



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

**Estudos de funcionalização oxidativa e por adição
de Michael de esteroides pregnanos e sua
aplicação no desenvolvimento de potenciais
fármacos quimioterápicos**

Octávio da Silva Ferreira

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

Orientador: Professor Doutor Samuel Martins Silvestre

Covilhã, outubro de 2017

À minha mãe, **Licinia Ferreira**,
ao meu pai, **Rui Ferreira**,
à minha **família**,
aos meus **amigos**.

*“Neste trilho eu caminhei com um propósito
sem receio ou falta de motivação,
num ambiente deveras inóspito
que me fez ser persistente,
sem nunca desistir do que queria alcançar.*

*Na dificuldade se adquire a inteligência,
na inteligência se conquista a vontade.
A vontade foi a minha essência,
o que me manteve consciente,
sem sequer ter tempo para pensar.*

No final tudo valeu a pena.”

Octávio Ferreira, 26/09/2017

Agradecimentos

No caminho trilhado ao longo deste ano, poucas serão sempre as palavras de agradecimento que deixo a todas as pessoas que tornaram isto possível. Aliás, nalguns casos o que está escrito neste pedaço de papel não chega para demonstrar toda a minha gratidão.

Ao meu orientador, o Professor Doutor Samuel Martins Silvestre, primeiro por ter aceite orientar-me nesta etapa, na realização deste trabalho de investigação, e em segundo por ter empregue o seu conhecimento e inteligência na minha orientação. Adicionalmente, também não posso deixar de agradecer toda a confiança que depositou em mim.

À Dra. Raquel Agostinho pela ajuda e gentilmente disponibilizar alguns dos compostos que foram imprescindíveis para a realização desta dissertação

À minha família, em especial aos meus pais, Licínia Ferreira e Rui Ferreira, que, muito provavelmente, receberam o agradecimento mais especial e sentido em todo este texto por ... tudo. Considerando o meu enorme orgulho, a minha enorme ingenuidade e potencial e a minha enorme teimosia posso dizer com toda as minhas convicções que uma pessoa como eu não é fácil de tolerar, muito menos guiar ao longo de uma vida. A vida é uma constante aprendizagem para qual ninguém está preparado e vocês são as melhores pessoas com as quais poderia aprender a vivê-la, sem qualquer sombra de dúvidas.

Às pessoas que me acompanharam no laboratório, e não só, ao longo deste processo. À Vanessa de Brito e à Sara Garcia deixo aqui um lugar de destaque por todos os conselhos prestados, por toda a ajuda e, acima de tudo por me terem feito crescer com a vossa dedicação. Às “minhas colegas de laboratório”, Alexandra Coimbra e Anabela Santos pela sua companhia, pelos diálogos, pelo apoio e pelos serões de fim de semana. À Margarida Lorigo um sincero reconhecimento pela sua preocupação. À Carmo Santos por toda a sua simpatia e energia. À Mafalda Jesus pela sua positividade e destreza. À Mariana Matias por todos os ensinamentos. À Mafalda Catarro pela paciência e capacidade de trabalho, um exemplo a seguir. À Joana Figueiredo e ao João Serrano pelo conhecimento partilhado. À Ana Silva por todos os diálogos interessantes e motivacionais. Por último, neste capítulo um agradecimento especial ao Filipe Lopes por toda a boa disposição, ajuda e companhia neste processo.

À Adriana Coelho, à Beatriz Moleirinho, à Carina Caminho e à Inês Feliciano por mais do que aquilo que eu merecia. Acho que sabem a consideração que tenho por vocês e o quão grato estou por todos os serões passados com vossas excelências nas “inúmeras” vezes que vou a Leiria. Mais do que um grande obrigado para vocês.

A todas amigadas que desenvolvi na Covilhã. Neste contexto, deixo aqui um especial agradecimento à Cristina Filipa Costa, ao Marco Almeida, à Maria Gomes Baptista, à Maria Antónia Costa e à Mariana Lucas. Considerando que não mereço toda a vossa dedicação e amizade poucas são as palavras que tenho para descrever o acompanhamento que fizeram à

minha vida acadêmica. Aos sermões de alguns, às insistências de outros, à vossa paciência para dar a quem nunca quer receber. Simplesmente, eu não consigo exprimir toda a minha gratidão.

À Marcela Alves, ao Bruno Tavares, à Carla Sofia, à Maria Gomes, à Cristiana Cruz, ao Tomás Santos, à Margarida Vinhas e à Catarina Batista. A todos vocês agradeço pela consideração que têm por mim e por, de uma maneira especial, deixarem-me fazer parte da vossa vida acadêmica e não só.

A todos os meus colegas de curso, tanto de licenciatura como de mestrado que foram imprescindíveis nesta caminhada.

A todas as pessoas que se cruzaram comigo na minha caminhada e que, de uma maneira ou de outra, me fizeram crescer.

OBRIGADO

Octávio da Silva Ferreira

Prefácio

Este documento tem o propósito de descrever a investigação realizada no âmbito da minha dissertação para a obtenção do grau de mestre em Química Medicinal. Esta dissertação está dividida em cinco capítulos.

O primeiro capítulo explana uma contextualização do propósito deste trabalho. Neste sentido, é destacada a importância dos esteroides a nível terapêutico, a preponderância e porquê de ser necessária uma maior aposta na química verde na síntese de compostos quimioterápicos e uma breve abordagem a processos sintéticos de funcionalização de esteroides altamente associados a síntese de derivados destas moléculas com potencial terapêutico, a oxidação alílica e a adição de Michael. Adicionalmente, é abordada a importância crescente do uso de ferramentas computacionais, como o *Docking* Molecular na otimização do processo de descoberta e desenvolvimento de novas entidades químicas com propriedades terapêuticas. Um foco em neoplasias também é um dos pontos deste capítulo, nomeadamente os tumores hormono-dependentes.

O segundo capítulo aborda as diretrizes que estiveram na base da realização deste trabalho. Os focos deste trabalho prenderam-se com o estudo de processo de reações de funcionalização oxidativa de esteroides, a produção de novas moléculas com potencial terapêutico, a avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos compostos sintetizados e estudo computacional da sua interação com recetores associados a neoplasias malignas hormono-dependentes. Os resultados obtidos da investigação realizada são descritos e analisados no capítulo três deste documento.

No quarto capítulo estão escritas as conclusões obtidas com a realização deste trabalho e as suas perspetivas futuras. No quinto capítulo todas as metodologias utilizadas ao longo deste último ano estão devidamente descritas.

Resumo

Os esteroides são compostos que são utilizados na terapêutica e são extremamente importantes a nível endógeno no controlo do crescimento e diferenciação celular. Assim, a síntese destas moléculas e a sua otimização é preponderante para se conseguir obter estas entidades químicas de forma eficiente. Uma das transformações mais usadas na sua funcionalização é a oxidação, nomeadamente a oxidação alílica de alcenos às correspondentes enonas. Os esteroides da série pregnano têm elevado potencial na descoberta de novas moléculas com atividade terapêutica, visto que a pregnenolona é um dos precursores dos esteroides endógenos. Neste contexto, esteroides pregnanos oxidados, nomeadamente Δ^5 -7-oxoesteroides, e funcionalizados com heterociclos, nomeadamente o indole, têm sido bastante estudados, tendo potencial para o tratamento de neoplasias malignas.

Assim, neste trabalho, realizaram-se estudos de funcionalização oxidativa por oxidação alílica de Δ^5 -esteroides a Δ^5 -7-oxoesteroides. Adicionalmente, também se estudou a funcionalização de Δ^5 -7-oxoesteroides com o núcleo indole por adição de Michael, uma reação que tem ganho um crescente destaque na síntese de esteroides com propriedades terapêuticas. Estudos de avaliação biológica da citotoxicidade dos compostos produzidos, os seus substratos e os seus derivados hidroxilados em C3 também foram desenvolvidos numa linha celular de cancro da próstata (PC-3) e numa linha celular de células normais (NHDF). Por último, foi realizado o *docking* molecular dos compostos com recetores hormonais comumente associados a tumores: recetores de estrogénios, recetores de progesterona e recetores de androgénios.

No estudo de processo da oxidação alílica dos Δ^5 -esteroides, concretamente o acetato de 16-desidropregnenolona (16-DPA) e o acetato de pregnenolona (AP), a Δ^5 -7-oxoesteroides, os resultados obtidos demonstraram que no conjunto de oxidantes e catalisadores testados, o melhor sistema para realizar a transformação química pretendida revelou ser o *t*-BuOOH/BiCl₃. No caso do 16-DPA, também ocorreu a epoxidação da insaturação presente em C16=C17. Nas reações com Bi(OTf)₃.xH₂O ocorreu simultaneamente a oxidação alílica em C7 e a hidrólise do grupo acetoxilo em C3 a grupo hidroxilo. Adicionalmente, foram realizados estudos sobre o mecanismo reacional com o radical TEMPO. Os resultados da funcionalização de Δ^5 -7-oxoesteroides com o núcleo indole por adição de Michael permitiram a obtenção do composto **6** que demonstrou uma citotoxicidade marcada nos ensaios de citotoxicidade. Os Δ^5 -7-oxoesteroides, os seus precursores e os derivados hidroxilados em C3 revelaram alguma seletividade de citotoxicidade para células cancerígenas. Os resultados obtidos no *docking* molecular demonstraram a potencial importância da funcionalização oxidativa de esteroides na sua interação com os recetores hormonais endógenos.

Palavras chave

Oxidação alílica, adição de Michael, Δ^5 -esteroides, Δ^5 -7-oxoesteroides, citotoxicidade.

Abstract

Steroids are compounds which are used in therapeutics and are extremely important at the endogenous level in controlling cell growth and differentiation. Thus, the synthesis of these molecules and their optimization is preponderant in order to efficiently obtain these chemical entities. One of the most used transformations in their functionalization is the oxidation, namely the allylic oxidation of alkenes to the corresponding enones. Pregnane steroids have a high potential in the discovery of new molecules with therapeutic activity, because pregnenolone is one of the precursors of endogenous steroids. In this context, oxidized pregnane steroids, namely Δ^5 -7-oxosteroids, and functionalized with heterocycles, namely indole, have been amply studied, by having potential for the treatment of malignant neoplasms.

Thus, in this work, studies of oxidative functionalization by allylic oxidation of Δ^5 -steroids to Δ^5 -7-oxosteroids were carried out. In addition, functionalization of Δ^5 -7-oxosteroids with the indole nucleus was also studied by Michael addition, a reaction that has gained increasing prominence in the synthesis of steroids with therapeutic properties. Biological studies of evaluation of the cytotoxicity of the compounds produced, their substrates and their hydroxylated C3 derivatives have also been developed in a prostate cancer cell line (PC-3) and a normal cell line (NHDF). Finally, were performed the molecular docking of the compounds with hormone receptors commonly associated with tumors: estrogen receptors, progesterone receptors and androgen receptors.

In the study of the process of allylic oxidation of Δ^5 -steroids, namely 16-dehydropregnenolone acetate (16-DPA) and pregnenolone acetate (PA), to Δ^5 -7-oxosteroids, the results obtained showed that on set of oxidants and catalysts tested, the best system for performing the desired chemical transformation was *t*-BuOOH/BiCl₃. In the case of 16-DPA, also occurred an epoxidation of the unsaturation present in C16=C17. In the reactions with Bi(OTf)₃.xH₂O occurred simultaneously the allylic oxidation at C7 and the hydrolysis of the acetoxy group at C3 to hydroxyl. In addition, reactional mechanistic studies were carried out with the radical TEMPO. The results of the functionalization of Δ^5 -7-oxosteroids with the indole nucleus by Michael addition allowed an attainment of compound **6** demonstrating an marked cytotoxicity. The Δ^5 -7-oxosteroids, their precursors and the C3 hydroxylated derivatives revealed some selectivity for cytotoxicity to cancer cells. The results obtained in molecular docking demonstrated the potential importance of oxidative functionalization of steroids in their interaction with endogenous hormone receptors.

Keywords

Allylic oxidation, Michael addition, Δ^5 -steroids, Δ^5 -7-oxosteroids, cytotoxicity.

Índice

Lista de Figuras	xiv
Lista de Tabelas	xv
Lista de Esquemas	xvi
Lista de Gráficos	xvii
Lista de Acrónimos, Abreviaturas e Símbolos	xviii
Capítulo I - Introdução	1
I.1) Generalidades estruturais e relevância terapêutica dos esteroides	1
I.2) Preparação e funcionalização química de esteroides	3
I.2.1) Formas gerais de produção de esteroides	3
I.2.2) Oxidação de esteroides	5
I.2.2.1) Importância biológica e sintética	5
I.2.2.2) Oxidação alílica	8
I.2.3) Adição nucleofílica em esteroides	9
I.2.3.1) Importância biológica e sintética	9
I.2.3.2) Adição de Michael	11
I.2.4) A química verde na preparação e funcionalização de esteroides	13
I.3) Esteroides úteis no tratamento de câncros	16
I.4) <i>Design</i> de fármacos assistido por computador	18
Capítulo II - Objetivos	20
Capítulo III - Resultados e discussão de resultados	21
III.1) Síntese Química	21
III.1.1) Estudo de processo da oxidação alílica de Δ^5 -esteroides	21
III.1.1.1) Oxidação do acetato de 16-desidropregnenolona 1	22
III.1.1.2) Oxidação do acetato de pregnenolona 2	25
III.1.2) A adição de Michael do núcleo indole a esteroides pregnanos	27
III.2) Ensaio de avaliação biológica	31
III.3) <i>Docking</i> Molecular	34
III.3.1) Validação do método	35
III.3.2) <i>Docking</i> dos compostos com os recetores	36
Capítulo IV - Conclusão e perspectivas futuras	44
Capítulo V - Materiais e métodos	47
V.1) Síntese Química	47
V.1.1) Generalidades	47
V.1.2) Reações de oxidação	48
V.1.2.1) Acetato de 16-desidropregnenolona 1	48

V.1.2.1.1) Oxidação com hidroperóxido de <i>t</i> -butilo (solução 5,0-6,0 M em <i>n</i> -decano) e tricloreto de bismuto	48
V.1.2.1.2) Oxidação com hidroperóxido de <i>t</i> -butilo (solução 5,0-6,0 M em <i>n</i> -decano) e oxiclureto de bismuto	49
V.1.2.1.3) Oxidação com hidroperóxido de <i>t</i> -butilo (solução 5,0-6,0 M em <i>n</i> -decano) e triflato de bismuto	50
V.1.2.1.4) Oxidação com hidroperóxido de <i>t</i> -butilo (solução aquosa a 70% em água) e tricloreto de bismuto	50
V.1.2.1.5) Oxidação com hidroperóxido de <i>t</i> -butilo (solução 5,0-6,0 M em <i>n</i> -decano) e hidróxido de Paládio(II) numa matriz de carvão	50
V.1.2.1.6) Oxidação com peróxido de hidrogénio (solução aquosa a 30 % (v/v) em água)	51
V.1.2.1.7) Oxidação com hidroperóxido de cumeno e tricloreto de bismuto	51
V.1.2.1.8) Oxidação com hidroperóxido de <i>t</i> -butilo (solução 5,0-6,0 M em <i>n</i> -decano), tricloreto de bismuto(III) e TEMPO	52
V.1.2.2) Acetato de pregnenolona 3	52
V.1.2.2.1) Oxidação com hidroperóxido de <i>t</i> -butilo (solução 5,0-6,0 M em <i>n</i> -decano) e tricloreto de bismuto	52
V.1.2.2.2) Oxidação com hidroperóxido de <i>t</i> -butilo (solução 5,0-6,0 M em <i>n</i> -decano) e oxiclureto de bismuto	53
V.1.2.2.3) Oxidação com hidroperóxido de <i>t</i> -butilo (solução 5,0-6,0 M em <i>n</i> -decano) e triflato de bismuto	54
V.1.2.2.4) Oxidação com hidroperóxido de <i>t</i> -butilo (solução aquosa a 70% em água) e tricloreto de bismuto	54
V.1.2.2.5) Oxidação com peróxido de hidrogénio (solução aquosa a 30 % (v/v) em água) e tricloreto de bismuto	54
V.1.2.2.6) Oxidação com hidroperóxido de cumeno e tricloreto de bismuto	55
V.1.2.2.7) Oxidação com hidroperóxido de <i>t</i> -butilo (solução 5,0-6,0 M em <i>n</i> -decano), tricloreto de bismuto e TEMPO	55
V.1.3) Reações de hidrólise	56
V.1.3.1) Acetato de 16-desidropregnenolona 1	56
V.1.3.2) Acetato de 16 α ,17 α -epoxi-7-oxo-pregnenolona 2	56
V.1.3.3) Acetato de pregnenolona 3	57
V.1.3.4) Acetato de 7-oxopregnenolona 4	57
V.1.4) Reações de adição de Michael	57
V.1.4.1) Progesterona	57
V.1.4.2) Acetato de 16-desidropregnenolona 1	57
V.1.4.3) Acetato de 16 α ,17 α -epoxi-7-oxo-pregnenolona 2	58
V.1.4.4) Acetato de 7-oxo-pregnenolona 4	58
V.1.5) Acetilação da 16 α ,17 α -epoxipregnenolona 10	58

V.2) Avaliação Biológica	59
V.2.1) Culturas celulares	59
V.2.2) Soluções dos compostos - preparação e armazenamento	59
V.2.3) Ensaio de proliferação celular - procedimentos	60
V.2.3.1) Tratamento das células com os compostos	60
V.2.3.2) Ensaio de MTT	60
V.3) Estudos de <i>Docking</i> Molecular	61
V.3.1) Preparação da proteína	61
V.3.2) Preparação dos ligandos	61
V.3.3) Definição e mapeamento da Grid	61
V.3.4) <i>Docking</i> Molecular - simulação computacional	62
Bibliografia	63
Anexos	73
Anexo 1 - Dados espectrais do composto 6	73
Anexo 2 - Comunicações	77

Lista de Figuras

Figura 1: Núcleo esteroide básico (série gonano);	1
Figura 2: Estrutura da 7-oxopregnenolona 5 ;	27
Figura 3: Estrutura e a atribuição de números e letras ao composto 4 (à esquerda) e ao núcleo indole (à direita);	28
Figura 4: Interações do 17 β -estradiol (17BE) com o recetor de estrogénios (RE) no sítio ativo;	38
Figura 5: Interações entre a 16-desidropregnenolona 7 e o RE no sítio ativo;	38
Figura 6: Interações entre a 7-oxopregnenolona 5 (A) e a 16 α ,17 α -epoxipregnenolona 11 e o RE no sítio ativo;	39
Figura 7: Interações da progesterona (P) com o recetor de progesterona (RP) no sítio ativo;	40
Figura 8: Interações entre o acetato de pregnenolona 3 e o RP no sítio ativo;	41
Figura 9: Interações entre o acetato de 16 α ,17 α -epoxipregnenolona 10 e o RP no sítio ativo;	41
Figura 10: Interações da testosterona (T) com o recetor de androgénios (RA) no sítio ativo;	42
Figura 11: Interações entre o acetato de 16-desidropregnenolona 1 e o RA no sítio ativo;	43
Figura 12: Interações entre o acetato de 7-oxopregnenolona 4 e o RA no sítio ativo;	43

Lista de Tabelas

Tabela 1: Núcleos das principais subclasses de esteroides;	2
Tabela 2: Exemplos de oxoesteroides com potencial utilização na terapia anticancerígena;	5-7
Tabela 3: Exemplos de esteroides com atividade biológica obtidos por adição de Michael;	10-11
Tabela 4: Condições oxidativas utilizadas nas reações de oxidação alílica com o substrato 16-DPA 1;	22
Tabela 5: Condições reacionais das reações de oxidação alílica com o composto 3;	26
Tabela 6: Atribuição de sinais dos espectros de ¹ H RMN e ¹³ C RMN do composto 6;	29
Tabela 7: Estrutura dos compostos utilizados no ensaio de MTT de avaliação de citotoxicidade;	32
Tabela 8: Valores de IC ₅₀ (µM) estimados para os compostos que apresentaram uma viabilidade celular (%) inferior a 50 % nos ensaios de screening nas linhas celulares NHDF e PC-3;	34
Tabela 9: Resultados do <i>docking</i> de validação com o algoritmo genético (AG) no AutoDockTools;	36
Tabela 10: Resultados do <i>docking</i> de validação dos recetores cristalizados por raio-x com os ligandos co-cristalizados;	36
Tabela 11: Energias de ligação (E de ligação) obtidas para cada composto no <i>docking</i> com os recetores de estrogénios (RE), progesterona (RP) e androgénios (RA);	37
Tabela 12: Recetores usados no <i>docking</i> molecular, os respetivos códigos PDB e o seu ligando principal;	61
Tabela 13: Coordenadas e especificações da Grid para cada recetor;	62
Tabela 14: Parâmetros usados no <i>Docking</i> Molecular - variações para cada recetor;	62

Lista de Esquemas

Esquema 1: Processo sintético do acetato de 16-desidropregnenolona (16-DPA) a partir da Diosgenina ou Solasodina;	4
Esquema 2: Esquema reacional da oxidação alílica de Δ^5 -esteroides aos correspondentes Δ^5 -7-oxoesteroides;	9
Esquema 3: Adição nucleofílica do indole à progesterona;	13
Esquema 4: Esquema reacional da oxidação alílica e epoxidação do acetato de 16-desidropregnenolona 1 a acetato de 16 α ,17 α -epoxi-7-oxo-pregnenolona 3 ;	23
Esquema 5: Esquema reacional da oxidação alílica e epoxidação do acetato de pregnenolona 2 a acetato de 7-oxo-pregnenolona 4 ;	26
Esquema 6: Formação de cristais de Formazano a partir da redução do MTT em células viáveis;	31

Lista de Gráficos

Gráfico 1: Resultados do ensaio de MTT de *screening* nas NHDF e nas PC-3 onde se evidencia a proliferação celular relativa em cada linha celular após a incubação de 72h com os compostos a 30 μM ; 33

Lista de Acrónimos, Abreviaturas e Símbolos

¹ H RMN	Ressonância Magnética Nuclear de próton
5αDHT	Dihidrotestosterona
5αR	5α-redutase
5-FU	5-Fluorouracilo
7-oxoDHEA	7-oxo-desidroepiandrosterona
¹³ C RMN	Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13
16-DPA	Acetato de 16-desidropregnenolona
17βE	17β-estradiol
Ab	Antibiótico antimicótico de penicilina G, streptomina e anfotericina B
AG	Algoritmo Genético
ATR	do inglês <i>Attenuated Total Reflectance</i>
BISTRO	1,8-bis(trimetilsilil)octa-2,6-dieno
CADD	do inglês <i>Computer Aided Drug Design</i>
CCF	Cromatografia em Camada Fina
CCR	Curva Concentração-Resposta
CM	Cancro da Mama
COSY	do inglês <i>COrelations Spectroscopy</i>
CP	Cancro da Próstata
CYP17A1	Aromatase
CumOOH	Hidroperóxido de cumeno
DEPT	do inglês <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DHEA	Desidroepiandrosterona
DLL	Domínio de ligação do ligando
DM	<i>Docking</i> Molecular
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPP-IV	Dipeptidil peptidase 4
E	Energia
EDTA	do inglês <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
FA	Fase aquosa
FBS	do inglês <i>Fetal Bovine Serum</i>
FO	Fase orgânica
HEPES	2-[4-(2-hidroxi etil)piperazin-1-il]etanosulfonato
HMBC	do inglês <i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation Spectroscopy</i>
HSQC	do inglês <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy</i>
IC ₅₀	Concentração de composto que induz metade do efeito máximo

IH	Interações Hidrofóbicas
IV	Espetro de Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
MeOH	Metanol
MTT	Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazólio
NHDF	do inglês <i>Normal Human Dermal Fibroblasts</i>
NHPI	<i>N</i> -hidroxiftalimida
P	Progesterona
PC-3	do inglês <i>Prostate Cancer</i>
PCC	Clorocromato de piridínio
PBS	do inglês <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PDB	do inglês <i>Protein Data Bank</i>
PDC	Dicromato de piridínio
p.f.	Ponto de fusão
PgP	Glicoproteína-P
PH	Pontes de Hidrogénio
ppm	Partes por milhão, unidade de desvio químico
RA	Recetor de androgénios
RE	Recetor de estrogénios
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RN	Recetores Nucleares
RP	Recetor de progesterona
SI	Sistema Internacional de Unidades
Sp	Antibiótico de penicilina G e streptomina
T	Testosterona
TA	Temperatura Ambiente
<i>t</i> -BuOOH	<i>t</i> -butilhidroperóxido
<i>t</i> -BuOOH _{aq}	Hidroperóxido de <i>t</i> -butilo em solução aquosa
<i>t</i> -BuOOH _s	hidroperóxido de <i>t</i> -butilo em solução 5,0-6,0 M de <i>n</i> -decano
TEMPO	2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi
TMS	Tetrametilsilano

Capítulo I - Introdução

I.1) Generalidades estruturais e relevância terapêutica dos esteroides

Os esteroides são uma classe de compostos que apresenta uma estrutura rígida e inúmeras propriedades terapêuticas tendo, por isso, uma grande importância na indústria farmacêutica [1a,1b]. A sua estrutura base é um ciclopentanoperidrofenantreno (Figura 1) que compreende quatro anéis fundidos [1b,2a]. Comumente, os esteroides também apresentam grupos metilo angulares em C10 e C13, o 19-CH₃ e o 18-CH₃, respectivamente, e uma cadeia lateral alquilo variável em C17. Os grupos metilo, estereoquimicamente, apresentam-se acima do plano e têm uma configuração B. Outros átomos ou substituintes que se apresentem acima do plano também têm configuração B, enquanto que os que se apresentam abaixo do plano têm configuração α [1-2a,3,4].

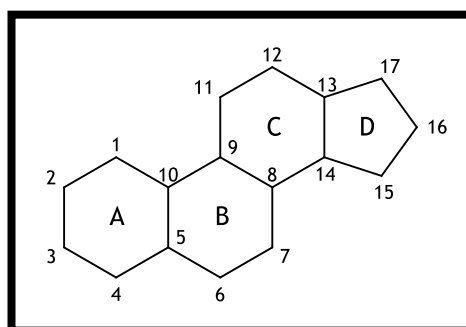


Figura 1: Núcleo esteroide básico (série gonano) [1].

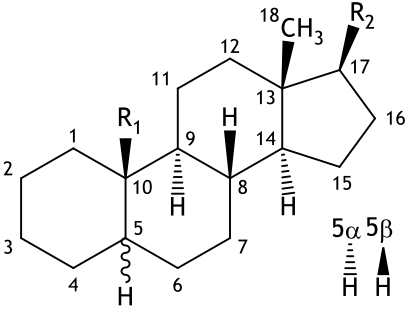
A atividade biológica dos esteroides pode ser significativamente alterada dependendo de alterações estruturais no seu esqueleto [1a,1b,2a]. Os esteroides biologicamente ativos pertencem a subclasses, nomeadamente, estranos (18 carbonos), androstanos (19 carbonos) e pregnanos (21 carbonos). Adicionalmente, os colanos (24 carbonos) e os colestanos (27 carbonos) constituem outras duas subclasses de esteroides com propriedades terapêuticas provenientes maioritariamente de fontes naturais (Tabela 1) [1b,2a]. Estas moléculas têm uma grande importância fisiológica e patológica, o que fomenta um elevado interesse nestes compostos na descoberta de novos agentes terapêuticos [1c].

Os adrenocorticóides são esteroides da série pregnano presentes no nosso organismo e a sua síntese ocorre no córtex adrenal. Alguns exemplos de esteroides pertencentes a esta classe são a cortisona e a progesterona [1b].

A pregnenolona é um esteroide formado endogenamente através da clivagem oxidativa da cadeia lateral do colesterol, na sua maioria, nas glândulas suprarrenais. Esta molécula é um

dos principais precursores da síntese dos esteroides que apresentam atividade biológica, os adrenocorticóides. Os adrenocorticóides estão subdivididos em três famílias: os glucocorticóides, os mineralocorticóides e os androgénios adrenais. Os androgénios adrenais, por sua vez, permitem a formação dos estrogénios e androgénios, as hormonas sexuais [1c].

Tabela 1: Núcleos das principais classes de esteroides [1b,1c].

	R ₁	R ₂	Subclasse
	H	H	Estrano
	CH ₃	H	Androstano
	CH ₃	20, 21	Pregnano
	CH ₃	20, 21, 22, 23, 24	Colano
	CH ₃	20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27	Colestano

A ação dos esteroides ocorre, principalmente, através da sua interação com os recetores intracelulares para os quais apresentam elevada afinidade. Esta interação permite a formação de complexos esteroide-recetor que migram para o núcleo da célula. No núcleo, estes complexos atuam como fatores de transcrição, o que permite a regulação da transcrição genómica e da síntese proteica e, conseqüentemente, o controlo do crescimento e da diferenciação celular. Outro facto importante relativamente a estes compostos é a sua elevada lipofilicidade. Esta característica permite o seu fácil transporte pelo organismo, através da ligação a proteínas transportadoras presentes na corrente sanguínea (como por exemplo, a albumina) e facilita também a sua travessia de membranas no organismo (como por exemplo, a membrana citoplasmática) [1b].

O panorama acima apresentado corrobora a indubitável importância a nível terapêutico destes compostos e, conseqüentemente, dos seus derivados. Atualmente, estes compostos são utilizados no tratamento de doenças reumatóides, do foro pulmonar (como por exemplo, a asma), de alergias e, cada vez mais, na terapia anticancerígena [1].

I.2) Preparação e funcionalização química de esteroides

I.2.1) Formas gerais de produção de esteroides

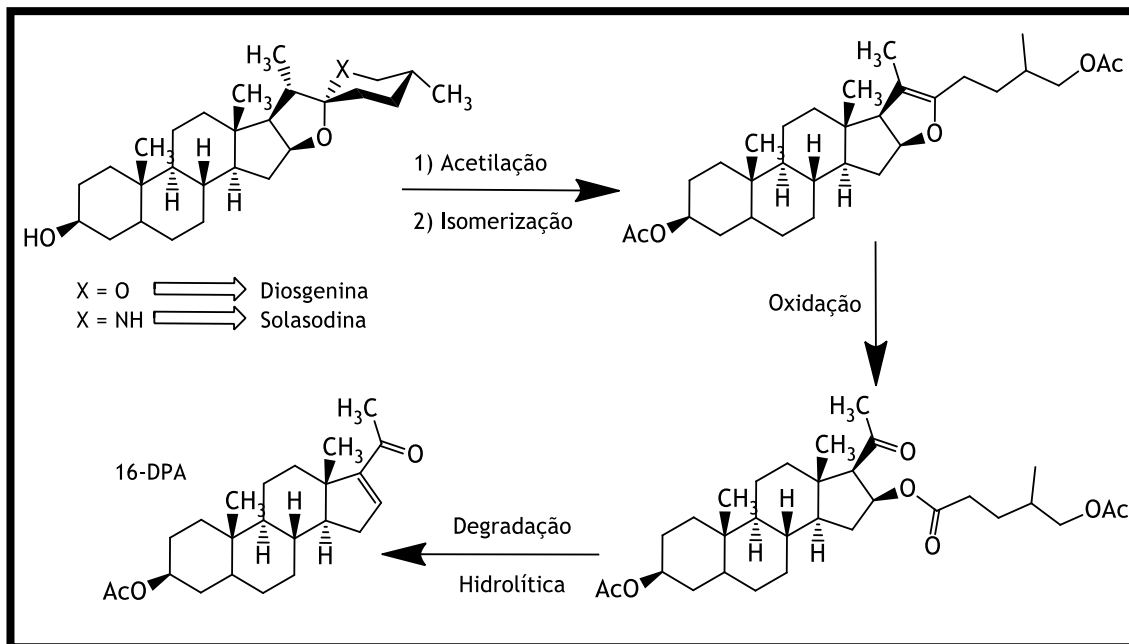
Os esteroides apresentam vários centros quirais, pelo que a sua síntese total envolve a utilização de muitos processos reacionais estereoseletivos. Alguns exemplos são a anelação de Robinson com uma metilvinilcetona na síntese da cortisona, reações com reagentes de *Grignard* na síntese do cortisol [5], reações de *Friedel-Craft* e de *Diels-Alder* na preparação de intermediários da síntese de estronas e da testosterona, a ciclização biomimética de *Johnson* na produção da progesterona [6], entre outros. Por exemplo, e ainda neste contexto, Ibrahim-Quali, M., reportou a síntese total de vários esteroides com heteroátomos a partir do BISTRO (1,8-bis(trimetilsilil)octa-2,6-dieno) [7].

As dificuldades inerentes à obtenção de esteroides de forma isolada, pura e em quantidades significativas pela síntese total tem levado os investigadores a optar por uma abordagem semissintética. Neste sentido, foi necessário procurar esteroides em fontes naturais que pudessem ser precursores semissintéticos de outros esteroides com atividade terapêutica. Um exemplo neste âmbito são os óleos de sementes de soja, que são ricos em esteroides, como por exemplo, o estigmasterol e o sitosterol. Após a sua descoberta, foi possível o desenvolvimento de um processo sintético mais eficiente e económico para preparar a progesterona a partir do estigmasterol e de um processo enzimático mais fácil para a produção de androgénios, como a desidroepiandrosterona (DHEA), a partir do sitosterol [8,9].

