



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências

**Esteroides antitumorais: desenvolvimento e  
avaliação biológica de esteroides estrogénicos  
potencialmente úteis no tratamento do cancro da  
mama**

**Sara Margarida Sousa Silva**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

**Bioquímica**

(2º ciclo de estudos)

Orientador: Professor Doutor Samuel Martins Silvestre

Co-orientador: Professora Doutora Luiza Breitenfeld Granadeiro

**Covilhã, Outubro de 2012**



***Aos meus Avós já falecidos, ao meu  
Irmão, à minha Irmã e ao Sérgio...***



*“É imoral pretender que uma coisa desejada se realize magicamente, simplesmente porque a desejamos. Só é moral o desejo acompanhado da severa vontade de prover os meios da sua execução.”*

*Ortega y Gasset*



# Agradecimentos

Ao meu Orientador, Professor Doutor Samuel Silvestre, os meus sinceros agradecimentos por todo o apoio, pela paciência e por entender a minha metodologia de trabalho. Foi um enorme privilégio ser merecedora da sua confiança para a realização desta dissertação.

À Professora Doutora Luíza Granadeiro, pela preocupação demonstrada, pelo espírito crítico e pelas palavras de ânimo.

Aos meus colegas de laboratório, Aura, Mafalda e João, pelo companheirismo, pela troca de ideias e pelos bons momentos que passamos juntos.

À Joana, à Melissa, ao Chico, pelos inigualáveis momentos de partilha.

Um agradecimento especial à Eduarda, pela amizade verdadeira... Simplesmente: Obrigado por tudo.

À Celina e ao Kaka por estarem presentes quando mais precisei.

Aos meus Pais e aos meus Irmãos, pelo apoio incondicional.

Ao Sérgio, por me apoiar em tudo e dizer as palavras certas nos momentos certos. Obrigado do fundo do meu coração.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

Obrigado a todos!



# Resumo

Os cancros da mama e da próstata são das patologias mais prevalentes na sociedade atual, tendo elevado impacto social e económico. Assim, o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficientes e seguras neste contexto é de elevado interesse e tem estimulado investigadores em todo o mundo a desenvolver novos compostos capazes de combater estas patologias. Uma vez que grande parte destes tipos de tumores é, pelo menos numa fase inicial, dependente de hormonas esteroides para se desenvolver, as estratégias de descoberta de novas moléculas para os tratar passam frequentemente por preparar compostos esteroides análogos das hormonas endógenas que possam bloquear o crescimento tumoral, por antagonismo dos seus receptores ou por inibição da biossíntese dessas hormonas endógenas. Assim, o objectivo deste trabalho foi o desenvolvimento de esteroides da série estrano, potencialmente úteis no tratamento de tumores hormono-dependentes da mama e da próstata. Para isso, foram sintetizados, principalmente através de reacções de oxidação, e caracterizados estruturalmente por IV e RMN vários derivados esteroides da série estrano, análogos do estradiol e da estrona, e foi efectuada a avaliação da sua ação antiproliferativa em células MCF-7 e LNCaP através do ensaio MTT. Adicionalmente também foram estudados os efeitos destes compostos em células NHDF, saudáveis, para aferir a sua toxicidade selectiva perante as células tumorais. Os resultados obtidos mostraram que alguns compostos tinham ações antiproliferativas interessantes, potencialmente exploráveis, especialmente nas células LNCaP. Adicionalmente evidenciou-se, entre outros aspectos, que a introdução de um grupo 9 $\alpha$ -OH ao esqueleto da estrona teve diferentes tipos de implicações na proliferação das células estudadas, que a introdução de uma dupla ligação em C9=C11 e de uma lactona no anel D (17 $\alpha$ -oxa-D-homoderivados) parecem não ter efeito muito relevante nas ações antiproliferativas, e que nas células LNCaP, exceptuando para os derivados D-homo, a ação antiproliferativa mais marcada está associada à presença de grupos OH em C3 ou em C9.

**Palavras-chave:** esteroides, estrogénios, acção antitumoral, oxidação, relação estrutura-actividade



# Abstract

Breast and prostate cancers are amongst the most prevalent pathologies in these days, having high social and economic impact. Thus the development of effective and safe therapeutic strategies in this context is of great interest and has prompted researchers around the world to develop new compounds able to combat these diseases. Since most of these tumor types are, at least initially, dependent on steroid hormones to grow, the strategies in the discovery of new molecules to treat these pathologies are frequently based on the development of steroid compounds that are analogous of endogenous hormones, that can block tumor growth by antagonism of their receptors, or by inhibiting biosynthesis of these endogenous hormones. Thus, the aim of this work was the development of estrane steroids potentially useful in the treatment of breast and prostate hormone-dependent tumors. In order to achieve this, several estrane steroids, analogues of estradiol and estrone, were synthesized, mainly through oxidation reactions, and structurally characterized by IR and NMR, and their antiproliferative activity was evaluated on MCF-7 and LNCaP cells by using the MTT assay. Additionally the effects of these compounds were also studied in NHDF cells (healthy cells) to assess their selective toxicity against tumor cells. The results showed that some compounds had interesting antiproliferative actions, potentially exploitable, especially in LNCaP cells. Additionally it was evidenced, among other information, that the introduction of a  $9\alpha$ -OH group to the backbone of estrone had different implications in cell proliferation and that introducing a double bond at C9=C11 and a lactone ring D (17 $\alpha$ -oxa-D-homoderivatives) appear to have a low effect on the antiproliferative actions, and in LNCaP cells, except for the D-homo derivatives, the most marked antiproliferative action is associated with the presence of OH groups in C3 or C9.

**Keywords:** steroids, estrogens, antitumor activity, oxidation, structure-activity relationships



# Índice geral

Agradecimentos	vii
Resumo	ix
Abstract	xi
Índice geral	xiii
Lista de gráficos	xvii
Lista de figuras	xix
Lista de tabelas	xxi
Lista de acrónimos	xxiii
Introdução	
1.Hormonas	1
2.Esteroidogénese	4
3.Cancros hormono-dependentes	6
3.1.Cancro da mama	6
3.1.1.Desenvolvimento do cancro da mama	7
3.1.1.1.Dependência hormonal do cancro da mama	8
3.1.1.2.Conversão periférica de hormonas e intracrinologia no cancro da mama	9
3.1.2.Tratamento clássico do cancro da mama	11
3.1.3.Tratamento do cancro da mama através da terapia hormonal	12
3.2.Cancro da próstata	19
3.2.1.Desenvolvimento do cancro da próstata	19
3.2.2.Conversão periférica de hormonas (fonte de androgénios)	20
3.2.3.Tratamento do cancro da próstata através da terapia endócrina	21

