



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Desenvolvimento de esteroides funcionalizados nos anéis A e D como potenciais agentes anti- Alzheimer

Jessica Patrícia Melo Ribeiro

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Medicinal
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Samuel Martins Silvestre

Covilhã, outubro de 2016

Agradecimentos

Queria começar por agradecer a minha vivência académica, ao longos destes anos, que apesar de me trazer algumas adversidades, contribuiu para o meu crescimento tanto a nível académico e como pessoal. E assim demonstrar a minha gratidão perante todos os meus colegas, em especial aos de curso e professores que me acompanharam neste caminho.

Focando-me neste último ano, quero agradecer primeiro ao professor Samuel Silvestre, por me aceitar como orientada e pela disponibilidade para me acompanhar e ajudar durante toda a dissertação.

Em segundo, a todos os colegas que cruzaram o meu caminho no laboratório, em especial à Joana, Mariana, Paulinha, Sara e Vanessa, que pela disponibilidade, auxílio ou boa-disposição, marcaram a última etapa académica. Assim como às professoras Isabel Ismael e Ana Paula Duarte que possibilitaram efetuar o ensaio enzimático.

Por último, mas igualmente importante, agradecer à família, que sempre me acompanhou. Aos meus pais, que proporcionaram a minha vida académica e sempre me apoiaram, às minhas irmãs e afilhada que sempre se preocuparam comigo e esperam que termine com sucesso esta etapa da minha vida, e ao meu namorado, Diogo. Ele manteve-se sempre do meu lado, a motivar-me para atingir os meus objetivos e foi fundamental, não só neste último ano, mas em todos em que me acompanhou.

Resumo

A doença de Alzheimer é uma demência neurodegenerativa, caracterizada a nível molecular por *misfolding* e agregação proteica, stress oxidativo, anomalias mitocondriais e processos inflamatórios. Apesar de ainda existirem incertezas quanto às causas moleculares da doença, algumas hipóteses são consideradas, como a colinérgica, que admite existir uma deficiência da acetilcolina no cérebro que é devido à diminuição da sua produção ou aumento da atividade da acetilcolinesterase (AChE). A AChE está também envolvida na formação de placas amiloides, também associadas com AD. A única terapia existente para a doença são os inibidores da AChE, que facilitam a transmissão colinérgica e interferem com síntese, formação e agregação das placas amiloides.

Compostos naturais ou semissintéticos, como esteroides, têm sido estudados como potenciais inibidores da enzima. Após uma análise dos pontos estruturais comuns desses esteroides, que lhe conferem a atividade inibitória, foram desenhados novos esteroides, partindo do acetato de 16-desidropregnenolona (16-DPA). Assim, modificou-se neste composto o substituinte em C-3 e funcionalizou-se o anel D, na posição 16, com a introdução de aminas.

Os compostos desenhados, foram submetidos a um estudo de *docking* molecular, do qual se obteve energias de ligação inferiores à tacrina (fármaco de referência), sendo o melhor resultado para o composto 27, com -14,38 kJ/mol. De seguida tentou-se sintetizar os compostos, recorrendo-se a uma hidrólise em C-3 e à adição de Michael, com estudo do catalisador, para a introdução de aminas em C16. Deste modo, foi possível obter dois acetatos de 16 α -aminopregnenolonas puros, 20 e 26, e uma 16 α -aminopregnenolona (21) hidrolisada em C-3.

Finalmente, submeteram-se os compostos 16-DPA, 20 e 21 ao ensaio de Ellman's, para a avaliar a sua capacidade inibitória contra a AChE, obtendo-se as seguintes percentagens de inibição 6,58, 15,36 e 15,58, respetivamente, para soluções a 10 μ M.

Palavras-chave

AChEIs, *docking* molecular, 16 α -aminopregnenolonas, reação de Michael, catalisador.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized at a molecular level by protein misfolding and aggregation, oxidative stress, mitochondrial abnormalities, and neuroinflammatory processes. The exact cause of AD is still uncertain, but some hypotheses have been considered, such as the cholinergic hypothesis which states that a deficiency on acetylcholine in brain is observed due to a decreased production of acetylcholine or to amplified acetylcholinesterase (AChE) activity. In addition, this enzyme has a partial involvement in the formation of amyloid plaques and neurofibrillary tangles, also associated with AD. The only therapy available for AD is AChE inhibitors, which facilitates the cholinergic transmission and interferes with amyloid plaques synthesis, formation and aggregation.

Natural or semisynthetic compounds, such as steroids have been studied as potential enzyme inhibitors. After an analysis of structural features of those steroids, that provides the inhibitory activity, new steroids were drawn, from 16-dihydropregnenolone acetate (16-DPA). Modifications were made on C-3 substituent and functionalization of ring D, by amine introduction on C-16.

The new compounds were submitted to a molecular docking study, where were obtained binding energies lowers than tacrine (reference drug), the best result was obtained for compound 27, with -14.38 kJ/mol. Then, the compounds were synthesized, using a hydrolysis on C-3 and Michael addition, with the study of the catalyst, for amine introduction. Two 16 α -aminopregnenolones acetate 20 and 26, and one hydrolysed on C-3 16 α -aminopregnenolone 21, were achieved.

Finally, compounds 16-DPA, 20 and 21 were submitted to an Ellman's assay, to evaluate their inhibitory capacity against AChE. The following inhibition percentage were obtained: 6.58, 15.36 and 15.58, respectively, for 10 μ M solutions.

Keywords

AChEIs, molecular docking, 16 α -aminopregnenolones, Michael addition, catalyst.

Índice

1. Introdução	1
1.1. Doença de Alzheimer	1
1.1.1. Acetilcolinesterase	6
1.1.2. Proteína tau	7
1.1.3. Proteína precursora amiloide	9
1.1.4. Apolipoproteína 4	11
1.2. Esteroides	13
1.2.1. Esteroides inibidores da acetilcolinesterase	14
1.2.1.1. Inibidores de origem natural	14
1.2.1.2. Inibidores semissintéticos	16
1.2.1.3. Relação estrutura atividade	20
1.2.2. Reação de Michael	21
1.3. Descoberta de novos fármacos	22
1.3.1. <i>Design</i> computacional de fármacos	23
1.3.1.1. <i>Docking</i> molecular	24
1.3.1.2. Algoritmo	26
1.3.1.3. <i>Scoring</i>	26
2. Objetivos	29
3. Parte experimental	31
3.1. Estudos de <i>Docking Molecular</i>	31
3.1.1. Preparação da proteína	31
3.1.2. Preparação dos ligandos	31
3.1.3. Cálculo do <i>grid map</i>	31
3.1.4. Simulações de <i>docking</i>	31
3.2. Síntese orgânica	32
3.2.1. Considerações gerais	32
3.2.2. Estudo do processo de síntese de acetato de 16 α -morfolinopregnenolona (20)	32
3.2.2.1. Reação sem catalisador [62]	32
3.2.2.2. Reação catalisada com triflato de bismuto [54, 82]	33
3.2.2.2.1. Reação a 90°C	33
3.2.2.2.2. Reação a 45°C	33
3.2.2.2.3. Reação a 80°C	33
3.2.2.3. Reação catalisada com KOH (21)[83]	34
3.2.2.4. Reação catalisada com CAN [54, 85]	34
3.2.2.4.1. Reação a 45°C	34
3.2.2.4.2. Reação à temperatura ambiente	35
3.2.2.5. Reação catalisada com quinina [86]	35
3.2.2.6. Reação catalisada com HClO ₄ -SiO ₂ [87]	35
3.2.3. Síntese de 16-desidropregnenolona (22)	35
3.2.4. Síntese de 16 α -morfolinopregnenolona (21)	36
3.2.5. Tentativa de síntese de 3 β , 4 β -dihidropregnenolona (23)	36
3.2.6. Tentativa de síntese de acetato de 16 α -(N-metil)morfolinopregnenolona (24) [88]	37
3.2.7. Tentativas de síntese de acetato de 3 β ,17 β -diacetoxi-5 α ,6 α -epóxi-16 α -morfolinoandrostano (25)	37
3.2.7.1. Com MMPP [89]	37
3.2.7.2. Com <i>m</i> -CPBA [84]	38

3.2.8.	Adição de aminas em C-16 com triflato de bismuto	38
3.2.8.1.	Síntese de acetato de 16 α -piperidinopregnenolona (26)	38
3.2.8.2.	Síntese de acetato de 16 α -pirrolidinopregnenolona (27)	39
3.2.8.3.	Síntese de acetato de 16 α -propilaminopregnenolona (28)	39
3.2.8.4.	Síntese de acetato de 16 α -imidazolepregnenolona (29)	40
3.2.8.5.	Síntese de acetato de 16 α -benzimidazolepregnenolona (30)	40
3.2.8.6.	Síntese de acetato de 16 α -anilinopregnenolona (31)	40
3.2.9.	Adição de aminas em C-16 com CAN	41
3.2.9.1.	Síntese de acetato de 16 α -piperidinopregnenolona (26)	41
3.2.9.2.	Síntese de acetato de 16 α -pirrolidinopregnenolona (27)	41
3.2.9.3.	Tentativa de síntese de acetato de 16 α -benzimidazolepregnenolona (30)	41
3.2.9.4.	Tentativa de síntese de acetato de 16 α -anilinopregnenolona (31)	42
3.2.9.5.	Tentativa de síntese de acetato de 16 α -indolpregnenolona (32)	42
3.2.9.6.	Tentativa de síntese de 5 α -morfolinoprogesterona (33)	42
3.3.	Avaliação biológica	43
3.3.1.	Ensaio enzimático	43
4.	Resultados e Discussão	45
4.1.	Estudos de <i>Docking</i> molecular	45
4.2.	Síntese Orgânica	49
4.3.	Ensaio Enzimático	54
5.	Conclusão	55
6.	Bibliografia	57
7.	Anexos	63
7.1.	Anexo 1	63
7.2.	Anexo 2	64
7.3.	Anexo 3	65
7.4.	Anexo 4	65

Lista de Figuras

Figura 1- Representação esquemática da patogénese da AD, com foco nas hipóteses colinérgica, amiloide e tau [1].	5
Figura 2- Processamento da APP pelas secretases [24].	11
Figura 3- Esquema da participação da APOE na patogénese da AD, dependente do A β . Os efeitos dependentes das isoformas da APOE estão indicados [5].	13
Figura 4- Núcleo esteroide gonano.	13
Figura 5- Composto 6, estrutura da conessina.	16
Figura 6- Mapa do modelo CoMFA com as contribuições electrostáticas e estereoquímicas. As zonas vermelhas indicam áreas cuja densidade negativa favorece a atividade. As zonas azuis indicam áreas com densidade positiva que promovem a atividade. A cor amarela indica regiões que substituintes volumosos beneficiam a atividade e a cor verde indica o melhoramento da atividade com substituintes pequenos [47].	20
Figura 7- Aplicações do CADD nas várias fases de desenvolvimento de um fármaco [70].	23
Figura 8- Implementação de docking covalente no método de CADD. No caso de docking covalente da proteína alvo são exploradas as interações entre a proteína como nucleófilo e o ligando como eletrófilo [77].	25
Figura 9- Esquema síntese de acetato de 16 α -morfolinopregnenolona.	32
Figura 10- Esquema síntese de 16 α -morfolinopregnenolona.	34
Figura 11- Esquema síntese de 16-desidropregnenolona.	35
Figura 12- Esquema síntese de 3 β ,4 β -dihidropregnenolona.	36
Figura 13- Esquema síntese de acetato de 16 α -(N-metil)morfolinopregnenolona.	37
Figura 14- Esquema síntese de acetato de 3 β ,17 β -diacetoxi-5 α ,6 α -epóxi-16 α morfolinoandrostando.	37
Figura 15 - Esquema síntese de acetato de 16 α -piperidinopregnenolona.	38
Figura 16- Esquema síntese de acetato de 16 α -pirrolidinopregnenolona.	39
Figura 17- Esquema síntese de acetato de 16 α -propilaminopregnenolona.	39
Figura 18- Esquema síntese de acetato de 16 α -imidazolepregnenolona.	40
Figura 19- Esquema síntese de acetato de 16 α -benzimidazolepregnenolona.	40
Figura 20- Esquema síntese de acetato de 16 α -anilinopregnenolona.	40
Figura 21- Esquema síntese de acetato de 16 α -indolpregnenolona.	42
Figura 22- Esquema síntese de acetato de morfolinoprogesterona.	42
Figura 23- Conformação 3D do complexo proteína-composto 27 e diagrama 2D com as interações do complexo.	49
Figura 24- Esquema do estudo de processo da síntese de acetato de 16 α -morfolinopregnenolona.	52
Figura 25- Esquema síntese de acetato de 16 α -aminopregnenolonas.	53

Lista de Tabelas

Tabela 1- Esteroides de origem natural inibidores da AChE	15
Tabela 2- Esteroides semissintéticos inibidores da AChE	18
Tabela 3- Preparação das soluções diluídas, a partir da solução com 4,4 mg/mL	43
Tabela 4- Principais interações complexo proteína-ligando, obtidas pela programa DiscoveryStudioClient	46
Tabela 5- Condições reacionais do estudo de processo	52
Tabela 6- Condições reacionais da síntese de acetato de 16 α -aminopregnenolonas	53
Tabela 7- Percentagem de inibição dos compostos avaliados	54

Lista de Acrónimos

16-DPA	Acetato de 16-desidropregnenolona
AB	Amiloide beta
AChE	Acetilcolinesterase
AChERs	Recetores da acetilcolina
AChEs	Inibidores da acetilcolinesterase
AcOEt	Acetato de etilo
AD	Doença de Alzheimer
APP	Proteína precursora amiloide
APOE	Apolipoproteína
ATCI	Iodeto de acetiltiocolina
CADD	Design computacional de fármacos
CAN	Nitrato de cério e amónio
ComFA	Análise comparativa do campo molecular
CSF	Fluido cérebroespinal
cdk5	Cinase 5 dependente da ciclina
CNS	Sistema nervoso central
DTNB	Ácido 5-(3-carboxi-4-nitrofenil)disulfanil-2-nitrobenzóico
DMC	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
FDA	Food and drug administration
EP	Éter de petróleo
GSK3	Glicogénio sintase cinase
HTS	<i>High throughput screening</i>
LPR1	Proteína associada ao recetor de lipoproteínas de baixa densidade
m-CPBA	Ácido <i>m</i> -cloroperbenzóico
MeOH	Metanol
MMPP	Monoperoxiftalato de magnésio
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MTs	Microtúbulos
nbM	Núcleo basal de Meynert
NCE	Novas entidades químicas
NFT	Emaranhados neurofibrilares
NMDA	<i>N</i> -metil- <i>D</i> -aspartato
PDB	<i>Protein data Bank</i>
QSAR	Relação quantitativa de atividade estrutura
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
US	Estados Unidos
UTR	Não traduzida
TFA	Ácido trifluoroacético
TMS	Tetrametilsilano
VHTS	<i>Virtual high throughput screening</i>
VS	<i>Virtual screening</i>

1. Introdução

1.1. Doença de Alzheimer

A demência é a perda de função cerebral que ocorre com determinadas doenças, está associada, normalmente, com o esquecimento. Os sintomas incluem dificuldades em várias áreas de função mental, incluindo a fala, disfunção da memória, percepção, comportamento emocional ou capacidades cognitivas (como cálculo, pensamento abstrato, ou julgamento). A maior parte da demência é irreversível (doenças degenerativas) [1,2]. É clinicamente definida como uma entidade ou síndrome, apesar de existirem várias causas, e divide-se em duas categorias primária e secundária. A forma primária, a doença de Alzheimer (AD), ocorre quando a doença ataca diretamente o cérebro, precedendo outras disfunções físicas ou psiquiátricas [2]. A forma secundária ocorre com doenças orgânicas, que incluem lesão cerebral traumática, tumor ou substâncias tóxicas, e no caso de um tratamento efetivo da doença, as funções mentais e cognitivas voltam ao normal [3].

A AD é a doença degenerativa com maior incidência, mundialmente, e o envelhecimento é o fator de maior risco para o seu desenvolvimento [4,5]. Não havendo uma cura ou estratégia de prevenção definitiva a sua incidência continuará a aumentar nos próximos anos, refletindo também o aumento da esperança média de vida, proporcionada por avanços médicos. Uma estimativa do censo do *US Census Bureau* concluiu que, entre 2000 e 2020, o número de indivíduos a viver até aos 100 anos irá aumentar em 200% e o número de indivíduos a sobreviver até 90-95 dobrará. Duma perspetiva epidemiológica, o *Baltimore Longitudinal Study of Aging* (1988-1998) mostrou que a incidência das taxas de AD aumenta com a idade, 0,08% por ano, no grupo de 60-65 anos, a uma incidência anual estimada de 6,48% no grupo de ≥ 85 anos. Este estudo estimou, igualmente, que 4,4 anos é o tempo que leva as taxas de incidência a duplicarem, com um intervalo de tempo similar para a conversão de disfunção cognitiva média para AD [4].

Aproximadamente 200000 pessoas com menos de 65 anos integram a população afetada com AD precoce, 5 milhões de pessoas afetadas com AD possuem mais de 65 anos [6]. Estima-se que um indivíduo em cada 85 possa sofrer de AD, no ano de 2050. A doença pode ser classificada consoante a idade com que se inicia, AD precoce e AD tardia. A AD precoce é, aproximadamente 1-6% de todos os casos e manifesta-se entre os 30 e 60 anos. AD tardia representa, 90% dos casos e apresenta-se em idades posteriores a 60 anos [7]. Em 2011, Alzheimer afetava pelo menos 30 milhões de pessoas, mundialmente [8].

A etologia da AD é multifatorial, com componentes genéticos, ambientais e comportamentais envolvidos. O maior fator de risco é o envelhecimento, outros são o historial familiar positivo (estudos com gémeos previram que a heritabilidade de AD tardia pode ser tão alta como 80%), trauma craniano, género feminino, diabetes, hiperlipidemia e fatores vasculares [1,7].

A AD é caracterizada, a nível molecular, por *misfolding* e agregação proteica, stress oxidativo, anomalias mitocondriais, e processos inflamatórios. É caracterizada por um défice gradual progressivo em mais que uma área cognitiva, incluindo memória episódica, mudanças humorais e comportamentais, linguística, atenção, desorientação visoespacial, discalculia/acalculia, acinesia e mutismo [1,8,9]. O sintoma inicial mais comum é a dificuldade em lembrar novas informações aprendidas. O curso sintomático da doença é geralmente 5 anos ou mais, apesar de um período pré-clínico de 7 anos de declínio de memória e atenção tem sido descrito [9], podendo ocorrer nas fases terminais uma variedade de comportamentos agitados, assim como psicose com ilusões, delírios, alucinações e paranoia [8].

É caracterizada patologicamente por perda de sinapses e neurónios, assim como da formação de placas amiloides extracelulares e emaranhados neurofibrilares intracelulares, que ocorre tanto na AD precoce como AD tardia, que possuem uma componente genética ou são esporádicas [1,5,10]. A primeira é caracterizada por um declínio severo e progressivo cognitivo e aumento da morte de neurónios, a segunda forma desenvolve-se mais rapidamente e é causada por mutações de intervenientes da via amiloide, como a proteína precursora amiloide (APP), apolipoproteína E4 (ApoE4), preselina-1 e preselina-2 e recetor 1 relacionado com a sortilina [1].

Áreas cerebrais envolvidas são: prosencéfalo basal, córtex e amígdala, que são as áreas relacionadas com aprendizagem, memória, atenção e balanço emocional [1], onde ocorrem distintos aspetos neuropatológicos: atrofia cerebral, placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares, deterioração nos caminhos neuronais, envolvendo transmissores como a acetilcolina, serotonina, noradrenalina e dopamina [2].

Durante décadas os médicos afirmavam que o diagnóstico da AD não podia ser confirmado sem uma biópsia cerebral ou autópsia. Em 2004, o primeiro ligando nuclear medicinal para a visualização do cérebro amiloide foi apresentado [11].

O diagnóstico da neuropatologia AD num determinado sujeito é feito pela avaliação da localização, distribuição e abundância de características lesões cerebrais. Tentativas para uniformizar para diagnosticar a AD e comorbidade começaram no início dos anos 1980 e continua até ao presente. Doenças neurodegenerativas são tradicionalmente consideradas desordens em que a perda de neurónios e sinapses ocorre em *loci* anatómicos distintos, resultando em diferentes fenótipos [4].

Existe um decréscimo significativo na atividade da colina acetiltransferase, um biomarcador para neurónios colinérgicos, nos cérebros *post mortem* de pacientes com demência [2].

A característica neuropatológica principal de AD cerebral, de uma inspeção grosseira é atrofia cortical, que é usualmente difusa e razoavelmente simétrica ao longo dos hemisférios cerebrais, em vez de acentuada em certos lóbulos ou num só lado do cérebro. Quando o cérebro é fatiado, a atrofia cortical (manifestada como adelgaçamento da fita cortical) é usualmente acompanhada pelo alargamento do sistema ventricular, ou hidrocefalia *ex vácuo*, e por vezes encolhimento, atrofia e/ou palidez da matéria branca subcortical [4].

As lesões microscópicas que são conhecidas por se acumularem no sistema nervoso central (CNS) (maioritariamente no córtex cerebral, por vezes no profundamente no meio da matéria cinza, cerebelo e tronco cerebral) de indivíduos com AD pode, quando proeminentes e numerosas, serem identificadas secções rotineiras do cérebro; contudo, são facilmente demonstradas por técnicas de impregnação de prata e métodos imunohistoquímicos de incorporação de anticorpos primários em proteínas depositadas no cérebro [4].

A autópsia detalhada - ou menos comum, o exame do cérebro por biópsia neuropatológica - continua a ser considerada o padrão para o diagnóstico de demências, incluindo AD. A correlação clinicopatológica cuidada, isto é, a tentativa de explicar complexos sintomas neurológicos, normalmente numa fase final do CNS por examinação do cérebro por autópsia, era o pilar da pesquisa de demência, durante a década de 1970 [4].

Questões éticas estão associadas com a AD, que surgem da discussão entre o princípio de não magoar (princípio da não-maleficência) nesta população vulnerável e o desenvolvimento de tratamentos efetivos (princípio do benefício). Problemas de autonomia e capacidade são igualmente numerosos, amplos e preocupantes: primeiro, tarefas diárias, como conduzir em segurança e gastar sabiamente o dinheiro; segundo, eventos de vida, como designar um representante legal, em caso de incapacidade, fazer um testamento; terceiro, autorizar procedimentos de diagnóstico e tratamentos; e quarto, participar numa pesquisa. O impulso de proteger doentes com AD levou a regulações éticas e políticas, tornando a investigação em pacientes incapacitados mais difícil, devido requerimentos rigorosos de consentimento informados e assinados ou mostrar a importância da investigação para aquela população específica de utentes [12].

Os debates éticos até 2005 focavam-se: 1) divulgação do diagnóstico de demência e as suas consequências (estigma, discriminação); 2) os custos/benefícios de fármacos sintomáticos para etapas iniciais a moderadas da demência; 3) a eficácia desses fármacos em estágios graves da doença e os critérios clínicos para parar o seu uso; 4) o uso de placebo em ensaios clínicos randomizados para novos fármacos; 5) a competência de pacientes com demência para consentir a pesquisa e terapia em geral; e 6) terminação dos cuidados médicos [12].

A descoberta de compostos para atrasar o desenvolvimento e progresso da AD é a tarefa imperativa de agências federais e companhias farmacêuticas [11]. As terapias correntes para

a AD e essencialmente para todas as outras doenças neurodegenerativas são baseadas na reposição de neurotransmissores, as quais são conceptualmente baseadas no desejo de replicar o milagre da terapia da *L*-dopa na doença de Parkinson. Estas terapias, como a colinérgica para a AD, não tentam alterar a patogénese da doença e, tal como a *L*-dopa, provavelmente têm pouco ou nenhum efeito nesse processo. As terapias em geral sofrem de três défices: primeiro, permitem o progresso do processo subjacente da doença; segundo, admitem que a vulnerabilidade da doença é seletiva; e terceiro, esperar que o aumento da eficácia sináptica seja satisfatório para mimetizar a transmissão sináptica que ocorre no cérebro sem patologias. É importante mencionar que estes défices não são direcionados pela terapia de genes e abordagens de células estaminais, cujas bases fisiofísicas são similares às terapias convencionais baseadas nos transmissores [13] .

Na década de 1970, investigadores da Grã-Bretanha descobriram o défice de acetilcolina no cérebro com AD, liderando o desenvolvimento da estratégia terapêutica de inibição da acetilcolinesterase (AChE). Esta enzima desempenha funções nas sinapses colinérgicas, cessando a neurotransmissão pela hidrólise rápida da acetilcolina. Apesar desta estratégia formar a base das medicações, foram necessários quase 20 anos para o primeiro inibidor da AChE ser aprovado [11,14].

O inibidor da AChE fisostigmina foi aplicado em 1876 no tratamento de glaucoma sendo, na altura, desconhecido o seu mecanismo de ação. Mais tarde, este tipo de inibidor foi usado como pesticida [1]. Os fármacos atualmente aprovados para o tratamento de AD têm como alvo os neurotransmissores alterados na AD interferindo no sistema colinérgico (Ex: donepezil, rivastigmina e memantina) ou no sistema glutamatérgico (memantina) [8].

