

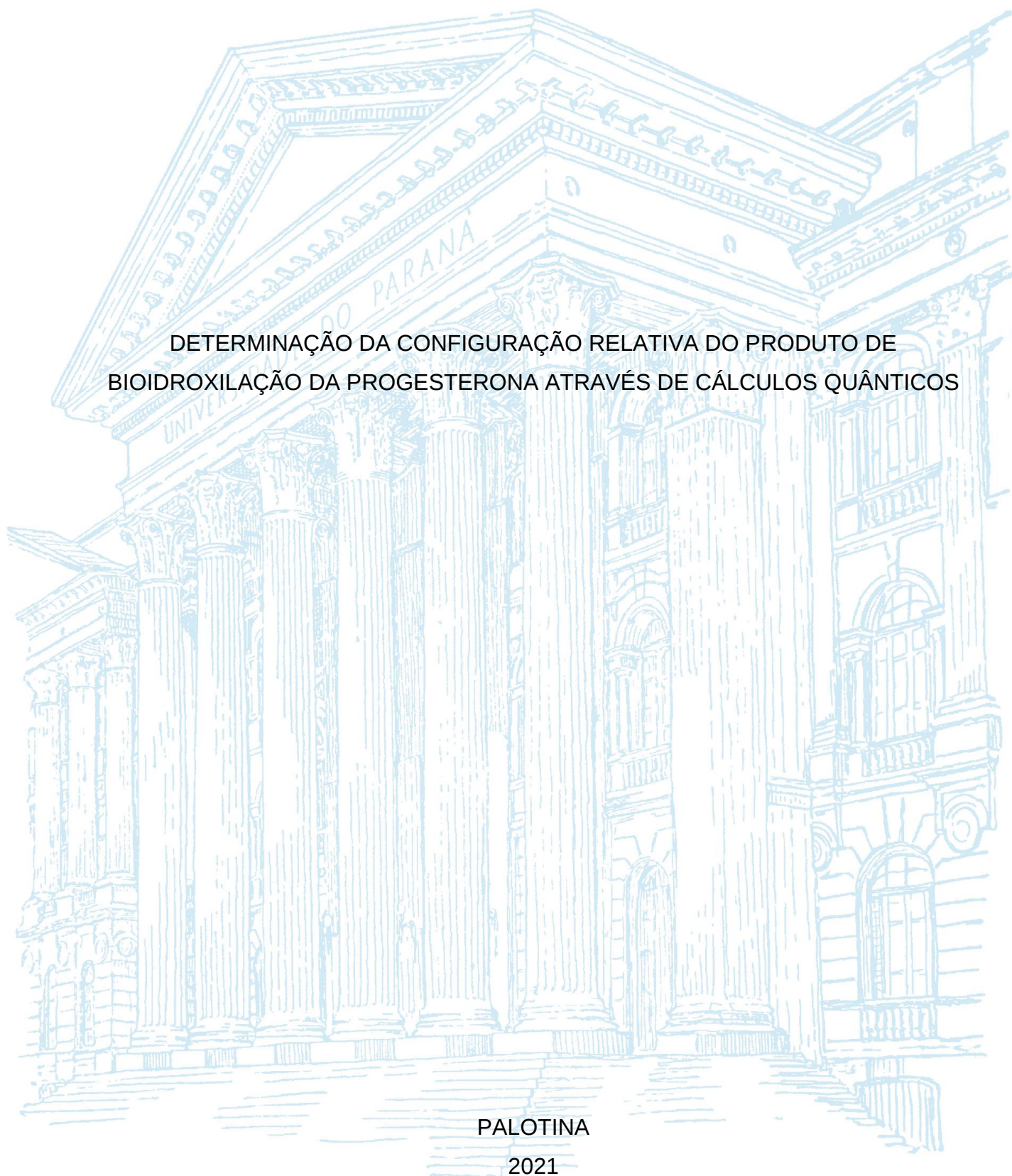
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CASSIA ROSANA RAMBO

DETERMINAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO RELATIVA DO PRODUTO DE
BIOIDROXILAÇÃO DA PROGESTERONA ATRAVÉS DE CÁLCULOS QUÂNTICOS

PALOTINA

2021



CASSIA ROSANA RAMBO

DETERMINAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO RELATIVA DO PRODUTO DE
BIOIDROXILAÇÃO DA PROGESTERONA ATRAVÉS DE CÁLCULOS QUÂNTICOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Isac G. Rosset

PALOTINA

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ATA DE REUNIÃO

Aos dezessete dias do mês de dezembro do ano de 2021, às dezenove horas e trinta minutos, na Sala virtual [h?ps://teams.microsoft.com/l/meetup-join/19%3amee?ng_Njg2MDcxNTktMjNhZC00Y2JlLWFINDctYTA0MTlyMjAxNjk0%40thread.v2/0?context=%7b%22Tid%22%3a%22c37b37a3-e9e2-42f9-bc67-4b9b738e1df0%22%2c%22Oid%22%3a%22fdcea9c1-3b45-4b00-8b26-2b0260338e29%22%7d](https://teams.microsoft.com/l/meetup-join/19%3amee?ng_Njg2MDcxNTktMjNhZC00Y2JlLWFINDctYTA0MTlyMjAxNjk0%40thread.v2/0?context=%7b%22Tid%22%3a%22c37b37a3-e9e2-42f9-bc67-4b9b738e1df0%22%2c%22Oid%22%3a%22fdcea9c1-3b45-4b00-8b26-2b0260338e29%22%7d) da Plataforma Microsoft Teams, Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, realizou-se a Defesa Pública e Oral do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado "Determinação da Configuração Relativa do Produto de Bioidroxilação da Progesterona através de Cálculos Quânticos" apresentado pela discente Cassia Rosana Rambo, orientado pelo Prof. Dr. Isac George Rosset, como um dos requisitos obrigatórios para conclusão do curso de graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Iniciados os trabalhos, o orientador e Presidente da Banca concedeu a palavra ao discente, para exposição do seu trabalho. A seguir, foi concedida a palavra em ordem sucessiva aos membros da Banca de Exame, os quais passaram a arguir o discente. Ultimada a defesa, que se desenvolveu nos termos normativos, a Banca de Exame, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo atribuído ao discente as seguintes notas: **Prof. Dr. Isac George Rosset, nota: 100 (cem)**, **Prof.(a) Dr.(a) Adriana Ferla de Oliveira, nota: 100 (cem)**, e **Prof.(a) Dr. (a) Kádima Nayara Teixeira, nota: 100 (cem)**. A nota final da discente, após a média aritmética dos três membros da banca de exame, foi **100 (cem)**. As considerações e sugestões feitas pela Banca de Exame deverão ser atendidas **pela discente** sob acompanhamento de seu orientador. Nada mais havendo a tratar foi lavrada a presente ata, que, lida e aprovada, vai por todos assinada eletronicamente.



Documento assinado eletronicamente por **ISAC GEORGE ROSSET, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 20/12/2021, às 16:57, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **KADIMA NAYARA TEIXEIRA, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 20/12/2021, às 17:32, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **ADRIANA FERLA DE OLIVEIRA, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 20/12/2021, às 22:58, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **4138768** e o código CRC **19ADBAAA**.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Isac G. Rosset, por todos os ensinamentos. Obrigada pela amizade, confiança, paciência e empatia.

Às professoras Dra. Adriana Ferla de Oliveira e Dra. Kádima N. Teixeira por todas as correções. Obrigada por toda a atenção e pelas sugestões.

À Universidade Federal do Paraná (UFPR) por buscar ao máximo uma educação de qualidade.

Um agradecimento especial ao Erik, à Poline e à Ingrid. Obrigada por compartilharem desde as pequenas conquistas às grandes decepções, vocês tornam o caminho mais leve. Pelo apoio, pelas críticas, pelos incentivos e elogios, muito obrigada.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a execução do projeto, que auxiliaram ou ensinaram. Agradeço também por todas as palavras de apoio e incentivo durante a minha trajetória. Agradeço também pelas críticas e correções, pois sempre podemos ser pessoas melhores do ontem.

Minha gratidão a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“Um cientista em seu laboratório [...] é uma criança que enfrenta fenômenos naturais que o impressionam como se fossem contos de fadas.”

Marie Curie

RESUMO

As técnicas de modelagem computacional de RMN têm se mostrado muito úteis na elucidação de estruturas químicas, inclusive para diferenciar estruturas intimamente relacionadas, como os isômeros. Esteroides são moléculas orgânicas bioativas com várias funções dependendo dos substituintes R presentes na estrutura, entre eles a progesterona. O objetivo desse trabalho foi determinar a estereoquímica da molécula 15-OH-progesterona produzida por biotransformação mediada por *Penicillium oxalicum* CBMAI 1996. O esteroide 6 β -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona foi usado para a escolha do nível de teoria adequado. A molécula passou por busca conformacional e os confôrmeros obtidos foram usados para otimização da molécula e determinação dos confôrmeros predominantes. Esses confôrmeros foram então submetidos aos cálculos de RMN em 6 diferentes níveis de teoria e 2 tipos de solvatação. Tetrametilsilano (TMS) e dioxano foram usados como padrões internos. Os resultados dos cálculos de RMN foram avaliados através dos cálculos de MAD e RMSE. Com a base escolhida, as mesmas etapas foram realizadas com os dois possíveis diastereoisômeros da molécula de interesse. Além dos valores de MAD e RMSE, também foi utilizado o cálculo da probabilidade DP4+ para prever a estrutura. O nível de teoria escolhido foi DFT/B3LYP/6-311G+(2d,p) em clorofórmio para a otimização, apresentando bons resultados tanto para os espectros de carbono quanto hidrogênio e baixo tempo computacional. O uso do dioxano como padrão interno foi descartado por não demonstrar ganhos significativos aos resultados. A busca conformacional dos diastereoisômeros resultou em 3 confôrmeros predominantes para a conformação α e 5 para a conformação β . Os cálculos de RMN foram realizados no nível de teoria DFT/B3LYP/6-311G+(d,p), adequado à probabilidade DP4+, e o resultado final foi obtido através da compensação de acordo com as populações de Boltzmann para cada uma das conformações possíveis. Os parâmetros MAD e RMSE já indicavam que o diastereoisômero β era o predominante. O que foi comprovado através da probabilidade DP4+, que indicou uma probabilidade de 100% de que se tratava da molécula 15 β -OH-progesterona. Dessa forma, o presente trabalho confirmou a estrutura descrita anteriormente na literatura.