4.Esteroides estrogénicos com potencial ação antitumoral	25
5.Objetivos	33
5.1. Estratégia de síntese	33
5.1.1. Acetilação	36
5.1.2. Oxidação benzílica/Hidroxilação	37
5.1.3. Desidratação	38
5.1.4. Hidrólise alcalina do éster	39
5.1.5. Oxidação da estrona	39
5.1.6. Oxidação pelo nitrato de cério e amónio (CAN)	41
5.1.7.Oxidação alílica	42
5.1.8. Oxidação de Baeyer-Villiger	43
5.2. Estratégia de avaliação da ação citotóxica dos compostos preparados	44
6.Parte experimental	45
6.1.Síntese química	45
6.1.1.Síntese do acetato de estrona	46
6.1.2. Síntese do acetato de 9 $\alpha$ -hidroxi-17-oxoestra-1,3,5(10)-trien-3-ilo	47
6.1.3. Síntese do acetato de 17-oxoestra-1,3,5(10)-tetraen-3-ilo	48
6.1.4. Síntese da 3,9 $\alpha$ -dihidroxiestra-1,3,5(10)-trien-17-ona	49
6.1.5. Síntese do 3-hidroxiestra-1,3,5(10),9(11)-tetraen-17-ona	50
6.1.6. Síntese do 10 $\beta$ -hidroxiestra-1,4-dieno-3,17-diona	51
6.1.7.Síntese do acetato de 9 $\alpha$ -hidroxi-11 $\beta$ -dioxoestra-1,3,5(10),9(11),tetraen-3-ilo	52
6.1.8.Síntese do acetato de 12,17-dioxoestra-1,3,5(10),9(11)-tetraen-3-ilo	53
6.1.9. Tentativas para a síntese do acetato de 17 $\alpha$ -oxa-D-homoestrone	54
6.1.10. Síntese do acetato de 9 $\alpha$ -hidroxi-17 $\alpha$ -oxa-D-homoestrone	57

6.2. Avaliação biológica	59
6.2.1. Material	59
6.2.1.1. Componentes	59
6.2.1.2. Instrumentação	59
6.2.2. Ensaio em linhas celulares	60
6.2.2.1. Linhas celulares utilizadas nos ensaios e sua cultura	60
6.2.2.2. Tripsinização	62
6.2.2.3. Contagem e sementeira das células	63
6.2.2.4. Incubação dos compostos	63
6.2.2.5. Ensaio de proliferação celular	64
7. Discussão dos Resultados	66
7.1. Aplicação da estratégia de síntese	66
7.2. Avaliação biológica	72
8. Conclusão	89
9. Perspetivas futuras	91
10. Bibliografia	92



# Lista de gráficos

Gráfico 1 - Efeito na viabilidade celular nas células NHDF e MCF-7, após 72 horas de exposição à estrona nas diferentes concentrações. \*p < 0,05 em relação ao controle (Teste t-student).

Gráfico 2 - Efeito na viabilidade celular nas células LNCaP, após 72 horas de exposição à estrona nas diferentes concentrações. \*p < 0,05 em relação ao controle (Teste t-student).

Gráfico 3- Efeito na viabilidade celular nas células NHDF e MCF-7, após 72 horas de exposição ao estradiol nas diferentes concentrações. \*p < 0,05 em relação ao controle (Teste t-student).

Gráfico 4 - Efeito na viabilidade celular nas células LNCaP, após 72 horas de exposição ao estradiol nas diferentes concentrações. \*p < 0,05 em relação ao controle (Teste t-student).

Gráfico 5- Efeito na viabilidade celular nas células NHDF e MCF-7, após 72 horas de exposição ao composto 1 nas diferentes concentrações. \*p < 0,05 em relação ao controle (Teste t-student).

Gráfico 6- Efeito na viabilidade celular nas células LNCaP, após 72 horas de exposição ao composto 1 nas diferentes concentrações. \*p < 0,05 em relação ao controle (Teste t-student).

Gráfico 7- Efeito na viabilidade celular nas células NHDF e MCF-7, após 72 horas de exposição ao composto 2 nas diferentes concentrações. \*p < 0,05 em relação ao controle (Teste t-student).

Gráfico 8- Efeito na viabilidade celular nas células LNCaP, após 72 horas de exposição ao composto 2 nas diferentes concentrações. \*p < 0,05 em relação ao controle (Teste t-student).

Gráfico 9- Efeito na viabilidade celular nas células NHDF e MCF-7, após 72 horas de exposição ao composto 3 nas diferentes concentrações. \*p < 0,05 em relação ao controle (Teste t-student).

Gráfico 10- Efeito na viabilidade celular nas células LNCaP, após 72 horas de exposição ao composto 3 nas diferentes concentrações. \*p < 0,05 em relação ao controle (Teste t-student).

Gráfico 11- Efeito na viabilidade celular nas células NHDF e MCF-7, após 72 horas de exposição ao composto 4 nas diferentes concentrações. \*p < 0,05 em relação ao controle (Teste t-student).

Gráfico 12- Efeito na viabilidade celular nas células LNCaP, após 72 horas de exposição ao composto 4 nas diferentes concentrações. \*p < 0,05 em relação ao controle (Teste t-student).

Gráfico 13- Efeito na viabilidade celular nas células NHDF e MCF-7, após 72 horas de exposição ao composto 6 nas diferentes concentrações. \*p < 0,05 em relação ao controle (Teste t-student).

Gráfico 14- Efeito na viabilidade celular nas células LNCaP, após 72 horas de exposição ao composto 6 nas diferentes concentrações. \*p < 0,05 em relação ao controle (Teste t-student).

Gráfico 15- Efeito na viabilidade celular nas células NHDF e MCF-7, após 72 horas de exposição ao composto 7 nas diferentes concentrações. \*p < 0,05 em relação ao controle (Teste t-student).

Gráfico 16- Efeito na viabilidade celular nas células LNCaP, após 72 horas de exposição ao composto 7 nas diferentes concentrações. \*p < 0,05 em relação ao controle (Teste t-student).

Gráfico 17- Efeito na viabilidade celular nas células NHDF e MCF-7, após 72 horas de exposição ao composto 9 nas diferentes concentrações. \*p < 0,05 em relação ao controle (Teste t-student).

Gráfico 18- Efeito na viabilidade celular nas células LNCaP, após 72 horas de exposição ao composto 9 nas diferentes concentrações. \*p < 0,05 em relação ao controle (Teste t-student).

Gráfico 19- Efeito na viabilidade celular nas células NHDF e MCF-7, após 72 horas de exposição ao composto 10 nas diferentes concentrações. \*p < 0,05 em relação ao controle (Teste t-student).

Gráfico 20 - Efeito na viabilidade celular nas células LNCaP, após 72 horas de exposição ao composto 10 nas diferentes concentrações. \*p < 0,05 em relação ao controle (Teste t-student).

Gráfico 21- Efeito na viabilidade celular nas células NHDF e MCF-7, após 72 horas de exposição à 2-iodoestrone nas diferentes concentrações. \*p < 0,05 em relação ao controle (Teste t-student).

Gráfico 22 - Efeito na viabilidade celular nas células LNCaP, após 72 horas de exposição à 2-iodoestrone nas diferentes concentrações. \*p < 0,05 em relação ao controle (Teste t-student).

Gráfico 23- Efeito na viabilidade celular nas células NHDF e MCF-7, após 72 horas de exposição à 2-nitroestrone nas diferentes concentrações. \*p < 0,05 em relação ao controle (Teste t-student).

Gráfico 24 - Efeito na viabilidade celular nas células LNCaP, após 72 horas de exposição à 2-nitroestrone nas diferentes concentrações. \*p < 0,05 em relação ao controle (Teste t-student).

# Lista de figuras

Figura 1 - Estrutura base de esteroides e sua numeração.