Atualmente, são 5 os fármacos aprovados pela FDA e/ou *US Food* para o tratamento das manifestações cognitivas de AD, os AChEIs (inibidores da AChE) rivastigmina, donepezil, galantamina e tacrina e o antagonista de recetores NMDA memantina [6,8]. Cada fármaco atua de forma diferente para impedir a clivagem da acetilcolina. A tacrina é raramente prescrita por apresentar sérios efeitos hepáticos secundários. Em geral, a galantamina (Reminyl®), a rivastigmina (Exelon®) e o donepezil (Aricept®) são os mais eficazes quando o tratamento começa nas fases iniciais. A memantina (Namenda®) é o único fármaco que mostra eficácia em fases mais tardias da doença. Todos mostraram abrandar a progressão dos sintomas cognitivos e reduzir os problemas comportamentais de algumas pessoas, mas pelo menos metade das pessoas sujeitas a este tratamento não responde ao mesmo. Estas estratégias apenas atrasam a progressão de sintomas associados com AD [6].

Assim como a hipótese colinérgica, a hipótese da proteína tau, do péptido amiloide B (A β) e da inflamação explicam a doença, figura 1. A hipótese mais considerada nas últimas duas décadas, a do péptido A β , não explica, no entanto, a complexidade da patofisiologia desta doença incapacitante. Estudos recentes destacaram o papel dos oligómeros de A β no dano

sináptico, sugerindo que estes são danos, entre diversos outros, envolvidos na destruição da integridade das funções cerebrais [6].

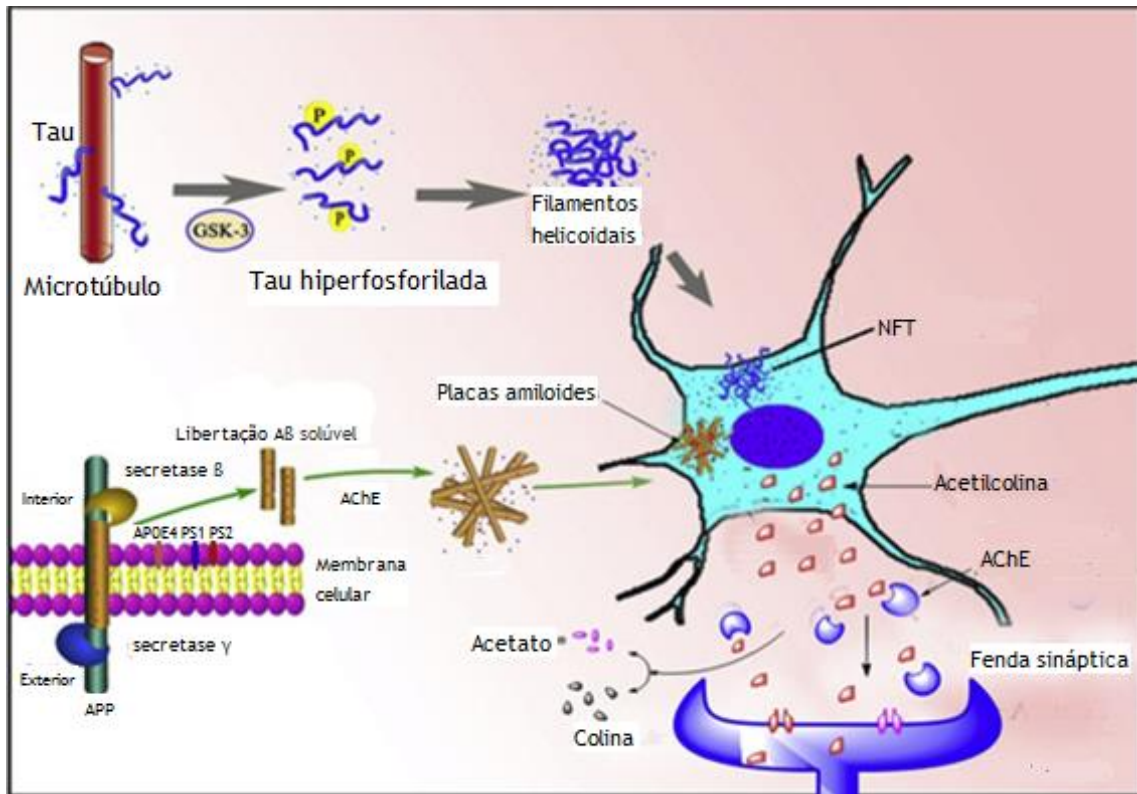


Figura 1- Representação esquemática da patogênese da AD, com foco nas hipóteses colinérgica, amiloide e tau [1].

Dados da literatura demonstram que os AChEI exercem um efeito colinérgico no metabolismo da proteína precursora amiloide (APP), influenciando um dos mecanismos mais relevantes para a patogênese da doença. Foi comprovado em fatias de cérebro cortical superfusado de rato e em culturas de neuroblastoma celular, os AChEIs aumentam a liberação de sAPP α , o produto não-amiloidogénico do processamento da APP, em proporção com grau de inibição dos AChEIs. Outro estudo sugere que os AChEIs, na dose comumente administrada clinicamente, modificam o processamento da APP celular periférico. De facto, em pacientes com AD, o decréscimo da taxa de formação da APP é reduzido a valores normais, por terapia de um mês com AChEIs [15].

Além de inibidores da AChE, outras terapias são usadas no tratamento da AD, incluindo terapias baseadas na Tau, lidando com o stress oxidativo, tendo como alvo o balanço de Ca²⁺, terapias anti-inflamatórias, estratégias centradas na amiloide, como inibidores da β -secretase e moduladores da γ -secretase. Os inibidores da β -secretase causam a redução dos níveis de A β e bloqueiam os passos *downstream* na patogênese da AD. Os moduladores da γ -secretase

reduzem seletivamente a produção de Aβ42 sem afetar o nível total de Aβ. No entanto ainda nenhuma destas terapias está disponível comercialmente [1].

1.1.1. Acetilcolinesterase

A perda de neurónios colinérgicos no prosencéfalo basal está associada aos défices de memória e aprendizagem na AD. A disfunção do sistema colinérgico na AD ocorre a vários níveis, incluindo a diminuição dos níveis de atividade da AChE, absorção de colina reduzida, diminuição da síntese de acetilcolina e níveis alterados dos recetores da acetilcolina (AChRs) [7]. Do sistema colinérgico do prosencéfalo basal consistem largos neurónios, que se estendem desde o septo medial, pela banda diagonal de Broca, até ao núcleo basal de Meynert (nbM). Os neurónios localizados no septo medial e no membro vertical da banda diagonal inervam predominantemente do hipocampo e córtex cingulado, respetivamente, enquanto os neurónios da nbM caudal inervam do neocortex e da amígdala. Existem evidências em estudos com *in vivo* (ratos), que os neurónios colinérgicos do prosencéfalo sofrem alterações atróficas e degenerativas com a idade [2].

Os neurónios colinérgicos possuem uma capacidade metabólica única, contribuindo para a sua vulnerabilidade, tanto na AD, como no envelhecimento. Estes neurónios usam colina para dois propósitos: 1) eles fosforilam-na em fosfocolina, que posteriormente é transformada em fosfatidilcolina membranar e 2) acetilam-na no neurotransmissor acetilcolina. Wurtman propôs que o envelhecimento e o AD podem estar relacionados com o decréscimo da captação de colina pelos neurónios. Os neurónios colinérgicos, quando privados de colina, utilizam a colina presente nas membranas fosfolipídicas, promovendo como resultado a sua morte. As alterações provocadas na composição da membrana podem aumentar a conversão APP a amiloide anormal [2].

Evidências diretas que suportam que a hipótese colinérgica é responsável por disfunções comportamentais são obtidas com tratamentos que aumentam a função colinérgica, como o uso de fármacos colinérgicos ou por transplantação neural de tecido fetal na região desaferentada no córtex (estudos animais). O primeiro tipo de abordagem tem sido extensivamente aplicado em sujeitos envelhecidos. Contudo, este tratamento também melhora a performance de jovens, que não demonstram níveis de acetilcolina reduzidos. Esta observação sugere que sujeitos envelhecidos podem simplesmente mostrar melhoramentos comportamentais, que não estão relacionados com o declínio colinérgico presente em idades avançadas [2].

Estudos do efeito da acetilcolina no córtex sensorial normal, sugere que esta tem um papel neuromodelador. Na presença de acetilcolina, a resposta neuronal a estímulos aferentes é favorecida e a relação sinal-ruído aumenta. Assim, sem atividade de fundo significativa, a acetilcolina tem mostrado aumentar as respostas de neurónios corticais somato-sensoriais,

por estímulo táctil e aumentado a relação sinal-ruído na resposta aos estímulos visuais, por parte dos neurónios corticais visuais [2].

A descoberta da deficiência colinérgica no córtex de pacientes, recorrendo à biópsia cerebral, assim como autópsia, levou a inúmeros ensaios clínicos randomizados, com o objetivo de aumentar os níveis de acetilcolina. A tacrina foi o primeiro agente terapêutico no campo da AD, seguido de outros inibidores de colinesterases, donezepil, galantamina, rivastigmina, desde início da década de 1990 [12].

Os AChEIs aumentam a neurotransmissão colinérgica, através da inibição da AChE, diminuindo a destruição de acetilcolina. Também é claro que existe um aumento da transmissão colinérgica quando os recetores colinérgicos são ativados. Os AChRs são expressos em interneurónios inibitórios, ambos pré e pós-sinápticamente na maior parte do hipocampo e, assim, aumentar os níveis de acetilcolina na fenda sináptica pode apresentar influências bidirecionais. A transmissão colinérgica participa também nos mecanismos envolvidos na neurogênese adulta e estudos sugerem que AChEIs aliviam o stress oxidativo, tanto em estudos *in vivo* e em humanos. Vários ensaios curtos com monoterapia AB mostraram que melhoramentos aparentes na função cognitiva baixaram o ritmo do declínio funcional ou pioramento clínico comparado com placebo e reduziram os sintomas comportamentais em pacientes com AD. Esforços para padronizar eficazmente a entrega de fármacos é outra área em desenvolvimento; sistemas de entrega trans-dérmica para os três fármacos estão desenvolvidas, mas não estão aprovados. A dosagem oral de AChEIs aumenta os níveis plasmáticos do fármaco num curto intervalo, o que pode contribuir para os efeitos gastrointestinais secundários. Os pensos trans-dérmicos asseguram um menor pico nos níveis e entrega prolongada com menores flutuações plasmáticas da concentração do fármaco. Além disso, o perfil de segurança e tolerabilidade dos pensos é melhor. Algumas novas moléculas AChEI estão a ser desenvolvidas. Memogain® é o éster benzoilo da galantamina e é um pró-fármaco disponível na formulação intranasal. A huperizine A é um alcaloide natural isolado da *Huperzia serrata* e possui uma acção inibidora da AChE com efeitos no metabolismo da APP e com neuroprotecção. A modulação direta de AChRs colinérgicos está também em estudo [7].

1.1.2. Proteína tau

A unidade associada à tubulina (*tubulin-associated unit* - Tau) é uma proteína, que representa o principal componente dos emaranhados que caracterizam os neurónios de pacientes com AD [16]. Esta proteína foi isolada por Mar Kirschner em 1975, na procura de fatores promotores da montagem de microtúbulos (MTs) [17, 18]. Posteriormente, foi bioquimicamente caracterizada e descobriu-se que é regulada juntamente com a tubulina durante a diferenciação neuronal [18]. Entre 1975 e 1988 o foco do estudo desta proteína mudou de uma proteína associada aos microtúbulos, para um componente dos filamentos helicoidais presentes na AD. [17]. Doenças neurodegenerativas associadas com a tau, que forma filamentos anormais, são conhecidas como taupatias, como a AD [19]. Esses filamentos

podem formar agregados maiores ordenados, os emaranhados neurofibrilares, em neurónios ou outras células cerebrais [20]. É aceite, de forma geral, que as taupatias são resultantes do aumento da quantidade de tau ou das suas. O aumento da quantidade de tau está comprovado na AD. Existem várias modificações pós-translacionais da tau, como fosforilação, acetilação, truncamento, glicosilação, ou glicação, capazes de resultar em toxicidade [17].

No sistema nervoso central dos mamíferos, a tau é composta por seis isoformas diferentes, produzidos por mecanismo de *splicing* alternativos [17, 18]. Três dessas isoformas contêm três cópias das repetições imperfeitas de 31 aminoácidos, que constituem o domínio de ligação ao microtúbulo (tau 3R), enquanto as outras três isoformas contem quatro repetições de tau (tau 4R). A função melhor conhecida *in vivo* da tau é a estabilização dos microtúbulos. A tau 3R (um estabilizador mais fraco que a tau 4R) é mais rapidamente expressa a elevados níveis que a tau 4R em células proliferativas não neuronais. Assim, a tau está presente em células neuronais, não proliferativas e diferenciadas [17, 20-22].

A regulação da função da tau é conseguida através de modificações pós-translacionais, principalmente fosforilações em diversos sítios. A tau possui 85 resíduos fosforiláveis. Devido à sua estrutura *unfolded*, diversos desses sítios podem ser fosforilados. Estes sítios são enriquecidos na AD-Tau e por serem reconhecidos por múltiplos anticorpos, possuem valor no diagnóstico. Com algumas exceções, os efeitos destes sítios fosforiláveis na função da tau são ambíguos [18].

O aumento da fosforilação da tau reduz a sua afinidade para os microtúbulos, provocando a instabilidade do citoesqueleto neuronal. Um gradiente de concentração de tau existe ao longo do axónio dos neurónios maduros, com maiores níveis na sinapse, onde pode bloquear a ligação de proteínas motoras e favorecer a libertação da sua carga. A fosforilação da tau pela GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*) em resíduos específicos modula a depressão a longo prazo [17].

Também já foi demonstrado que a tau é extensivamente modificada pós-translacional pela acilação lisínica, resultando na perda da função da tau e promovendo agregação patológica [17].

Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar a polarização da tau, e são subdivididos em mecanismos baseados no RNA e baseados em proteínas. O mecanismo baseado em RNA postula o transporte preferencial do mRNA da tau em axões mediados pelo sinal de localização axonal da região 3'-não traduzida (UTR). Outro modelo, do mesmo mecanismo, é o transporte preferencial da mRNA tau em ribossomas em axónios com oligopirimidina 5'-UTR, que medeia a síntese da proteína mTOR dirigida a em axónios em desenvolvimento [18].

Os mecanismos baseados em proteínas postulam 1) degradação preferencial da tau em compartimentos não axonais; 2) estabilização em neurónios; ou 3) retenção da tau em axónios por uma barreira entre axónio e soma. Microinjecções de tau marcada em neurónios sugeriu a degradação da tau em compartimentos específicos. Inicialmente a tau é distribuída por todos os compartimentos celulares, mas após 4 dias a tau marcada só está presente em axónios. Estes resultados podem ser explicados por interações diferenciais com as vias de degradação (proteosoma, autofagia) ou vias de folding (chaperonas). A estabilização axonal da tau ou retenção em axónios pode explicar a elevada afinidade dela para MTs axonais e baixa afinidade para MTs dendríticos, demonstrados em células permeabilizadas fixadas [18].

Em cérebros de pacientes com AD, o caminho de propagação da agregação patológica da tau é altamente característico, seguindo um caminho anatomicamente definido, desde o córtex entorrinal até ao hipocampo e no córtex límbico e associados, o que se correlaciona com o estado cognitivo do paciente. A acumulação da tau anormal é mediada pelo espalhamento da proteína de célula para célula, envolvendo espécies de tau extracelulares como o maior agente da propagação interneuronal de lesões neurofibrilares e espalhamento da toxicidade da tau pelas diferentes áreas cerebrais [17, 23].

A presença da tau em sinapses, em cérebros saudáveis, sugere um papel na regulação da função sináptica normal, enquanto na neurodegeneração a toxicidade sináptica da tau aparenta estar relacionada com formas solúveis e não agregados insolúveis. A medição de níveis de tau sináptica em frações de sinaptossomas, de cérebros com AD, *post mortem*, mostrou que a tau está normalmente localizada nos terminais sinápticos corticais e que a clivagem da tau pode facilitar a agregação e secreção de compartimentos pré-sinápticos [17].

A perda de função da tau pode resultar da acumulação de ferro em neurónios específicos, pelo que o uso terapêutico de um quelante de ferro, o clioquinol, foi proposto. Contudo, como referido, as taupatias são frequentemente as consequências de: 1) aumento do nível da proteína; 2) aumento de modificações pós-translacionais; 3) aumento da agregação; ou 4) alteração da taxa tau 3R/4R em algumas populações específicas de neurónios. MicroRNAs estão ligados a processos neurodegenerativos e a sua desregulação contribui para a neurotoxicidade da tau [17].

1.1.3. Proteína precursora amiloide

A função fisiológica precisa da APP é desconhecida. Em muitos estudos, a sobreexpressão de APP mostra um efeito positivo na saúde e crescimento celular. Esta proteína é produzida em elevadas quantidades nos neurónios e rapidamente metabolizada. A sua proteólise pela via amiloidegénica resulta na formação do péptido A β . A primazia da APP no desenvolvimento da AD depende da toxicidade do péptido A β , porque a evidência não mostra que a perda de

função da APP é deletéria. Em adição, a toxicidade AB também explica outros aspetos patológicos da AD incluindo emaranhados neurofibrilares, inflamação e danos oxidativos [10].

De acordo com a hipótese APP, esta é normalmente clivada pela α -secretase e processada anormalmente pelas γ - e β -secretase, resultando no desequilíbrio entre a produção e remoção do péptido AB [6]. A γ -secretase é um complexo com grande peso molecular, de quatro proteínas (preselina 1 e ou 2, nicastrina, APH1, PEN2) que liberta o péptido AB da APP e especifica o seu comprimento, ou com 40 ou com 42 aminoácidos (figura 2) [11]. Como consequência, estes péptidos agregam-se espontaneamente em oligómeros solúveis e formam fibrilas insolúveis, em folha-beta, que são eventualmente depositadas em placas difusas e senis. Os oligómeros AB42 são produzidos por atividades cooperativas dos neurónios e estão associados a astrócitos. Estes oligómeros induzem danos oxidativos, promovem a hiperfosforilação da tau, resultando efeitos tóxicos nas sinapses e nas mitocôndrias. Os agregados de AB42 são considerados por serem responsáveis degeneração neuronal e vascular, em cérebros com AD [6, 11]. Isto resulta em stress oxidativo, uma situação na qual os oligómeros são particularmente suscetíveis, devida ao conteúdo reduzido de glutatona e eles tem um elevado conteúdo de ferro, impedindo assim a habilidade de captar os radicais de oxigénio. Os oligómeros AB42 possuem uma capacidade acrescida para danificar membranas ricas em colesterol, como as encontradas na mielina [6].

O péptido AB solúvel consegue controlar a clivagem e fosforilação da tau, ambas cruciais para os emaranhados neurofibrilares (NFT). A fosforilação da tau é regulada por diversas cinases, incluindo a GSK3 β e cdk5, que são ambas ativadas por AB extracelular. As vias que conduzem à clivagem da GSK3 β , caspase3, caspase9, e capaína são ativadas por formas solúveis de AB. Também se supõe que a tau é um mediador *downstream* da toxicidade do AB. Ao reduzir os níveis de AB por imunoterapia, previne-se a patologia da tau de se desenvolver e anula os problemas de memória espacial [10].

A remoção dos oligómeros AB42 do cérebro pode ocorrer por diversas vias, incluindo degradação proteolítica, pelas proteases neprilisina e enzima de degradação da insulina, absorção por astrócitos e microglia, fluxo passivo para o líquido cefalorraquidiano e sequestração para o compartimento vascular pela forma solúvel do LRP1 [6].

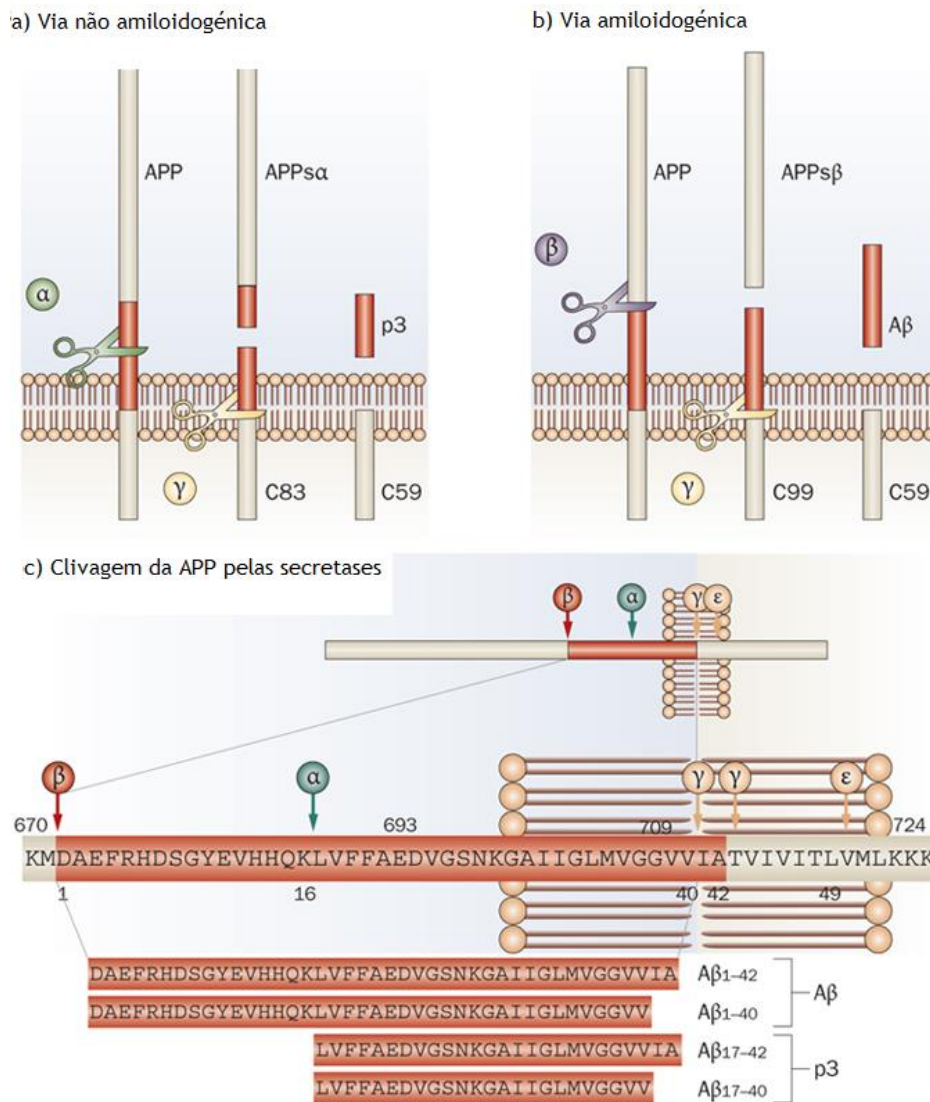


Figura 2- Processamento da APP pelas secretases [24].

1.1.4. Apolipoproteína 4

A APOE humana é uma lipoproteína de 299 aminoácidos com dois domínios estruturais. O domínio N-terminal contém a região de ligação ao recetor e o domínio C-terminal contém a região de ligação ao lípido. Está localizada no cromossoma 19q13 e codifica três isoformas: APOE2, APOE3 e APOE4, que diferem somente nos resíduos 112 e 158, e que exercem um enorme efeito na estrutura e função da APOE a nível molecular e celular e estão associadas com condições neuropatológicas [5, 25].

A APOE é expressa em inúmeros tecidos, com maior expressão no fígado, seguido pelo cérebro. No cérebro, os astrócitos são reconhecidos como a fonte primária da APOE, apesar desta ser também sintetizada por microglia e neurónios. No CNS, a APOE redistribui lípidos gerados após degeneração neuronal, para células que necessitam de lípidos, para proliferação, reparação membranar ou remielinização de novos axónios [5].

A APOE4 é a isoforma com maior risco de AD e a APOE2 tem efeito protetor contra a doença. Um alelo da APOE4 muda o risco da curva da doença para 5 anos mais cedo, duas cópias da APOE4 muda para 10 e uma cópia do alelo da APOE2 muda para 5 anos mais tarde [5]. Ou seja, indivíduos homocigóticos para APOE4 têm maior risco de desenvolver AD, assim como AD precoce, do que indivíduos heterocigóticos [26].

Apesar de ser aceito que a APOE4 participa na doença, o mecanismo pelo qual exerce o seu efeito ainda é controversa. A APOE4 é mais suscetível a clivagem proteolítica que APOE3, resultando na formação de fragmentos neurotóxicos [5, 26]. O seu efeito na doença pode também estar relacionado, entre outras hipóteses, com a sua função de manutenção e reparação na membrana celular, depósito e eliminação de Aβ, e/ou provável participação na fosforilação da tau [26]. Experiências com APP humana em ratos transgênicos expressando a APOE3 e APOE4 humanas demonstraram um efeito de dose dependente do gene e efeito dependente da isoforma de APOE na acumulação de Aβ (APOE4>APOE3>APOE2). O aumento da deposição de Aβ fibrilar ocorre concomitantemente com a diminuição dos níveis de Aβ42 do fluido cérebrospinal (CSF), suportando que a APOE4 promove a deposição de Aβ no cérebro [5, 26], ver figura 3.