Nos processos de semissíntese de esteroides, um dos precursores mais utilizados é o acetato de 16-desidropregnenolona (16-DPA) (Figura 2). Os corticosteróides, os esteroides anabólicos, os contraceptivos orais e as hormonas sexuais são alguns exemplos de classes de fármacos usados na terapêutica que têm como precursor da sua semissíntese o 16-DPA [1c]. A descoberta da diosgenina (Figura 3) que mediante uma via sintética de degradação controlada da sua cadeia lateral permite obter o 16-DPA, foi um passo chave, sendo que este esteroide pregnano, ao longo dos anos, tem sido preponderante no desenvolvimento da química dos esteroides. De facto, esta molécula pode sofrer uma grande quantidade de modificações estruturais e, conseqüentemente, originar uma grande variedade de esteroides e derivados com atividade terapêutica [8-10].

Ao nível industrial, a síntese do 16-DPA continua a ter precursor mais habitual a diosgenina, como já foi referido. A síntese deste esteroide é simples e envolve três passos (Esquema 1): acetilação em C3 seguida de isomerização da cadeia lateral formando o diacetato de pseudodiosgenina; oxidação do enol em C20=C22, levando à abertura do anel tetrahydrofurano originando uma cadeia lateral em C17 e outra em C16 e, por fim, a degradação hidrolítica da cadeia lateral presente em C16 levando à formação da insaturação em C16=C17.

O 16-DPA também pode ser obtido, igualmente, através da solasodina, um análogo nitrogenado da diosgenina (Esquema 1). Estes dois compostos podem ser interconvertidos um no outro e permitir a produção de outros esteroides, como a progesterona, a pregnenolona, e os seus derivados [10].



Esquema 1: Processo sintético do acetato de 16-desidropregnenolona (16-DPA) a partir da Diosgenina ou Solasodina [10-14].

As investigações mais recentes relativamente à via sintética de produção do 16-DPA têm o propósito de otimizar esse processo, ou seja, obter melhores rendimentos e melhorar as condições reacionais tornando o processo económica e ambientalmente mais rentável [12-14]. Alguns avanços nestas temáticas envolvem a substituição do agente oxidante utilizado no passo 2 do processo reacional, o trióxido de crómio (CrO_3), por permanganato de potássio ($KMnO_4$) [13] ou oxigénio molecular (O_2), bem como o uso da sonicação para diminuir a quantidade de agente oxidante utilizada [14].

Os esteroides podem sofrer várias transformações químicas dependendo dos grupos funcionais e substituintes que a sua estrutura apresenta. Neste contexto, é importante salientar o condicionamento estereoquímico presente nestas moléculas devido aos grupos metilo angulares. Os grupos metilo apresentam uma estereoquímica β e dificultam a inserção de um grupo funcional ou substituinte com essa configuração, especialmente nas suas proximidades. Assim, preferencialmente, os grupos funcionais ou substituintes que são introduzidos estabelecem uma ligação com estereoquímica α [2a].

Algumas das transformações mais utilizadas na síntese de esteroides incluem a sua oxidação, como já foi referenciado acima. Dentro das várias reações de oxidação possíveis, a oxidação alílica apresenta um enorme destaque uma vez que permite a formação de, por exemplo, enonas, que estão largamente associadas a esteroides com atividade biológica

[15,16]. Outras reações também têm sido utilizadas, como por exemplo a adição de Michael de nucleófilos a esteroides [17].

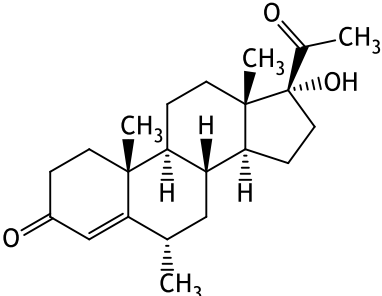
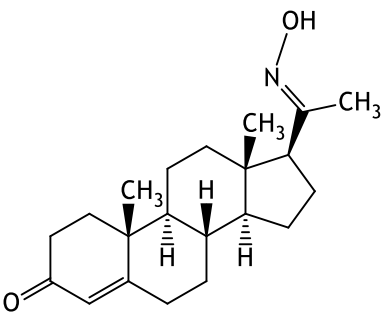
1.2.2) Oxidação de esteroides

A importância que os esteroides apresentam permitiu o desenvolvimento de metodologias sintéticas com o intuito de se obterem derivados de esteroides já existentes. Os esteroides oxidados têm-se revelado, por exemplo, bons agentes na terapia anticancerígena [19-32]. Uma das reações mais utilizadas para realizar esta transformação química é a oxidação alílica, processo reacional explorado posteriormente [18].

1.2.2.1) Importância biológica e sintética

A oxidação de esteroides da série pregnano com o objetivo de se obter agentes citotóxicos é um dos principais focos deste trabalho. A importância de alguns destes esteroides no nosso organismo e na terapêutica, nomeadamente, de tumores, faz com que a investigação nesta classe de esteroides seja cada vez mais necessária e importante. Na Tabela 2 estão discriminados alguns exemplos de esteroides oxidados sendo que alguns derivam de esteroides com núcleo pregnano.

Tabela 2: Exemplos de esteroides oxidados com potencial utilização na terapia anticancerígena.

Esteróide oxidado	Série esteroide	Propriedade(s) terapêutica(s)	Ref.
	Pregnano	Inibidor da angiogénese	[19]
	Pregnano	Inibidor da atividade da 5 α -redutase (5 α R) ^a	[20]

^a Enzima responsável pela conversão da testosterona (T) em dihidrotestosterona (DHT) [20];

Tabela 2: Exemplos de esteroides oxidados com potencial utilização na terapia anticancerígena (continuação).

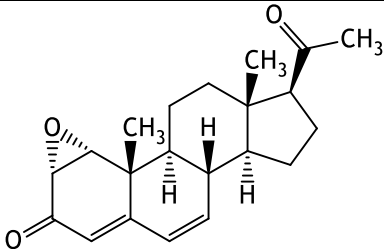
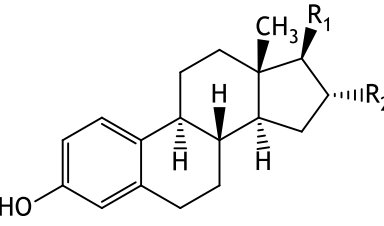
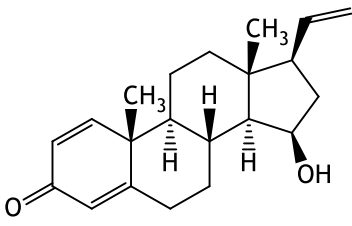
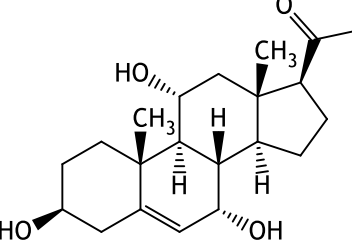
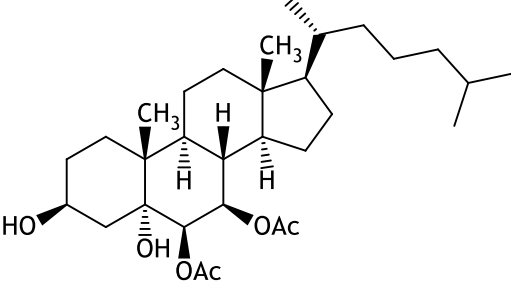
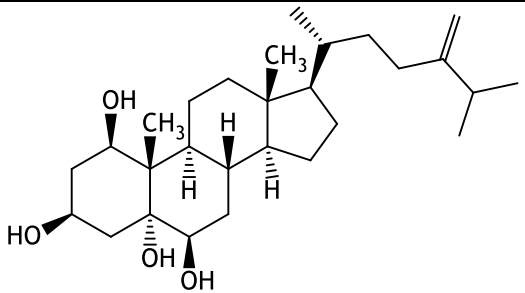
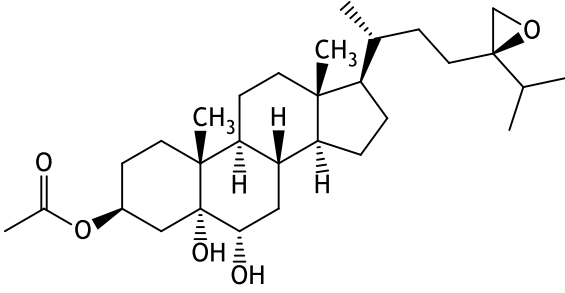
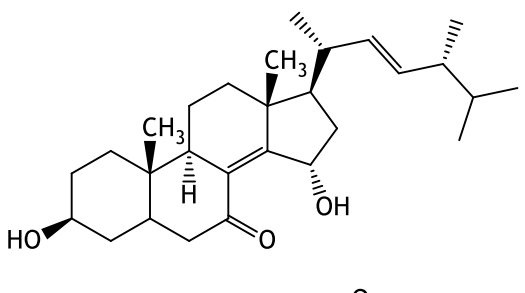
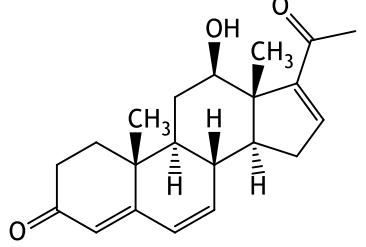
Esteróide oxidado	Série esteroide	Propriedade(s) terapêutica(s)	Ref.
	Pregnano	Citotoxicidade em linhas celulares de cancro da próstata (PC-3 e LNCaP)	[20]
 <p data-bbox="467 864 671 976"> $R_1, R_2 = O$; $R_3 = H$ $R_1 = OH$; $R_2 = H$ $R_1 = OH$; $R_2 = OH$ </p>	Estrano	Citotoxicidade em linha celular do carcinoma hepatocelular	[21]
	Pregnano	Citotoxicidade em linha celular de hepatoma (Bel-7402)	[22]
	Pregnano	Citotoxicidade em linha celular de cancro esofágico (EC-109)	[23]
	Colestano	Citotoxicidade em linha celular de cancro da próstata (PC-3)	[24]

Tabela 2: Exemplos de esteroides oxidados com potencial utilização na terapia anticancerígena (continuação).

Esteróide oxidado	Série esteroide	Propriedade(s) terapêutica(s)	Ref.
	Colestano	Citotoxicidade em linhas celulares de cancro do pulmão (A-549) e osteossarcoma (MG-63)	[25]
	Colestano	Citotoxicidade em linhas celulares de glioma de rato (C6) e humano (U-251)	[26]
	Colestano	Citotoxicidade em linhas celulares de linfoma (P-388), leucemia aguda promielocítica (HL-60), de cancro do pulmão (A-549) e de hepatoma (Bel-7402)	[27]
	Pregnano	Citotoxicidade em linha celular de cancro do pulmão (A-549)	[28]

Os dados apresentados evidenciam uma grande versatilidade de oxiesteroides com propriedades citotóxicas em várias linhas celulares de diferentes tipos de tumores.

Entre os oxiesteroides, os Δ^5 -7-oxoesteroides têm demonstrado especial interesse terapêutico. Estes compostos são bons agentes citotóxicos e são capazes de inibir a replicação celular e a biossíntese de esteroides. Por estas e por outras razões são considerados excelentes agentes anticancerígenos. Por exemplo, demonstraram ter efeitos antileucêmicos e de inibição da HMG-CoA redutase. Adicionalmente, a 7-oxodesidroepiandrosterona (7-oxoDHEA) e o seu derivado acetilado em C3 apresentam a capacidade de induzir enzimas termogénicas e de ter

efeitos positivos na memória de ratos, respetivamente [29,31]. O Δ^5 -7-oxo-colesterol demonstrou ter atividade regulatória na biossíntese do colesterol [32].

O interesse em esteroides da série pregnano para a produção de derivados oxidados com propriedades terapêuticas, por exemplo anticancerígenas, tem sido cada vez maior. A margem de progressão nesta temática é significativa sendo, por isso, esse um dos focos do desenvolvimento deste trabalho. Relativamente à produção de Δ^5 -7-oxiesteroides, as reações de oxidação alílica tem sido um dos meios mais usados para a funcionalização dos Δ^5 -esteroides.

1.2.2.2) Oxidação alílica

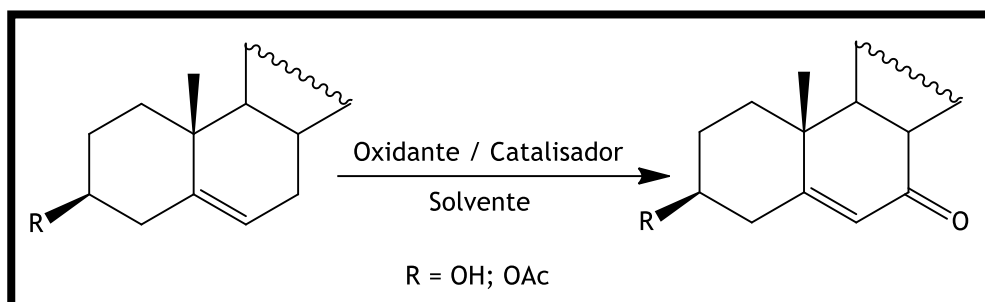
A oxidação alílica permite a obtenção de álcoois alílicos, ésteres, éteres e grupos carbonilos α,β -insaturados que podem ser aldeídos ou cetonas [29,33,34]. Esta reação envolve, por outras palavras, a oxidação de um carbono adjacente a um grupo funcional, que normalmente é uma ligação insaturada.

Nesta reação, neste âmbito, a oxidação alílica de alcenos esteroides às correspondentes enonas tem tido elevado impacto visto que esta funcionalização está presente em muitas moléculas que apresentam actividade biológica [29].

Além disso, os produtos desta reação são intermediários chave em vias sintéticas [34]. No caso dos esteroides, a transformação mais habitual neste âmbito é a oxidação dos Δ^5 -esteroides a Δ^5 -7-oxoesteroides. Estes para além de terem propriedades terapêuticas, também podem ser utilizados, por exemplo, na síntese da esqualamina [29], um composto com atividade antiangiogénica [19].

Na oxidação alílica de Δ^5 -esteroides às correspondentes enonas α,β -insaturadas muitos têm sido os reagentes descritos [35]. Inicialmente começou-se por usar reagentes de crómio(IV) em quantidades estequiométricas, como por exemplo, o *t*-butil cromato, o cromato de sódio, o clorocromato de piridínio (PCC) e o dicromato de piridínio (PDC). Contudo, a realização da reação com estes compostos é bastante desvantajosa dado que implica o uso de grandes quantidades de reagentes e solventes, para além das questões ambientais e económicas que estes compostos levantam e da dificuldade para a ocorrência da reação e de isolamento do produto final [29,35,37]. Como tal, foi necessário procurar alternativas economicamente mais rentáveis e mais amigas do ambiente. Neste contexto, processos catalíticos e que envolvem o uso de oxidantes mais aceitáveis em termos ambientais têm ganho cada vez mais espaço (Esquema 2). Neste âmbito, podemos referenciar o hidroperóxido de *t*-butilo (*t*-BuOOH) como o oxidante mais estudado, principalmente em associação com catalisadores de metais de transição. Relativamente aos catalisadores metálicos utilizados tem sido reportado o cobalto(II), cobre(II), manganês(II), vanádio(II), ruténio(III) e bismuto(III) [29,35-37]. Os catalisadores de bismuto(III) são considerados económicos e ambientalmente mais aceitáveis, para além de serem mais seguros e não serem tóxicos, como no caso dos reagentes de crómio(IV). Adicionalmente, parecem aumentar significativamente a quimioseletividade da reação [29,36,37]. No campo da oxidação alílica, outro método também descrito envolve o uso de clorito de sódio (NaClO_2) e *N*-hidroxiftalimida (NHPI), processo reacional também

ambientalmente mais aceitável e em que não é necessário utilizar um catalisador de metal de transição [35].



Esquema 2: Esquema reacional da oxidação alílica de Δ^5 -esteroides aos correspondentes Δ^5-7 -oxoesteroides [37].

1.2.3) Adição nucleofílica em esteroides

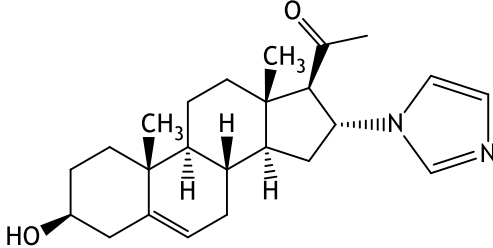
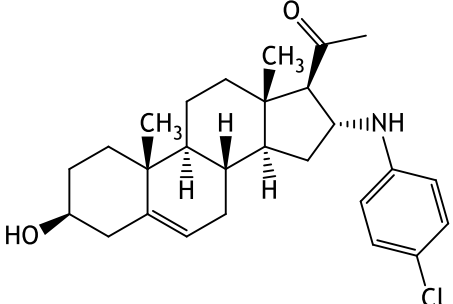
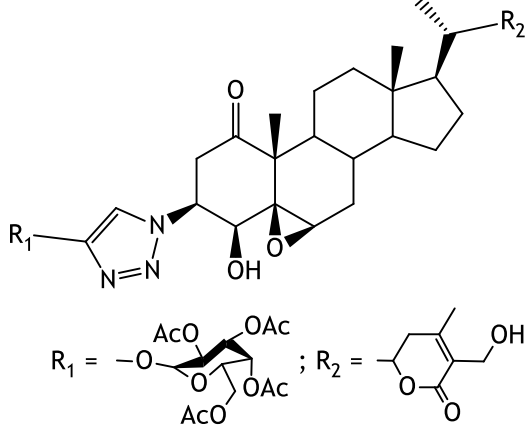
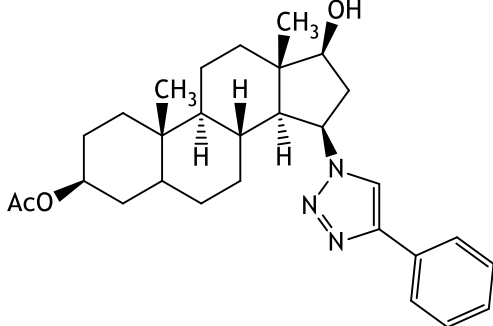
A adição nucleofílica tem se tornado ao longo dos anos bastante preponderante no desenvolvimento de esteroides com propriedades terapêuticas, designadamente ligados a heterociclos que sejam reconhecidos pelo organismo [5-7]. Neste âmbito, a reação de adição de Michael, especificamente, tem sido uma das reações de adição nucleofílica mais estudadas. Esta transformação química geralmente é simples e pode ser bastante económica e ambientalmente aceitável, dependendo dos reagentes envolvidos [38-43].

1.2.3.1) Importância biológica e sintética

As enonas esteroides, como já foi referenciado, estão associadas frequentemente a atividade biológica [29,30]. Estes grupos carbonilos α,β -insaturados podem também ser utilizados em reações de adição nucleofílica, mais concretamente, de adição de Michael de heterociclos com heteroátomos de azoto, enxofre e oxigénio. A consequência da incorporação de um heterociclo na estrutura de um esteroide pode ser a modulação da sua atividade [46]. Neste campo, têm sido realizados vários estudos com o intuito de se sintetizar derivados de esteroides com potencial terapêutico utilizando a reação de adição de Michael. Na Tabela 3 estão representados alguns exemplos de moléculas esteroides biologicamente ativas funcionalizadas envolvendo reações de adição de Michael de nucleófilos, principalmente a enonas.

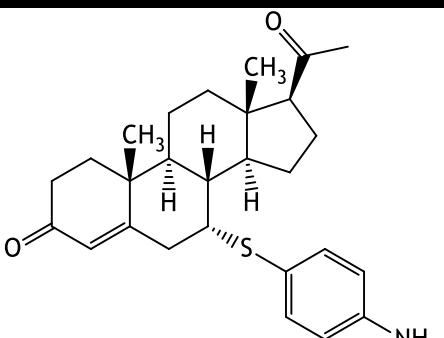
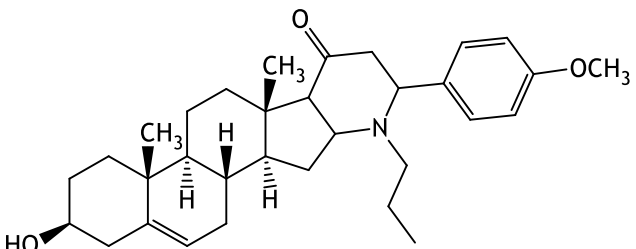
Alguns dos esteroides presente nesta tabela, como poderemos verificar, derivam de enonas da série pregnano. Neste âmbito, os Δ^5-7 -oxoesteroides também podem ser usados como aceitadores numa reação de adição nucleofílica. Assim, a adição de Michael de heterociclos a estas enonas esteroides pode-se revelar uma estratégia sintética útil na produção de novos agentes quimioterápicos.

Tabela 3: Exemplos de esteroides com atividade biológica obtidos por adição de Michael.

Esteróide	Série esteroide	Propriedade(s) terapêutica(s)	Ref.
	Pregnano	Inibidor da CYP17A1 ^a	[39]
	Pregnano	Atividade antioxidante e antilipídica	[40]
	Ergostano	Citotoxicidade em linhas celulares de cancro do pulmão (A-549), do ovário (IGR-OV-1), da próstata (PC-3), do cólon (CoLo) e leucemia (THP-1)	[38]
	Androstano	Citotoxicidade em linha celular de adenocarcinoma cervical (HeLa)	[41]

^a Enzima regulatória envolvida na biossíntese de androgénios cujos inibidores são utilizados no tratamento de doenças associadas a estes esteroides endógenos, como por exemplo, os tumores hormono-dependentes [39].

Tabela 3: Exemplos de esteroides com atividade biológica obtidos por adição de Michael (continuação).

Esteróide	Série esteroide	Propriedade(s) terapêutica(s)	Ref.
	Pregnano	Inibição da ação da Glicoproteína-P (PgP) ^b	[42]
	Pregnano	Inibição da atividade da DPP-IV ^c	[43]

^b A Glicoproteína-P está associada a um fenótipo de resistência à ação de fármacos, funciona como bomba de efluxo impedindo a acumulação do composto terapêutico em elevadas concentrações no meio intracelular [50]; ^c Enzima antigênica presente na superfície das células que desempenha um papel importante no metabolismo da glucose, podendo ser usada no tratamento da diabetes *mellitus* tipo 2 [51];

Na adição de Michael de heterociclos a enonas esteroides um dos heterociclos que pode ser utilizado é o núcleo indole. As moléculas com o núcleo indole na sua estrutura têm recebido cada vez maior destaque devido ao potencial terapêutico deste heterociclo. Adicionalmente, podemos referenciar as β -indolilcetonas como *building blocks* na síntese de compostos com propriedades terapêuticas [17,44]. Este núcleo é bastante encontrado em produtos naturais, principalmente em alcalóides, e no nosso organismo em vários órgãos. Derivados de indole já descritos, esteroides e não esteroides, apresentam propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, anticonvulsionantes e cardiovasculares. Em adição a isto, cada vez mais se têm produzido moléculas com núcleo indole na sua estrutura com propriedades anticancerígenas [45].

Assim, a funcionalização de enonas esteroides descritas como potenciais agentes anticancerígenos, designadamente, de Δ^5 -7-oxoesteroides, com um núcleo indole por, por exemplo, adição de Michael é uma estratégia sintética a considerar na produção de novos compostos com propriedades citotóxicas seletivas para neoplasias.

1.2.3.2) Adição de Michael

A adição de Michael é uma reação que pode ser realizada tanto em meio ácido como em meio básico e que envolve a adição de um nucleófilo a grupos carbonilos α,β -insaturados e

compostos relacionados, na posição β [2b,46,47]. Esta reação apresenta uma grande versatilidade visto que é um modelo de adição conjugada a alcenos ativados onde podem ser usados um número variado de nucleófilos [46]. Nesta transformação são designados por aceitadores de Michael os alcenos ativados utilizados e por dadores de Michael as espécies nucleofílicas [47]. Normalmente, os aceitadores de Michael mais usados são as enonas. No que toca a dadores de Michael destacam-se os enolatos. Contudo, as enaminas também têm algum destaque nesta temática, principalmente em sínteses mais complexas [2b].

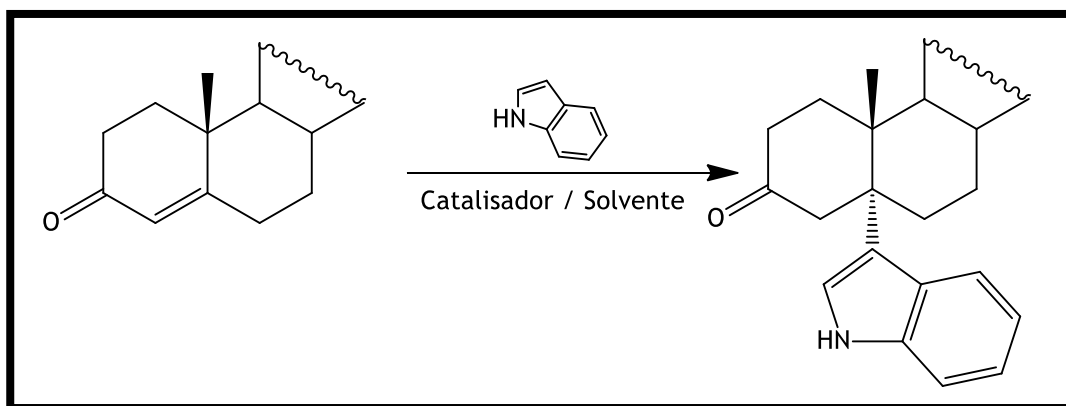
A reação de adição de Michael foi idealizada e testada por Arthur Michael com o éster etílico do ácido cinâmico e com o malonato dietílico. Esta reação foi o ponto de partida para o desenvolvimento e implementação de uma das reações mais importantes da química orgânica [2b,46].

Esta transformação também pode apresentar algumas desvantagens. O uso, muitas vezes em excesso, de ácidos ou bases fortes para promover a reação pode levar a reações secundárias e, conseqüentemente, a produtos indesejados. Este facto levou ao desenvolvimento de processos alternativos com catálise. De facto, os catalisadores metálicos têm sido bastante descritos incluindo compostos de cobre, ferro, ruténio, ródio, platina [47] e bismuto [48], por exemplo. Assim, surgiram metodologias económica e ambientalmente mais rentáveis. No entanto, frequentemente, estes processos são bastante substrato-seletivos, sendo necessário o desenvolvimento de processo mais versáteis [49].

Além de ser importante na formação de ligações carbono-carbono, a reação de Michael também pode ser utilizada para formar ligações carbono-heteroátomo. As reações de Aza-Michael (ligação carbono-azoto) são exemplificativas disso mesmo. Estas reações podem ser realizadas com vários aceitadores (enonas, acrilatos, amidas, sulfonas, nitroalcenos, fosfonatos, entre outros) e dadores de Michael (aminas, tanto alifáticas como aromáticas, azidas, amidas e carbamatos) [50]. Na catálise de reações de Aza-Michael vários catalisadores de metais de transição têm sido descritos, nomeadamente catalisadores de bismuto [48], ruténio [51], cobre [52], entre outros.

A adição de Michael pode ser utilizada no desenvolvimento de compostos farmacológica e biologicamente ativos [53]. Neste contexto, um núcleo importante nesta reação é o indole porque é usado como *building block* na síntese de compostos com propriedades terapêuticas, como já foi referenciado [44]. No caso da adição de Michael com o indole, este pode atuar como N- ou como C-nucleófilo, dependendo das condições reacionais [49,54]. Se o indole atuar como C-nucleófilo, a reação, salvo raras exceções, ocorre na posição 3 da sua estrutura. Caso esta posição esteja ocupada, a reação ocorrerá preferencialmente na posição 2 [49]. As reações catalisadas por ácidos de Lewis permitem geralmente que o indole atue como um C-nucleófilo. Assim, a escolha do catalisador tem de ter em conta o objetivo final uma vez que não existe um catalisador que seja adequado para todos os aceitadores e dadores de Michael [50]. No caso concreto do indole, os catalisadores de bismuto, nomeadamente o trifluorometanosulfonato ou triflato de bismuto ($\text{Bi}(\text{OTf})_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$), têm provado ser bastante eficientes na sua adição como C-nucleófilo a enonas [48].

Neste contexto, Tabatabaeian, K., *et al*, reportou a síntese de derivados da progesterona recorrendo a este processo reacional com vários heterociclos de azoto derivados do indole e com o pirrole (Esquema 3), usando como catalisador o tricloreto de ruténio [17]. Assim, no presente trabalho, estudou-se a possibilidade desta reação também ocorrer com Δ^5 -7-oxoesteroides.



Esquema 3: Adição nucleofílica do indole à progesterona [17].

1.2.4) A química verde na síntese de esteroides quimioterápicos

A área da química ao longo dos anos tem desempenhado um papel bastante importante na nossa sociedade. Um exemplo disso são as moléculas utilizadas como agentes terapêuticos no diagnóstico e tratamento de variadíssimas doenças. Face à sua importância, é necessário que esta área esteja sempre em constante evolução no sentido de melhorar os seus processos. A importância desta temática é reforçada pela crescente preocupação ambiental que tem existido. Assim, surgiu o conceito de química verde, ou química sustentável, que tem como objetivo diminuir o impacto ambiental e o aumento da sustentabilidade dos processos químicos [55].

Apesar de ser recente, este conceito já apresenta uma preponderância e aceitabilidade elevadas dentro da comunidade científica, sendo uma das prioridades na indústria química. Tendo em conta a sua prioridade, o desafio dos químicos passa por desenvolver novos processos, produtos e serviços que estejam de acordo com os requisitos necessários para um desenvolvimento sustentável. As “implicações” disto são também a economia em termos dos componentes reacionais usados e da energia dispendida no processo reacional, sem comprometer a eficiência de uma dada metodologia empregada. Isto leva à diminuição das quantidades dos químicos perigosos no meio ambiente, sendo que o objetivo passa pela sua total eliminação. Neste sentido um cenário ideal prende-se com uma síntese e produção limpa associada a uma redução dos “lixos reacionais” [55].

O Doutor Paul Anastas, conhecido com o pai da química verde, definiu esta química como “A utilização de um conjunto de princípios que reduzem ou eliminam o uso ou criação

de substâncias perigosas no design, manufaturação e aplicação de produtos químicos”. Estes princípios que o Doutor Paul Anastas aborda são os 12 Princípios da Química Verde [55]:

1. Prevenção: a prevenção da produção de resíduos/desperdícios químicos é preferível ao seu tratamento;
2. Economia do átomo: os processos sintéticos devem ser capazes de maximizar a incorporação de todos os materiais de partida no(s) produto(s) final(is);
3. Sínteses químicas menos tóxicas: as metodologias sintéticas ideais não devem usar nem produzir substâncias perigosas;
4. Desenvolvimento de substâncias seguras: os produtos reacionais não devem ser tóxicos;
5. Solventes e auxiliares seguros: o uso de auxiliares deve ser minimizado;
6. Eficiência energética: as necessidades energéticas dos processos devem ser minimizadas tendo em conta o impacto económico e ambiental do processo;
7. Uso de matéria-prima renovável: a matéria-prima utilizada deve ser renovável e facilmente manuseável;
8. Prevenir derivatizações: as derivatizações de um dado processo químico devem de ser mínimas;
9. Catálise: a preferência deve recair sobre um catalisador e não sobre mais um reagente para chegar ao resultado pretendido;
10. Desenvolvimento virado para a degradação: os produtos químicos devem-se degradar em produtos inócuos;
11. Prevenção da poluição através da análise em tempo real: os processos químicos devem ser o mais controlados possível;
12. Química intrinsecamente segura para a prevenção de acidentes: as substâncias químicas devem ser escolhidas e manuseadas da forma menos suscetível e passível a originar acidentes [55,56];

A catálise, dos 12 princípios enumerados acima, é um dos mais importantes, senão o que apresenta maior preponderância nesta temática. Um bom uso da catálise é extremamente importante para o desenvolvimento de metodologias económica- e ambientalmente mais rentáveis [55].

De facto, a maioria dos processos sintéticos a nível industrial, sobretudo na área da *bulk chemistry*, já utiliza catalisadores [57]. Segundo Ostwald, “*um catalisador acelera uma reação química sem afetar a posição de equilíbrio*” [54]. Estas espécies são capazes de influenciar a velocidade e a seletividade de uma reação. As reações catalisadas apresentam uma velocidade superior uma vez que os catalisadores atuam ao nível da cinética reacional diminuindo a energia de ativação necessária para que a transformação química pretendida se realize, sem afetar a energia livre de Gibbs da reação total [56,57]. Por outro lado, a seletividade destas reações também é influenciada visto que um dado catalisador quando inserido, por exemplo, numa reação onde, para além do produto principal, também se podem formar produtos secundários, pode promover a síntese do produto principal e diminuir as

quantidades estequiométricas dos produtos secundários no final do processo. Mas se usarmos outro catalisador, este pode promover a produção de um dos produtos secundários. Isto indica que os catalisadores influenciam a seletividade das reações e que de catalisador para catalisador essa influência pode ser diferente [57]. Outro factor de grande preponderância na catálise é a estabilidade do catalisador. Este, após catalisar uma transformação química, na maioria dos casos, sofre alterações na sua estrutura que impossibilitam uma nova atuação, a não ser que haja a sua regeneração ou substituição [56,57].

Os catalisadores com metais de transição são dos mais utilizados na catálise de reações. De facto, os metais de transição apresentam camadas eletrónicas vazias na sua esfera de coordenação, o que possibilita que tenham vários estados de oxidação e que sejam versáteis no que toca à forma como interagem com os reagentes para adjuvarem a transformação química desejada. Isto permite a formação de complexos de coordenação variados, possibilitando uma mudança controlada da atividade e seletividade do processo catalítico [58]. Assim, vários catalisadores de metais de transição têm sido usados na catálise de transformações químicas também de esteroides.