Palavras-chave: Esteroides. Ressonância Magnética Nuclear. Deslocamento químico. Progesterona.

ABSTRACT

NMR computational techniques have been shown to be useful in the elucidation of chemical structures, including to differentiate closely related structures, such as isomers. Steroids are organic molecules with different function depending on the R substituents present in the structure, including progesterone. This work aimed to determine the stereochemistry of 15-OH-progesterone produced by *Penicillium oxalicum* CBMAI 1996 biotransformation. The steroid 6 β -hydroxy-4-pregnen-3,20-dione was used to choose the appropriate level of theory. The molecule went through a conformational search and the conformers predominant conformer(s) were determined. This conformer was then subjected to NMR calculations at 6 levels of theory and 2 types of solvation. Tetramethylsilane (TMS) and dioxane were used as internal standards. Results of NMR calculations were evaluated through MAD and RMSE calculations. After choosing the base, same steps were carried out with the two possible diastereoisomers. In addition to MAD and RMSE values, the DP4+ probability was also used to predict the structure. The chosen theory level was DFT/B3LYP/6-311G+(2d,p) in chloroform for optimization, presenting good results for both carbon and hydrogen spectra and low computational time. The use of dioxane as internal standard was discarded as it did not show significant gain. The conformational search for diastereoisomers came out with 3 predominant conformers for α conformation and 5 conformers for β conformation. NMR calculations were performed at the theory level DFT/B3LYP/6-311G+(d,p), appropriate to DP4+ probability, and final result was obtained through compensation according to Boltzmann populations for each of possible conformations. MAD and RMSE parameters already indicated that the β diastereomer was the predominant one. This was proven through DP4+ probability, which indicated 100% probability that it was the 15 β -OH-progesterone. Thus, the present work confirmed the structure previously described by experimental methods.

Keywords: Steroids. Nuclear Magnetic Resonance. Chemical shifts. Progesterone.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESTRUTURA BÁSICA DOS ESTEROIDES	17
FIGURA 2 – ESTRUTURA DA PROGESTERONA.....	18
FIGURA 3 – 15 β -HIDROXIPROGESTERONA (a) E 7 β ,15 β - DIHIDROXIPROGESTERONA (b)	19
FIGURA 4 – 6 β -HIDROXI-4-PREGNEN-3,20-DIONA	20
FIGURA 5 – ETAPAS PARA DETERMINAÇÃO DA MELHOR BASE TEÓRICA.....	21
FIGURA 6 – TMS (a) E DIOXANO (b).....	22
FIGURA 7 – DOIS POSSÍVEIS DIASTEREOISÔMEROS DA 15-OH- PROGESTERONA.....	24
FIGURA 8 – ETAPAS PARA DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA RELATIVA DA 15- OH-PROGESTERONA	25
FIGURA 9 – CONFÔRMEROS REPRESENTATIVOS DOS 9 <i>CLUSTERS</i> DA 6 β - HIDROXI-4-PREGNEN-3,20-DIONA.....	26
FIGURA 10 – VALORES DE MAD E RMSE PARA DESLOCAMENTO QUÍMICO DO ¹ H	28
FIGURA 11 – VALORES DE MAD E RMSE PARA DESLOCAMENTO QUÍMICO DO ¹³ C.....	28
FIGURA 12 – CONFÔRMEROS PREDOMINANTES DA 15 α -OH- PROGESTERONA.....	29
FIGURA 13 – CONFÔRMEROS PREDOMINANTES DA 15 β -OH- PROGESTERONA.....	31

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE TEORIA PARA OS CÁLCULOS DE RMN	22
TABELA 2 – ENERGIAS E PREVALÊNCIA DE CADA CONFÔRMERO	27
TABELA 3 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS OBTIDOS PARA O TMS (ppm)	30
TABELA 4 – POPULAÇÃO DE CONFÔRMEROS PARA 15 α -OH- PROGESTERONA	30
TABELA 5 – POPULAÇÃO DE CONFÔRMEROS PARA 15 β -OH- PROGESTERONA	30
TABELA 6 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^{13}C PARA 15-OH- PROGESTERONA (ppm)	32
TABELA 7 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^1H PARA 15-OH- PROGESTERONA (ppm)	33
TABELA 8 – VALORES DE MAD E RMSE PARA OS POSSÍVEIS DIASTEROISÔMEROS DA 15-OH-PROGESTERONA	33

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	JUSTIFICATIVA	12
1.2	OBJETIVOS	12
1.2.1	Objetivo geral	12
1.2.2	Objetivos específicos.....	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	QUÍMICA COMPUTACIONAL.....	14
2.2	ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) ...	15
2.3	CÁLCULOS TEÓRICOS DE RMN	16
2.4	ESTEROIDES	17
3	MATERIAL E MÉTODOS	20
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
	REFERÊNCIAS.....	36

1 INTRODUÇÃO

As características estereoquímicas de uma estrutura química têm grande impacto sobre suas propriedades moleculares. O que faz com que a determinação estrutural de compostos orgânicos seja uma etapa fundamental do processo de elucidação da estrutura. Dessa forma, a busca por métodos mais eficazes para a análise estereoquímica de sistemas moleculares complexos tem se mostrado um grande desafio e um grande estímulo aos pesquisadores (BIFULCO et al, 2007).

A química quântica computacional obteve grandes avanços graças ao aumento da capacidade de processamento dos computadores. Dentre as aplicações estão a previsão de propriedades, reatividades, conformações de moléculas, além de simulação de espectros de infravermelho e RMN (Ressonância Magnética Nuclear), embasando ou complementando dados experimentais (ALCÁCER, 2007; BARONE et al, 2008).

A técnica de RMN se baseia nas propriedades eletromagnética de certos núcleos atômicos, uma vez que, esses núcleos são capazes de absorver energia quando expostos a um campo magnético intenso. O estudo de uma molécula por espectroscopia de RMN nos permite registrar diferenças nas propriedades dos vários núcleos magnéticos presentes, o que auxilia na dedução das posições desses núcleos dentro da molécula (KEMP, 1991).

As técnicas de modelagem computacional dos deslocamentos químicos de ^{13}C e ^1H na RMN tem se tornado cada vez mais apuradas e úteis a diferentes aplicações. Valores de RMN calculados permitem correlacionar os deslocamentos químicos calculados aos núcleos que dão origem a eles, mostrando que técnicas *in silico* podem ser muito úteis quando associadas aos métodos clássicos de elucidação (BARONE et al, 2008; BIFULCO et al, 2007; SMITH; GOODMAN, 2010).

Esteroides são moléculas orgânicas derivadas do triterpeno lanosterol, sua estrutura é baseada em um sistema de anéis carbônicos tetracíclico. São moléculas bioativas e sua função varia de acordo com suas característica químicas e biológicas, principalmente em função dos substituintes R. Nos humanos, esta classe de moléculas atua como hormônios, são secretados pelas glândulas adrenais e funcionam como mensageiros químicos nos tecidos alvo (MCMURRY , 2012). Um desses hormônios é a progesterona, um esteroide natural produzido por fêmeas da

classe dos mamíferos. É usado como precursor para a semissíntese de diferentes contraceptivos comerciais (CARDOSO DE PAULA; PORTO, 2020).

1.1 JUSTIFICATIVA

Estudos *in silico* tem contribuído para o desenvolvimento de diferentes áreas do conhecimento e a química é uma delas. A química computacional possibilita identificação de estruturas e descrição de propriedades de diferentes moléculas de forma eficiente, com baixo custo e com tempos de execução relativamente baixos. Quando aliados às técnicas experimentais, podem trazer mais dinâmica para o processo científico, facilitando por exemplo, a elucidação de uma nova molécula com atividade biológica.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

O objetivo desse trabalho é determinar, através de simulações computacionais de espectros de RMN ^1H e ^{13}C , a estereoquímica relativa da molécula 15-OH-progesterona produzida por biotransformação mediada por *Penicillium oxalicum* CBMAI 1996.

1.2.2 Objetivos específicos

- Determinar o método de simulação computacional de espectros de RMN ^1H e ^{13}C mais adequado para moléculas de esteroides;
- Determinar o número de possíveis confôrmeros dos diastereoisômeros da molécula 15-OH-progesterona;
- Avaliar, usando a equação de Boltzmann, qual o confôrmero ou quais os confôrmeros predominantes;

- Realizar as simulações dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C para a molécula proposta;
- Elucidar a estrutura química usando os dados obtidos na simulação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 QUÍMICA COMPUTACIONAL

O advento da mecânica quântica se deu em 1900, quando Max Planck formulou a teoria quântica de que a luz e as partículas se propagam na forma de ondas ou quanta, mas nas interações apresentam comportamento de partícula. Partindo desse pressuposto, a teoria quântica atual detalha um espaço linear com elementos descritos como funções de onda ou vetores de estado, mas que necessitam de significado físico (ALCÁCER, 2007).