Também está comprovado que a APOE afeta as alterações neurológicas em cérebros com AD *in vitro* e em modelos animais. A APOE3 pode inibir a hiperfosforilação anormal e destabilização do citoesqueleto neuronal na AD, enquanto a forma truncada do C-terminal da APOE4 é neurotóxica e estimula a fosforilação da tau, resultando em preNFTs, contudo estudos humanos da relação entre APOE e tau mostram resultados contraditórios. O genótipo da APOE parece interagir com biomarcadores presentes no CSF na AD, nos níveis de tau e de tau fosforilada. Os transportadores da APOE4 são consistentemente encontrados com mais tau, tau fosforilada e razão tau/Aβ, a cada fase da doença [5].

Está estabelecido que a neuroinflamação contribui para a neuropatogênese da AD e que a APOE modula respostas inflamatórias e imunológicas, de forma dependente da isoforma, (APOE4>APOE3>APOE2). Apesar da APOE3 ser crítica na supressão inflamatória, a APOE4 está associada ao fenótipo imune pró-inflamatório hiperativo. Um estudo humano demonstrou que o genótipo APOE está relacionado com os níveis de biomarcadores inflamatórios plasmáticos (APOE4>APOE3>APOE2). Intervenções anti-inflamatórias na AD mostra maior benefício em transportadores APOE 4, em oposição a não transportadores [5].

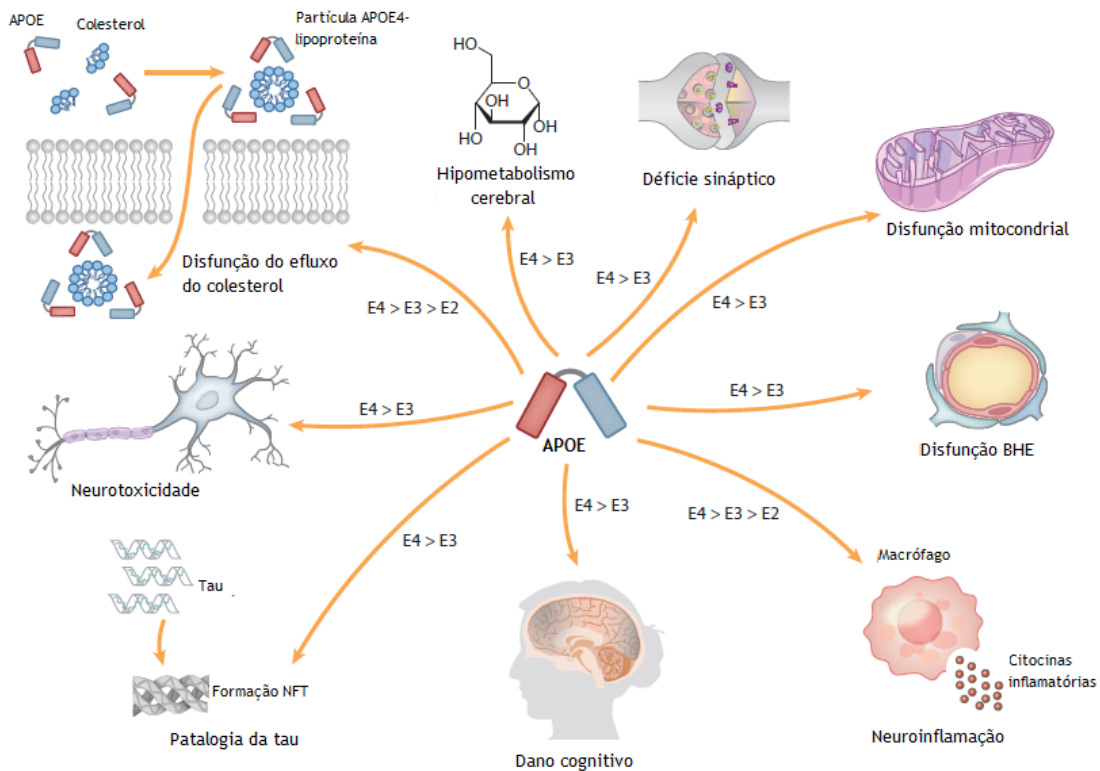


Figura 3- Esquema da participação da APOE na patogênese da AD, dependente do AB. Os efeitos dependentes das isoformas da APOE estão indicados [5].

1.2. Esteroides

Os esteroides são compostos que ocorrem naturalmente, nos quais se incluem os esteróis, ácidos biliares, algumas hormonas, glicosídeos cardíacos, saponinas e alcaloides [27]. Estes compostos podem ser classificados consoante a sua composição química, consoante o número de átomos de carbono existentes. Por exemplo, a classe ergostano possui 28 átomos de carbono, a colestano 27 átomos, a colano 24 átomos, a pregnano 21, a androstano 19 e a estrano 18. O núcleo esteroide tetracíclico com 17 carbonos e sem cadeia lateral chama-se gonano (figura 4) [28].

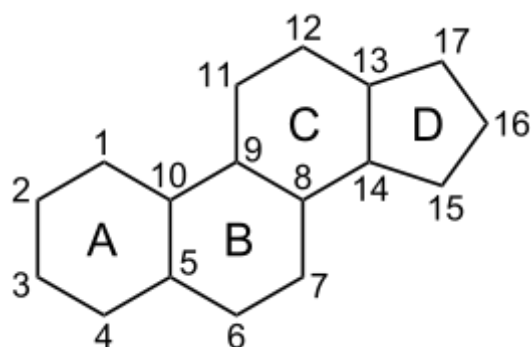


Figura 4- Núcleo esteroide gonano.

A modificação estrutural dos esteroides permite modular uma variedade de efeitos fisiológicos, levando ao foco de aplicação de esteroides em diversas terapias [29]. O uso primário destas substâncias nos cuidados de saúde é para a redução de inflamação e outros sintomas de doenças [28]. Uma classe de esteroides que desperta o interesse de cientistas são os neuroesteroides, que são esteroides neuroativos. Está comprovado que este grupo de esteroides atua nos recetores das células membranares, sendo os seus alvos principais recetores de alguns neurotransmissores (Ex: GABA). Atualmente existem três obstáculos principais para o uso desta classe de esteroides: 1) barreira hematoencefálica (BHE), que pode impedir a sua ação no cérebro; 2) a baixa solubilidade em água; e 3) o seu metabolismo rápido. O problema da solubilidade pode ser resolvido com a introdução de substituintes polares [30].

1.2.1. Esteroides inibidores da acetilcolinesterase

1.2.1.1. Inibidores de origem natural

Sarcococca é um género de planta, da qual vários esteroides têm sido isolados e estudados pela sua atividade biológica inibitória da AChE. Estes esteroides apresentam um esqueleto do tipo pregnano ligados a mono ou demetilaminas, na posição C-3 e/ou C-20. Os compostos mais potentes encontrados são hookerianamida H, axilaridina A e sarsalignenona (compostos 1-3, respetivamente), com IC_{50} de 2,9, 5,2 e 5,8 μM , respetivamente. Estes esteroides também possuem o grupo cetona em C-4. Além da presença do grupo amino em C-20, a densidade de electrões em C-3 e C-4 favorece o aumento da atividade inibitória pretendida [31-38].

Os *withanolides* são um grupo de esteroides naturais com esqueleto ergostano, no qual C-22 e C-26, ou C-3 e C-26 são oxidados para formar uma lactona. Na avaliação da sua actividade inibitória da AChE destacou-se um composto (composto 4) que revelou IC_{50} de 5,2 μM . Este possui um álcool em C-6 beta [39-41].

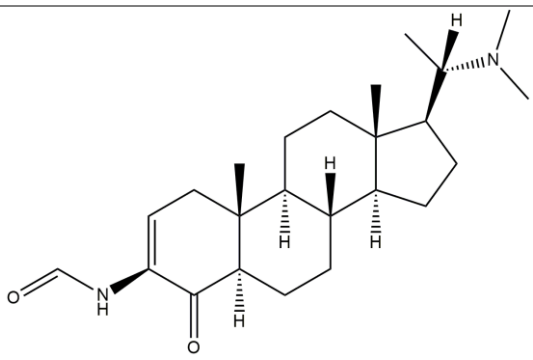
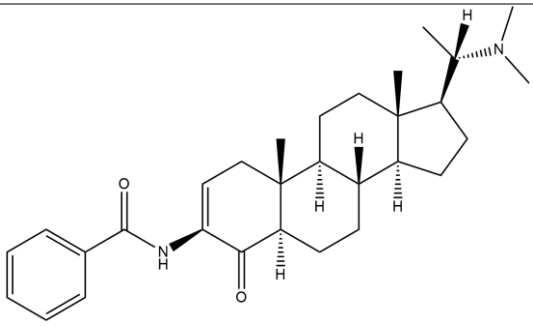
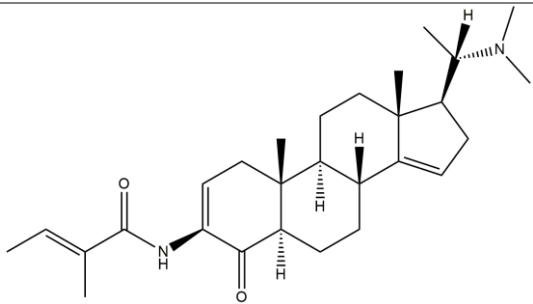
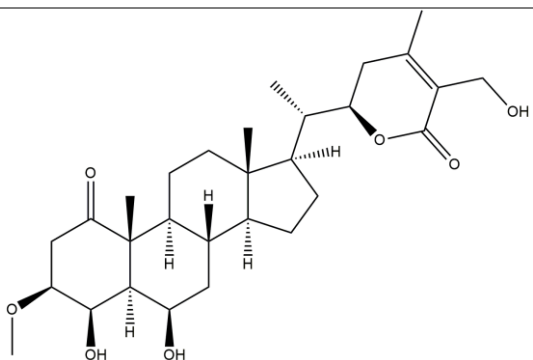
Um ensaio realizado com sistostanos naturais com um ou mais grupos álcoois e uma ou mais ligações duplas, revelou dois compostos ativos, haloxysterol B e haloxysterol C (compostos 5 e 6), com IC_{50} de 0,89 e 1,0 μM , respetivamente. Ambos os esteroides possuem átomos de oxigénios, em grupos cetona ou álcool, e duas ligações duplas [42].

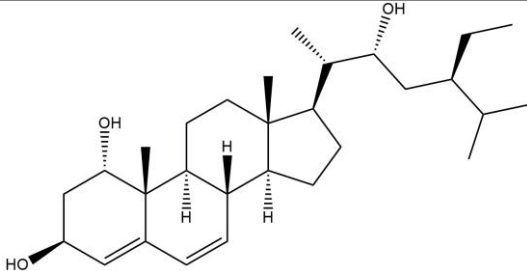
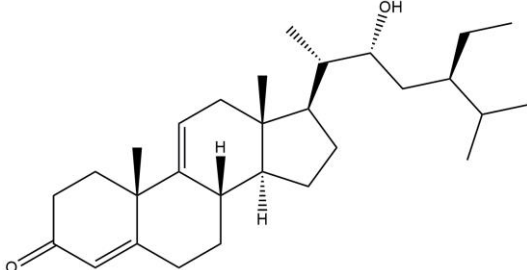
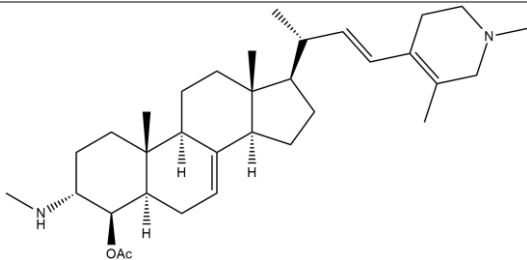
Um esteroide isolado numa esponja, 4-acetoxi-plakamina B (composto 7), possui IC_{50} de 3,75 μM . O composto 7 tem uma monometilamina em C-3, um grupo acetiloxi em C-4 e porção piperidinilo em C-23 [43].

Finalmente, foi investigado um grupo de esteroides como potenciais inibidores da AChE, que estruturalmente continham um substituinte mono ou dimetilamino em C-3 e um anel pirrolidina no anel D, ligado pelos C-13 e C-17. As atividades registadas foram superiores a 50

μM , demonstrando a importância da presença do átomo de azoto em C-20 para a atividade biológica pretendida [44].

Tabela 1- Esteroides de origem natural inibidores da AChE.

Composto	Estrutura	IC50(μM)
1		2,9
2		5,2
3		5,8
4		5,2

5		0,89
6		1,0
7		3,75

1.2.1.2. Inibidores semissintéticos

Os investigadores Guofei Jin e colegas fizeram modificações estruturais para aumentar a atividade de esteroides como AChEIs: 1) introduzir 2-4 átomos na cadeia lateral, permitindo aos inibidores movimento ao longo da cavidade da AChE e 2) introduzir anéis aromáticos, que podem formar ligações π - π . Assim, primeiro foi substituído um grupo metilo da dimetilamina, por um etilo; e segundo foi adicionado ao etilo diferentes substituintes ariloxil, em esteroides com esqueleto de conessina (figura 5). Deste grupo, todos os compostos obtiveram um IC_{50} experimental inferior a $3,90 \mu M$, sendo $0,11 \mu M$ o valor mais baixo obtido (composto 9) [45].

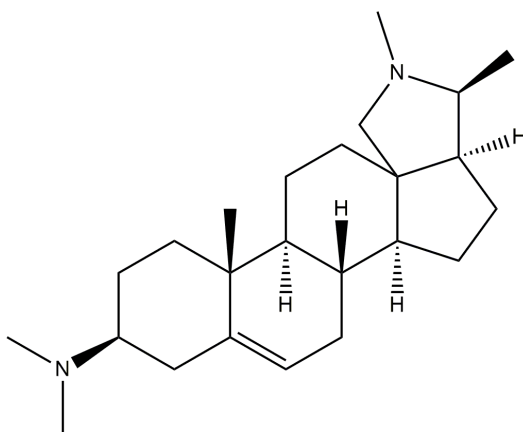


Figura 5- Composto 6, estrutura da conessina.

Uma série de espirotiazolidinonas foram sintetizadas a partir de cetonas esteroides e, juntamente com os compostos intermediários de síntese, foram avaliados biologicamente. Neste grupo, todos os compostos demonstraram IC_{50} inferior a $50 \mu M$, possuindo o composto 10, o mais potente, IC_{50} de $0,35 \mu M$. Este esteroide tem na sua estrutura um grupo OAc em C-3 e fração tiazolidina em C-7 [46].

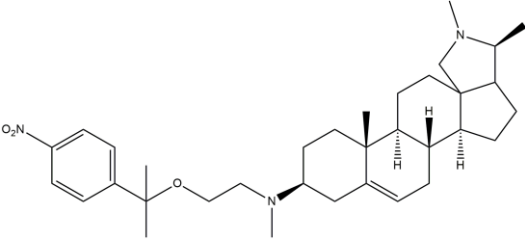
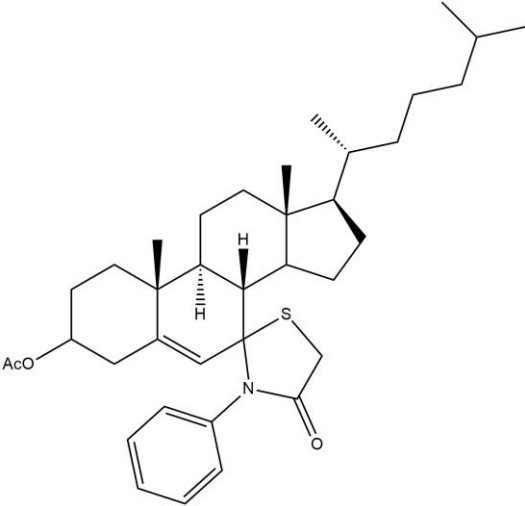
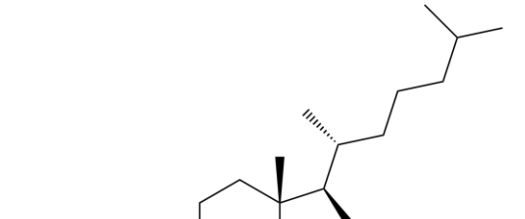
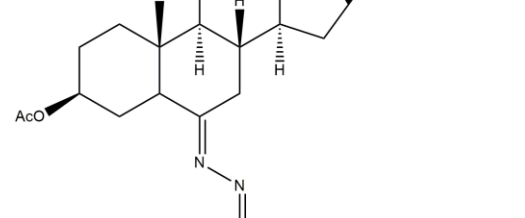
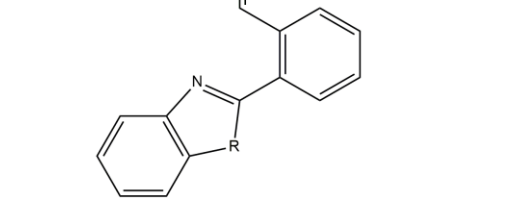
Esteroides cíclicos, derivados do colestano, foram também sintetizados. Estes compostos possuíam um grupo iminohidrazonometilfenil em C-6, ao qual se ligou um benzotiazole, benzimidazole ou benzoxazole, enquanto se varia o substituinte em C-3 com OAc, Cl ou H. Nesta série de compostos, independentemente do heterocíclico ligado ao composto sintetizado, os mais ativos apresentavam o grupo OAc em C-3. No ensaio enzimático observou-se que os três compostos (11-13) com o OAc em C-3 apresentaram os seguintes IC_{50} $0,31$, $0,37$, $0,39 \mu M$ [47].

Recorrendo a cetonas α,β -insaturadas, foi preparado um conjunto de 1,5-benzotiazepinas esteroides, com diferentes substituintes em C-3. Destes, o composto (14) foi o que revelou maior potencial inibitório, IC_{50} de $0,31 \mu M$, e apresentava o grupo 1,5-benzotiazepina em C-5 e C-7 e um OAc em C-3. Os compostos com átomos de hidrogénio em C-3 revelaram-se os menos potentes [48].

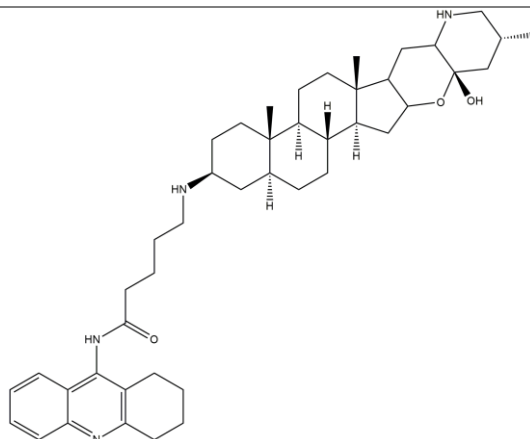
Para sintetizar uma série de novos compostos, Thibaut Sauvaître e colegas partiram de um esteroide natural, com um grupo amina em C-20 e álcool em C-16. Para a posição C-3 foi-se alternando o substituinte, com diferentes heterocíclicos ou amidas, e na posição C-4 variou-se entre aminas ou álcoois. Os dois compostos mais promissores (15 e 16), com IC_{50} de $0,018$ e $0,014 \mu M$, diferem no comprimento da cadeia carbonada, e têm uma tetrahidropirimidina em C-3 [49].

A solanoscapsina (composto 17) é um composto natural com IC_{50} de $3,22 \mu M$, que tem na sua estrutura amina e hemicetal como substituintes. Este composto foi usado como base para a síntese de novos compostos, para melhorar a sua ação como AChEI. De todos os derivados da solanoscapsina, somente dois compostos (18 e 19) cumpriram o objetivo, obtendo IC_{50} de $1,56$ e $0,090 \mu M$, sendo que o primeiro apresenta um grupo xanteno e o segundo o inibidor tacrina, ligado por uma cadeia carbonada à amina em C-3 [50].

Tabela 2- Esteroides semissintéticos inibidores da AChE.

Composto	Estrutura	IC50 (µM)
9		0,11
10		0,35
11 R= S		0,31
12 R= O		0,37
13 R= NH		0,39

14		0,31	
15	R= iPr		0,018
16	R=(S)-(CH3)CH(C2H5)		0,014
17			3,22
18			1,56



1.2.1.3. Relação estrutura atividade

Estudos 3D-QSAR, obtidos e validados com um modelo CoMFA permitiram identificar regiões espaciais nas moléculas esteroides onde a alteração de substituintes provoca aumento ou diminuição da atividade biológica neste âmbito. Assim, foi observado que a substituição em C-4 e na cadeia ligada a C-3 existe uma zona em que a presença de maior densidade eletrônica aumenta a atividade inibitória, assim como uma dupla ligação entre C-5 e C-6 (figura 6). Contudo, grupos grandes em C-3 e C-4 e pequenas zonas com densidade negativa em C-2 diminuem a atividade. A região entre C-14 e C-15 também não é favorecida por substituinte volumosos [51, 52]. Neste estudo, verificou-se que a cadeia lateral em C-17 não afeta significativamente a atividade [33, 46]. Estes dados comprovam-se tanto com as estruturas dos esteroides isolados da *Sarcococca* testados por atividade inibitória contra a AChE, em que a presença de átomos de azoto em C-3 e/ou em C-20 é fundamental para a sua potência, como pelas estruturas apresentadas nas tabelas 1 e 2, que têm densidade eletrônica em C-3 e/ou C-4, conferidas por átomos de azoto ou oxigênio e não apresentam substituições em C-14 ou C-15 [1, 34, 51].

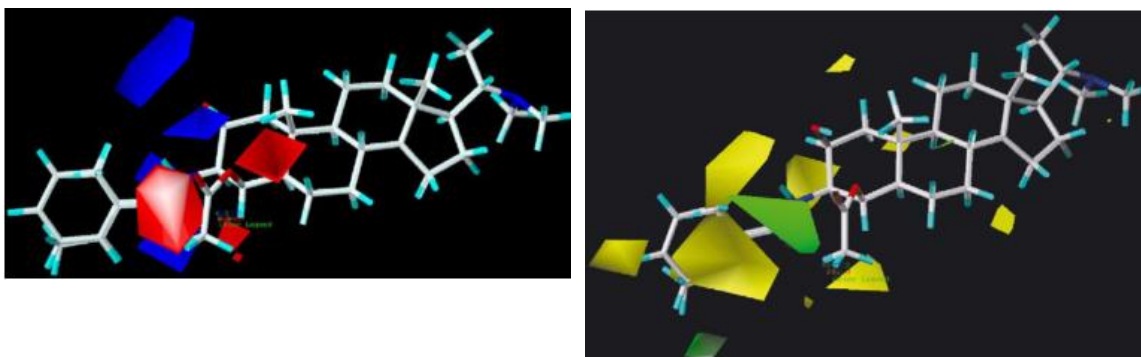


Figura 6- Mapa do modelo CoMFA com as contribuições electroestáticas e estereoquímicas. As zonas vermelhas indicam áreas cuja densidade negativa favorece a atividade. As zonas azuis indicam áreas com densidade positiva que promovem a atividade. A cor amarela indica regiões que substituintes volumosos beneficiam a atividade e a cor verde indica o melhoramento da atividade com substituintes pequenos [47].

Estudos de *docking* molecular conduzidos em esteroides alcaloides da *Holarrhea antidysenterica*, revelaram também algumas características SAR relevantes: 1) a eliminação do grupo N-Me da porção pirrolidina fundido no anel D, pelo C-13 e C-17, aumentou a atividade; 2) a clivagem de um ou dois grupos N-Me em C-3 diminui a atividade. Estes resultados demonstram a importância do grupo N,N-dimetil em C-3 e da não existência de grupos substituintes em NH da pirrolidina para a atividade biológica [44].

1.2.2. Reação de Michael

A adição conjugada de nucleófilos a compostos carbonilo α,β -insaturados é uma das mais significantes e úteis na formação de ligações, na química orgânica, conseguida frequentemente com a reação de Michael (aza-Michael na adição de N nucleófilos). [53].

A adição aza-Michael de um azoto nucleófilo, como amina, ião azida, o-benzilhidroxilamina e carbamato, é uma via conveniente para a introdução de uma funcionalidade à base de amina a um β -carbono ligado a um grupo sacador de elétrons. O interesse por este tipo de reação aumentou rapidamente, devido à sua versatilidade evidente. Pode ocorrer com vários N nucleófilos (aminas alifáticas e aromáticas, amidas, carbamatos e azidas) e aceitadores de Michael (enonas, nitrilos insaturados, amidas, sulfonas, fosfanatos, trifluorometilacenos e nitroalcenos) [54, 55]. Geralmente, não é necessário o uso de catalisador numa reação aza-Michael com aminas como nucleófilos. No entanto, em reações aza-Michael entre compostos menos reativos, pode recorrer-se, por exemplo, a ácidos de Lewis metálicos como catalisadores [56].