A aplicação das diretrizes que estão na base do conceito de química verde tem sido cada vez mais o foco da indústria farmacêutica com o intuito de otimizar a síntese de determinados fármacos que têm um grande potencial terapêutico, mas que cujo processo de produção acarreta graves problemas e levanta demasiadas questões. Uma classe de compostos com propriedades terapêuticas cujos processos sintéticos têm sido otimizados são os esteroides. A adoção de uma estratégia de semissíntese a partir de compostos naturais com núcleo esteroide em detrimento de uma síntese total é um exemplo claro da intervenção da química verde nesta temática. Especificamente, a utilização de catalisadores metálicos, oxidantes, nucleófilos, entre outros, mais amigos do ambiente e economicamente rentáveis tem sido cada vez mais frequente. Estas alterações permitiram o desenvolvimento de procedimentos experimentais mais produtivos, eficientes e sustentáveis. Alguns novos processos também permitiram ultrapassar o desafio do condicionamento estereoquímico inerente aos esteroides. Outros problemas também foram solucionados, como a reduzida solubilidade deste género de moléculas. Contudo, ainda existe um caminho muito longo a percorrer no que toca a síntese de esteroides dado que, apesar dos grandes avanços na otimização destes processos, ainda muitos problemas precisam de ser resolvidos. Assim, é preciso um esforço maior para o desenvolvimento de estratégias sintéticas com base na química verde para combater as falhas ainda presentes nos processos sintéticos já existentes. Nesta ótica, podemos referenciar o estudo do uso de novos catalisadores, de preferência metálicos, solventes, tecnologias e novas transformações químicas para se conseguir obter os esteroides terapêuticos já existentes de uma forma mais benéfica a todos os níveis [3].

I.3) Esteroides no tratamento de cancros

O cancro é uma neoplasia considerada maligna uma vez que é fatal para o seu portador, quando não tratado. Assim, quando falamos numa neoplasia no geral o mais correto é utilizarmos o termo tumores uma vez que estes podem ser neoplasias benignas ou neoplasias malignas. No caso das neoplasias benignas falamos num aglomerado de células que se dividem desreguladamente sem consequências de maior para o portador. No que toca aos tumores malignos, um dos principais problemas é a sua invasividade que faz com que estes se distribuam pelo organismo o que leva a disfunções e, conseqüentemente, ao mau funcionamento dos órgãos vitais [59].

O cancro é uma doença bastante complexa que resulta de modificações genéticas e epigenéticas que podem ser desencadeadas por vários fatores. A inativação de algumas funções de controlo do crescimento e diferenciação celular são algumas das situações inerentes a estas transformações [60]. O cancro pode advir de modificações genómicas (mutações, eliminações e sobreexpressão) e translocações de porções cromossomais, que podem originar mutações somáticas e/ou mutações germinativas [61-63].

A patologia aqui introduzida é uma das principais causas de morte a nível mundial [60]. Tendo em conta os vários géneros de tumores malignos que afetam a nossa sociedade na atualidade, os tumores hormono-dependentes têm um lugar de destaque.

Vários esteroides atuam no nosso organismo como hormonas em vias de sinalização celular, interagindo com os seus recetores intracelulares, controlando a proliferação e a diferenciação celular [2c]. Os tumores hormono-dependentes estão associados a uma sobreexpressão dos recetores hormonais, o que leva a uma maior interação das hormonas com os recetores correspondentes e, conseqüentemente, a uma proliferação celular desregulada [64].

Neste contexto, as hormonas são fundamentais para a sobrevivência das células tumorais [65]. Em virtude dos agonistas dos recetores envolvidos neste género de cancros serem hormonas esteroides é extremamente importante o desenvolvimento de esteroides funcionalizados que sejam capazes, de alguma forma, bloquear o efeito do agonista de um dado recetor hormonal. Este tem sido o caminho trilhado na evolução do tratamento deste género de neoplasias. O cancro da mama (CM) e o cancro da próstata (CP) são dois exemplos de tumores hormono-dependentes.

O CM é uma neoplasia manifestada nos tecidos mamários e que afeta em larga escala a nossa sociedade. Esta neoplasia desenvolve-se, principalmente, no tecido epitelial da mama. Os fatores de risco a ela associados são o género (mais frequente no género feminino), a idade (pessoas de mais idade são mais suscetíveis a desenvolverem a esta neoplasia), fatores endócrinos, fatores genéticos, fatores ambientais e o estilo de vida. A formação e a manutenção de um tumor na mama estão intrinsecamente associadas a uma maior interação das hormonas com os seus recetores [66]. O 17 β -estradiol é a principal hormona envolvida neste processo sendo que os recetores de estrogénios (RE) são sobreexpressos nesta patologia. Para além

destes, também os recetores de progesterona (RP) estão associados a CM. Cerca de 75 % dos CM's estão associados a atividade desregulada dos RE's, RP's ou aos dos dois tipos de recetores em simultâneo. No tratamento desta neoplasia podemos referenciar o tamoxifeno (modula a atividade dos RE's e também pode atuar como antagonista deste recetor) e os inibidores da aromatase (inibem a ação da enzima responsável pela conversão de androgénios em estrogénios) [67].

O CP é uma neoplasia que, como o nome indica, se manifesta na próstata e que, à semelhança do CM, também afeta em larga escala a nossa sociedade. O CP normalmente é assintomático, mas quando esta patologia se torna invasiva provoca disfunções ureterais e alterações na micção do seu portador. Numa fase bastante avançada da doença esta pode levar a anemia e a perda de peso por parte do paciente. A formação e a manutenção de um tumor na próstata estão intrinsecamente associadas a uma maior interação dos androgénios (testosterona (T) e 5 α -dihidrotestosterona (5 α DHT)) com os recetores de androgénio (RA). A T é convertida na 5 α DHT, o principal androgénio responsável por esta patologia por ação de 5 α R's. Assim, no tratamento, além de antagonistas dos RA, podem também usar-se inibidores da 5 α R, o finasteride e o dutasteride, e inibidores da CYP17A1 [68,69a].

Os inibidores da CYP17A1 que impedem a conversão da pregnenolona e progesterona aos seus derivados 17 α -hidroxilados e a formação da desidroepiandrosterona e androstenodiona, respetivamente, os percursores dos androgénios endógenos [69a,69b].

Os recetores hormonais associados a tumores hormono-dependentes são fatores de transcrição que pertencem à superfamília de recetores nucleares (RN). Os seus ligandos são hormonas que interagem com estas proteínas no seu domínio de ligação (DLL). As interações que ocorrem levam à ativação ou repressão dos genes alvo de cada recetor e isto permite o controlo do crescimento, diferenciação e homeostasia celular [71-74].

O RE apresenta como ligando principal o 17 β -estradiol (17BE) [71]. O 17BE é o estrogénio presente em maior quantidade em organismos vertebrados. A sua ação está associada, principalmente, ao sistema reprodutor feminino e à manutenção das características sexuais secundárias [74].

O RP tem a progesterona (P) como ligando principal [72]. A P atua principalmente durante a gravidez e, após a sua síntese endógena a partir da pregnenolona, serve de precursor para os mineralocorticóides, os glucocorticóides e a androstenediona (androgénios), precursora da testosterona (T) e do 17BE (estrogénios) [75].

A T e a 5 α DHT são os ligandos principais do RA, também bastante conhecido por 5 α R [73]. Estas duas hormonas esteroides são responsáveis pelo desenvolvimento do sistema reprodutor masculino e dos caracteres sexuais secundários do homem [76].

Dada a associação de recetores hormonais a tumores e, tendo em conta a natureza esteroide das hormonas presentes no nosso organismo, têm sido desenvolvidos uma grande variedade de derivados de esteroides funcionalizados que evidenciam propriedades terapêuticas para estas patologias [20,24,39].

I.4) *Design* de fármacos assistido por computador (CADD - do inglês *Computer Aided Drug Design*)

A pesquisa por novos agentes terapêuticos iniciou-se, de forma mais pronunciada, no século XIX, através do isolamento de metabolitos de plantas que apresentam propriedades medicinais. Desde que se começou a dar mais importância à necessidade de descobrir novos agentes terapêuticos, a evolução no processo de pesquisa destas novas moléculas tem sido estonteante. Atualmente, existe uma grande quantidade de moléculas e classes terapêuticas. Ainda assim, a descoberta destas moléculas é habitualmente um desafio importante.

A química medicinal é uma vertente da área da química bastante importante no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos. Esta valência utiliza várias ferramentas computacionais (modelos *in silico*) e uma panóplia de ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo* que são fulcrais no processo de descoberta de potenciais novos agentes terapêuticos para uma determinada patologia. Ao longo dos anos tem-se observado o desenvolvimento de técnicas inovadoras que têm sido cada vez mais utilizadas no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos. Uma dessas técnicas é o *design* de fármacos assistido por computador (CADD - do inglês *Computer Aided Drug Design*) que utiliza ferramentas como o *Docking* Molecular (DM) para adjuvar na descoberta de novas entidades químicas passíveis de serem usadas na terapêutica.

O CADD usa ferramentas computacionais no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos. Esta abordagem permite compilar informação química e biológica sobre um ligando e os alvos terapêuticos em estudo para descobrir o melhor agente terapêutico para uma dada patologia. Estas ferramentas computacionais também permitem prever algumas propriedades que um dado composto possa ter, tendo em conta a sua estrutura, no sentido de se verificar se essa molécula é promissora no tratamento da doença que está a ser estudada. A realização deste processo para vários compostos pode levar a perceber quais as características estruturais adequadas que o novo composto terapêutico deve ter para evidenciar a atividade desejada. Neste sentido, o DM permite a análise do modo de interação dos candidatos a fármacos com os alvos terapêuticos com o intuito de prever a afinidade do novo composto [77].

Com o objetivo de simular computacionalmente o modo de interação de uma dada molécula com um dado alvo terapêutico, esta estratégia tenta chegar à conformação correspondente à energia mínima, a conformação ótima para interagir com o alvo terapêutico [77].

O DM pode ser realizado através de duas abordagens gerais: o sistema chave/fechadura ou o sistema de *Induced Fit*. No primeiro caso, o alvo e o ligando são trabalhados como estruturas rígidas enquanto que, no segundo caso, as estruturas do ligando e do alvo são flexíveis. É importante salientar que, dos dois modelos apresentados, o de *Induced Fit* é o que se aproxima mais do que ocorre no nosso organismo [77].

O DM envolve um algoritmo de pesquisa e uma função de *scoring*. O algoritmo de pesquisa pode ser definido como um conjunto de diretrizes que permitem a determinação do modo de ligação de uma dada molécula a um dado alvo terapêutico. A função de *scoring* permite hierarquizar as conformações de um dado ligando obtidas quando este interage com um dado alvo terapêutico pela afinidade de ligação. Este processo de hierarquização pode ser empírico, baseado no conhecimento já existente ou baseado na mecânica molecular envolvida na interação [77].

Os *softwares* usados para a realização do DM são variados, sendo que um dos mais conhecidos é o AutoDock [77].

O AutoDock, como já foi referenciado, é um *software* utilizado para realizar DM. Atualmente, este programa já vai na quarta versão (AutoDock4). O AutoDock4, tal como as versões anteriores usa como algoritmo de pesquisa principal o Algoritmo Genético de Lamarckian (LGA - do inglês *Lamarckian Genetic Algorithm*). Este algoritmo permite a criação de uma panóplia de conformações do ligando que, seguidamente, em sucessivas gerações sofrem alterações (mutações) nos parâmetros conformacionais, competindo entre elas de uma maneira similar ao que acontece no processo evolutivo dos seres vivos. No fim, as conformações de menor energia prevalecem em detrimento das restantes. Para além disto, este algoritmo permite às conformações pesquisar o seu espaço conformacional local [78].

Este *software* demonstrou ter uma enorme capacidade de prever as interações e as energias de ligação que são criadas quando uma dada molécula interage com um dado alvo terapêutico. Este programa usa o sistema de Grid, uma “caixa” cujas dimensões são definidas pelo operador e onde ocorre todo o DM. Somente as estruturas dentro desta caixa estão suscetíveis a todo o processo de *docking* [78].

Capítulo II - Objetivos

A importância dos esteroides a nível endógeno e farmacêutico e a necessidade de otimizar os processos sintéticos para a sua produção e de obtenção de novas moléculas esteroides com propriedades terapêuticas levaram à definição dos seguintes objetivos para este trabalho:

1. Funcionalização por oxidação alílica de Δ^5 -esteroides e por adição de Michael a Δ^5 -7-oxoesteroides da série pregnano, desenvolvendo e aplicando processos relevantes no âmbito da Química Verde com o objetivo de obter moléculas com interesse terapêutico, bem como uma preparação mais eficiente das mesmas;
2. Avaliação da citotoxicidade de derivados de Δ^5 -esteroides em linhas celulares;
3. Simulação computacional das possíveis interações destes com recetores hormonais associados a tumores hormono-dependentes;

Os Δ^5 -esteroides utilizados são derivados da pregnenolona, um esteroide que é precursor da maioria das hormonas presentes no nosso organismo, e incluem o acetato de 16-desidropregnenolona **1** e o acetato de pregnenolona **2**. A escolha do composto **1** também se deveu ao facto de ser um dos principais precursores da semissíntese da maioria das moléculas esteroides utilizadas na atualidade na terapêutica.

Capítulo III - Resultados e discussão de resultados

III.1) Síntese Química

III.1.1) Estudo de processo da oxidação alílica de Δ^5 -esteroides

Neste trabalho, procurou-se estudar várias condições oxidativas e catalíticas na oxidação alílica de Δ^5 -esteroides às correspondentes enonas. O estudo deste processo oxidativo teve como foco o uso de catalisadores metalóides e de peróxidos como agentes oxidantes, dado que a sua combinação se tem revelado bastante efetiva em vários processos oxidativos [79,80]. As reações foram realizadas em acetonitrilo (CH_3CN) visto que é um solvente bastante comum em oxidações desta natureza [56].

Os catalisadores utilizados foram catalisadores de bismuto(III), nomeadamente, o tricloreto de bismuto (BiCl_3), o trifluorometanosulfonato ou triflato de bismuto [$\text{Bi}(\text{OTf})_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$] e o oxicloreto de bismuto (BiOCl), e um catalisador de paládio(II), concretamente, o hidróxido de paládio em matriz de carvão. Os catalisadores de bismuto(III), como já foi referenciado na introdução, são vantajosos em termos económicos e ambientais e, adicionalmente, são seguros e não estão associados a toxicidade [29,34,35]. O $\text{Pd}(\text{OH})_2\text{-C}$ foi utilizado, uma vez que, apesar de estar associado a reações de redução, é capaz de ativar hidroperóxidos, nomeadamente o hidroperóxido de *t*-butilo (*t*-BuOOH), um dos peróxidos utilizados em reações de oxidação de alcenos a enonas [81,82].

Os peróxidos utilizados foram o *t*-BuOOH, o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o hidroperóxido de cumeno (CumOOH). A escolha sob esta classe de agentes oxidantes teve como base a fácil acessibilidade a estes e as vantagens ambientais e económicas do seu uso. O *t*-BuOOH é um dos peróxidos orgânicos existentes mais estáveis e tem sido bastante usado na oxidação alílica de Δ^5 -esteroides [36,37]. Adicionalmente, o co-produto deste hidroperóxido, o *t*-butanol, é benigno ao nível ambiental e pode ser eliminado por evaporação a pressão reduzida ou, recuperado por destilação e reutilizado [56]. O H_2O_2 apresenta a particularidade de poder ser usado como agente oxidante e como agente redutor [83]. Em termos ambientais, este é um dos oxidantes mais promissores dado que a sua envolvência no processo de oxidação leva à formação de água e oxigénio molecular [84,85]. O seu emprego na oxidação de alcanos conjuntamente com vários catalisadores de metais de transição tem sido bastante explorado [84]. O CumOOH é outro hidroperóxido que também tem sido utilizado em processos oxidativos, sobretudo de epoxidação [86].

Na realização das reações, de forma muito genérica, começou-se por dissolver o substrato no solvente orgânico utilizado que foi sempre o CH₃CN. Após a dissolução do substrato adicionou-se 10 equivalentes de agente oxidante e 0,1 equivalentes de catalisador, tendo por base a reação de oxidação alílica catalisada por BiCl₃, já descrita anteriormente [37]. As reações decorreram sob agitação magnética a 70°C num sistema aberto com um condensador adaptado ao balão onde a reação estava a decorrer. As reações foram controladas por Cromatografia em Camada Fina (CCF) e o produto da reação (Δ^5 -7-oxoesteróide) correspondia a uma mancha alaranjada com R_f cerca de 0,6.

No estudo de processo da oxidação alílica de Δ^5 -esteróides começou-se por realizar reações usando como substrato o acetato de 16-desidropregnenolona **1** e, posteriormente, o acetato de pregnenolona **2**.

III.1.1.1) Oxidação do acetato de 16-desidropregnenolona **1**

Na tabela 4 podemos visualizar as várias condições reacionais testadas na oxidação alílica do 16-DPA **1** e no esquema 3 a transformação química realizada.

Tabela 4: Condições oxidativas utilizadas nas reações de oxidação alílica com o substrato 16-DPA **1** (0,25 mmol).

Entrada	Oxidante (5,0 mmol)	Catalisador (0,050 mmol)	Solvente (3,0 mL)	Outros Reagentes	Temp. (°C)	Tempo / h	η (%)	
							C ^a	P ^b
1	<i>t</i> -BuOOH _s	BiCl ₃	CH ₃ CN	c	70	24	66	14
2	<i>t</i> -BuOOH _s	BiCl ₃	CH ₃ CN	c	70	48	63	19
3	<i>t</i> -BuOOH _s	BiCl ₃	CH ₃ CN	c	70	72	67	10
4	<i>t</i> -BuOOH _s	BiOCl	CH ₃ CN	c	70	48	---	---
5	<i>t</i> -BuOOH _s	Bi(OTf) ₃ .xH ₂ O	CH ₃ CN	c	70	48	---	---
6	<i>t</i> -BuOOH _{aq}	BiCl ₃	CH ₃ CN	c	70	48	79 ^d	---
7	<i>t</i> -BuOOH _s ^e	Pd(OH) ₂ -C ^e	CH ₂ Cl ₂ ^e	K ₂ CO ₃ ^e	25	72	84	---
8	H ₂ O ₂	BiCl ₃	CH ₃ CN	c	70	48	23 ^e	---
9	H ₂ O ₂	Bi(OTf) ₃ .xH ₂ O	CH ₃ CN	c	70	48	17 ^e	---
10	CumOOH	BiCl ₃	CH ₃ CN	c	70	99	---	---
11	<i>t</i> -BuOOH _s	BiCl ₃	CH ₃ CN	TEMPO ^f	70	48	95	21
12	<i>t</i> -BuOOH _s	BiCl ₃	CH ₃ CN	TEMPO ^f	70	48	88	---

t-BuOOH_s - hidroperóxido de *t*-butilo em solução 5,0-6,0 M de *n*-decano;

t-BuOOH_{aq} - hidroperóxido de *t*-butilo em solução aquosa a 70%;

^a C - Rendimento do crude obtido após a realização do *work-up* da reação;

^b P - Rendimento do produto obtido (Δ^5 -7-oxoesteróide) após a coluna cromatográfica;

^c Não aplicável;

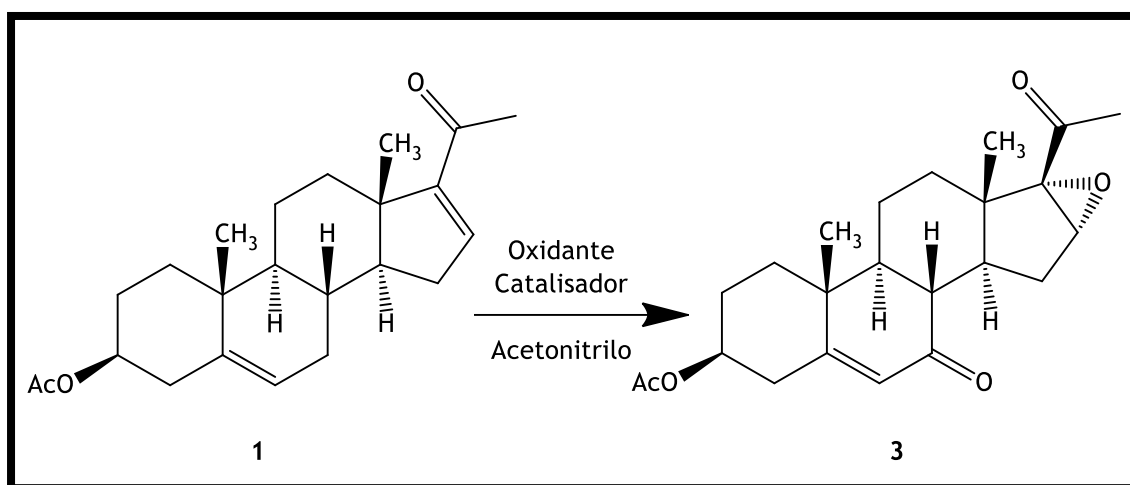
^d Rendimento obtido após redissolução com éter etílico;

^e Quantidades usadas: 1 - 0,64 mmol, Pd(OH)₂-C - 0,032 mmol, *t*-BuOOH - 1,6 mmol; K₂CO₃ - 0,080 mmol, CH₂Cl₂ - 1,0 mL;

^f TEMPO - 0,50 mmol na reação 11 e 0,25 mmol na reação 12;

Nas reações de oxidação alílica do substrato **1** o produto da reação apresentava a enona esperada resultante da oxidação em C7. Contudo, em vez da oxidação alílica em C15 ocorreu a epoxidação da dupla ligação presente em C16=C17 (Esquema 4). Este resultado parece ser

surpreendente. Contudo, no composto **1** existe uma enona que pode sofrer ataque nucleofílico, originando um epóxido. Neste caso, a justificação da epoxidação dessa dupla ligação pode ser baseada na possibilidade de os sistemas de oxidante/catalisador utilizados darem origem as espécies nucleofílicas que promovem esta transformação química. Este resultado é bastante relevante visto que têm sido cada vez mais descritos esteroides epoxidados com propriedades terapêuticas, nomeadamente anticancerígenas [3,29,35,37]. No sentido de comprovar que este seria o produto reacional final, os dados obtidos foram comparados com os da literatura e com os dos trabalhos de investigação anteriores da Dra. Mafalda Silva e da Dra. Raquel Agostinho [87-89].



Esquema 4: Esquema reacional da oxidação alílica e epoxidação do acetato de 16-desidropregnenolona **1** a acetato de 16 α ,17 α -epoxi-7-oxo-pregnenolona **3**.

O melhor sistema catalisador/oxidante para realizar a transformação química desejada provou ser o BiCl₃ com o *t*-BuOOH em solução 5,0-6,0 M de *n*-decano (*t*-BuOOH_s) (Tabela 4, entradas 1-3). Na realização das reações com este sistema verificou-se que ao fim de 24h o substrato já tinha sido totalmente consumido. Contudo, ao deixar a reação decorrer durante mais 1 dia verificou-se que a quantidade obtida de composto **3** após coluna aumentou. Isto significa que nesta reação, após a conversão do substrato em possíveis intermediários reacionais, estes podem converter-se mais no composto **3**. Neste caso, importa também salientar que isto só se verifica até determinada altura dado que foi realizada a mesma reação, mas durante 72h (Tabela 4, entrada 3) e os resultados parecem mostrar um decréscimo no rendimento do composto **3**. É de notar que após o processo de purificação por coluna cromatográfica o rendimento da purificação é muito reduzido, comparativamente, ao do crude. Isto aconteceu porque se observaram produtos secundários em CCF com polaridades próximas à do produto principal, o que impediu uma separação eficiente.

Na realização das reações com o sistema BiCl₃/*t*-BuOOH_s verificou-se o aparecimento de uma coloração branca à medida que a reação se desenrolava. Esta alteração de cor é explicada pela suscetibilidade do BiCl₃ originar BiOCl quando em contacto com a água [37]. O

BiOCl é menos solúvel que o BiCl₃, daí a coloração branca. Assim, o passo seguinte foi realizado na tentativa de se perceber se era o BiCl₃ ou BiOCl o responsável pela catálise da reação. Nesta ótica realizou-se uma reação com o sistema BiOCl/*t*-BuOOH_s (Tabela 4, entrada 4). A reação realizada com este sistema evoluiu a uma velocidade bastante mais reduzida do que a realizada com o sistema anterior e, como tal, optou-se por parar o processo reacional ao fim de 48h.

O estudo da oxidação do composto **1** continuou com a realização de uma reação catalisada com o Bi(OTf)₃.xH₂O (Tabela 3, entrada 5). Este catalisador pode estar na forma tetra- ou nonahidratada o que permite a sua estabilização. Para além disto, apresenta uma elevada eficiência catalítica, baixa toxicidade, é de fácil manipulação e na literatura está descrita a sua aplicabilidade num grande número de reações orgânicas [90-92]. Contudo, a velocidade da reação foi menor com este catalisador sendo que se optou por terminar a reação às 48h para se comparar os resultados obtidos com este catalisador com os obtidos com os dos sistemas com BiCl₃. Curiosamente, as CCF demonstraram uma mancha com o R_f similar ao do produto reacional, mas sem a cor alaranjada, o que pode indicar que, provavelmente, o produto resultante da catálise com Bi(OTf)₃.xH₂O é diferente. Apesar disto, não foi possível identificar este produto uma vez que no processo de isolamento só se conseguiu obter um óleo esbranquiçado residual cujos dados de RMN foram inconclusivos.

Também foi estudada a combinação de BiCl₃ com *t*-BuOOH em solução aquosa a 70 % *t*-BuOOH_{aq} (Tabela 3, entrada 6). Neste caso, obteve-se um óleo amarelo após o isolamento. Este óleo foi deixado a secar ao ar livre e passado uma semana verificou-se a formação de um sólido branco amarelado cujos dados espectrais de RMN de próton e carbono confirmaram a presença do composto **3**. A utilização do *t*-BuOOH_{aq} provou, assim, ser uma alternativa bastante viável ao *t*-BuOOH.

Na reação com o Pd(OH)₂-C, pelas CCF, parece ocorrer também a formação do composto **3** (Tabela 3, entrada 7). Contudo, este sistema promove também a formação de muitos produtos secundários, o que impossibilitou a purificação adequada do produto pretendido. Isto leva-nos a afirmar que este sistema não é adequado para este tipo de transformação química dado que envolveria bastantes etapas de purificação para se obter o produto pretendido, o que não é economicamente rentável.

A H₂O₂ foi outro peróxido que foi testado com BiCl₃ e Bi(OTf)₃.xH₂O (Tabela 3, entradas 8 e 9). Na reação com BiCl₃, após o isolamento, obteve-se um óleo esbranquiçado. Este óleo foi redissolvido em éter dietílico, o que permitiu a formação de um sólido branco que os dados espectrais de RMN de próton e carbono confirmaram ser o composto **3**. Relativamente à reação, com Bi(OTf)₃.xH₂O os resultados obtidos são inconclusivos relativamente ao produto obtido uma vez que, apesar de se ter obtido um sólido esbranquiçado após redissolução os dados espectrais evidenciaram uma mistura de compostos. As duas reações com H₂O₂ apresentaram rendimentos de crude da reação bastante inferiores aos das reações com *t*-BuOOH.

Com o sistema reacional com o CumOOH obtiveram-se os piores resultados visto que ao fim de 99h ainda não tinha ocorrido reação, pelo que se optou por parar a reação (Tabela 3, entrada 10).

Em virtude de estarmos a estudar várias condições oxidativas com hidroperóxidos foi realizado um estudo mecanístico do processo, uma vez que, devido à natureza radicalar deste tipo de processos de oxidação alílica, esta transformação química poderá ser realizada por intermédio de espécies radicalares. Para tal, foi realizada uma reação onde ao sistema $\text{BiCl}_3/t\text{-BuOOH}$ se adicionou um reagente que atua como inibidor da ação de espécies radicalares, o radical 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxilo (TEMPO) (Tabela 3, entradas 11 e 12) [93-95]. Neste contexto, primeiramente foi realizada uma reação com 1 equivalente de TEMPO. Contudo, contrariamente ao esperado, a formação do composto **3** não foi inibida, sendo que o que aconteceu foi uma diminuição dos produtos secundários observados na CCF, ou seja, a reação foi mais limpa. O rendimento de obtenção do produto acabou também por ser ligeiramente superior ao da reação sem TEMPO após o processo de purificação por coluna cromatográfica. Estes dados indicam que o TEMPO, ao invés de impedir o potencial processo radicalar, terá atuado como oxidante. De facto, também está descrito que o TEMPO pode atuar como oxidante [96-100]. Como a reação foi realizada com 1 eq. de TEMPO procurou-se otimizar as quantidades de TEMPO utilizadas no processo. Para tal, realizou-se a mesma reação, mas com 0,5 equivalentes de TEMPO. Na análise da CCF desta reação verificou-se o aparecimento de alguns produtos secundários similares aos da reação sem TEMPO, o que indica que a redução dos equivalentes de TEMPO parece ser desvantajosa neste processo de oxidação alílica do composto **1**. Assim, mantém-se a incerteza em relação ao mecanismo reacional envolvido neste processo e outros estudos são necessários.

III.1.1.2) Oxidação do acetato de pregnenolona **2**

Na Tabela 5 podemos visualizar as várias condições reacionais estudadas na oxidação alílica do acetato de pregnenolona **2** e no Esquema 5 a transformação química realizada. O composto **2** foi sujeito praticamente às mesmas condições reacionais que o composto **1** no sentido de complementar os resultados obtidos e a análise efetuada em III.1.1.1). Alguns sistemas reacionais não foram estudados com este substrato, dado que não eram vantajosos na funcionalização do acetato de 16-desidropregnenolona **1**.

Os resultados obtidos nas reações de oxidação alílica do substrato **2** foram de encontro ao esperado visto que o produto da reação foi o acetato de 7-oxopregnenolona **4**. Novamente, o sistema $\text{BiCl}_3/t\text{-BuOOH}$ foi considerado o melhor para realizar esta funcionalização e o que permitiu a obtenção do composto **4** isolado em maior quantidade após o processo de purificação (Tabela 5, entradas 1 e 2). À semelhança do que aconteceu com o composto **1** nas reações com este sistema, o consumo total do substrato **2** ocorreu ao fim de, aproximadamente, 15h tendo sido necessário deixar a reação realizar-se durante 48h para ocorrer a formação de maior quantidade de produto. Os restantes resultados obtidos nas outras reações realizadas com o composto **2** foram similares aos obtidos com o composto **1** com as mesmas condições reacionais, o que permite corroborar o que foi dito em III.1.1.1).

Tabela 5: Condições reacionais das reações de oxidação alílica com o composto 4.

Entrada	Oxidante (2,5 mmol)	Catalisador (0,025 mmol)	Solvente (1,5 mL)	Outros Reagentes	Temp. (°C)	Tempo / h	η (%)	
							C ^a	P ^b
1	<i>t</i> -BuOOH _s	BiCl ₃	CH ₃ CN	c	70	16	84	35
2	<i>t</i> -BuOOH _s	BiCl ₃	CH ₃ CN	c	70	48	98	48
3	<i>t</i> -BuOOH _s	BiOCl	CH ₃ CN	c	70	48	---	---
4	<i>t</i> -BuOOH _s	Bi(OTf) ₃ .xH ₂ O	CH ₃ CN	c	70	48	86 ^d	---
5	<i>t</i> -BuOOH _{aq}	BiCl ₃	CH ₃ CN	c	70	48	88 ^d	---
6	H ₂ O ₂	BiCl ₃	CH ₃ CN	c	70	72	68 ^d	---
7	H ₂ O ₂	Bi(OTf) ₃ .xH ₂ O	CH ₃ CN	c	70	48	84 ^d	---
8	CumOOH	BiCl ₃	CH ₃ CN	c	70	70	---	---
9	<i>t</i> -BuOOH _s	BiCl ₃	CH ₃ CN	TEMPO ^e	70	45	97	---

t-BuOOH_s - hidroperóxido de *t*-butilo em solução 5,0-6,0 M de *n*-decano;

t-BuOOH_{aq} - hidroperóxido de *t*-butilo em solução aquosa a 70%;

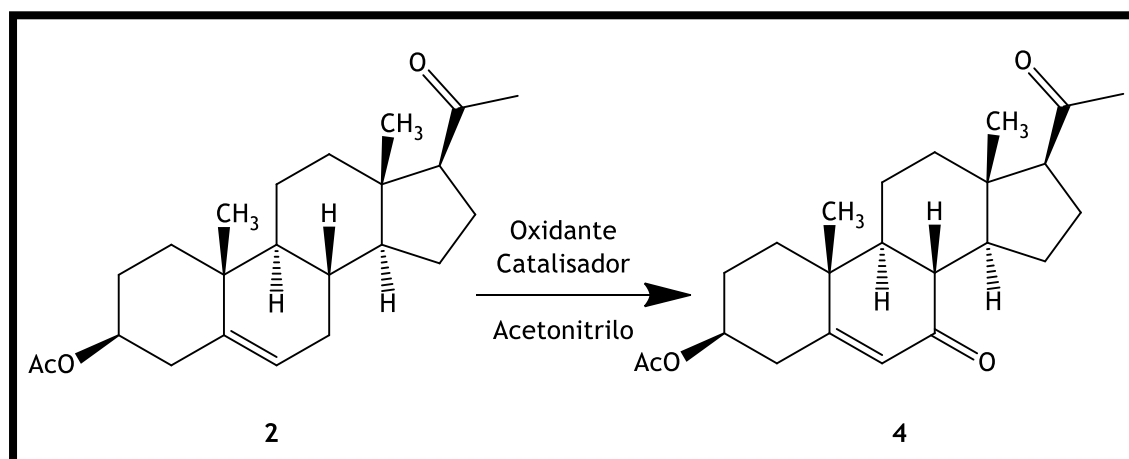
^a C- Rendimento do crude obtido após a realização do *work-up* da reação;

^b P - Rendimento do produto obtido (Δ⁵-7-oxoesteróide) após a coluna cromatográfica;

^c Não aplicável;

^d Rendimento obtido após redissolução com éter etílico;

^e TEMPO - 0,25 mmol;



Esquema 5: Esquema reacional da oxidação alílica do acetato de pregnenolona 2 a acetato de 7-oxopregnenolona 4.

