

## Revisión bibliográfica

# Biotransformación de esteroides con diferentes microrganismos

## Biotransformation of steroids with different microorganisms

In memoria de Miguel Ángel Aparicio Trinidad

Jorge Luis García, Rigoberto Ramos, Javier Gómez, Juan Carlos Vázquez, Arturo Cano

Laboratorio de Biotransformaciones y Química de Productos Naturales, L-314  
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM

---

### Resumen

La introducción de un grupo hidroxilo “*biohidroxilación*” en el esqueleto esteroide, es una etapa importante en la síntesis de nuevos esteroides, ya que determinan su actividad biológica, como hormonas y fármacos fisiológicamente activos. Se conocen más de 300 fármacos esteroideos, lo que representa la segunda categoría dentro del mercado farmacéutico después de los antibióticos. En la producción de fármacos esteroideos y hormonas se han aplicado diversas biotransformaciones a escala industrial, las cuales han funcionalizado de manera *químico, regio* y *estereo-selectiva* los diferentes tipos de materias primas por medio de reacciones de hidroxilación, oxidación de Bayer-Villiger, reacciones de oxidación, reducción, isomerización, adiciones de Michael y reacciones de condensación entre otras. Desde el punto de vista de la Química Verde constituyen una importante metodología química acorde con el medio ambiente.

---

### Abstract

The introduction of a hydroxyl group “*biohydroxylation*” in the steroid skeleton is an important step in the synthesis of new steroids used physiologically as hormones and active drugs. There are currently about 300 known steroid drugs whose production constitutes the second category within the pharmaceutical market after antibiotics. Several biotransformations at industrial scale have been applied in the production of steroid hormones and drugs, which have functionalized different types of raw materials by means of *chemo, regio* and *stereo-selective* reactions (hydroxylation, Bayer-Villiger oxidation, oxidation reactions, reduction of group carbonyl, isomerization, and Michael additions, condensation reactions, among others). From the viewpoint of Green Chemistry biotransformations are an important chemical methodology according to the environment.

---

**Palabras clave:** biotransformaciones, compuestos esteroideos, transformaciones biológicas, bioconversiones, microrganismos.

**Key words:** biotransformation, steroid compounds, biological transformation, bioconversions, microorganism.

---

**Correspondencia:**

Dr. Arturo Cano Flores  
Laboratorio de Biotransformaciones y Química de Productos Naturales, L-314  
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Campo II,  
UNAM  
Batalla 5 de mayo s/n, Col. Ejército de Oriente  
Delegación Iztapalapa, CP. 09230, México, D.F.  
Email: aecanomx@unam.mx, aecanomx@yahoo.com

Fecha de recepción: 04 de septiembre de 2014

Fecha de recepción de modificaciones:

06 de marzo de 2015

Fecha de aceptación: 14 de abril de 2015

## Introducción

Los esteroides (stereos=sólidos) son compuestos orgánicos derivados de los alcoholes, los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en el reino animal y vegetal. Su esqueleto base presenta 17 átomos de carbono en un sistema de anillos tetracíclicos conocido como perhidrociclopentanofenanreno (gonano, esterano). En dicho grupo de sustancias se agrupan compuestos vitales para la vida, tales como el colesterol, los ácidos biliares, hormonas sexuales, vitamina D, corticoesteroides, agliconas cardíacas, antibióticos, entre otras. Algunas de las más potentes toxinas son alcaloides esteroidales; además, son responsables de importantes funciones biológicas en la célula, por ejemplo los esteroides derivados del androstano, pregnano y estrano tienen actividad hormonal,<sup>1-5</sup> los ácidos biliares son importantes para la digestión y absorción de las grasas y las agliconas cardiotónicas son empleadas para el tratamiento de enfermedades del corazón. Los esteroles son constituyentes de la membrana celular, esenciales para su estabilidad y desarrollo celular; además, de ser los precursores de los ácidos biliares y hormonas esteroidales. Un amplio número de esteroides son empleados como agentes anti-inflamatorios,<sup>6</sup> inmunosupresores, progestacionales, diuréticos, anabólicos y como anticonceptivos.<sup>7-9</sup> Algunos han sido usados para el tratamiento de cáncer de próstata y mama,<sup>10-11</sup> insuficiencia suprarrenal,<sup>12</sup> en la prevención de enfermedades del corazón,<sup>13</sup> como agentes anti-fúngicos,<sup>14</sup> como ingredientes activos para el tratamiento de la obesidad<sup>15</sup> y SIDA.<sup>16</sup> Recientemente, se ha determinado la actividad anti-viral frente al virus del herpes simple tipo I de algunos glicósidos esteroidales.<sup>17</sup> La acción terapéutica de algunas hormonas esteroidales ha sido asociada a su interacción con receptores intracelulares, los cuales actúan como factores de transcripción en la regulación de la expresión genética.<sup>18</sup> Hace un tiempo, se informó que algunos esteroides, tales como dehidroepiandrosterona (DHEA), progesterona, pregnalona y sus derivados sulfatados;<sup>19, 20</sup> así como, el 17 $\beta$ -estradiol, la allopregnanolona y sus derivados sintéticos alfoxolano y ganaxolano son considerados neuroesteroideos, por su acción que ejercen a nivel del SNC.<sup>19</sup> La actividad fisiológica de los esteroides depende de su estructura, por ejemplo; del tipo, número, orientación espacial y reactividad de los diferentes grupos funcionales presentes en el núcleo del esterano; así como, del estado de oxidación de los anillos. Por ejemplo, la presencia de una función oxigenada en el C-11 $\beta$  es crucial para su actividad anti-inflamatoria, la función hidroxilo en C-17 $\beta$  determina sus propiedades androgénicas, la aromatización del anillo A en su efecto estrogénico; los corticosteroides tienen al grupo 3-ceto-5-eno y la cadena lateral del pregnano en C-17.<sup>21, 22</sup> Actualmente, se conocen cerca de 300 fármacos esteroidales, y

este número tiende a crecer, su producción representa la segunda categoría dentro del mercado farmacéutico después de los antibióticos.<sup>23</sup> La producción anual de esteroides excede el millón de toneladas y el mercado global es de alrededor de diez billones de dólares.<sup>24</sup>

La producción de fármacos esteroidales y hormonas es uno de las mejores ejemplos de las aplicaciones que tiene las biotransformaciones a escala industrial.<sup>3, 21</sup> Las transformaciones microbiológicas son una herramienta efectiva para la preparación de diversos compuestos,<sup>25</sup> los cuales pueden ser difíciles de obtener por métodos químicos convencionales y han sido extensamente usadas en la bioconversión de esteroides.<sup>24</sup> Alrededor de 1950, se dan a conocer los efectos farmacológicos del cortisol y progesterona; además de la hidroxilación de esta última en C-11 $\alpha$  por especies de *Rhizopus*, iniciándose una etapa muy importante en el desarrollo de la síntesis de esteroides con actividad biológica.<sup>4-5</sup> Actualmente, se reconoce la gran versatilidad de los sistemas microbianos en la industria farmacéutica para la producción comercial de esteroides y otros fármacos.<sup>26-27</sup> En la literatura se han informado de varios cientos de transformaciones microbiológicas de esteroides; además, muchas bioconversiones se han incorporado en numerosas síntesis parciales de nuevos compuestos para su evaluación como hormonas o fármacos.<sup>21, 28-31</sup> Los derivados químicos de algunos esteroides han mostrado poseer mejores ventajas terapéuticas que el material de partida. Sin embargo, los objetivos principales en la investigación y desarrollo de la industria de los fármacos esteroidales actualmente consiste en la detección y aislamiento de cepas microbianas con actividad novedosa o capacidad de transformación más eficiente, donde pueden jugar un papel destacado la ingeniería genética y la ingeniería metabólica de bacterias, hongos y plantas.<sup>32-35</sup>

En la presente revisión, sin ser una revisión muy exhaustiva, se pretende enfatizar la importancia que tiene las biotransformaciones con microrganismos en la obtención de sustancias químicas esteroidales con interés farmacéutico, como una estrategia químico-biológica alterna a la transformación o síntesis química y destacando la reacción química que efectúan los diferentes tipos de microrganismos en la funcionalización del esqueleto esteroide.

### Transformaciones microbiológicas de hormonas esteroidales

Desde el punto de vista de la química verde las biotransformaciones constituyen una metodología importante en química orgánica.<sup>36</sup> Las transformaciones microbiológicas en los esteroides ha sido una herramienta química indispensable

para la preparación de muchos intermediarios y en la generación de nuevas drogas, donde la funcionalización química –hidroxilación, oxidación de Bayer-Villiger, reducción de cetonas, reducción, isomerización, adiciones de Michael y reacciones de condensación– se pueden llevar a cabo en diferentes posiciones del esqueleto del esteroide de manera *químico, regio* y *estereo-selectiva*, lo cual resulta complicado y en muchas ocasiones imposible de funcionalizar por métodos químicos. Actualmente, cualquier centro estereogénico del esqueleto esterooidal puede ser estéreo específicamente hidroxilado. Hoy en día, las hidroxilaciones en C-11 $\alpha$ , C-11 $\beta$ , C-15 $\alpha$  y C-16 $\alpha$  se realizan industrialmente vía una hidroxilación microbiana con buenos rendimientos y exceso enantiomérico (*ee*). A continuación se ejemplifican algunas transformaciones microbiológicas realizadas a diferentes esteroides naturales y sintéticos.<sup>24</sup>

En la literatura se encuentra bien documentada la hidroxilación *regio* y *estereo-selectiva* en C-14 con orientación  $\alpha$  en la progesterona (**1**) y otros esteroides por diversos hongos con un buen rendimiento, como *Thamnostylum piriforme* (ATCC 8992), *Mucor griseocyanus* (ATCC 1207a), *Actinomucor elegans* (MMP 3132) y *Zygodesmu* ssp (ATCC 14716). De la incubación de **1** con *T. piriforme* se obtuvieron 14  $\alpha$ -hidroxiprogesterona (**2**, 32 %) y 9 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (**3**, 1.4 %), mientras que de **1** con *M. griseocyanus* se obtuvieron **2** (13.4 %), 7 $\alpha$ ,14 $\alpha$ -dihidroxiprogesterona (**4**, 6.5 %) y 6 $\beta$ ,14  $\alpha$ -dihidroxiprogesterona (**5**, 2.8 %). De la transformación de **1** con *A. fumigatus* después de 24 horas de incubación, se obtuvieron diferentes productos mono- y dihidroxilados; 11  $\alpha$ -hidroxiprogesterona (**6**, 33%), 11 $\alpha$ ,15 $\beta$ -dihidroxiprogesterona (**7**, 17%), 7 $\beta$ ,15 $\beta$ -dihidroxiprogesterona (**8**, 14 %), 15  $\beta$ -hidroxiprogesterona (**9**), 7 $\beta$ -hidroxiprogesterona (**10**), donde **9** y **10** se detectaron en mínima cantidad. Finalmente, a las 72 horas los productos principales fueron **7** (48%) y **8** (25 %), observándose que las posiciones 11 $\alpha$  y 15 $\beta$  se hidroxilan más fácilmente que la posición 7 $\beta$  en **1**.<sup>37-38</sup> De la incubación de **1** con *Saprolegnia hypogyna* se obtuvieron 4-androsten-3, 17-diona (**11**), testosterona (**12**) y testolactona (**13**).<sup>39</sup> Los compuestos 15 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (**14**, 47%) y 12 $\beta$ , 15  $\alpha$ -dihidroxiprogesterona (**15**, 25%) fueron aislados de la biotransformación de **1** con *Fusarium culmorum*.<sup>40</sup> De la biotransformación de **1** con la bacteria termofílica *Bacillus stearothermophilus* fueron aislados tres productos de monohidroxilación, 20 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (**16**, 61%), 6  $\beta$ -hidroxiprogesterona (**17**, 21%) y 6 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (**18**, 14%) y 9, 10-seco-pregn-3, 9, 20-triona (**19**, 4%).<sup>41</sup> Recientemente, se informó de la biotransformación de **1** con *Penicillium aurantiogriseum* durante diez días para dar **11** y androsta-1, 4-dien-3,17-diona (**86**), dichos productos fueron observados en la biotransformación de **1** con *Bacillus sphaericus*,

observándose principalmente la hidrólisis de la cadena en C-17, ver figura 1.<sup>42-43</sup>

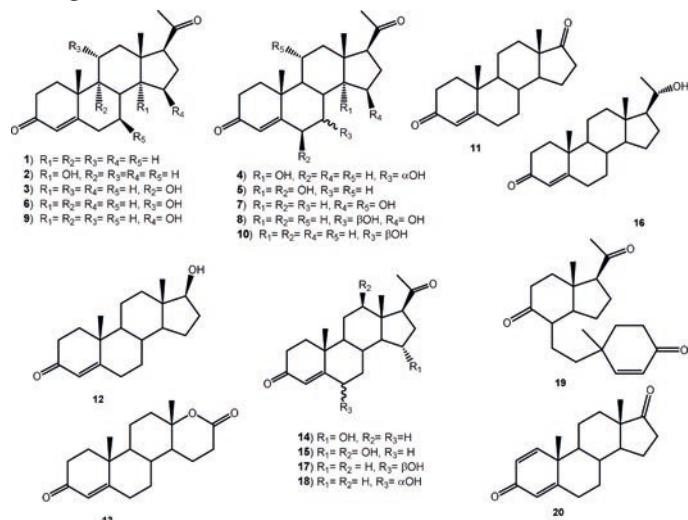


Figura 1. Productos de biotransformación de la progesterona con diferentes microrganismos (1)