De forma sucinta, a mecânica quântica trata dos níveis atômico e subatômico, através da avaliação do comportamento da matéria e da energia envolvida nas interações. Ou seja, os cálculos de mecânica quântica se baseiam em prever a distribuição provável dos elétrons, chamada de densidade eletrônica, em torno dos núcleos atômicos de uma determinada molécula (FALBRIARD; BROSSO, 2020). Trata-se de “uma teoria abstrata formulada a partir de um conjunto apropriado de postulados.” (ALCÁCER, 2007, p. xii).

A equação formulada pelo físico Schrödinger é base para os cálculos de energias de átomos e moléculas, pois prevê o comportamento das partículas em um sistema quântico através de funções de onda. A função de onda de um sistema descreve a probabilidade de ocorrência de um evento quântico baseado na mecânica ondulatória. É uma construção matemática para demonstrar a energia total e propriedades convenientes de átomos e moléculas (BASEDEN; TYE, 2014).

A Teoria Funcional da Densidade (DFT ou *Density Functional Theory*) analisa sistemas atômicos e moleculares de forma semiempírica. Na teoria parte da energia é explicada através de funções de onda e outra parte é explicada através da densidade eletrônica; isso é possível pois a densidade eletrônica é proporcional ao valor absoluto da função de onda e ao número de elétrons da molécula (BASEDEN; TYE, 2014). A metodologia alia observações experimentais aos cálculos teóricos, o que possibilitou transpor problemas das metodologias *ab initio*, que se valem apenas de formulações teóricas. Para tentar resolver o problema da correlação eletrônica (interação entre os elétrons), a DFT recorre a equações mono eletrônicas auto coerentes que calculam orbitais e energias da molécula ou átomo a partir de valores de densidade eletrônica. A partir dos dados de orbitais e energias, uma nova

densidade é calculada, então orbitais e energias são novamente calculados até que se tenha a convergência dos valores de diferença de energias totais ou de diferença das densidades. O principal dado obtido é a energia total da estrutura, usada na determinação de propriedades e características da molécula, como por exemplo prever valores confiáveis de deslocamentos químicos de RMN (ALCÁCER, 2007).

2.2 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma ferramenta de extrema importância na descrição de estruturas químicas. É uma técnica espectroscópica, ou seja, avalia a interação da radiação com a matéria em função do comprimento de onda. A transmissão de energia se dá em forma de ondas, sendo que na RMN a interação da matéria ocorre com a componente magnética da energia (NASCIMENTO, 2016).

Esta técnica se vale do fato das cargas do núcleo do átomo estarem em constante movimento em torno do eixo nuclear, o que resulta em um dipolo magnético associado a certos núcleos. A molécula é exposta a um campo magnético estático e homogêneo, fazendo com que os núcleos atômicos absorvam radiação eletromagnética em frequências específicas, o que induz neles uma orientação em relação ao campo. Quando o pulso magnético cessa, há a emissão de radiação pelos núcleos, que tem suas frequências de picos de absorção e intensidades registradas pelo equipamento (NASCIMENTO, 2016; SILVERSTEIN et al, 2019).

Quando submetidos ao campo magnético, os núcleos atômicos absorvem essa energia, passando para um estado de maior energia. Quando o campo é interrompido, os núcleos retornam ao estado basal, irradiando a energia excedente, a qual é usada para calcular os deslocamentos químicos que geram um espectro de RMN. Os deslocamentos químicos, além de serem característicos de cada átomo, dependem do ambiente químico a qual estão expostos e das blindagens produzidas pelas nuvens eletrônicas dos átomos vizinhos (NASCIMENTO, 2016; SILVERSTEIN et al, 2019). Para registrar os espectros de RMN é usado um pulso curto de radiofrequência de alta energia, de forma que irá excitar todos os núcleos de um tipo de átomo (por exemplo, ^1H) (SILVERSTEIN et al, 2019).

A característica mais importante do átomo para descrever suas propriedades magnéticas é o *spin*. O número de *spin* é calculado a partir de princípios da mecânica quântica usando valores de massa atômica (A) e número atômico (Z) de cada núcleo. Núcleos com *spin* zero não possuem momento angular associado ao sistema, de forma que não são afetados pelo campo magnético. Mas núcleos com *spin* diferente de zero podem apresentar diferentes orientações quando expostos a um campo magnético externo. As direções apresentadas são função do número de *spin* e correspondem a estados energéticos distintos (NASCIMENTO, 2016). Os espectros de RMN mais utilizados são ^{13}C e ^1H , ambos apresentam número de *spin* $I = \frac{1}{2}$, de forma que seus núcleos podem assumir duas orientações diferentes sob ação do campo magnético (SILVERSTEIN et al, 2019).

2.3 CÁLCULOS TEÓRICOS DE RMN

O uso dos cálculos teóricos de RMN tem se tornado uma ferramenta valiosa pra descrição estereoquímica (SMITH; GOODMAN, 2010). A técnica tem sido usada para descrever ou redefinir a estrutura de moléculas orgânicas, entre elas: (+)-diplopirona (SAROTTI, 2020), tristichona C, gomerone B, maneonenes, isomaneonenes, lembinas (KUTATELADZE; REDDY, 2017), hemicalide (MACGREGOR et al, 2016), samoquasina A (TIMMONS; WIPF, 2008), mururina C (HU et al, 2008), hipurticina (MENDOZA-ESPINOZA et al, 2009).

Isso se deve ao crescente aumento da capacidade computacional e às diferentes técnicas que vem sendo desenvolvidas. O parâmetro CP3 foi projetado para comparar os deslocamentos químicos de duas possíveis estruturas em casos em que os dados dos deslocamentos experimentais para ambas estão disponíveis. O princípio da técnica faz com que erros sistemáticos se cancelem e o modelo é capaz de avaliar quais os núcleos de carbono ou prótons são mais úteis para a atribuição da estrutura, conferindo maior peso a estes durante o cálculo (SMITH; GOODMAN, 2009).

Apesar das vantagens, a principal limitação do parâmetro CP3 ocorre quando se tem apenas dados experimentais para uma das possíveis estruturas. A probabilidade DP4 é usada para determinar o espectro experimental dentre os diastereoisômeros possíveis em situações onde apenas um conjunto de dados

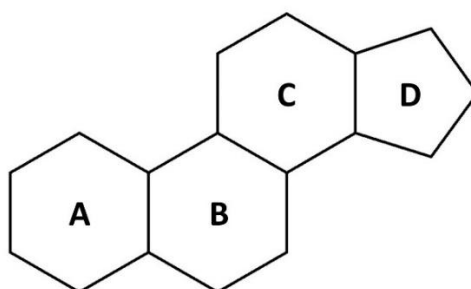
experimentais está disponível. Através dos deslocamentos obtidos empiricamente para cada uma das estruturas possíveis, são calculados os erros entre estes e os deslocamentos obtidos experimentalmente. Então é usada a distribuição t de Student para calcular a probabilidade de que cada erro observado seja obtido. Essas probabilidades são multiplicadas entre todos os átomos da mesma molécula, resultando no conjunto de erros daquela estrutura, que é convertido através do teorema de Bayes na probabilidade de que cada estrutura candidata seja a correta (SMITH; GOODMAN, 2010).

A probabilidade DP4+ teve como objetivo melhorar o desempenho da técnica anterior, através da inclusão de deslocamentos fora de escala e da possibilidade de uso de níveis teóricos mais complexos para o cálculo de RMN (GRIMBLAT et al, 2015).

2.4 ESTEROIDES

Esteroides são compostos lipídicos presentes diversos organismos vivos, sendo responsáveis por diversas atividades vitais, atuando como reguladores fisiológicos, hormônios e provitaminas (SALVADOR et al, 2013). Possuem esqueleto químico comum composto por 17 carbonos distribuídos em quatro anéis nomeados com A, B, C e D, sendo três deles anéis de 6 membros e um anel de 5 membros, também chamado de núcleo esteroide (FIGURA 1). Sua interação com enzimas e receptores ocorre de maneira muito específica de forma que pequenas mudanças estereoquímicas podem resultar em mudanças em suas atividades biológicas (BRUEGGEMEIER; LI, 2003).

FIGURA 1 – ESTRUTURA BÁSICA DOS ESTEROIDES

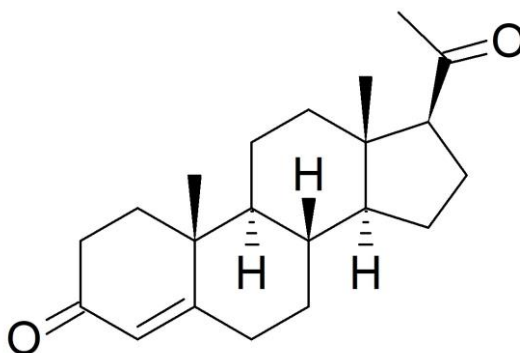


FONTE: Adaptado de BRUEGGEMEIER; LI, 2003.

Diversas moléculas esteroidais são usadas com finalidade terapêutica, dentre elas estão drogas usadas contra tumores e câncer, em condições inflamatórias, condições neurológicas, moléculas usadas para tratamento de HIV, podem possuir atividade contra microrganismos, além do papel importante em questões de fertilidade e menopausa. Suas atividades biológicas dependem da estrutura, ou seja, dependem do estado de oxidação do centro tetracíclico, além do tipo, número, orientação espacial e reatividade dos diferentes grupos funcionais ligados a ele (DONOVA; EGOROVA, 2012; MAHATO; GARAI, 1997).