No caso das reações catalisadas com Bi(OTf)₃.xH₂O, tanto com *t*-BuOOH_s e com H₂O₂, novamente, pela cor das manchas na CCF, pareceu que o produto obtido não era o esperado (Tabela 5, entradas 4 e 7). Adicionalmente, nas reações com o composto 2 com este catalisador conseguiu-se obter um óleo esbranquiçado após o processo de isolamento, e na forma de sólido branco após redissolução deste com éter dietílico. Isto facilitou a caracterização da estrutura do composto por ¹H RMN e ¹³C RMN. Os dados espectrais permitiram verificar a formação da 7-oxopregnenolona 5 (Figura 2). Isto indica que o Bi(OTf)₃.xH₂O promoveu a hidrólise do grupo acetato presente em C3 e a oxidação alílica em C7 na mesma reação. Este resultado é bastante

demonstraram a ligação do C3 do núcleo indole ao C5 da progesterona. Neste processo reacional o catalisador utilizado foi o $\text{Bi}(\text{OTf})_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ e o solvente foi o metanol (MeOH). Resumidamente, o esteroide foi dissolvido em MeOH a 65°C e após isto foi adicionado o indole e o catalisador. As reações foram controladas por CCF e foi-se observando a formação de um composto mais lipofílico que precipitava na mistura reacional. A reação foi parada ao fim de 1 hora e o produto foi obtido através de uma filtração a vácuo e subsequente lavagem com MeOH frio. No caso do substrato **1** não se observou reatividade, possivelmente devido à diferente reatividade da enona no anel D.

Os Δ^5 -7-oxoesteroides são esteroides funcionalizados com enonas, o que também pode permitir o ataque nucleofílico do indole à molécula esteroide. Nesta ótica e tendo como base estas condições reacionais, realizou-se esta reação com os Δ^5 -7-oxoesteroides **3** e **4**.

No entanto, no caso do composto **2**, tal como com o composto **1**, podemos verificar que o sólido branco bastante insolúvel não se formou, ao contrário da reação com o composto **4**. Este dado indica que a presença de um epóxido em C16,C17 pode também, de alguma forma, influenciar esta transformação química.

A adição de Michael com o acetato de 7-oxopregnenolona **4** originou um produto, que foi designado como composto **6**, e que foi isolado de forma similar ao da reação com a progesterona. Para elucidar a sua estrutura, procedeu-se à realização de espetros de ^1H RMN, ^{13}C RMN e correlações associadas (COSY, HSQC e HMBC), bem como de IV. Para além disto, foi medido o ponto de fusão (p.f.) do composto. Assim, com os dados dos espetros de RMN acima referidos foi realizada uma análise destes com o intuito de se tentar obter a estrutura final do produto reacional obtido, sendo que os dados principais estão indicados na Tabela 6. A Figura 2 ilustra a estrutura do composto **4**, do núcleo indole e a atribuição de números e letras, respetivamente, aos carbonos destas moléculas. Esta atribuição foi realizada para facilitar a atribuição de sinais dos espetros de RMN na Tabela 6.

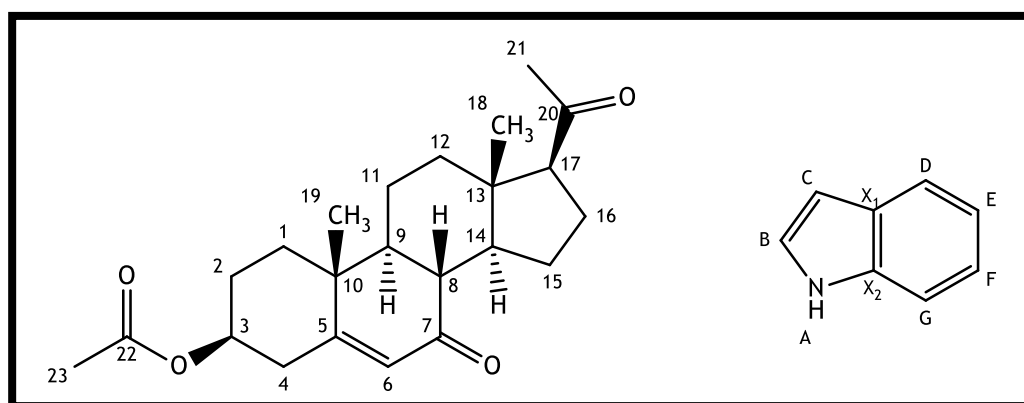


Figura 3: Estrutura e a atribuição de números e letras ao composto **4** (à esquerda) e ao núcleo indole (à direita).

Tabela 6: Atribuição de sinais dos espectros de ^1H RMN e ^{13}C RMN do composto 6.

Posição	δ ^1H (ppm), m	δ ^{13}C (ppm)	Posição	δ ^1H (ppm), m	δ ^{13}C (ppm)
1	-----	a	17	-----	c
2	-----	a	18	0.69, s (18- CH_3)	13.28
3	3.67, s (3 α -H)	62.37	19	1.31, s (19- CH_3)	17.58
4	-----	a	20	-----	209.82 ^b
5	-----	169.91 ^b	21	2.14, s (21- CH_3)	31.66
6	5.95, s (6-H)	125.89	22	-----	-----
7	-----	201.61 ^b	23	-----	-----
8	-----	c	A	8.15, s (N-H)	-----
9	-----	c	B	7.05, s (C-H)	122.35
10	-----	b	C	-----	111.24 ^b
11	-----	a	D	7.39, d (Ar-H)	118.89
12	-----	a	E	7.22, t (Ar-H)	119.21
13	-----	b	F	7.14, t (Ar-H)	122.08
14	-----	c	G	7.61, d (Ar-H)	126.77
15	-----	a	X ₁	-----	118.94 ^b
16	-----	a	X ₂	-----	136.09 ^b

^a Sinal correspondente a carbonos secundários; ^b Sinal correspondente a carbonos quaternários; ^c Sinal correspondente a carbonos terciários;

O processo reacional permitiu a formação de um sólido branco bastante lipofílico. O p.f. (266-267 °C) medido demonstra um elevado grau de pureza do composto obtido. A análise dos dados espectrais, porém, é inconclusiva no que toca à estrutura final da molécula. Contudo, foi possível fazer algumas elucidções da estrutura do composto. O grupo acetoxilo em C3 sofreu hidrólise, o que permitiu o aparecimento de um grupo hidroxilo nessa posição. Este facto é comprovado por quatro razões: 1) aparecimento de um sinal com desvio químico de 3.67 ppm no espectro de ^1H RMN característico do C3 funcionalizado com um grupo hidroxilo; 2) no espectro de ^{13}C RMN podemos denotar a presença de somente dois sinais correspondentes a grupos carbonilos, quando inicialmente no composto 4 existiam 3 referentes a este grupo funcional. Na mesma linha de raciocínio também o número de sinais correspondentes a grupos metilo reduziram de 4 para 3; 3) o catalisador utilizado, o $\text{Bi}(\text{OTf})_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, em reações anteriores realizadas levou à hidrólise deste grupo acetato; 4) o espectro de IV apresenta uma banda larga próxima dos 3200 cm^{-1} . Inicialmente pensava-se que o indole se iria ligar ao Δ^5 -7-oxoesteroide pelo C5 mediante reação de Michael. Contudo, tal não deverá ter acontecido, uma vez que no espectro de ^1H RMN apareceu o sinal característico do hidrogénio da enona presente nesta zona da molécula. Adicionalmente, no espectro de ^{13}C RMN observa-se um sinal a 169.91 ppm de desvio químico que é característico do C5 e do sinal a 125.89 ppm característico do C6 quando existe uma insaturação em C5=C6. Os dados espectrais comprovam que o grupo carbonílico em C7 permanece na molécula, sendo os desvios químicos similares aos do substrato, bem como no

caso do carbonilo em C20, o que indica que, no primeiro caso, a enona provavelmente se manteve intacta e que, no segundo caso, a cadeia lateral também permaneceu inalterada.

Estes resultados até agora podem levar a uma conclusão errática de que o indole não se ligou ao Δ^5 -7-oxoesteroide. Contudo, os sinais de RMN correspondentes ao núcleo indole demonstram que a reação ocorreu. Isto é fundamentado nas seguintes observações: 1) verifica-se a presença de dois dupletos e dois tripletos referentes aos prótons do anel aromático no espectro de RMN de próton, sendo que a integração destes sinais corresponde a um próton; 2) no espectro de ^{13}C RMN, na gama de desvios químicos onde são característicos os sinais deste núcleo podemos evidenciar 3 sinais referentes a carbonos quaternários: 111.24 ppm, 126.77 ppm e 136.09 ppm. Se o núcleo indole não se tivesse ligado ao Δ^5 -7-oxoesteroide, o número total de sinais correspondentes a carbonos quaternários era 2; 3) no espectro de ^1H RMN podemos evidenciar na gama de desvios químicos onde são característicos os sinais deste núcleo que existem somente 2 singuletos, um referente ao próton ligado ao heteroátomo de azoto a 8.16 ppm e outro referente ou ao próton presente no CB ou ao próton presente em CC (ambos os sinais também tiveram uma integração de um próton). Caso a reação não tivesse ocorrido existiria um sinal singuleto para cada um dos prótons ligados a estes carbonos. Assim, podemos concluir que a reação ocorreu num destes dois carbonos pertencentes ao indole, provavelmente em CC.

A análise do espectro de DEPT135 provou a existência de 7 sinais correspondentes aos carbonos secundários da molécula a 20.78, 23.65, 26.23, 26.63, 33.13, 36.97 e 37.72 ppm. Estes sinais corresponderão a C1, a C2, a C4, a C11, a C12, a C15 e a C16. A análise ainda deste DEPT também permitiu evidenciar a existência de 4 sinais correspondentes a carbonos terciários no núcleo esteroide do composto **6** com 31.40, 45.54, 50.28 (sinal correspondente a 2 carbonos) e 62.37 ppm. O último sinal é característico do C3 funcionalizado com um grupo hidroxilo, sendo essa a justificação da sua atribuição a este carbono. Os outros sinais pertencem a um dos seguintes carbonos: C8, C9, C14 e C17. Por exclusão de partes os restantes sinais são referentes aos carbonos quaternários: 209.82 ppm (C20), 201.61 ppm (C7), 169.91 ppm (C5), 44.58 ppm e 39.25 ppm (C10 e C13).

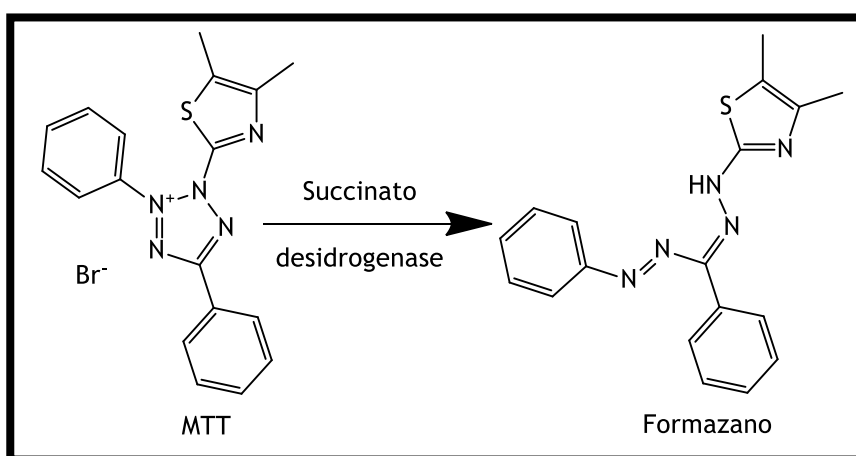
A averiguação dos dados explanada no parágrafo anterior permite concluir claramente que a reação ocorreu e que se formou um novo composto, o composto **6**. No entanto, o local de ligação do Δ^5 -7-oxoesteroide ao indole não foi ainda identificado. A análise dos espectros bidimensionais acabou por ser inconclusiva neste aspeto uma vez que conduziu sempre a becos sem saída. Ainda assim, coloca-se a possibilidade de ter ocorrido um rearranjo molecular do esteroide que permitiu a ocorrência desta transformação química, situação já descrita em esteroides mediante catálise por triflato de bismuto [102]. Esta hipótese pode ser justificada pelo facto de que se, por exemplo, a reação ocorresse num carbono secundário, teríamos de ter 6 carbonos deste tipo na molécula final e não os 7 que são evidenciados uma vez que no Δ^5 -7-oxoesteroide que serviu de substrato reacional do composto **6** existiam esses 7 carbonos secundários, ou seja, para tal acontecer teria de haver uma variação nos sinais correspondentes ao núcleo esteroide e tal não se verifica.

Ainda assim, para uma melhor elucidação estrutural do composto **6** dados de outras técnicas são fundamentais para complementar estas informações recolhidas, por exemplo, ao nível da espectroscopia de massa de alta resolução e da cristalografia de raio-X.

III.2) Ensaio de avaliação biológica

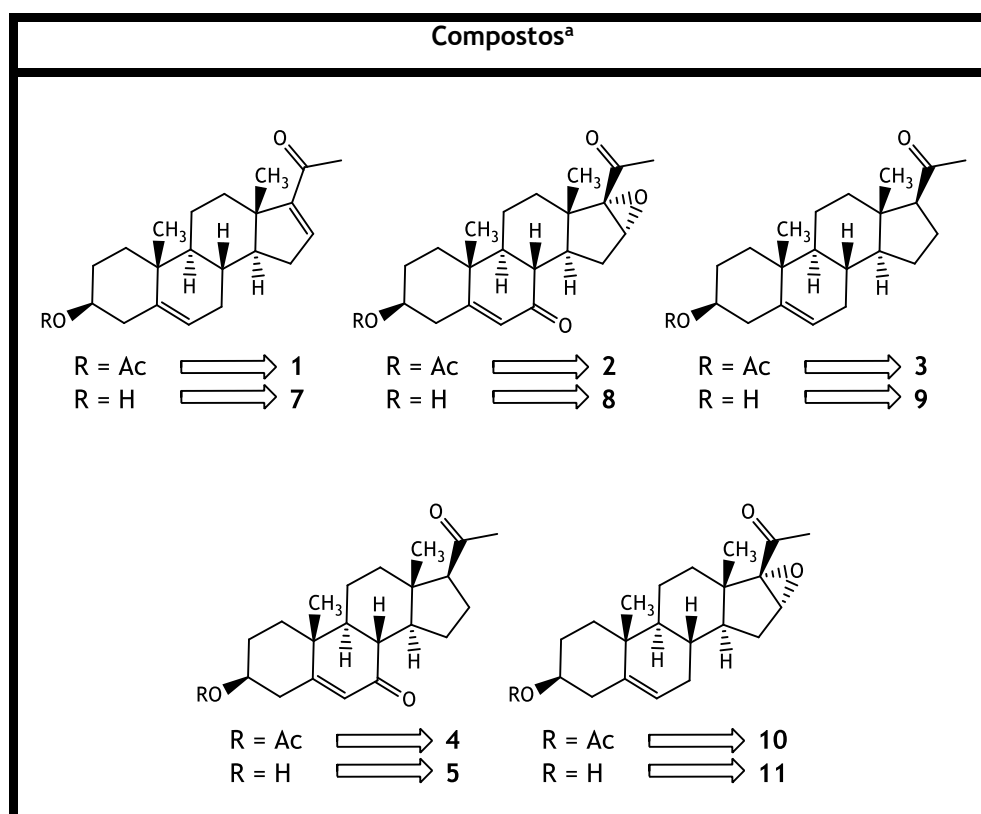
No sentido de avaliar a atividade citotóxica dos compostos sintetizados foi realizado um ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) para os efeitos dos compostos na proliferação celular de células pertencentes às linhas celulares NHDF e PC-3. No ensaio MTT, os efeitos citotóxicos dos compostos nas células podem ser quantificados através da medição da absorvância a 570 nm dos cristais de formazano insolúveis diluídos em DMSO. Estes cristais são originados através da metabolização, por parte de células viáveis, do sal MTT (Esquema 6). Considera-se que quanto maior for a absorvância obtida, maior será a viabilidade celular e o número de células vivas.

Os compostos cuja avaliação dos seus efeitos citotóxicos foi realizada podem ser consultados na Tabela 7. Este ensaio teve como objetivo principal a avaliação biológica dos efeitos na proliferação celular dos compostos **2**, **4** e **6**. Neste sentido, para um estudo mais completo da atividade citotóxica destes compostos foi realizado também o ensaio de MTT nos substratos reacionais dos compostos **2** e **4**, os compostos **1** e **3**. Adicionalmente, também foram testados os derivados de todos estes compostos produzidos após a hidrólise do grupo acetato presente em C3: 7-oxopregnenolona **5**, 16-desidropregnenolona **7**, 16 α ,17 α -epoxi-7-oxopregnenolona **8**, pregnenolona **9**. Estes compostos foram obtidos através de reações de hidrólise alcalina com uma solução de KOH 10 % cujo solvente foi MeOH e controladas por CCF. O acetato de 16 α ,17 α -epoxipregnenolona **10** e a 16 α ,17 α -epoxipregnenolona **11**, fornecidos pela Dra. Raquel Agostinho, também foram avaliados para se perceber melhor os efeitos do grupo 16 α ,17 α -epóxido. O composto **6**, apesar de não sabermos ao certo a sua estrutura foi também sujeito ao ensaio de MTT para avaliar o seu efeito citotóxico.



Esquema 6: Formação de cristais de Formazano a partir da redução do MTT em células viáveis.

Tabela 7: Estrutura dos compostos utilizados no ensaio de MTT de avaliação de citotoxicidade.



^a A estrutura do composto 6 não está presente nesta tabela uma vez que não foi possível chegar à sua estrutura final.

Os ensaios foram realizados nas células NHDF para possibilitar o estabelecimento de um termo de comparação e analisar a seletividade dos efeitos citotóxicos dos compostos para células tumorais, que neste caso são as PC-3, em detrimento das células não-tumorais (NHDF). Primeiramente, foi realizado um ensaio de *screening* onde os compostos foram incubados com as células nos poços das *96-multiwells* durante 72h a uma concentração de 30 μM . Os resultados deste ensaio de *screening* podem ser visualizados na Figura 9. Neste estudo, o 5-fluorouracilo (5-FU) foi utilizado como controlo positivo de citotoxicidade uma vez que é um fármaco preponderante no tratamento de um número variado de tumores. O controlo negativo utilizado foi o meio de crescimento celular sem compostos.

Os resultados, no geral, demonstram um efeito antiproliferativo superior na linha celular PC-3, em relação à linha celular de células normais, NHDF. Ainda assim, os compostos 5, 6 e 11 levam a uma viabilidade celular (%) inferior a 50 % para as NHDF. Relativamente aos resultados nas PC-3, podemos destacar os resultados obtidos com os compostos 6 e 10 neste aspeto, dado que também levaram a uma viabilidade celular (%) inferior a 50 %. Em ambas as linhas celulares nenhum composto estimulou a proliferação celular dado que não foram observadas viabilidades celulares superiores a 100 %. Comparando os resultados obtidos para todos os compostos com os obtidos para o 5-FU podemos evidenciar que todas as moléculas testadas apresentam citotoxicidade inferior à do 5-FU em ambas as linhas celulares. A

comparação dos resultados dos compostos sintetizados com os dos substratos reacionais permite evidenciar que tanto para o composto 1, como para o composto 3, todos os seus derivados apresentam uma menor citotoxicidade, no geral.

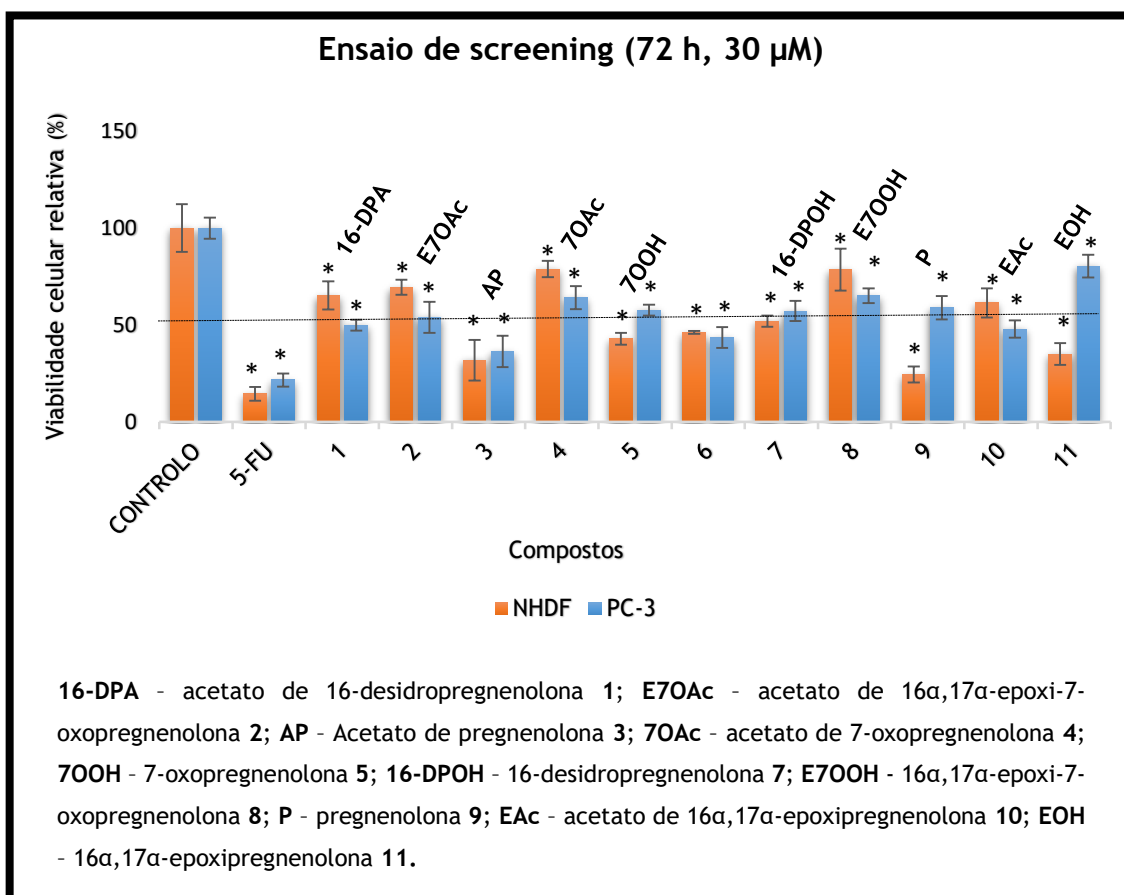


Gráfico 1: Resultados do ensaio de MTT de *screening* nas NHDF e nas PC-3 onde se evidencia a proliferação celular relativa em cada linha celular após a incubação de 72h com os compostos a 30 μ M. Os resultados foram obtidos através da quantificação dos cristais de formazano formados no ensaio de MTT a 570 nm. Os dados são expressados na forma de viabilidade celular em valores percentuais (%) relativamente ao controlo negativo, sendo os valores obtidos referentes à média \pm desvio padrão e representativos de, pelo menos, dois ensaios independentes. A significância estatística dos dados foi averiguada através de um teste *t*-Student (*p*) dos dados em relação ao controlo negativo. * *p*<0,05 indica significância estatística.

Após os ensaios de MTT de *screening* procedeu-se à elaboração de ensaios de MTT para se obter as Curvas de Concentração-Resposta (CCR) dos compostos que levaram a viabilidade celular (%) inferior a 50 % em ambas as linhas celulares testadas. Para isso, as células foram sujeitas a várias concentrações destes compostos (0.01, 0.1, 1, 10, 50 e 100 μ M) durante 72 h. Estes testes permitiram efetuar o cálculo da concentração de composto que induz metade do efeito máximo (IC₅₀) destes compostos sobre as células das linhas celulares testadas. Cálculos de ajuste sigmoidal permitiram a obtenção dos IC₅₀'s considerando um intervalo de confiança de 95 %. Os resultados estão evidenciados na Tabela 8.

Tabela 8: Valores de IC₅₀ (µM) estimados para os compostos que apresentaram uma viabilidade celular (%) inferior a 50 % nos ensaios de screening nas linhas celulares NHDF e PC-3. Os compostos foram incubados durante 72h nas seguintes concentrações: 0.0100, 0.100, 1.00, 10.0, 50.0 e 100 µM. A citotoxicidade dos compostos foi determinada através de um ensaio de MTT. Os valores de IC₅₀ foram calculados através de ajuste sigmoidal considerando um intervalo de confiança de 95 %. Os valores obtidos são representativos de, pelo menos, dois ensaios independentes.

Compostos	Linhas celulares			
	NHDF		PC-3	
	IC ₅₀ (µM)	R ²	IC ₅₀ (µM)	R ²
5-FU	3.157	0.9716	60.46	0.9021
3	41.07	0.9569	43.66	0.9680
5	68.43	0.7918	-----	-----
6	33.25	0.9619	34.35	0.9654
9	66.35	0.8434	-----	-----
10	-----	-----	61.03	0.9403
11	56.28	0.9096	-----	-----

Os resultados obtidos evidenciam uma toxicidade marcada do composto **6** tanto nas NHDF como nas PC-3. Nas NHDF, para além do composto **6**, os outros compostos originaram também uma citotoxicidade inferior à do 5-FU sendo os IC₅₀ destes compostos compreendidos, aproximadamente, entre os 40 µM e os 70 µM. Nas células PC-3, as conclusões são semelhantes sendo que a diferença está nos valores dos IC₅₀ dos compostos que são inferiores ao valor de IC₅₀ do 5-FU.

Os resultados do IC₅₀, resumidamente, demonstram que o composto **6** é o composto mais citotóxico entre todas as entidades química estudadas. Adicionalmente, os valores de IC₅₀ obtidos evidenciam que um grupo hidroxilo é, genericamente, mais preponderante para a atividade que um grupo acetoxilo em C3 uma vez que os derivados com grupos OH neste carbono demonstraram mais citotoxicidade comparativamente aos mesmos compostos acetilados nessa posição. A funcionalização de um esteroide com um núcleo indole pode ser preponderante para a sua atividade uma vez que o composto **6** demonstrou ser o mais citotóxico. Uma enona em C7 e um 16α,17α-epóxido são capazes de conferir alguma citotoxicidade aos esteroides. Contudo, quando estas duas funcionalizações estão presentes na mesma molécula a citotoxicidade é inferior à observada quando encontradas de forma isolada.

III.3) Docking Molecular

Atualmente, muitas neoplasias malignas têm a elas associadas uma desregulação no processo de sinalização desencadeado por hormonas que está intrinsecamente associado ao crescimento e diferenciação celular. Essa desregulação, normalmente, passa por um aumento da expressão dos recetores hormonais. Entre os recetores hormonais associados a este problema podemos destacar os RE, os RP e os RA. Assim, através de estudos de *docking* molecular

pretendeu-se analisar a afinidade dos compostos 1-5 e 7-11 para os recetores. O composto 6 não foi usado porque não se sabe a sua estrutura. Esta simulação computacional permitiu analisar as interações que os compostos testados, provavelmente, irão realizar com estes recetores *in vivo*. Neste sentido, realizou-se o DM primeiramente com os ligandos naturais destes recetores no nosso organismo no sentido de reproduzir as interações que normalmente estes ligandos fazem com os seus recetores. No fim, a verificação da existência dessas interações permitiu a validação do método, o que possibilitou, assim, a realização do DM com os compostos sintetizados. Seguidamente, apresentam-se os resultados obtidos subdivididos nos tópicos de “Validação do método” e de “*Docking* dos compostos com os recetores” sendo que este último está subdividido em “Recetores de estrogénios (RE)”, “Recetores de progesterona (RP)” e “Recetores de androgénios (RA)”. Nestes últimos três tópicos irá ser abordado os resultados obtidos no DM dos compostos com os recetores já referenciados. Na análise destes resultados primeiro examinou-se o melhor composto, aquele que apresentou uma energia de ligação menor, e, conseqüentemente, uma possível maior afinidade para com o recetor. Posteriormente, analisou-se os resultados obtidos para os compostos que correspondem aos produtos reacionais das reações de oxidação alílica e adição de Michael e os seus derivados desacetilados em C3 (compostos 2, 4, 5, 8, 10 e 11).

III.3.1) Validação do método

Na validação do método considerou-se alguns parâmetros que permitiram a tomada de decisão sobre a validação do método. As coordenadas estruturais tridimensionais dos recetores foram retiradas do PDB (do inglês *Protein Data Bank*). A escolha destes recetores recaiu no facto de serem dos principais alvos de moléculas com atividade anticancerígena em tumores hormono-dependentes. As entradas do PDB apresentavam todas os ligandos naturais complexados com o recetor (RE com o 17BE, o RP com a progesterona (P) e o RA com a 5 α DHT).

O DM foi realizado com o programa AutoDockTools com o algoritmo genético (AG). Na validação foi realizado o re-*docking* dos recetores com os ligandos co-cristalizados. Todas as simulações conseguiram reproduzir as interações ligando-recetor descritas na estrutura cristalina do recetor conjugado ao ligando natural no PDB. Os dados obtidos do processo de validação foram organizados na Tabela 9 e na Tabela 10 podemos visualizar a complexação dos ligandos com o recetor após o DM.

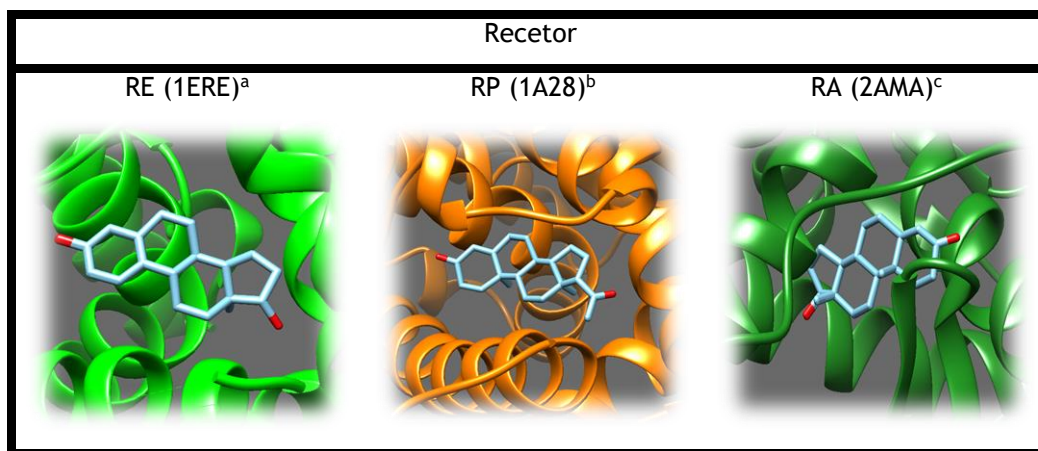
Os valores de RMS obtidos são inferiores a 2.0 Å e estão compreendidos entre os 0.5 Å e os 1.5 Å. Adicionalmente, podemos visualizar que em todos os recetores as conformações pertencem somente a um *cluster*. Estes dois resultados conjugados permitiram a validação do método.

Tabela 9: Resultados do docking de validação com o algoritmo genético (AG) no AutoDockTools.

Código PDB	Complexo R - LN ^a	Resolução (Å)	GA <i>Runs</i>	Nº de <i>clusters</i>	<i>E</i> ^b (Kcal/mol)		RMS (Å)	
					<i>E</i> ^b Mínima	Média <i>E</i> ^b	RMS <i>E</i> ^b Mínima	Média RMS
1ERE	RE-17BE	3.1	100	1	-10.39	-10.38	0.64	0.64
1A28	RP-P	1.8	100	1	-11.76	-11.75	0.59	0.58
2AMA	RA-5αDHT	1.9	10	1	-11.04	-11.04	1.46	1.46

^a Complexo R - LN - Complexo Recetor-Ligando Natural; ^b *E* - Energia;

Tabela 10: Resultados do *docking* de validação dos recetores cristalizados por raio-x com os ligandos co-cristalizados. ^a 17BE complexado com RE; ^b P complexada com RP; ^c 5αDHT complexado com RA.



Os valores de RMS obtidos são inferiores a 2.0 Å e estão compreendidos entre os 0.5 Å e os 1.5 Å. Adicionalmente, podemos visualizar que em todos os recetores as conformações pertencem somente a um *cluster*. Estes dois resultados conjugados permitiram a validação do método.

