etc.

De uma maneira geral, as patentes concedidas e solicitadas propõem metodologias para a produção de 4-AD, avaliando a influência de diferentes microrganismos mutantes do gênero *Mycobacterium* e dos esteróis utilizados como substratos (colesterol e fitoesteróis) na otimização dos processos, sempre visando obter o máximo de androstenediona como produto principal. Estes documentos também discutem possíveis aplicações de AD na produção de compostos farmacêuticos para o tratamento de diversas doenças provenientes de desequilíbrios hormonais e como hormônio precursor na produção de compostos que podem atuar na biossíntese de outros esteroides úteis.

Diferentemente da tendência de retorno no interesse sobre o assunto observada nos artigos, o perfil de solicitação de patentes ao longo dos anos indica poucas inovações em termos de metodologias e tecnologias disponíveis para a biossíntese de 4-AD. Por outro lado, os documentos solicitados mais recentes revelam o interesse na aplicação de androstenediona na preparação de novos medicamentos.

Comparando última patente concedida com a taxonomia Meso “Tecnologias/Rotas”, em 2007, com a última patente solicitada dentro da mesma taxonomia, em 2004, observa-se um interesse comum de explorar o uso do complexo ciclodextrina-colesterol como substrato na biossíntese de 4-AD. Estes documentos retratam, inclusive, a possibilidade de substituir o colesterol por fitoesteróis na produção do complexo ciclodextrina-esterol a fim de produzir androstenediona com alto rendimento.

Os resultados obtidos através das análises envolvidas nessa prospecção tecnológica são de suma importância para planejamento e desenvolvimento de novos processos e tecnologias de produção de intermediários de esteroides e sugere um grande avanço na biossíntese de androstenediona a partir de fitoesteróis.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARASEKARA, A. S. Acidic ionic liquids. **Chem. Rev.**, V. 116 (10), p. 6133-6183, 016.

Androstenedione Market Trends. Transparency Market Research. Disponível em: <<https://www.transparencymarketresearch.com/androstenedione-market.html>>. Acesso em 24 abr. 2020.

ANDRYUSHINA, V. A. et al. Conversion of Soybean Sterols into 3,17Diketosteroids using Actinobacteria *Mycobacterium neoaurum*, *Pimelobacter simplex*, and *Rhodococcus erythropolis*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, V. 47, n. 3, p. 270-273, 2011.

ANTONOW, D. R. et al. Glicorticoides: uma meta-análise. **Disc. Scientia. Série: Ciências da Saúde**, V. 8, n. 1, p. 51-68, 2007.

ARIMA, K. et al. Microbial transformation of sterols. Part I. Decomposition of cholesterol by microorganisms. **Agric. Biol. Chem**, V. 33, p. 1636-1643, 1969. Balkan Pharmaceuticals. Disponível em: <<https://balkanpharmaceuticals.com/>>. Acesso em 18 set. 2020.

BARNES, P. J. Corticosteroids: The drugs to beat. **European Journal of Pharmacology**, V. 533, p. 2-14, 2006.

BARRY, C. E. Interpreting cell wall virulence factors of *Mycobacterium tuberculosis*. **Trends Microbiol.**, V. 9, p.237-241, 2001.

BAVARESCO, L.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M. O. Glicocorticóides: Usos clássicos e emprego no tratamento de câncer. **Infarma**, V. 17, n. 7/9, 2005.

BORSCHIVER, S.; DA SILVA, A. L. R. **Technology roadmap: planejamento estratégico para alinhar mercado-produção-tecnologia**. Rio de Janeiro: Interciência. ed. 1, 2016.

CANONGIA, C.; PEREIRA, N. M. F.; ANTUNES, A. **Gestão da informação e monitoramento tecnológico: o mercado dos futuros genéricos**. Belo Horizonte, V. 7, n, 2, p. 155-166, 2002.

CRUZ, A. et al. Study of Key Operational Parameters for the Side-Chain Cleavage of Sitosterol by Free Mycobacterial Cells in Bis-(2-ethylhexyl) phthalate. **Biocatalysis and Biotransformation**, V. 22, p. 189-194, 2004.

DAVIES, H.; GHOSH, D.; MORTON, D. **Substituted androst-4-ene diones**. US nº 20130157988. 20 jun. 2013. USPTO.

DAVIES, H.; GHOSH, D.; MORTON, D. **Substituted androst-4-ene diones**. US nº 20150148321. 27 jan. 2015. USPTO.