A progesterona é um hormônio esteroide envolvido no ciclo reprodutivo feminino (FIGURA 2). Sua concentração nos fluidos tem relação direta com o ciclo menstrual e encontra-se em níveis elevados durante a gravidez. Foi obtido em sua forma cristalina e teve sua estrutura descrita em 1934. É considerada um neuroesteroide devido ao nível de ação sobre o Sistema Nervoso Central e seus derivados modificados foram usados como contraceptivos orais no passado (LEDNICER, 2011).

FIGURA 2 – ESTRUTURA DA PROGESTERONA



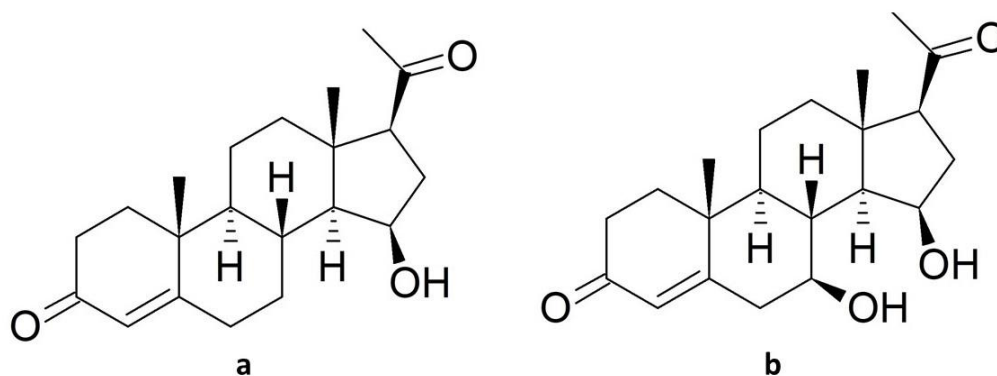
FONTE: A autora (2021).

A produção de hormônios e medicamentos esteroides é um ótimo exemplo das aplicações da biotransformação em escala industrial. Microrganismos têm sido muito usados na bioconversão de esteroides, já que são capazes de alterações em posições da molécula de difícil acesso às técnicas convencionais; são capazes de diferenciações regio e estereoespecíficas, as vias metabólicas de interesse podem ser introduzidas em uma sequência específica na cepa de interesse. Além disso,

várias reações necessitam de apenas uma etapa biotecnológica (DONOVA; EGOROVA, 2012).

A hidroxilação dos esteroides é uma importante reação para a atividade biológica desses compostos. Em geral, a molécula hidroxilada demonstra maior atividade mais significativa quando comparado ao análogo menos polar. Os microrganismos tem se mostrado muito bons em realizar essa funcionalização (DONOVA; EGOROVA, 2012). Um exemplo dessa bioconversão é o trabalho de De Paula et al. (2021), onde o fungo *Penicillium oxalicum* CBMAI 1996 realizou a hidroxilação da progesterona nas posições C-7 e C-15, resultando na moléculas 15 β -hidroxiprogesterona e 7 β ,15 β -dihidroxiprogesterona (FIGURA 3). A determinação da estereoquímica da primeira será o foco deste trabalho.

FIGURA 3 – 15 β -HIDROXIPROGESTERONA (a) E 7 β ,15 β -DIHIDROXIPROGESTERONA (b)



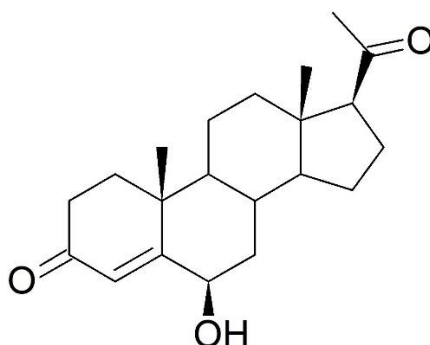
FONTE: A autora (2021).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os cálculos foram efetuados através de computador com processador Intel® Core™ i5, com 4 núcleos de 3.20GHz, interface Linux Ubuntu 16.0 LTS. O programa ACD/Schemsketch™ (Freeware 2018.2.5) (ADVANCED CHEMISTRY DEVELOPMENT, 2018) foi utilizado para desenho molecular e o programa Gaussian 09™ (FRISCH et al, 2016) foi responsável pela execução dos cálculos. Os inputs (arquivos de entrada) para os cálculos foram preparados através do software GaussView 6.0.16™ (DENNINGTON et al, 2009) e o CYLview v 1.0.561 BETA foi usado para visualização tridimensional das estruturas geradas (LEGAULT, 2009).

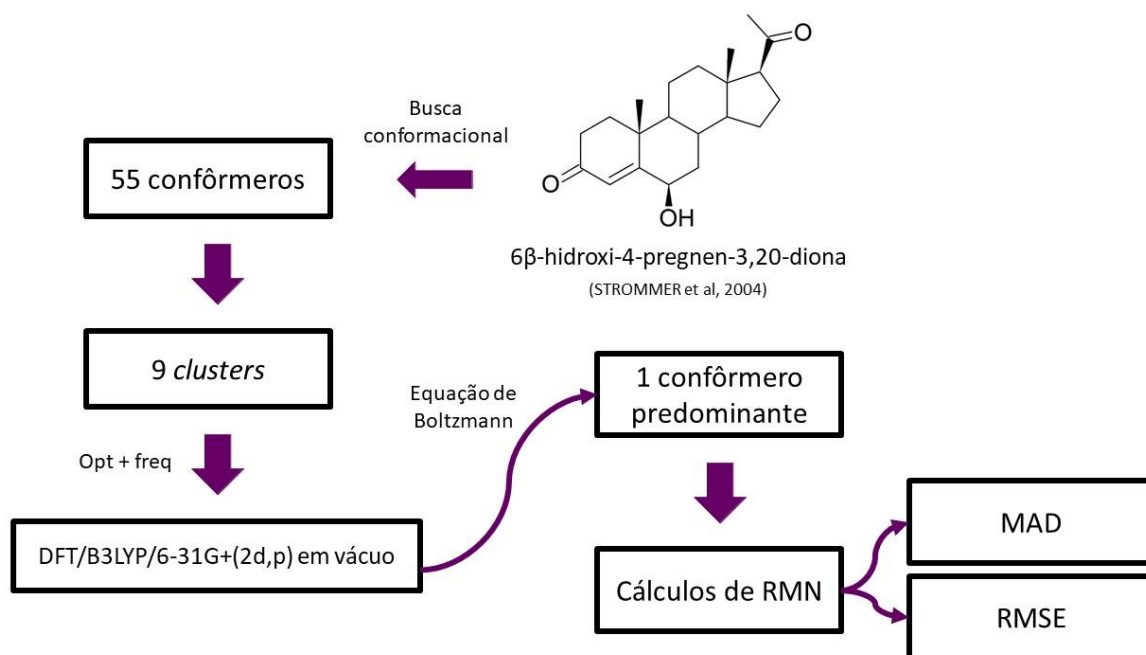
Para otimização dos cálculos, utilizou-se um esteroide modelo, a 6β-hidroxi-4-pregnen-3,20-diona (C₂₁H₃₀O₃) (FIGURA 4), com deslocamentos químicos experimentais descritos por Strommer et al. (2004). A molécula foi sintetizada a partir da oxidação da progesterona com SeO₂ e foi escolhida pela presença de ligações C-O, comuns em esteroides. As etapas realizadas para determinação da base teórica mais adequada encontram-se descritas na FIGURA 5. A molécula passou por busca conformacional pelo software MacroModel, disponível na interface Maestro™ (SCHRÖDINGER, 2018), usando geometria MMFF (*Molecular Mechanics Force Field*, campo de força da mecânica molecular em tradução livre) com limite superior de energia de 65 kJ/mol (aproximadamente 15 kcal/mol) e com máximo de 5000 etapas. A busca resultou em 55 possíveis confôrmeros. Estes foram então agrupados em 9 *clusters*, utilizando-se ferramenta do mesmo software. Devido à similaridade estrutural, apenas um confôrmero de cada *cluster* foi utilizado para os cálculos de otimização e frequência; o nível de teoria DFT/B3LYP/6-31G+(2d,p) em vácuo foi empregado (CHESHIRE, 2021).

FIGURA 4 – 6β-HIDROXI-4-PREGNEN-3,20-DIONA



FONTE: A autora (2021).

FIGURA 5 – ETAPAS PARA DETERMINAÇÃO DA MELHOR BASE TEÓRICA



FONTE: A autora (2021).

Os dados de energia obtidos para os 9 *clusters* foram avaliados e utilizando a equação de Boltzmann, determinou-se o confôrmers predominante. A relação de Boltzmann descreve a movimentação microscópica das partículas de um sistema em equilíbrio termodinâmico. De acordo com Çengel e Boles (2013), a equação pode ser descrita por:

$$S = k \ln p$$

Onde S corresponde a entropia do sistema (ou seja, o nível de desordem do sistema, que está relacionada a espontaneidade do processo); k é a constante de Boltzmann e corresponde a $1,3806 \times 10^{-23}$ J/K e p é a probabilidade termodinâmica (número total de possíveis estados microscópicos do sistema).