III.3.2) *Docking* dos compostos com os recetores

Neste patamar do estudo de *docking*, os compostos utilizados neste processo foram os compostos 1-5 e 7-11. Na análise dos resultados primeiramente foi realizado o mapeamento e descrição do sítio ativo do recetor e das respetivas interações que são formadas entre este e o seu ligando natural. Os resultados foram discutidos em relação às energias de ligação obtidas para todos os compostos testados que estão evidenciados na Tabela 11. Por fim, nos compostos com resultados mais pertinentes estudou-se as interações desses compostos com o recetor.

Tabela 11: Energias de ligação (E de ligação) obtidas para cada composto no docking com os recetores de estrogénios (RE), progesterona (RP) e androgénios (RA).

Compostos	E de ligação (Kcal.mol ⁻¹)		
	RE	RP	RA
1	-10.39	-12.11	-12.26
2	-8.08	-11.70	-12.13
3	-9.97	-12.33	-12.12
4	-8.91	-11.81	-12.23
5	-10.06	-11.77	-11.24
7	-10.42	-11.33	-11.04
8	-9.80	-11.67	-11.04
9	-10.17	-11.15	-10.97
10	-9.64	-12.21	-11.92
11	-10.12	-11.05	-10.79
17BE	-10.39	-----	-----
P	-----	-11.76	-----
5 α DHT	-----	-----	-11.04

O domínio de ligação do ligando (DLL) do RE, de acordo com o que está descrito na literatura, é formado pelas hélices α H3 a H12 e pelas folhas β S1 e S2. O 17BE interage com o RE principalmente na zona mais hidrofóbica do DLL. As interações principais observadas são pontes de hidrogénio (PH) e interações hidrofóbicas (IH). A conformação de menor energia do 17BE interage com o recetor por quatro PH (três entre o grupo hidroxilo presente em C3 (O3) com o glutamato 353 (Glu353), com a arginina 394 (Arg394) e com uma molécula de água (H₂O), e uma entre o OH presente em C17 (O17) e a histidina 524 (His524)). As IH's ocorrem no resto da molécula. A interface dos anéis A/B interage com a alanina 350 (Ala350) e leucina 387 (Leu387) na face β e fenilalanina 404 (Phe404) na face α . O anel D interage com a isoleucina 424 (Ile424), glicina 521 (Gly521) e leucina 525 (Leu525) [69]. Na figura 4 podemos visualizar uma representação do DLL do RE.

Analisando os resultados obtidos no DM no RE podemos concluir que a maioria dos compostos apresentaram uma afinidade inferior para o recetor comparativamente à afinidade do 17BE. O único composto que apresentou uma afinidade superior foi o composto 7. Entre os produtos reacionais e derivados, o composto 5 e o 11 foram os que maior afinidade demonstraram para o sítio ativo do recetor. A examinação da estrutura dos compostos com melhores resultados mostra que a presença de um grupo hidroxilo em C3 é benéfico para atividade. Adicionalmente, a presença de uma enona em C7 e de um epóxido em C16,C17 também são bons para a atividade. Contudo, a presença destas duas funcionalizações em conjunto na mesma molécula (composto 8) diminui a afinidade de interação com este recetor. Nas figuras 4 e 5 pode ver-se as interações formadas entre os compostos 5, 7 e 11 e o RE.

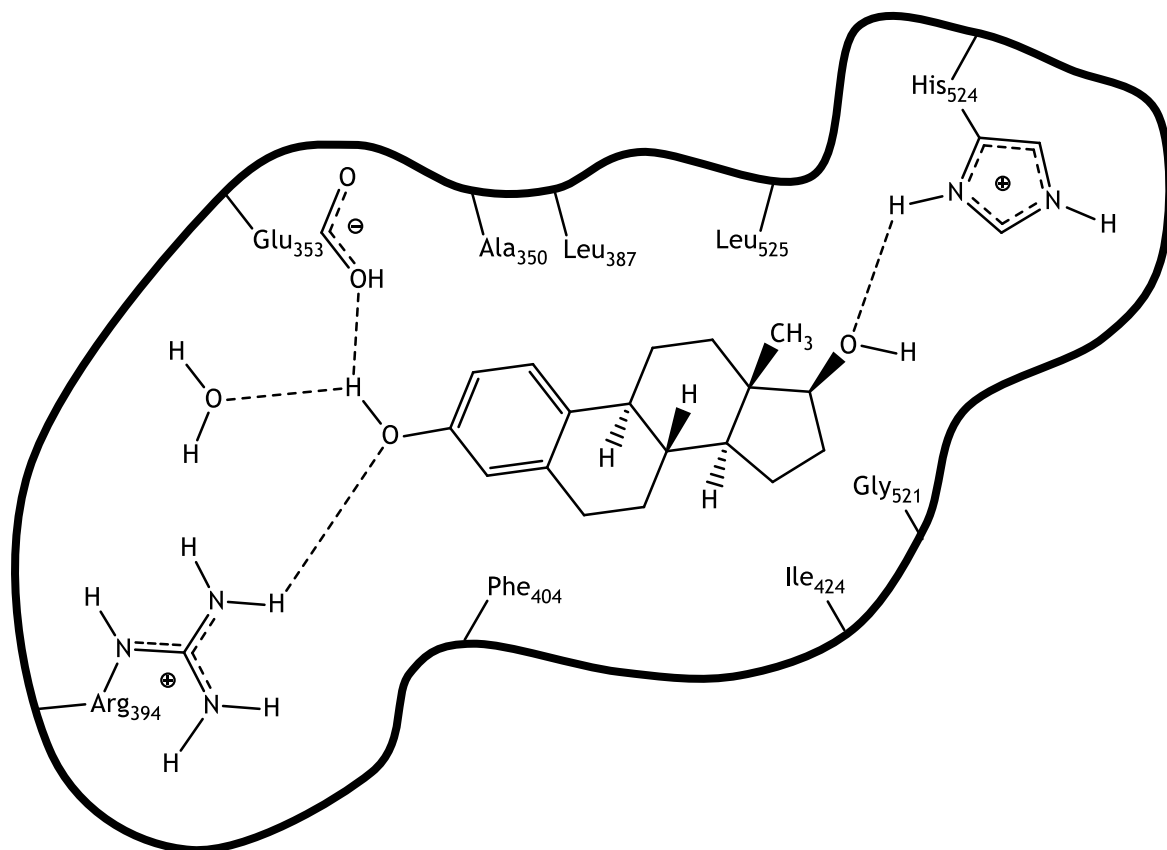


Figura 4: Interações do 17 β -estradiol (17BE) com o recetor de estrogénios (RE) no sítio ativo. As linhas a tracejado representam as interações por PH. A Ala350, Leu387, Leu525, Phe404, Ile424 e Gly521 são os aminoácidos envolvidos em interações hidrofóbicas IH [69].

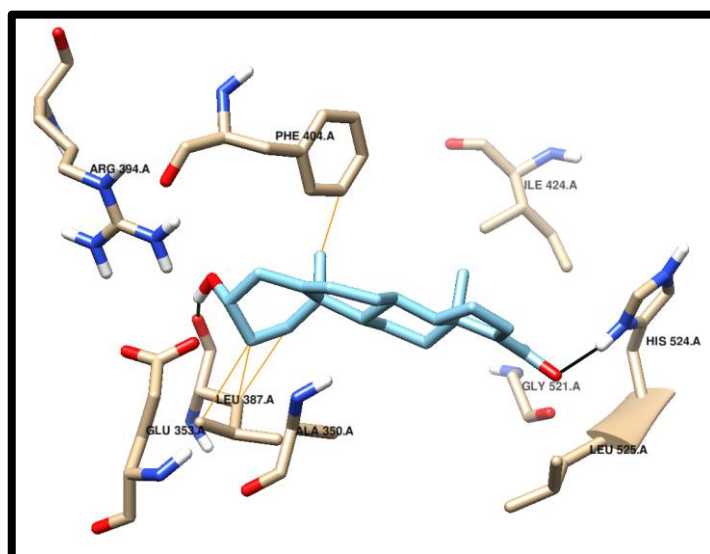


Figura 5: Interações entre a 16-desidropregnenolona 7 e o RE no sítio ativo. Linhas preto - Interações por PH; Linha laranja - Interações IH;

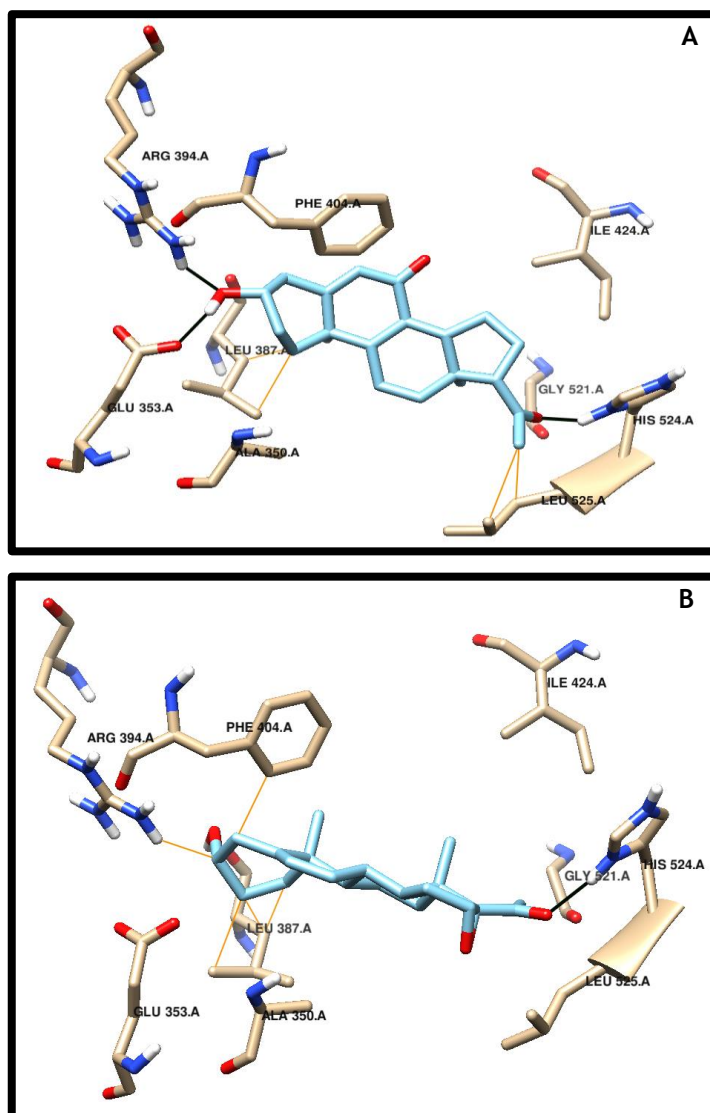


Figura 6: Interações entre a 7-oxopregnenolona **5** (A) e a 16 α ,17 α -epoxipregnenolona **11** (B) e o RE no sítio ativo. Linhas preto - Interações por PH; Linha laranja - Interações IH;

Na figura 5 podemos visualizar as interações do composto **7** com o RE. Este composto estabeleceu interações por PH com a Leu387 e a His524 e interações IH com a Leu387 e a Phe404. Na figura 6A podemos visualizar que o composto **5** interagiu por PH com o Glu353, a Arg394 e a His524 e por IH com a Leu387 e a Leu 525. Na figura 6B verifica-se que o composto **11** interagiu com a His524 por PH e com a Arg394, a Phe404 e Leu387 por IH.

O DLL do RP, de acordo com o que está descrito na literatura, apresenta similaridades estruturais com o do RE. A interação entre a P e o DLL do RP ocorre através de PH entre o grupo carbonilo presente em C3 (3-ceto) e a glutamina 725 (Gln725). Esta interação ocorre uma vez que a fenilalanina 778 (Phe778) ao estar ligada à tirosina 777 (Tyr777) confere uma certa rigidez a esta zona estrutural do DLL. Isto permite uma interação da Tyr777 com a arginina 766 (Arg766) por PH, estabilizando-a. A sua estabilização possibilita a estabilização da posição da Gln725 através de uma comunhão de PH entre Arg766-H₂O-Gln725. Por outro lado, a Gln725 também estabelece um sistema de PH com a Phe778 (Gln725-H₂O-Phe778) que aumenta a rigidez

estrutural neste local. Adicionalmente, a Phe778 também estabelece uma IH com o anel A do ligando. Em relação ao grupo carbonílico presente em C17 (17-ceto) a sua orientação não favorece a formação de PH [71]. Na figura 7 podemos visualizar uma representação do DLL do RP. Nesta figura só está representada a zona da estrutura da progesterona que está envolvida em interações com o recetor.

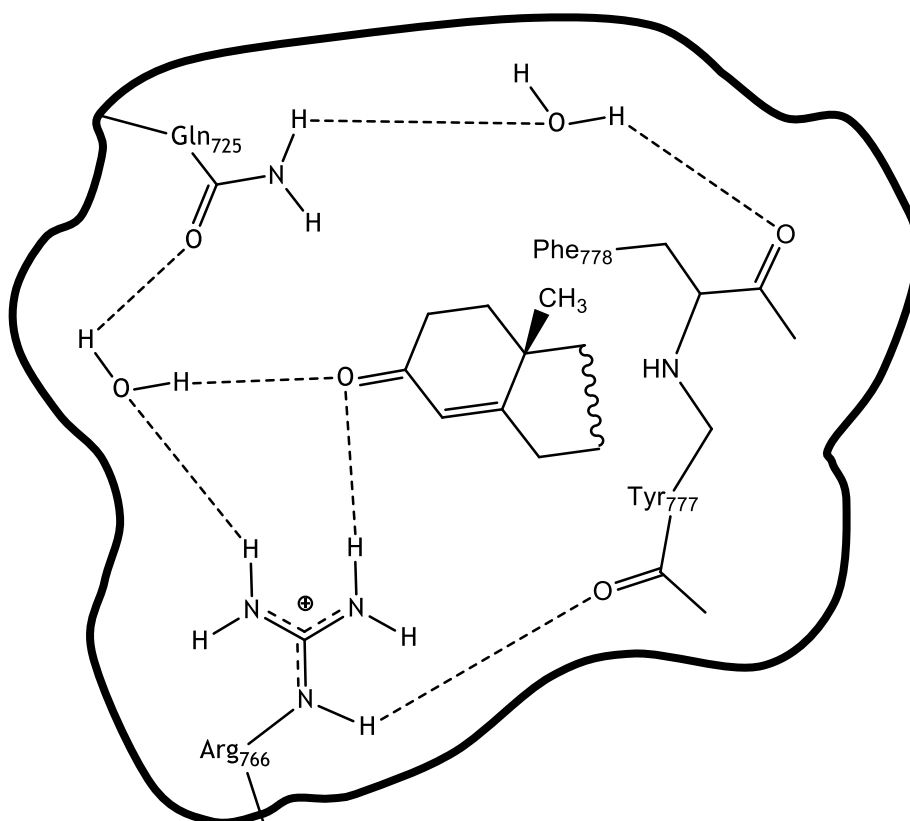


Figura 7: Interações da progesterona (P) com o recetor de progesterona (RP) no sítio ativo. As linhas a tracejado representam as interações por pontes de hidrogénio (PH) [71].

Os resultados obtidos no DM no RP demonstraram que a maioria dos compostos apresentam uma afinidade similar comparativamente à afinidade do P. O composto **3** foi o que demonstrou maior afinidade. Entre os produtos reacionais e derivados, o composto **10** apresentou uma maior afinidade comparativamente aos demais e o composto **11** demonstrou ser o que menos afinidade tem destes. Todos os outros apresentaram afinidades similares. Neste caso, podemos constatar que um grupo acetilo em C3 é benéfico para a atividade uma vez que os compostos que o apresentam na sua estrutura comparativamente aos seus derivados oxidados nessa posição demonstram uma maior afinidade para interagirem com este recetor. Contudo, a presença de um grupo hidroxilo em C3 também demonstrou ser benéfico para a atividade de um dado esteroide, mas somente em associação com a funcionalização de um esteroide com um epóxido em C16,C17, sendo esta a estratégia mais benéfica para a produção de derivados com afinidade para este recetor tendo em conta os resultados obtidos. Nas figuras 8 e 9 pode ver-se as interações formadas entre os compostos **3** e **10** e o RP.

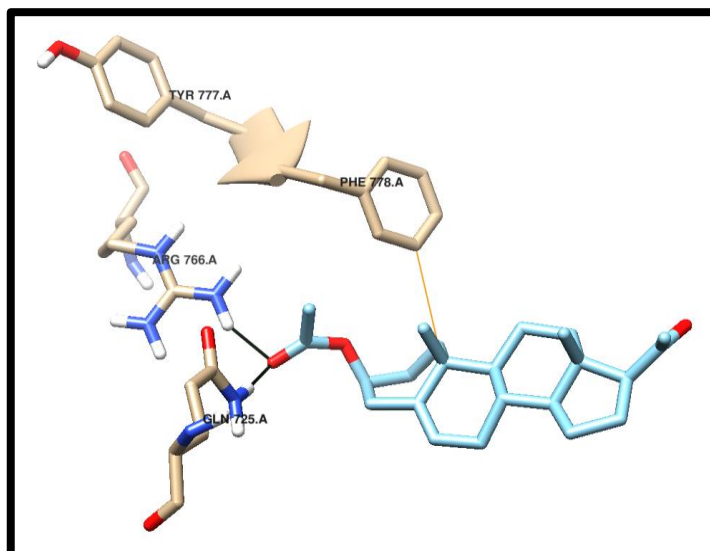


Figura 8: Interações entre o acetato de pregnenolona **3** e o RP no sítio ativo. Linhas preto - Interações por PH; Linha laranja - Interações IH;

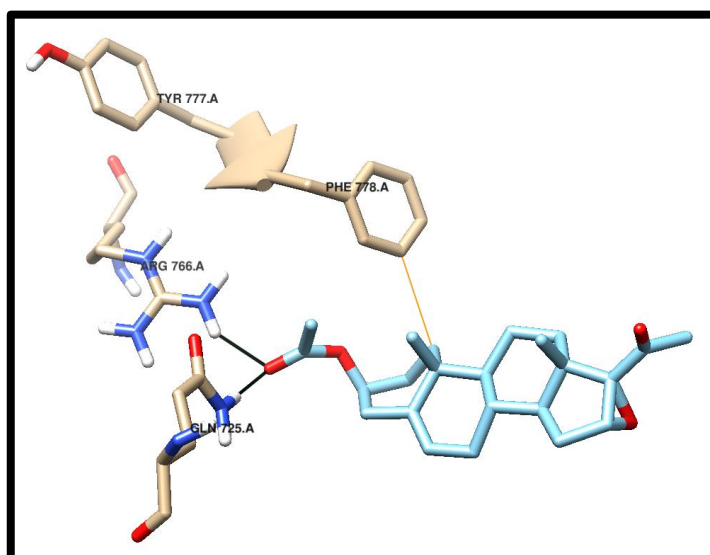


Figura 9: Interações entre o acetato de 16 α ,17 α -epoxipregnenolona **10** e o RP no sítio ativo. Linhas preto - Interações por PH; Linha laranja - Interações IH;

Na figura 8 podemos visualizar as interações do composto **3** com o RP. Este composto estabeleceu interações por PH com a Gln725 e a Arg766 e interações IH com a Phe778. Na figura 9 podemos visualizar que o composto **10** estabeleceu as mesmas interações que o composto **3**.

O DLL do RA, de acordo com o que está descrito na literatura, é constituído por quatro hélices α (H3-H5 e H11) e uma folha β próxima de H5. Relativamente a interações entre T e DHT e o RA estas ocorrem por PH entre o grupo carbonílico presente em C3 (3-ceto) e a arginina 752 (Arg752) e a glutamina 711 (Gln711). Este género de interações também ocorre entre o grupo hidroxilo em C17 (O17) e a asparagina 705 (Asn705) e a treonina 877 (Thr877). No primeiro caso, a diferença na interação da T para a DHT é que, no caso da primeira, os aminoácidos estão mais próximos da estrutura do ligando, o que faz com que a PH em 3-ceto seja mais forte no caso da T. Isto acontece porque o anel A da T é mais rígido do que o da 5 α DHT devido à

insaturação presente em C4. É importante também evidenciar a presença de PH entre os resíduos de aminoácidos envolvidos nas interações e H₂O que conferem uma certa rigidez nesta zona da proteína. Analisando as possíveis interação hidrofóbicas do recetor com estes dois ligandos, estas são bastante similares, quer em número (20 no caso da T e 18 no caso da 5 α DHT) quer nas distâncias interatômicas entre os aminoácidos que estabelecem a interação e a zona do ligando envolvida nesse processo [73]. Na figura 10 podemos visualizar uma representação do DLL do RP.

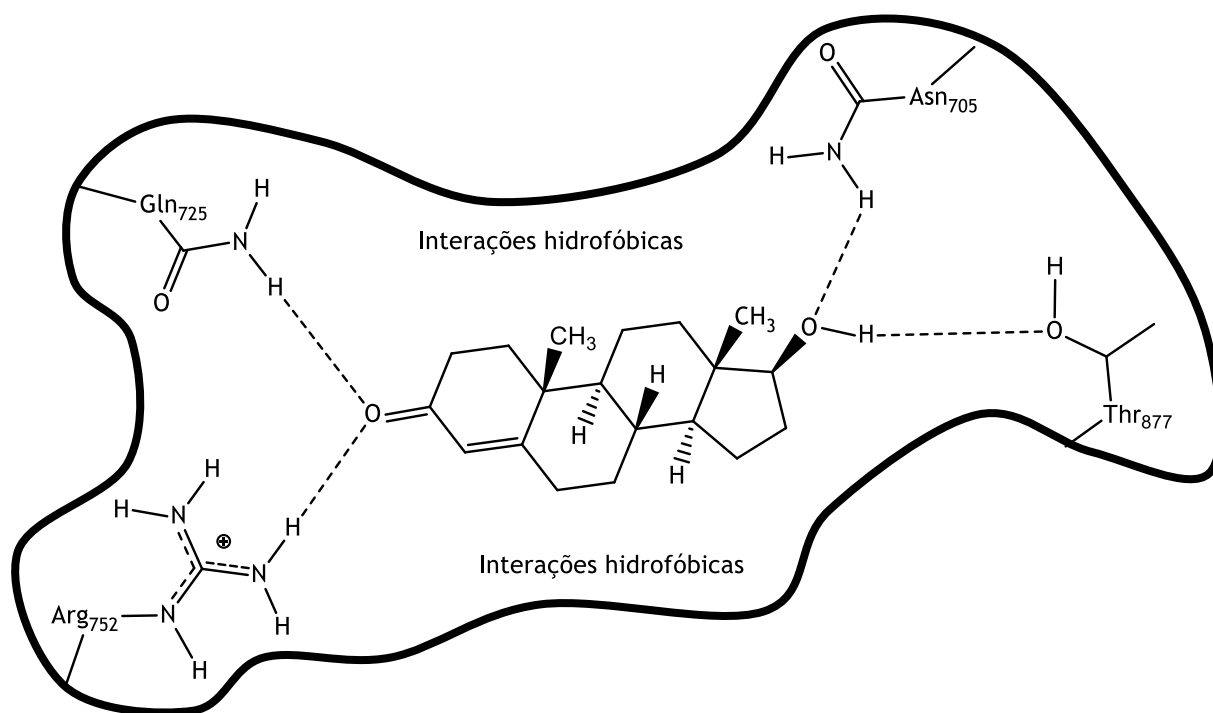


Figura 10: Interações da testosterona (T) com o recetor de androgénios (RA) no sítio ativo. As linhas a tracejado representam as interações por pontes de hidrogénio (PH). As diferenças para as interações com a dihidrotestosterona (5 α DHT) é a distância da Gln725 e Arg752 para o substrato, o que faz com que as pontes de hidrogénio (PH) sejam mais fracas no caso da 5 α DHT. As linhas a tracejado representam as interações por PH [73].

No RA, os resultados do DM evidenciaram que somente os compostos **9** e **11** apresentam afinidade inferior ao 5 α DHT. O composto **1** foi o que apresentou uma maior afinidade. Entre os produtos reacionais e derivados, o composto **4** foi o que mais afinidade para interagir com o RA no sítio ativo demonstrou. Os resultados obtidos neste recetor evidenciam que a presença de um grupo acetilo em C3 é benéfico para a atividade uma vez que os compostos que o apresentam comparativamente aos derivados que apresentam grupos hidroxilos nesta posição demonstram uma maior afinidade para interagir com o recetor. Adicionalmente, podemos auferir que a presença de uma enona em C7 é benéfica para a atividade. Nas figuras 11 e 12 pode ver-se as interações formadas entre os compostos **1** e **4** e o RA.

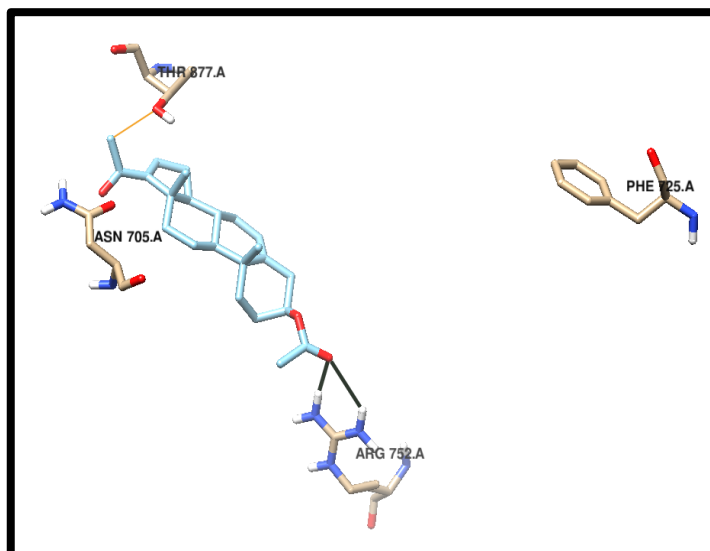


Figura 11: Interações entre o acetato de 16-desidropregnenolona 1 e o RA no sítio ativo. Linhas preto - Interações por PH; Linha laranja - Interações IH;

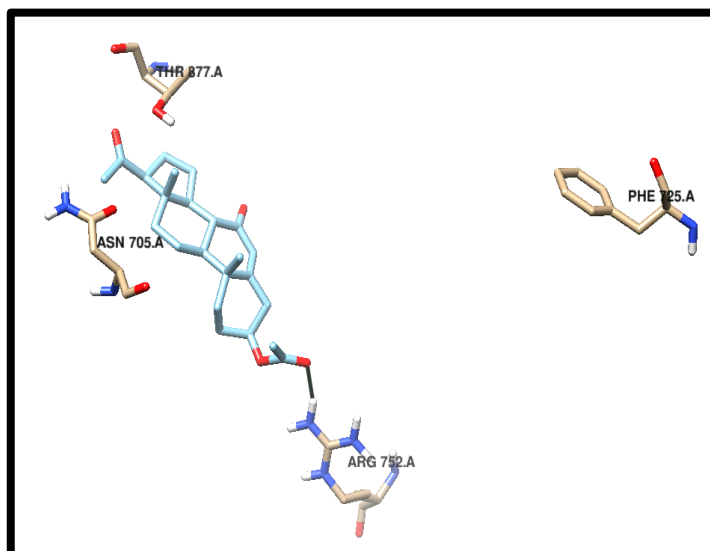


Figura 12: Interações entre o acetato de 7-oxopregnenolona 4 e o RA no sítio ativo. Linhas preto - Interações por PH; Linha laranja - Interações IH;

Na figura 11 podemos visualizar as interações do composto 1 com o RA. Este composto estabeleceu interações por PH com a Arg752 e interações IH com a Thr877. Na figura 12 podemos visualizar que o composto 4 estabeleceu interações por PH com a Arg752.

Capítulo IV - Conclusão e perspectivas futuras

A química é uma área científica em constante desenvolvimento devido à sua ampla aplicabilidade e à gama de opções que oferece para solucionar um determinado problema. Neste âmbito, duas das temáticas sobre as quais nos podemos debruçar e cuja importância atual é extrema são a saúde do nosso planeta e as patologias cujo tratamento ainda não é possível, sendo que estas duas áreas estão interligadas.

Os meios que a química muitas vezes apresenta para, por exemplo, sintetizar um determinado composto não são os melhores. Reagentes muito tóxicos e estratégias reacionais muito dispendiosas são alguns dos problemas que a química apresenta. A solução para estes dilemas passa por um conceito de Química Verde. A rentabilização de um determinado processo reacional tornando-o mais económico e ecológico é essencial. Neste sentido, foram definidos os 12 Princípios da Química Verde. Também foi nesse sentido que foi realizado um estudo de processo de oxidação alílica de Δ^5 -esteroides. A justificação para, especificamente, se ter estudado esta reação num grupo de esteroides específico prende-se com a segunda temática acima enunciada. Os esteroides estão presentes amplamente no nosso organismo, nomeadamente atuando como hormonas que atuam em vias de sinalização envolvidas na regulação do crescimento e diferenciação celular. Como tal, uma desregulação nestas vias de sinalização celular pode originar um crescimento e diferenciação desregulada das células, o que pode originar tumores, mais concretamente, tumores hormono-dependentes. Isto torna extremamente importante a funcionalização de moléculas esteroides para combater este género de patologias. Neste contexto, as reações de funcionalização oxidativa, nomeadamente, de oxidação alílica, têm sido bastante importantes uma vez que os esteroides oxidados têm-se demonstrado excelentes agentes quimioterápicos.

Os resultados evidenciados no estudo do processo de oxidação alílica permitiram concluir que o melhor sistema para se proceder à oxidação alílica de Δ^5 -esteroides a Δ^5 -7-oxoesteroides envolve o uso de *t*-BuOOH como agente oxidante e de BiCl₃ como catalisador. O estudo foi realizado testando vários peróxidos ambientalmente mais aceitáveis que os peroxiácidos e reagentes de crómio(IV), e catalisadores com capacidade de ativação dos agentes oxidantes utilizados. O sistema *t*-BuOOH/BiCl₃ permitiu a obtenção do produto principal com os melhores rendimentos. Ainda assim, a realização de uma CC para a purificação do produto levou à perda de muito composto uma vez que a polaridade dos produtos secundários era muito similar às do produto principal da reação, o que fez com que a separação não fosse muito eficiente. Um resultado bastante importante neste estudo envolveu o catalisador metálico Bi(OTf)₃.xH₂O uma vez que este permitiu a oxidação alílica em C7 e a hidrólise em C3 na reação com o composto **3**. Muito provavelmente, a capacidade dos catalisadores de bismuto(III) poderem atuar como ácidos de Lewis possibilitou a hidrólise observada. Este

resultado é bastante interessante uma vez que um C3 hidroxilado está bastante associado à atividade terapêutica de muitas moléculas esteroides.

As reações de oxidação alílica foram estudadas principalmente no 16-DPA 1, uma vez que este é um dos principais precursores semissintético da síntese de esteroides comerciais e utilizados na terapêutica. Adicionalmente, foram realizados também estudos com o AP 3 uma vez que a pregnenolona endógena é um dos principais precursores da maioria das hormonas. Nas reações de oxidação alílica com o composto 1 obteve-se um resultado bastante interessante. Inicialmente, o esperado era a dupla oxidação alílica em C7 e em C15. Contudo, o que se observou foi a oxidação alílica em C7 e a epoxidação da insaturação presente em C16=C17. Isto pode ter ocorrido devido a espécies nucleofílicas produzidas no meio reacional. Contudo, ainda não foi possível saber concretamente o mecanismo envolvido nesta funcionalização sendo isto um dos estudos futuros que deve ser realizado.

A natureza radicalar de reações de oxidação alílica com hidroperóxidos e catalisadores metálicos levou à realização de reações com o TEMPO. Os resultados não corroboram esta natureza do mecanismo reacional. Contudo a Dra. Raquel Agostinho realizou este mesmo estudo também com butilhidroxitolueno e, no caso deste inibidor radicalar, os resultados estão de acordo com os observados na literatura e que indicam que, provavelmente, o mecanismo reacional é radicalar. Sendo assim, nesta reação o TEMPO poderá estar a atuar como oxidante. Assim, são necessários mais estudos para compreender melhor o que está por detrás destas reações.

Adicionalmente, foram realizadas funcionalizações através da reação de adição de Michael, uma vez que esta transformação química tem ganho um crescente destaque na produção de compostos com propriedades terapêuticas, principalmente no campo dos esteroides. Assim, procedeu-se primeiramente à funcionalização da progesterona e os resultados obtidos foram similares aos observados anteriormente. Os substratos reacionais bem como os seus produtos correspondentes também foram estudados neste processo reacional sendo que o resultado mais importante se observou com o acetato de 7-oxopregnenolona 4, originando-se o composto 6, cuja estrutura é desconhecida. Assim, foi realizado o estudo dos dados espectrais de RMN e IV deste composto, na tentativa de se chegar à estrutura final deste composto. Contudo, tal não foi possível, pelo que é necessário no futuro realizar mais estudos, nomeadamente, ao nível da cristalografia por raios-X e de espectro de massa de alta resolução. O núcleo indole foi o escolhido nesta reação de adição nucleofílica uma vez que é altamente reconhecido no nosso organismo e também está associado a atividade quimioterápica.