En la biotransformación de la 5 $\beta$ -pregnan-3,20-diona (**20**) con *T. piriforme* se caracterizaron a la 14 $\alpha$ -hidroxi-5 $\beta$ -pregnan-3, 20-diona (**21**, 11.8%), 3 $\beta$ , 14 $\alpha$ -dihidroxi-5 $\beta$ -pregnan-20-ona (**22**, 0.5%) y 14 $\alpha$ ,15 $\beta$ -dihidroxi-5 $\beta$ -pregnan-3, 20-diona (**23**, 0.4%), mientras que en la biotransformación de 3 $\beta$ -hidroxi-5  $\beta$ -pregnan-20-ona (**24**) se aislaron **22** (0.6%) y 3 $\beta$ ,9 $\alpha$ ,14  $\alpha$ -trihidroxi-5 $\beta$ -pregnan-20-ona (**25**, 16%) después de 96 h de incubación, observándose que **24** es biotransformado más lentamente que **20** por dicho hongo. La transformación microbiológica de **24** con *Actinomucor elegans* produjo la mezcla de los compuestos **22** y **25** en menor rendimiento que *T. piriforme* y un producto minoritario que fue identificado como 3 $\beta$ ,9 $\alpha$ -dihidroxi-5 $\beta$ -pregnan-20-ona (**26**), figura 2.<sup>37</sup>

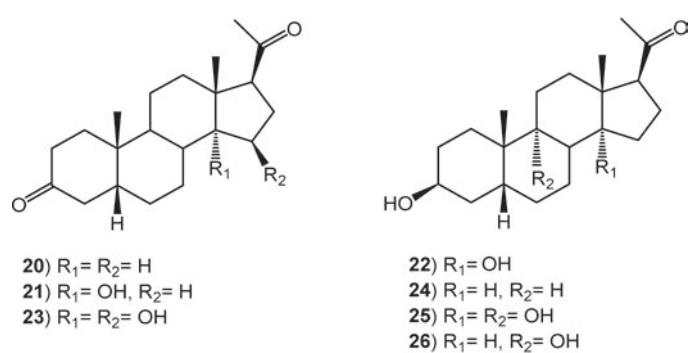
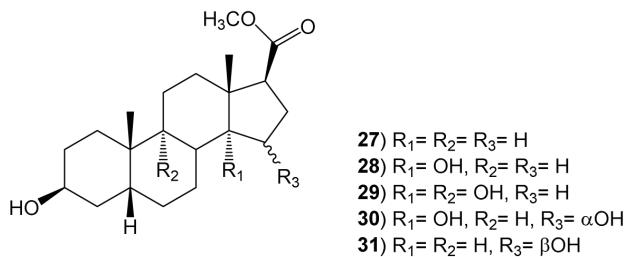


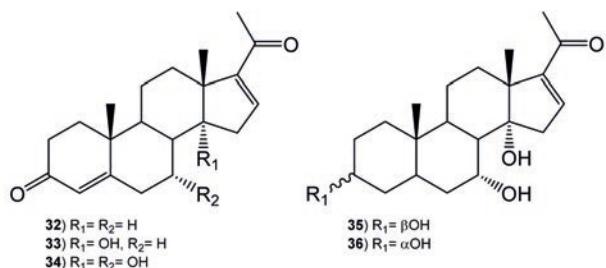
Figura 2. Productos de biotransformación de la 5 $\beta$  pregnano-3, 20-diona (20)

De la biotransformación del  $3\beta$ -hidroxi- $5\beta,17(\alpha)$ -etianicato de metilo (**27**) con *T. piriforme* se obtuvo la mezcla de  $3\beta,14\alpha$ -dihidroxi- $5\beta,17(\alpha)$ -etianicato de metilo (**28**, 9%) con  $9\alpha,14\alpha$ -dihidroxi-derivado (**29**, 12%) y dos productos minoritarios  $14\alpha,15\alpha$ -dihidroxi (**30**) y  $15\beta$ -hidroxi (**31**), ver figura 3. El compuesto **28** fue identificado como producto de biotransformación con *A. elegans*, *M. griseocyamus* y *Zygosdesmus* sp.<sup>37</sup>

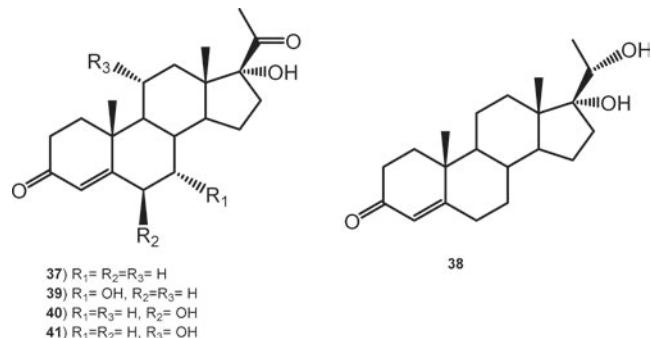


**Figura 3. Productos de biotransformación de la 3-hidroxi-5,17(H)-etianicato de metilo (27)**

Se ha informado de la biotransformación de la 16-dehidropregesterona (**32**) con *Mucor piriformis* para dar el producto de hidroxilación en C-14 $\alpha$  a 24 h de biotransformación (14 $\alpha$ - hidroxi- pregnan- 4, 16- dien- 3, 20-diona, **33**); mientras que los microsomas obtenidos de **33** en presencia de NADPH, transformaron **32** en 48 h a 7 $\alpha$ , 14 $\alpha$ -dihidroxi- pregnan- 4, 16- dien- 3, 20- diona (**34**, 78%), 3 $\beta$ , 7 $\alpha$ , 14 $\alpha$ - trihidroxi- 5 $\alpha$ - pregnan- 16- en- 20- ona (**35**, 3%) y 3 $\alpha$ , 7 $\alpha$ , 14 $\alpha$ - trihidroxi- 5 $\alpha$ - pregnan- 16- en- 20- ona (**36**, 2%), ver figura 4.<sup>44</sup> Por otro lado, de la biotransformación de la 17 $\alpha$ - hidroxiprogesterona (**37**) con el mismo microrganismo después de 48 h de incubación se obtuvieron los compuestos 17 $\alpha$ , 20 $\alpha$ -dihidroxipregnán- 4- en- 3- ona (**38**, 19%), 7 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -dihidroxipregnán- 4- en- 3, 20-diona (**39**, 20%), 6 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 20 $\alpha$ -trihidroxipregnán- 4- en- 3- ona (**40**, 18%) y 11 $\alpha$ , 17 $\alpha$ , 20 $\alpha$ -trihidroxipregnán- 4- en- 3- ona (**41**, 25%), observándose que *M. piriformis* es capaz de hidroxilar las posiciones C-6, C-7, C-11 y C-14 de manera estereoespecífica; además de reducir el sistema 4-en-3-ona en el anillo A y el grupo ceto del C-20.<sup>44</sup> La biotransformación **37** con *Fusarium culmorum*, condujo a la formación de **14** (47 %) y **15** (12 $\beta$ , 15 $\alpha$ - dihidroxiprogesterona, 25%) como se ilustra en la figura 5.<sup>40</sup>



**Figura 4. Productos de biotransformación 16-dehidropregesterona (32).**



**Figura 5. Productos de biotransformación 17-hidroxiprogesterona (37)**

La pregnenolona (3 $\beta$ -hidroxipregn-5-en-20-ona, **42**) precursora de muchas hormonas esteroideas, fue biotransformada por *Mucor piriformis* para obtener dos metabolitos, 3 $\beta$ , 7 $\alpha$ -dihidroxipregn- 5- en- 20- ona (**43**) y 3 $\beta$ , 7 $\alpha$ , 11 $\alpha$ -trihidroxipregn- 5- en- 20- ona (**44**, 45) donde **44** (46.4%) es también producto de bioconversión de **42** con *Mucor circinelloides* var. *lusitanicus*.<sup>46</sup> La transformación de **42** con *Botrytis cinerea* se obtuvieron 3 $\beta$ , 11 $\alpha$ , 16 $\beta$ - trihidroxipregn- 5- en- 20- ona (**45**, 39%) y 11 $\alpha$ , 16 $\beta$ - dihidroxipregn- 4- en- 3, 20-diona (**46**, 6%), la formación de los productos de hidroxilación en C-11 y C-16 por *B. cinerea* puede estar determinado por la presencia del grupo acetilo en C-20.<sup>47</sup> La biotransformación de **42** con diferentes microrganismos: *Cunninghamella elegans*, *Rhizopus stolonifer* y *Gibberella fujikuroi*, fue informada por Choudhary *et. al.* (2005).<sup>48</sup> La incubación de **42** con *C. elegans* produjo los productos 3 $\beta$ , 7 $\beta$ , 11 $\alpha$ - trihidroxipregn- 5- en- 20- ona (**47**, 28%), 3 $\beta$ , 6 $\alpha$ , 11 $\alpha$ , 12 $\beta$ , 15 $\beta$ - pentahidroxipregn- 4- en- 20- ona (**48**, 4%) y 3 $\beta$ , 6 $\beta$ , 11 $\alpha$ - trihidroxipregn- 4- en- 20- ona (**49**, 2%), mientras que la incubación con *G. fujikuroi* se obtuvieron dos productos 3 $\beta$ , 7 $\beta$ - dihidroxipregn- 5- en- 20- ona (**50**, 3%) y 6 $\beta$ , 15 $\beta$ - dihidroxipregn- 4- en- 3, 20- diona (**51**, 2%). De la biotransformación de **42** con diferentes cepas de *Bacillus* se obtuvieron como productos mayoritarios **43**, **50**, y 7-oxo-pregnenolona (**52**),<sup>49</sup> mientras con *Fusarium oxysporum* var. *cubense* produjo como único producto **43**, ver figura 6.<sup>50</sup> La biotransformación del acetato de la pregnenolona (**53**) con *C. elegans* generó **42**, androsta- 1,4- dien- 3, 17- diona (**86**), 6 $\beta$ , 15 $\beta$ - dihidroxandrosta- 4- en- 3, 17- diona (**54**) y 11 $\alpha$ , 15 $\beta$ - dihidroxipregn- 4- en- 3, 20- diona (**55**), mientras con *R. stolonifer* se obtuvieron los productos 11 $\alpha$ - hidroxipregn- 4- en- 3, 20- diona (**56**) y **51**.<sup>48</sup>

La transformación microbiológica de la mezcla racémica del 13- etil- 17 $\beta$ - hidroxi- 18, 19- dinor- 17 $\alpha$ - pregn- 4- en- 20- in- 3- ona (**57**) fue ensayada con diferentes hongos *Rhizopus nigricans*, *R. arrhizus*, *Aspergillus niger*, *A. ochraceus* y *Curvularia lunata*.<sup>51</sup> La bioconversión de la mezcla racémica de **57** por *R. arrhizus*

produjo una mezcla de ( $\pm$ )-13- etil- 10 $\beta$ , 17 $\beta$ - dihidroxi- 18, 19-dinor- 17 $\alpha$ - pregn- 4- en- 20- in- 3- ona (**58**, 28.4%) como único producto; mientras que *R. nigricans*, *A. niger* y *C. lunata* biotransformaron **57** a **58** de manera más lenta e ineficiente. La mezcla racémica ( $\pm$ )-13- etil- 7 $\beta$ , 17 $\beta$ - dihidroxi- 18, 19-dinor- 17 $\alpha$ - pregn- 4- en- 20- in- 3- ona (**59**, 4.3%) fue obtenida como productos de la incubación de la mezcla **57** con *A. ochraceus*, ninguno de los hongos ensayados fueron capaces de diferenciar a los dos enantiómeros de **57** en el curso de la reacción de hidroxilación; además, la ausencia del derivado hidroxilado en C-11 se pudo explicar debido a la presencia del grupo etilo en C-13 o el grupo etinil en C-17. La transformación microbiológica de la mezcla racémica y del enantiómero dextro del compuesto **57**, se ha descrito empleando diferentes especies de *Cunninghamella*.<sup>52</sup> Por ejemplo, la transformación de la mezcla racémica de **57** por *Cunninghamella blakesleeana* produjo **58** (5.3%), 13- etil- 6 $\beta$ , 17 $\beta$ - dihidroxi- 18, 19-dinor- 17 $\alpha$ - pregn- 4- en- 20- in- 3- ona (**60**, 3.6%), 13- etil- 15 $\alpha$ , 17 $\beta$ -dihidroxi- 18, 19-dinor- 17 $\alpha$ - pregn- 4- en- 20- in- 3- ona (**61**, 3.0%) y 13- etil- 6 $\beta$ , 10 $\beta$ , 17 $\beta$ - trihidroxi- 18, 19-dinor- 17 $\alpha$ - pregn- 4- en- 20- in- 3- ona (**62**, 3.6%), ver figura 7. Por otro lado, de la biotransformación del enantiómero (*dextro*) con el mismo hongo, se obtuvieron **58** (3.5%), **60** (1.0%) y **62** (4.8%).