Esse confôrmers foi então submetido aos cálculos de blindagem magnética em diferentes níveis de teoria e solvatação para determinar o conjunto de base mais adequada para este tipo de molécula, ou seja, aquele conjunto de funções que melhor representa matematicamente os orbitais de um esteroide (TABELA 1).

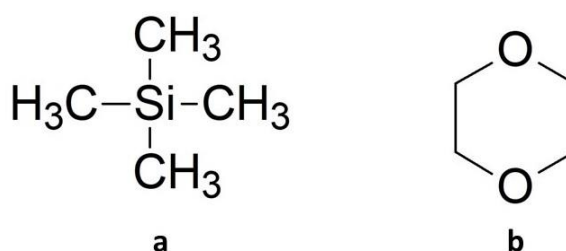
TABELA 1 – DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE TEORIA PARA OS CÁLCULOS DE RMN

Cálculo	Técnica	Nível de teoria		Solvatação
1	RMN	DFT - B3LYP	6-311G+(2d,p)	Vácuo
2	RMN	DFT - B3LYP	6-311G+(2d,p)	IEFPCM (Clorofórmio)
3	RMN	DFT - mPW1PW91	6-311G+(2d,p)	Vácuo
4	RMN	DFT - mPW1PW91	6-311G+(2d,p)	IEFPCM (Clorofórmio)
5	RMN	DFT - PBEPBE	6-311G+(2d,p)	Vácuo
6	RMN	DFT - PBEPBE	6-311G+(2d,p)	IEFPCM (Clorofórmio)
7	RMN	DFT - B3PW91	6-311G+(2d,p)	Vácuo
8	RMN	DFT - B3PW91	6-311G+(2d,p)	IEFPCM (Clorofórmio)
9	RMN	DFT - B3LYP	LanL2DZ	Vácuo
10	RMN	DFT - B3LYP	LanL2DZ	IEFPCM (Clorofórmio)
11	RMN	DFT - B3LYP	aug- cc-pVDZ	Vácuo
12	RMN	DFT - B3LYP	aug- cc-pVDZ	IEFPCM (Clorofórmio)

FONTE: A autora (2021).

Para obtenção dos deslocamentos químicos mais precisos, também foram calculados os espectros de RMN ^{13}C e ^1H para o tetrametilsilano (TMS) e dioxano nas mesmas configurações descritas (FIGURA 6). Essas moléculas são usadas como padrões internos, já que o TMS é referenciado como ponto zero dos deslocamentos químicos e o dioxano foi usado para avaliar os efeitos relativísticos dos átomos de oxigênio.

FIGURA 6 – TMS (a) E DIOXANO (b)



FONTE: A autora (2021).

Os resultados para os diferentes níveis de teoria foram avaliados através dos cálculos de desvio médio absoluto (MAD, *mean absolute deviation*) e erro quadrático médio (RMSE, *root mean square error*). O MAD compara os

deslocamentos químicos calculados para determinada molécula com os deslocamentos experimentais, através da equação (LINDGREN; LEAL, 2013):

$$MAD = \frac{\sum_{i=1}^n |\delta_{exp} - \delta_{calc}|}{n}$$

Onde n corresponde ao número total de deslocamentos químicos, δ_{exp} é o deslocamento químico experimental e δ_{calc} o deslocamento químico calculado.

O RMSE avalia a correlação dos dados em relação à linha de tendência obtida em cada regressão linear. Para tanto, a seguinte equação é utilizada (LINDGREN; LEAL, 2013):

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\delta_{exp} - \delta_{calc})^2}{n}}$$

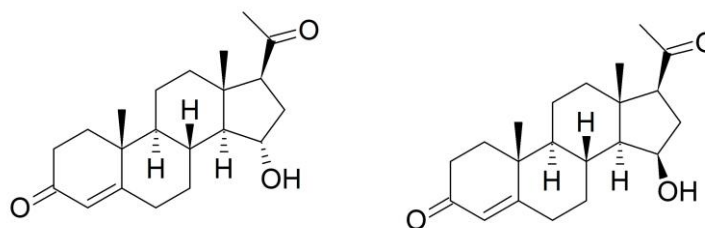
Os deslocamentos químicos teóricos para ^{13}C e ^1H usando TMS como padrão interno são obtidos através da subtração das constantes de blindagem dos núcleos da molécula de interesse das constantes de blindagem do TMS. Quando o efeito do dioxano é considerado, o deslocamento é calculado de acordo com a equação:

$$\delta = \sigma_{diox} - \sigma_{calc} + \delta_{diox\ exp}$$

Onde δ representa a deslocamento químico para determinado átomo, σ_{diox} é a média dos deslocamentos para os átomos do dioxano, σ_{calc} a constante de blindagem para este átomo e $\sigma_{diox\ exp}$ é o deslocamento experimental para o dioxano. Os valores experimentais usados para o dioxano foram 3,71 ppm para ^1H e 67,14 ppm para ^{13}C obtidos de Fulmer et al. (2010).

Após a escolha do nível de teoria mais adequado, as mesmas etapas foram realizadas com a molécula de interesse, 15-OH-hidroxiprogesterona, para a determinação da estereoquímica relativa (FIGURA 7). A busca conformacional resultou em 6 possíveis confôrmeros para o isômero que possui a hidroxila para trás do plano (alfa) e 7 confôrmeros para a molécula com isomeria para frente do plano (beta). Como foram poucos os confôrmeros observados, não houve necessidade de agrupamento em *clusters*.

FIGURA 7 – DOIS POSSÍVEIS DIASTEREOISÔMEROS DA 15-OH-PROGESTERONA

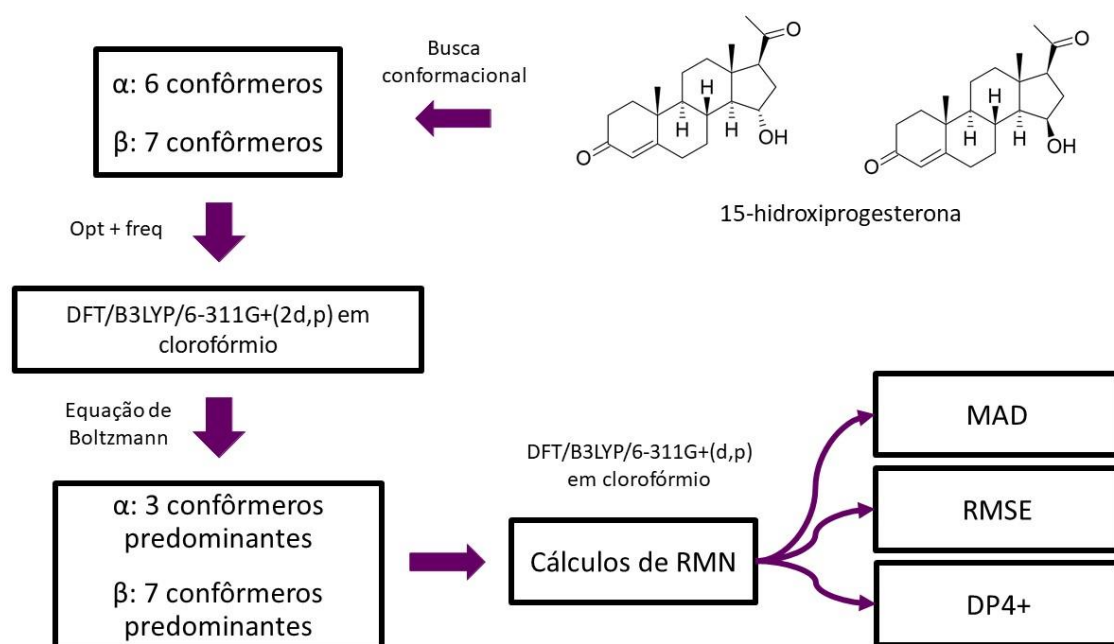


FONTE: A autora (2021).

Os cálculos de otimização foram realizados para cada um dos confôrmeros obtidos através da técnica DFT com conjunto de bases B3LYP/6-311G+(2d,p) com solvatação em clorofórmio. Os confôrmeros predominantes foram determinados através da equação de Boltzmann, para cada uma das possíveis isomerias. As moléculas resultantes seguiram para os cálculos dos deslocamentos químicos do espectro de RMN no nível de teoria DFT/B3LYP/6-311G+(d,p) com solvatação em clorofórmio adequado para que a técnica de DP4+ possa ser usada na comparação.

O uso da equação de Boltzmann resultou em 3 confôrmeros predominantes para o diastereoisômero α e 5 confôrmeros para o isômero β . Isso porque todas as moléculas com prevalência acima de 5% foram consideradas. Após os cálculos de RMN, os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C foram tabelados e adequados à proporção representativa de cada um. Após essa compensação, os dados foram aplicados na técnica DP4+ (GRIMBLAT et al, 2015) e os parâmetros de MAD e RMSE foram calculados. O padrão interno TSM passou pelos cálculos de otimização e de RMN nas mesmas bases usadas para a molécula. As etapas realizadas com a molécula de interesse encontram-se demonstradas na FIGURA 8.