Os compostos sintetizados, os seus precursores e os seus derivados hidrolisados em C3 foram avaliados citotxicamente nas linhas celulares NHDF e PC-3. Os resultados demonstraram alguma toxicidade para a linha celular de cancro da próstata em comparação com a linha NHDF, uma linha de celular de fibroblastos normais humanos. Contudo, o objetivo principal destes ensaios biológicos prendia-se com a avaliação dos efeitos citotóxicos destes compostos em linhas celulares com recetores hormonais associados a tumores hormono-dependentes, as LNCaP (apresenta RA's) e as MCF-7 (apresenta RE's e RP's). Tal não foi possível devido a

problemas relacionados com o cultivo destas linhas celulares o que só permite a amostragem de resultados na linha celular PC-3, uma linha celular de cancro da próstata que não depende da atuação hormonal. Assim, é imperativo efetuar estudos futuros de citotoxicidade nestas linhas celulares para complementar os resultados obtidos. Dentro destes resultados, podemos referenciar o composto **6** como o mais citotóxico. Este composto foi testado a nível biológico no sentido de tentar se perceber se valeria a pena continuar estudos em indolilesteroides.

Os estudos de *docking* foram realizados em recetores hormonais associados a neoplasias malignas. Genericamente, os resultados demonstraram a importância de funções oxidadas na estrutura dos esteroides, na interação destes com os recetores. Este estudo não foi realizado para o composto **6** dado que a sua estrutura não estava determinada. Em termos de trabalho futuro neste capítulo podemos referenciar a realização deste estudo na aromatase, uma enzima envolvida na biossíntese de estrogénios e realização de todos os estudos de *docking* no composto **6**, quando se tiver a certeza sobre a sua estrutura.

Capítulo V - Materiais e métodos

V.1) Síntese Química

V.1.1) Generalidades

Os reagentes, catalisadores, agentes oxidantes e solventes orgânicos utilizados foram obtidos comercialmente. A maioria dos reagentes foi obtida através da *Sigma Aldrich* à exceção do indole (*Acros Organics*), do 4-dimetilaminopiridina ou DMAP (*Fluka Analytical*). Os catalisadores e os agentes oxidantes foram todos obtidos através da *Sigma Aldrich* e os solventes orgânicos através da *Fisher Scientific*. Relativamente ao processo de isolamento do produto, todas as substâncias usadas foram adquiridas também através da *Sigma Aldrich*, à exceção do sulfato de sódio anidro que foi obtido da José Manuel Gomes dos Santos, Lda. No que toca ao processo de purificação por coluna cromatográfica, a sílica-gel usada apresentava um tamanho de 0,060 - 0,200 mm e foi adquirida à *Acros Organics*.

As reações foram realizadas em placas de aquecimento e agitação *Heidolph* da *Fisher Scientific*. A concentração do produto das reações a pressão reduzida foi realizada no evaporador rotativo R-215 da *Buchi*.

As placas de cromatografia de camada fina (CCF) são provenientes da *Macherey-Nagel GmbH & Co. KG*. As manchas nas placas de CCF foram observadas na luz UV com comprimento de onda de 254 nm num equipamento da *Vilber Lourmat* (CN-15.LC). Todas as placas de CCF foram reveladas num revelador universal de esteroides constituído por etanol a 99,9% (Fábrica do Álcool - Manuel Vieira & C^a (Irmão) Sucrs, Lda.) e ácido sulfúrico (*VWR Chemicals*) na proporção de 95:5, seguindo-se aquecimento a 120 °C em placa de aquecimento.

Os espectros de Infravermelho (IV) foram coletados no aparelho *Nicolet iS10: smart iTR* da *ThermoScientific* equipado com um cristal de diamante ATR (do inglês *Attenuated Total Reflectance*). Na aquisição dos dados, a amostra sólida foi colocada sob o cristal e, posteriormente, o espectro foi adquirido. Antes da obtenção do espectro IV do composto foi realizado o branco (espectro do ar) para o programa definir a linha de base de aquisição do espectro do composto. O espectro foi coletado à temperatura ambiente (TA) com números de onda (em unidades do Sistema Internacional (SI) de cm^{-1}), compreendidos entre os 600 cm^{-1} e os 4000 cm^{-1} , em função da Transmitância (em valores percentuais - %). A amostra foi sujeita a 16 varrimentos e a resolução espectral usada foi de 2 cm^{-1} .

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram adquiridos num espectrómetro da *Bruker Avance* de 400 MHz. O RMN de protão (^1H RMN) foi adquirido a 400 MHz e o ^{13}C RMN a 100 MHz. A análise dos espectros foi realizada através do *software* da *Bruker*, o *TopSpin 3.5 pl 7* de abril de 2017. As amostras apresentavam cerca de 10 mg de composto e foram dissolvidas em clorofórmio deuterado (CDCl_3) que origina um sinal a 7,21 ppm com multiplicidade de singuleto no ^1H RMN. Os desvios químicos (δ) foram dados em partes por

milhão (ppm) e o tetrametilsilano (TMS) foi usado como referência. Nalguns espectros de ^1H RMN foi usada água deuterada (D_2O) como referência interna. As constantes de acoplamento (J) estão descritas em hertz (Hz). A multiplicidade de sinal é descrita de acordo com a seguinte nomenclatura: s=singuleto, d=duplete, t=tripleto e m=multiplete para multiplicidades superiores. A técnica de DEPT (do inglês *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) e os espectros bidimensionais de HSQC (do inglês *Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy*), HMBC (do inglês *Heteronuclear Multiple-Bond Correlation Spectroscopy*) e COSY (do inglês *COrrrelation Spectroscopy*) também foram realizadas para o composto 6.

V.1.2) Reações de oxidação alílica

V.1.2.1) Acetato de 16-desidropregnenolona 1

V.1.2.1.1) Oxidação com hidroperóxido de *t*-butilo (solução 5,0-6,0 M em *n*-decano) e tricloreto de bismuto

I. Num balão de fundo redondo, o composto 1 (0,50 mmol) foi dissolvido em CH_3CN (3,0 mL) com auxílio de aquecimento a $70\text{ }^\circ\text{C}$ e agitação. Após a dissolução e a estabilização da temperatura a $70\text{ }^\circ\text{C}$, adicionou-se o *t*-BuOOH em solução 5,0-6,0 M em *n*-decano (5,0 mmol) e o BiCl_3 (0,050 mmol). A reação decorreu à temperatura de $70\text{ }^\circ\text{C}$ durante 48h.

A reação foi controlada por CCF [eluente: éter de petróleo 40-60 $^\circ\text{C}$:acetato de etilo 2:1]. Após 48 horas de reação denotou-se uma mancha com $R_f=0,6$ correspondente ao produto da reação, vestígios de produtos secundários e de matéria prima inalterada.

Após a reação terminar a mistura foi deixada arrefecer até à TA e colocada sob agitação durante 3 horas com uma solução de sulfito de sódio a 10 % (50 mL). De seguida, a mistura foi sujeita a uma extração líquido-líquido com acetato de etilo (3 X 50 mL) e, posteriormente, a fase orgânica (FO) foi lavada com uma solução saturada de bicarbonato de sódio (25 mL) e água destilada (25 mL). A FO foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada a vácuo e evaporada a pressão reduzida no evaporador rotativo até à *secura*. No fim, obteve-se um óleo amarelo com um rendimento de, aproximadamente, 63 %.

No processo de purificação foi realizada uma cromatografia em coluna (CC) [eluente: éter de petróleo:acetato de etilo 5:1] sendo que um sólido branco foi obtido após a evaporação das frações da coluna e secagem numa estufa de vácuo a uma pressão de -0,6 mbar e a uma temperatura de $50\text{ }^\circ\text{C}$. O produto da reação foi analisado por ^1H RMN e ^{13}C RMN, sendo que os dados espectrais obtidos permitiram verificar a obtenção do acetato de 16 α ,17 α -epoxi-7-oxo-pregnenolona 2 [88], com um rendimento de 19 %.

p.f. $187\text{-}189\text{ }^\circ\text{C}$; ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 0.99 (3H, s, 18- CH_3), 1.15 (3H, s, 19- CH_3), 1.96 (3H, s, 21- CH_3), 1.98 (3H, s, 23- CH_3), 3.64 (1H, s, 16 α -H), 4.64 (1H, m, 3 α -H), 5.65 (1H, s, 6-H); ^{13}C RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 60.94 (C16), 69.99 (C17), 72.01 (C3), 126.39 (C6), 165.29 (C5), 170.28 (C22), 200.81 (C7), 205.21 (C20)

II. A reação foi realizada nos mesmos moldes da reação em V.1.2.1.1) I. sendo que o tempo reacional foi de 24h.

A reação foi controlada por CCF [eluente: éter de petróleo 40-60 °C:acetato de etilo 2:1]. Após 24 horas de reação denotou-se uma mancha com $R_f=0,6$ correspondente ao produto da reação, vestígios de produtos secundários e de matéria prima inalterada.

O isolamento foi realizado da mesma forma que na reação V.1.2.1.1) I. obtendo-se um óleo amarelo com um rendimento de, aproximadamente, 66 %.

O processo de purificação também foi realizado de forma similar ao da reação V.1.2.1.1) I. obtendo-se um sólido branco amarelado. O produto da reação foi analisado por ^1H RMN e ^{13}C RMN. Os dados espectrais obtidos demonstraram-se similares aos descritos em V.1.2.1.1) I., o que permitiu verificar a obtenção do composto 2, com um rendimento de, aproximadamente, 14 %.

III. A reação foi realizada nos mesmos moldes da reação em V.1.2.1.1) I. sendo que o tempo reacional foi de 72h. A cada 24h, foram adicionados o *t*-BuOOH em solução 5,0-6,0 M em *n*-decano (2,5 mmol) e o BiCl_3 (0,025 mmol) sob agitação.

A reação foi controlada por CCF [eluente: éter de petróleo 40-60 °C:acetato de etilo 2:1]. Após 72 horas de reação denotou-se uma mancha com $R_f=0,6$ correspondente ao produto da reação, vestígios de produtos secundários e de matéria prima inalterada.

O isolamento foi realizado da mesma forma que na reação V.1.2.1.1) I. obtendo-se um óleo amarelo com um rendimento de, aproximadamente, 67 %.

O processo de purificação também foi realizado de forma similar ao da reação V.1.2.1.1) I. obtendo-se um sólido amarelado. O produto da reação foi analisado por ^1H RMN e ^{13}C RMN. Os dados espectrais obtidos demonstraram-se similares aos descritos em V.1.2.1.1) I., o que permitiu verificar a obtenção do composto 2, com um rendimento de, aproximadamente, 10 %.

V.1.2.1.2) Oxidação com hidroperóxido de *t*-butilo (solução 5,0-6,0 M em *n*-decano) e oxiclreto de bismuto

A reação foi realizada nos mesmos moldes da reação em V.1.2.1.1) I., mas usando BiOCl (0,050 mmol) em vez de BiCl_3 , sendo que o tempo reacional foi de 24h.

A reação foi controlada por CCF [eluente: éter de petróleo 40-60 °C:acetato de etilo 2:1]. Após 48 horas de reação verificou-se que a velocidade da reação era muito reduzida pelo que se optou por para a reação, não tendo sido realizado *work-up*.

V.1.2.1.3) Oxidação com hidroperóxido de *t*-butilo (solução 5,0-6,0 M em *n*-decano) e triflato de bismuto

A reação foi realizada nos mesmos moldes da reação em V.1.2.1.1) I. $\text{Bi}(\text{OTf})_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (0,050 mmol), sendo que o tempo reacional foi de 48h.

A reação foi controlada por CCF [eluyente: éter de petróleo 40-60 °C:acetato de etilo 2:1]. Após 48 horas de reação denotou-se uma mancha com $R_f=0,6$ correspondente ao produto da reação, vestígios de produtos secundários e de matéria prima inalterada.

O isolamento foi realizado da mesma forma que na reação V.1.2.1.1) I., obtendo-se um óleo esbranquiçado em quantidades muito reduzidas.

V.1.2.1.4) Oxidação com hidroperóxido de *t*-butilo (solução aquosa a 70%) e tricloreto de bismuto

A reação foi realizada nos mesmos moldes da reação em V.1.2.1.1) I., mas utilizando *t*-BuOOH em solução aquosa de 70 % (5,0 mmol), sendo que o tempo reacional foi de 48h.

A reação foi controlada por CCF [eluyente: éter de petróleo 40-60 °C:acetato de etilo 2:1]. Após 48 horas de reação denotou-se uma mancha com $R_f=0,6$ correspondente ao produto da reação, vestígios de produtos secundários e de matéria prima inalterada.

O isolamento foi realizado da mesma forma que na reação V.1.2.1.1) I. obtendo-se um óleo amarelo. Após isto deixou-se a mistura na *hotte* durante 2 dias e procedeu-se à redissolução do óleo em éter dietílico o que levou à formação de um sólido branco. O produto da reação foi analisado por ^1H RMN e ^{13}C RMN. Os dados espectrais obtidos demonstraram-se similares aos descritos em V.1.2.1.1) I., o que permitiu verificar a obtenção do composto 2, com um rendimento de, aproximadamente, 79 %.

V.1.2.1.5) Oxidação com hidroperóxido de *t*-butilo (solução 5,0-6,0 M em *n*-decano) e hidróxido de Paládio(II) numa matriz de carvão

Num balão de fundo redondo, o composto 1 (0,64 mmol) foi dissolvido em CH_2Cl_2 (1,0 mL) à TA com auxílio de agitação. Após o 1 estar dissolvido, à TA adicionou-se o $\text{Pd}(\text{OH})_2\text{-C}$ (0,032 mmol) e K_2CO_3 (0,080 mmol). A mistura foi arrefecida até aos 4°C através de um banho de gelo e, posteriormente, adicionou-se o *t*-BuOOH (1,6 mmol) sob agitação. A mistura foi aquecida até à TA e a reação decorreu à TA durante 72h. A cada 24h, foram adicionados o $\text{Pd}(\text{OH})_2\text{-C}$ (0,016 mmol) e K_2CO_3 (0,040 mmol) e o *t*-BuOOH (0,80 mmol) sob agitação.

A reação foi controlada por CCF [eluyente: éter de petróleo 40-60 °C:acetato de etilo 2:1]. Após 72 horas de reação denotou-se uma mancha com $R_f=0,6$ correspondente ao produto da reação, e várias manchas produtos secundários e vestígios de matéria prima inalterada.

Após a reação terminar a mistura foi deixada arrefecer até à TA e colocada sob agitação durante 3 horas com uma solução de sulfito de sódio de 10 % (50 mL). De seguida, a mistura foi sujeita a uma extração líquido-líquido com acetato de etilo (3 X 50 mL) e, posteriormente, a fase orgânica (FO) foi lavada com uma solução saturada de bicarbonato de sódio (25 mL) e água destilada (25 mL). A FO foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada a vácuo e evaporada a

pressão reduzida no evaporador rotativo até à secura. No fim, obteve-se um óleo esbranquiçado com um rendimento de, aproximadamente, 84 %.

No processo de purificação foi realizada uma cromatografia em coluna (CC) [eluente: éter de petróleo 40-60 °C:acetato de etilo 9:1] sendo que um sólido esbranquiçado foi obtido após a evaporação das frações da coluna e secagem numa estufa de vácuo a uma pressão de - 0,6 mbar e a uma temperatura de 50 °C. O produto da reação foi analisado por ^1H RMN e ^{13}C RMN, sendo que os dados espectrais obtidos evidenciaram uma mistura de produtos.

V.1.2.1.6) Oxidação com peróxido de hidrogénio (solução aquosa de 30 % (v/v))

I. A reação foi realizada nos mesmos moldes da reação em V.1.2.1.1) I. utilizando H_2O_2 em solução aquosa de 30 % (v/v) (5,0 mmol), sendo que o tempo reacional foi de 48h.

A reação foi controlada por CCF [eluente: éter de petróleo 40-60 °C:acetato de etilo 2:1]. Após 48 horas de reação denotou-se uma mancha com $R_f=0,6$ correspondente ao produto da reação, vestígios de produtos secundários e de matéria prima inalterada.

O isolamento foi realizado da mesma forma que na reação V.1.2.1.1) I. obtendo-se um óleo esbranquiçado. Após isto deixou-se a mistura na *hotte* durante 2 dias e procedeu-se à redissolução do óleo em éter dietílico o que fez com que a maioria do óleo esbranquiçado originasse um sólido branco. O produto da reação foi analisado por ^1H RMN e ^{13}C RMN. Os dados espectrais obtidos demonstraram-se similares aos descritos em V.1.2.1.1) I., o que permitiu verificar a obtenção do composto 2, com um rendimento de, aproximadamente, 23 %.

II. A reação foi realizada nos mesmos moldes da reação em V.1.2.1.6) I. utilizando $\text{Bi}(\text{OTf})_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (0,050 mmol), sendo que o tempo reacional foi de 48h.

A reação foi controlada por CCF [eluente: éter de petróleo 40-60 °C:acetato de etilo 2:1]. Após 48 horas de reação denotou-se uma mancha com $R_f=0,6$ correspondente ao produto da reação, vestígios de produtos secundários e de matéria prima inalterada.

O isolamento foi realizado da mesma forma que na reação V.1.2.1.5) I. obtendo-se um óleo esbranquiçado. Após isto deixou-se a mistura na *hotte* durante 2 dias e procedeu-se à redissolução do óleo em éter dietílico o que fez com que a maioria do óleo esbranquiçado originasse um sólido branco. O produto da reação foi analisado por ^1H RMN e ^{13}C RMN. Os dados espectrais obtidos demonstraram-se similares aos descritos em V.1.2.1.5) I., o que permitiu verificar a obtenção do composto 2, com um rendimento de, aproximadamente, 17 %.

V.1.2.1.7) Oxidação com hidroperóxido de cumeno e tricloreto de bismuto

A reação foi realizada nos mesmos moldes da reação em V.1.2.1.1) I. utilizando $\text{C}_6\text{H}_5\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OOH}$ (5,0 mmol), sendo que o tempo reacional foi de 99h.

A reação foi controlada por CCF [eluente: éter de petróleo 40-60 °C:acetato de etilo 2:1]. Após 99 horas de reação, esta ainda não se tinha sucedido pelo que se optou por interromper o processo.

V.1.2.1.8) Oxidação com hidroperóxido de *t*-butilo (solução 5,0-6,0 M em *n*-decano), tricloreto de bismuto e TEMPO

I. A reação foi realizada nos mesmos moldes da reação em V.1.2.1.1) I. utilizando, adicionalmente, o TEMPO (0,050 mmol), sendo que o tempo reacional foi de 48h.

A reação foi controlada por CCF [eluente: éter de petróleo 40-60 °C:acetato de etilo 2:1]. Após 48 horas de reação denotou-se uma mancha com $R_f=0,6$ correspondente ao produto da reação, vestígios de produtos secundários e de matéria prima inalterada.

O isolamento foi realizado da mesma forma que na reação V.1.2.1.1) I. obtendo-se um sólido branco amarelado com um rendimento de, aproximadamente, 95 %.

O processo de purificação também foi realizado de forma similar ao da reação V.1.2.1.1) I. obtendo-se um sólido branco amarelado. O produto da reação foi analisado por ^1H RMN e ^{13}C RMN. Os dados espectrais obtidos demonstraram-se similares aos descritos em V.1.2.1.1) I., o que permitiu verificar a obtenção do composto 2, com um rendimento de, aproximadamente, 21 %.

II. A reação foi realizada nos mesmos moldes da reação em V.1.2.1.8) I. exceto uma variação nas quantidades de TEMPO (0,025 mmol) usadas, sendo que o tempo reacional foi de 48h.

A reação foi controlada por CCF [eluente: éter de petróleo 40-60 °C:acetato de etilo 2:1]. Após 48 horas de reação denotou-se uma mancha com $R_f=0,6$ correspondente ao produto da reação, vestígios de produtos secundários e de matéria prima inalterada.

O isolamento foi realizado da mesma forma que na reação V.1.2.1.1) I. obtendo-se um óleo amarelo com um rendimento de, aproximadamente, 88 % cujo os dados espectrais de ^1H RMN e ^{13}C RMN evidenciaram uma mistura de produtos.

V.1.2.2) Acetato de pregnenolona 3

V.1.2.2.1) Oxidação com hidroperóxido de *t*-butilo (solução 5,0-6,0 M em *n*-decano) e tricloreto de bismuto

I. Num balão de fundo redondo, o composto 3 (0,25 mmol) foi dissolvido em CH_3CN (1,5 mL) com auxílio de aquecimento a 70 °C e agitação. Após o 3 estar dissolvido e a estabilização da temperatura a 70 °C, adicionou-se o *t*-BuOOH em solução 5,0-6,0 M em *n*-decano (2,5 mmol) e o BiCl_3 (0,025 mmol). A reação decorreu à temperatura de 70 °C durante 48h.

A reação foi controlada por CCF [eluyente: éter de petróleo 40-60 °C:acetato de etilo 2:1]. Após 48 horas de reação denotou-se uma mancha com $R_f=0,6$ correspondente ao produto da reação, vestígios de produtos secundários e de matéria prima inalterada.

Após a reação terminar a mistura foi deixada arrefecer até à TA e colocada sob agitação durante 3 horas com uma solução de sulfito de sódio de 10 % (50 mL). De seguida, a mistura foi sujeita a uma extração líquido-líquido com acetato de etilo (3 X 50 mL) e, posteriormente, a fase orgânica (FO) foi lavada com uma solução saturada de bicarbonato de sódio (25 mL) e água destilada (25 mL). A FO foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada a vácuo e evaporada a pressão reduzida no evaporador rotativo até à secura. No fim, obteve-se um óleo amarelo com um rendimento de, aproximadamente, 98 %.

No processo de purificação foi realizada uma cromatografia em coluna (CC) [eluyente: éter de petróleo 40-60 °C:acetato de etilo 5:1] sendo que um sólido branco foi obtido após a evaporação das frações da coluna e secagem numa estufa de vácuo a uma pressão de -0,6 mbar e a uma temperatura de 50 °C. O produto da reação foi analisado por ^1H RMN e ^{13}C RMN, sendo que os dados espetrais obtidos permitiram verificar a obtenção do acetato de 7-oxo-pregnenolona 4, com um rendimento de 48 %.

p.f. 134-136°C; ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 0.59 (3H, s, 18- CH_3), 1.15 (3H, s, 19- CH_3), 1.99 (3H, s, 21- CH_3), 2.07 (3H, s, 23- CH_3), 4.65 (1H, m, 3 α -H), 5.65 (1H, s, 6-H); ^{13}C RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 62.27 (C17), 72.01 (C3), 126.52 (C6), 164.19 (C5), 170.31 (C22), 201.18 (C7), 209.72 (C20)

II. A reação foi realizada nos mesmos moldes da reação em V.1.2.2.1) I. sendo que o tempo reacional foi de 16h.

A reação foi controlada por CCF [eluyente: éter de petróleo:acetato de etilo 2:1]. Após 1 horas de reação denotou-se uma mancha com $R_f=0,6$ correspondente ao produto da reação, vestígios de produtos secundários e de matéria prima inalterada.

O isolamento foi realizado da mesma forma que na reação V.1.2.2.1) I. obtendo-se um óleo amarelo com um rendimento de, aproximadamente, 84 %.

O processo de purificação também foi realizado de forma similar ao da reação V.1.2.2.1) I. obtendo-se um sólido branco amarelado. O produto da reação foi analisado por ^1H RMN e ^{13}C RMN. Os dados espetrais obtidos demonstraram-se similares aos descritos em V.1.2.2.1) I., o que permitiu verificar a obtenção do composto 4, com um rendimento de, aproximadamente, 35 %.

V.1.2.2.2) Oxidação com hidroperóxido de *t*-butilo (solução 5,0-6,0 M em *n*-decano) e oxiclureto de bismuto

A reação foi realizada nos mesmos moldes da reação em V.1.2.2.1) I. sendo que o tempo reacional foi de 24h.

A reação foi controlada por CCF [eluente: éter de petróleo 40-60 °C:acetato de etilo 2:1]. Após 48 horas de reação verificou-se que a velocidade da reação era muito reduzida pelo que se optou por para a reação.

V.1.2.2.3) Oxidação com hidroperóxido de *t*-butilo (solução 5,0-6,0 M em *n*-decano) e triflato de bismuto

A reação foi realizada nos mesmos moldes da reação em V.1.2.2.1) I. utilizando Bi(OTf)₃.xH₂O (0,025 mmol), sendo que o tempo reacional foi de 48h.

A reação foi controlada por CCF [eluente: éter de petróleo 40-60 °C:acetato de etilo 2:1]. Após 48 horas de reação denotou-se uma mancha com Rf=0,6 correspondente ao produto da reação, vestígios de produtos secundários e de matéria prima inalterada.

O isolamento foi realizado da mesma forma que na reação V.1.2.2.1) I. obtendo-se um óleo esbranquiçado. De seguida, procedeu-se à redissolução do óleo em éter dietílico o que fez com que a maioria do óleo esbranquiçado originasse um sólido branco. Este sólido foi analisado por ¹H RMN e ¹³C RMN. Os dados espectrais obtidos permitiram verificar a obtenção da 7-oxopregnenolona **5**, com um rendimento de, aproximadamente, 84 %.

p.f. 185-188°C; ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 0.59 (3H, s, 18-CH₃), 1.16 (3H, s, 19-CH₃), 1.99 (3H, s, 21-CH₃), 2.07 (3H, s, 23-CH₃), 4.65 (1H, m, 3α-H), 5.65 (1H, s, 6-H); ¹³C RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 62.30 (C17), 70.36 (C3), 127.61 (C6), 165.76 (C5), 201.63 (C7), 209.98 (C20)

V.1.2.2.4) Oxidação com hidroperóxido de *t*-butilo (solução aquosa de 70%) e tricloreto de bismuto

A reação foi realizada nos mesmos moldes da reação em V.1.2.2.1) I. utilizando *t*-BuOOH em solução aquosa de 70 % (2,5 mmol), sendo que o tempo reacional foi de 48h.

A reação foi controlada por CCF [eluente: éter de petróleo 40-60 °C:acetato de etilo 2:1]. Após 48 horas de reação denotou-se uma mancha com Rf=0,6 correspondente ao produto da reação, vestígios de produtos secundários e de matéria prima inalterada.

O isolamento foi realizado da mesma forma que na reação V.1.2.2.1) I. obtendo-se um óleo amarelo. Após isto deixou-se a mistura na *hotte* durante 2 dias e procedeu-se à redissolução do óleo em éter dietílico o que levou à formação de um sólido branco. O produto da reação foi analisado por ¹H RMN e ¹³C RMN. Os dados espectrais obtidos demonstraram-se similares aos descritos em V.1.2.1.1) I., o que permitiu verificar a obtenção do composto **4**, com um rendimento de, aproximadamente, 88 %.

V.1.2.2.5) Oxidação com peróxido de hidrogénio (solução aquosa de 30 % (v/v))

I. A reação foi realizada nos mesmos moldes da reação em V.1.2.2.1) I. utilizando H₂O₂ em solução de 30 % (v/v) em H₂O (2,5 mmol), sendo que o tempo reacional foi de 72h.

A reação foi controlada por CCF [eluente: éter de petróleo 40-60 °C:acetato de etilo 2:1]. Após 72 horas de reação denotou-se uma mancha com $R_f=0,6$ correspondente ao produto da reação, vestígios de produtos secundários e de matéria prima inalterada.

O isolamento foi realizado da mesma forma que na reação V.1.2.2.1) I. obtendo-se um óleo esbranquiçado. Após isto deixou-se a mistura na *hotte* durante 2 dias e procedeu-se à redissolução do óleo em éter dietílico o que fez com que a maioria do óleo esbranquiçado desse origem a um sólido branco. O produto da reação foi analisado por ^1H RMN e ^{13}C RMN. Os dados espectrais obtidos demonstraram-se similares aos descritos em V.1.2.2.1) I., o que permitiu verificar a obtenção do composto 2, com um rendimento de, aproximadamente, 68 %.

II. A reação foi realizada nos mesmos moldes da reação em V.1.2.1.5) I. utilizando $\text{Bi}(\text{OTf})_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (0,025 mmol), sendo que o tempo reacional foi de 48h.

A reação foi controlada por CCF [eluente: éter de petróleo:acetato de etilo 2:1]. Após 48 horas de reação denotou-se uma mancha com $R_f=0,6$ correspondente ao produto da reação, vestígios de produtos secundários e de matéria prima inalterada.

O isolamento foi realizado da mesma forma que na reação V.1.2.1.5) I. obtendo-se um óleo esbranquiçado. De seguida, procedeu-se à redissolução do óleo em éter dietílico o que fez com que a maioria do óleo esbranquiçado originasse um sólido branco. Este sólido foi analisado por ^1H RMN e ^{13}C RMN. Os dados espectrais obtidos demonstraram-se similares aos descritos em V.1.2.1.1) I., o que permitiu verificar a obtenção da 7-oxopregnenolona 5, com um rendimento de, aproximadamente, 84 %.

V.1.2.2.6) Oxidação com hidroperóxido de cumeno e tricloreto de bismuto

A reação foi realizada nos mesmos moldes da reação em V.1.2.2.1) I. utilizando $\text{C}_6\text{H}_5\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{OOH}$ (2,5 mmol), sendo que o tempo reacional foi de 78h.

A reação foi controlada por CCF [eluente: éter de petróleo 40-60 °C:acetato de etilo 2:1]. Após 78 horas de reação, esta ainda não se tinha sucedido pelo que se optou por interromper o processo.

V.1.2.2.7) Oxidação com hidroperóxido de *t*-butilo (solução 5,0-6,0 M em *n*-decano), tricloreto de bismuto e TEMPO

I. A reação foi realizada nos mesmos moldes da reação em V.1.2.2.5) I. utilizando, adicionalmente, o TEMPO (0,025 mmol), sendo que o tempo reacional foi de 48h.

A reação foi controlada por CCF [eluente: éter de petróleo 40-60 °C:acetato de etilo 2:1]. Após 48 horas de reação denotou-se uma mancha com $R_f=0,6$ correspondente ao produto da reação, vestígios de produtos secundários e de matéria prima inalterada.

O isolamento foi realizado da mesma forma que na reação **V.1.2.2.5) I**, obtendo-se um óleo amarelo com um rendimento de, aproximadamente, 97 %. O óleo foi analisado por ^1H RMN e ^{13}C RMN. Os dados espectrais obtidos evidenciaram uma mistura de produtos.

V.1.3) Reações de hidrólise

V.1.3.1) Acetato de 16-desidropregnenolona 1

Num balão de fundo redondo, o composto **1** (0,25 mmol) foi dissolvido em metanol (4,0 mL) com auxílio de agitação à TA. Após o substrato estar dissolvido adicionou-se uma solução aquosa de hidróxido de sódio a 10 % (1,35 mL). A reação foi realizada à TA e controlada por CCF com éter de petróleo e acetato de etilo 2:1 (v/v) como eluente. A reação foi parada após se verificar o desaparecimento da mancha do substrato na placa de CCF, ao fim de 2h. De seguida, a mistura reacional foi concentrada no evaporador rotativo e, posteriormente, colocou-se o sólido resultante em agitação com diclorometano (75 mL) e água (10 mL) durante 2 horas. Após este passo foi realizada uma extração líquido-líquido onde a fase aquosa da mistura foi lavada com diclorometano (2 X 50 mL). Posteriormente, a fase orgânica resultante foi lavada com água destilada (10 mL). De seguida, colocou-se a fase orgânica em contacto com sulfato de sódio anidro para eliminar resíduos da fase aquosa. Depois, realizou-se uma filtração a vácuo e a fase orgânica foi evaporada a pressão reduzida no evaporador rotativo até à secura. No fim, obteve-se um sólido branco com um rendimento de 95 %. O último passo envolveu uma cromatografia em coluna (CC) para purificar o produto (remover vestígios de substrato inalterado não detetáveis na CFF e de outros produtos reacionais) com um eluente de éter de petróleo e acetato de etilo 5:1 (v/v). Um sólido branco foi obtido após a evaporação das frações da coluna no evaporador rotativo. Para eliminar os resíduos de solvente, o balão com o produto foi colocado na estufa de vácuo a uma pressão de -0,6 mbar e a uma temperatura de 50 °C. O rendimento após o processo de purificação foi de 27 %.

p.f. 201-202 °C; ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 0.85 (3H, s, 18- CH_3), 0.98 (3H, s, 19- CH_3), 2.19 (3H, s, 21- CH_3), 3.46 (1H, m, 3 α -H), 5.29 (1H, s, 6-H), 6.64 (16-H); ^{13}C RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 71.73 (C3), 121.06 (C6), 141.38 (C5), 144.49 (C16), 155.38 (C17), 196.89 (C20)

V.1.3.2) Acetato de 16 α ,17 α -epoxi-7-oxo-pregnenolona 2

A reação foi realizada nos mesmos moldes da reação em **V.1.3.1)** e controlada por CCF [eluente: éter de petróleo 40-60 °C:acetato de etilo 2:1]. O isolamento também foi realizado da mesma forma (rendimento de 69 %) bem como o processo de purificação (rendimento de 50 %).

p.f. 205-209 °C; ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 0.99 (3H, s, 18- CH_3), 1.14 (3H, s, 19- CH_3), 1.96 (3H, s, 21- CH_3), 3.64 (1H, m, 3 α -H), 5.63 (1H, s, 6-H); ^{13}C RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 70.31 (C17), 70.02 (C3), 60.97 (C16), 125.77 (C6), 166.34 (C5), 201.19 (C7), 205.24 (C20)

V.1.3.3) Acetato de pregnenolona 3

A reação foi realizada nos mesmos moldes da reação em V.1.3.1) e controlada por CCF [eluente: éter de petróleo 40-60 °C:acetato de etilo 2:1]. O isolamento também foi realizado da mesma forma (rendimento de 99 %) bem como o processo de purificação (rendimento de 89 %).

p.f. 187-188 °C; ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 0.57 (3H, s, 18-CH₃), 0.94 (3H, s, 19-CH₃), 2.06 (3H, s, 21-CH₃), 3.46 (1H, m, 3α-H), 5.29 (1H, s, 6-H); ¹³C RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 63.71 (C17), 71.73 (C3), 121.39 (C6), 140.78 (C5), 209.64 (C20)

V.1.3.4) Acetato de 7-oxopregnenolona 4

A reação foi realizada nos mesmos moldes da reação em V.1.3.1) e controlada por CCF [eluente: éter de petróleo 40-60 °C:acetato de etilo 2:1]. O isolamento também foi realizado da mesma forma (rendimento de 99 %) bem como o processo de purificação (rendimento de 65 %).

p.f. 185-190 °C; ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 0.59 (3H, s, 18-CH₃), 1.14 (3H, s, 19-CH₃), 2.07 (3H, s, 21-CH₃), 3.61 (1H, m, 3α-H), 5.64 (1H, s, 6-H); ¹³C RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 62.37 (C17), 70.22 (C3), 125.82 (C6), 161.42 (C5), 201.79 (C7), 209.87 (C20)

V.1.4) Reações de adição de Michael

V.1.4.1) Progesterona

Num balão de fundo redondo o composto 1 (0,25 mmol) foi dissolvido em metanol (3 mL) com auxílio de aquecimento a 65 °C e agitação. Após o substrato estar dissolvido e a temperatura ter atingido os 65 °C adicionou-se o indole (0,30 mmol) e o triflato de bismuto (0,0125 mmol) havendo uma mudança de cor da mistura reacional para roxo. A reação foi controlada por CCF e o eluente usado foi éter de petróleo 40-60 °C:acetato de etilo 2:1 (v/v). Após 1 hora de reação observou-se a formação de um precipitado esbranquiçado. Após a sua formação a reação foi parada e a mistura reacional resultante foi filtrada a vácuo para isolar o sólido branco obtido. Posteriormente, este sólido branco foi lavado com metanol frio (15 mL). Por fim, o produto foi deixado a secar à TA. O rendimento obtido foi de 61 %.

¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 0.65 (3H, s, 18-CH₃), 1.01 (3H, s, 19-CH₃), 1.97 (3H, s, 21-CH₃), 6.55 (1H, s, B-H), 7.11 (1H, t, F-H), 7.16 (1H, t, E-H), 7.28 (1H, d, D-H), 7.88 (1H, d, G-H), 8.04 (1H, s, N-H)

V.1.4.2) Acetato de 16-desidropregnenolona 1

A reação foi realizada nos mesmos moldes da reação V.1.4.1) e controlado por CCF e o eluente usado foi éter de petróleo 40-60 °C:acetato de etilo 2:1 (v/v). Neste caso, a reação não ocorreu pelo que se optou por pará-la ao fim de 1 hora.

V.1.4.3) Acetato de 16 α ,17 α -epoxi-7-oxo-pregnenolona 2

A reação foi realizada nos mesmos moldes da reação V.1.4.1) e controlado por CCF e o eluente usado foi éter de petróleo 40-60 °C:acetato de etilo 2:1 (v/v). Neste caso, a reação também não ocorreu pelo que se optou por pará-la ao fim de 1 hora.

V.1.4.4) Acetato de 7-oxo-pregnenolona 4

A reação foi realizada nos mesmos moldes da reação V.1.4.1) e controlado por CCF e o eluente usado foi éter de petróleo 40-60 °C:acetato de etilo 2:1 (v/v). Após 1 hora de reação observou-se a formação de um precipitado esbranquiçado. Após a sua formação a reação foi parada e a mistura reacional resultante foi filtrada a vácuo para isolar o sólido branco obtido. Posteriormente, este sólido branco foi lavado com metanol frio (15 mL). Por fim, o produto foi deixado a secar à TA. O rendimento de obtenção do produto foi calculado em relação à massa de reagente limitante (acetato de 7-oxopregnenolona 4) - 49 %.

Os dados dos espectros de ¹H RMN, ¹³C RMN, HSQC, HMBC, COSY, DEPT135 e IV estão presentes no Anexo 1.

p.f. 266-267 °C

V.1.5) Acetilação da 16 α ,17 α -epoxipregnenolona 10

Num balão de fundo redondo o 16 α ,17 α -epoxipregnenolona 10 (0,25 mmol) foi dissolvido em THF (1,4 mL) à TA e sob agitação. Após o substrato estar dissolvido adicionou-se anidrido acético (0,25 mmol) e DMAP (0,060 mmol). A reação foi controlada por CCF e o eluente usado foi éter de petróleo e acetato de etilo 1:2 (v/v). A reação foi seguida com recurso a CCF utilizando como eluente acetato de etilo e éter de petróleo 40-60°C numa mistura 2:1. A reação foi parada após se verificar o desaparecimento da mancha do substrato na placa de CCF, após 6 horas. De seguida, a mistura reacional foi concentrada no evaporador rotativo e, posteriormente, foi realizada uma extração líquido-líquido com acetato de etilo (3 X 50 mL) e a fase orgânica foi lavada com uma solução de ácido clorídrico a 10 % (25 mL), uma solução saturada de bicarbonato de sódio (25 mL) e água destilada (50 mL) por esta ordem. De seguida, colocou-se a fase orgânica em contacto com sulfato de sódio anidro para eliminar resíduos da fase aquosa. Depois, realizou-se uma filtração a vácuo e a fase orgânica foi evaporada a pressão reduzida no evaporador rotativo. O acetato de 16 α ,17 α -epoxipregnenolona 11 (figura 9) foi obtido com um rendimento de 89 %.

¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 0.89 (3H, s, 18-CH₃), 1.10 (3H, s, 19-CH₃), 1.97 (3H, s, 21-CH₃), 2.03 (3H, s, 23-CH₃), 3.61 (1H, t, 16-H), 4.52 (1H, m, 3 α -H), 5.29 (1H, s, 6-H)

V.2) Avaliação Biológica

V.2.1) Culturas celulares

As linhas celulares utilizadas foram as NHDF (do inglês *Normal Human Dermal Fibroblasts*) e PC-3 (adenocarcinoma humano da próstata). As culturas foram realizadas em frascos de cultura de 75 cm² a 37 °C numa incubadora com atmosfera humidificada contendo 5 % de dióxido de carbono.

A linha celular das NHDF é constituída por células normais/saudáveis de fibroblastos humanos provenientes da derme de um indivíduo adulto. Estas células são aderentes e expressam os RE. A linha celular das PC-3 é constituída por células de metástases do osso de adenocarcinoma humano da próstata. Estas células são aderentes e não expressam os RA.

As NHDF foram cultivadas em meio RPMI 1640 da *Sigma Aldrich* suplementado com 10 % FBS (do inglês *Fetal Bovine Serum*), 2mM de L-glutamina, 10 mM HEPES, 1mM de piruvato de sódio e 1 % de antibiótico antimicótico Ab (10,000 U/mL de penicilina G, 100 mg/mL de streptomina e 25 µg/mL de anfotericina B) da *Sigma Aldrich*. As PC-3 foram cultivadas em meio RPMI 1640 da *Sigma Aldrich* com 10 % de FBS e 1 % de antibiótico Sp (10,000 U/mL de penicilina G e 100 mg/mL de streptomina).

Os ensaios nas NHDF foram realizados nas passagens 20 à 23 enquanto que nas PC-3 as passagens usadas foram da 28 à 32.

O meio das culturas celulares de ambos os tipos de células foi renovado sempre a cada 2-3 dias até as celulares atingirem uma confluência de 90-95 %. Quando esta confluência foi atingida as células foram desaderidas por tripsinização com uma solução de tripsina de 0,5 g/L com 0,02 g/L de EDTA (do inglês *EthyleneDiamineTetraacetic Acid*). Antes de se realizar cada ensaio, as células foram contadas numa câmara de *Neubauer* através do ensaio de exclusão com *Trypan-Blue* e adequadamente diluídas no meio de cultura apropriado.

V.2.2) Soluções dos compostos - preparação e armazenamento

As soluções mãe dos compostos com uma concentração de 10 mM e perfaziam um volume total de 1,8 mL, sendo que o solvente usado foi o dimetilsulfóxido (DMSO) da *Fisher Scientific*. Estas soluções foram armazenadas a 4°C.

As soluções dos compostos usadas nos estudos efetuados partiram de diluições da solução mãe e foram preparadas com o meio de cultura adequado para cada linha celular. Nos estudos o nível máximo de concentração de DMSO envolvido foi de 1 %.

V.2.3) Ensaio de proliferação celular - procedimentos

V.2.3.1) Tratamento das células com os compostos

As células foram tripsinizadas após chegarem a uma confluência de 90-95 % no frasco de cultura e contadas através do ensaio de exclusão com *Trypan-Blue*. Posteriormente, estas foram diluídas adequadamente no meio de cultura apropriado sendo a densidade celular após a diluição de 2×10^4 células/mL. De seguida, as células foram semeadas numa placa de 96-*multiwells* da VWR onde a cada poço foi adicionado 100 μ L da suspensão de células com o meio de cultura. As células foram seguidamente incubadas durante 48h para aderirem ao fundo do poço. Após este passo, o meio foi substituído pelas soluções dos compostos a estudar. Relativamente à concentração das soluções, as que foram usadas nos estudos iniciais de *screening* apresentavam uma concentração de 30 μ M, sendo que para um estudo de dose-resposta as concentrações usadas foram as seguintes: 0,01 μ M; 0,1 μ M; 1 μ M; 10 μ M; 50 μ M e 100 μ M. As células nos poços foram incubadas com as soluções dos compostos durante 72h. As células nos poços que não foram tratadas com compostos foram usadas como controlo negativo. No que toca aos ensaios foram realizados dois ensaios independentes (duplicados) e em cada ensaio independente foram realizados quadruplicados.

V.2.3.2) Ensaio de MTT

O ensaio de MTT foi o método usado para avaliar os efeitos antiproliferativos dos compostos. Após o período de incubação das células com as soluções dos compostos, o meio foi aspirado. Posteriormente, as células foram lavadas com 100 μ L de uma solução de PBS (do inglês *Phosphate Buffer Saline*) que continha NaCl (137 mM), KCl (2,7 mM), Na_2HPO_4 (10 mM) e KH_2PO_4 (1,8 mM) dissolvidos em água destilada. De seguida, a solução de PBS também foi aspirada e, posteriormente, a solução de MTT a 5 mg/mL foi adicionada aos poços (100 μ L em cada). Esta solução foi preparada com meio sem soro e antibiótico e PBS. Após a adição da solução de PBS, as células foram incubadas durante 4h a 37 °C. Após a incubação o meio com MTT foi removido dos poços e os cristais de formazano foram dissolvidos em DMSO. As leituras das absorvâncias foram realizadas a 570 nm usando um espectrofotómetro de microplacas da *BIO-RAD xMark™*. A viabilidade celular foi expressa em valores percentuais relativos às absorvâncias obtidas nos controlos negativos.

V.3) Estudos de *Docking* Molecular

V.3.1) Preparação da proteína

As estruturas 3D dos recetores foram obtidas através do PDB (do inglês *Protein Data Bank*) estando na tabela 12 as proteínas usadas e os códigos correspondentes na base de dados PDB. Seguidamente, através do *software* Chimera v. 1.10.1, as coordenadas dos ligandos co-cristalizados e as moléculas de água foram removidas em todos os recetores à exceção do RE onde foram eliminadas todas as moléculas de água exceto a N° 3. Após isto recorrendo ao *software* AutoDockTools v. 1.5.6 do *The Scripps Research Institute* foram adicionados os hidrogénios apolares e as cargas parciais de *Gasteiger*. No fim, o mapa tridimensional da proteína foi convertido do formato PDB para PDBQT, formato usado no *Docking* Molecular.

Tabela 12: Recetores usados no docking molecular, os respetivos códigos PDB e o seu ligando principal.

Recetor	Código PDB	Ligando Principal
Estrogénios	1ERE	17 β -estradiol
Progesterona	1A28	Progesterona
Androgénios	2AMA	Dihidrotestosterona

V.3.2) Preparação dos ligandos

O ligando co-cristalizado com a proteína foi isolado com auxílio do *software* Chimera v. 1.10.1 e, posteriormente, através do *software* AutoDockTools v. 1.5.6 definiu-se as torções da molécula e esta foi convertida do formato PDB para PDBQT.

Os ligandos a testar (compostos 1 a 5, 7 a 11) foram estruturados bidimensionalmente no *software* ChemDraw v. 12.0 da *Cambridge ChemBioOffice*. Posteriormente, a sua estrutura foi extrapolada para o *software* Chem3D v. 12.0, também da *Cambridge ChemBioOffice* para se obter a estrutura 3D e se proceder à minimização de energia e otimização da geometria de cada composto. Após este passo os ligandos foram gravados no formato PDB. De seguida, procedeu-se à definição das torções de cada um e à conversão para formato PDBQT no *software* AutoDockTools v. 1.5.6.

V.3.3) Definição e mapeamento da Grid

O AutoGrid4 foi o *software* usado para efetuar o cálculo e mapeamento da Grid para cada recetor. As coordenadas da Grid em cada recetor, bem como as suas dimensões e especificações estão descritas na Tabela 13, abaixo apresentada. Os cálculos foram efetuados para cada átomo em cada ligando com mapeamento eletrostático e de dessolvatação usando uma constante dielétrica de -0,1465.

V.3.4) Docking Molecular - simulação computacional

O AutoDock4 foi o *software* usado para efetuar o *Docking* Molecular. Relativamente aos parâmetros de *Docking* foram utilizados os *default* exceto algumas variações descritas na Tabela 13 para cada recetor. Os resultados foram analisados através do *software* Chimera v.1.10.1, mais concretamente as interações entre os ligandos e a proteína no sítio ativo. A validação do método foi realizada com o ligando co-cristalizado com a proteína no PDB. Neste processo foi possível reproduzir as interações descritas. Em todas as simulações o valor do RMSD foi inferior a 2.0 Å, o que indica que o processo de *docking* molecular foi bem sucedido.

Tabela 13: Coordenadas e especificações da Grid para cada recetor.

Parâmetros da Grid		Recetor		
		Estrogénios	Progesterona	Androgénios
Dimensão da Grid	X	50	35	70
	Y	50	45	70
	Z	50	50	65
Centro da Grid	X	9.096	22.853	27.691
	Y	46.224	10.139	2.402
	Z	131.216	60.282	4.911
<i>Spacing</i>		0.375		
Especificações	Dimensão	Incorpora Arg394, Glu353 e His524	---	---
	Centro	No ligando co-cristalizado		

Tabela 14: Parâmetros usados no *Docking* Molecular - variações para cada recetor.

Parâmetros da Grid	Recetor		
	Estrogénios	Progesterona	Androgénios
Algoritmo	<i>Lamarckian</i>		
<i>Runs</i> do Algoritmo Genético	100	10	10
Número de avaliações	2500000	2500000	2500000
Tamanho da população	150	150	150
<i>Local Search</i>	Não	Sim	Sim

Bibliografia

1. Lemke, T. L., Williams, D. A., Roche, V. F., Zito, S. W., (2013). *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. 7^a Ed., Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins: a. Zavod, R. M., Knittel, J. J. Capítulo 2 - *Drug Design and Relationship of Functional Groups to Pharmacologic Activity*, p. 47; b. Miller, D. D., Brueggemeier, R. W., Dalton, J. T. Capítulo 28 - *Adrenocorticoids*, p. 908-911; c. Miller, D. D., Brueggemeier, R. W., Dalton, J. T. Capítulo 40 - *Men's Health*, p. 1348-1353;
2. Solomons, T. W. G., Fryhle, C. G., (2011). *Organic Chemistry*. 10^a Ed., John Wiley & Sons, Inc.: a. Capítulo 23 - *Lipids*, p. 1065-1074; b. Capítulo 19 - *Condensation and Conjugate Addition Reactions of Carbonyl Compounds*, p. 870;
3. Salvador, J. A. R., Pinto, R. M. A., Silvestre, S. M., (2015). *Pharmaceutical Green Chemistry Applied to the Chemical Synthesis of Steroids Compounds*. *Current Green Chemistry*, 2 (2), p. 97-134. Doi: 10.2174/2213346101666140915212302;
4. Moss, G. P., (1989). *Nomenclature of Steroids (Recommendations 1989)*. *Pure and Applied Chemistry*, 61 (10), p. 1783-1822. Doi: 10.1351/pac198961101783;
5. Blickenstaff, R. T., Ghosh, A. C., Wolf, G. C., (1974). *Total Synthesis of Steroids*. Academic Press. Capítulo 1 - *Designing Total Syntheses*, p. 1-34;
6. Zeelen, F. J., (1994). *Steroid Total Synthesis*. *Natural Product Reports*, 11, p. 607-612. Doi: 10.1039/NP9941100607;
7. Ibrahim-Ouali, M., (2015). *Total synthesis of steroids and heterosteroids from BISTRO*. *Steroids*, 98, p. 9-28. Doi: 10.1016/j.steroids.2015.02.014;
8. Lednicer, D., (2009). *Strategies for Organic Drug Synthesis and Design*. 2^a Ed., John Wiley & Sons, Inc., p. 84-145;
9. Lednicer, D., Mitscher, L. A., Georg, G. I., (1977). *The Organic Chemistry of Drug Synthesis*. Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., p. 155-211;
10. Jasem, Y. A., Khan, M., Taha, A., Thiemann, T., (2014). *Preparation of steroidal hormones with an emphasis on transformations of phtosterols and cholesterol - a review*. *Mediterranean Journal of Chemistry*, 3(2), p.796-830. Doi: 10.13171/mjc.3.2.2014.18.04.15
11. Micovic, I. V., Ivanovic, M. D., Piatak, D. M., (1990). *Simplified Preparation of 16-Dehydropregnenolone Acetate*. *Synthesis-Stuttgart*, 1990 (7), p. 591-592. Doi: 10.1055/s-1990-26951;

12. Chowdhury, P., Borah, J. M., Bordoloi, M., Goswami, P. K., Goswami, A., Barua, N. C., Rao, P. G., (2011). *A Simple Efficient Process for the Synthesis of 16-Dehydropregnenolone Acetate (16-DPA) - A Key Steroid Drug Intermediate from Diosgenin*. *Journal of Chemical Engineering & Process Technology*, 2 (5), p. 1-7. Doi: 10.4172/2157-7048.1000117;
13. Goswami, A., Kotoky, R., Rastogi, R. C., Ghosh, A. C., (2003). *A one-pot efficient process for 16-dehydropregnenolone acetate*. *Organic Process Research & Development*, 7 (3), p. 306-308. Doi: 10.1021/op0200625;
14. Zhang, Y., Liu, Y., Cheng, X., Wang, X., Zhang, B., (2005). *An environmentally friendly process for the preparation of 16-dehydropregnenolone acetate*. *Chinese Journal of Chemistry*, 23 (6), p. 753-756. Doi: 10.1002/cjoc.200590753;
15. Cui, J., Fan, L., Huang, Y., Xin, Y., Zhou, A., (2009). *Synthesis and evaluation of some steroidal oximes as cytotoxic agents: Structure/activity studies (II)*. *Steroids*, 74 (12), p. 989-995. Doi: 10.1016/j.steroids.2009.07.009;
16. Huang, Y., Cui, J., Chen, S., Gan, C., Zhou, A., (2011). *Synthesis and antiproliferative activity of some steroidal lactams*. *Steroids*, 76 (12), p. 1346-1350. Doi: 10.1016/j.steroids.2011.06.013;
17. Tabatabaeian, K., Mamaghani, M., Mahmoodi, N., Khorshidi, A., (2009). *Diastereoselective ruthenium-catalyzed Michael addition of indoles to hormone steroids: and efficient route to new indole derivatives*. *Synthetic Communications*, 40 (11), p. 1677-1684. Doi: 10.1800/00397910903161678;
18. Silvestre, S. M., Silva, M. M. C., Salvador, J. A. R., (2016). *Recent Highlights in Green Oxidative Chemical Processes Applied to Steroid Chemistry*. *Green Nanotechnology - Overview and Further Prospects*, Dr. Marcelo Larramendy (Ed.), InTech, p. 35-56. Doi: 10.5772/62381;
19. Pietras, R. J., Weinberg, O. K., (2005). *Antigiogenic Steroids in Human Cancer Therapy*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2 (1), p.49-57. Doi: 10.1093/ecam/neh066;
20. Kim, S., Ma, E., (2009). *Synthesis of Pregnane Derivatives, Their Cytotoxicity on LNCaP and PC-3 Cells, and Screening on 5 α -Redutase Inhibitory Activity*. *Molecules*, 14 (11), p. 4655-4668. Doi: 10.3390/molecules14114655;
21. Xu, H., Wei, Y., Zhang, Y., Xu, Y., Li, F., Liu, J., Zhang, W., Han, X., Tan, R., Shen, P., (2012). *Oestrogen attenuates tumour progression in hepatocellular carcinoma*. *The Journal of Pathology*, 228 (2), p. 216-229. Doi: 10.1002/path.4009;

22. Zhao, H., Shao, C., Li, Z., Han, L., Cao, F., Wang, C., (2013). *Bioactive Pregnane Steroids from a South China Sea Gorgonian Carijoa sp.* *Molecules*, 18 (3), p. 3458-3466. Doi: 10.3390/molecules18033458;
23. Shan, L., Liu, H., Huang, K., Dai, G., Cao, C., Dong, R., (2009). *Synthesis of 3 β , 7 α , 11 α -trihydroxy-pregn-21-benzylidene-5-en-20-one derivatives and their cytotoxic activities.* *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19 (23), p. 6637-6639. Doi: 10.1016/j.bmcl.2009.10.019;
24. Carvalho, J. F. S., Silva, M. M. C., Moreira, J. N., Simões, S., Melo, M. L. S., (2011). *Selective Cytotoxicity of Oxysterols through Structural Modulation on Rings A and B. Synthesis, in Vitro Evaluation, and SAR.* *Journal of Medicinal Chemistry*, 54 (18), p. 6375-6393. Doi: 10.1021/jm200803d;
25. Wang, P., Tang, H., Liu, B., Li, T., Sun, P., Zhu, W., Luo, Y., Zhang, W., (2013). *Tumour cell growth inhibitory activity and structure-activity relationship of polyoxygenated steroids from the gorgonian Menella kanisa.* *Steroids*, 78 (9), p. 951-958. Doi: 10.1016/j.steroids.2013.05.019;
26. Yu, S., Ye, X., Chen, L., Lian, X., Zhang, Z., (2014). *Polyoxygenated 24,28-epoxyergosterols inhibiting the proliferation of glioma cells from sea anemone anthopleura midori.* *Steroids*, 88, p. 19-25. Doi: 10.1016/j.steroids.2014.06.013;
27. Wang, F., Fang, Y., Zhang, M., Lin, A., Zhu, T., Gu, Q., Zhu, W., (2008). *Six new ergosterols from the marine-derived fungus Rhizopus sp.* *Steroids*, 73 (1), p. 19-26. Doi: 10.1016/j.steroids.2007.08.008;
28. Bai, L., Wang, L., Zhao, M., Toki, A., Hasegawa, T., Ogura, H., Kataoka, T., Hirose, K., Sakai, J., Bai, J., Ando, M., (2007). *Bioactive Pregnanes from Nerium oleander.* *Journal of Natural Products*, 70 (1), p. 14-18. Doi: 10.1021/np068030o;
29. Salvador, J. A. R., Silvestre, S. M., Moreira, V. M., (2006). *Catalytic Oxidative Processes in Steroid Chemistry: Allylic Oxidation, β -Selective Epoxidation, Alcohol Oxidation and Remote Functionalization Reactions.* *Current Organic Chemistry*, 10 (17), p. 2227-2257. Doi: 10.2174/138527206778742641;
30. Koutsourea, A. I., Foustieris, M. A., Arsenou, E. S., Papageorgiou, A., Pairas, G. N., Nikolaropoulos, S. S., (2008). *Synthesis, In vivo Antileukemic Evaluation and Comparative Study of Novel 5 α -7-Keto Steroidal Esters of chlorambucil and its Active Metabolite.* *In vivo*, 22 (3), p. 345-352;
31. Parish, E. J., Kizito, S. A., Qiu, Z., (2004). *Review of Chemical Syntheses of 7-keto- Δ^5 -sterols.* *Lipids*, 39 (8), p. 801-804. Doi: 10.1007/s11745-004-1299-y;

32. Wendell, S. G., Edward, J. P., (2016). *A Short Review of Methods for the Allylic Oxidation of Δ^5 Steroidal Compounds to Enones*. *Journal of Steroids & Hormonal Science*, 7 (2), p. 1-5. Doi: 10.4172/2157-7536.100017117;
33. Trost, B. M., Fleming, I., (1991). *Comprehensive Organic Synthesis: Selectivity, Strategy & Efficiency in Modern Organic Chemistry*. 2^a Ed., Pergamon Press. Page, P. C. B., McCarthy, T. J., (1991). Capítulo 2.1 - *Oxidation Adjacent to C=C Bonds*, p. 83-117;
34. Nakamura, A., Nakada, M., (2013). *Allylic Oxidations in Natural Product Synthesis*. *Synthesis*, 45 (11), p., 1421-1451. Doi: 10.1055/s-0033-1338426;
35. Silvestre, S. M., Salvador, J. A. R., (2007). *Allylic and benzylic Oxidation reactions with sodium chlorite*. *Tetrahedron*, 63 (11), p. 2439-2445. Doi: 10.1016/j.tet.2007.01.012;
36. Choi, H., Doyle, M. P., (2007). *Optimal TBHP allylic oxidation of Delta5-steroids catalyzed by dirhodium caprolactamate*. *Organic Letters*, 9 (26), p. 5349-5352. Doi: 10.1021/ol7025284;
37. Salvador, J. A. R., Silvestre, S. M. (2005) *Bismuth-catalyzed allylic oxidation using t-butyl hydroperoxide*. *Tetrahedron Letters*, 46(15), p. 2581-2584. Doi: 10.1016/j.tetlet.2005.02.080;
38. Yousuf, S. K., Majeed, R., Ahmad, M., Sangwan, P., Purnima, B., Saxsena, A. K., Suri, K. A., Mukherjee, D., Taneja, S. C., (2011). *Ring A structural modified derivatives of withaferin A and the evaluation of their cytotoxic potential*. *Steroids*, 76 (10-11), p. 1213-1222. Doi: 10.1016/j.steroids.2011.05.012;
39. Szánti-Pintér, E., Maksó, L., Gömöry, Á., Wouters, J., Herman, B. E., Szécsi, M., Mikle, G., Kollár, L., Skoda-Földes, R., (2017). *Synthesis of 16a-amino-pregnenolone derivatives via ionic liquid-catalyzed aza-Michael addition and their evaluation as C_{17,20}-lyase inhibitors*. *Steroids*, 123, p. 61-66. Doi: 10.1016/j.steroids.2017.05.006;
40. Sethi, A., Bhatia, G., Khanna, A. K., Khan, M. M., Bishnoi, A., Pandey, A. K., Maurya, A., (2009). *Expedient synthesis of some novel pregnane derivatives and their evaluation as anti-oxidant and anti-dyslipidemic agents*. *Medicinal Chemistry Research*, 20 (1), p. 36-46. Doi: 10.1007/s00044-009-9280-y;
41. Kadar, Z., Molnar, J., Schneider, G., Zupko, I., Frank, E., (2012). *A facile 'click' approach to novel 15B-triazolyl-5a-androstane derivatives, and an evaluation of their antiproliferative activities in vitro*. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 20 (4), p. 1396-402. Doi: 10.1016/j.bmc.2012.01.008;

42. Leonessa, F., Kim, J., Ghiorghis, A., Kulawiec, R. J., Hammer, C., Talebian, A., Clarke, R., (2002). *C-7 Analogues of Progesterone as Potent Inhibitors of the P-Glycoprotein Efflux Pump*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 45 (2), p. 390-398. Doi: 10.1021/jm010126m;
43. Kumar, M., Rawat, P., Khan, M. F., Rawat, A. K., Srivastava, A. K., Maurya, R., (2011). *Aza-annulation on the 16-dehydropregnenolone, via tandem intermolecular aldol process and intramolecular Michael addition*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 21 (8), p. 2232-2237. Doi: 10.1016/j.bmcl.2011.02.112;
44. Xu, R., Ding, J. C., Chen, X. A., Liu, M. C., Wu, H. Y., (2009). *Gallium trichloride catalyzed conjugate addition of indole and pyrrole to α,β -unsaturated ketones in aqueous media*. *Chinese Chemical Letters*, 20 (6), p. 676-679. Doi: 10.1016/j.ccl.2009.01.028;
45. Ali, N. A. S., Dar, B. A., Pradhan, V., Farooqui, M., (2013). *Chemistry and biology of indoles and indazoles: a mini-review*. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 12 (13), p. 1782-1800. Doi: 10.2174/1389557511313120009;
46. Tokoroyama, T., (2010). *Discovery of the Michael Reaction*. *European Journal of Organic Chemistry*, 2010 (10), p. 2009-2016. Doi: 10.1002/ejoc.200901130;
47. Comelles, J., Moreno-Mañas, M., Vallribera, A., (2005). *Michael additions catalyzed by transition metals and lanthanides species. A review*. *Arkivoc*, 2005 (9), p. 207-238. Doi: 10.3998/ark.5550190.0006.921;
48. Reddy, A. V., Ravinder, K., Goud, T. V., Krishnaiah, P., Raju, T. V., Venkateswarlu, Y., (2003). *Bismuth triflate catalyzed conjugate addition of indoles to α,β -enones*. *Tetrahedron Letters*, 44 (33), p. 6257-6260. Doi: 10.1016/S0040-4039(03)01555-7;
49. Srivastava, N., Banik, B. K., (2003). *Bismuth nitrate-catalyzed versatile Michael reactions*. *The Journal of Organic Chemistry*, 68 (6), p. 2109-2114. Doi: 10.1021/jo026550s;
50. Rulev, A. Y., (2011). *Aza-Michael reaction: achievements and prospects*. *Russian Chemical Reviews*, 80 (3), p. 197-218. Doi: 10.1070/RC2011v080n03ABEH004162;
51. Wang, Y., Zhang, Y., Zhang, H., Liu, L., Xu, H., (2005). *$RuCl_3$ in Poly(ethylene glycol): A Highly Efficient and Recyclable Catalyst for the Conjugate Addition of Nitrogen and Sulfur Nucleophiles*. *Synthesis*, 2005 (13), p. 2129-2136. Doi: 10.1055/s-2005-870010;

52. Kusurkar, R. S., Nayak, S. K., Chavan, N. L., (2006). *Conjugate addition of pyrroles to α,β -unsaturated ketones using copper bromide as a catalyst*. Tetrahedron Letters, 47 (41), p. 7323-7326. Doi: 10.1016/j.tetlet.2006.08.030;
53. Kawatsura, M., Aburatani, S., Uenishi, J., (2007). *Catalytic conjugate addition of heterocyclic compounds to α,β -unsaturated carbonyl compounds by hafnium salts and scandium salts*. Tetrahedron, 63 (19), p. 4172-4177, Doi: 10.1016/j.tet.2007.02.091;
54. Moghaddam, F., Bardajee, G., Taimoory, S., (2006). *KF/Al₂O₃ Mediated Aza-Michael Addition of Indoles to Electron-Deficient Olefins*. Letters in Organic Chemistry, 3 (2), p. 157-160. Doi: 10.2174/157017806775224224;
55. Clark, J., Macquarrie, D., (2009). *Handbook of Green Chemistry & Technology*. 1^a Ed., Blackwell Science Ltd., p. 1-9;
56. Silvestre, S. M., (2007). *Novos processos de oxidação ambientalmente aceitáveis usando esteroides como substratos*. Tese de doutoramento em Farmácia (Química Farmacêutica) apresentada à Faculdade de Farmácia de Coimbra. Capítulo III - *Oxidação alílica utilizando hidroperóxido de t-butilo, catalisada por compostos de bismuto(III)*, p. 117-157;
57. Hagen, J., (2006). *Industrial Catalysis: A Practical Approach*. 2^a Ed., WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, p. 1-9;
58. Gusevskaya, E. V., (2003). *Organometallic catalysis: some contributions to organic synthesis*. Química Nova, 26 (2), p. 242-248. Doi: 10.1590/S0100-40422003000200017;
59. Mantovani, A., (2009). *Cancer: Inflaming metastasis*. Nature, 457, p. 36-37. Doi: 10.1038/457036b;
60. Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M., Jemal, A., (2016). *Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends - An Update*. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 25 (1), p. 16-27. Doi: 10.1158/1055-9965.EPI-15-0578;
61. Boultonwood, J., Fidler, C., (2002). *Molecular Analysis of Cancer*. 1^a Ed., Humana Press Inc., p. 1-5;
62. Hesketh, R., (1997). *The oncogene and tumour suppressor gene factsbook*. 2^a Ed., Academic Press, p. 3;
63. Mohrenweiser, H. W., Jones, I. M., (1990). *Review of the molecular characteristics of gene mutations of the germline and somatic cells of the human*. Mutations

Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 231 (1), p. 87-108.
Doi: 10.1016/0027-5107(90)90179-8;