Figura 2 - Anatomia e histologia das glândulas adrenais.

Figura 3- Mecanismo de ação das hormonas esteroides nas células alvo.

Figura 4 - Biossíntese das hormonas esteroides nas glândulas adrenais e gónadas.

Figura 5 - Origem e linhagem de diferentes tipos de células da glândula mamária.

Figura 6 - Vias sintéticas dos androgénios e estrogénios.

Figura 7 - Mecanismo intracrino da síntese de estrogénios no cancro da mama humano.

Figura 8 - Ciclo de *feedback* endócrino.

Figura 9 - Estrutura química da primeira e segunda geração dos antiestrogénios não-esteroides (tamoxifeno e os seus derivados) e a nova terceira geração (arzoifeno e lasoifeno) de SERMs

Figura 10 - Estrutura química dos antiestrogénios esteroides.

Figura 11 - Reações enzimáticas que conduzem à aromatização (exemplificado para a estrona).

Figura 12 - Estruturas químicas dos inibidores da aromatase.

Figura 13 - Eixos adrenais-pituitária-hipotálamo e testiculares e mecanismos de inibição farmacológicos.

Figura 14 - Mecanismo de resistência à castração no cancro da próstata.

Figura 15 - Estrutura química dos antiandrogénios.

Figura 16 - Papel da 17 $\beta$ -HSD 1 na síntese do potente estrogénio, E<sub>2</sub>.

Figura 17 - Estrutura da (a) estrona-3-*O*-sulfamato (EMATE), (b) 6-oxo-8,9,10,11-tetrahydro-7H-ciclohepta-[c][1]benzopirano-3-*O*-sulfamato (667 COUMATE), (c) 2-metoxiestradiol (2-MeOE2), (d) 2-metoxiestrona-3-*O*-sulfamato (2-MeOEMATE), (e) 2-metoxiestradiol-3,17-*O*-bis-sulfamato (2-MeOE2bisMATE).

Figura 18 - Inibição da sulfatase com derivados da estrona substituídos na posição 4.

Figura 19 - Testolactona.

Figura 20 - Compostos mais ativos da série dos androstanos.

Figura 21 - Mecanismo reacional da acetilação usando como catalisador o 4-dimetilaminopiridina (DMAP).

Figura 22 - Posições benzílicas suscetíveis de sofrerem oxidação.

Figura 23 - Mecanismo reacional da desidratação de álcoois.

Figura 24 - Hidrólise alcalina dos ésteres.

Figura 25 - Mecanismo hipotético para a oxidação do fenol.

Figura 26 - Mecanismo hipotético para a oxidação pelo nitrato de cério e amónio (CAN).

Figura 27 - Mecanismo proposto para a oxidação de Baeyer-Villiger.

Figura 28 - Estruturas químicas do MTT e do MTT formazano.

Figura 29 - Células NHDF.

Figura 30 - Células MCF-7.

Figura 31 - Células LNCaP.

Figura 32 - Distribuição dos zeros (Z), controlos (C) e das concentrações (0,01  $\mu\text{M}$ ; 0,1  $\mu\text{M}$ ; 1  $\mu\text{M}$ ; 10  $\mu\text{M}$ ; 50  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ ) numa placa de 48 wells.

Figura 33 - Espectro  $^1\text{H}$  RMN completo do composto 3.

Figura 34 - Expansão 1 do Espectro  $^1\text{H}$  RMN completo do composto 3.

Figura 35 - Expansão 2 do Espectro  $^1\text{H}$  RMN completo do composto 3.

Figura 36 - Espectro  $^1\text{H}$  RMN completo do composto 4.

Figura 37 - Expansão 1 do Espectro  $^1\text{H}$  RMN do composto 4.

Figura 38 - Expansão 2 do Espectro  $^1\text{H}$  RMN do composto 4.

Esquema 1 - a) Anidrido acético / DMAP; b) Oxone® / Acetona /  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  /  $\text{H}_2\text{O}$  /  $\text{NaHCO}_3$  / TBAHS /  $15^\circ\text{C}$ ; c)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  /  $-20^\circ\text{C}$ ; d)  $\text{CH}_3\text{OH}$  /  $\text{KOH}$ ; e)  $\text{KMNO}_4$  / Acetato de etilo /  $\text{HCl}$  aq.; f) CAN / Ácido acético /  $\text{H}_2\text{O}$ ; g)  $\text{BiCl}_3$  / TBHP.

Esquema 2 - a) Anidrido acético / DMAP; b) Ácido *meta*-cloroperoxibenzóico / THF /  $\text{H}_2\text{O}$  /  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; c) Oxone® / Acetona /  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  /  $\text{H}_2\text{O}$  /  $\text{NaHCO}_3$  / TBAHS /  $15^\circ\text{C}$ .

# Lista de tabelas

Tabela 1 - Tentativas da síntese do composto 9 através da oxidação de Baeyer-Villiger.



# Lista de acrónimos

ACTH	Hormona adrenocorticotrófica
AD	Androstenodiona
Adiol	Androstenodiol
Als	Inibidores da Aromatase
AR	Recetores de androgénios
cAMP	Adenosina 3', 5' - monofosfato cíclico
CAN	Nitrato de cério e amónio
CCF	Cromatografia em camada fina
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
CM	Cancro da mama
CP	Cancro da próstata
CPA	Acetato ciproterona
CYP17	Citocromo P450 17 $\alpha$ -hidroxilase-C <sub>17,20</sub> -liase
CYP19	Citocromo P450 aromatase
CYP450	Citocromo P450
$\delta$	Desvio químico
DHEA	Desidroepiandrosterona
DHT	Dihidrotestosterona
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
d	dubleto
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético

ER	Recetores de estrogénios
Ex:	Exemplo
E <sub>1</sub>	Estrona
E <sub>2</sub>	Estradiol
E1S	Estrona sulfatase
FBS	Soro bovino fetal
HSDs	Hidroxiesteróides desidrogenases
IC <sub>50</sub>	Concentração de composto que inibe a atividade enzimática em 50%
IV	Infra-vermelho
LH	Hormona luteinizante
LHRH	Hormona libertadora da hormona luteinizante
LNCaP	<i>Lymph node carcinoma of the prostate</i>
m	multipleto
MCF-7	<i>Michigan Cancer Foundation-7</i>
MMPP	Monoperoxiftalato de magnésio hexahidratado
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] 2,5 difeniltetrazólio
NHDF	<i>Normal human dermal fibroblasts</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato salino
PSA	Antigénio específico da próstata
P450 <sub>scc</sub>	Colesterol desmolase
Rf	Fator de retenção
RNA	Ácido ribonucleico
SERMs	Moduladores seletivos dos recetores de estrogénios
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
<sup>13</sup> C RMN	Ressonância magnética nuclear de carbono 13

$^1\text{H}$ RMN	Ressonância magnética nuclear de prótons
STS	Esteróide sulfatase
TFA	Anidrido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultra-violeta



# Introdução

## 1. Hormonas

As hormonas são mensageiros químicos que consistem numa variedade de moléculas (proteínas, péptidos, esteroides) libertadas para o meio extracelular pelas células de um tecido, sendo transportadas (geralmente pelo sistema circulatório) até um novo local de ação onde produzem uma resposta específica. Entre outras funções, as hormonas influenciam a produção e a proliferação de certas enzimas nas células alvo, coordenando e controlando assim as suas correspondentes atividades no organismo. Apesar de a circulação sanguínea distribuir as hormonas para todas as partes do corpo, apenas algumas células, órgãos ou tecidos respondem a estas. As hormonas atuam nas células alvo através de recetores específicos, que se podem classificar em membranares ou nucleares. A variedade de recetores hormonais em cada célula normalmente assegura a ligação de diferentes hormonas a estes. A sensibilidade de uma célula para uma hormona em particular, depende, em parte, do número de recetores disponíveis.