DIAS, R. C. B. **Método Delphi: Uma descrição de seus principais conceitos e características.** Monografia (Especialização em Pesquisa de Mercado em Comunicação) - Escola de Comunicações e Artes, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007.

DONOVA, M. V. et al. Mycobacterium sp. mutant strain producing 9 $\alpha$ -hydroxyandrostenedione from sitosterol. **Appl Microbiol Biotechnol**, V. 67, p. 671–678, 2005.

DOVBNYA, D. et al. Obtaining of 11 $\alpha$ -Hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione from Natural Sterols. **Microbial Steroids: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, V. 1645, p. 259-269, 2017.

FARAMARZI, M. A. et al. Formation of hydroxysteroid derivatives from androst-4-en-3,17-dione by the filamentous fungus *Mucor racemosus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, V. 50, p. 7–12, 2008.

FERNANDES, P.; CABRAL J. M. S. Phytosterols: Applications and recovery methods. **Bioresource Technology**, V. 98, p. 2335-2350, 2007.

FERNANDES-ROSA, F. L.; ANTONINI, S. R. R. Resistência aos mineralocorticóides: pseudo-hipoaldosteronismo Tipo1. **Arq Bras Endocrinol Meta**, V. 51, n. 3, p. 373-381, 2007.

FUJIMOTO, Y. et al. Microbial degradation of the phytosterol side chain. 1. Enzymatic conversion of 3-oxo-24-ethylcholest-4-en-26-oic acid into 3-oxo-chole-4-en-24-oic acid and androst-4-ene-3,17-dione. **J. Am. Chem. Soc.**, V. 104, p. 4718-4720, 1982.

Gadea Grupo Farmacéutico. Disponível em: <<https://www.linkedin.com/company/gadea-pharmaceutical-group/?originalSubdomain=br>>. Acesso em 18 set. 2020.

GALÁN, et al. Mycobacterium smegmatis is a suitable cell factory for the production of steroidal synthons. **Microbial Biotechnology**, V. 10(1), p. 138-150, 2017.

GHAEDIZADEH, S. et al. Understanding the molecular behaviour of Renilla luciferase in imidazolium-based ionic liquids, a new model for the  $\alpha/\beta$  fold collapse. **Biochem. Eng. J.**, V. 105, p. 505-513, 2016.

GOODMAN & GILMAN. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 10. ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, p. 422- 424, 2003.

GULLA, V.; BANERJEE, T.; PATIL, S. Quantitative TLC Analysis of Steroid Drug Intermediates Formed During Bioconversion of Soysterols. **Chromatographia**, V. 68, p. 663-667, 2008.

HALBE, H. W. Biossíntese dos Estrogênios. **Revista De Medicina**, V. 49(4), p. 226-234, 1965.

Hauptman-Woodward Medical Research Institute. Overview and History. Disponível em: < <https://hwi.buffalo.edu/about-us-old/overview/> >. Acesso em 09 mai. 2020.

HINDMARSH, P. C.; GEERSTMA, K. **Congenital Adrenal Hyperplasia - A Comprehensive Guide**. Londres: Academic Press, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/androstenedione>>. Acesso em 12 fev. 2020.

HUANG, C.-L.; CHEN, Y.-R.; LIU, W.-H. Production of androstenediones from phytosterol by mutants of *Mycobacterium* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, V. 39, p. 296-300, 2006.

Hunan Yuxin Pharmaceutical Co., LTD. Disponível em: <<http://www.steroidchem.com/>>. Acesso em 18 set. 2020.

JACOBS, M. **Steroid Medicines and Upjohn: A Profile of Chemical Innovation**. American Chemical Society, 2019. Disponível em: <<https://www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/upjohn-steroid-medicines.html>>. Acesso em 06 mai. 2020.

JARAMILLO-MADRID, A. C. et al. Phytosterol biosynthesis and production by diatoms (*Bacillariophyceae*). **Phytochemistry**, V. 163, p. 46–57, 2019.

JOSEFSEN, K. D.; NORDBORG, A.; SLETTA, H. Bioconversion of Phytosterols into Androstenedione by *Mycobacterium*. **Microbial Steroids: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, V. 1645, p. 177-197, 2017.

KNIGHT, J. C.; WOVCHA, M. G. **Composition of matter and process**. US nº 4,039,381. 17 nov. 1975. 02 ago. 1977. USPTO.