A reação de aza-Michael é importante para construção da ligação C-N e é frequentemente usada como passo chave na síntese de compostos naturais biologicamente ativos [57, 58]. Heterocíclicos com azoto e os seus derivados têm ampla aplicação em sintéticos, materiais e química biológica, e em resultado a sua síntese e reatividade são compostos de interesse considerável [59]. As moléculas de mais de 90% de todos os fármacos contêm pelo menos um átomo de azoto, e uma em cada sete reações na indústria farmacêutica envolve a formação de uma ligação carbono-azoto [54].

Neste âmbito, os heteroesteroides são frequentemente estudados por químicos medicinais para a descoberta de novos fármacos. A estrutura e aspetos estereoquímicos do núcleo esteroide promovem o interesse de investigadores, por conseguinte, alterações no esqueleto esteroide são realizadas para desenvolver novas entidades químicas (NCE), com potencial para serem novos fármacos no futuro. Adicionalmente, a incorporação de um anel heterocíclico ou heteroátomo na estrutura esteroide afeta as suas propriedades químicas e, normalmente, resulta em alterações úteis para as suas atividades biológicas. Os heteroesteroides compõem uma variedade de compostos com atividade biológica

reconhecida, como por exemplo o finasteride (inibidor da 5α -redutase), o formestano e o exemestano (inibidores da aromatase) [60].

A pregnenolona é uma hormona presente no organismo humano em geral e particularmente no tecido nervoso e vários estudos indicam que alguns dos seus derivados possuem várias atividades biológicas, como anti-inflamatória, anti-asmática, citotóxica, anti-oxidante, antivirais, e anti-dislipidemia [61]. Um dos seus derivados, 16-DPA, tem tido destaque quer nas suas aplicações quer como um *scaffold* versátil e bloco de construção para diferentes potenciais fármacos esteroides [62]. Neste âmbito, a adição de Michael foi descrita com sucesso para este tipo de moléculas, originando compostos com potencial atividade biológica [30, 60-64].

1.3. Descoberta de novos fármacos

A descoberta de fármacos aplica abordagens multidisciplinares para experimentalmente e/ou computacionalmente identificar compostos líder, com aplicações terapêuticas em várias doenças. Neste contexto, a inerente complexidade dos sistemas biológicos é um enorme desafio para os investigadores, uma vez que frequentemente há informação insuficiente requerida para descobrir novos fármacos [65].

As primeiras descobertas de fármacos foram conseguidas por serendipismo, resultando frequentemente da observação de mudanças durante a experimentação animal ou humana. Esta prática tornou-se mais consistente por volta de 1930, devido à proliferação de novas matérias químicas e o crescimento da adoção dos métodos de *screening* fenotípico. O *screening* fenotípico é teste de séries de substâncias (pequenas moléculas, péptidos) com sistemas biológicos, de forma a identificar agentes que induzem o resultado fenotípico pretendido (Ex: inibição da proliferação celular, indução de secreção hormonal) [66].

Com os rápidos avanços na biologia molecular em 1980-90, foi possível criar e testar novas hipóteses de funções biológicas envolvendo genes individuais. O boom de tecnologias genómicas, combinada com estudos genéticos pioneiros em organismos inferiores (vírus, bactéria), encorajou o pensamento de que as funções celulares podem ser totalmente desconstruídas e um alvo biológico individual apontado para determinada aplicação clínica. Assim, compostos para interagir com determinado alvo podem ser desenvolvidos, resultando uma interação terapêutica entre os dois. Com a identificação de mais genes, pelo Projeto do genoma humano, o número de alvos aumentou rapidamente, provocando o desenvolvimento de tecnologias para assistir o processo de identificação do alvo, como gene *knockouts*. Este é o *screening* baseado no alvo, que consiste no teste de séries de substâncias, como um alvo biológico isolado (Ex: proteína molecular), de modo a identificar os agentes que conferem o resultado biológico pretendido (Ex: inibição da atividade catalítica do alvo) [66].

Introduzir um novo fármaco no mercado é um processo dispendioso, em termos monetários, de tempo e humano. A descoberta e desenvolvimento demora cerca de 10-15 anos, com o custo de 800 milhões de dólares americanos, aproximadamente. Inovações em química combinatória, que levou ao crescimento de bases de dados de compostos, auxiliaram na expansão da fase da descoberta de fármacos e no desenvolvimento de *high-throughput screening* (HTS). Apesar disto, o número de NCE lançadas com sucesso no mercado, continua a diminuir, ao longo dos últimos anos. Nesta finalidade, a aplicação de técnicas computacionais de descoberta de fármacos, por indústrias farmacêuticas e outros grupos de investigação, tornou-se essencial para a fase preliminar da descoberta da NCE, para acelerar o desenvolvimento do fármaco numa forma mais equilibrada em custo-eficiência e para diminuir falhas na fase final [67].

1.3.1. *Design* computacional de fármacos

O desenvolvimento de novos fármacos e produtos medicinais tornou-se mais desafiador, ineficiente e caro. Este é um facto reconhecido por grandes empresas de produtos farmacêuticos [68].

O design computacional de fármacos (CADD), sofreu melhoramentos significativos desde a década de 1970. Com o rápido desenvolvimento da biologia estrutural e molecular, as estruturas 3D e funções de macromoléculas foi determinada. Entretanto a aplicação de métodos computacionais na descoberta de fármacos e simulações moleculares também cresceu com o avanço rápido das ciências computacionais e computadores de elevado desempenho. Mecânica quântica, mecânica molecular, dinâmica molecular, e as combinações destas três disciplinas, são amplamente usadas no desenvolvimento de fármacos. Séries de abordagens em CADD baseadas em estruturas 3D de macromoléculas biológicas (proteínas e aminoácidos), como o método de *virtual screening* (VS), têm beneficiado bastante a eficiência da descoberta de novos fármacos. Atualmente, a simulação e predição 3D de *folding* proteico, assim como a descobertas de compostos ativos para um alvo, de bibliotecas de compostos é outra direção na descoberta de fármacos. A fidelidade das simulações do VS depende, extensivamente, da capacidade do computador, (figura 7) [69].

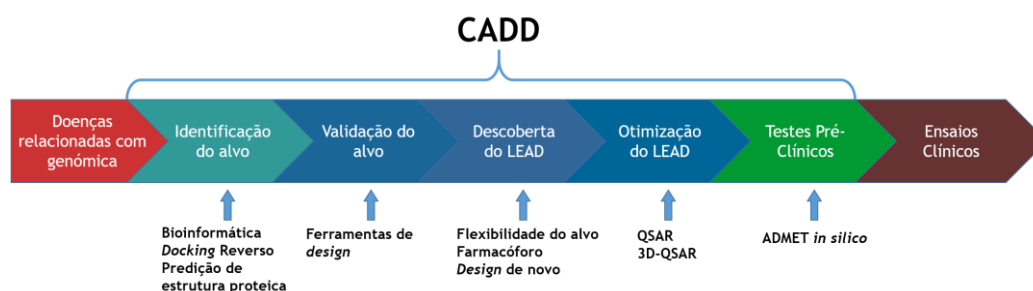


Figura 7- Aplicações do CADD nas várias fases de desenvolvimento de um fármaco [70].

O *docking* molecular é frequentemente usado em métodos de VS, onde grandes bibliotecas virtuais de compostos são reduzidas em tamanho, para um subgrupo maneável, onde, se houver sucesso, inclui moléculas com elevada afinidade de ligação para um recetor alvo. O potencial do algoritmo do *docking* para uso no VS é baseado na sua precisão e rapidez [71].

1.3.1.1. *Docking* molecular

O *docking* é uma técnica computacional que coloca uma pequena molécula no sítio ativo da proteína alvo, mostra as suas possíveis conformações e estima a sua afinidade de ligação (figura 8) [72-75]. Com o aumento de estruturas de mais recetores-alvo determinadas, esta técnica é extensivamente usada na descoberta de novas moléculas com potencial biológico [75]. Entender como pequenas moléculas se ligam a diferentes tipos de proteínas, e como as inibem ou ativam, é de extrema importância para as companhias farmacêuticas. Para entenderem este processo, deve-se identificar os ligandos que se conseguem ligar a determinada proteína alvo. Este processo pode ser efetuado através de experiências dispendiosas de HTS em bibliotecas de compostos químicos pequenos, que sofrem um *screening* com a proteína alvo, para descobrir se tem uma ligação de afinidade alta ou, através de uma alternativa mais económica, *virtual high-throughput screening* (VHTS), no qual os programas de software tentam prever se os complexos proteína-ligando são ou não possíveis, através de *docking* proteína-ligando [76]. O programa de *docking* realiza esta tarefa ao colocar a molécula no sítio ativo, em centenas ou milhares orientações e conformações, avalia a sua complementaridade e classifica a molécula, relativamente ao resto da base de dados [75].

Apesar desta técnica se ter imposto com sucesso nos últimos anos, alguns problemas ainda se colocam [75]. Quando se efetua um *docking* proteína-ligando, deve-se questionar: 1) onde obter a estrutura da proteína e ligando que se procura; 2) onde efetuar o *docking* do ligando, ou seja, onde é o sítio ativo; 3) como funciona o programa de *docking*, como é tratada a flexibilidade do ligando, assim como a sua protonação, tautomerismo e estereoisomerismo; 4) a importância da flexibilidade da proteína/recetor (desde a rotação da cadeia lateral ao movimento do domínio) durante o *docking* e também o tratamento das águas estruturais e protonação da cadeia lateral; 5) descrição de alguns programas de *docking* populares, com ênfase nas suas vantagens e limitações e 6) quais programas de *docking* fornecem os melhores resultados [72, 76].

Gerar a estrutura recetor-ligando *in silico* envolve duas componentes principais: o *docking* e o *scoring*. O *docking* acarreta a amostragem conformacional e orientacional do ligando dentro das restrições do sítio de ligação do recetor. *Scoring* seleciona a melhor pose para um ligando e a classificação de outros ligandos, se alguma base de dados for *dockada*. Para ser bem sucedido, o *docking* deve prever com precisão duas coisas relativas à informação

experimental disponível: a estrutura do ligando (predição da conformação) e a propensão de ligação (predição de afinidade) [72].

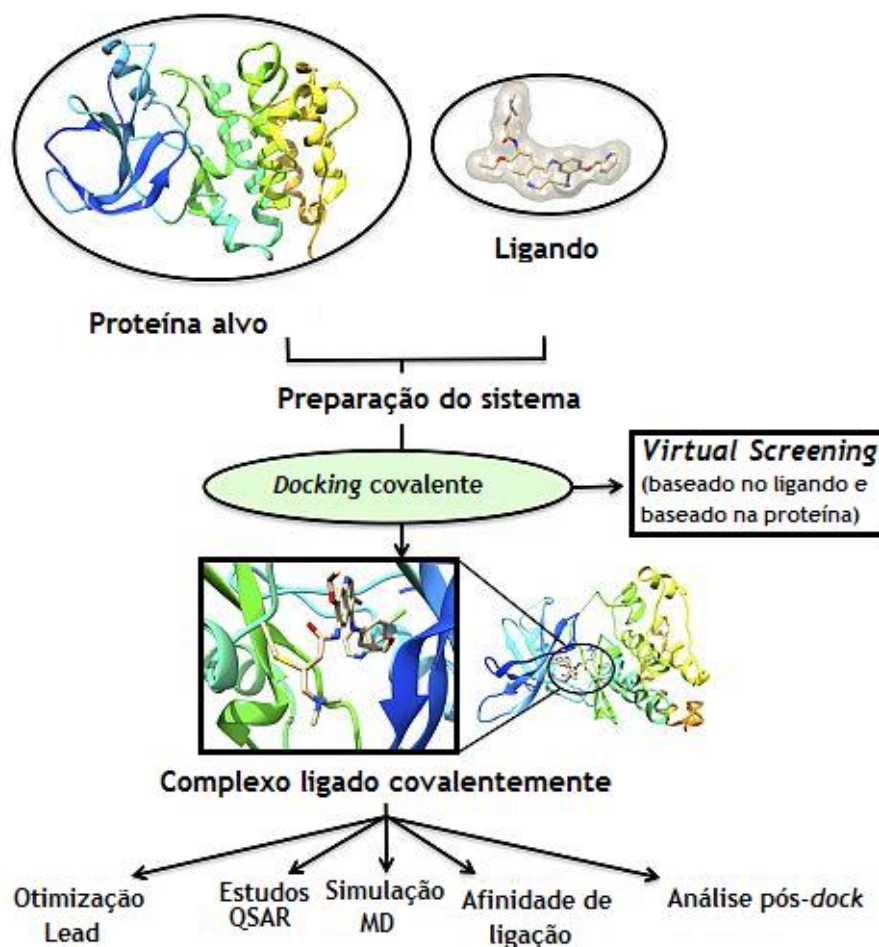


Figura 8- Implementação de *docking* covalente no método de CADD. No caso de *docking* covalente da proteína alvo são exploradas as interações entre a proteína como nucleófilo e o ligando como eletrófilo [77].

Em vários métodos de *docking* o ligando é tratado como flexível, mas a conformação da proteína é mantida rígida. Isto baseia-se na hipótese *Lock-and-Key* para ligação proteína-ligando. Contudo, é agora aceite que a ligação à proteína não é um evento estático, é um processo dinâmico. No *docking* a incorporação da flexibilidade do recetor aumenta, exponencialmente, o espaço potencial de procura e rapidamente se torna impraticável. Deste modo, contabilizar a flexibilidade do ligando é mais rentável que a do recetor [74]. Uma aproximação comum em modelar computacionalmente a flexibilidade é assumir apenas o espaço conformacional do ligando, considerando o recetor rígido, ao longo do protocolo de *docking* [71].

1.3.1.2. Algoritmo

Um algoritmo rigoroso corre exaustivamente todos os modos de ligações possíveis entre o complexo recetor-ligando. Contudo, isto é impraticável devido ao tamanho do espaço da procura. A aplicação prática de uma procura extensiva envolve amostras de estados de alta energia, desfavoráveis, que pode restringir o sucesso e otimização do algoritmo. Assim, aplicam-se restrições e aproximações para diminuir a dimensão do problema e tentar localizar o mínimo global, tão eficientemente quanto possível. Uma aproximação comum nos primeiros algoritmos foi tratar o ligando e o alvo como corpos rígidos, e apenas 6 graus de liberdade translacional e rotacional eram explorados. Apesar destes métodos se terem provado capazes, em alguns casos, há uma limitação no paradigma do *docking* de corpos rígidos, em que a conformação do ligando deve ser similar à da observado experimentalmente, quando ligada ao alvo [71].

Um algoritmo usado frequentemente em simulações de *docking* é o algoritmo genético. Este é um mecanismo de procura adaptativo que modela processos biológicos evolucionários, de forma a resolver difíceis problemas de otimização. Existe uma variedade de modelos diferentes que são agrupados nos algoritmos genéticos, contudo todos possuem características comuns. Primeiro, há uma população de indivíduos, cada um com o genótipo e fenótipo. O genótipo de um indivíduo é tipicamente um cromossoma linear, representado por um fio de valores, selecionados de um alfabeto de duas ou mais letras possíveis. O genótipo é a receita pelo qual o fenótipo é criado, assim como em organismos biológicos. O genótipo é manipulado por operadores biológicos, como *crossover* e mutação, cada um operando uma determinada probabilidade baixa. Após a produção do fenótipo, este é avaliado conforme a sua proximidade a uma solução ótima. Os indivíduos melhores são escolhidos preferencialmente para formar uma nova geração, e este ciclo de avaliação mutação/*crossover* é repetido até se encontrar o desejado nível de população geral [78].

1.3.1.3. Scoring

Os métodos de *docking* disponíveis atualmente usam as funções de *scoring* de uma de duas formas. A primeira abordagem usa a função *scoring* completa para a classificação da conformação ligando-proteína. O sistema é então modificado pelo algoritmo de procura e a mesma função de *scoring* é aplicada para a classificação da nova estrutura. O método alternativo é usar a função *scoring* de dois estágios. Aqui é aplicada uma função reduzida para direcionar a estratégia de procura e uma função mais rigorosa para a classificação das estruturas resultantes [71, 79].

Gerar vários modos de ligação é inefetivo sem um modelo para fazer a classificação de cada conformação, que seja tanto eficiente quanto preciso. A função de *scoring* deve ser capaz de distinguir os modos de ligação experimental dos outros modos explorados durante a procura

do algoritmo. O *scoring* rigoroso é computacionalmente caro, pelo que a complexibilidade da função é reduzida, implicando perda de precisão [71].

A função de *scoring* ideal deveria calcular com precisão as energias livres de ligação, mas atualmente nenhuma função é capaz de o fazer. Este tipo de funções é baseado na suposição que as energias de afinidade podem ser descritas como uma soma de termos independentes. Por esta razão, todas as funções de *scoring* sofrem de uma significativa dependência do tamanho do *score*: quanto maior a molécula, maior é a probabilidade de um *score* favorável. Segundo, todas as funções desprezam os efeitos entrópicos, ao avaliar as interações entre um recetor rígido e um ligando num único modo de ligação. As funções de *scoring* também desprezam efeitos de solvatação [80].

2. Objetivos

Os esteroides são um grupo de compostos presente na natureza e em diversos organismos vivos, como tal o seu estudo, mais particularmente o estudo das suas atividades biológicas é de elevado interesse para os investigadores. Entre muitas das atividades já comprovadas para este tipo de compostos, naturais ou semissintéticos, está a sua capacidade para inibir a AChE.

A elevada atividade da AChE está relacionada com os baixos níveis de acetilcolina característicos na AD. Neste âmbito, os AChEIs têm a capacidade de reduzir a clivagem da acetilcolina pela AChE, aumentando os seus níveis cerebrais e retardando assim a progressão da AD. Como a AD é uma doença neurodegenerativa que afeta uma grande parte da população envelhecida, a pesquisa de novos fármacos para a combater é um foco de muitos cientistas.

O objetivo final do trabalho desenvolvido focou-se na descoberta de novos AChEIs, derivados de esteroides. Para atingir este objetivo, numa primeira fase, procurou-se na literatura quais esteroides estavam a ser estudados para potenciais AChEIs. Uma vez descobertos efetuou-se uma análise estrutural para identificar quais os aspetos que poderiam conferir maior atividade inibitória. A reunião dessa informação permitiu desenhar novas estruturas para fazer um estudo de *docking* molecular e aferir se as energias de ligação obtidas eram satisfatórias.

A segunda fase do trabalho consistiu na estratégia sintética, para tentar obter os produtos desenhados, derivados do 16-DPA, com substituições em C-3 e C-16. A terceira e última fase consistiu no estudo da atividade biológica dos compostos sintetizados com sucesso, através de um ensaio enzimático.

3. Parte experimental

3.1. Estudos de *Docking Molecular*

3.1.1. Preparação da proteína

A estrutura 3D da proteína foi obtida do Protein Data Bank (PDB), código 4M0F [81]. As coordenadas da subunidade B, do ligando co-cristalizado e moléculas de água foram eliminadas, usando o software Chimera (v 1.10.1). As cargas das histidinas foram definidas para similar o ambiente fisiológico e a estrutura final foi guardada no formato PDB. Usando o software AutoDockTools (v 1.5.6), os hidrogénios não polares foram *merged* e adicionou-se as cargas parciais Kollman e Gasteiger. O ficheiro da estrutura foi guardado em formato PDBQT, para posterior utilização no estudo de *docking*.

3.1.2. Preparação dos ligandos

Todos os ligandos foram construídos usando o software Chem 3D (v. 12.0.2) do Cambridge ChemBioOffice 2010. O mesmo programa foi usado para a minimizar a energia, e os ficheiros guardados em formato pdb. Com o software Chimera, as coordenadas dos ligandos foram alteradas para corresponder com a do ligando co-cristalizado e o centro ativo da proteína. Com o AutoDockTools, escolheu-se as torsões dos ligandos e estes foram guardados no formato PDBQT.

3.1.3. Cálculo do *grid map*

O grid map foi calculado no AutoDockTools, usando o AutoGrid4, com as coordenadas do centro ativo da proteína, -15.108×-43.192×27.35. O tamanho da caixa manteve-se igual para cada ligando, com as dimensões 100×70×86, com *spacing* de 2.00Å.

3.1.4. Simulações de *docking*

As simulações foram conduzidas usando o algoritmo genético Lamarckian. O número máximo de avaliação de energia foi 2 500 000 e o tamanho da população GA foi 150. Um total de 50 GA-LS *runs* foram realizadas por cada simulação. Os resultados foram visualizados no AutodockTools e DiscoveryStudio2016Client, do BIOVIA. Para os resultados serem válidos e o método de *docking* sucedido, o valor RMSD entre as conformações de ligando deve ser menor que 2.0Å.

3.2. Síntese orgânica

3.2.1. Considerações gerais

Os reagentes e solventes foram adquiridos à Sigma-Aldrich. As reações foram efetuadas sob aquecimento e agitação, usando placas Heidolph. A análise por TLC foi realizada com placas sílica-gel A1 de 0,20mm (Macherey-Nagel 60 F254). Os compostos com enonas foram visualizados usando luz UV (245nm). A câmara de revelação UV usada foi CN-15.LC. As placas de sílica-gel foram reveladas com a mistura etanol/ácido sulfúrico, 95:5, seguidas de aquecimento a 120°C. Para o isolamento e purificação dos produtos, de diversas reações, foi usada uma coluna cromatográfica com sílica-gel 0,063-0,0200mm ou 0,040-0-0,063mm, adquiridas à Merck. O eluente usado é indicado como proporção v/v em cada procedimento experimental. A evaporação de solvente foi conseguida usando o evaporador rotativo a vácuo da Büchi (R-125). Os espectros de RMN foram adquiridos no espectrofotômetro de 400MHz da Bruker Avance (RMN ¹H a 400MHz e ¹³C a 100MHz), usou-se clorofórmio deuterado (CDCl₃) como solvente e processou-se os espectros com o software MestReNova (v. 9.0.1) (Mestrelab Research, Santiago de Compostela, Espanha). Os desvios químicos são reportados em partes por milhão (δ) relativamente ao TMS ou solvente deuterado com padrão interno. A multiplicidade é descrita como s=singlete, d=duplete, t=tripleto e combinações superiores como m=multiplete.

3.2.2. Estudo do processo de síntese de acetato de 16α-morfolinopregnenolona (20)

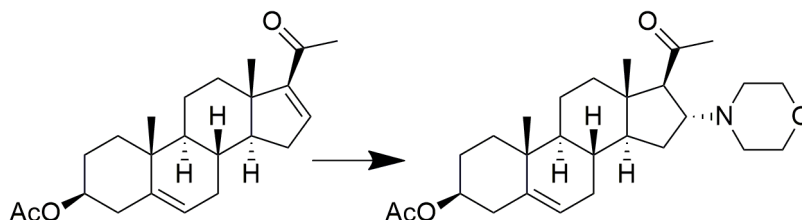


Figura 9- Esquema síntese de acetato de 16α-morfolinopregnenolona.

3.2.2.1. Reação sem catalisador [62]

Num balão de fundo, à temperatura de 45°C, foi adicionado 0,20mmol de 16-DPA, 20eq de morfolina e 16mg de triflato de bismuto. Por controlo por TLC, parou-se a reação ao fim de 96 horas. Prosseguiu-se com uma extração líquido-líquido com 15mL de H₂O e 3×25mL AcOEt e lavagem da fase orgânica com 30mL de brine. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada sobre vácuo e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. Uma coluna cromatográfica, eluente AcOEt:EP (1:1) eluiu o substrato e MeOH o produto, obtendo-se um sólido laranja claro, com 11% rendimento.

RMN ¹H (CDCl₃, 400MHz) δ: 5,30-5,29 (1H, d, H-6), 4,57-5,49 (1H, m, H-3) 3,62-3,60 (4H, d, H-3', 5'), 3,53-3,49 (1H, t, H-16), 2,62-2,60 (1H, d, H-17), 2,43-2,40 (4H, m, H-2', 6'), 2,12 (3H,

s, OCOCH₃), 1,96 (3H, s, 20-CH₃) 0,94 (3H, s, 19-CH₃), 0,59 (3H, s, 19-CH₃). ¹³C (CDCl₃, 100MHz) δ: 208,15 (C-20), 170,53 (OCOCH₃), 139,69 (C-5), 122,10 (C-6), 73,75 (C-3), 66,88 (C-17), 65,50 (2× C-2'), 64,90 (C-16), 55,04 (2× C-1'), 51,36 (C-14), 49,73 (C-9), 44,70 (C-13), 38,80 (C-4), 38,04 (C-12), 36,89 (C-10), 36,58 (C-1), 31,80 (C-8), 31,62 (C-8), 31,55 (C-21), 29,07 (C-2,7), 27,69 (C-15), 21,43 (OCOCH₃), 20,75 (C-11), 19,29 (C-18), 14,54 (C-19).