FIGURA 8 – ETAPAS PARA DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA RELATIVA DA 15-OH-PROGESTERONA

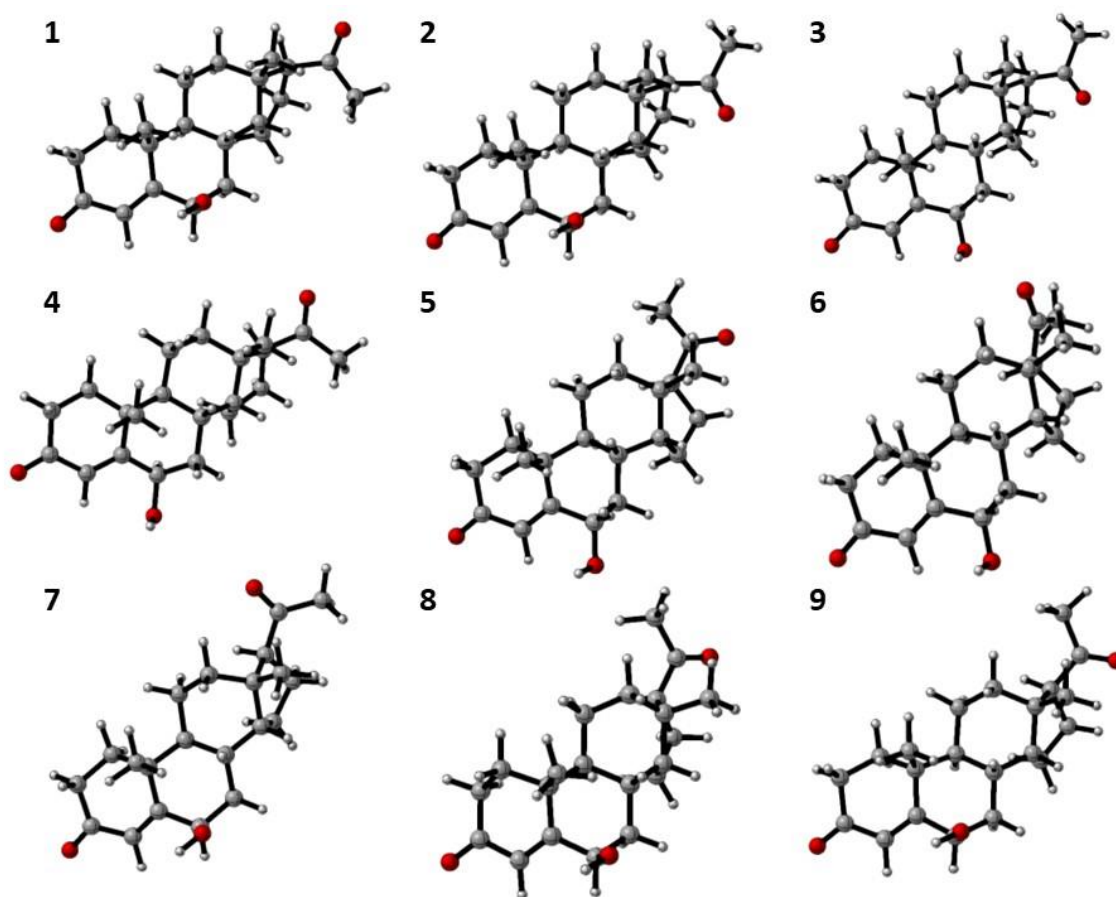


FONTE: A autora (2021).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A busca conformacional do esteroide 6 β -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona nos parâmetros adotados resultou em 55 possíveis confôrmeros, que foram agrupados em 9 *clusters* (FIGURA 9). A otimização da molécula foi calculada usando os 9 confôrmeros no nível de teoria DFT/B3LYP/6-31G+(2d,p) em vácuo. Os resultados das energias e da prevalência de cada um dos confôrmeros, calculados através da equação de Boltzmann, encontram-se na TABELA 2.

FIGURA 9 – CONFÔRMEROS REPRESENTATIVOS DOS 9 *CLUSTERS* DA 6 β -HIDROXI-4-PREGNEN-3,20-DIONA



FONTE: A autora (2021).

A equação da média ponderada de Boltzmann é uma ferramenta usada na análise de fenômenos fora do equilíbrio termodinâmico, envolvendo gradientes de temperatura e densidade e é capaz de fornecer informações importantes sobre as propriedades do sistema. De acordo com a TABELA 2, podemos observar que o

confômero majoritário foi o de número 2. Os outros 8 confômeros apresentaram uma porcentagem muito pequena, por este motivo serão desconsiderados na próxima etapa dos cálculos.

TABELA 2 – ENERGIAS E PREVALÊNCIA DE CADA CONFÔMERO

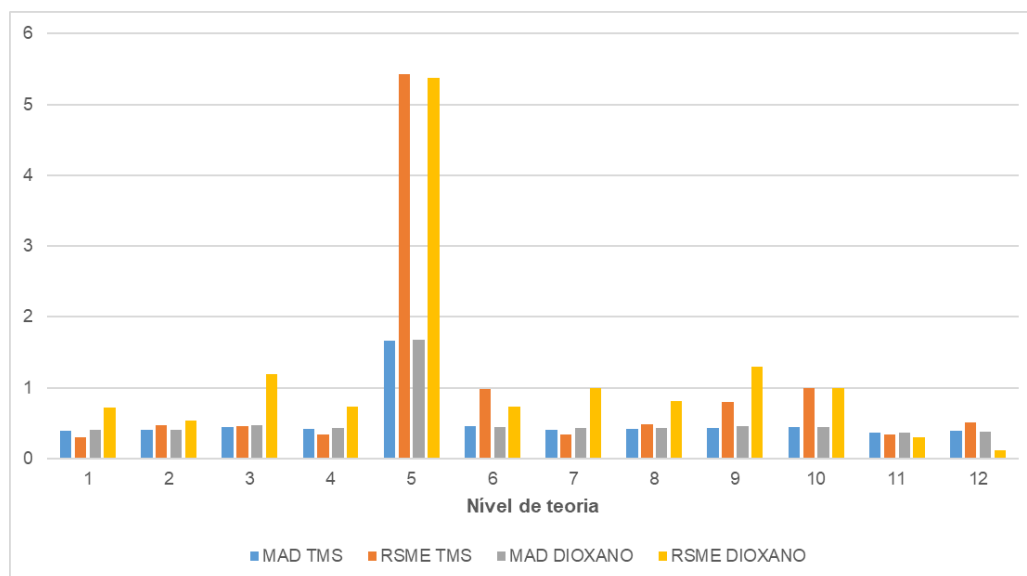
Molécula	Energia (kcal/mol)	%conf (T=300K)
Confômero 1	-654626,217118	0,72
Confômero 2	-654629,145078	97,91
Confômero 3	-654624,205322	0,02
Confômero 4	-654622,517949	0,00
Confômero 5	-654621,065264	0,00
Confômero 6	-654620,061249	0,00
Confômero 7	-654625,763429	0,34
Confômero 8	-654624,214107	0,03
Confômero 9	-654626,402233	0,98

FONTE: A autora (2021).

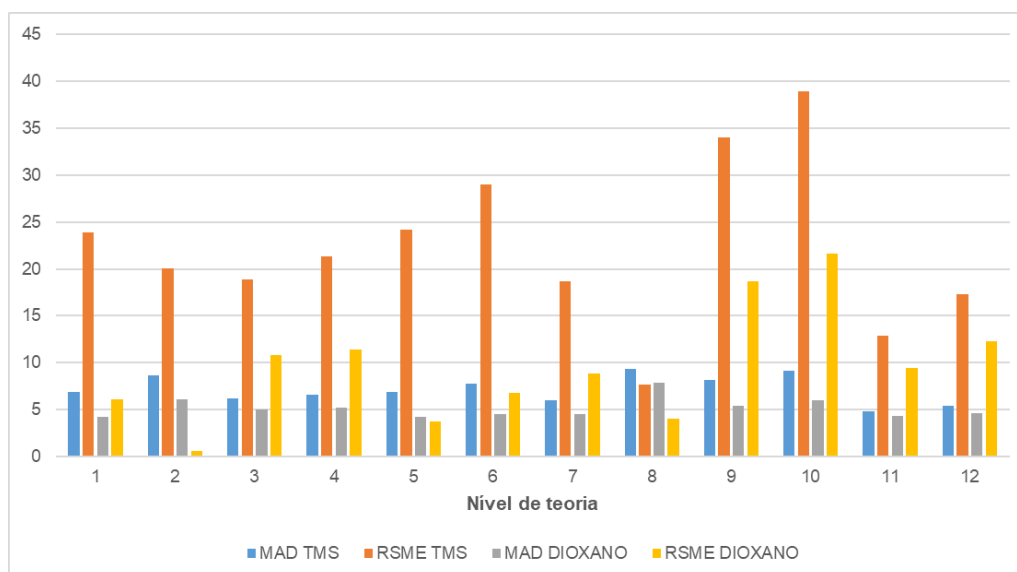
O confômero 2 foi então usado como modelo para os cálculos de RMN com 12 conjuntos de base diferentes, conforme indicado na TABELA 1. Os resultados foram tabelados e comparados através dos valores de MAD e RSME. Nas FIGURAS 10 e 11 pode-se observar os resultados obtidos para o deslocamento dos átomos de hidrogênio e carbono, respectivamente.

Quanto aos valores de MAD e RMSE para o deslocamento químico do ^1H , os valores encontrados foram baixos e homogêneos, exceto pelo nível de teoria número 5. Dentre os resultados obtidos, as bases 1, 2, 11 e 12 se mostraram mais promissoras. Uma vez que os valores obtidos foram bastante próximos, 1 e 2 foram consideradas mais viáveis, devido ao alto custo computacional despendido nos casos 11 e 12.

Para os resultados de ^{13}C , os resultados foram mais discrepantes. Os resultados mais homogêneos foram apresentados pelas bases 1, 5 e 8. Os níveis de teoria 11 e 12 também obtiveram resultados promissores, mas levando em conta o tempo computacional exigido, foram colocadas em segundo plano. A base 2 apresentou o RSME mais baixo no método usando dioxano como padrão interno, mas nos outros parâmetros, essa base não teve um desempenho tão discrepante das demais.