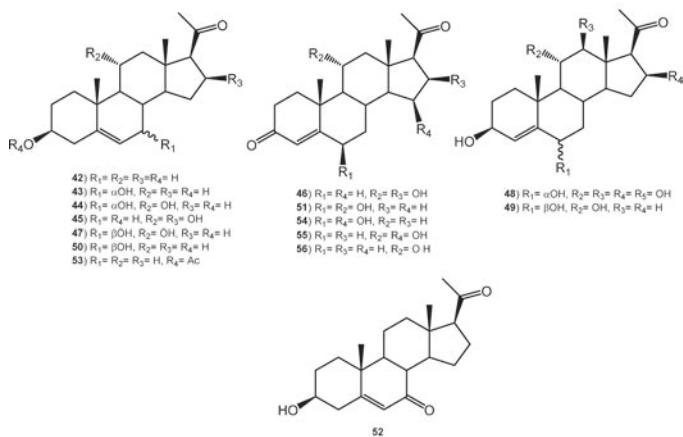


Figura 6. Productos de biotransformación de la pregnenolona (42) y su derivado acetilado (53).

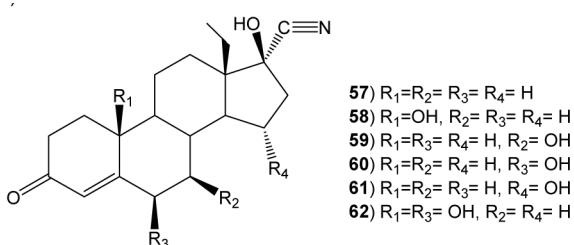


Figura 7. Productos de biotransformación de ( $\pm$ )- 13- etil- 17 $\beta$ - hidroxi- 18- 19 dinor- 17 $\alpha$ - pregn- 4- en- 3- ona (**57**).

De la biotransformación del danazol (17 $\beta$ - hidroxi- 17 $\alpha$ -pregna- 2, 4- dien- 20- ino- [2, 3- d]- isoxazole, **63**) con *Fusarium lini*, *Aspergillus niger* y *Cephalosporium aphidicola* se obtuvieron 17 $\beta$ - hidroxi- 2- (hidroximetil)- 17 $\alpha$ - pregn- 4- en- 20- in- 3- ona (**64**) y 17 $\beta$ - hidroxi- 2- (hidroximetil)- 17 $\alpha$ - pregn- 1, 4- dien- 20- in- 3- ona (**65**), ver figura 8; mientras con *Bacillus cereus* se obtuvo **65**, como único producto.<sup>53</sup>

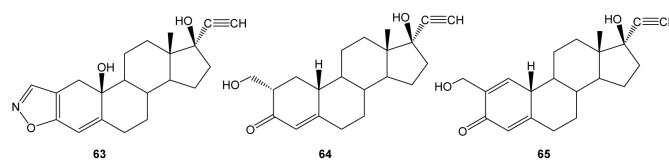


Figura 8. Productos de biotransformación del danazol (17 $\beta$ - hidroxi- 17 $\alpha$ -pregna- 2, 4- dien- 20- ino- [2, 3- d]- isoxazole, **63**)

La noretisterona (noretindrona, **66**) es un potente progestano utilizado como agente anticonceptivo, su biotransformación con *Cephalosporium aphidicola* produjo 17 $\alpha$ -etinilestradiol (**67**); mientras que **67** fue biotransformado por *Cunninghamella elegans* para dar los compuestos 19- nor- 17 $\alpha$ -pregna- 1, 3, 5 (10)- trien- 20- in- 3, 4, 17 $\beta$ - triol (**68**), 19- nor- 17 $\alpha$ -pregna- 1, 3, 5 (10)- trien- 20- in- 3, 7 $\alpha$ , 17 $\beta$ - triol (**69**), 19- nor- 17 $\alpha$ -pregna- 1, 3, 5 (10)- trien- 20- in- 3, 11 $\alpha$ , 17 $\beta$ - triol (**70**), 19- nor- 17 $\alpha$ -pregna- 1, 3, 5 (10)- trien- 20- in- 3, 6 $\beta$ , 17 $\beta$ - triol (**71**) y 6 $\beta$ - metoxi- 19- nor- 17 $\alpha$ -pregna- 1, 3, 5 (10) trien- 20- in- 3, 17 $\beta$ - diol (**72**), figura 9.<sup>54</sup>

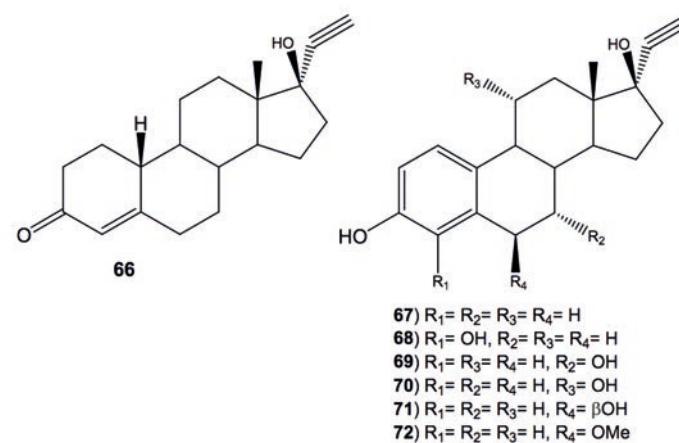


Figura 9. Productos de biotransformación de la noretisterona (**66**) y 17 alfa- etinilestradiol (**67**).

La androst-4-en-3,17-diona (**11**) sustancia que juega un papel importante en el metabolismo de fármacos, entre otras muchas funciones, fue biotransformada con *M. piriformis* para dar como producto principal la 6 $\beta$ -hidroxiandrost-4-en-3,17-diona (**73**, 13 %), además de cuatro productos minoritarios 14

$\alpha$ - hidroxiandrost- 4- en- 3, 17- diona (**74**, 2%), 7 $\alpha$ - hidroxiandrost- 4- en- 3, 17- diona (**75**, 2%), testosterona (**12**, 3%), 6 $\beta$ - hidroxitestosterona (**76**, 1%). De la biotransformación de **11** con *M. griseocyamus* se obtuvieron **74** (9%), **75** (4%) y 14  $\alpha$ - hidroxitestosterona (**77**, 9%) como productos mayoritarios; asimismo, se identificaron a **11** y **73** en la mezcla de productos de biotransformación.<sup>55</sup> A partir de la incubación de **11** con *M. piriformis* se obtuvieron **74**- **77**, y 7 $\alpha$ , 14 $\alpha$ - dihidroxitestosterona (**78**).<sup>37</sup> Los esteroides hidroxilados en C-9 son importantes intermediarios en la síntesis de fármacos anti-inflamatorios altamente efectivos. La transformación microbiológica de **11** a 9  $\alpha$ - hidroxiandrost- 4- en- 3, 17- diona (**79**) fue estudiada con *Rhodococcus* sp en un medio de cultivo bajo en nutrientes a pH fijo, figura 10.<sup>56</sup>

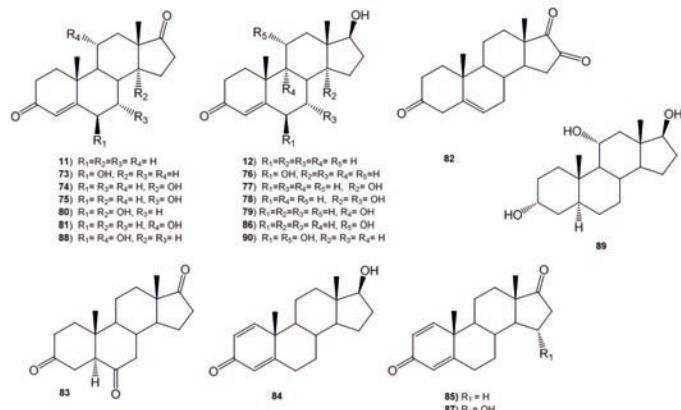


Figura 10. Productos de biotransformación de androst-4-en-3, 17-diona (11).

La incubación de **11** con *Bacillus* strain HA-V6- 3 produjo los metabolitos **12**, **73**- **76**, 6 $\beta$ , 14 $\alpha$ - dihidroxandrosten- 4- en- 3, 17- diona (**80**), 11 $\alpha$ - hidroxandrosten- 4- en- 3, 17- diona (**81**), androst- 4- en- 3, 6, 17- triona (**82**) y 5 $\alpha$ - androsta- 3, 6, 17- triona (**83**) como lo describen Schaaaf et. al., (1998), figura 10.<sup>57</sup>

De la bioconversión de **11** con *C. aphidicola* se obtuvieron **73** y **74**,<sup>58</sup> mientras que de la fermentación de **11** con *Curvularia lunata*, se obtuvieron los productos **81** (4%), 17 $\beta$ - hidroxandrosten- 1, 4- dien- 3- ona (**84**, 4.4%), androsta- 1, 4- dien- 3, 17- diona (**86**, 3%), 11 $\alpha$ , 17 $\beta$ - dihidroxandrosten- 4- en- 3- ona (**86**, 4%) y **87** (15 $\alpha$ - hidroxandrosten- 1, 4- dien- 3, 17- diona, 2.8%).<sup>59</sup> La biotransformación de **11** con el hongo *Beauveria bassiana* fue estudiada en tiempos y con medios de cultivo a diferentes pH (pH= 6 y 7).<sup>60</sup> A pH= 6 se obtuvieron dos productos: **86** y 6 $\beta$ , 11 $\alpha$ - dihidroxandrosten- 4- en- 3, 17- diona (**88**), donde se observa la hidroxilación estereoselectiva en C- 11 $\alpha$  y C- 6 $\beta$ ; mientras a pH =7 se obtuvieron los compuestos **12**, **86**, 3  $\alpha$ , 11 $\alpha$ , 17 $\beta$ - trihidroxi- 5 $\alpha$ - androstan- o (b9) y 6 $\beta$ , 11 $\alpha$ , 17 $\beta$ - trihidroxi- androst- 4- en- 3- ona (**90**), observándose que la

reducción del grupo carbonilo en C-17 es más rápida que la hidroxilación en C-11 $\alpha$ , siendo la reducción del grupo carbonilo regioselectiva. Los productos **73** (14%) y **74** (75%) fueron aislados de la biotransformación de **11** con *Chaetomium* sp., figura 10.<sup>61</sup>

La obtención de derivados hidroxilados en una posición específica es un objetivo de la industria de los esteroides, por ejemplo los 14 $\alpha$ - hidroxiesteroides han mostrado poseer actividad antiinflamatoria, anticonceptiva y antitumoral. La biotransformación de **11** y **85** con diferentes cepas del hongo *Curvularia lunata* permitió en el caso de **11**, obtener como producto mayoritario **74**; mientras con **85** se obtuvo 14 $\alpha$ - hidroxandrosten- 1, 4- dien- 3, 17- diona (**91**, 70%), figura 10.<sup>62</sup>

La testosterona (**12**) fue metabolizada por *M. griseocyamus* y *T. piriforme*. De la biotransformación de **12** con *M. griseocyamus* se obtuvieron **77** (35%) y otros productos, donde se identificó a **74** como producto mayoritario. Contrariamente, la transformación microbiológica de **12** con *T. piriforme* produjo a las 24 horas como producto principal **77** (10%), después de 72 h de biotransformación se obtuvieron cuatro productos: **73** (13%), **76** (7%), **77** (13%) y **91** (5%), observándose que *T. piriforme* produce en menor cantidad los derivados 14 $\alpha$ -hidroxi-derivados, ver figura 10.<sup>37</sup>