KNIGHT, J. C.; WOVCHA, M. G. **Composition of matter and process**. US nº 4,042,459. 17 nov. 1975. 16 ago. 1977. USPTO.

KNIGHT, J. C.; WOVCHA, M. G. **Composition of matter and process**. US nº 4,098,647. 10 fev. 1977. 04 jul. 1978. USPTO.

KNIGHT, J. C.; WOVCHA, M. G. **Mycobacterium fortuitum strain**. US nº 4,329,432. 28 ago. 1980. 11 mai. 1982. USPTO.

KNIGHT, J. C.; WOVCHA, M. G. **Process for the microbial transformation of steroids**. US nº 4,304,860. 13 fev. 1978. 08 dez. 1981. USPTO.

KNIGHT, J. C.; WOVCHA, M. G. **Steroid intermediates**. US nº 4,176,123. 20 nov. 1978. 27 nov. 1979. USPTO.

KORYCKA-MACHALA, M.; RUMIJOWSKA-GALEWICZ, A.; DZIADEK, J. The Effect of Ethambutol on *Mycobacterium* Cell Wall Permeability to Hydrophobic Compounds. **Polish Journal of Microbiology**, V. 54, n.1, 2005.

LIN, Y. et al. Microbial transformation of phytosterol in corn flour and soybean flour to 4-androstene-3,17-dione by *Fusarium moniliforme* Sheld. **Bioresource Technology**, V. 100, p. 1864-1867, 2009.



LIU, Y. et al. Efficient biotransformation of cholesterol to androsta-1,4-diene-3,17-dione by a newly isolated actinomycete *Gordonia neofelifaecis*. **World J Microbiol Biotechnol**, V. 27, p. 759–765, 2011.

LO, C. K.; PAN, C. P.; LIU, W. H. Production of testosterone from phytosterol using a single-step microbial transformation by a mutant of *Mycobacterium* sp. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, V. 28, p. 280 – 283, 2002.

LO, C. K.; WU, K. L.; LIU, W. H. Interconversion of androst -4-ene-3,17-dione and testosterone by an enzyme from a *Mycobacterium* sp. or its resting cells. **Food Sci Agric Chem** 3, p. 30-35, 2001.

LONE, S. H.; BHAT, K. A. Phytosterols as precursors for the synthesis of aromatase inhibitors: Hemisynthesis of testololactone and testolactone. **Steroids**, V. 96, p. 164-168, 2015.

LOU, W. Y.; ZONG, M. H.; SMITH, T. J. Use of ionic liquids to improve whole-cell biocatalytic asymmetric reduction of acetyltrimethylsilane for efficient synthesis of enantiopure (S)-1-trimethylsilylethanol. **Green Chem.**, V. 8 (2), p. 147-155, 2006.

MACÊDO, M.M.; FERNANDES, F.º.J. Estudo das características dermatoglíficas, somatotípicas e das qualidades físicas básicas nos diversos estágios de maturação sexual. **Fitness & Performance Journal**, V. 2, n. 6, p.315-320, 2003.

MALAVIYA, A.; GOMES, J. Androstenedione production by biotransformation of phytosterols. **Bioresource Technology**, V. 99, p. 6725-6737, 2008.

MANCILLA, R. A.; PAVÉZ-DIAZ, R.; AMOROSO, A. Production and Biotransformation of Phytosterol Microdispersions to Produce 4-Androstene-3,17-Dione. **Microbial Steroids: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, V. 1645, p. 159-165, 2017.

MARQUES, M. P. C. et al. Steroid bioconversion: towards green processes. **Food Bioprod. Process.**, V. 88 (1), p. 12-20, 2010.

MARTÍNEZ-CÁMARA, S. et al. Scale-Up of Phytosterols Bioconversion into Androstenedione. **Microbial Steroids: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, V. 1645, p. 199-210, 2017.

MIRANDA, M.; FONTOURA, M. Pseudohipoaldosteronismo tipo I na criança. **Arquivos de Medicina**, V. 27, n. 6, p. 265-271, 2013.

Monsanto e Pharmacia Upjohn negociam fusão, diz Journal. **Folha de Londrina**, Londrina, 17 dez. 1999. Disponível em: < [https://www.folhadelondrina.com.br/geral/monsanto-e-pharmacia--upjohn-negociam-fusao-diz-journal\\_-237696.html](https://www.folhadelondrina.com.br/geral/monsanto-e-pharmacia--upjohn-negociam-fusao-diz-journal_-237696.html) >. Acesso em 19 jun. 2020.