FIGURA 10 – VALORES DE MAD E RMSE PARA DESLOCAMENTO QUÍMICO DO ^1H 

FONTE: A autora (2021).

FIGURA 11 – VALORES DE MAD E RMSE PARA DESLOCAMENTO QUÍMICO DO ^{13}C 

FONTE: A autora (2021).

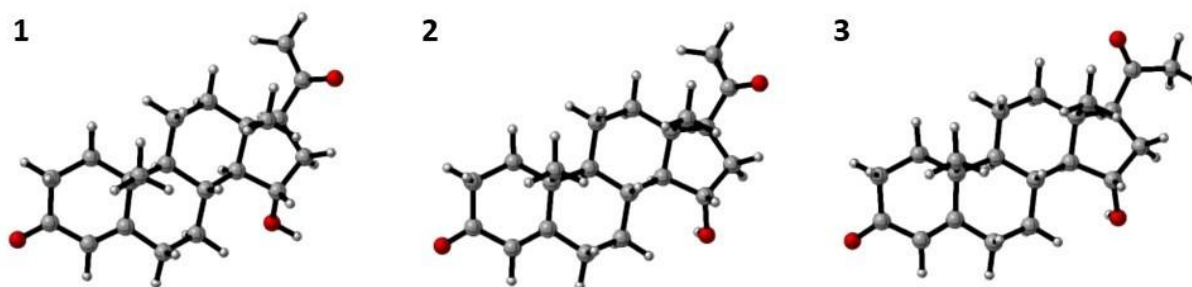
Diante destes resultados, o conjunto de base escolhido foi o conjunto 2. Dessa forma, o nível de teoria escolhido foi DFT/B3LYP/6-311G+(2d,p) em clorofórmio, uma vez que este apresentou bons resultados tanto para os espectros de carbono quanto hidrogênio, além de um tempo computacional inferior a outros métodos testados.

Além disso, outro quesito a ser avaliado é se o uso do dioxano como padrão interno leva a diferenças significativas nos resultados. O que se observou foi que o

uso do dioxano como padrão interno associado ao TMS, melhorou os parâmetros de MAD e RME avaliados em ^{13}C , mas o mesmo não ocorreu para os átomos de hidrogênio. Uma vez que o dioxano é utilizado para avaliar os efeitos relativísticos do oxigênio na molécula, possivelmente essa diferença se deve ao fato dos átomos de oxigênio da molécula estarem ligados à átomos de carbono. Dessa forma, os cálculos com a molécula de interesse foram realizados apenas com o TMS, os deslocamentos obtidos para o padrão interno encontram-se descritos na TABELA 3. A média dos deslocamentos para o hidrogênio resultou em 32,01 ppm e para o carbono 184,39 ppm.

Então seguiram-se aos cálculos com a molécula de interesse: 15-hidroxiprogesterona. Após a otimização dos confôrmeros no nível de teoria DFT/B3LYP/6-311G+(2d,p) com solvatação em clorofórmio, a equação de Boltzmann foi usada para avaliar os confôrmeros predominantes. Foram consideradas populações predominantes, todas as estruturas dos confôrmeros com populações maiores que 5%. Dessa forma, para a molécula α (hidroxila para trás do plano), os cálculos de RMN foram realizados com os confôrmeros 1, 3 e 4 (TABELA 4) e para o diastereoisômero β (hidroxila para frente do plano) os confôrmeros 1, 2, 3, 4 e 6 (TABELA 5). Os confôrmeros estão representados nas FIGURAS 12 e 13.

FIGURA 12 – CONFÔRMEROS PREDOMINANTES DA 15 α -OH-PROGESTERONA



FONTE: A autora (2021).

TABELA 3 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS OBTIDOS PARA O TMS (ppm)

¹ H	¹³ C
32,05	183,48
31,99	187,13
31,99	183,48
32,01	183,45
32,00	
32,00	
31,99	
31,99	
32,05	
31,99	
32,05	
31,99	

FONTE: A autora (2021).

TABELA 4 – POPULAÇÃO DE CONFÔRMEROS PARA 15 α -OH-PROGESTERONA

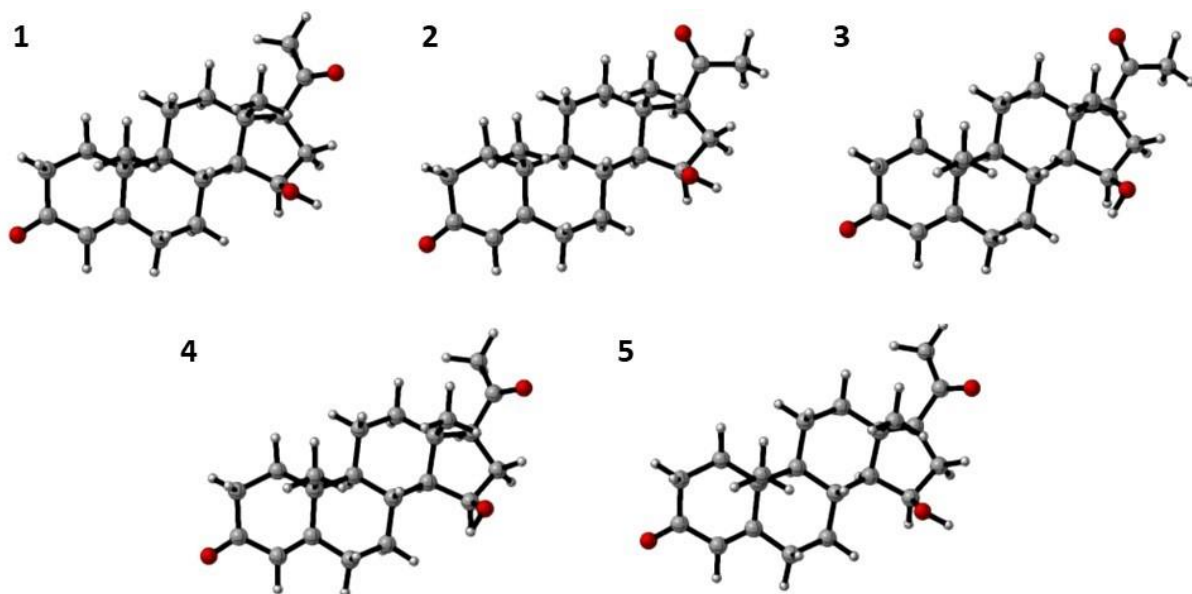
Molécula	Energia (kcal mol)	%conf (T=300K)
Confômero 1	-654773,016088	41,69
Confômero 2	-654771,728439	4,81
Confômero 3	-654773,034286	42,98
Confômero 4	-654771,933634	6,78
Confômero 5	-654771,446059	2,99
Confômero 6	-654770,619002	0,75

FONTE: A autora (2021).

TABELA 5 – POPULAÇÃO DE CONFÔRMEROS PARA 15 β -OH-PROGESTERONA

Molécula	Energia (kcal mol)	%conf (T=300K)
Confômero 1	-654771,599172	12,12
Confômero 2	-654771,597917	12,10
Confômero 3	-654771,222666	6,45
Confômero 4	-654772,367871	44,02
Confômero 5	-654770,556251	2,11
Confômero 6	-654771,974422	22,75
Confômero 7	-654769,632557	0,45

FONTE: A autora (2021).

FIGURA 13 – CONFÔRMEROS PREDOMINANTES DA 15 β -OH-PROGESTERONA

FONTE: A autora (2021).

Para que os dados estivessem adequados para serem aplicados na probabilidade DP4+ o conjunto de base utilizado foi DFT/B3LYP/6-311G+(d,p) em clorofórmio. Os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C obtidos foram tabelados, corrigidos usando os deslocamentos teóricos do padrão interno e compensados de acordo com as porcentagens representativas de cada população obtidos na equação de Boltzmann. A TABELA 6 compara os deslocamentos de ^{13}C obtidos para cada um dos diastereoisômeros com os dados obtidos experimentalmente por De Paula et al. (2021). Na TABELA 7 é possível observar a mesma comparação para os deslocamentos de ^1H .

TABELA 6 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^{13}C PARA 15-OH-PROGESTERONA (ppm)

Carbono	Experimental	15 α -OH-progesterona	15 β -OH-progesterona
1	35,8	21,787966	40,988689
2	33,9	20,431786	38,761613
3	199,4	109,843242	208,385767
4	123,9	68,594820	130,347950
5	170,9	98,577076	186,584258
6	32,8	20,540025	38,624740
7	31,0	20,316581	37,587235
8	31,6	22,103856	37,815981
9	53,7	31,010730	59,412067
10	38,7	24,629136	46,663487
11	20,9	12,946348	24,718328
12	40,2	23,301783	45,777356
13	43,9	26,774813	49,845204
14	60,4	35,584580	66,180391
15	70,2	42,257165	77,423652
16	36,2	22,400314	41,709873
17	63,5	35,627644	70,287648
18	15,9	8,771301	17,195190
19	17,9	10,135939	19,010572
20	209,3	116,559745	219,961032
21	31,4	18,600650	34,845111

FONTE: A autora (2021).

Com os esses dados foram calculados os parâmetros de MAD e RMSE como podem ser observados na TABELA 8. É possível notar que os dados para a conformação β foram menores, indicando sua predominância. Como forma de confirmação, os dados foram aplicados na técnica DP4+, que compara diferentes isômeros e indica a probabilidade de que cada um deles seja a estrutura obtida em laboratório.