La biotransformación de **12** con *Nectria haematococca* se aislaron cuatro sustancias, cuyo rendimiento estuvo en función del tiempo de incubación; siendo los productos mayoritarios a las 72 h, los derivados hidroxilados en C- 11 con orientación  $\alpha$  y deshidrogenación en C<sub>1</sub>- C<sub>2</sub> para darlos compuestos: 11 $\alpha$ - hidroxi- androst- 1, 4- dien- 3, 17- diona (**92**, 8%), 11 $\alpha$ , 17 $\beta$ - dihidroxandrosten- 1, 4- dien- 3- ona (**93**, 4.3%). **81** (1.9%) y **84** (2.3%).<sup>63</sup> La incubación de **12** con *Fusarium culmorum* produjo **73** (10%) y **76** (32%) con hidroxilación en C- 6 $\beta$ ; además de los productos 15 $\alpha$ , 17 $\beta$ - dihidroxandrosten- 4- en- 3- ona (**94**, 22%) y del 15 $\alpha$ - hidroxi- androst- 4- en- 3, 17- diona (**95**). La hidroxilación selectiva en el C- 6 con una orientación  $\beta$  y en posición alílica al sistema 3- ceto- insaturado en **95** es favorecida por el sistema  $\pi$  y la presencia del grupo hidroxilo en C- 17, mientras que la hidroxilación en C- 15 para los compuestos **11** y **12**, es un proceso muy frecuente realizado por hongos del género *Fusarium*.<sup>40</sup> Los metabolitos **11**, **76**, **94** y **95**, fueron obtenidos como productos de oxidación e hidroxilación de **12** con el hongo *F. oxysporum* var. cubense.<sup>50</sup> El hongo *Cephalosporium aphidicola* hidroxiló a 12 para dar los productos **76** (47%) y **77** (3%), con hidroxilación en C- 6 $\beta$  y C- 14 $\alpha$  respectivamente.<sup>58</sup> La incubación de **12** con *C. lunata* y *Pleurotus ostreatus* se obtuvieron los compuestos **11** (17%) y **95** (13%) respectivamente.<sup>64</sup> El hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* produjo el 7  $\beta$ , 17 $\beta$ - dihidroxi- androsta- 3- ona (**96**, 73%), como único producto de biotransformación de **12**, al parecer la presencia del grupo hidroxilo en C- 17 en el esqueleto del androstan dirigió la hidroxilación en C- 7 con una orientación  $\beta$ , ver figura 11.<sup>47</sup>

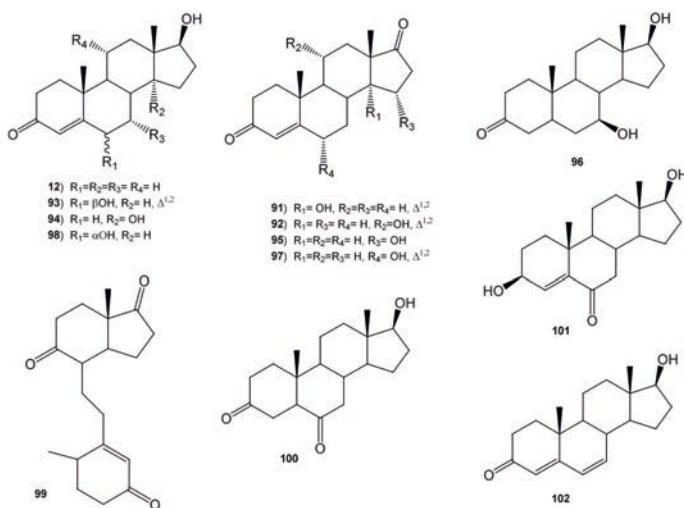


Figura 11. Productos de biotransformación de la testosterona (12)

De la biotransformación de **12** por *Bacillus stearothermophilus* –bacteria termófila– se obtuvo como producto mayoritario **11** (90.2%), generado por la oxidación del C- 17, y los derivados hidroxilados de **11** en C- 6 (**73**, C-6β, 1.1%) y (**97**, C- 6α, 0.9%); además, dos derivados monohidroxilados de **12**, **76** (C-6β, 3.9%) y **98** (C- 6α, 3.9%); sugiriendo que la hidroxilación con orientación α en el C- 6, puede ser un acción común de algunas bacterias termófilas.<sup>65</sup> La biotransformacion de **11** con *B. stearothermophilus* en presencia de inductores de hidrolasas –ácido salicílico, cloranfenicol, ciclodextrina, dexametasona, riboflavina y rifampicina– permitió obtener una mayor concentración de los compuestos: 9, 10- seco- 4- androsten- 3, 9, 17- triona (**99**), 5α- androstan- 3, 6, 17- triona (**83**), 17β- hidroxi- 5α- androstan- 3, 6- diona (**100**), 3β, 17β- dihidroxiandrost- 4- en- 6- ona (**101**) y 17β- hidroxiandrost- 4, 6- dien- 3- ona (**102**). Por ejemplo, la presencia de glucosa y ciclohexamida favoreció la obtención de **101**, mientras la producción de **102** se logró en presencia de rifampicina.<sup>66</sup> Los productos aislados de la biotransformación de **12** con *Chaetomium sp* fueron **73** (21%), **74** (39%) y **76** (19%), a las 24 horas de incubación se detectado la presencia de **11**. Janeczko, et al. (2009),<sup>61</sup> concluyeron que los factores estéricos asociados con el sustrato determinan la localización y orientación del grupo hidroxilo. Por ejemplo, el grupo carbonilo en C- 17 en **11**, dirige la entrada del grupo hidroxilo en C- 14 con orientación alfa; mientras que la hidroxilación en C-6β, se ve favorecida por la presencia del grupo hidroxilo en C- 17, como en **12**. En el caso de la progesterona (**1**), la cual posee un grupo acilo se observaron derivados dihidroxilados en C- 6 y C- 14, ver figura 11.<sup>61</sup>

La metiltestosterona (**103**) es un anabólico esteroidal, fue biotransformado por *Mucor racemosus* en cinco días para producir dos productos monohidroxilados en los C- 7 (7α- hidroximetiltestosterona, **104**, 35%) y C- 15 (15α- hidroximetiltestosterona, **105**, 21%), además de un producto dihidroxilado (12, 15α- dihidroximetiltestosterona, **106**, 22%). Se ha informado del aislamiento de productos de hidroxilacion en diferentes carbonos a partir de **103** con diferente orientación, C- 6β, C- 7β, C- 9α, C- 11α, C- 12β y C- 15α, ver figura 12.<sup>67</sup>

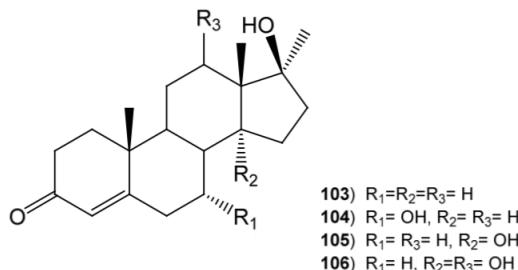
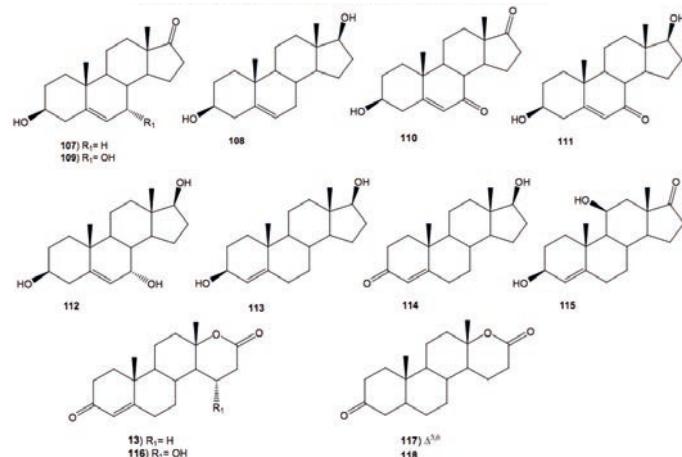


Figura 12. Productos de biotransformación de la metiltestosterona (103)

La dehidroepiandrosterona (3β- hidroxiandrost- 5- en- 17- ona, **107**) prohormona endógena secretada por las glándulas suprarrenales, es precursora de los andrógenos y estrógenos. La incubación **107** con *M. pririformis* permitió el aislamiento de cinco compuestos: 3β, 17β- dihidroxiandrost- 5- eno (**108**), 3β, 7α- dihidroxiandrost- 5- en- 17- ona (**109**), 3β- hidroxiandrost- 5- en- 7, 17- diona (**110**), 3β, 17β- dihidroxiandrost- 5- en- 7- ona (**111**), y 3β, 7α, 17β- trihidroxiandrost- 5- eno (**112**), la acción de dicho hongo fue la hidroxilación *estereoespecífica* en C- 7α (**109** y **112**) y la reducción del grupo carbonilo en C- 17.<sup>45</sup> De la bioconversión de **107** con *Rhizopus stolonifer* se aislaron siete productos: **108** (20%), **109** (12%), **112** (20%), 3β, 17β- dihidroxiandrost- 4- eno (**113**, 12%), 17β- hidroxiandrost- 4- en- 3- ona (**114**, 34%), 3β, 11β- dihidroxiandrost- 4- en- 17- ona (**115**, 15%).<sup>68</sup> *Fusarium oxysporum* biotransformó a **107** en una mezcla de cuatro derivados hidroxilados (**108** a **110** y **112**), los cuales fueron caracterizados como sus derivados acetilados; observando la hidroxilación favorablemente en C- 7 de manera *estereoespecífica* (orientación α) en los 3β- hidroxi- Δ<sup>5</sup>- esteroides, mientras que *Colletotrichum musae* biotransformó a **107** a **108** mediante la reducción del grupo carbonilo en C- 17, ver figura 13.<sup>50</sup>

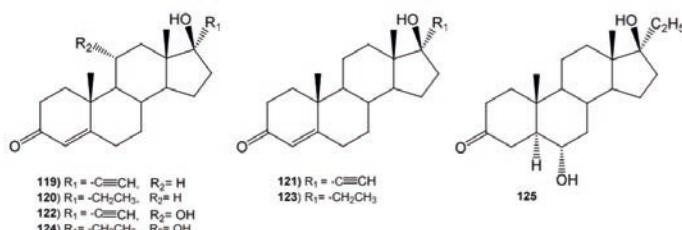
La transformación microbiológica de la dehidroepiandrosterona (**107**) con *Penicillium griseopurpureum* y *P. glabrum* produjo derivados hidroxilados de **107** en C- 7α (**75**), C- 14α (**74**) y C- 15 α (**95**) y como principal producto **11**. Además, *P. griseopurpureum*

generó los productos de oxidación de Baeyer Villiger para dar el anillo de la lactona D (testolactona, **13**) y su derivado hidroxilado en C- 15 $\alpha$  (15 $\alpha$ - hidroxi- 17 $\alpha$ - oxa- D- homo-androst- 4- en- 3, 17- diona, **116**), mientras *P. glabrum* generó los compuestos 3 $\beta$ - hidroxi- 17 $\alpha$ - oxa- D- homo- androst- 5- en- 17- ona (**117**) y 3 $\beta$ - hidroxi- 17 $\alpha$ - oxa- D- homo- androstan- 17- ona (**118**).<sup>69</sup>



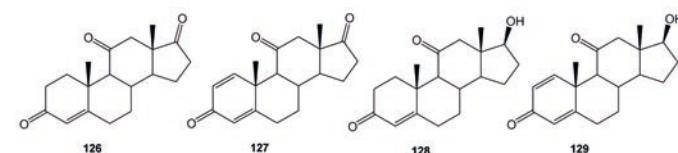
**Figura 13.** Productos de biotransformación de la dehidroepiandrosterona (**107**)

Se ha descrito la biotransformación de la 17 $\alpha$ - etinil- 17 $\beta$ - hidroxiandrost- 4- en- 3- ona (ethisterona, **119**) y 17 $\alpha$ - etil- 17 $\beta$ - hidroxiandrost- 4- en- 3- ona (**120**) con los hongos *Cephalosporium aphidicola* y *Cunninghamella elegans*. La bioconversión de **119** con *C. aphidicola* produjo 17 $\alpha$ - etinill- 17 $\beta$ - hidroxiandrost- 1, 4- dien- 3- ona (**121**, 5.5%), mientras que con *C. elegans* se obtuvo 17 $\alpha$ - etinil- 11 $\alpha$ , 17 $\beta$ - dihidroxiandrost- 4- en- 3- ona (**122**, 3.4%). La biotransformación de **120** con *C. aphidicola* generó la 17 $\alpha$ - etil- 17 $\beta$ - hidroxiandrost- 1, 4- dien- 3- ona (**123**, 2.2%); por otra parte, al incubar **120** con *C. elegans* se obtuvieron dos nuevos productos 17 $\alpha$ - etil- 11 $\alpha$ , 17 $\beta$ - dihidroxiandrost- 4- en- 3- ona (**124**, 2.8%) y 17 $\alpha$ - etil- 6 $\alpha$ , 17 $\beta$ - dihidroxi- 5 $\alpha$ - androstan- 3- ona (**125**, 1.6%), ver figura 14.<sup>70</sup>



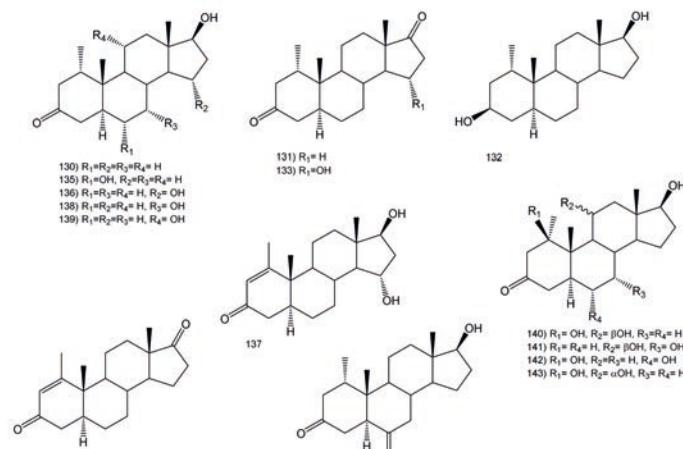
**Figura 14.** Productos de biotransformación de la 17 $\alpha$ - etinil- 17 $\beta$ - hidroxiandrost- 4- en- 3- ona (**119**) y 17 $\alpha$ - etil- 17 $\beta$ - hidroxiandrost- 4- en- 3- ona (**120**)