MORAES, L. A. M. et al. Síndrome dos Ovários Policísticos. Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia. **Projeto Diretrizes: Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina** p. 347-356, 2002.

NELSON, D. L.; MICHAEL, M. C. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2014.

NOH, S. et al. **Method for preparation of androst-4-ene-3,17-dione and androsta-1,4-diene-3,17-dione**. US nº 20040152153. 05 ago. 2004. USPTO.

NOH, S. et al. **Method for preparation of androst-4-ene-3,17-dione and androsta-1,4-diene-3,17-dione**. US nº 7,241,589. 21 nov. 2002. 10 jul. 2007. USPTO.

NORMANDO, A. P. C. et al. M. Avaliação da Utilidade do Estímulo Agudo das Gonadotrofinas e dos Esteróides Ovarianos com Análogo do Hormônio Liberador de Gonadotrofinas no Diagnóstico Diferencial do Hiperandrogenismo Ovariano Funcional. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**. São Paulo, v. 47, n. 1, 2003.

OWEN, R. W.; MASON, A. N.; BILTON, R.F. The degradation of betasitosterol by *Pseudomonas* sp. NCIB 10590 under aerobic conditions. **J. Steroid Biochem.**, V. 23 (3), p. 327-332, 1985.

PENDHARKAR, G. B.; ANJUM, S. D.; PATIL, S. Enhanced biotransformation of phytosterols, a byproduct of soybean refineries, to a key intermediate used for synthesis of steroidal drugs. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, V. 7(5), p. 178-180, 2014.

PEREIRA, E. L.; MIGUEL, A. L. R. Produção industrial de hormônios esteroides. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, V. 15, n. 2, p.411-435, 2017.

Pharmins Pharmaceutical Ingredients. Disponível em: <<http://www.pharmins.net/>>. Acesso em 18 set. 2020.

PIIRONEN, V. et al. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, V. 80, p. 939-966, 2000.

PINTO, R. M. A.; CHIAPETA, S. M. S. V. O cálcio, o estrogênio e a atividade física na intervenção da osteoporose em mulheres no climatério. **Rev. min. Educ. Fis.**, V. 3, n. 2, p. 5- 16, 1995.

PIRES, L. T. **Prospecção Tecnológica: importância, métodos e experiências da Embrapa Cerrados**. Distrito Federal: Embrapa Cerrados, p. 9-22, 2013.

PYKE, T. R.; SALMOND, M. P. **Microbial transformation of steroids**. US nº 4,097,335. 14 fev. 1977. 27 jun. 1978. USPTO.

QUIJANO, G.; COUVERT, A.; AMRANE, A. Ionic liquids: Applications and future trends in bioreactor technology. **Bioresour. Technol.**, V. 101 (23), p. 8923-8930, 2010.

REALPE, C. K. T. **Prospecção tecnológica de combustível renovável para aviação: estudo de caso do diesel verde**. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2016.

REDONDO, F. R. R. **Efeitos do uso de esteróides anabolizantes associados ao treinamento físico de natação sobre o fluxo sanguíneo para o miocárdio de ratos normotensos**. Dissertação (Mestrado em Biodinâmica do Movimento Humano) - Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2007.

RIBEIRO, N. M. et al. **Série Prospecção Tecnológica**, V. 1, Bahia: EDIFBA, 2018. p. 19-99.

ROCHA, F. L. et al. Esteróides anabolizantes: mecanismos de ação e efeitos sobre o sistema cardiovascular. **O Mundo da Saúde**, V. 31, n. 4, p. 470-477, 2007.

ROCHA, M.; AGUIAR, F.; RAMOS, H. O uso de esteroides androgênicos anabolizantes e outros suplementos ergogênicos - uma epidemia silenciosa. **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**, V. 9, n. 2, p. 98-105, 2014.

ROKADE, R. et al. Microbial Biotransformation for the Production of Steroid Medicament. **Secondary Metabolites - Sources and Applications**. IntechOpen, 2018.  
RUMIJOWSKA-GALEWICZ, A. et al. Alterations in lipid composition of Mycobacterium vaccae cell wall outer layer enhance b-sitosterol degradation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** 16, p. 237-244, 2000.

SANTOS, M. et al. Prospecção de tecnologias do futuro: métodos, técnicas e abordagens. **Parcerias Estratégicas**, n. 19, p. 189-224, 2004. Disponível em < [http://seer.cgee.org.br/index.php/parcerias\\_estrategicas/article/viewFile/253/247](http://seer.cgee.org.br/index.php/parcerias_estrategicas/article/viewFile/253/247) >. Acesso em 16 abr. 2020.