De acordo com o seu mecanismo de ação, as hormonas podem classificar-se em hidrofílicas ou lipofílicas. As hormonas hidrofílicas (geralmente proteínas e péptidos) ligam-se preferencialmente aos seus recetores específicos na superfície externa das células alvo, levando à libertação enzimática, dentro da célula, de segundos mensageiros. A ação intermediária de certas substâncias mensageiras (Ex: adenosina 3',5'-monofosfato cíclico, cAMP) pode, por exemplo, influenciar o transporte ou os sistemas enzimáticos e, conseqüentemente, algumas vias metabólicas. Assim, as hormonas hidrofílicas influenciam, principalmente, a actividade da célula. Em contraste com as hormonas hidrofílicas, os esteroides e as hormonas tiroideias podem penetrar facilmente na membrana celular, por serem moléculas lipossolúveis [1].

Os esteroides são um grande grupo de compostos que consistem em estruturas com um núcleo de quatro anéis fundidos (designados A, B, C e D), onde os anéis A, B e C formam estruturalmente o núcleo per-hidrofenantreno e o anel D é um ciclopentano (figura 1) [2].

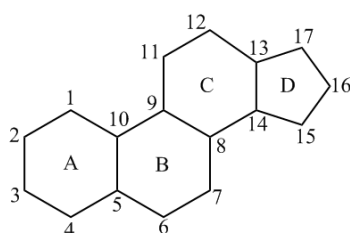


Figura 1 - Estrutura base de esteroides e sua numeração [2].

A função dos diversos esteroides nos organismos é fundamentalmente fisiológica: contribuem para a digestão das gorduras (ácidos biliares), são precursores da vitamina D<sub>3</sub>, medeiam o desenvolvimento dos caracteres sexuais (hormonas sexuais) e também participam na regulação fisiológica do metabolismo dos glúcidos e dos eletrólitos (hormonas adrenocorticais). A sua síntese ocorre em diversos tecidos, tais como nas glândulas supra-renais (figura 2), nas gónadas e na placenta, mas tem sempre um precursor comum: o colesterol [3]. Devido à função essencial que estas moléculas desempenham na fisiologia humana, são necessários mecanismos de regulação complexos, que atuam concertadamente, para manterem as concentrações plasmáticas destas hormonas em níveis adequados [4].

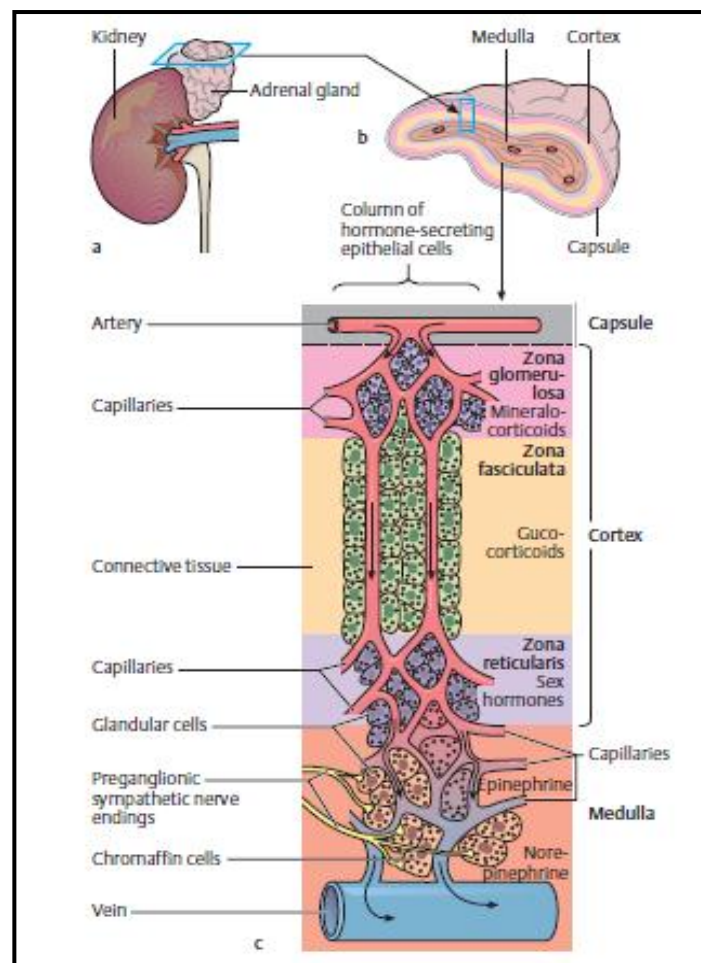


Figura 2 - Anatomia e histologia das glândulas adrenais. Adaptado da literatura [1].

As hormonas esteroides são transportadas na corrente sanguínea maioritariamente ligadas de modo reversível a proteínas séricas. Os esteroides livres podem difundir-se através da membrana celular e assim entrarem nas células. As células sensíveis a determinada hormona esteroide (células alvo), contêm recetores de esteroides, que são geralmente proteínas intracelulares solúveis que, após ativação, podem atuar como fatores de transcrição através da interação em locais específicos do DNA. Antes da ligação ao esteroide, os recetores de esteroides estão complexados com proteínas de choque térmico. A ligação ao esteroide inicia, para além da alteração conformacional, a dissociação das proteínas de choque térmico, permitindo a dimerização e a translocação dos recetores para o núcleo. Aí, o dímero do recetor interage com regiões específicas do DNA celular (conhecidas como elementos sensíveis a hormonas) e com co-ativadores de vários fatores de transcrição nucleares. A ligação do complexo recetor-esteroide ao DNA inicia a transcrição das sequências do DNA para produzir mRNA, de que resulta um aumento da síntese proteica no retículo endoplasmático (figura 3). Estas proteínas podem incluir enzimas, recetores e fatores de secreção, que posteriormente regulam a resposta das hormonas esteroides como a função celular, o crescimento, a diferenciação, etc [2].

A síntese das hormonas esteroides, a partir do colesterol, envolve enzimas da família das monooxigenases do citocromo P450 e das hidroxisteroides desidrogenases (HSDs), nas glândulas supra-renais, nas gónadas, na placenta, nos intestinos e no sistema nervoso periférico e central [4]. Este complexo processo denomina-se esteroidogénese.