3.2.2.2. Reação catalisada com triflato de bismuto [54, 82]

3.2.2.2.1. Reação a 90°C

Num balão de fundo, à temperatura de 90°C, foi adicionado 0,20mmol de 16-DPA, 20eq de morfolina e 16mg de triflato de bismuto. Por controlo por TLC, parou-se a reação ao fim de 21 horas. Prosseguiu-se com uma extração líquido-líquido com 15mL de H₂O e 3×25mL AcOEt e lavagem da fase orgânica com 30mL de brine. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada sobre vácuo e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. Uma coluna cromatográfica, com o eluente AcOEt:EP (1:1) eluiu o substrato e MeOH o produto, obtendo-se um sólido laranja claro, com 71% rendimento.

Os dados espectrais verificados foram similares aos descritos na secção 3.2.2.1., à exceção da integração do sinal a 2,62-2,60 ppm, que mostrou mistura de produtos, 87/12%.

3.2.2.2.2. Reação a 45°C

Num balão de fundo, à temperatura de 45°C, foi adicionado 0,20mmol de 16-DPA, 20eq de morfolina e 16mg de triflato de bismuto. Por controlo por TLC, parou-se a reação ao fim de 91 horas. Prosseguiu-se com uma extração líquido-líquido com 15mL de H₂O e 3×25mL AcOEt e lavagem da fase orgânica com 30mL de brine. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada sobre vácuo e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. Uma coluna cromatográfica, com o eluente AcOEt:EP (1:1) eluiu o substrato e MeOH o produto, obtendo-se um sólido laranja claro, com 59% rendimento.

Os dados espectrais verificados foram similares aos descritos na secção 3.2.2.1., à exceção da integração do sinal a 2,62-2,60 ppm, que mostrou mistura de produtos, 95/2%.

3.2.2.2.3. Reação a 80°C

Num balão de fundo, à temperatura de 80°C, foi dissolvido-se 0,20mmol de 16-DPA em 3mL de acetonitrilo. Adicionou-se 20eq de morfolina e 16mg de triflato de bismuto. Por controlo por TLC, parou-se a reação ao fim de 75 horas. Evaporou-se o solvente a vácuo. Prosseguiu-se com uma extração líquido-líquido com 15mL de H₂O e 3×25mL AcOEt e lavagem da fase orgânica com 30mL de brine. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada sobre vácuo e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. Uma coluna cromatográfica, com o eluente AcOEt:EP (1:1) eluiu o substrato e MeOH o produto, obtendo-se um sólido laranja claro, com 83% rendimento.

Os dados espectrais verificados foram similares aos descritos na secção 3.2.2.1., à exceção da integração do sinal a 2,62-2,60 ppm, que mostrou mistura de produtos, 75/24%.

3.2.2.3. Reação catalisada com KOH (21)[83]

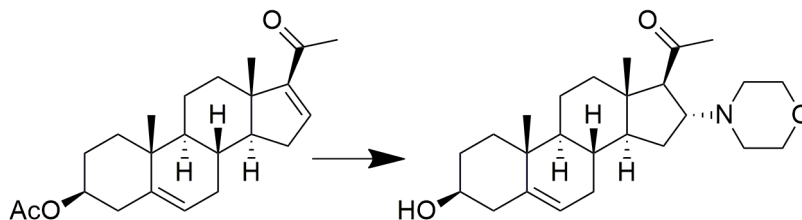


Figura 10- Esquema síntese de 16 α -morfolinopregnenolona.

Num balão de fundo, à temperatura de 100°C, foi adicionado 0,20mmol de 16-DPA, 20eq de morfolina, 20,4mg de KOH. De seguida adicionou-se 20,4mg de KOH em 21,33 μ L de H₂O. Ao fim de duas horas a mistura reacional foi retirada do aquecimento e ficou à temperatura durante a noite. Foi adicionada H₂O e manteve-se a agitação por mais uma hora. O controlo de TLC mostrou que havia formação de produto e a reação foi parada, após um total de 21 horas. Prosseguiu-se com uma extração líquido-líquido com 3 \times 25mL AcOEt e lavagem da fase orgânica com 30mL de brine. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada sobre vácuo e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. Uma coluna cromatográfica, com o eluente AcOEt:EP (1:1) eluiu o substrato e MeOH o produto, obtendo-se um sólido laranja claro, com 66% rendimento.

RMN ¹H (CDCl₃, 400MHz) δ : 5,28-5,27 (1H, d, H-6), 3,63-3,61 (4H, m, H-3', 5') 3,53-3,43 (2H, m, H-3, OH), 2,62-2,60 (1H, d, H-17), 2,23-2,19 (4H, m, H-2', 6'), 2,12 (3H, s, 20-CH₃) 0,93 (2,72H, s, 19-CH₃), 0,59 (2,69H, s, 18-CH₃).

3.2.2.4. Reação catalisada com CAN [54, 85]

3.2.2.4.1. Reação a 45°C

Num balão de fundo, à temperatura de 45°C, foi adicionado 0,20mmol de 16-DPA, 20eq de morfolina e 16mg de CAN. Por controlo por TLC, parou-se a reação ao fim de 53 horas. Prosseguiu-se com uma extração líquido-líquido com 15mL de H₂O e 3 \times 25mL AcOEt e lavagem da fase orgânica com 30mL de brine. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada sobre vácuo e o solvente foi evaporado sob pressão. Uma coluna cromatográfica, com o eluente AcOEt:EP (1:1) eluiu o substrato e MeOH o produto, obtendo-se um sólido laranja claro, com 70% rendimento.

Os dados espectrais verificados foram similares aos descritos na secção 3.2.2.1., à exceção da integração do sinal a 2,62-2,60 ppm, que mostrou mistura de produtos, 94/6%.

3.2.2.4.2. Reação à temperatura ambiente

Num balão de fundo, à temperatura de ambiente, foi adicionado 0,20mmol de 16-DPA, 20eq de morfolina e 16mg de CAN. Por controlo por TLC, parou-se a reação ao fim de 96 horas. Prosseguiu-se com uma extração líquido-líquido com 15mL de H₂O e 3×25mL AcOEt e lavagem da fase orgânica com 30mL de brine. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada sobre vácuo e o solvente foi evaporado sob pressão. Uma coluna cromatográfica, com o eluente AcOEt:EP (1:1) eluiu o substrato e MeOH o produto, obtendo-se um sólido laranja claro, com 34% rendimento.

Os dados espectrais verificados foram similares aos descritos na secção 3.2.2.1., à exceção da integração do sinal a 2,62-2,60 ppm, que mostrou mistura de produtos, 86/12%.

3.2.2.5. Reação catalisada com quinina [86]

Num balão de fundo, à temperatura ambiente, dissolveu-se 0,20mmol de 16-DPA em 2mL de diclorometano (DMC). Adicionou-se 0,30mmol de morfolina, 20%mol de quinina e 40%mol de TFA. O controlo por TLC não mostrou a formação de produto, parando-se a reação ao fim de 72 horas.

3.2.2.6. Reação catalisada com HClO₄-SiO₂ [87]

Num balão de fundo, à temperatura ambiente, foi adicionado 0,20mmol de 16-DPA, 20eq de morfolina e 20mg de HClO₄-SiO₂. Por controlo por TLC, parou-se a reação ao fim de 96 horas. Prosseguiu-se com a filtração da mistura reacional, seguida de uma lavagem com DMC. Uma coluna cromatográfica, com o eluente AcOEt:EP (1:1) eluiu o substrato e MeOH o produto, obtendo-se um sólido laranja claro, com 34% rendimento.

Os dados espectrais verificados foram similares aos descritos na secção 3.2.2.1.

3.2.3. Síntese de 16-desidropregnenolona (22)

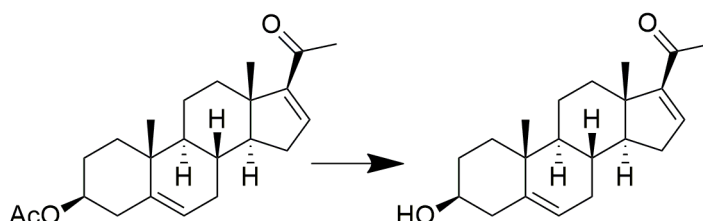


Figura 11- Esquema síntese de 16-desidropregnenolona.

Num balão de fundo redondo, dissolveu-se 0,5mmol de 16-DPA em 4mL de isopropanol e adicionou-se uma solução aquosa de KOH a 10%. A mistura permaneceu em agitação durante 3horas, à temperatura ambiente, tendo sido confirmado por TLC o consumo total do substrato. O isopropanol foi evaporado, adicionou-se 11mL de H₂O e 10mL de DMC ao balão e este foi submetido em agitação por mais 2 horas. O conteúdo do balão foi vertido para uma

ampola de decantação, onde foi extraído com 3×25mL de DMC. A fase orgânica foi recuperada, seca com sulfato de sódio anidro, que posteriormente foi removido por filtração a vácuo. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida e obteve-se um sólido de cor branca e com 90% de rendimento.

RMN ¹H (CDCl₃, 400MHz) δ: 6,65-6,63 (1H, t, H-16), 5,30-5,28 (1H, m, H-6), 3,49-3,42 (1H, m, H-3), 2,19 (3H, s, 20-CH₃) 0,9 (3H, s, 19-CH₃), 0,85 (3H, s, 18-CH₃)

3.2.4. Síntese de 16α-morfolinopregnenolona (21)

Num balão de fundo redondo, dissolveu-se 0,15mmol do composto 20 em 1,2mL de metanol e adicionou-se uma solução aquosa de KOH a 10%. A mistura permaneceu em agitação durante 3horas, à temperatura ambiente, tendo sido confirmado por TLC o consumo total do substrato. O metanol foi evaporado, adicionou-se 2mL de H₂O e 4mL de DMC ao balão e este foi submetido em agitação por mais 2 horas. O conteúdo do balão foi vertido para uma ampola de decantação, onde foi extraído com 3×25mL de AcOEt. A fase orgânica foi recuperada, seca com sulfato de sódio anidro, que posteriormente foi removido por filtração a vácuo. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida e obteve-se um sólido de cor laranja tênue e com 97% de rendimento.

Os dados espectrais verificados foram similares aos descritos na secção 3.2.2.3., à exceção da integração do sinal a 2,62-2,60 ppm, que mostrou mistura de produtos, 91/7%.

3.2.5. Tentativa de síntese de 3β, 4β-dihidropregnenolona (23)

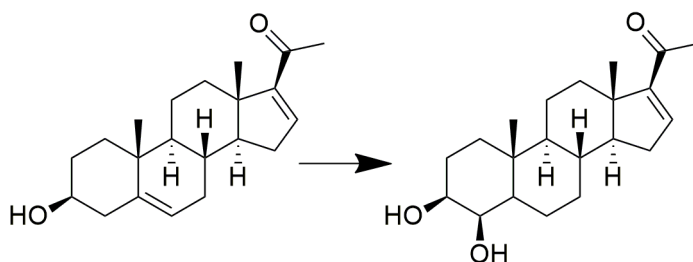


Figura 12- Esquema síntese de 3β,4β-dihidropregnenolona.

Num balão de fundo redondo dissolveu-se 0,25mmol de 16-DPA em 1,875mL água/dioxano (proporção), e adicionou-se 0,875mmol de SeO₂. A mistura reacional permaneceu em agitação e a 80°C. Após 26horas reacionais, foi adicionada igual quantidade e SeO₂. Após 90 horas a reação foi parada, após a TLC mostrar que não houve mais evolução da reação. Adicionou-se 5mL de AcOEt ao balão, filtrou-se o seu conteúdo, a vácuo, sobre uma camada de celite e lavou-se o Kitasato com 2×25mL AcOEt, para uma ampola de decantação. A fase orgânica foi lava com 2×20mL de brine e seca com sulfato de sódio anidro. Por coluna cromatográfica com eluente AcOEt:EP (3:1) separou as manchas obtidas por TLC.

Por RMN confirmou-se que a reação não ocorreu.

3.2.6. Tentativa de síntese de acetato de 16 α -(N-metil)morfolinopregnenolona (24) [88]

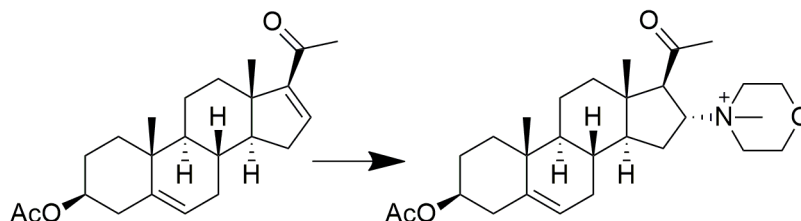


Figura 13- Esquema síntese de acetato de 16 α -(N-metil)morfolinopregnenolona.

Num balão de fundo redondo dissolveu-se 0,19-0,22mmol solução de DMC-Acetonitrilo (1:1). Adicionou-se 3,2mmol de iodeto de metilo e deixou-se em refluxo durante a noite. Por confirmação por TLC da existência de produto, a reação foi parada, ao fim de 19 horas. O produto foi recristalizado com MeOH, mas a formação de cristais não foi notória.

Por RMN confirmou-se que a reação não ocorreu.

3.2.7. Tentativas de síntese de acetato de 3 β ,17 β -diacetoxi-5 α ,6 α -epóxi-16 α -morfolinoandrostando (25)

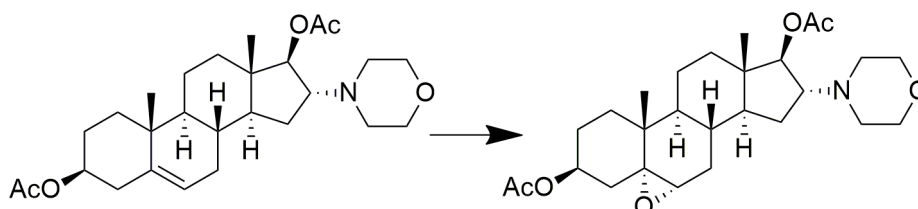


Figura 14- Esquema síntese de acetato de 3 β ,17 β -diacetoxi-5 α ,6 α -epóxi-16 α -morfolinoandrostando.

3.2.7.1. Com MMPP [89]

Num balão de fundo redondo dissolveu-se 0,38mmol de acetato de 16 α -morfolinopregnenolona em 50mL de DMC-MeOH (1:2), adicionou-se 0,418mmol de monoperoxifalato de magnésio (MMPP) e 1mL de H₂O. A mistura reacional permaneceu em agitação durante 18 horas, à temperatura ambiente. Parou-se a reação e evaporou-se o solvente. Lavou-se o conteúdo do balão com 20mL de NaHCO₃ saturado, 3x50mL de DMC e 20mL de H₂O. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente evaporado.

Por RMN confirmou-se que a reação não ocorreu.

3.2.7.2. Com *m*-CPBA [84]

Num balão de fundo redondo dissolveu-se 0,15mmol de acetato de 16 α -morfolinopregnenolona, 0,02mmol de CAN e 0,2mmol de *m*-cloroperbenzóico (*m*-CPBA), em 1mL de DMC. A reação foi mantida à temperatura ambiente durante 24horas, após o controle por TLC não mostrar a presença de substrato. A reação foi vertida em água fria e foi extraída com 60mL de AcOEt. A fase orgânica foi lavada com 15mL de sulfito de sódio 10% e 15mL de brine. A fase orgânica foi ainda seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporado o solvente.

Por RMN confirmou-se que a reação não ocorreu.

3.2.8. Adição de aminas em C-16 com triflato de bismuto

3.2.8.1. Síntese de acetato de 16 α -piperidinopregnenolona (26)

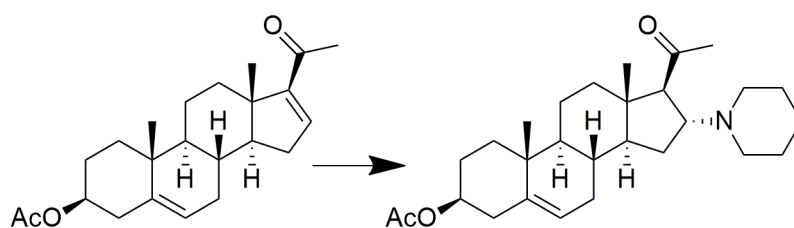


Figura 15 - Esquema síntese de acetato de 16 α -piperidinopregnenolona.

Num balão de fundo, à temperatura de 45°C, foi dissolveu-se 0,20mmol de 16-DPA em 3mL de acetonitrilo. Adicionou-se 20eq de piperidina e 16mg de triflato de bismuto. Por controle por TLC, parou-se a reação ao fim de 167 horas. Evaporou-se o solvente a vácuo. Prosseguiu-se com uma extração líquido-líquido com 15mL de H₂O e 3×25mL AcOEt e lavagem da fase orgânica com 30mL de brine. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada sobre vácuo e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. Uma coluna cromatográfica, usando o eluente AcOEt:EP (1:1) eluiu o substrato e MeOH o produto.

Foi obtido um produto sólido, alaranjado com rendimento de 48%.

RMN ¹H (CDCl₃, 400MHz) δ : 5,30-5,29 (1H, d, H-6), 4,57-5,49 (1H, m, H-3) 3,49-3,44 (1H, m, H-16), 2,63-2,61 (1H, d, H-17), 2,30-2,19 (4H, m, H-3', 5') 2,12 (3H, OCOCH₃), 1,86 (3H, s, 20-CH₃), 0,94 (3H, s, 19-CH₃), 0,59 (3H, s, 18-CH₃).

3.2.8.2. Síntese de acetato de 16 α -pirrolidinopregnenolona (27)

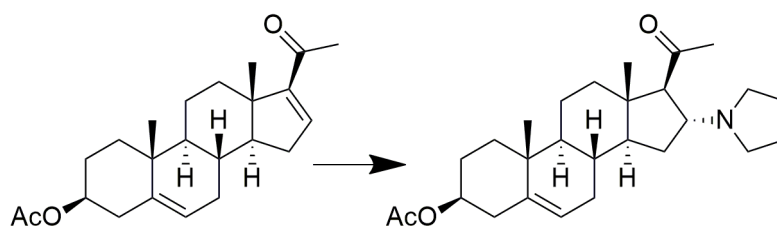


Figura 16- Esquema síntese de acetato de 16 α -pirrolidinopregnenolona.

Num balão de fundo, à temperatura de 45°C, foi dissolvido-se 0,20mmol de 16-DPA em 3mL de acetonitrilo. Adicionou-se 20eq de pirrolidina e 16mg de triflato de bismuto. Por controlo por TLC, parou-se a reação ao fim de 91 horas. Evaporou-se o solvente a vácuo. Prosseguiu-se com uma extração líquido-líquido com 15mL de H₂O e 3×25mL AcOEt e lavagem da fase orgânica com 30mL de brine. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada sobre vácuo e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. Uma coluna cromatográfica, com o eluente AcOEt:EP (1:1) eluiu o substrato e MeOH o produto.

Foi obtido um produto sólido, castanho escuro, com rendimento de 86%.

RMN ¹H (CDCl₃, 400MHz) δ : 5,28-5,26 (1H, d, H-6), 3,49-3,41 (1H, m, H-3), 2,79-2,78 (0,23H, d, H-17), 2,68-2,67 (0,74H, d, H-17), 2,30-2,19 (4H, m, H-1', 2'), 2,12 (3H, s, OCOCH₃), 1,69 (3H, s, 20-CH₃), 0,93 (2,98H, s, 19-CH₃), 0,59 (2,28H, s, 18-CH₃).

3.2.8.3. Síntese de acetato de 16 α -propilaminopregnenolona (28)

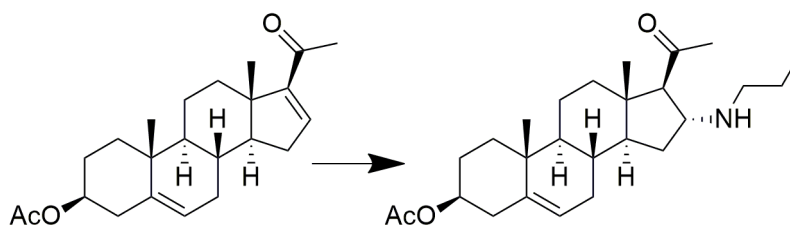


Figura 17- Esquema síntese de acetato de 16 α -propilaminopregnenolona.

Num balão de fundo, à temperatura de 45°C, foi dissolvido-se 0,20mmol de 16-DPA em 3mL de acetonitrilo. Adicionou-se 20eq de propilamina e 16mg de triflato de bismuto. Por controlo por TLC, parou-se a reação ao fim de 162 horas. Evaporou-se o solvente a vácuo. Prosseguiu-se com uma extração líquido-líquido com 15mL de H₂O e 3×25mL AcOEt e lavagem da fase orgânica com 30mL de brine. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada sobre vácuo e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. Uma coluna cromatográfica, com o eluente AcOEt:EP (1:1) eluiu o substrato e MeOH o produto

Por RMN confirmou-se que a reação não ocorreu.

3.2.8.4. Síntese de acetato de 16 α -imidazolepregnenolona (29)

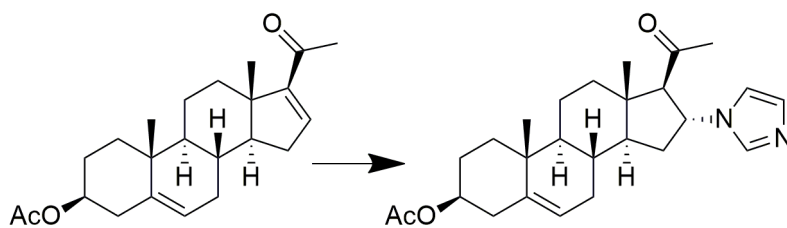


Figura 18- Esquema síntese de acetato de 16 α -imidazolepregnenolona.

Num balão de fundo, à temperatura de 45°C, foi dissolvido-se 0,20mmol de 16-DPA em 3mL de acetonitrilo. Adicionou-se 20eq de imidazol e 16mg de triflato de bismuto. Por controle por TLC, parou-se a reação ao fim de 149 horas. Evaporou-se o solvente a vácuo. Prosseguiu-se com uma extração líquido-líquido com 15mL de H₂O e 3×25mL AcOEt e lavagem da fase orgânica com 30mL de brine. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada sobre vácuo e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. Uma coluna cromatográfica, com eluente AcOEt:EP (1:1) eluiu o substrato e MeOH o produto.

Por RMN confirmou-se que a reação não ocorreu.

3.2.8.5. Síntese de acetato de 16 α -benzimidazolepregnenolona (30)

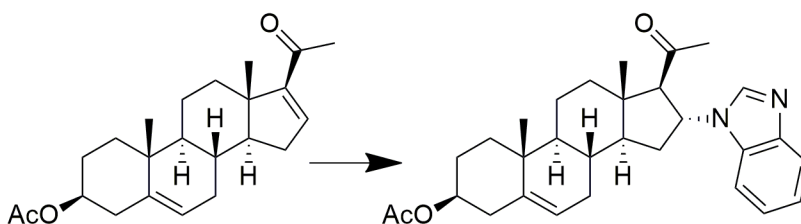


Figura 19- Esquema síntese de acetato de 16 α -benzimidazolepregnenolona.

Num balão de fundo, à temperatura de 45°C, foi dissolvido-se 0,20mmol de 16-DPA em 3mL de acetonitrilo. Adicionou-se 20eq de benzimidazole e 16mg de triflato de bismuto. O controle por TLC não mostrou a formação de produto, parando-se a reação ao fim de 96 horas e recuperou-se o substrato.

3.2.8.6. Síntese de acetato de 16 α -anilinopregnenolona (31)

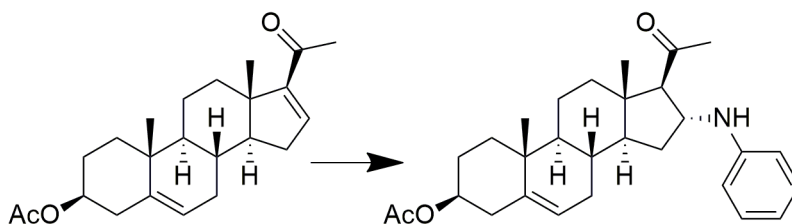


Figura 20- Esquema síntese de acetato de 16 α -anilinopregnenolona.

Num balão de fundo, à temperatura de 45°C, foi dissolvido-se 0,20mmol de 16-DPA em 3mL de acetonitrilo. Adicionou-se 20eq de anilina e 16mg de triflato de bismuto. O controle por TLC

não mostrou a formação de produto, parando-se a reação ao fim de 96 horas e recuperou-se o substrato.

3.2.9. Adição de aminas em C-16 com CAN

3.2.9.1. Síntese de acetato de 16 α -piperidinopregnenolona (26)

Num balão de fundo, à temperatura de 45°C, foi adicionado 0,20mmol de 16-DPA, 20eq de piperidina e 16mg de CAN. Por controlo por TLC, parou-se a reação ao fim de 53 horas. Prosseguiu-se com uma extração líquido-líquido com 15mL de H₂O e 3×25mL AcOEt e lavagem da fase orgânica com 30mL de brine. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada sobre vácuo e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. Uma coluna cromatográfica, com o eluente AcOEt:EP (1:1) eluiu o substrato e MeOH o produto. O produto foi recristalizado de metanol e foi obtido um produto sólido, alaranjado com rendimento de 45%.