SCHIFFER, L. et al. Human steroid biosynthesis, metabolism and excretion are differentially reflected by serum and urine steroid metabolomes: A comprehensive review. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, V. 194, p. 1-25, 2019.

SCHMID, A. et al. Industrial biocatalysis today and tomorrow. **Nature**, V. 49, p.258-268, 2001.

SCOPUS – Base de dados - Disponível em: < <https://www.scopus.com/> >.

SHAHIDI, N. T. **A review of chemistry, biological action and clinical applications of anabolic androgenic steroid**. Clin. Ther., v. 23, p. 1355-1390, 2001.

SHAHZAD, N. et al. Phytosterols as a natural anticancer agent: Current status and future perspective. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, V. 88, p. 786-794, 2017.

SHAO, M. et al. Efficient androst-1,4-diene-3,17-dione production by co-expressing 3-ketosteroid-D1-dehydrogenase and catalase in Bacillus subtilis. **Journal of Applied Microbiology**, V. 122, p. 119-128, 2016.

SHAO, M. et al. Enhanced intracellular soluble production of 3-ketosteroid- $\Delta$ 1-dehydrogenase from *Mycobacterium neoaurum* in *Escherichia coli* and its application in the androst-1,4-diene-3,17-dione production. **J Chem Technol Biotechnol**, 2016.

SIH, C.J.; WANG, K.C.; TAI, H.H. Mechanisms of steroid oxidation by microorganisms. XIII. C22 acid intermediates in the degradation of the cholesterol side chain. **Biochemistry**, V. 7, p. 796-807, 1968.

SILVA, A. L. R.; BORSCHIVER, S. Roadmapping tecnológico a partir de prospecção em documentos científicos: Estudo de caso para o setor de manufatura híbrida. **ALTEC**, 2017.

SILVA, E.O. et al. Non-terpenoid biotransformations by *Mucor* species. **Phytochemistry Reviews**, V.14(5), p. 745-764, 2015.

SILVA, P. R. P et al. Esteróides anabolizantes no esporte. **RevBrasMed Esporte**, V. 8, n. 6, 2002.

SOARES, P. H. S. **Reações de adição conjugada em esteroides – aplicação a potenciais agentes quimioterápicos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade da Beira Interior. Corvilhã, 2013.

SRIPALAKIT, P.; SARAPHANCHOTIWITTHAYA, A. Utilization of phytosterol-containing vegetable oils as a substrate for production of androst-4-ene-3,17-dione and androsta-1,4-diene-3,17-dione by using *Mycobacterium* sp. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, V. 8, p. 18–23, 2016.

STEFANOV, S.; YANKOV, D.; BESCHKOV, V. Biotransformation of Phytosterols to Androstenedione in Two Phase Water-oil Systems. **Chem. Biochem. Eng. Q.**, V. 20 (4), p. 421–427, 2006.

SU, L. et al. Improvement of AD Biosynthesis Response to Enhanced Oxygen Transfer by Oxygen Vectors in *Mycobacterium neoaurum* TCCC 11979. **Appl Biochem Biotechnol**, China, 2017.

SU, L. et al. Cofactor engineering to regulate NAD<sup>+</sup>/NADH ratio with its application to phytosterols biotransformation. **Microbial Cell Factories**, 2017.

SUKHODOLSKAYA, G. V. et al. Steroid-1-dehydrogenase of *Mycobacterium* sp. VKM Ac-1817D strain producing 9 $\alpha$ -hydroxy-androst-4-ene-3,17-dione from sitosterol. **Appl Microbiol Biotechnol**, V. 74, p. 867-873, 2007.

SZENTIRMAI, A. Microbial physiology of side chain degradation of sterols. **J. Ind. Microbiol.**, V. 6, p. 101-106, 1990.

TEIXEIRA, L. P. **Prospecção Tecnológica: importância, métodos e experiências da Embrapa Cerrados**. Documentos 317. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 34 p., 2013.

THYGS, F. B.; MERZ, J. Downstream Process Synthesis for Microbial Steroids. **Microbial Steroids: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**, V. 1645, p. 321-345, 2017.

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

WANG, F.; YAO, K.; WEI, D. From Soybean Phytosterols to Steroid Hormones. Soybean and Health. China: InTech, p.231-251, 2011.