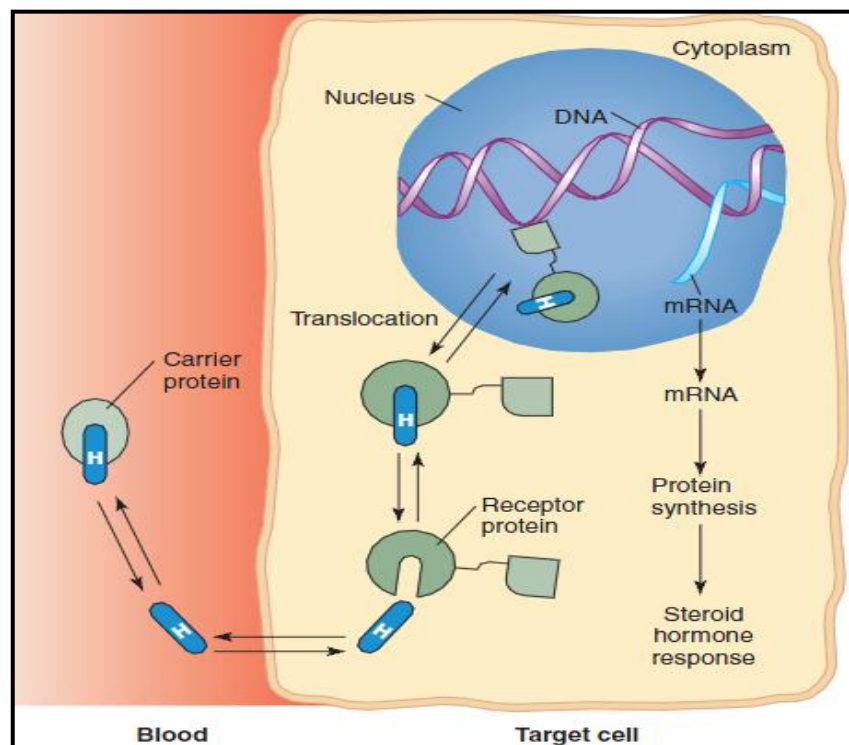


Figura 3 - Mecanismo de ação das hormonas esteroides nas células alvo. Adaptado da literatura [5].

## 2. Esteroidogénese

Os dois principais tecidos esteroidogénicos nos mamíferos são as glândulas supra-renais e as gónadas. O córtex supra-renal contém três camadas esteroidogénicas: a *zona glomerulosa*, composta por uma fina camada de células que sintetizam aldosterona (mineralocorticóides), a *zona fasciculata* que produz glucocorticóides e a *zona reticularis* responsável pela produção das hormonas sexuais (figura 2). A biossíntese dos esteroides adrenais é regulada pela hormona adrenocorticotrófica (ACTH), a qual é secretada pela glândula pituitária. Ao contrário dos esteroides adrenais, os esteroides sexuais (testosterona e estrogénios) são secretados pelas gónadas, mediante a estimulação pela hormona luteinizante (LH), também secretada pela hipófise anterior [6]. Em cada um destes tecidos esteroidogénicos, o citocromo P450 e as HSDs (3 $\beta$ -HSD e 17 $\beta$ -HSD), são utilizados como catalisadores destas vias biossintéticas [7]. Estas enzimas catalisam uma cascata de reações, convertendo o colesterol em produtos esteroides. Os níveis de expressão relativos destas enzimas esteroidogénicas, nos diferentes tipos de células, ditam o tipo de esteroides que são sintetizados [6].

O colesterol é o precursor das cinco principais classes de hormonas esteroides: progesterona, estrogénios, androgénios, glucocorticóides e mineralocorticóides (figura 4). A enzima colesterol desmolase (P450<sub>scc</sub>) é responsável pela primeira fase da síntese das hormonas esteroides. Esta enzima cliva a cadeia lateral do colesterol, formando-se a pregnenolona, sendo esta conversão estimulada pela ACTH [8]. A pregnenolona, por sua vez, pode ser metabolizada pela 17 $\beta$ -hidroxilase-17,20-liase (CYP17) formando-se a desidroepiandrosterona (DHEA), ou pela 3 $\beta$ -HSD e pela  $\Delta^{4,5}$ -isomerase, originando a progesterona que é depois metabolizada também pela CYP17 e forma a androstenodiona (AD) [9, 10]. A redução da AD na posição 17 é regulada pela 17 $\beta$ -HSD tipo 3, formando-se a testosterona. Os principais órgãos produtores de androgénios são os testículos (nas células de Leydig) e as glândulas supra-renais (na *zona reticularis*). A testosterona circulante chega, nomeadamente, até às células prostáticas, por difusão local, onde é convertida pela 5 $\alpha$ -reductase, no seu metabolito mais potente, a dihidrotestosterona (DHT) [11]. Pela actuação da aromatase (CYP19) sobre a AD e sobre a testosterona, resultam também, respetivamente, os estrogénios estrona (E<sub>1</sub>) e estradiol (E<sub>2</sub>) [9, 10]. Ainda entre as enzimas envolvidas na esteroidogénese, a 17 $\beta$ -HSD tipo 1 é responsável pela conversão de E<sub>1</sub> em E<sub>2</sub>, o estrogénio mais potente, e da DHEA em androst-5-eno-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol ( $\Delta^5$ -diol) [12]. Nas mulheres, a produção de estrogénios inicia-se nas células teca. Estas células, para além de possuírem 17 $\beta$ -HSDs, contêm também outras enzimas, tais como a 5 $\alpha$ -reductase e a 3 $\alpha$ -HSD. Os precursores intermediários (como por exemplo a AD) são posteriormente convertidos em estrogénios pelas células da granulosa [11].

Na síntese da aldosterona estão envolvidas ainda três diferentes enzimas. A 3 $\beta$ -HSD transforma a pregnenolona em progesterona em dois passos enzimáticos sucessivos: desidrogenação na posição 3, sucedendo-se a transferência da dupla ligação (isomerização) para a posição 4 do anel A. Em seguida, a progesterona é hidroxilada na posição 21, num

único passo reacional (CYP21), para formar a desoxicorticosterona. A desoxicorticosterona sofre duas hidroxilações na posição 11 e 18, seguida de uma oxidação na posição 18, formando-se a aldosterona. Esta sequência de três reações é controlada por um complexo enzimático CYP450 expresso na *zona glomerulosa* do córtex. Os glucocorticóides são secretados pelas células da *zona fasciculata* (figura 2) do córtex, e são moduladores do metabolismo das proteínas e dos carboidratos. O principal glucocorticóide presente no homem é o cortisol, o qual é sintetizado a partir da progesterona, primeiramente por uma hidroxilação na posição 17 (CYP17) seguida de outras duas na posição 21 (CYP21) e na posição 11B (CYP11B1) [13].