La adrenosterona (**126**) es un inhibidor de la enzima estrógeno sintetasa responsable de la formación de estrógenos y con gran aplicación clínica. La biotransformación de **126** con *C. aphidicola* generó androsta- 1, 4- dien- 3, 11, 17- triona (**127**, 3%), 17 $\beta$ - hidroxiandrost- 4- en- 3, 11- diona (**128**, 2%) y 17 $\beta$ - hidroxiandrosta- 1, 4- dien- 3, 11- diona (**129**, 17%). Por otro lado, de la biotransformación de **126** con *Fusarium linise* obtuvieron **127** (11.2%) y **12** (8.1%), mientras **128** (36.8%) fue obtenido de la biotransformación de **126** con *Trichothecium roseum*, figura 15.<sup>71</sup>



**Figura 15.** Productos de la biotransformación de la adrenosterona (**126**)

La biotransformación de la mesterelona (1 $\alpha$ - metil- 17 $\beta$ - hidroxi- 5 $\alpha$ - androstan- 3- ona, **130**), es un esteroide androgénico sintético, fue realizada con diferentes hongos como describe Choudhary *et al.* (2005).<sup>70</sup> De la biotransformación de **130** con *C. aphidicola* se obtuvieron los compuestos 1 $\alpha$ - metil- 5 $\alpha$ - androstan- 3, 17- diona (**131**), 1 $\alpha$ - metil- 5 $\alpha$ - androstan- 3, 17- diol (**132**) y 1 $\alpha$ - metil- 15 $\alpha$ - hidroxi- 5 $\alpha$ - androstan- 3, 17- diona (**133**). La incubación de **130** con *Fusarium lini* produjo los compuestos **133**, 1- metil- 5 $\alpha$ - androstan- 1- en- 3, 17- diona (**134**), 1 $\alpha$ - metil- 6 $\alpha$ , 17 $\beta$ - dihidroxi- 5 $\alpha$ - androstan- 3- ona (**135**), 1 $\alpha$ - metil- 15 $\alpha$ , 17 $\beta$ - dihidroxi- 5 $\alpha$ - androstan- 3- ona (**136**) y 1- metil- 15 $\alpha$ , 17 $\beta$ - dihidroxi- 5 $\alpha$ - androstan- 1- en- 3- ona (**137**). Los productos obtenidos de la biotransformación de **130** con *Rhizopus stolonifer* fueron **131**, **135**, **137**, 1 $\alpha$ - metil- 7 $\alpha$ , 17 $\beta$ - dihidroxi- 5 $\alpha$ - androstan- 3- ona (**138**) y 1 $\alpha$ - metil- 11 $\alpha$ , 17 $\beta$ - dihidroxi- 5 $\alpha$ - androstan- 3- ona (**139**), figura 16.<sup>72</sup>



**Figura 16.** Productos de la biotransformación de la mesterolona (**130**)

La bioconversión de **130** con *Cunninghamella blakesleeana* produjo siete productos de biotransformación, como **135**, **138-139**; además del 1 $\alpha$ - metil- 1 $\beta$ , 11 $\beta$ , 17 $\beta$ - trihidroxi- 5 $\alpha$ - androstan- 3- ona (**140**), 1 $\alpha$ - metil- 7 $\alpha$ , 11 $\beta$ , 17 $\beta$ - trihidroxi- 5 $\alpha$ - androstan- 3- ona (**141**), 1 $\alpha$ - metil- 1 $\beta$ , 6 $\alpha$ , 17 $\beta$ - trihidroxi- 5 $\alpha$ - androstan- 3- ona (**142**), 1 $\alpha$ - metil- 1 $\beta$ , 11 $\alpha$ , 17 $\beta$ - trihidroxi- 5 $\alpha$ - androstan- 3- ona (**143**), *Macrophomina phaseolina* biotransformó a **130** en 1 $\alpha$ - metil- 17 $\beta$ - hidroxi- 5 $\alpha$ - androstan- 3, 6- diona (**144**), ver figura 16.<sup>73</sup>

El mestranol (**145**) y el 17 $\beta$ - metoximestranol (**146**) son los derivados mono- y dialquilados del 17 $\alpha$ - etinilestradiol (**147**), respectivamente. De la incubación de **145** con *Cunninghamella elegans* se obtuvieron dos compuestos hidroxilados: 6 $\beta$ - hidroximestranol (**148**, 2.78%) y 6 $\beta$ , 12 $\beta$ - dihidroximestranol (**149**, 3.61%), deduciéndose que la presencia del grupo metoxilo en C- 3 reduce el número de productos de biotransformación e introduce grupos hidroxilo en los C- 6 y C- 12 con orientación  $\beta$ ; mientras **148** no fue biotransformado debido a la presencia del grupo metoxilo en C- 17, figura 17.<sup>72</sup>

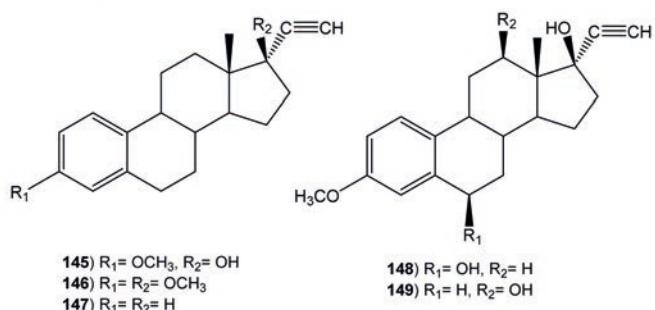


Figura 17. Productos de biotransformación de mestranol (**145**)

De la biotransformación de la 3- hidroxiestra- 1, 3, 5 (10)- trien- 17- ona (**150**) con *Fusarium oxysporum* var. cubense se aislaron los compuestos de reducción en C- 17 (3, 17 $\beta$ - dihidroxiestra- 1, 3, 5 (10)- trieno, **151** e hidroxilación en C- 15 (3, 15 $\alpha$ - dihidroxiestra- 1, 3, 5 (10)- trieno, **152**), figura 18.<sup>50</sup>

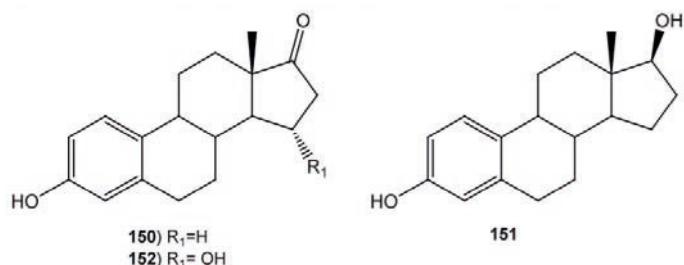


Figura 18. Productos de biotransformación de la 3-hidroxi-1, 3, 5 (10)-trien-17-ona (**150**)

La prednisona (**153**) es un corticosteroide sintético (profármaco) utilizado para el tratamiento de enfermedades

autoinmunitarias, inflamatorias y del riñón, entre otras. La biotransformación de **153** por *C. elegans* ocurrió mediante la hidrogenación de  $\Delta^{4,5}$  y reducción de C- 20, para producir los compuestos 17 $\alpha$ , 21- dihidroxi- 5 $\alpha$ - pregn- 1- en- 3, 11, 20- triona (**154**, 15.8%) y 17 $\alpha$ , 20S, 21- trihidroxi- 5 $\alpha$ - pregn- 1- en- 3, 11- diona (**155**, 6.5 %), mientras que como único producto de biotransformación de **153** con *Fusarium lini* (5.2%), *Rhizopus stolonifer* (5.5%) y *Curvularia lunata* (6.2%) fue 1, 4-pregnadien- 17 $\alpha$ , (20S), 21- triol- 3, 11- diona (**156**), figura 19.<sup>74</sup>

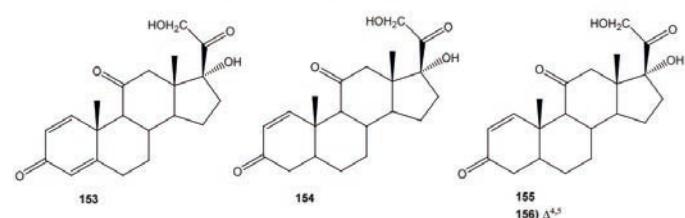


Figura 19. Productos de biotransformación de la prednisona (**153**)

Las principales transformaciones químicas realizadas por diferentes especies del género *Acremonium* en diversos compuestos esteroidales han sido oxidaciones, reducciones, hidroxilaciones en distintas posiciones, isomerizaciones e hidrólisis de la cadena en C- 17. La hidrocortisona (**157**) es un importante anabólico, usado clínicamente como anti-inflamatorio y anti-alérgico; además de ser materia prima para la síntesis de muchas hormonas esteroidales. La biotransformación con *Acremonium strictum* de **157** generó los productos 11 $\beta$ , 17 $\beta$ - dihidroxiandrostan- 4- en- 3- ona (**158**, 8%), 11 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 20 $\beta$ , 21- tetrahidropregn- 4- en- 3- ona (**159**, 11.2%) y 21- acetoxi- 17 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 20- trihidroxipregn- 4- en- 3- ona (**160**, 7.6%), observándose que la acción de dicha especie fue la reducción, acetilación y degradación de la cadena en C- 17, sin modificación de la cetona-  $\alpha$ ,  $\beta$ - insaturada. figura 20.<sup>75</sup>

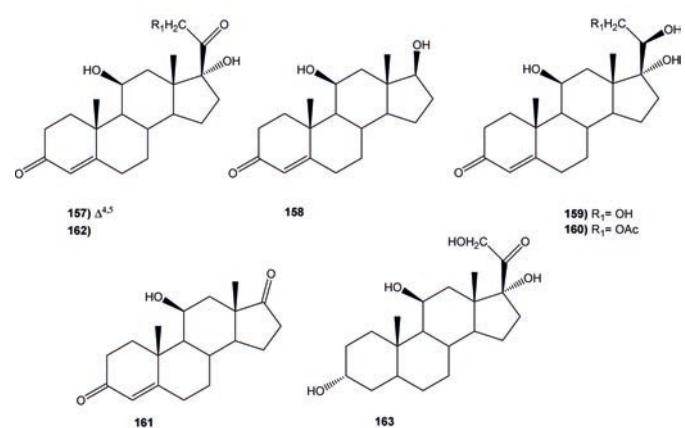
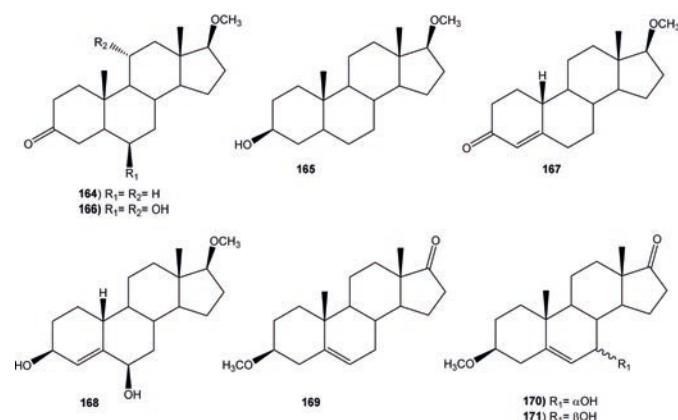


Figura 20. Productos de biotransformación de la hidrocortisona (**157**)

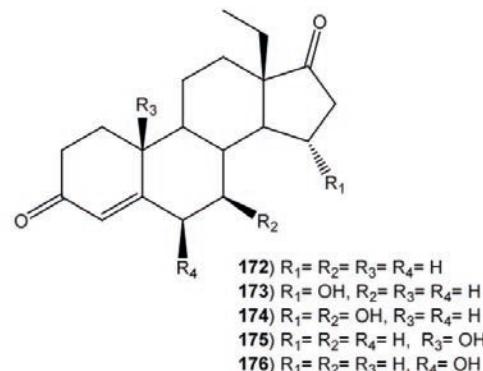
La biotransformación de **157** con *Gibberella fujikuroi* produjo  $11\beta$ - hidroxiandrost- 4- en- 3, 17- diona (**161**, 41%), mientras con *Bacillus subtilis* y *Rhizopus stolonifer* se obtuvieron **159** (15%). Los productos  $11\beta$ ,  $17\alpha$ , 21- trihidroxi-  $5\alpha$ - pregnan- 3, 20- diona (**162**, 45%) y  $3\alpha$ ,  $11\beta$ ,  $17\alpha$ , 21- tetrahidroxi-  $5\alpha$ - pregnan- 20- ona (**163**, 31%) fueron obtenidos de la bioconversión de **157** con *Bacillus cerus*, figura 20.<sup>76</sup>