WANG, X. et al. Two-Step Bioprocess for Reducing Nucleus Degradation in Phytosterol Bioconversion by *Mycobacterium neoaurum* NwIB-R10hsd4A. **Appl Biochem Biotechnol**, 2019.

WANG, Z. F. et al. Lecithin-enhanced biotransformation of cholesterol to androsta-1,4-diene-3,17-dione and androsta-4-ene-3,17-dione. **J Chem Technol Biotechnol**, V. 77, p. 1349–1357, 2002.

WARD, R.D.; WEIGEL, N.L. Steroid/Thyroid Hormone Receptors. **Encyclopedia of Biological Chemistry**, p. 308-313, 2013.

WOVCHA, M. G.; BIGGS, C. B. **Microorganism mutant conversion of sterols to androsta-4-ene-3,17-dione**. US n° 4,345,030. 8 set. 1980. 17 ago. 1982. USPTO.

WOVCHA, M. G.; BIGGS, C. B. **Mycobacterium phlei mutants convert sterols to androsta-1,4-diene-3,17-dione and androsta-4-ene-3,17-dione**. US n° 4,345,029. 8 set. 1980. 17 ago. 1982. USPTO.

WOVCHA, M. G.; BIGGS, C. B. **Process for preparing androst-4-ene-3,17-dione**. US n° 4,293,644. 09 out. 1977. 06 out. 1981. USPTO.

WOVCHA, M. G.; BIGGS, C. B.; PYKE, T. R. **Mycobacterium fortuitum mutant**. US n° 4,345,033. 8 set. 1980. 17 ago. 1982. USPTO.

WOVCHA, M. G.; BIGGS, C. B.; PYKE, T. R. **Biologically pure culture of mutant mycobacterium**. US n° 4,339,539. 8 set. 1980. 13 jul. 1982. USPTO.

WOVCHA, M. G.; BIGGS, C. B.; PYKE, T. R. **Mycobacterium fortuitum strain**. US n° 4,328,315. 8 set. 1980. 04 mai. 1982. USPTO.

WOVCHA, M. G.; BIGGS, C. B.; PYKE, T. R. **Process for microbial transformation of steroids**. US n° 4,211,841. 20 nov. 1978. 08 jul. 1980. USPTO.

WOVCHA, M. G.; BIGGS, C. B.; PYKE, T. R. **Process for preparing androsta-1,4-diene-3,17-dione and androst-4-ene-3,17-dione**. US n° 4,293,645. 09 nov. 1977. 06 out. 1981. USPTO.

WOVCHA, M. G.; BROOKS, K. E. **Composition of matter and process**. US n° 4,293,646. 07 ago. 1978. 06 out. 1981. USPTO.

WOVCHA, M. G.; BROOKS, K. E. **Mycobacterium fortuitum mutant**. US n° 4,345,034. 8 ago. 1980. 17 ago. 1982. USPTO.

WOVCHA, M. G.; BROOKS, K. E. **Mycobacterium fortuitum mutant**. US n° 4,358,538. 8 set. 1980. 9 nov. 1982. USPTO.

XIONG, Z. et al. Microbial transformation of androst-4-ene-3,17-dione by *Beauveria bassiana*. **Steroids**, V. 71, p. 979-983, 2006.

XU, X.W. et al. Influence of temperature on nucleus degradation of 4-androstene-3, 17-dione in phytosterol biotransformation by *Mycobacterium* sp. **Letters in Applied Microbiology** **61**, p. 63-68, 2015.

XU, Y. et al. Study on substrate and solubilizer in side-chain cleavage of sterols by *Mycobacterium* sp. MB 3863. **Huaxue Fanying Gongcheng Yu Gongyi/Chemical Reaction Engineering and Technology**, V. 31(5), p. 423-429, 2015.

YAMANA, K.; LABRIE, F.; LUU-THE, V. Human type 3 5 $\alpha$ -reductase is expressed in peripheral tissues at higher levels than types 1 and 2 and its activity is potently inhibited by finasteride and dutasteride. **Horm Mol Biol Clin Invest**, V.2(3), p. 293–299, 2010.

YUAN, J.; GUAN, Y.; YAO, S. Evaluation of Biocompatible Ionic Liquids for Their Application in Phytosterols Bioconversion by *Mycobacterium* sp. Resting Cells. **ACS Sustainable Chem. Eng.**, V. 5, p. 10702-10709, 2017.