TABELA 7 – DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE ^1H PARA 15-OH-PROGESTERONA (ppm)

Hidrogênios	Experimental	15 α -OH-progesterona	15 β -OH-progesterona
1a	1,75	1,941749	2,020515
1b	2,06	1,706422	1,750872
2a	2,31	2,353522	2,500313
2b	2,43	2,137422	2,259075
4	5,76	5,770206	6,014629
6a	2,38	2,487689	2,685822
6b	2,49	2,280028	2,372627
7a	1,14	2,288819	2,086919
7b	2,15	1,131823	1,230004
8b	1,96	1,807093	2,089069
9a	1,05	0,966165	0,983276
11a	1,68	1,497719	1,534298
11b	1,52	1,572642	1,621353
12a	1,46	1,861243	2,080466
12b	2,06	1,425960	1,344400
14a	1,05	0,906033	0,875131
15a	4,33	4,109691	4,341466
16a	2,24	2,929366	2,551888
16b	2,24	1,156468	2,061124
17a	2,49	2,458762	2,273052
18	0,94	0,742327	0,977236
19	1,22	1,257576	1,301402
21	2,15	2,077348	2,177078

FONTE: A autora (2021).

TABELA 8 – VALORES DE MAD E RMSE PARA OS POSSÍVEIS DIASTEREISÔMEROS DA 15-OH-PROGESTERONA

RMN	15 α -OH-progesterona		15 β -OH-progesterona	
	MAD	RMSE	MAD	RMSE
^{13}C	27.18	119.00	6.22	27.24
^1H	0.32	0.42	0.27	0.06

FONTE: A autora (2021).

A segunda técnica comprovou o que já indicavam os dados de MAD e RMSE. Obteve-se uma probabilidade de 100% de que o diastereoisômero obtido experimentalmente seja diastereoisômero β . Esse resultado confirma a estrutura proposta por De Paula e colaboradores (2021). Dessa forma, pode-se concluir que a

biotransformação da progesterona mediada pelo fungo *P. oxalicum* teve como produto a 15 β -OH-progesterona.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através de simulações computacionais, o presente trabalho determinou a estereoquímica da molécula produzida pela biotransformação da progesterona pelo fungo *P. oxalicum*. Além disso, o trabalho confirmou a estrutura proposta experimentalmente. Esse fato demonstra a viabilidade da associação entre dados *in silico* e como dados experimentais, sobrepondo limitações que ambas as técnicas poderiam ter quando usadas isoladamente e garantindo mais robustez aos dados.

Também foram definidos os conjuntos de bases teóricas mais adequados para estudos com esteroides. O método foi aplicado para a molécula 15 β -OH-progesterona, demonstrando resultados satisfatórios, com a confirmação da sua conformação relativa.

Durante a biotransformação, além da 15 β -OH-progesterona, também foi verificada a produção de uma molécula di-hidroxilada, descrita pelos autores como 7 β ,15 β -dihidroxiprogesterona. As próximas etapas da pesquisa têm como objetivo determinar a estereoquímica dessa molécula.

REFERÊNCIAS

ADVANCED CHEMISTRY DEVELOPMENT. **ACD/CHEMSKETCH, version 2018.2.5**. Toronto, Canada: Inc., 2018.

ALCÁCER, L. **Introdução à Química Quântica Computacional**. IST Press, 2007.

BARONE, V.; IMPROTA, R.; REGA, N. Quantum Mechanical Computations and Spectroscopy: From Small Rigid Molecules in the Gas Phase to Large Flexible Molecules in Solution. **Accounts of Chemical Research**, v. 41, n. 5, p. 605–616, 2008.

BASEDEN, K. A.; TYE, J. W. Introduction to Density Functional Theory: Calculations by Hand on the Helium Atom. **Journal of Chemical Education**, v. 91, n. 12, p. 2116–2123, 2014.

BIFULCO, G. et al. Determination of Relative Configuration in Organic Compounds by NMR Spectroscopy and Computational Methods. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 9, p. 3744–3779, 2007.

BRUEGGEMEIER, R. W.; LI, P.-K. Fundamentals of steroid chemistry and biochemistry. **Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery**, Cardiovascular Agents and Endocrines. 6 ed, v. 3, 2003. Wiley.

CARDOSO DE PAULA, S. F.; PORTO, A. L. M. Cascade reactions of progesterone by mycelia and culture broth from marine-derived fungus *Aspergillus sydowii* CBMAI 935. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 25, p. 101546, 2020.

ÇENGEL, Y. A.; BOLES, M. A. **Termodinâmica**. 7^o ed. Porto Alegre: AMGH, 2013.

CHESHIRE Chemical Shift Repository. .Disponível em:
<<http://cheshirenmr.info/Recommendations.htm>>. Acesso em: 16/10/2021.

DENNINGTON, R.; KEITH, T.; MILLAM, J. **Gauss View, version 6**. Shawnee Mission: Semichem Inc., 2009.

DONOVA, M. V.; EGOROVA, O. V. Microbial steroid transformations: current state and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, n. 6, p. 1423–1447, 2012.

FALBRIARD, C.; BROSSO, I. **Computação Quântica: A realidade de uma nova era**. Editora Alta Books, 2020.

FRISCH, M. J. et al. **Gaussian 09**. Wallingford CT: Gaussian, Inc., 2016.

FULMER, G. R. et al. NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist. **Organometallics**, v. 29, n. 9, p. 2176–2179, 2010.

GRIMBLAT, N.; ZANARDI, M. M.; SAROTTI, A. M. Beyond DP4: an Improved Probability for the Stereochemical Assignment of Isomeric Compounds using Quantum Chemical Calculations of NMR Shifts. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 80, n. 24, p. 12526–12534, 2015.

HU, G.; LIU, K.; WILLIAMS, L. J. The *Brosimum Allene*: A Structural Revision. **Organic Letters**, v. 10, n. 23, p. 5493–5496, 2008.

KEMP, W. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **Organic Spectroscopy**. p.101–241, 1991. London: Macmillan Education UK. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-349-15203-2_3>. Acesso em: 1/9/2021.

KUTATELADZE, A. G.; REDDY, D. S. High-Throughput in Silico Structure Validation and Revision of Halogenated Natural Products Is Enabled by Parametric Corrections to DFT-Computed ^{13}C NMR Chemical Shifts and Spin-Spin Coupling Constants. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 82, n. 7, p. 3368–3381, 2017.

LEDNICER, D. **Steroid Chemistry at a Glance**. Wiley, 2011.

LEGAULT, C. Y. **CYLview, 1.0b**. Université de Sherbrooke, 2009.

LINDGREN, E. B.; LEAL, K. Z. Application of Computational Chemistry in the Calculation of ^{13}C NMR Chemical Shifts of Organic Molecules. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 2, 2013.

MACGREGOR, C. I. et al. Toward the stereochemical assignment and synthesis of hemicalide: DP4f GIAO-NMR analysis and synthesis of a reassigned C16–C28 subunit. **Chemical Communications**, v. 52, n. 25, p. 4632–4635, 2016.

MAHATO, S. B.; GARAI, S. Advances in microbial steroid biotransformation. **Steroids**, v. 62, n. 4, p. 332–345, 1997.

MCMURRY, J. E. **Organic Chemistry**. 8th ed. Belmont: Brooks Cole, 2012.

MENDOZA-ESPINOZA, J. A. et al. Structural Reassignment, Absolute Configuration, and Conformation of Hypurticin, a Highly Flexible Polyacyloxy-6-heptenyl-5,6-dihydro-2*H*-pyran-2-one. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 4, p. 700–708, 2009.

NASCIMENTO, C. **Ressonância Magnética Nuclear**. São Paulo: Blucher, 2016.

DE PAULA, S. F. C.; ROSSET, I. G.; PORTO, A. L. M. Hydroxylated steroids in C-7 and C-15 positions from progesterone bio-oxidation by the marine-derived fungus *Penicillium oxalicum* CBMAI 1996. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 37, p. 102167, 2021.

SALVADOR, J. A. R. et al. Anticancer steroids: linking natural and semi-synthetic compounds. **Nat. Prod. Rep.**, v. 30, n. 2, p. 324–374, 2013.

SAROTTI, A. M. In Silico Reassignment of (+)-Diplopyrone by NMR Calculations: Use of a DP4/J -DP4/DP4+/DIP Tandem to Revise Both Relative and Absolute Configuration. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 85, n. 17, p. 11566–11570, 2020.

SCHRÖDINGER. **Maestro**. New York: Schrödinger, 2018.

SILVERSTEIN, R. M. et al. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 8 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2019.

SMITH, S. G.; GOODMAN, J. M. Assigning the Stereochemistry of Pairs of Diastereoisomers Using GIAO NMR Shift Calculation. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 74, n. 12, p. 4597–4607, 2009.

SMITH, S. G.; GOODMAN, J. M. Assigning Stereochemistry to Single Diastereoisomers by GIAO NMR Calculation: The DP4 Probability. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 37, p. 12946–12959, 2010.

STROMMER, R. et al. Synthesis of 6-Hydroxy Derivatives of Steroidal Hormones by SeO₂ Mediated Oxidation. **Monatshefte fur Chemie/Chemical Monthly**, v. 135, n. 9, 2004.

TIMMONS, C.; WIPF, P. Density Functional Theory Calculation of ¹³C NMR Shifts of Diazaphenanthrene Alkaloids: Reinvestigation of the Structure of Samoquasine A. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 73, n. 22, p. 9168–9170, 2008.