La incubación  $17\beta$ - metoxi-  $5\alpha$ - androstan- 3- ona (**164**) *Cephalosporium aphidicola* produjo  $17\beta$ - metoxi-  $5\alpha$ - androstan- 3 $\beta$ - ol (**165**) y  $6\beta$ ,  $11\alpha$ - dihidroxi-  $17\beta$ - metoxi-  $5\alpha$ - androstan- 3- ona (**166**); mientras la biotransformación del  $17\beta$ - metoxiestra- 4- en- 3- ona (**167**) con *C. aphidicola* dio como metabolito mayoritario al  $6\beta$ - hidroxi-  $17\beta$ - metoxiestra- 4- en- 3- ona (**168**). Similarmente, la transformación microbiológica del  $3\beta$ - metoxiandrostan- 5- en- 17- ona (**169**) dio una mezcla de productos:  $7\alpha$ - hidroxi- 3 $\beta$ - metoxiandrostan- 5- en- 17- ona (**170**) y  $7\beta$ - hidroxi- 3 $\beta$ - metoxiandrostan- 5- en- 17- ona (**171**), figura 21.<sup>77</sup>



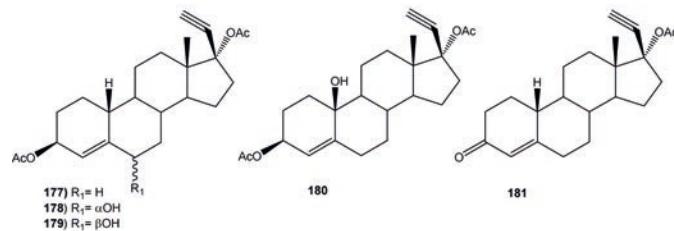
**Figura 21.** Productos de biotransformación  $17\beta$ - metil-  $5\alpha$ - androsten- 3- ona (**164**)  $17\beta$ - metoxiestra- 4- en- 3- ona (**167**) y  $3\beta$ - metoxiandrostan- 5- en- 17- ona (**169**).

En la literatura se han descrito varias especies de hongos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mortierella* y *Penicillium* capaces de hidroxilar de manera esteroselectiva el C- 15 en diversos esteroides. Por ejemplo, Jekkel *et al.* (1998)<sup>78</sup> describen la evaluación de más de 3000 hongos para hidroxilar la posición C- 15 en la  $13\beta$ - etil- 4- gonan- 3, 17- diona (**172**), siendo el género *Fusarium* y en particular *Fusarium nivale*, el hongo que hidroxila preferentemente **172** con una orientación alfa ( $15\alpha$ - hidroxi-  $13\beta$ - etil- 4- gonan- 3, 17- diona, **173**, 77%) y C- 7 $\beta$  ( $7\beta$ ,  $15\alpha$ - dihidroxi-  $13\beta$ - etil- 4- gonan- 3, 17- diona, **174**). Por otro lado, la biotransformación de **172** con *Mortierella pusilla* produjo **173**, **175** (10 $\beta$ - hidroxi-  $13\beta$ - etil- 4- gonan- 3, 17- diona) y **176** (6 $\beta$ - hidroxi-  $13\beta$ - etil- 4- gonan- 3, 17-diona), figura 22.<sup>78</sup>



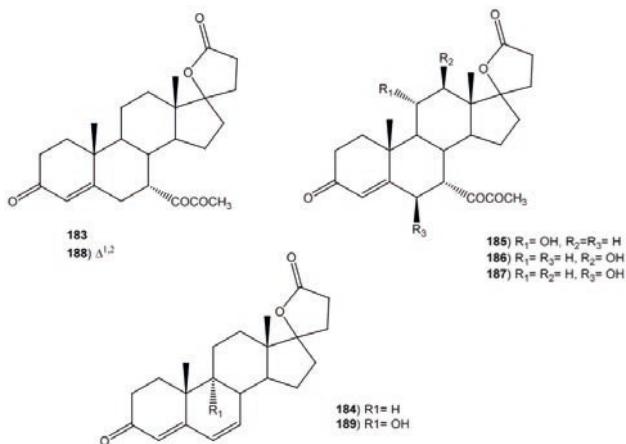
**Figura 22.** Productos de biotransformación de la  $13\beta$ - etil- 4- gonan- 3, 17- diona (**172**)

El diacetato del etinodiol (**177**) es una derivado sintético **1**, utilizado como anticonceptivo oral debido a que inhibe el proceso de la ovulación. La transformación microbiológica del **177** con *Cunninghamella elegans* produjo tres compuestos hidroxilados que fueron caracterizados como:  $17\alpha$ - etinilestra- 4- en- 3 $\beta$ ,  $17\beta$ - diacetoxi- 6 $\alpha$ - ol (**178**, 0.5%),  $17\alpha$ - etinilestra- 4- en- 3 $\beta$ ,  $17\beta$ - diacetoxi- 6 $\beta$ - ol (**179**, 1%),  $17\alpha$ - etilestra- 4- en- 3 $\beta$ ,  $17\beta$ - diacetoxi- 10 $\beta$ - ol (**180**, 0.5%) y  $17\alpha$ - etinil-  $17\beta$ - acetoxiestra- 4- en- 3- ona (**181**, 1.4%), ver figura 24.<sup>79</sup>



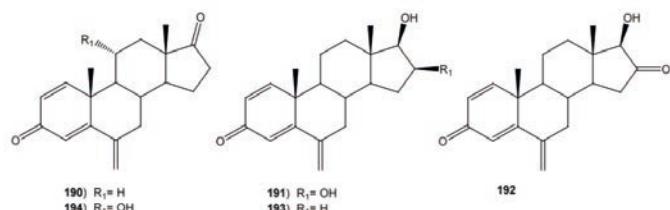
**Figura 23.** Productos de Biotransformación del diacetato de etinodiol (**177**)

Los fármacos mexrenona (**182**) y canrenona (**183**) son esteroides con una espirolactona en el C- 17 y son potentes antagonistas de los mineralocorticoides.<sup>80</sup> La biotransformación de **182** y **183** con una amplia diversidad de microrganismos resultó en la obtención de productos monohidroxilados en diferentes posiciones, donde *Beauveria bassiana* generó a la  $11\alpha$ - hidroximexrenona (**184**, 67%) como producto mayoritario, mientras que la  $12\beta$ - hidroximexrenona (**185**, 50%) y  $6\beta$ - hidroximexrenona (**186**, 33%) se obtuvieron con *Mortierella isabellina*. El producto de deshidrogenación ( $\Delta^{1,2}$ - mexrenona, **187**, 15%) fue favorecido con *Bacterium cyclo-oxidans*; además de *Rhodococcus equi*, *Nocardia aurentia* y *Comomonas testosteroni*. De la biotransformación de **183** con *Corynespora cassicola* se obtuvo  $9\alpha$ - hidroxicanrenona (**188**, 30 %), figura 24.<sup>81</sup>



**Figura 24.** Productos de biotransformación de mexrenona (183) y canrenona (184)

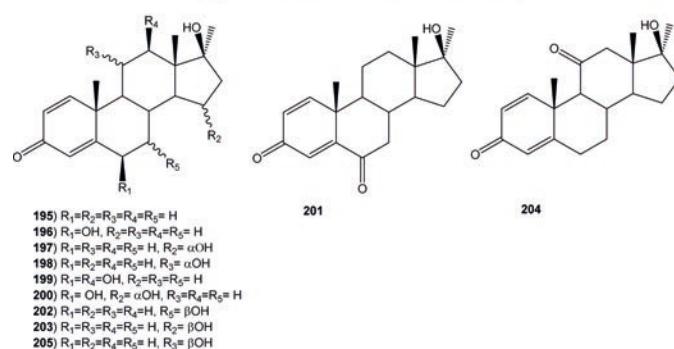
Uno de los esteroides utilizados en el tratamiento del cáncer de mama es el exemestano (190)— aromasin, inhibidor de la aromatasa esteroidal—. De la transformación de 190 con *Macrophomina phaseolina* se obtuvieron la 16 $\beta$ , 17 $\beta$ -dihidroxi- 6- metilen- androsta- 1, 4- dien- 3- ona (191) 17 $\beta$ - hidroxi- 6- metilen- androsta- 1, 4- dien- 3, 16- diona (192) y 17 $\beta$ - hidroxi- 6- metilen- andros- 1, 4- dien- 3- ona (193) mientras con *Fusarium lini* se obtuvo como único producto a la 11 $\alpha$ - hidroxi- 6- metilen- androsta- 1, 4- dien- 3, 17- diona (194), ver figura 25.<sup>82</sup>



**Figura 25.** Productos de Biotransformación al exemestano (190).

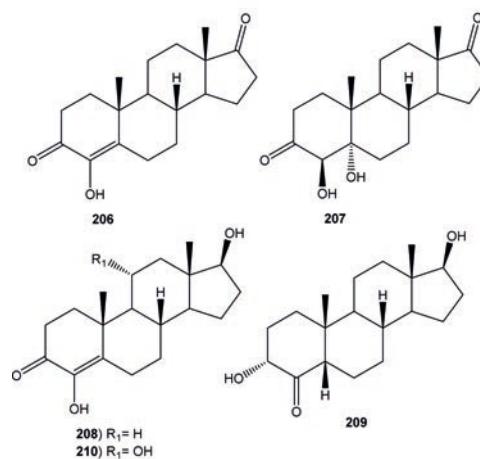
Dianabol (Metandrostenolona, 17 $\alpha$ - metil- 17 $\beta$ - hidroxil-androsta- 1, 4- dien- 3- on, 195) es un esteroide anabolizante oral que promueve la síntesis de las proteínas (aumento del tejido muscular). De la biotransformación de 195 con *Cunningamella elegans* se obtuvieron cinco productos de bioconversión: 6 $\beta$ , 17 $\beta$ - dihidroxi- 17 $\alpha$ - metil- 5 $\alpha$ - androsta- 1, 4- dien- 3- ona (196), 15 $\alpha$ , 17 $\beta$ - dihidroxi- 17 $\alpha$ - metil- 5 $\alpha$ - androsta- 1, 4- dien- 3- ona (197), 11 $\alpha$ , 17 $\beta$ - dihidroxi- 17 $\alpha$ - metil- 5 $\alpha$ - androsta- 1, 4- dien- 3- ona (198), 6 $\beta$ , 12 $\beta$ , 17 $\beta$ - trihidroxi- 17 $\alpha$ - metil- 5 $\alpha$ - androsta- 1, 4- dien- 3- ona (199), 6 $\beta$ , 15 $\alpha$ , 17 $\beta$ - trihidroxi- 17 $\alpha$ - metil- 5 $\alpha$ - androsta- 1, 4- dien- 3- ona (200). Los productos 17 $\beta$ - hidroxi- 17 $\alpha$ - metil- 5 $\alpha$ - androsta- 1, 4- dien- 3, 6- diona (201), 7 $\beta$ , 17 $\beta$ - dihidroxi- 17 $\alpha$ - metil- 5 $\alpha$ - androsta- 1, 4- dien- 3- ona (202), 15 $\beta$ , 17 $\beta$ - dihidroxi- 17 $\alpha$ - metil- 5 $\alpha$ - androsta- 1, 4- dien- 3- ona (203), 17 $\beta$ - hidroxi- 17 $\alpha$ - metil- 5 $\alpha$ - androsta- 1, 4- dien- 3, 11- diona (204), 11 $\beta$ , 17 $\beta$ - dihidroxi- 17 $\alpha$ - metil- 5 $\alpha$ - androsta- 1, 4- dien- 3- ona (205), fueron obtenidos de la biotrans-

formación de 195 con *Macrophomina phaseolina*, ver figura 26.<sup>83</sup> Se ha informado de la biotransformación de 195 con varios microrganismos, por ejemplo *Penicillium notatum*<sup>84</sup> transformó 195 en 196 y 197, mientras *Trichoderma hamatum*<sup>85</sup> produjo 198. Similarmente *Beauveria bassiana*,<sup>86</sup> *Aspergillus ochraceus*, *Colletotrichum lagenarium* y *Sporotrichum sulfurescens* dan como producto de biotransformación 198. *Absidia glauca*<sup>87</sup> metabolizó 195 en los compuestos 195, 201 y 202, por el contrario, la biotransformación de 195 con *A. coerulea*<sup>88</sup> produjo 204 junto con 7 $\alpha$ , 17 $\beta$ - dihidroxi- 17 $\alpha$ - metilandrosta- 1, 4- dien- 3- ona (205), mientras con *Botrytis cinerea*<sup>89</sup> se obtuvo 205, como único producto, ver figura 26.