RMN ¹H (CDCl₃, 400MHz) δ : 5,30-5,29 (1H, d, H-6), 4,57-5,49 (1H, m, H-3) 3,49-3,44 (1H, m, J=3,46, 16), 2,63-2,61 (1H, d, H-17), 2,30-2,19 (4H, m, H-3', 5') 2,12 (3H, OCOCH₃), 1,86 (3H, s, 20-CH₃), 0,94 (3H, s, 19-CH₃), 0,59 (3H, s, 18-CH₃). ¹³C (CDCl₃, 100MHz) δ : 208,53 (C-20), 170,52(OCOCH₃), 139,62 (C-5), 122,24 (C-6), 73,79 (C-3) 65,35 (C-17) 65,20 (C-2×C-1'), 54,92(C-16), 52,15(2×C-2'), 49,75 (C-14), 44,70 (C-9), 38,79 (C-13), 38,05 (C-4), 36,88 (C-12), 36,59 (C-3'), 31,87 (C-10), 31,65 (C-1), 31,54 (C-8), 30,09 (C-21), 27,20 (C-2,7) , 26,02C-15), 21,43 (OCOCH₃), 20,75 (C-11), 19,29 (C-18), 14,57 (C-19).

3.2.9.2. Síntese de acetato de 16 α -pirrolidinopregnenolona (27)

Num balão de fundo, à temperatura de 45°C, foi adicionado 0,20mmol de 16-DPA, 20eq de pirrolidina e 16mg de CAN. Por controlo por TLC, parou-se a reação ao fim de 45 horas. Prosseguiu-se com uma extração líquido-líquido com 15mL de H₂O e 3×25mL AcOEt e lavagem da fase orgânica com 30mL de brine. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada sobre vácuo e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. Uma coluna cromatográfica, usando o eluente AcOEt:EP (1:1) eluiu o substrato e MeOH o produto.

Foi obtido um produto sólido, castanho escuro, com rendimento de 94%.

Os dados espectrais verificados foram similares aos descritos na secção 3.2.8.2., à exceção da integração do sinal a 2,62-2,60 ppm, cuja mistura de produtos é 81/22%.

3.2.9.3. Tentativa de síntese de acetato de 16 α -benzimidazolepregnenolona (30)

Num balão de fundo, à temperatura de 45°C, foi adicionado 0,20mmol de 16-DPA, 20eq de benzimidazole e 16mg de CAN. O controlo por TLC não mostrou a formação de produto, parando-se a reação ao fim de 53 horas.

3.2.9.4. Tentativa de síntese de acetato de 16 α -anilino pregnenolona (31)

Num balão de fundo, à temperatura de 45°C, foi adicionado 0,20mmol de 16-DPA, 20eq de anilina e 16mg de CAN. O controlo por TLC não mostrou a formação de produto, parando-se a reação ao fim de 53 horas.

3.2.9.5. Tentativa de síntese de acetato de 16 α -indolpregnenolona (32)

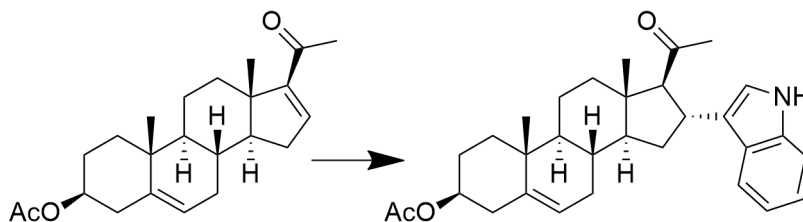


Figura 21- Esquema síntese de acetato de 16 α -indolpregnenolona.

Num balão de fundo, à temperatura de 45°C, foi adicionado 0,20mmol de 16-DPA, 20eq de indol e 16mg de CAN. Por controlo por TLC, parou-se a reação ao fim de 53 horas. Prosseguiu-se com uma extração líquido-líquido com 15mL de H₂O e 3×25mL AcOEt e lavagem da fase orgânica com 30mL de brine. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada sobre vácuo e o solvente foi evaporado sob pressão. Uma coluna cromatográfica, o eluente AcOEt:EP (1:1) eluiu o substrato e MeOH o produto.

Por RMN confirmou-se que a reação não ocorreu.

3.2.9.6. Tentativa de síntese de 5 α -morfolinoprogesterona (33)

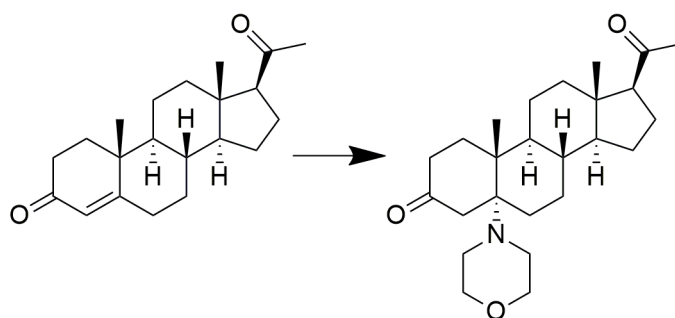


Figura 22- Esquema síntese de acetato de morfolinoprogesterona.

Num balão de fundo, à temperatura de 45°C, foi adicionado 0,20mmol de progesterona, 20eq de morfolina e 16mg de CAN. Por controlo por TLC, parou-se a reação ao fim de 24 horas. Prosseguiu-se com uma extração líquido-líquido com 15mL de H₂O e 3×25mL AcOEt e lavagem da fase orgânica com 30mL de brine. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada sobre vácuo e o solvente foi evaporado sob pressão. Por RMN confirmou-se que a reação não ocorreu.

3.3. Avaliação biológica

3.3.1. Ensaio enzimático

Foi utilizado o método de Ellman modificado para conduzir o teste enzimático [90], usando o espectrofotômetro para microplacas BIO-RAD xMark™. Numa placa com 96 poços, colocou-se em cada poço 125µL de DNTB 3mM em tampão fosfato pH7, 25µL de iodeto de acetiltiocolina (ATCI) 15mM, 50µL de tampão fosfato pH 8 e 25µL da solução do composto em DMSO 10µM. Colocou-se no espectrofotômetro, com incubação a 25°C e efetuou-se um *shake* para uniformizar os poços, e leu-se a absorvância 3x a cada 45 segundos, a 405nm. A placa foi retirada e colocou-se 25µL de enzima AChE de enguia elétrica (*Electrophorus electricus*) 0,22U/mL. A placa voltou a colocar-se no espectrofotômetro, realizou-se o *shake* e registou-se a absorvância 10x a cada 2 minutos, num total de 20 minutos, a 405nm, a 25°C. Para a curva de calibração utilizou-se neostigmina, cuja solução mãe (4,4 mg/mL) foi preparada em DMSO e as diluições com água Mili-Q, para as seguintes concentrações 0,05, 0,10, 0,15, 0,20, 0,25, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 mg/mL e 10µM.

Para preparar as diluições aplicou-se a fórmula, $C_i V_i = C_f V_f$ e per fez-se o volume de 2,0 mL com água Mili-Q, tabela 3. Para preparar a solução 10µM (2mL), calculou-se primeiro a concentração molar de da solução mãe, 14,5µM e depois os volumes necessários.

Tabela 3- Preparação das soluções diluídas, a partir da solução com 4,4 mg/mL

Concentração (mg/mL)	Vsolução mãe (µL)	Volume água Mili-Q (µL)
0,05	22,7	1977,3
0,10	45,5	1954,5
0,15	68,2	1931,8
0,20	90,9	1909,1
0,25	113,6	1886,4
0,50	227,3	1772,7
1,00	454,6	1545,4
1,50	681,8	1318,2
2,00	909,1	1090,9

Para os cálculos da inibição da enzima, em primeiro, realizou-se a média das absorvâncias obtidas para composto, após a adição da enzima; segundo, calculou-se a percentagem de inibição, para todos os segundos lidos, usando a seguinte fórmula: $1 - (\text{Absorvância}_{\text{controle}} / \text{Absorvância}_{\text{composto}})$; e terceiro, calculou-se a média das percentagens de inibições calculada para todos os segundos lidos, obtendo-se a percentagem de inibição da enzima.

4. Resultados e Discussão

4.1. Estudos de *Docking* molecular

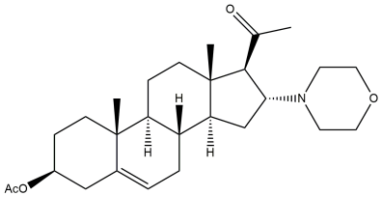
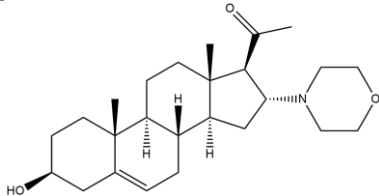
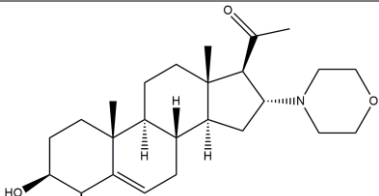
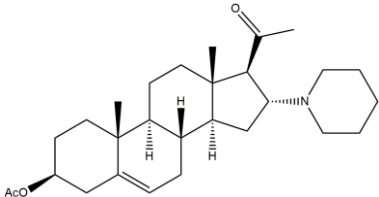
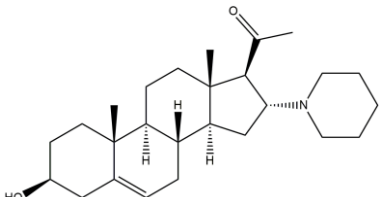
A AChE está localizada na sinapse colinérgica nos vertebrados e regula a neurotransmissão através da rápida hidrólise do neurotransmissor acetilcolina, em colina e acetato. Os fármacos que penetram na BHE para inibir a AChE podem aumentar os níveis de acetilcolina e potencializar os seus efeitos fisiológicos. Inibidores reversíveis desta enzima são usados para compensar a diminuição endógena dos níveis de acetilcolina no tratamento da AD [81].

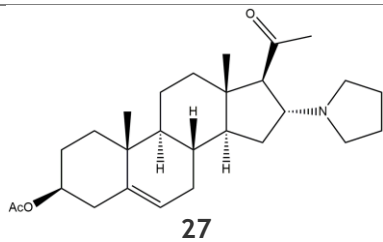
Após efetuada uma pesquisa sobre quais os esteroides com potencial para AChEIS, realçando alguns aspetos SAR, resolveu-se fazer um estudo computacional de novas moléculas a sintetizar, tendo em conta as suas interações e afinidade com a proteína. Sabendo importância de determinadas modificações nos anéis A e D para a presença de atividade biológica, desenharam-se novos compostos.

Os novos ligandos para a AChE variam essencialmente nas posições C-3 e C-16, da estrutura básica do 16-DPA. Na posição C-3 estudou-se a substituição do grupo acetato por um álcool e na posição C-16 a introdução de diferentes aminas. Foram selecionadas 6 aminas diferentes, a piperidina, pirrolidina, propilamina, imidazole, benzimidazole e anilina. Esta amostragem de aminas é de elevada relevância, pois envolve compostos cíclicos aromáticos, cíclicos não aromáticos e ainda um linear. A escolha de adição de aminas advém da importância já referida da existência de ligações C-N em novos compostos e da análise estrutural de compostos já comercializados para o tratamento do Alzheimer. Como por exemplo, na estrutura do fármaco tacrina, a sua porção 4-aminopiridil é importante para a sua potente atividade [1]. Como a introdução na morfolina em C-16 já está estudada quimicamente [62], pelo que se explorou a introdução de mais um OH na sua estrutura, na posição C-4, composto 23.

Assim, foram desenhadas 15 estruturas para realizar o *docking* no sítio ativo da proteína. Em relação ao fármaco de referência, a tacrina, todos os compostos apresentaram energias de ligação inferiores, ou seja, teoricamente podem possuir maior afinidade que este. Relativamente aos resultados dos compostos desenhados e o composto co-cristalizado (teritem B) com a proteína, apenas um demonstrou menor energia de ligação. A tabela 4 apresenta as energias de ligação para todos os compostos, assim como as principais interações de cada um com a AChE, analisadas no *software* DiscoveryStudio2016Client.

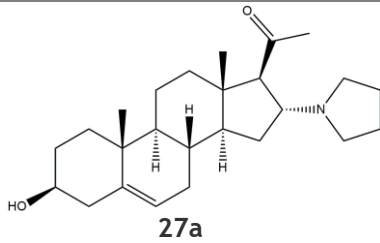
Tabela 4- Principais interações complexo proteína-ligando, obtidas pelo programa DiscoveryStudioClient.

Composto	Energia de Ligação (kJ/mol)	Interações
Territem B	-13,84	Trp86, 286, Tyr124, 337, 341, Ser203, 293, Arg296, Phe338
Tacrina	-7,86	Leu289, Trp286, Arg296
 20	-13,41	Trp86, 286, Gly120, 121, 126, 448, Tyr124, 133, 337, 341, Ser125, 203, 293, Glu202, Val294, Phe295, 297, 338, Arg296, His447
 21	-12,07	Asp74, Thr83, Trp86, 286, Gly121, Tyr24, 337, 341, Ser125, 293, Val294, Phe295, 297, 338, Arg296
 23	-11,46	Trp286, Phe295, 297, 338, Arg296, Tyr337, 341
 26	-13,43	Phe297, 338, Tyr337,341, Thr83, Trp86
 26a	-12,52	Trp86, 286, Tyr72, 337, 341, Glu202, Phe338, His447, Gly448



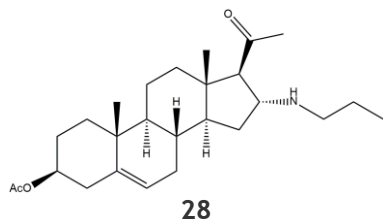
-14,38

Trp86, Arg296, Tyr337, 341,
Phe338 His447



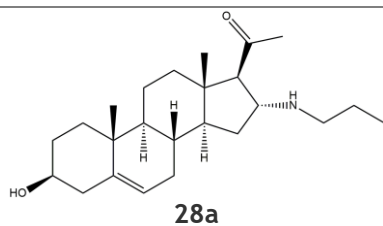
-12,36

Trp86, Tyr124, 133, 337, 341,
Phe297, 338, His447



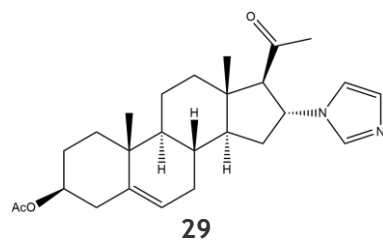
-13,05

Aps74, Trp86, 286, Val294,
Phe295, 297, 338, Arg296,
Tyr337, 341



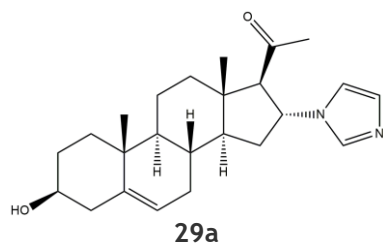
-12,19

Trp86, 286, Tyr72, 124, 337,341,
asp74, Glu202, Phe338, His447



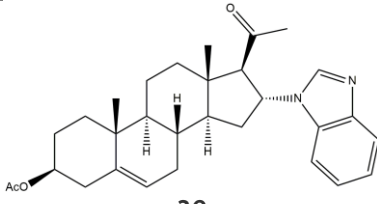
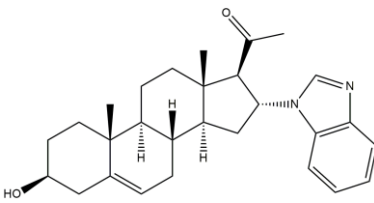
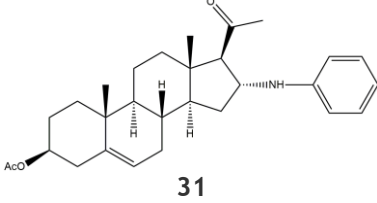
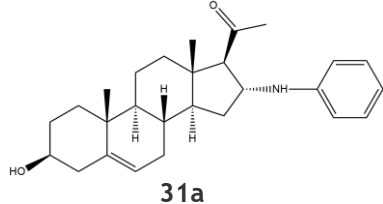
-12,56

Trp86, Gly121, 448, Tyr124, 337,
341, Ser125, Glu202, Arg296,
Phe295, 338



-11,39

Asp74, Trp86, Tyr124, 337,341,
Glu202, Phe338, His447, Gly448

 <p>30</p>	-13,06	Trp86, 286, Phe295, 297, 338, Tyr337, 341
 <p>30a</p>	-13,01	Asp74, Trp86, 286, Asn87, Tyr119, 124, 133, 337,341, Gly120, 121, 126, Ala127, Leu130, Val294, Phe295, 338, Arg296
 <p>31</p>	-13,33	Trp86, 286, Phe295,297,338, Tyr341
 <p>31a</p>	-12,71	Thr83, Trp86, 286, Tyr341, Phe297, 338

A estrutura inicial do estudo da AChE revelou uma cavidade de 20Å de profundidade com o sítio ativo. O local catalítico está situado na base da cavidade e contém a tríade catalítica (His447, Glu334 e Ser203). Um segundo sítio, o periférico, desde o Tyr337 na interface do sítio periférico até à entrada da cavidade, contém várias cadeias laterais aromáticas. Estudos cinéticos e termodinâmicos demonstraram que os inibidores podem interagir com um ou com os dois sítios de ligação da AChE. O sítio periférico contribui para a eficácia catalítica, ao assegurar que as moléculas com que colide e se ligam transientemente, procedem para o sítio catalítico [81]. Após uma análise à tabela verifica-se que apenas dois compostos não interagiram com o aminoácido Tyr337 (30 e 30a), mas uma observação cuidada ao resto das interações e da estrutura 3D do complexo proteína-ligando (figura 23), permite afirmar que todos os compostos se encontram dentro da cavidade do sítio ativo. Igualmente da tabela afere-se que a substituição do grupo acetato é desfavorável para a atividade na AChE, pois a energia de ligação aumentou com essa alteração. No entanto a diferença de energias não se mostrou superior a 2,02 (caso dos compostos 26 e 26a) e manteve-se sempre acima do valor obtido para a tacrina, conservando o interesse de todos como potenciais AChEIs. Por último admite-se que a introdução do segundo OH na estrutura não favoreceu o potencial inibitório,

pois dos três compostos estudados com morfolina (21, 11 e 23), essa alteração resultou na diminuição da energia de ligação, sendo a segunda energia mais desfavorável do paromana geral.

Quando se analisa o ligando co-cristalizado com a proteína, apenas o composto 26 obteve a energia de ligação inferior, -13,84 e -14,38 kJ/mol, respectivamente. Contudo, todos os compostos apresentaram energias inferiores a -11 kJ/mol (composto 26a com 11,39 kJ/mol), pelo menos 3,50 kJ/mol menor que a energia da tacrina (-7,86 kJ/mol), consideram-se assim todos como fortes candidatos a AChIs.

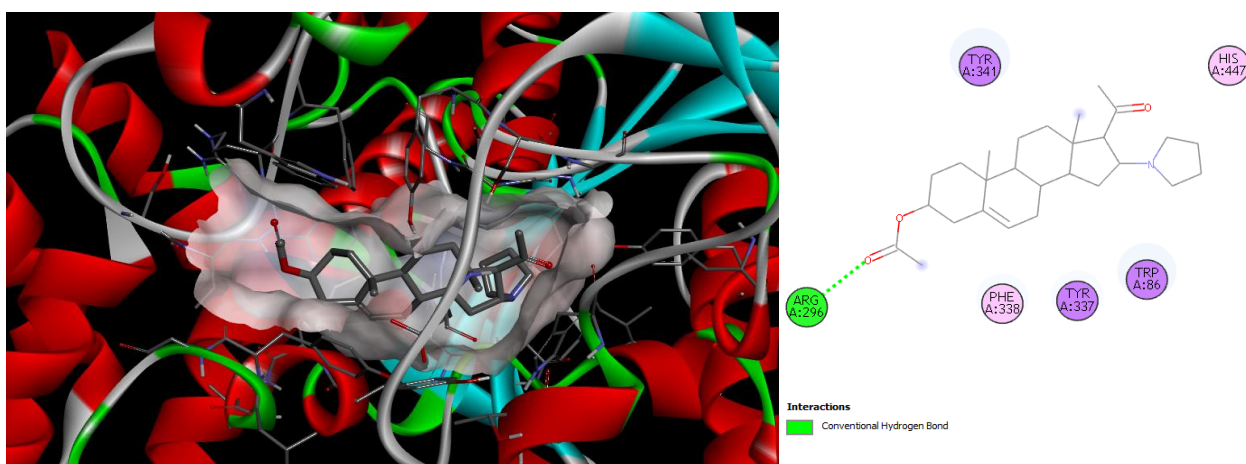


Figura 23- Conformação 3D do complexo proteína-compound 27 e diagrama 2D com as interações do complexo.

4.2. Síntese Orgânica

Uma vez que as estruturas desenhadas e submetidas ao processo de *docking* molecular se revelaram potenciais AChEIs, planeou-se a sua síntese. Recorreu-se à técnica de adição de Michael, para tentar adicionar as aminas selecionadas ao composto de partida. Este tipo de adição é bastante eficaz, tanto pela versatilidade dos catalisadores disponíveis, como pelas suas aplicações [54-56]. A adição de Michael é descrita em sínteses de esteroides por vários investigadores, que atingem resultados satisfatórios após a sua utilização [60-62, 64].

A primeira amina adicionada, foi a morfolina, na tentativa de reproduzir os resultados previamente obtidos pelo grupo. Nesta adição foi estudado primeiro o efeito da temperatura (45, 90°C), usando o mesmo catalisador, o triflato de bismuto [54]. Como seria de esperar, a temperatura é favorável na velocidade da reação, reduzindo de 4 dias (reação a 45°C) para 21 horas (reação a 90°C) o decorrer da mesma. No entanto, as condições reacionais alteraram-se ao longo do tempo, pois, apesar de a morfolina, reagente líquido, se encontrar em excesso, a reação parava por falta de algum componente líquido que solubilizasse o substrato. Assim, ao fim de 19 horas, foi adicionada igual quantidade de morfolina, nos dois balões reacionais. Na tentativa de resolver este problema, e manter a rapidez da reação, foi escolhido um

solvente. Ao substrato, morfolina e catalisador, foi então adicionado acetonitrilo, a uma temperatura de 80°C. Nestas condições, a reação manteve-se rápida e ainda ocorreu uma melhoria de rendimento.

A análise por RMN do produto das três reações referidas mostrou existir formação de um segundo produto além do pretendido, presumivelmente um isômero, mediante a análise espectral. Deste modo, verificou-se que em nenhuma das condições reacionais se conseguiu obter só o isômero alfa pretendido. A proporção relativa dos isômeros foi determinada por avaliação da intensidade relativa do sinal do H-17. Nos espectros de próton obtidos observou-se a duplicação do sinal do H17 (a cerca de 2,5 ppm), indicando a presença de isômeros, e calculou-se as percentagens isoméricas para 45, 90 e 80°C, sendo 55, 87 e 75, respetivamente. Verificou-se que com o aumento da temperatura também aumento o efeito cinético.

A primeira reação foi conseguida, porém os resultados, a nível de isômeros, não foram os pretendidos, pelo que se começou um estudo de processo, para se alcançar um produto puro (figura 24 e tabela 5). Em paralelo com a pesquisa bibliográfica realizou-se a adição das aminas selecionadas ao 16-DPA (figura 25 e tabela 6). Devido a algumas se encontrarem no estado sólido e para manter as condições reacionais semelhantes em todas as adições, todas as sínteses decorreram com a adição de 3mL de acetonitrilo e foram mantidas a 80°C. Das aminas propostas, apenas três foram adicionadas com sucesso além da morfolina: a piperidina, a pirrolidina e o imidazole. No entanto, ocorreram problemas na separação do imidazole do produto obtido, mesmo após efetuada uma coluna cromatográfica, nas mesmas condições dos outros produtos obtidos. Desta forma, foi realizado um novo *workup* para esta mistura de composto, em que se utilizou uma lavagem com HCl a 10%, para ionizar o imidazole e removê-lo na fase aquosa, a análise do espectro de próton mostrou a existência de resíduos imidazole.

A primeira tentativa de síntese, neste estudo de processo, foi reproduzir o protocolo proposto por Manmeet Kumar [62], em que ao fim de 4 horas, a 45°C e sem nenhum catalisador, seria visível em TLC a mancha correspondente ao produto. Tal situação só se verificou ao fim de 24 horas, sendo ténue essa mancha. A reação foi parada ao fim de 96 horas, apresentando ainda bastante substrato por consumir. No entanto, nestas condições, por RMN confirmou-se a presença de só um isômero. Contudo, sendo a reação muito lenta e com um rendimento muito baixo, 11%, o estudo teve de continuar.