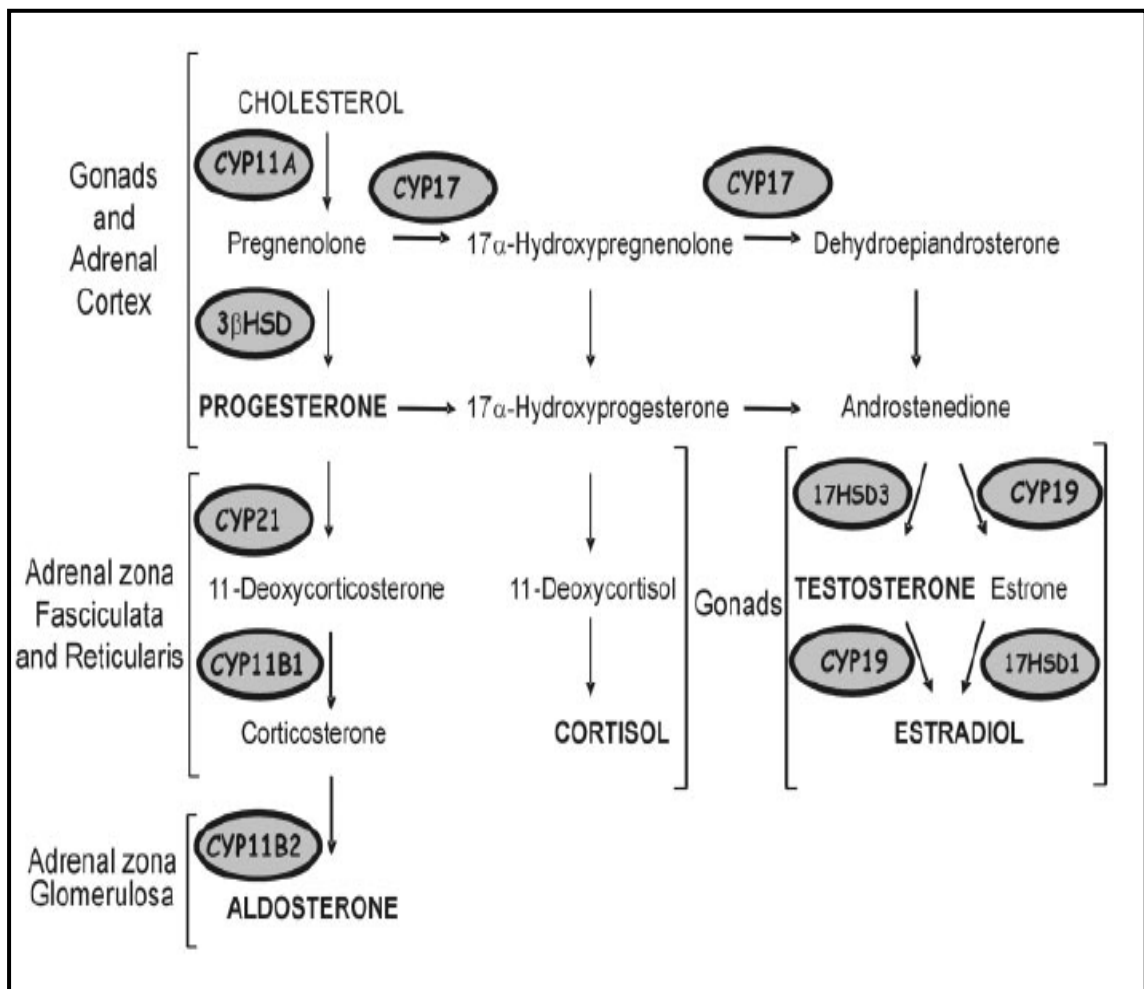


Figura 4 - Biossíntese das hormonas esteroides nas glândulas adrenais e gónadas. Adaptado da literatura [14].

### 3. Cancros hormono-dependentes

Nos dias de hoje, o cancro continua a ser a principal causa de morte no mundo e, de acordo com as estatísticas da Organização Mundial de Saúde (OMS), esta patologia foi diagnosticada a mais de 10 milhões de pessoas e, em cada ano, 6 milhões de pessoas irão morrer devido ao cancro. Nos Estados Unidos, o cancro é a segunda maior causa de morte a qual corresponde a 25% do total de mortalidades. Além disso, a alocação dos recursos médicos nesta patologia custa cerca de 263.3 biliões de dólares por ano [15, 16].

A progressão e a iniciação do cancro consistem em processos com várias etapas, que se refletem em alterações epigenéticas progressivas que conduzem à transformação de células humanas normais em células malignas [17]. Existem, pelo menos, três classes principais de genes que desempenham um papel chave na iniciação do tumor: os proto-oncogenes, os genes supressores de tumores e os genes envolvidos nos mecanismos de reparação do DNA. Mutações nestes genes podem levar a uma desregulação dos mecanismos biológicos envolvidos no crescimento, e na diferenciação celular normal. Pensa-se que estes eventos são seguidos por uma seleção clonal de células variantes, com comportamentos altamente agressivos, que se caracterizam pela sua habilidade em proliferar descontroladamente, contrariando os mecanismos de regulação de crescimento normal, assim como pela sua capacidade em invadir e destruir os tecidos normais [18].

Os cancros hormono-dependentes, dos quais fazem parte alguns cancros da mama, do endométrio e da próstata, encontram-se entre as principais doenças do mundo moderno [19]. O desenvolvimento de tumores hormono-dependentes envolve a estimulação da proliferação celular por hormonas, as quais podem aumentar o número de divisões celulares e a possibilidade de ocorrerem erros genéticos aleatórios [20].

#### 3.1. Cancro da mama

Apesar dos recentes avanços no diagnóstico precoce, na prevenção e na terapia [21], o cancro da mama (CM) é a principal causa de morte relacionada com cancro em mulheres em todo o mundo [22]. Só em 2009, foram reportados mais de 190.000 novos casos de CM invasivos, que contabilizaram aproximadamente 25% de todos os cancros, entre mulheres, nos Estados Unidos. Apesar das causas deste permanecerem ainda parcialmente desconhecidas, sabe-se que existem vários fatores de risco que aumentam a probabilidade de uma mulher desenvolver CM. Estes incluem a idade, genética, ambiente, história familiar, dieta, álcool e obesidade [23, 24]. Acredita-se que muitos CM se desenvolvem espontaneamente através da acumulação de mutações e alterações epigenéticas ao longo da vida e que a menopausa tardia aumenta o seu risco. Por outro lado, a gravidez, principalmente na idade jovem, diminui o risco de desenvolvimento deste. É interessante de notar que as mulheres de países

Asiáticos apresentam risco inferior de adquirirem CM, comparado com as mulheres Ocidentais, o que poderá justificar-se pela dieta [25].

### 3.1.1. Desenvolvimento do cancro da mama

A glândula mamária é constituída por células epiteliais luminais e mioepiteliais incorporadas numa complexa matriz estromal, composta predominantemente por fibroblastos, adipócitos e macrófagos (figura 5). Os diversos subtipos de epitélios mamários e as células estromais vizinhas surgem de divisões epiteliais assimétricas e de células mesenquimais originais (células estaminais), respetivamente [26, 27]. Dados emergentes sobre as células estaminais mamárias, suscitam a hipótese de que esta subpopulação epitelial atua como alvo inicial de agentes oncogénicos [26].