**Figura 26.** Productos de biotransformación del dianabol (17 $\beta$ - hidroxi- 17 $\alpha$ - metil- androst- 1, 4- dien- 3- ona, 195)

El formestano (4- hidroxiandrost- 4- en- 3, 17- diona, 206) es un inhibidor de la enzima aromatasa esteroidal que convierte los andrógenos en estrógenos, actualmente es usado en el tratamiento de cáncer de pecho y ovario en mujeres post- menopáusicas. De la transformación microbiológica de 206 con *Rhizopus oryzae* se obtuvo 4 $\beta$ , 5 $\alpha$ - androstan- 3, 17- diona (207, 8.6%), mientras que la biotransformación de 206 con *Beauveria bassiana* produjo la 4, 17 $\beta$ - dihidroxiandrost- 4- en- 3- ona (208, 5.3%), 3 $\alpha$ , 17 $\beta$ - dihidroxi- 5 $\beta$ - androstan- 4- ona (209, 0.9%) y 4, 11 $\alpha$ , 17 $\beta$ - trihidroxiandrost- 4- en- 3- ona (210, 2.4%), ver figura 27.<sup>90</sup>



**Figura 27.** Productos de biotransformación del formestano (207).

## Conclusiones.

Los procesos de biotransformación de diferentes sustancias esteroidales descritas en esta revisión, si bien no son exhaustivos, pretenden resaltar la importancia que tiene las biotransformaciones por medio de diferentes microrganismos, como una herramienta químico-biológica útil para la obtención de derivados químicos novedosos desde diferentes aspectos, tanto a nivel de investigación, como industrial. Como por ejemplo, la obtención de compuestos esteroidales para la industria farmacéutica.

La biotransformaciones de esteroides se ha implementado de manera importante en la síntesis parcial de nuevos esteroides, para su evaluación como hormonas y fármacos. Actualmente, existe una amplia variedad de esteroides usados como diuréticos, anabólicos, anti-inflamatorios, anti-androgénicos, anti-conceptivos, anti-tumorales, entre otras aplicaciones.

La funcionalización química en los diferentes átomos de carbono del esqueleto del esterano se encuentra relacionada con la actividad biológica de la molécula, razón por la cual las transformaciones microbiológicas juegan un papel importante en la obtención de dichos compuestos mediante transformaciones químicas, como la oxidación del grupo hidroxilo en C-3 y C-17, isomerización del doble enlace  $\Delta^{5,6}$  a  $\Delta^{4,5}$ , hidrogenación de dobles ligaduras  $\Delta^{1,2}$  y  $\Delta^{4,5}$ , reducción del grupo carbonilo en C-17 y C-20 con orientación  $\beta$ .

Las “biohidroxilaciones” efectuadas en diferentes posiciones del esqueleto esteroideal—C-11 $\alpha$ , C-11 $\beta$ , C-15 $\beta$  y C-16 $\alpha$ —utilizando diferentes especies de hongos de los géneros *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Curvularia*, *Cunninghamella* y *Streptomyces* con altos rendimientos, son una transformación química importante en muchos esquemas de síntesis de nuevos esteroides con una actividad biológica determinada (tabla 1), ver figura 28.

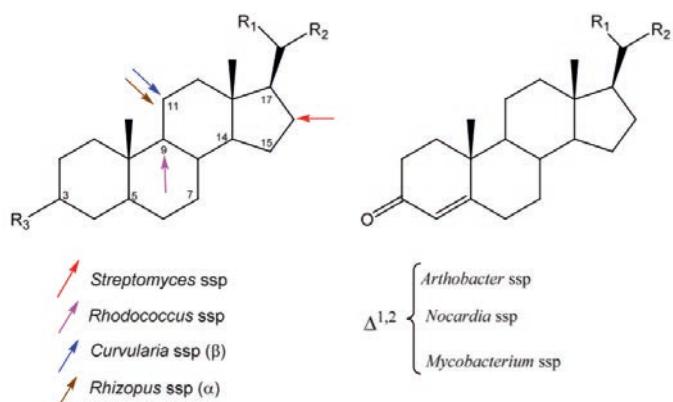


Figura 28. Sitios de acción de diferentes microrganismos en el esqueleto del gonano.

Tabla 1. Ejemplos de “biohidroxilaciones” promovidas por diferentes géneros de microrganismos.

Sitio de hidroxilación	Género del microrganismo	Usos
C-7 $\alpha$	<i>Fusarium</i> ssp	Obtención de fármacos para neurosiquiatría e inmunología
C-7 $\beta$	<i>Mortierella</i> ssp	Obtención de productos para el tratamiento del cáncer de próstata
C-9	<i>Rhodococcus</i> ssp	Obtención de corticoides halogenados
C-11 $\alpha$	<i>Aspergillus</i> ssp, <i>Rhizopus</i> ssp, <i>Curvularia</i> ssp	Obtención de anticonceptivos
C-11 $\beta$	<i>Cochliobolus</i> ssp, <i>Aspergillus</i> ssp, <i>Rhizopus</i> ssp, <i>Curvularia</i> ssp	Obtención de glucocorticoides
C-15 $\beta$	<i>Bacillus</i> ssp	Obtención de 4-aza-esteroides para el tratamiento del cáncer de próstata
C-16 $\alpha$	<i>Streptomyces</i> ssp	Obtención de glucocorticoides

La hidroxilación de esteroides —progesterona, testosterona, 17  $\alpha$ -metiltestosterona y 4-androsten-3, 17-diona— que presentan el sistema 4-en-3-ona, procede con una alta *estéreo* y *regio*-selectividad en los C-6 y C-11, con una orientación  $\beta$  en C-6 y con orientación alfa en C-11. La presencia del grupo metilo en C-10 es necesaria para la hidroxilación en el C-11, como se puede observar en los derivados de la 19-nortestosterona.

El interés por las biotransformaciones de compuestos esteroidales ha venido incrementándose en los últimos años, debido a la obtención de nuevos y útiles compuestos farmacológicamente activos. Aunado al desarrollo de nuevas cepas genéticamente modificadas, al incremento en la disponibilidad de enzimas inmovilizadas y a la manipulación de los medios de cultivo.

Las biotransformaciones de los esteroides procede con rendimientos de bajos a moderados en general, una de las principales causas es su baja solubilidad en agua. Actualmente, se desarrollan metodologías que permitan la incorporación de sustancias químicas —surfactantes, líquidos iónicos, ciclodextrinas, liposomas, entre otros— que coadyuven a mejorar los rendimientos de cada proceso de biotransformación. Además, de contribuir al desarrollo de procesos amigables con el medio ambiente.

## Agradecimientos

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM por el apoyo al proyecto IN216012. A la Carrera de Biología de la FES-Zaragoza, UNAM. A la Lic. Fabiola Cano y al M. en C. Joan Robert Chávez por sus sugerencias y comentarios al manuscrito final.

## Referencias

1. Mensah-Nyagan AG, Meyer L, Schaeffer V, Kibaly C, Patte-Mensah C. Evidence for a key role of steroids in the modulation of pain. *Psychoneuroendocrinology*. 2009; 34: 169-177.
2. Funder JW. Minireview: aldosterone and mineralocorticoid receptors: past, present, and future. *Endocrinology*. 2010; 151: 5098-5102
3. Fernandez P, Cruz A, Angelova B, Pinheiro HM, Cabral JMS. Microbial Conversion of steroid compounds: recent developments. *Enz Microb Technol*. 2003; 32: 688-705.
4. Hogg JA. Steroids, steroids community and Upjohn in perspective: a profile of innovation. *Steroids*. 1992; 257: 593-616.
5. Sedlaczek L. Biotransformations of steroids. *Crit Rev Biotechnol*. 1988; 7: 187-236.
6. Ko D, Heiman AS, Chen M, Lee HJ. New steroid anti-inflammatory antedrugs: methyl 21-desoxy-21-chloro-11 $\beta$ , 17 $\alpha$ -dihydroxy-3, 20-dioxo-1, 4-pregnadiene-16 $\alpha$ -carboxylate, methyl 21-desoxy-21-chloro-11 $\beta$ -hydroxy-3, 20-dioxo-1, 4-pregnadiene-16 $\alpha$ -carboxylate, and their 9 $\alpha$ -fluoro derivatives. *Steroids*. 2000; 65: 210-218.
7. Fragkaki AG, Angelis YS, Koupparis M, Tsantili-Kakoulidou A, Kokotos G, Georgakopoulos C. Structural characteristics of anabolic androgenic steroids contributing to binding to the androgen receptor and to their anabolic and androgenic activities: applied modifications in the steroid structure. *Steroids*. 2009; 74: 172-197.
8. Agoston ES. Anticancer Agents Med Chem. 2006; 6:53-71.
9. Tuba Z, Barden CW, Dancsi A, Franksics-Czinege E, Molnar EC, Csorgei J, Falkay G, Koide SS, Kumar N, Sundaram K, Dukat-Abrok V, Balogh G. Synthesis and biological activity of a new progestogen, 16-methylene-17 $\alpha$ -hydroxy-18-methyl-19-norpregn-4-ene-3,20-dione acetate. *Steroids*. 2000; 65: 266-274.
10. Siemes C, Visser LE, De-Jong FH, Jan-Willem Coebergh W, Uitterlinden AG. Cytochrome P450 3A gene variation steroid hormone serum levels and prostate cancer. *Steroids*. 2010; 75: 1024-1032.
11. Diaz-Chico BN, Rodriguez FG, Gonzalez A, Ramirez R, Bilbao C, Leon AC, Jaime AA, Chirino R, Navarro D. Androgens and androgen receptors in breast cancer. *J Steroids Biochem Mol Biol*. 2007; 105: 1-15.
12. Johnston JO. Aromatase inhibitors, In: *Biochemistry and function of sterols*. Parish EJ, Nes WD, editors. Boca Raton, FL: CRC Press; 1987. p. 23-53.
13. Craigie E, Mullins JJ, Bailey MA. Glucocorticoids and mineralocorticoids. In: *Cardiovascular hormone systems: from molecular mechanisms to novel therapeutics*. Bader M, editor. Weinheim, Wiley-VCHVerlag GmbH & Co; 2009. p. 1-64.
14. Chung SK, Ryoo CH, Yang HW, Shim JY, Kang MG, Lee KW, Kang HI. Synthesis and bioactivities of steroids derivatives as antifungal agents. *Tetrahedron*. 1998; 52: 15899-15914.
15. Suzuki K, Nakata T, Shimizu T, Enomoto K. Anti-obesity agents. US Patent 5,846,962 (1998).
16. Dombrowski AW, Hazuda DJ, Polishook JD, Felock PJ, Singh SB, Zink DL. HIV-integrase-inhibitors. WO Patent 0036132 (2000).
17. Athan D, Svasti J, Kittakoop P, Pittayakhachonwut D, Tanticharpen M, Thebtaranon Y. Antiviral isoflavonoid sulfate and steroid glycoside from the fruits of *Solanum torvum*. *Phytochemistry*. 2002; 59: 459-463.
18. Rupprecht R, Holsboer F. Neuoroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacologyperspectivs. *Trends Neurosci*. 1999; 22: 410-416.
19. Mellon SH, Griffin LD. Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends Endocrinol Metab*. 2002; 13:35-43.
20. Baulieu E-E, Schumacher M. Progesterone as a neuroactiveneurosteroid, with special reference to the effect of progesterone on myelination. *Steroids*. 2000; 65: 605-612.
21. Fernandez P, Cabral JMS. Steroidbioconversion. In: *Enciclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*. Flickinger M, editores, New York: John Wiley & Sons, Inc.; 2010. p. 1-32.
22. Donova MV, Ergova OV. Microbial steroid transformations: Current state and prospect. *Appl Microbial Biotechnol*. 2012; 94:1423-1447.
23. Ong W-Y, Dong X. Microbial biotransformation: recent developments on steroid drugs. *Recent Patents on Biotechnol*. 2009; 3: 141-153.
24. Bureik M, Bernhardt R. Steroid hydroxilation: microbial steroid biotransformation using cytochrome P450 enzymes. In *Modern biooxidation: enzymes, reactions and applications*. Schmid RD, Urlacher VB, editores. Wienheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2007. p. 155-176.