Uma vez que foi descrito o uso de KOH [83] para esta transformação, a qual também permitia obter o composto 20 desacetilado em C-3, ou seja o composto 21. A reação ocorreu como esperado, com bom rendimento, porém, a percentagem de isômeros mostrada pelo espectro RMN não foi satisfatória (84/12). Seguidamente, tentou-se mais três catalisadores, quinina combinada com o aditivo TFA [86], HClO₄-SiO₂ [87] e CAN [54, 85], descritos como

catalisadores da reação de Michael na literatura. Para o primeiro caso, a reação não foi conseguida, tendo-se recuperado o substrato no fim. Quando se usou o ácido imobilizado em sílica, foi obtido o produto 20 puro, mas o rendimento manteve-se baixo, 30%. A reação com o CAN, mantida a 45°C, mostrou-se mais rápida, comparativamente à reação com triflato de bismuto a 45°C, levou a um melhor rendimento (70%) e percentagem de isómeros de 96/4. Analisando todas as reações envolvidas no estudo de processo, o uso de CAN levou a um melhor equilíbrio em todos os fatores. Assim, na tentativa de melhorar o ponto principal, a pureza isomérica, conduziu-se novamente a reação com CAN, com eliminação da temperatura. A análise do espectro de próton mostrou uma baixa proporção do isómero, 86/12. Como o CAN, aparentemente foi o mais eficaz de todos os catalisadores, adicionou-se a piperidina, pirrolidina, benzimidazole e anilina, ao 16-DPA. Só as duas primeiras aminas foram adicionadas eficazmente e os seus resultados foram melhores do que os obtidos nas condições anteriores. Como a percentagem de isómeros para o produto 26 foi 94/5, tentou-se a recristalização de metanol, para obter o composto puro. Após a obtenção do espectro de próton verificou-se que já não existia a duplicação de sinal correspondente à presença de isómeros, no H-17.

Ainda antes de terminar o estudo de processo, tentou-se mudar o nucleófilo numa reação e o substrato noutra reação, mantendo as restantes condições experimentais. Assim, em vez da morfolina, um N-nucleófilo, experimentou-se o indol, um C-nucleófilo, só que a reação não foi conseguida. A mudança de substrato de 16-DPA para progesterona, também foi testada, só que também não foi bem-sucedida na obtenção de um produto.

Como um dos substituintes importantes na atividade de esteroides como AChEs tem lugar em C-3, nesta posição deu-se a hidrólise do grupo acetato a álcool. Esta hidrólise correu como esperado e com rendimento de 90%.

Igualmente a par da pesquisa para o estudo de processo da adição de aza-Michael, também se procurou por sínteses capazes de fazer a hidroxilação em C-4, pois uma maior densidade eletrónica nesta zona favorece a atividade inibitória. No entanto, na literatura, não se conseguiu encontrar nenhum agente oxidante para esta reação que tivesse sido utilizado no 16-DPA. Assim, tentou-se descobrir condições reacionais que tivessem sido bem-sucedidas na hidroxilação no mesmo carbono, em outros esqueletos esteroides. Este tipo de reação é extensamente discutido com o colesterol [91-95], tendo por sido usado no 16-DPA as melhores condições experimentais aplicadas no colesterol. As condições foram reproduzidas, mas a reação não foi conseguida.

Após a adição das aminas, estudou-se outras modificações no composto 20, com o objetivo de obter novos compostos, para também estudar as suas implicações na atividade biológica. Estas modificações foram baseadas na informação da análise da relação estrutura atividade. A primeira modificação foi a hidrólise em C-3, seguindo o protocolo usado para a hidrólise do

16-DPA. A reação ocorreu de forma esperada, com bom rendimento e estrutura confirmada por RMN. A segunda modificação foi a introdução do grupo metilo no anel de morfolina, tornando o azoto quaternário, só que apesar de se seguir o protocolo proposto por Hao Hu e colegas [88], não se verificou a formação de cristais na recristalização, e análise espectral confirmou que não ocorreu a metilação. A presença de um azoto quaternário, torna o ligando catiónico e este consegue-se mover-se mais facilmente desde a superfície enzimática até à cavidade, onde se localiza o seu centro ativo. Este movimento é possível devido à presença dos anéis aromáticos presentes na cavidade [31].

Em mais uma tentativa de modificar o composto para favorecer a ação inibitória, tentou-se submeter o composto 20 a uma reação de Baeyer-Villiger, para modificar a cetona no anel D e facilitar a ligação à AChE pelo anel D. Para esta reação usou-se primeiro o MMPP [89] e após não se verificar resultados, tentou-se a mesma reação, seguindo outro protocolo, que recorria ao uso do CAN e de ácido *m*-CPBA [84]. Este novo protocolo também não se verificou eficaz para esta reação, e tendo em conta que o substrato e produto referenciados nos artigos de referência somente diferem do acetato de 16 α -morfolinopregnenolona e conseguinte produto, no substituinte morfolina na posição 16. Assim, este heterocíclico pode ter funcionado como um impedimento estereoquímico e eventualmente eletrónico para a reação.

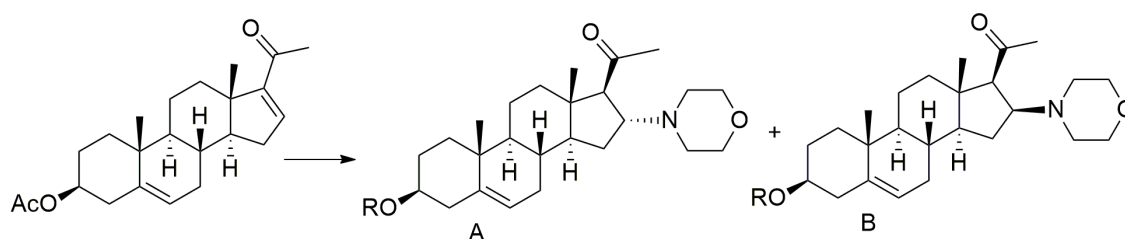


Figura 24- Esquema do estudo de processo da síntese de acetato de 16 α -morfolinopregnenolona.

Tabela 5- Condições reacionais do estudo de processo usando 16-DPA e morfolina.

Catalisador	R	T (°C)	Solvente	Aditivo	Tempo (h)	Rendimento (%)	A/B ^a (%)
-	Ac	45	-	-	96	12	100
Bi(OTf) ₃ .xH ₂ O	Ac	45	-	-	91 ^b	56	95/2
Bi(OTf) ₃ .xH ₂ O	Ac	90	-	-	21 ^b	68	87/12
Bi(OTf) ₃ .xH ₂ O	Ac	80	Acetonitrilo	-	75	83	75/24
KOH	H	100 (2h), rt ^c	-	H ₂ O	21	66	84/12
HClO ₄ -SiO ₂	Ac	Rt	-	-	96	34	100

Quinina	Ac	Rt	DMC	TFA	72	- ^d	- ^d
CAN	Ac	45	-	-	53	68	94/6
CAN	Ac	Rt	-	-	96	34	86/12

^a - Razão obtida pela integração do H-17 do RMN ¹H; ^b - Foi adicionada mais 20eq de amina após 19 horas reacionais; ^c - Após duas horas a 100°C, a reação reagiu à temperatura ambiente; ^d - não houve formação de produto.

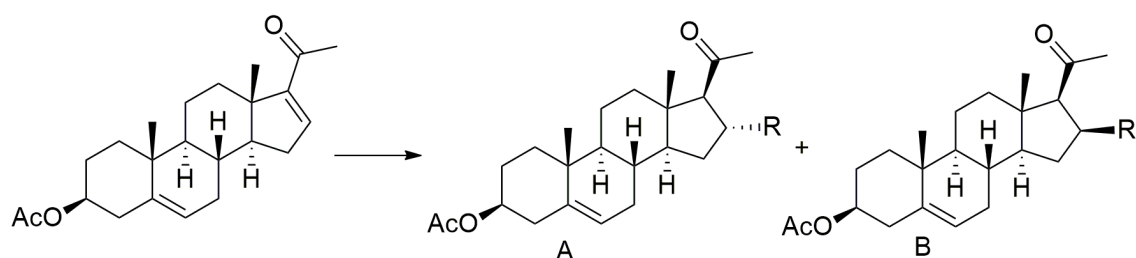


Figura 25- Esquema síntese de acetato de 16 α -aminopregnenolonas.

Tabela 6 - Condições reacionais da síntese de acetato de 16 α -aminopregnenolonas.

R	Catalisador	T (°C)	Tempo (h)	Rendimento (%)	A/B ^a (%)
Piperidina	Bi(OTf) ₃ .xH ₂ O	45	75	45	71/29
	CAN	45	53	45	100
Pirrolidina	Bi(OTf) ₃ .xH ₂ O	45	167	82	74/23
	CAN	45	24	84	81/22
Propilamina	Bi(OTf) ₃ .xH ₂ O	45	91	- ^b	-
Imidazole	Bi(OTf) ₃ .xH ₂ O	45	162	- ^b	-
Benzimidazole	Bi(OTf) ₃ .xH ₂ O	45	168 ^c	- ^b	-
	CAN	45	56	- ^b	-
Anilina	Bi(OTf) ₃ .xH ₂ O	45	168	- ^b	-
	CAN	45	56	- ^b	-

^a - Razão obtida pela integração do H-17 do RMN ¹H; ^b - não houve formação de produto.

4.3. Ensaio Enzimático

No ensaio de Ellman, a reação da tiocolina (um dos produtos da hidrólise enzimática do ATCI) com DTNB (reagente de Ellman) forma um produto amarelo (ácido 5-mercapto-2-nitrobenzóico) a pH 8, que pode ser detetado a 405nm [90]. Este método foi estabelecido por Ellman para avaliar a atividade da AChE *in vitro* [96].

No ensaio enzimático testou-se o composto de partida das reações, o 16-DPA, o acetato de 16 α -morfolinopregnenolona puro e o 16 α -morfolinopregnenolona. Estes compostos permitiram avaliar qual a influência experimental da introdução de uma amina cíclica na inibição da enzima e ainda como respondia a AChE a essa introdução, quando em C-3 se encontrava um grupo acetiloxi ou álcool.

Após se realizar a curva de calibração, avaliou-se a atividade dos três compostos a uma concentração de 10 μ M, que se encontra nos parâmetros da curva de calibração. Na concentração escolhida, verificou-se que houve um aumento da inibição para os esteroides aminados em relação ao 16-DPA. Relativamente à presença do grupo acetato ou OH, a diferença não foi notória (tabela 6).

Tabela 7- Percentagens de inibição dos compostos avaliados

Composto (10 μ M)	Inibição (%)
16-DPA	6,58
20	15,36
21	15,58

5. Conclusão

A AD é uma doença neurodegenerativa cuja via de tratamento disponível é a administração de AChEs. Este tratamento impede a rápida clivagem da acetilcolina cerebral, cujos níveis baixos são característicos da doença, pela AChE. Assim, a área de investigação de alguns cientistas passa por encontrar novos AChEIs, mais potentes e com número de efeitos secundários restritos. Na investigação de novos AChEIs têm sido destacados alguns compostos esteroides, tanto de origem natural, como semissintética, com capacidade de inibir, a baixas concentrações, a enzima.

Este trabalho foi composto por três etapas distintas, *docking* molecular, síntese orgânica e avaliação biológica, com o objetivo de se conseguir obter novos esteroides, capazes de inibir a AChE.

Na primeira fase conseguiu-se reunir alguns aspetos estruturais importantes para a atividade inibitória de esteroides contra a AChE. Com essa informação desenhou-se novas estruturas e procedeu-se ao *docking* molecular, no centro ativo da enzima. Para todos os compostos foram obtidas energias de ligação bastante inferiores ao fármaco de referência, a tacrina. Deste modo, verificou-se que os compostos desenhados possuíam potencial como AChEIs, não tendo sido feitas alterações estruturais e prosseguiu-se para a segunda etapa.

Na síntese orgânica realizou-se um estudo de processo para tentar conciliar a melhor percentagem de isómeros obtida, o maior rendimento e menor tempo reacional. Assim, foram testados diferentes catalisadores, frequentemente aplicados em reação de Michael, em variadas condições reacionais. O uso do CAN revelou-se a melhor estratégia, por cumprir melhor as três características pretendidas. Também foi realizada a tentativa de adição de várias aminas na posição 16 do esqueleto esteroide, só se conseguindo três, a morfolina, piperidina e pirrolidina. No entanto só com as primeiras duas aminas se conseguiu isolar compostos puros, só com o isómero pretendido.

Ainda na síntese, tentou-se fazer algumas modificações a um composto com a amina adicionada, composto 20. Esta fase teve a finalidade de estudar biologicamente as repercussões dessas alterações, em comparação com composto 20. Só foi possível obter um novo produto, o composto 21, resultante da hidroxilação do 20.

Para avaliar a atividade biológica, recorreu-se a um ensaio enzimático. Este ensaio, o método de Ellman's avaliou três compostos, o 16-DPA, e os compostos 21 e 22. Este estudo demonstrou que a introdução de uma amina é importante para a atividade inibitória, enquanto que a substituição de um grupo acetil por álcool não pareceu relevante.

6. Bibliografia

- [1] M. Singh, M. Kaur, H. Kukreja, R. Chugh, O. Silakari, D. Singh. Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: From nerve toxins to neuroprotection. *Eur. J. Med. Chem.* **70**, 165-188 (2013).
- [2] J. L. Muir. Acetylcholine, Aging, and Alzheimer's Disease. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **56**, 687-696 (1997).
- [3] W. Reith, R. Mühl-Benninghaus. Differenzialdiagnose demenzieller Erkrankungen. *Radiologe.* **55**, 378-385 (2015).
- [4] H. V. Vinters. Emerging Concepts in Alzheimer's Disease. *Rev. Pathol. Mech. Dis.* **10**, 291-319 (2015).
- [5] J. Yu, L. Tan, J. Hardy. Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease: An Update. *Rev. Neurosci.* **37**, 79-100 (2014).
- [6] A. Kumar, A. Singh, Ekavili. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacol. Rep.* **67**, 195-203 (2015).
- [7] R. Anand, K. D. Gill, A. A. Mahdi. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacol.* **76**, 27-50 (2014).
- [8] J. E. Morley. Alzheimer's Disease: Future Treatments. *J. Am. Med. Dir. Assoc.* **12**, 1-7 (2011).
- [9] R. S. Shah, H. Lee, Z. Xiongwei, G. Perry, M. A. Smith, R. J. Castellani. Current approaches in the treatment of Alzheimer's disease. *Biomed. Pharmacother.* **62**, 199-207 (2008).
- [10] R. J. O'Brien, P. C. Wong. Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Rev. Neurosci.* **34**, 185-204 (2011).
- [11] S. Gandy, S. T. DeKosky. Toward the Treatment and Prevention of Alzheimer's Disease: Rational Strategies and Recent Progress. *Rev. Med.* **64**, 367-383 (2013).
- [12] S. Gauthier, A. Leuzy, E. Racine, P. Rosa-Neto. Diagnosis and management of Alzheimer's disease: past, present and future ethical issues. *Prog. Neurobiol.* **110**, 102-113 (2013).
- [13] J. Hardy. Toward Alzheimer therapies based on genetic knowledge. *Rev. Med.* **55**, 15-25 (2004).
- [14] M. Khan. Molecular interactions of cholinesterases inhibitors using *in silico* methods: current status and future prospects. *N. Biotechnol.* **25**, 331-343 (2009).
- [15] B. Borroni, C. Agosti, G. Martini, R. Volpi, C. Brambilla, L. Caimi, M. Di Luca, A. Padovani. Cholinesterase inhibitors exert a protective effect on endothelial damage in Alzheimer disease patients. *J. Neurol. Sci.* **230**, 211-213 (2005).
- [16] G. Lippens, I. Landrieu, C. Smet, I. Huvent, N. S. Gandhi, B. Gigant, C. Despres, H. Qi, J. Lopez. NMR Meets Tau: Insights into its Function and Pathology. *Biomolecules.* **6**, 1-21 (2016).
- [17] M. Medina, F. Hernández, J. Avila. New features about Tau function and dysfunction. *Biomolecules.* **6**, 1-12 (2016).

- [18] H. Zempel, E. Mandelkow. Lost after translation: missorting of Tau protein and consequences for Alzheimer disease. *Trends Neurosci.* **37**, 721-732 (2014).
- [19] B. Bulic, M. Pickhardt, E. Mandelkow, E. Mandelkow. Tau Protein and Tau Aggregation Inhibitors. *Neuropharmacol.* **59**, 276-289 (2010).
- [20] K. R. Brunden, C. Ballatore, A. Crowe, A. B. Smith, V. M.-Y Lee, J. Q. Trojanowski. Tau-directed drug discovery for Alzheimer's disease and related Tauopathies: a focus on Tau assembly inhibitors. *Exp. Neurol.* **223**, 304-310 (2014).
- [21] B. Lichtenberg-Kraag, E.-M Mandelkow. Isoforms of Tau Protein from Mammalian Brain and Avian Erythrocytes: structure, self-assembly and elasticity. *J. Struct. Biol.* **105**, 46-53 (1990).
- [22] M. Espinoza, R. de Silva, D. W. Dickson, P. Davies. Differential incorporation of Tau isoforms in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* **14**, 1-16 (2008).
- [23] C. M. Wischik, C. R. Harrington, J. M. D. Storey. Tau-aggregation inhibitor therapy for Alzheimer's disease. *Biochem. Pharmacol.* **88**, 529-539 (2014).
- [24] B. De Strooper, R. Vassar, T. Golde. The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* **6**, 99-107 (2010).
- [25] C. L. Allan, K. P. Ebmeier. The influence of ApoE4 on clinical progression of dementia: a meta-analysis. *Int. J. Geriatr. Psychiatry.* **26**, 520-526 (2011).
- [26] M. E. Haj, P. Antoine, P. Amouyel, J. Lambert, F. Pasquier, D. Kapogiannis. Apolipoprotein E (APOE) ϵ 4 and episodic memory decline in Alzheimer's disease: a review. *Ageing Res. Rev.* **27**, 15-22 (2016).
- [27] P. Crabé. Some aspects of steroid research based on natural products from plant origin. *Bull. Soc. Chim. Belg.* **88**, 345-358 (1979).
- [28] A. Rasheed, M. Qasim. A review of natural Steroids and their applications. *IJPSR.* **4**, 520-531 (2013).
- [29] A. V. Baranovskii, V. A. Khripach. Steroids modified at C¹⁵. Synthesis and Spectra-structure correlations. *Russ. J. Gen. Chem.* **81**, 2142-2150 (2011).
- [30] B. Slavíková, Z. Kristofíková, H. Chodounská, M. Buděsínský, F. J. Durán, A. S. Veleiro, G. Burton, A. Kasal. Allopregnanolone (3 α -Hydroxy-5 α -pregnan-20-one) derivatives with a polar chain in position 16 α : synthesis and activity. *J. Med. Chem.* **52**, 2119-2125 (2009).
- [31] A. Khalid, Zaheer-Ul-Haq, M. N. Ghayur, F. Feroz, Atta-Ur-Rahman, A. H. Gilani, M. I. Choudhary. Cholinesterase inhibitory and spasmolytic potential of steroidal alkaloids. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **92**, 477-484 (2004).
- [32] Z. U. Babar, A. Ata, M. H. Meshkatsadat. New bioactive steroidal alkaloids from *Buxus hyrcana*. *Steroids.* **71**, 1045-1051 (2006).
- [33] Atta-Ur-Rahman, F. Feroz, I. Naeem, Zaheer-Ul-Haq, S. A. Nawaz, N. Khan, M. R. Khan, M. I. Choudhary. New pregnane-type steroidal alkaloids from *Sarcococca saligna* and their cholinesterase inhibitory activity. *Steroids.* **69**, 735-741 (2004).
- [34] E. L. Konrath, C. D. S. Passos, L. C. Klein-Júnior, A. T. Henriques. Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Pharm. Pharmacol.* **65**, 1701-1725 (2013).
- [35] M. I. Choudhary, K. P. Devkota, S. A. Nawaz, R. Ranjit, and Atta-ur-Rahman. Cholinesterase inhibitory pregnane-type steroidal alkaloids from *Sarcococca*

- hookeriana*. *Steroids*. **70**, 295-303 (2005).
- [36] K. P. Devkota, J. D. Wansi, B. N. Lenta, M. I. Choudhary, D. P. Kisingau, Q. Naz, Samreen, N. Sewald. Bioactive 5 α -Pregnane-type steroidal alkaloids from *sarcococca hookeriana*. *J. Nat Prod.* **71**, 1481-1484 (2008).
- [37] M. I. Choudhary, K. P. Devkota, S. A. Nawaz, F. Shaheen, Atta-Ur-Rahman. Cholinesterase-inhibiting new steroidal alkaloids from *Sarcococca hookeriana* of nepalese origin. *Helv. Chim. Acta.* **87**, 1099-1108 (2004).
- [38] K. P. Devkota, B. N. Lenta, M. I. Choudhary, Q. Naz, F. B. Fekam, P. J. Rosenthal, N. Sewald. Cholinesterase inhibiting and antiplasmodial steroidal alkaloids from *Sarcococca hookeriana*. *Chem. Pharm. Bull.* **55**, 1397-1401 (2007).
- [39] L. X. Chen, H. He, F. Qiu. Natural withanolides: an overview. *Nat. Prod. Rep.* **28**, 705-740 (2011).
- [40] M. I. Choudhary, S. A. Nawaz, Zaheer-Ul-Haq, M. A. Lodhi, M. N. Ghayur, S. Jalil, N. Riaz, S. Yousuf, A. Malik, A. H. Gilani, Atta-Ur-Rahman. Withanolides, a new class of natural cholinesterase inhibitors with calcium antagonistic properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **334**, 276-287 (2005).
- [41] C. M. Cao, H. Zhang, R. J. Gallagher, B. N. Timmermann. Withanolide artifacts formed in methanol. *J. Nat. Prod.* **76**, 2040-2046 (2013).
- [42] E. Ahmed, S. A. Nawaz, A. Malik, M. I. Choudhary. Isolation and cholinesterase-inhibition studies of sterols from *Haloxylon recurvum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**, 573-580 (2006).
- [43] R. Langjae, S. Bussarawit, S. Yuenyongsawad, K. Ingkaninan, A. Plubrukarn. Acetylcholinesterase-inhibiting steroidal alkaloid from the sponge *Corticium sp.* *Steroids*. **72**, 682-685 (2007).
- [44] Z. D. Yang, D. Z. Duan, W. W. Xue, X. J. Yao, S. Li. Steroidal alkaloids from *Holarrhena antidysenterica* as acetylcholinesterase inhibitors and the investigation for structure-activity relationships. *Life Sci.* **90**, 929-933 (2012).
- [45] G. Jin, Z. Yang, W. Xue, J. Sheng, Y. Shi, X. Yao. Synthesis, biological activity evaluation and molecular modeling study on the new isoconessimine derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. *Chin. J. Chem.* **31**, 1228-1233 (2013).
- [46] K. A. A. Abdul Baqi, A. Ali, M. Asif, A. Mashrai, H. Khanam, A. Sherwani, Z. Yaseen, M. Owais. Synthesis, characterization, biological evaluation and molecular docking of steroidal spirothiazolidinones. *J. Mol. Struct.* **1085**, 104-114 (2015).
- [47] A. Ali, M. Asif, H. Khanam, A. Mashrai, M. A. Sherwani, M. Owais, S. Shamsuzzaman. Synthesis and characterization of steroidal heterocyclic compounds, DNA condensation and molecular docking studies and their *in vitro* anticancer and acetylcholinesterase inhibition activities. *RSC Adv.* **5**, 75964-75984 (2015).
- [48] A. U. Khan, N. Malik, M. Alam, D. U. Lee. Ultrasound-assisted synthesis of benzothiazepines and assessment of their *in vitro* acetylcholinesterase inhibition activity. *Green. Chem. Lett. Rev.* **7**, 158-166 (2014).
- [49] T. Sauvaître, M. Barlier, D. Herlem, N. Gresh, A. Chiaroni, D. Guenard, C. Guillou. New potent acetylcholinesterase inhibitors in the tetracyclic triterpene series. *J. Med. Chem.* **50**, 5311-5323 (2007).
- [50] M. E. García, J. L. Borioni, V. Cavallaro, M. Puiatti, A.B. Pierini, A. P. Murray, A. B. Peñeñory. Solanocapsine derivatives as potential inhibitors of acetylcholinesterase enzyme: synthesis, molecular docking and biological studies. *Steroids*. **104**, 95-110

- (2015).
- [51] Zaheer-ul-Haq, B. Wellenzohn, S. Tonmunphean, A. Khalid, M. I. Choudhary, B. M. Rode. 3D-QSAR Studies on natural acetylcholinesterase inhibitors of *Sarcococca saligna* by comparative molecular field analysis (CoMFA). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**, 4375-4380 (2003).
- [52] Z. Haq, R. Uddin. Structure Based 3D-QSAR Studies on Cholinesterase Inhibitors. *Alzheimer's Disease Pathogenesis-Core Concepts, Shifting Paradigms and Therapeutic Targets*. Capitulo 26, 603-632 (InTech, 2011).
- [53] S. Shankar, M. Sani, G. Terraneo, M. Zanda. Studies towards a novel synthesis of tubulysins: Highly asymmetric aza-Michael reactions of 2-enoylthiazoles with metalated chiral oxazolidinones. *Synlett*, **8**, 1341-1345 (2009).
- [54] A. Y. Rulev. Aza-Michael reaction: achievements and prospects. *Russ. Chem. Rev.* **80**, 197-218 (2011).
- [55] L. W. Xu, C. G. Xia. TMSCl-promoted transition metal-catalyzed aza-Michael reactions of chalcones with carbamates. *Synthesis*. **13**, 2191-2195 (2004).
- [56] S. Kobayashi, K. Kakumoto, M. Sugiura. Transition Metal Salts-Catalyzed Aza-Michael Reactions of Enones with Carbamates. *Org. Lett.* **4**, 1319-1322 (2002).
- [57] D. Perdicchia, K. A. Jørgensen. Asymmetric Aza-Michael Reactions Catalyzed by Cinchona Alkaloids The organocatalysed asymmetric aza-Michael addition of hydrazones to cyclic enones has been achieved in good yield and stereoselection using cheap and commercially available cinchona alkaloid. *J. Org. Chem.* **13**, 3565-3568 (2007).
- [58] C. Munro-Leighton, S. A. Delp, E. D. Blue, T. B. Gunnoe. Addition of N-H and O-H bonds of amines and alcohols to electron-deficient olefins catalyzed by monomeric copper(I) systems: Reaction scope, mechanistic details, and comparison of catalyst efficiency. *Organometallics*. **26**, 1483-1493 (2007).
- [59] J. Lv, H. Wu, e Y. Wang, «Organocatalytic enantioselective aza-Michael additions of N-heterocycles to α,β -unsaturated enones. *Eur. J. Med. Chem.* **11**, 2073-2083 (2010).
- [60] R. Bansal, S. Guleria, S. Thota, S. L. Bodhankar, M. R. Patwardhan, C. Zimmer, R. W. Hartmann, A. L. Harvey. Design, synthesis and evaluation of novel 16-imidazolyl substituted steroidal derivatives possessing potent diversified pharmacological properties. *Steroids*. **77**, 621-629 (2012).
- [61] A. Sethi, D. Shukla, R. P. Singh. Synthesis, spectroscopic characterization of novel 16 α -(3-acetyl phenyl amino)-3 β -hydroxy pregn-5-ene-20-one, its molecular structure, NBO analysis, intramolecular interactions studied by DFT and AIM approach. *J. Mol. Struct.* **1074**, 213-223 (2014).
- [62] M. Kumar, P. Rawat, M. F. Khan, A. K. Rawat, A. K. Srivastava, R. Maurya. Aza-annulation on the 16-dehydropregnenolone, via tandem intermolecular Aldol process and intramolecular Michael addition. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21**, 2232-2237 (2011).
- [63] M. Dubs, R. Krieg, H. Go. Reactions of the four diastereomeric 16-amino-17-hydroxy-3-methoxy-estra-1,3,5(10)-trienes with aromatic ortho-hydroxy and heteroaromatic α -aldehydes and with 1,3-dicarbonyl compounds - molecular structures of condensation products and of copper (II) complexes. *Steroids*. **65**, 305-318 (2000).
- [64] U. Sharma, U. Bora, R. C. Boruah, J. S. Sandhu. Alumina-promoted fast solid-phase Michael addition of enamines with conjugated enones under microwave irradiation. *Tetrahedron Lett.* **43**, 143-145 (2002).