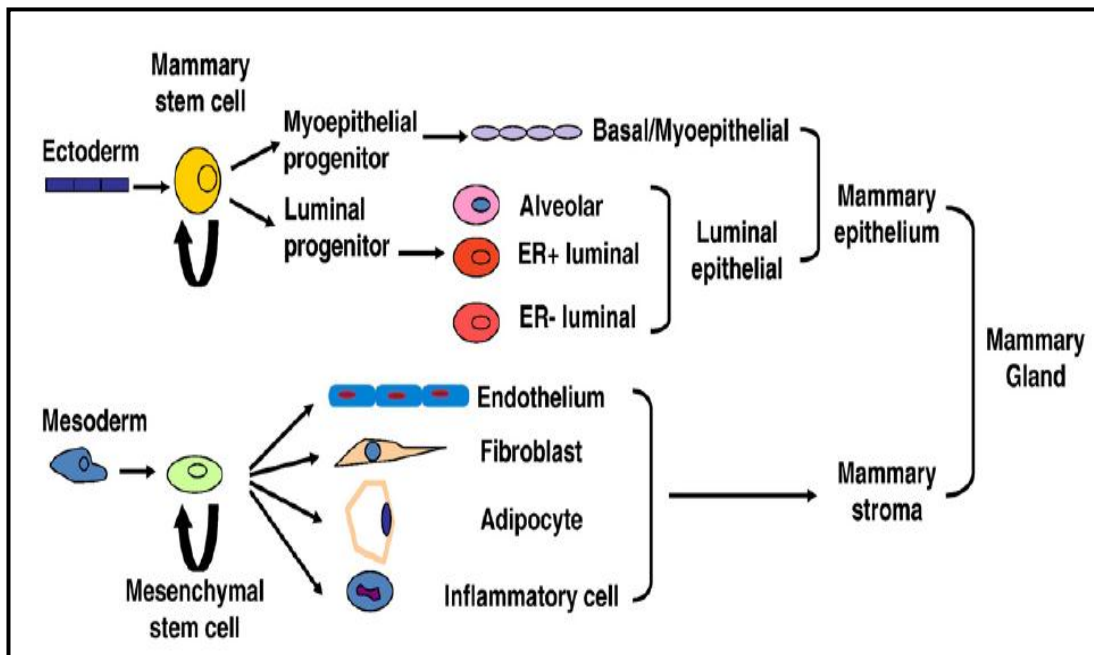


Figura 5 - Origem e linhagem de diferentes tipos de células da glândula mamária. Adaptado da literatura [26].

A transformação de células epiteliais mamárias normais em malignas, manifesta-se num crescimento anormal e em respostas de sobrevivência a sinais extracelulares. Estes sinais derivam do sistema endócrino, bem como do estroma, cuja proximidade física com as células epiteliais permite uma regulação parácrina dinâmica e uma integração de sinais a partir de hormonas circulantes e de fatores de crescimento [28, 29]. Alterações moleculares e fenotípicas dentro do estroma, afetam as suas interações com as células vizinhas, resultando

num microambiente que pode ser favorável para a progressão para a malignidade [30, 31, 32].

### 3.1.1.1. Dependência hormonal no cancro da mama

A maioria dos CM, quer em mulheres pré-, quer pós-menopáusicas, são inicialmente hormono-dependentes [33]. Tanto as hormonas esteroides endógenas, como certos compostos exógenos com ação hormonal, estão implicadas na patogénese do CM, devido aos efeitos que estas podem desempenhar no crescimento celular, na diferenciação e na função da mama e outros tecidos [24]. Assim, nos cancros hormono-dependentes, a terapia endócrina é uma abordagem relativamente seletiva e por isso potencialmente menos tóxica, quando comparada com a quimioterapia citotóxica, sendo, portanto, a escolha predominante no tratamento e prevenção destas patologias [34]. Esta terapia passa por utilizar compostos capazes de interferirem com a ação dos esteroides nas células do CM ou pela inibição de enzimas envolvidas na biossíntese dos esteroides [35].

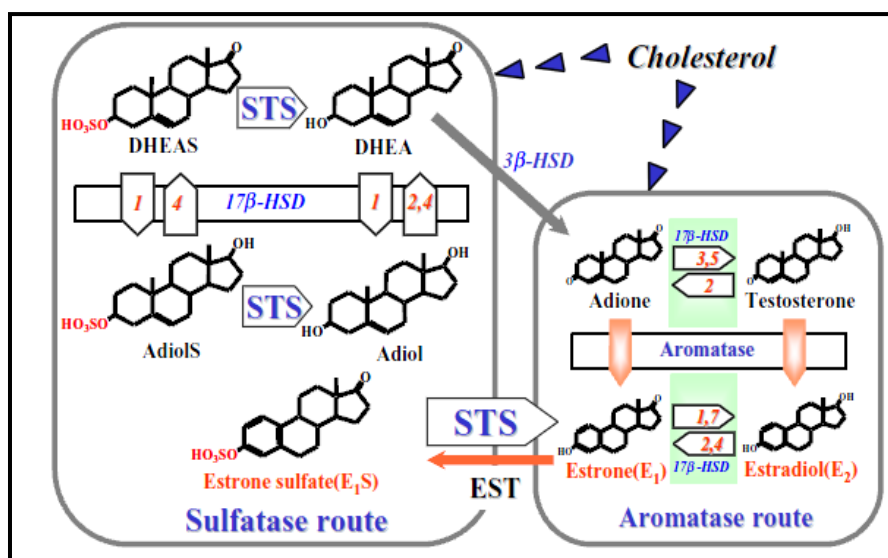
Depois de um período que pode demorar meses a anos, os tumores tornam-se hormono-independentes por um mecanismo que ainda não está totalmente elucidado. Uma possível explicação para este facto envolve mutações que ocorrem nos recetores de estrogénios (ER) [36, 37].

Embora a produção local dos estrogénios seja, maioritariamente, nos ovários, estes exercem efeitos sistémicos seletivos em determinados tecidos alvo. A ação dos estrogénios é mediada principalmente por dois tipos de recetores: ER- $\alpha$  e ER- $\beta$ , que são produtos de diferentes genes. O ER- $\alpha$  é expresso, primariamente, no útero, fígado, rim e no coração, sendo algumas vezes co-expresso com o ER- $\beta$  nas glândulas mamárias, tiroideas e adrenais, assim como também nos ossos e no cérebro. No cérebro, o ER- $\beta$  forma heterodímeros funcionais e, em muitos casos, as suas ações opõem-se às do ER- $\alpha$ . Em contraste, o ER- $\beta$  é expresso, especificamente, nos ovários, na próstata, nos pulmões, no trato gastrointestinal, na bexiga, no sistema nervoso central e no sistema hematopoiético [38].

### 3.1.1.2. Conversão periférica de hormonas e intracrinologia no cancro da mama

Os estrogénios são as principais hormonas envolvidas no desenvolvimento e crescimento de tumores da mama [39]. Para além de serem responsáveis pelas características sexuais primárias e secundárias nas mulheres, os estrogénios também regulam processos biológicos nos tecidos e órgãos alvo [40]. Atualmente, é bem conhecido que uma proporção de CM expressa recetores celulares para os estrogénios ou para outras hormonas esteroides (incluindo a progesterona). As células que contêm estes locais de ligação denominam-se células positivas para os receptores hormonais [41]. A hormona e o complexo receptor-estrogénio podem mediar a ativação de proto-oncogenes e de oncogenes (por exemplo o c-fos e o c-myc), de proteínas nucleares, bem como de outros genes [33]. Nos tumores sensíveis a hormonas a expressão dos ER (no caso do CM) ou dos receptores de androgénios (AR) (no caso do cancro da próstata) encontra-se frequentemente acima de um limite detetável pré-estabelecido [20]. Consequentemente, os processos que modulam as concentrações intracelulares de estrogénios ativos podem afetar a etiologia desta doença [33]. Deste modo, uma estratégia lógica para o tratamento de CM sensíveis a estrogénios, consiste na utilização de antiestrogénios. Estes previnem que os estrogénios interajam com os seus recetores específicos, impedindo assim o crescimento do tumor mamário [41].