64. Alison, M. R., (2001). *The cancer Handbook*. 1^a Ed., Nature Publishing Group, p. 135;
65. Huggins C.B., (1963). *The hormone-dependent cancers*. Journal of the American Medical Association, 186 (5), p. 481-483. Doi: 10.1001/jama.1963.63710050009008;
66. Wells, B. G., Dipiro, J. T., Schwinghammer, T. L., Dipiro, C. V., (2009). *Pharmacotherapy Handbook*. 7^a Ed., The McGraw-Hill Companies, Inc., p. 679-688;
67. Altundag, K., Ibrahim, N. K., (2006). *Aromatase Inhibitors in Breast Cancer: An Overview*. The Oncologist, 11 (6), p. 553-562. Doi: 10.1634/theoncologist.11-6-553;
68. Selman, S. H., (2011). *The McNeal Prostate: A Review*. Urology, 78 (6), p. 1224-1228. Doi: 10.1016/j.urology.2011.07.1395;
69. Wells, B. G., Dipiro, J. T., Schwinghammer, T. L., Dipiro, C. V., (2009). *Pharmacotherapy Handbook*. 7^a Ed., The McGraw-Hill Companies, Inc.: a. DiPiro, C. V. Capítulo 65 - *Prostate Cancer*, p. 713-718; b. Dipiro, C. V. Capítulo 82 - *Benign Prostatic Hyperplasia*, p. 931-935;
70. Moreira, V. M. A., Vasaitis, T. S., Njar, V. C. O., Salvador, J. A. R., (2007). *Synthesis and evaluation of novel 17-indazole androstene derivatives designed as CYP17 inhibitors*. Steroids, 72 (14), p. 939-948. Doi: 10.1016/j.steroids.2007.08.004;
71. Brzozowski, A. M., Pike, A. C. W., Dauter, Z., Hubbard, R. E., Bonn, T., Engström, O., Öhman, L., Greene, G. L., Gustalsson, J., Carlquist, M., (1997). *Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor*. Nature, 389, p.753-758. Doi: 10.1038/39645;
72. Williams, S. P., Sigler, P. B., (1998). *Atomic structure of progesterone complexed with its receptor*. Nature, 393, p. 392-396. Doi: 10.1038/30775;
73. Jésus-Tran, K. P., Côté, P., Cantin, L., Blanchet, J., Labrie, F., Breton, R., (2006). *Comparison of crystal structures of human androgen receptor ligand-binding domain complexed with various agonists reveals molecular determinants responsible for binding affinity*. Protein Science, 15 (5), p. 987-999. Doi: 10.1110/ps.051905906;
74. Barreiros, L., Queiroz, J. F., Magalhães, L. M., Silva, A. M. T., Segundo, M. A., (2016). *Analysis of 17- β -estradiol and 17- α -ethinylestradiol in biological and environmental matrices - A review*. Microchemical Journal, 126, p. 243-262. Doi: 10.1016/j.microc.2015.12.003;

75. Goletiani, N. V., Keith, D. R., Gorsky, S. J., (2007). *Progesterone: Review of Safety for Clinical Studies*. *Experimental and Clinical Psychopharmacology*, 15 (5), p. 427-444. Doi: 10.1037/1064-1297.15.5.427;
76. Siiteri, P. K., Wilson, J. D., (1974). *Testosterone Formation and Metabolism During Male Sexual Differentiation in the Human Embryo*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 38 (1), p. 113-125. Doi: 10.1210/jcem-38-1-113;
77. Chaudhary, K. K., Mishra, N., (2016). *A Review on Molecular Docking: Novel Tool for Drug Discovery*. *JSM Chemistry*, 4 (3), p. 1-4. Doi:
78. Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., Olson, A. J., (2009). *AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility*. *Journal of Computational Chemistry*, 30 (16), p. 2785-2791. Doi: 10.1002/jcc.21256;
79. Sharpless, K. B., Verhoeven, T. R., (1979). *Metal-Catalyzed, Highly Selective Oxygenations of Olefins and Acetylenes with tert-Butyl Hydroperoxide*. *Aldrichimica Acta*, 12, p. 63-73;
80. Burke, S. D., Danheiser, R. L., (1999). *Handbook of Reagents for Organic Synthesis: Oxidizing and Reducing Agents*. 1^a Ed., John Wiley & Sons. Jones, A. K., Wilson, T. E., Nikam, S. S. *T-Butyl Hydroperoxide*, p. 61-68;
81. Yu, J., Corey, E. J., (2003). *A Mild, Catalytic, and Highly Selective Method for the Oxidation of α,β -Enones to 1,4-Enediones*. *Journal of American Chemical Society*, 125 (11), p. 3232-3233. Doi: 10.1021/ja0340735;
82. Yu, J., Corey, E. J., (2002). *Diverse Pathways for the Palladium(II)-Mediated Oxidation of Olefins by tert-Butylhydroperoxide*. *Organic Letters*, 4 (16), p. 2727-2730. Doi: 10.1021/ol0262340;
83. Elvers, B., (2012). *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Goor, G. Glenneberg, J., Jacobi, S. *Hydrogen Peroxide*, p. 394-427;
84. Rocha, B. G. M., Kuznetsov, M. L., Kozlov, Y. N., Pombeiro, A. J. L., Shul'pin, G. B., (2015). *Simple soluble Bi(III) salts as efficient Catalysts for the Oxidation of alkanes with H₂O₂*. *Catalysis Science & Technology*, 5, p. 2174-2187. Doi: 10.1039/c4cy01651c;
85. Kuznetsov, M. L., Rocha, B. G. M., Pombeiro, A. J. L., Shul'pin, G. B., (2015). *Oxidation of Olefins with Hydrogen Peroxide Catalyzed by Bismuth Salts: A Mechanistic Study*. *Catalysis*, 5, p. 3823-3835. Doi: 10.1021/acscatal.5b00077;

86. Chauhan, S. M. S., Ray, P. C., Mohibb, M., Azam, E., Parkash, S., Sharma, T. K., (1997). *Epoxidation of 3 β -Acetoxycholest-5-ene with Cumene Hydroperoxide catalysed by 5,10,15,20-Tetraaryporphyrinatoiron(III) Chlorides*. Journal of Indian Chemical Society,
87. Solaja, B. A., Milic, D. R., Dosen-Micovic, L. I., (1994). *Oxidation of steroidal 5-en-3 β -ols with Jones reagent in ether*. Steroids, 59 (5), p. 330-334;
88. Silva, M. C.V. M., (2012). *A funcionalização dos anéis B e D de esteroides da série pregnano na preparação de potenciais fármacos quimioterápicos: Experiência Profissionalizante na vertente de Farmácia Comunitária, Hospitalar e Investigação*. Relatório para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas;
89. Agostinho, R. M. R., (2016). *A oxidação de esteroides pregnanos na preparação de potenciais compostos quimioterápicos: Experiência Profissionalizante na vertente de Farmácia Comunitária, Hospitalar e Investigação*. Relatório para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas;
90. Gaspard-Iloughmane, H., Roux, Le Roux, C., (2004). *Bismuth(III) Triflate in Organic Synthesis*. European Journal of Organic Chemistry, 2004 (12), p. 2517-2532. Doi: 10.1002/ejoc.200300754;
91. Salvador, J. A. R., Silvestre, S. M., Pinto, R. M. A., Santos, R. C., Le roux, C., (2012). *New applications for Bismuth(III) Salts in Organic Synthesis: From Bulk Chemicals to Steroid and Terpene Chemistry*. Topics in Current Chemistry, 311, p. 143-177. Doi: 10.1007/128_2011_170;
92. Banerjee, B., (2017). *Bismuth(III) triflate: Na Efficient Catalyst for the Synthesis of Diverse Biologically Relevant Heterocycles*. Chemistry Select, 2 (23), p. 6744-6757. Doi: 10.1002/slct.201701441;
93. Lai, W., Xu, D., Wang, X., Wang, Z., Liu, Y., Zhang, X., Li, Y., Liu, X., (2017). *Defluorination and covalent grafting of fluorinated graphene with TEMPO in a radical mechanism*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2017 (35), p. 24076-24081. Doi: 10.1039/C7CP04439A;
94. Tao, X., Türkuilmaz, F., Daniliuc, C. G., Kehr, G., Erker, G., (2017). *Reactions of strongly electrophilic alkenyl(pentafluorophenyl)boranes with the TEMPO radical*. Journal of Organometallic Chemistry, 2017 (847), p. 167-172. Doi: 10.1016/j.jorganchem.2017.03.030;

95. Wang, C., Zhang, L., You, J., (2017). *Nickel-Catalyzed Aminooxylation of Inert Aliphatic C(sp³)-H Bonds with Stable Nitroxyl Radicals under Air: One-pot Route to α -Formyl Acid Derivatives*. *Organic Letters*, 19 (7), p. 1690-1693. Doi: 10.1021/acs.orglett.7b00479;
96. Iida, T., Namegawa, K., Nakane, N., Iida, K., Hofmann, A. F., Omura, K., (2016). *Chemical Synthesis of Uncommon Natural Bile Acids: The 9 α -Hydroxy Derivatives of Chenodeoxycholic and Lithocolic Acids*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 64 (9), p. 1397-1402. Doi: 10.1248/cpb.c16-00247;
97. Badalyan, A., Stahl, S. S., (2016). *Cooperative electrocatalytic alcohol oxidation with electron-proton-transfer mediators*. *Nature*, 535, p. 1-5. Doi: 10.1038/nature18008;
98. Sengupta, S., Kim, H. J., Cho, K. S., Song, W. Y., Sim, T., (2017). *Highly stereoselective synthesis of Mupirocin H*. *Tetrahedron*, (Accepted Manuscript). Doi: 10.1016/j.tet.2017.01.017;
99. Spier, V. C., Sierakowski, M. R., Reed, W. F., Freitas, R. A., (2017). *Polysaccharide depolymerisation from TEMPO-catalysis: Effect of TEMPO concentration*. *Carbohydrate Polymers*, 170, p.140-147. Doi: 10.1016/j.carbpol.2017.04.064;
100. Zanka, A., (2003). *A Simple and Highly Practical Oxidation of Primary Alcohols to Acids Mediated by 2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidinyloxy (TEMPO)*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 51 (7), p. 888-889. Doi: 10.1248/cpb.51.888;
101. Peixoto, M. F. M. S., (2013). *A reação de Michael na preparação de esteroides potencialmente bioativos: Experiência Profissionalizante na vertente de Farmácia Comunitária, Hospitalar e Investigação*. Relatório para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas;
102. Pinto, R. M. A., (2009). *New processes with Bismuth(III) Reagents and Catalysts using Steroids as Substrates*. Tese de doutoramento em Farmácia (Química Farmacêutica) apresentada à Faculdade de Farmácia de Coimbra;

Anexos

Anexo 1 - Dados espectrais do composto 6

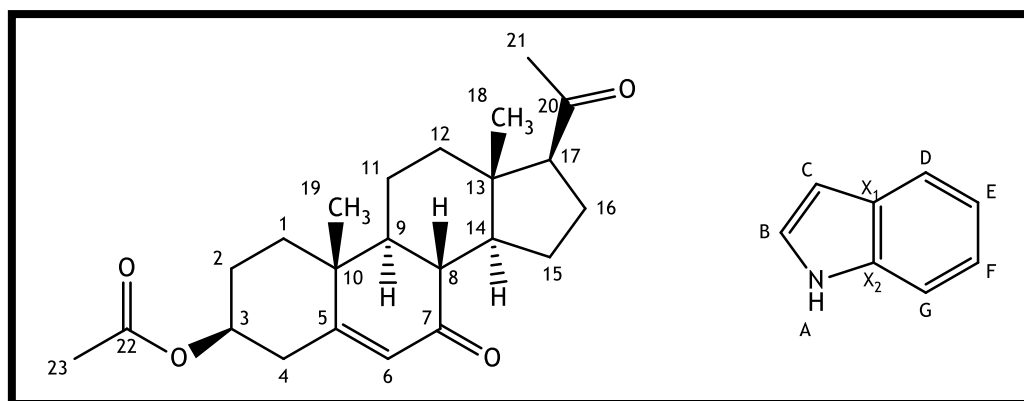
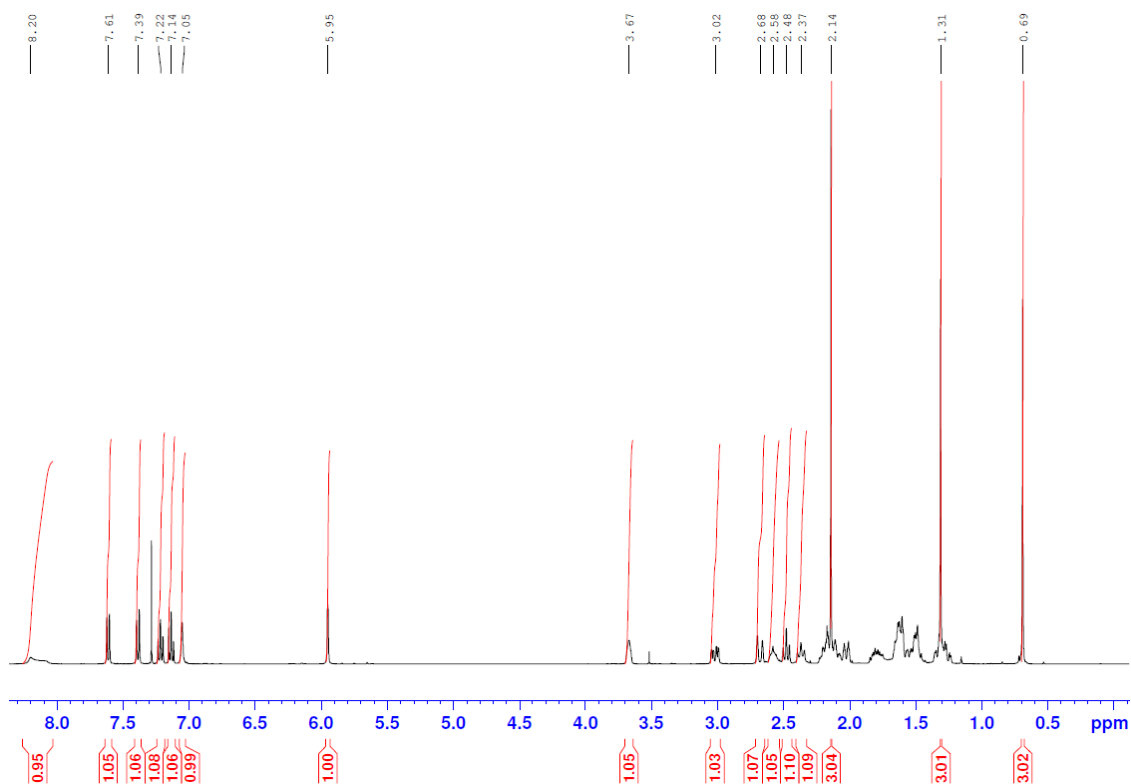


Figura 2: Estrutura e a atribuição de números e letras ao composto 4 (à esquerda) e ao núcleo indole (à direita).

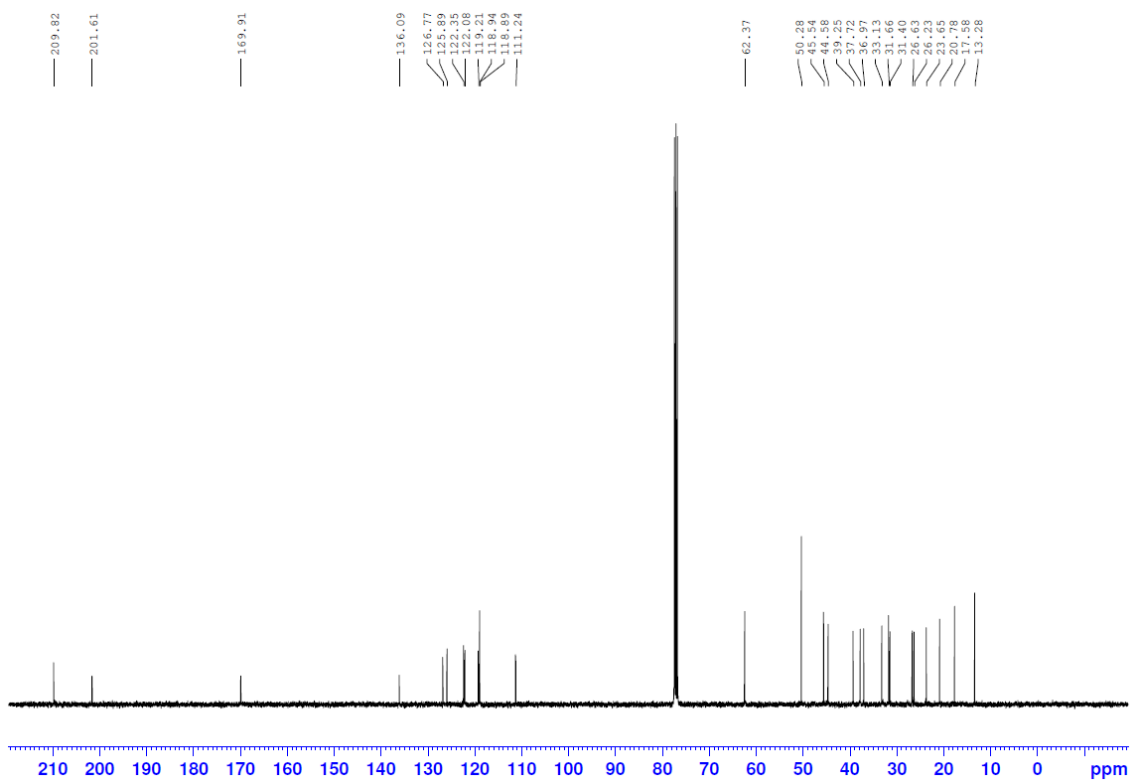
^1H RMN

(CDCl_3 , 400 MHz), 0.69 (3H, s, 18- CH_3), 1.31 (3H, s, 19- CH_3), 2.14 (3H, s, 21- CH_3), 2.14 (1H, t, $J = 10.56$ Hz), 2.48 (1H, t, $J = 9.36$ Hz), 2.58 (1H, s), 2.68 (1H, ds, $J = 15.13$ Hz), 3.02 (1H, dd, $J = 15.46$ Hz), 3.67 (1H, s, 3 α -H) 5.95 (1H, s, 6-H), 7.05 (1H, s, B-H), 7.14 (1H, t, $J = 7.08$ Hz, F-H), 7.22 (1H, t, $J = 7.22$ Hz, E-H), 7.39 (1H, d, $J = 8.08$ Hz, D-H), 7.61 (1H, d, $J = 7.84$ Hz, G-H), 8.15 (1H, s).



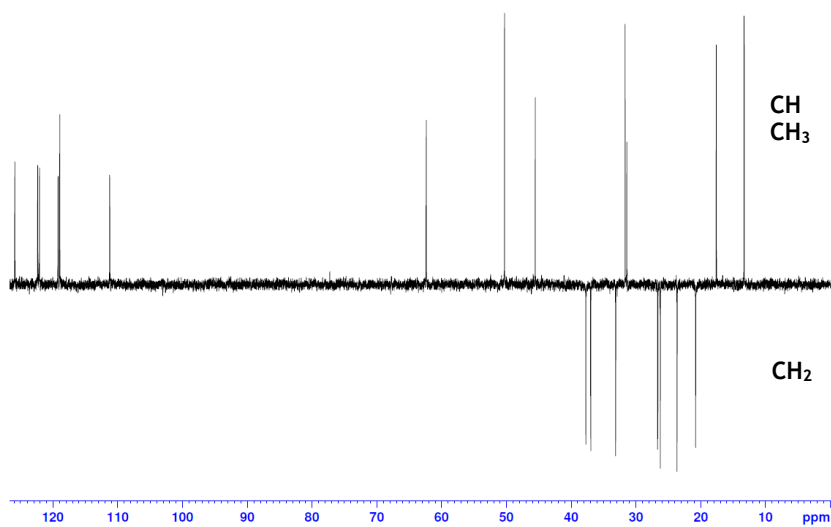
¹³C RMN

(CDCl₃, 400 MHz), 13.28 (C18), 17.58 (C19), 20.78 (CH₂), 23.65 (CH₂), 26.23 (CH₂), 26.63 (CH₂), 31.40 (CH), 31.66 (C21), 33.13 (CH₂), 36.97 (CH₂), 37.72 (CH₂), 39.25 (C), 44.58 (C), 45.54 (CH), 50.28 (2 CH's), 62.37 (C3), 111.24 (C), 118.89 (CD), 118.94 (CC), 119.21 (CE), 122.08 (CF), 122.35 (CB), 125.89 (C6), 126.77 (CX₁), 136.09 (CX₂), 169.91 (C5), 201.61 (C7), 209.82 (C20).

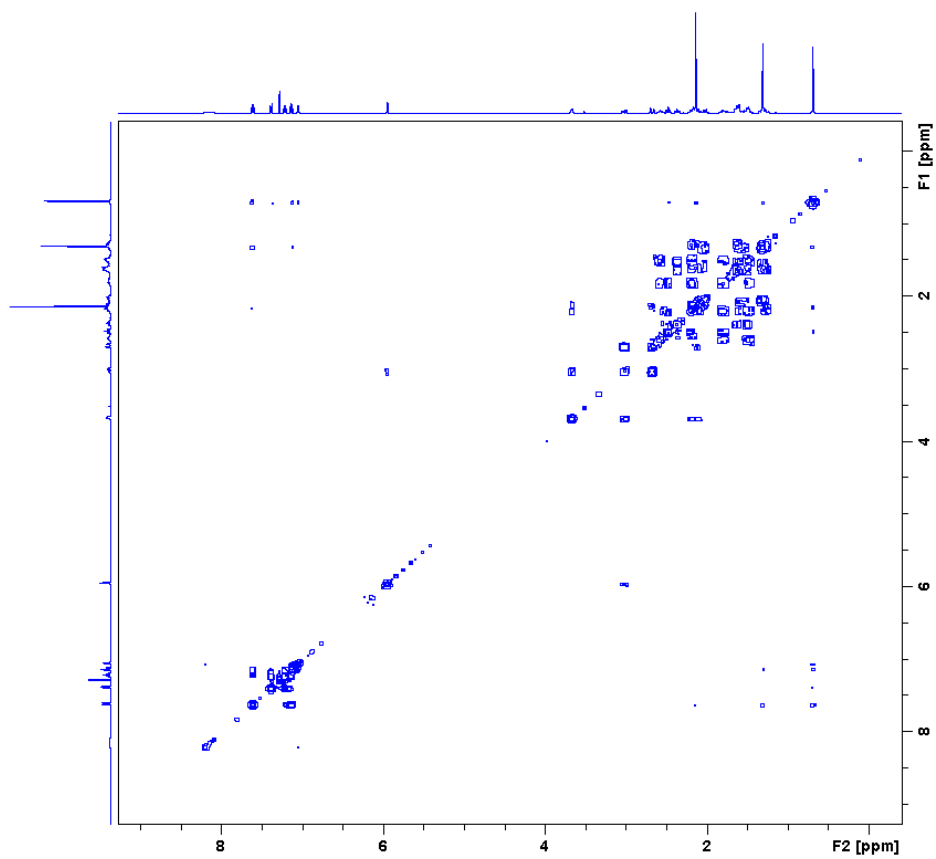


DEPT135

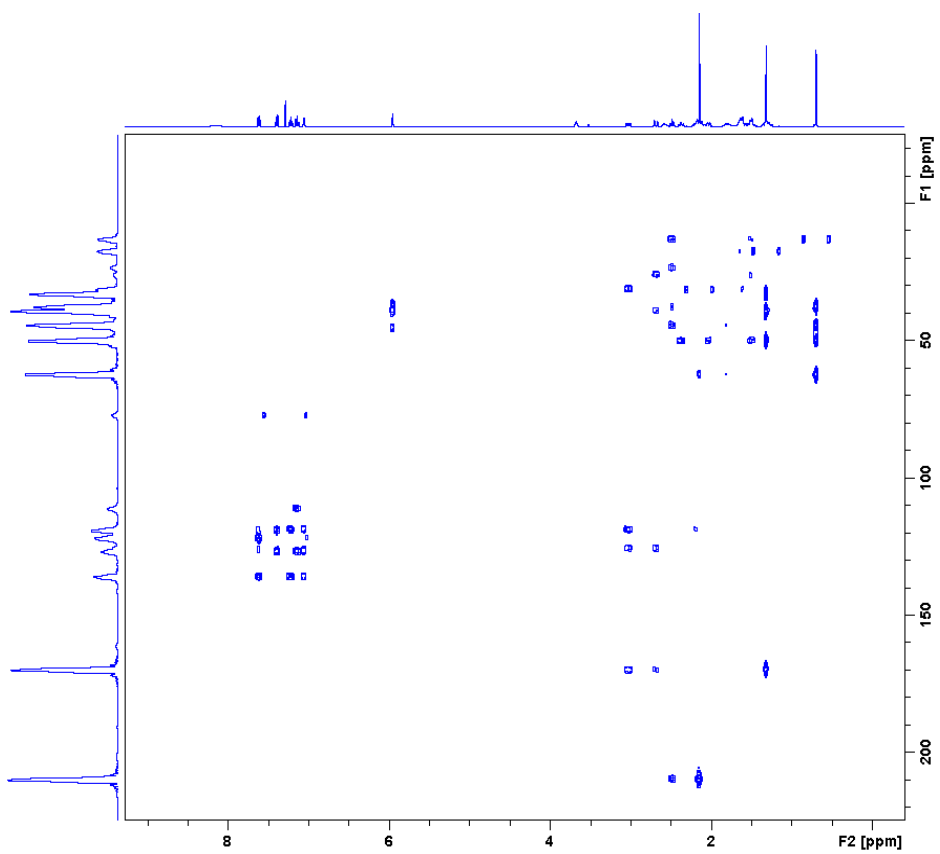
DEPT135 (δ (ppm))	
CH, CH ₃	CH ₂
13.28	20.78
17.58	23.65
31.40	26.23
31.66	26.63
45.54	33.13
50.28	36.97
62.37	----
111.24	----
118.89	----
119.21	----
122.08	----
122.35	----
126.77	----



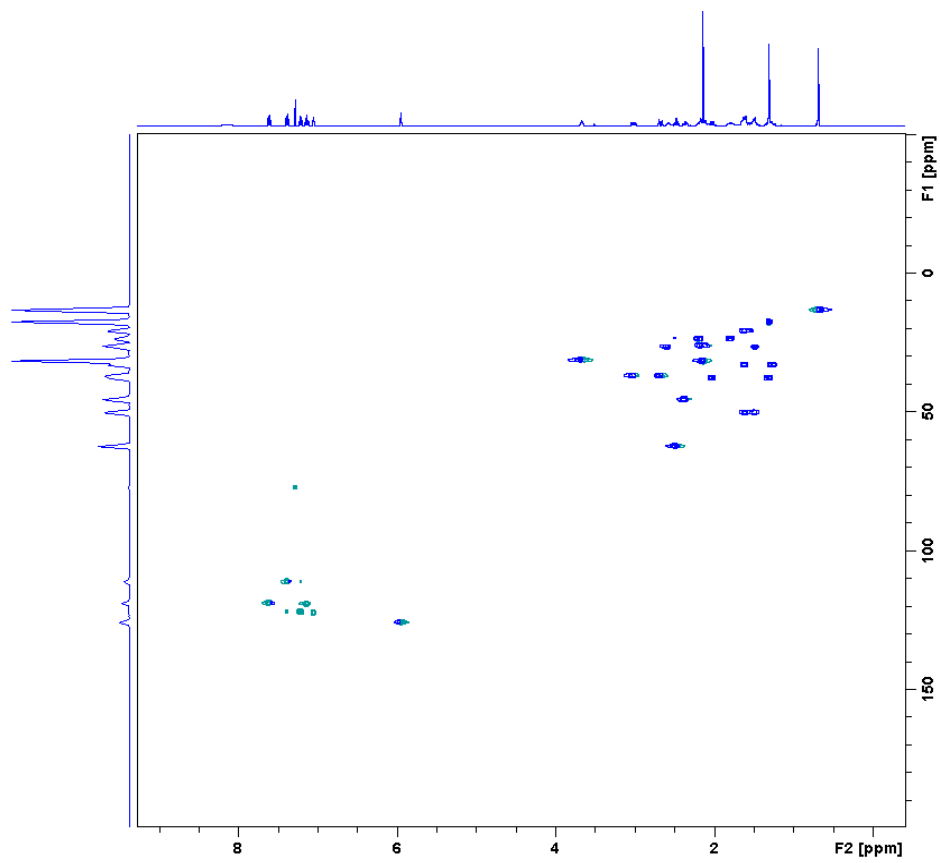
COSY



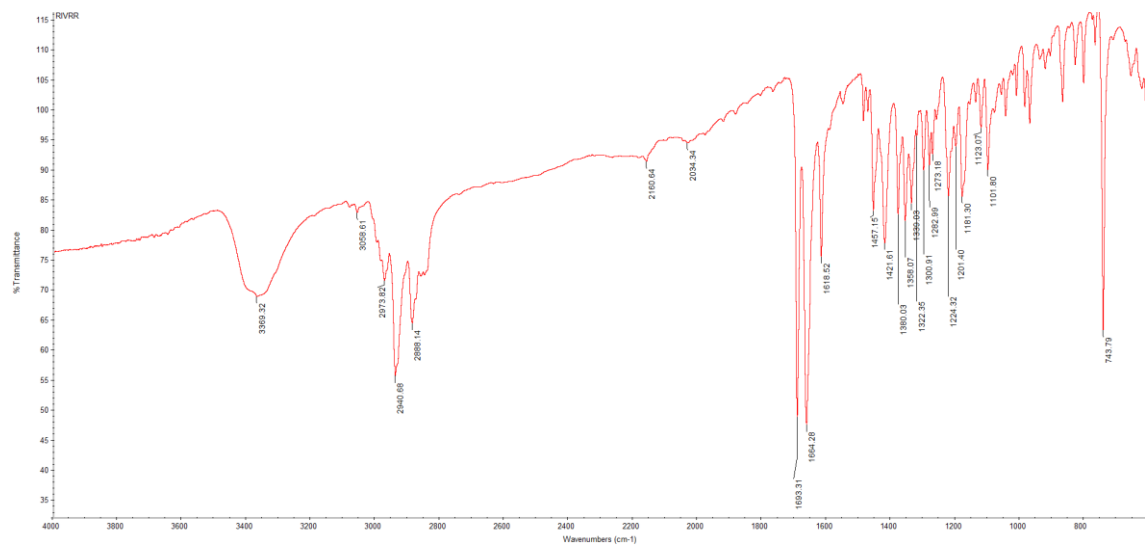
HMBC



HSQC



IV



Anexo 2 - Comunicações

Comunicação oral no âmbito desta dissertação, no XII *Annual CICS-UBI Symposium*, 2017

The oxidation of pregnane steroids as a synthetic route to potential antiproliferative agents

Ferreira, O.¹, Agostinho, R.¹, Silva, M.¹, Silvestre, S.¹

¹*CICS-UBI - Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal*

A large variety of steroids is present in human body and has high physiologic and pathologic relevance and therefore they are of high interest in the discovery new therapeutic agents. Relevant examples within this family of compounds include pregnenolone, an endogenous pregnane steroid and one of the main precursors of sexual hormones [1] and 16-dehydropregnenolone acetate (16-DPA), an important starting point for the industrial preparation of commercial steroids.

The allylic oxidation of steroids has being used over the years to develop new potentially interesting therapeutic agents [2]. In this work, metal catalysed oxidation reactions [3] applied to pregnenolone acetate (PA) and 16-DPA were studied intending to develop new and more environmentally friendly procedures to perform allylic oxidations as well as to obtain new bioactive steroids. Interestingly, using the combination of *t*-BuOOH and BiCl₃, both substrates were oxidized at C7, however, an additional epoxidation occurred on C16=C17 of 16-DPA. When using Bi(OTf)₃.xH₂O instead of BiCl₃, the hydrolysis of the 3-acetyl group was observed. Some mechanistic studies involving two different radicalar inhibitors, TEMPO and butylhydroxytoluene, were performed in order to attest the radicalar mechanism of the reaction. Interestingly, when using stoichiometric amounts of TEMPO, an increase in the reaction yield of 16 α ,17 α -epoxy-7-oxopregnenonole acetate was observed.

Furthermore, it was performed MTT screening assays in NHDF and PC-3 cell lines after exposition to a concentration of 30 μ M of substrates, oxidized derivatives and their hydrolysed derivatives during 78 h and relevant reduction of cell proliferation was observed for the oxidized steroids.

Keywords

Steroids, allylic oxidation, synthetic process, 16-dehydropregnenolone acetate, cytotoxicity

References

1. Lemke, T. L., Williams, D. A., Roche, V. F., Zito, S. W., (2013). *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. 7^a Ed., Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins. Miller, D. D., Brueggemeier, R. W., Dalton, J. T. Capítulo 40 - *Men's Health*, p. 1348-1353;
2. Salvador, J. A. R., Silvestre, S. M., Moreira, V.M. (2012) *Recent Developments in Oxidative Processes in Steroid Chemistry*. *Current Organic Chemistry*, 16(10), p. 1243-76. Doi: 10.2174/138527212800564204;
3. Salvador, J. A. R., Silvestre, S. M. (2005) *Bismuth-catalyzed allylic oxidation using t-butyl hydroperoxide*. *Tetrahedron Letters*, 46(15), p. 2581-2584. Doi: 10.1016/j.tetlet.2005.02.080;