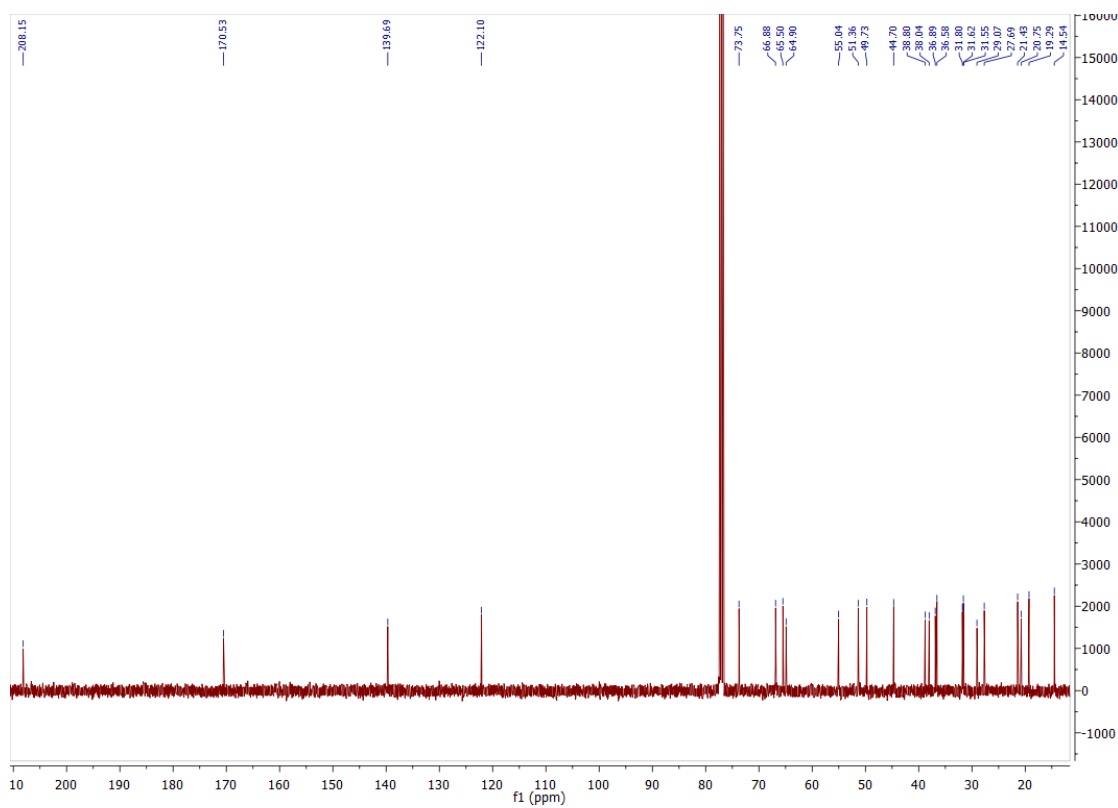
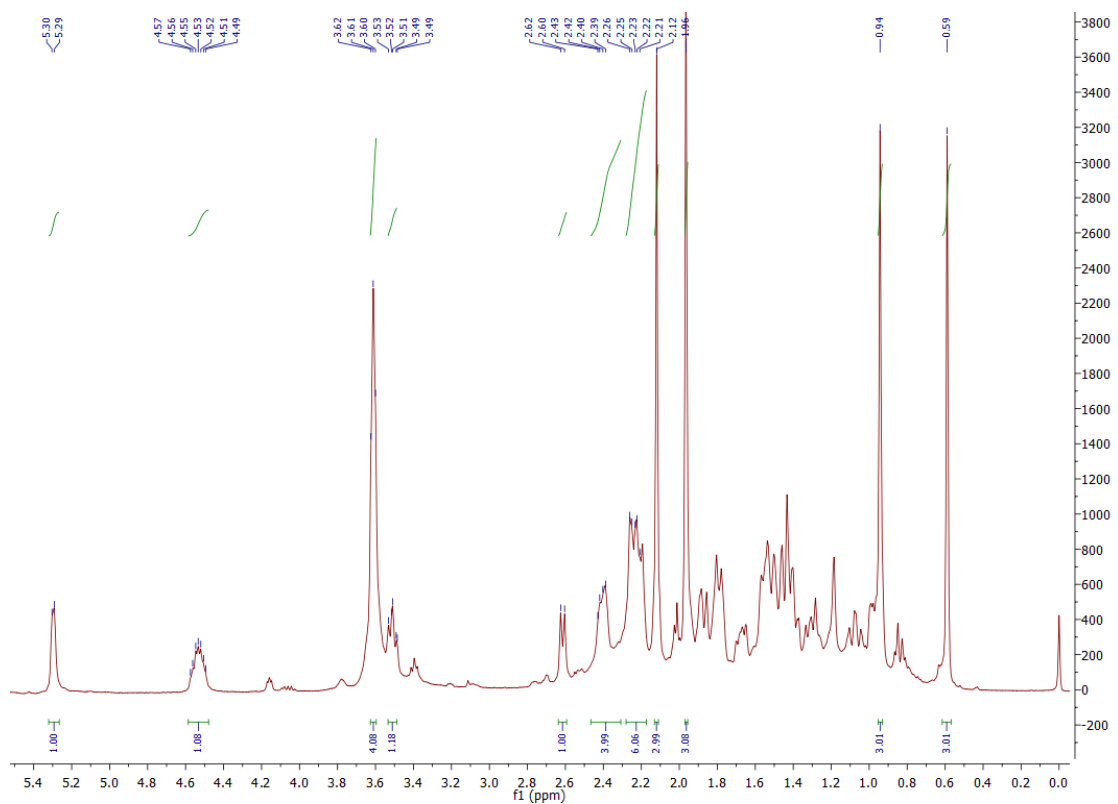
- [65] C. Y. Tseng, J. Tuszynski. A unified approach to computational drug discovery. *Drug Discovery Today*. **20**, 1328-1336 (2015).
- [66] H. Al-Ali. The evolution of drug discovery: from phenotypes to targets, and back. *Med. Chem. Commun.* **7**, 788-798 (2016).
- [67] S. J. Y. Macalino, V. Gosu, S. Hong, S. Choi. Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. *Arch. Pharmacol Res.* **38**, 1686-1701 (2015).
- [68] F. Bretz, M. Branson, C.F. Burman, C. Chuang-Stein, C. S. Coffey. Adaptivity in drug discovery and development. *Drug Dev. Res.* **70**, 169-190 (2009).
- [69] T. Liu, D. Lu, H. Zhang, M. Zheng, H. Yang, Y. Xu, C. Luo, W. Zhu, K. Yu, H. Jiang. Applying high-performance computing in drug discovery and molecular simulation. *Natl Sci Rev.* **3**, 49-63 (2016).
- [70] P. P. Kore, M. M. Mutha, R. V Antre, R. J. Oswal, S. S. Kshirsagar. Computer-Aided Drug Design: An Innovative Tool for Modeling. *OJMC.* **2**, 139-148 (2012).
- [71] R. D. Taylor, P. J. Jewsbury, J. W. Essex. A review of protein-small molecule docking methods. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **16**, 151-166 (2002).
- [72] E. Yuriev, J. Holien, P. A. Ramsland. Improvements, trends, and new ideas in molecular docking: 2012-2013 in review. *J. Mol. Recognit.* **28**, 581-604 (2015).
- [73] E. Yuriev, M. Agostino, P. A. Ramsland. Challenges and advances in computational docking: 2009 in review. *J. Mol. Recognit.* **24**, 149-164 (2011).
- [74] E. Yuriev, P. A. Ramsland. Latest developments in molecular docking: 2010-2011 in review. *J. Mol. Recognit.* **26**, 215-239 (2013).
- [75] B. Q. Wei, L. H. Weaver, A. M. Ferrari, B. W. Matthews, B. K. Shoichet. Testing a flexible-receptor docking algorithm in a model binding site. *J. Mol. Biol.* **337**, 1161-1182 (2004).
- [76] M. Vaqué, A. Ardévol, C. Bladé, M. J. Salvadó, M. Blay, J. Fernández-Larrea, L. Arola, G. Pujadas. Protein-ligand Docking: A Review of Recent Advances and Future Perspectives. *Current Pharmaceutical Analysis.* **4**, 1-19 (2008).
- [77] H. M. Kumalo, S. Bhakat, M. E. S. Soliman. Theory and applications of covalent docking in drug discovery: Merits and pitfalls. *Molecules.* **20**, 1984-2000 (2015).
- [78] R. J. Read, T. N. Hart, M. D. Cummings, S. R. Ness. Monte Carlo algorithms for docking to proteins. *Supramol. Chem.* **6**, 135-140 (1995).
- [79] M. Feher. Consensus scoring for protein-ligand interactions. *Drug Discovery Today.* **11**, 421-428 (2006).
- [80] T. Schulz-Gasch, M. Stahl. Scoring functions for protein-ligand interactions: A critical perspective. *Drug Discovery Today: Technologies.* **1**, 231-239 (2004).
- [81] J. Cheung, E. N. Gary, K. Shiomi, T. L. Rosenberry. Structures of human acetylcholinesterase bound to dihydrotanshinone I and *teritrem B* show peripheral site flexibility. *ACS Med. Chem. Lett.* **4**, 1091-1096 (2013).
- [82] A. V. Reddy, K. Ravinder, T. V. Goud, P. Krishnaiah, T. V. Raju, Y. Venkateswarlu. Bismuth triflate catalyzed conjugate addition of indoles to α,β -enones. *Tetrahedron Lett.* **44**, 6257-6260 (2003).
- [83] E. L. Shapiro, F. Gruen, E. B. Hershberg, B. Y. David. Steroidal Amines. III. 16 α -Amino-Substituted Pregnanes. *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 3158-3163 (1956).
- [84] P. Goswami, S. Hazarika, A. M. Das, P. Chowdhury. Ceric ammonium nitrate (CAN) catalyzed Baeyer-Villiger oxidation of carbonyl compounds, specially 20-oxosteroids.

- Indian J. Chem.* **43**, 1275-1281 (2004).
- [85] S. Wang. Ultrasound-accelerated Michael Addition of Indole to α,β -Unsaturated Ketones Catalyzed by Ceric Ammonium Nitrate (CAN). *Synlett* **13**, 2074-2076 (2003).
- [86] X. Lu, L. Deng. Asymmetric Aza-Michael Reactions of α,β -Unsaturated Ketones with Bifunctional Organic Catalysts. *Angew. Chem. Int. Ed.* **47**, 7710-7713 (2008).
- [87] C. Mukherjee, A. K. Misra. Aza-Michael Addition of Amines to Activated Alkenes Catalyzed by Silica Supported Perchloric Acid Under a Solvent-Free Condition. *Lett. Org. Chem.* **4**, 54-59 (2007).
- [88] H. Hu, Z. Rao, J. Xu, Q. Zhu, H. J. Altenbach, H. Chen, D. Zhou, Y. Xiao, X. Ke, H. Guo, Z. Wu, P. Liu, X. Hu. 16-Morpholino quaternary ammonium steroidal derivatives as neuromuscular blocking agents: Synthesis, biological evaluation and in silico probe of ligand-receptor interaction. *Eur. J. Med. Chem.* **56**, 332-347 (2012).
- [89] M. Garrido, E. Bratoeff, D. Bonilla, J. Soriano, Y. Heuze, M. Cabeza. New steroidal lactones as 5α -reductase inhibitors and antagonists for the androgen receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **127**, 367-373 (2011).
- [90] H. Hajimehdipoor, M. Shekarchi, A. Aghighi. Evaluating the acetylcholinesterase inhibitory activity of *Ferulago angulata* and *Ferulago subvelutina*. *RJP.* **1**, 39-43 (2014).
- [91] H. Kawamoto, Y. Ohmori, M. Maekawa, M. Shimada, N. Mano, e T. Iida. An efficient synthesis of 4α - and 4β -hydroxy-7-dehydrocholesterol, biomarkers for patients with and animal models of the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Chem. Phys. Lipids.* **175-176**, 73-78 (2013).
- [92] P. Ghosh, J. Das, A. Sarkar, S. W. Ng, E. R. T. Tiekink. Oxidation with selenium dioxide: the first report of solvent-selective steroidal aromatization, efficient access to $4\beta,7\alpha$ -dihydroxy steroids, and syntheses of natural diaromatic ergosterols. *Tetrahedron.* **68**, 6485-6491 (2012).
- [93] A. K. Goodenough, J. M. Onorato, Z. Ouyang, S. Chang, A. D. Rodrigues, S. Kasichayanula, S. P. Huang, W. Turley, R. Burrell, M. Bifano, M. Jemal, F. Lacreata, A. Tymiak, D. Wang-Iverson. Quantification of 4- β -hydroxycholesterol in human plasma using automated sample preparation and LC-ESI-MS/MS analysis. *Chem. Res. Toxicol.* **24**, 1575-1585 (2011).
- [94] W. a. Turley, R. C. Burrell, S. J. Bonacorsi, A. K. Goodenough, J. M. Onorato. Synthesis of [D4]- and [D7]- 4β -hydroxycholesterols for use in a novel drug-drug interaction assay. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **55**, 61-65 (2012).
- [95] O. Rosenheim, W. W. Starling Action of Selenium Dioxide on Sterols and Bile Acids. Part III. Cholesterol. *J. Chem. Soc.* 377-384 (1936).
- [96] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, R. M. Featherstone. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88-95 (1961).

7. Anexos

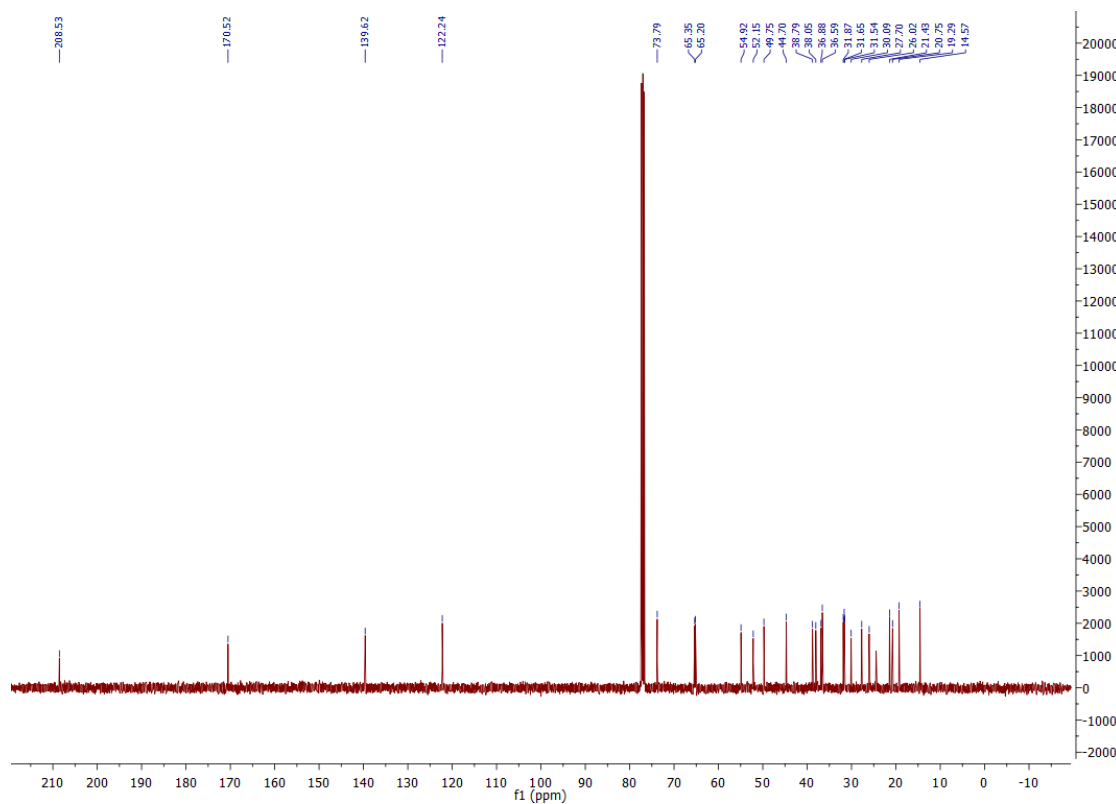
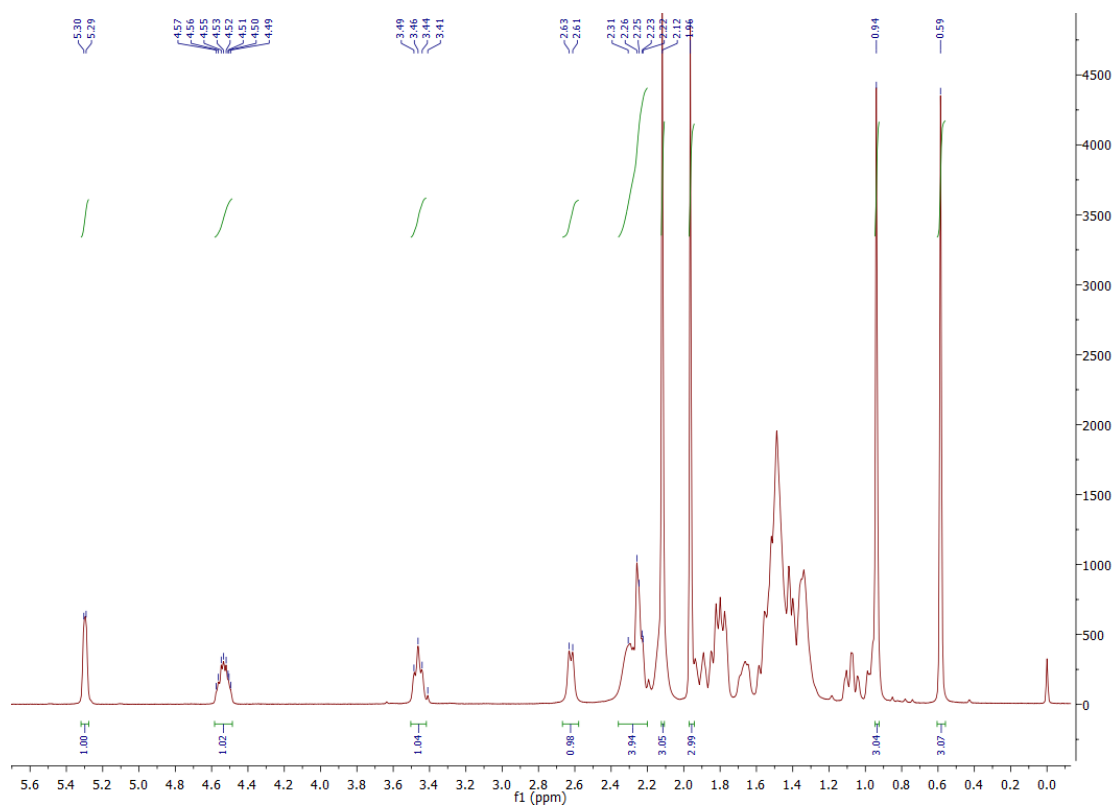
7.1. Anexo 1

Espectros RMN ^1H e ^{13}C do composto 20



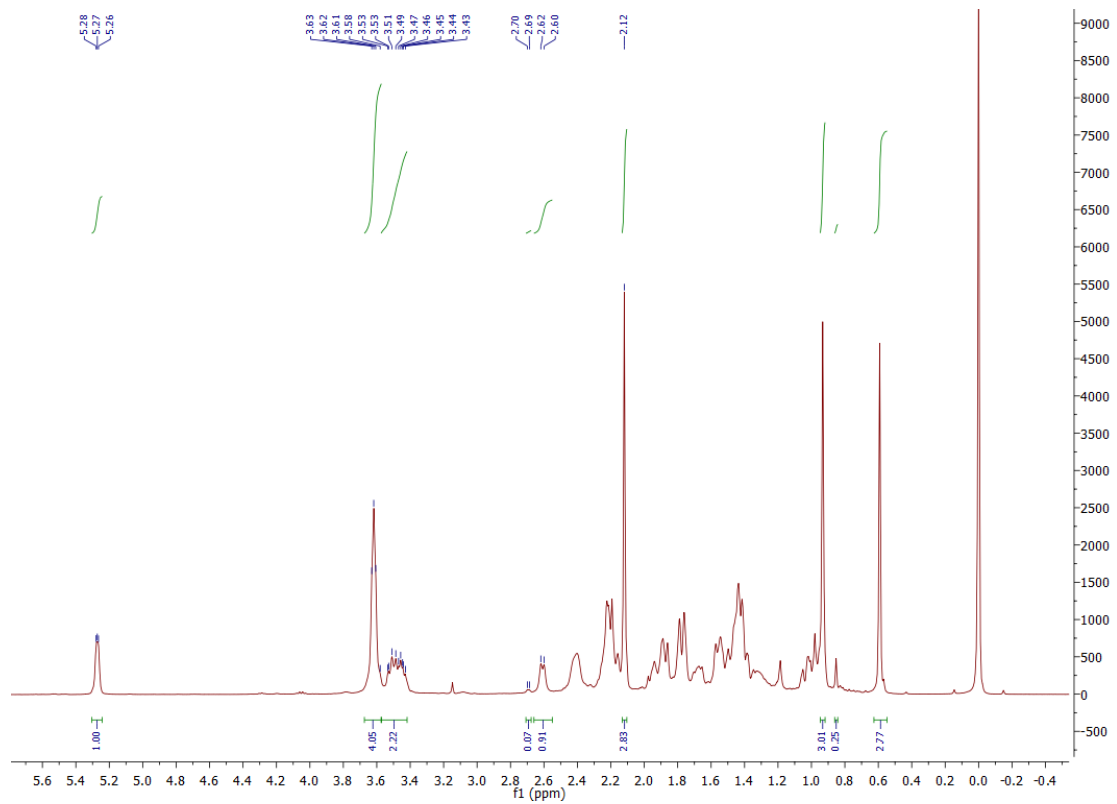
7.2. Anexo 2

Espectros RMN ^1H e ^{13}C do composto 26



7.3. Anexo 3

Espectro RMN ^1H do composto 21



7.4. Anexo 4

Espectro RMN ^1H do composto 22