25. Lehman LR, Stewart JD. Filamentous fungi: potentially useful for the biohydroxylation of non-activated carbon centres. *Curr Org Chem.* 2001; 5: 439-470.
26. Pollard DJ, Woodley JM. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *Trends Biotechnol.* 2006; 25: 66-72.
27. Straathof AJJ. The production of fine chemicals by biotransformation. *Curr Opin Biotechnol.* 2002; 13: 548-546.
28. Mahato SB, Mazumber I. Current trends in microbial steroid biotransformation. *Phytochemistry.* 1995; 34: 883-898.
29. Mahato SB, Garai S. Advances in microbial steroid biotransformation. *Steroids.* 1997; 62: 332-345.
30. Donova MV. Transformation of steroids by actinobacteria: *Rev Appl Biochem Microbiol.* 2007; 43: 1-14.
31. Prabha V, Ohri M. Review: bacterial transformations of bile acids. *World J Microbiol Biotechnol.* 2006; 22: 191-196.
32. Huttel W & Hoffmeister D. Fungal Biotransformation in pharmaceutical sciences. In: Industrial applications, the mycota X. Hofrichter M, editors. Berlin: Springer. 2010. p. 293-317.
33. Petric S, Hakki T, Bernhardt R, Zigon D, Cresnar B. Discovery of a steroid 11 $\alpha$ -hydroxylase from *Rhizopus oryzae* and its biotechnological application. *J Biotechnol.* 2010; 150: 428-437.
34. Rodina NV, Andryushina VA, Stysenko TS, Turova TP, Baslerov RV, Panteleeva AN, Voishvillo NE. The introduction of the 9 $\alpha$ -hydroxy group into andros-4-en-3,17-dione using a new actinobacterium strain. *Appl Biochem Microbiol.* 2009; 45: 395-400.
35. Faber K, Kroutil W. New enzymes for biotransformation. *Curr Opin Chem Biol.* 2005; 9: 181-187.
36. Ran N, Zhao L, Chen Z, Tao J. Recent applications of biocatalysis in developing green chemistry for chemical synthesis at the industrial scale. *Green Chem.* 2008; 10: 361-372.
37. Hu SH, Genain G, Azerad R. Microbial transformation of steroids: Contribution to 14 $\alpha$ -hydroxylations. *Steroids.* 1995; 60: 337-352.
38. Smith KE, Ahmed F, Williams RAD, Kelly SL. Microbial transformations of steroids-VIII. Transformation of progesterone by whole cells and microsomes of *Aspergillus fumigatus*. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1994; 49: 93-100.
39. Khalil AM, Eman MM. Microbiological transformation of progesterone by some zoosporic fungi. *J Basic Microbiol.* 1996; 4: 255-259.
40. Kolek T, Swizder A. Biotransformation XLV. Transformations of 4-ene-3-oxosteroids in *Fusarium culmorum* culture. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1998; 67: 63-9.
41. Al-Awadi S, Afzal M, Oommen S. Studies on *Bacillus stearothermophilus*. Part I. Transformation of progesterone to a new metabolite 9,10-seco-4-pregnene-3,9,20-trione. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2001; 78: 493-498.
42. Gharaei-Fathabad E & Chabra A. Biotransformation of progesterone by *Penicillium aurantiogriseum*. *Res J Microbiol.* 2011; 6, 98-104.
43. Venu Gopal SK, Naik S, Somal P, Sharma P, Arjuna A, Hassam RU. Production of 17-ketoandrostene steroids by the side chain cleavage of progesterone with *B. sphaericus*. *Biocatal Biotransf.* 2008; 26: 272-279.
44. Madayasth KM, Joseph T. Transformation of 16-dehydroprogesterone and 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone by *Mucor piriforme*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1994; 41: 170-177.
45. Madayasth KM, Joseph T. Transformation of dehydroepiandrosterone pregnenolone by *Mucor piriforme*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1995; 44: 339-343.
46. Shan Li-H, Liu H-M, Huang Ke-H, Dai G-F, Cao Ch, Dong R-J. Synthesis of 3 $\beta$ , 7 $\alpha$ , 11 $\alpha$ - trihydroxy- pregn- 21-benzylidene- 5- en- 20- one. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009; 19: 6637-6639.
47. Farooq A, Tahara S. Biotransformation of testosterone and pregnenolone catalyzed by the fungus *Botrytis cinerea*. *J Nat Prod.* 2000; 63: 489-491.
48. Choudhary MI, Batool I, Shah SAA, Nawaz SA, Atta-ur-Rehman. Microbial hydroxylation of pregnenolone derivatives. *Chem Pharm Bull.* 2005; 11: 1455-1459.
49. Schaaaf O, Dettner K. Transformation of steroids by *Bacillus* strains isolated from the foregut of water beetles (Coleoptera: Dytiscidae): II. Metabolism of 3 $\beta$ -hydroxypregn- 5- en- 20- one (pregnenolone). *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000; 75: 187-199.
50. Wilson MR, Gallimore WA & Reese PB. Steroid transformations with *Fusarium oxysporum* var. *cubense* and *Colletotrichum musae*. *Steroids.* 1999; 64: 834-843.
51. Hu SH, Tian XF, Sun YH, Han GD. Microbial hydroxylation of 13- ethyl- 17 $\beta$ - hydroxy- 18, 19- dinor- 17 $\alpha$ - pregn- 4- en- 20- in- 17- ona. *Steroids.* 1996; 61: 407- 410.
52. Hu SH, Tian XF, Han GD. Novel microbial hydroxylation of 13- ethyl- 17 $\beta$ - hydroxy- 18, 19- dinor- 17 $\alpha$ - pregn- 4- en- 20- yn- 3- one. *Steroids.* 1998; 63: 88-92.
53. Choudhary MI, Azizuddin, Atta-ur-Rehman. Microbial transformation of danazol. *Nat Prod Lett.* 2002; 16: 101-106.
54. Choudhary MI, Musharraf SG, Ali RA, Atif M, Atta- ur-Rehman. Microbial transformation of antifertility agents. Norethisterone and 17 $\alpha$ -ethynodiol. *Z Naturforsch.* 2004; 59B: 319-323.
55. Madayasth KM. Novel microbial transformation of steroids. *Adv Exp Med Biol.* 1995; 405: 259-270.

56. Angelova B, Mutafov S, Avramova T, Dimova I & Boyadjieva L. 9α-Hydroxylation of 4-androstene-3,17-dione by resting *Rhodococcus* sp. cells. *Process Biochem.* 1996; 31:179–184.
57. Schaaaf O, Dettner K. Transformation of steroids by *Bacillus* strains isolated from the foregut of water beetles (Coleoptera: Dytiscidae): I. Metabolism of androst-4-en-3,17-diona (AD). *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1998; 67: 451-465.
58. Hanson JR, Nasir H, Pervez A. The hydroxilation of testosterone and some derivates by *Cephalosporium aphidicola*. *Phytochemistry.* 1996; 42: 411- 415.
59. Choudhary MI, Sultan S, Khan MTH, Yasin A, Shaheen F, Atta-ur-Rehman Biotransformation of (+)- androst-4-ene-3,17-diona. *Nat Prod Res.* 2004; 18: 529-535.
60. Xiong Z, Wei Q, Chen H, Chen S, Xu W, Qiu G, Liang S, Hu X. Microbial transformation of androst-4-en-3,17-dione by *Beauveria bassiana*. *Steroids.* 2006; 71: 979-983.
61. Janeczko T, Dmochowska-Gładysza J, Kostrzewska-Susłowa E, Białńska A, Ciunikb Z. Biotransformations of steroid compounds by *Chaetomium* sp. KCH 6651. *Steroids.* 2009; 74: 657-661.
62. Andryushina, VA, Voishvillo NE, Druzhinina AV, Stytsenko TS, Yaderets VV, Petrosyan MA, Zeinalov OA. 14α-hydroxylation of steroids by mycelium of the mold fungus *Curvularia lunata* (VKPM F-981) to produce precursors for synthesizing new steroidal drugs. *Pharma Chem J.* 2013; 47: 103-108.
63. Ahmed F, Williams RAD, Smith KE. Microbial transformations of steroids- X. Cytochromes P- 450 11α-hydroxylase and C17-C20 lyase and A1- ene-dehydrogenase transform steroids in *Nectria haematococca*. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1996; 58: 337–349.
64. Atta-ur-Rehman, Choudhary MI, Asif F, Farooq A, Yaqoob M. Microbial transformations of testosterone. *Nat Prod Lett.* 1998; 12: 255–261.
65. Al-Awadi S, Afzal M, Oommen S. Studies of *Bacillus stearothermophilus*. Part III. Transformation of testosterone. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2003; 62:48–52.
66. Al-Awadi S, Afzal M, Oommen S. Studies on *Bacillus stearothermophilus*. Part IV. Influence of enhancers on biotransformation of testosterone. *Steroids.* 2005; 70: 323-327.
67. Torshabi M, Badiie M, Faramarzi MA, Rastegar H, Forootanfar H, Mohit, E. Biotransformation of methyl-testosterone by the filamentous fungus *Mucor racemosus*. *Chemistry of Natural Compounds.* 2011; 47: 59-63.
68. Choudhary MI, Ali Shah SA, Musharraf SG, Shaheen F, Atta-ur-Rahman. Microbial transformation of dehydroepiandrosterone. *Nat Prod Lett.* 2003; 17: 215– 220.
69. Huang Li-H, Li J, Xu G, Zhang X-H, Wang Y-G, Yin Y-L, Liu H-M. Biotransformación de dehydroepiandrosterone (DHEA) con *Penicillium griseopurpureum* Smith y *Penicillium glabrum* (Wehmer) Westling. *Steroids.* 2010; 75: 1039-1046.
70. Choudhary MI, Sultan S, Khan MTH, Atta-ur-Rehman. Microbial transformation of 17α- ethynyl- and 17α-ethylsteroids and tyrosinase inhibitory activity of transformed products. *Steroids.* 2005; 70:798–802.
71. Musharraf SG, Atta-ur-Rehman, Choudhary MI, Sultan S. Microbial transformation of (+)-adrenosterone. *Nat Prod Lett.* 2002; 16:345–349.
72. Choudhary MI, Sultan S, Jalil S, Anjum S, Rahman AA, Fun HK, Atta-ur-Rehman. Microbial transformation of mesterolone. *Chem Biodivers.* 2005; 2:392–400.
73. Ahmad MS, Zafar S, Bibi M, Bano S, Wahab A-tul, Atta-ur-Rehman, Choudhary MI. Biotransformation of androgenic steroid mesterolone with *Cunninghamella blakesleeana* and *Macrophomina phaseolina*. *Steroids.* 2014;82:53-59
74. Choudhary MI, Siddiqui ZA, Musharraf SG, Nawaz SA, Atta-ur-Rehman. Microbial transformation of prednisone. *Nat Prod Res.* 2005; 19:311–317.
75. Faramarzi MA, Yazdi MT, Shafiee A, Zarrini G. Microbial transformation of hydrocortisone by *Acremonium strictum* PTCC 5282. *Steroids.* 2002; 67: 869–872.
76. Choudhary MI, Sultan S, Yaqoob M, Musharraf SG, Yasin A, Shaheen F, Attaur-Rehman. Microbial transformation of cortisol and prolylendopeptidase inhibitory activities of its transformed products. *Nat Prod Res.* 2003; 17:389–395.
77. Kiran I, Hanson JR, Hunter AC. The microbiological hydroxylation of some methoxysteroids by *Cephalosporium aphidicola*. *J Chem Res.* 2004; 5: 362–363.
78. Jekkel A, Ilkoy E, Horváth G, Pallagi I, Süto J, Ambrus G. Microbial hydroxylation of 13β- ethyl- 4- gonene- 3, 17-dione. *J Mol Catal B.* 1998; 5:385–387.
79. Zafar S, Yousuf S, Kayani HA, Saifullah S, Khan S, Al-Majid AM, Choudhary MI. Biotransformation of oral contraceptive ethynodiol diacetate with microbial and plant cell cultures. *Chemistry Central Journal.* 2012; 6: 109-116.
80. Huyet J, Pinon GM, Fay MR, Fagart J, Rafestin-Oblin M-E. Structural Basis of Spirolactone Recognition by the Mineralocorticoid Receptor. *Mol Pharmacol.* 2007; 72:563– 571.
81. Preisig CL, Laakson JA, Mocek UM, Wang PT, Baez J, Byng G. Biotransformation of the cardiovascular drugs mexrenone and canrenone. *J Nat Prod.* 2003; 66: 350-356.

82. Baydoun E, Bibi M, Iqbal MA, Wanab A, Farran D, Smith C, Sattar SA, Atta-ur-Rahman, Choudhary MI. Microbial transformation of anti-cancer steroid exemestane and cytotoxicity of its metabolites against cancer cell lines. *Chemistry Central Journal* 2013; 7:57-63.
83. Khan NT, Zafar S, Noreen S, Al Majid AM, Al Othman ZA, Al-Rasayes SI, Atta-ur-Rahman, Choudhary MI. Biotransformation of dianabol with the filamentous fungi and  $\beta$ -glucoronidase inhibitory activity of resulting metabolites. *Steroids*. 2014; 85: 65-72.
84. Bartmanska A, Dmochowska-Gladysz J, Huszcza E. Steroids transformation in *Penicillium notatum* culture. *Steroids*. 2005; 70:193-198.
85. Bartmanska A, Dmochowska-Gladysz J. Transformation of steroids by *Trichoderma hamatum*. *Enzyme Microb Technol*. 2007; 40:1615-1621.
86. Huszcza E, Dmochowska-Gladysz J, Bartmanska A. Transformation of steroids by *Beauveria bassiana*. *Z Naturforsch*. 2005; 60c:103-108.
87. Huszcza E, Dmochowska-Gladysz J. Transformation of testosterone and related steroids in *Absidia glauca* culture. *J Basic Microbiol*. 2003; 43:113-120.
88. Brezezowska E, Dmochowska-Gladysz J, Kolek T. Biotransformation XXXIX. Metabolism of testosterone, androstenediona, progesterone and testosterone derivates in *Absidia coerula* culture. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1996; 57:357-362.
89. Huszcza E, Dmochowska-Gladysz J. Transformation of testosterone and related steroids by *Botrytis cinereae*. *Phytochemistry*. 2003; 62: 155- 158.
90. Martin GDA, Narvaez J, Marti A. Synthesis and bioconversions of formestane. *J Nat Prod*. 2013; 76: 1966-1969.