Em mulheres adultas, uma grande proporção de estrogénios ativos são sintetizados em tecidos alvo, tais como a mama, a partir de esteroides precursores inativos. Os tecidos do cancro mamário têm a capacidade de biossintetizar  $E_2$  a partir de precursores circulantes. Existem duas vias principais implicadas na formação do  $E_2$  em tecidos do CM: a via da aromatase, a qual converte os androgénios (AD e testosterona) em estrogénios ( $E_1$  e  $E_2$ ) e a via da sulfatase, a qual converte o sulfato de estrona em  $E_1$  pela sulfatase (figura 6). O passo final da esteroidogénese é a conversão da  $E_1$ , funcionalmente menos ativa, em  $E_2$ , biologicamente potente, pela ação da 17 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1 (17 $\beta$ -HSD 1) redutiva. Estudos têm indicado que nos tumores mamários humanos, a via da sulfatase ( $E_1S$ ) é uma fonte muito mais provável de  $E_2$  do que os androgénios pela via da aromatase [42].



**Figura 6** - Vias sintéticas dos androgénios e estrogénios. A origem dos compostos esteroides é o colesterol. 17β-HSD: 17β-hidroxiesteróide desidrogenase. DHEAS: sulfato de desidroepiandrosterona. AdiolS: sulfato de androstenodiol. EST: estrona sulfotransferase. Adaptado da literatura [32].

A maioria dos CM estrogénio-dependente verifica-se em mulheres pós-menopáusicas, em que a função dos ovários e o controlo hipofisário de produção de estrogénios cessaram [43]. Apesar dos baixos níveis de estrogénios circulantes, as concentrações tecidulares de E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> e dos seus sulfatos (E<sub>1</sub>S, E<sub>2</sub>S) são muitas vezes superiores aos encontrados no plasma sugerindo uma biossíntese específica tumoral e acumulação destas hormonas. Vários fatores podem estar incluídos neste processo, incluindo a elevada absorção de esteroides a partir do plasma e a formação local do estrogénio mais potente, o E<sub>2</sub>, pelo tecido do CM em si. Este efeito alarga o conceito de intracrinologia, onde a ação do esteroide é exercida nas mesmas células onde ocorre a sua síntese, sem diluição e libertação das hormonas ativas no espaço extracelular e na circulação em geral (figura 7) [33]. Assim, a taxa de formação de cada esteroide sexual, depende da atividade de cada enzima específica responsável pela síntese de androgénios ou estrogénios, em cada célula de cada tecido [44].

Devido ao efeito estimulatório do E<sub>2</sub> em células do CM, bloquear a sua formação pela inibição destas enzimas, deverá ser de extrema importância, para o controlo do crescimento do tumor mamário. Assim, inibidores potentes e seletivos destas enzimas têm sido desenvolvidos e têm-se mostrado promissores como agentes antiproliferativos em CM hormono-dependentes [33].

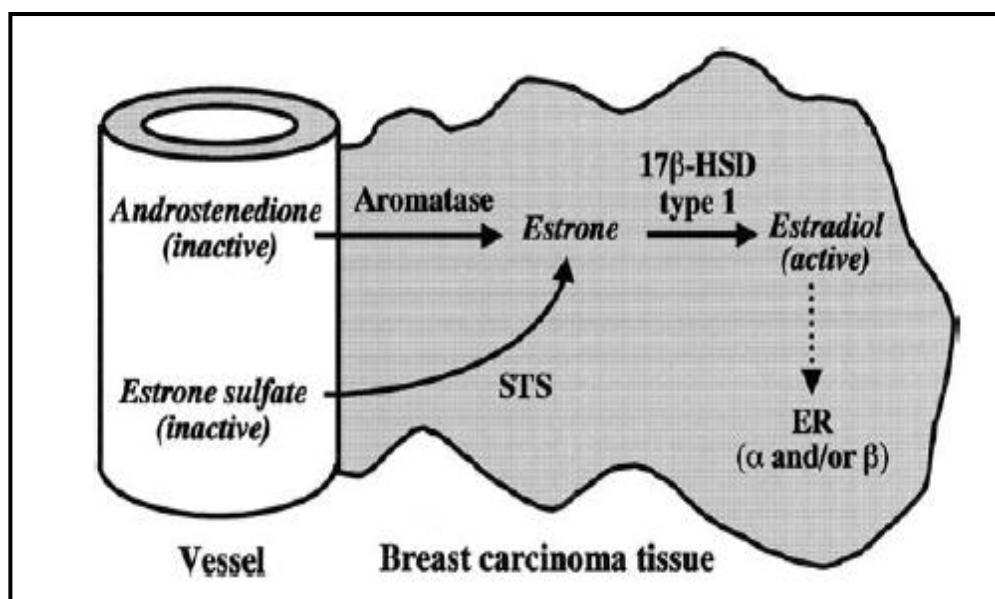


Figura 7 - Mecanismo intracrina da síntese de estrogénios no cancro da mama humano. STS, esteróide sulfatase; 17 $\beta$ -HSD tipo 1, 17 $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 1 e ER, receptor de estrogénios. Adaptado da literatura [33].

### 3.1.2. Tratamento clássico do cancro da mama

Para que o tratamento do cancro seja o mais eficaz possível, é fundamental conhecer o mais possível sobre a doença. Pacientes com CM precoce, isto é, quando a doença se limita à mama e aos gânglios linfáticos locais, são geralmente submetidos a terapias sistémicas e locais, para diminuir o risco de recorrência e aumentar a possibilidade de cura. A terapia local pode incluir qualquer uma das formas de mastectomia, parcial ou total, e a radioterapia. Em pacientes que se sujeitaram à mastectomia, também se pode recomendar radioterapia, com base no tamanho do tumor, no número de gânglios linfáticos positivos, entre outros fatores. A terapia adjuvante sistémica consiste principalmente na quimioterapia “clássica”, na terapia hormonal e na terapia biológica, com base na extensão da doença e nas características tumorais [45].

Tradicionalmente, o estado dos recetores hormonais tem sido a principal característica usada na prática clínica para decidir qual a melhor forma de tratamento do CM metastizado. Tumores com recetores de estrogénio (ER) ou de progesterona (PR) positivos, são normalmente tratados através da terapia endócrina, enquanto que pacientes com recetores hormonais negativos são tratados com quimioterapia ou anticorpos como o

trastuzumabe. Outras características importantes incluem a taxa de crescimento do tumor (tumores de crescimento lento são tendencialmente tratados através da terapia endócrina, enquanto que em tumores agressivos recorre-se à quimioterapia), o local e a expansão da propagação das metástases pelas vísceras, assim como o estado geral do doente [46].

### 3.1.3. Tratamento do cancro da mama através da terapia hormonal

Ao longo dos anos, tem sido feita muita pesquisa sobre a biossíntese e o mecanismo de ação das hormonas esteroides, os quais auxiliam a identificação de potenciais moléculas alvo nas células que podem ser usadas para prevenir ou tratar o CM. Contudo, ainda se encontra em curso uma longa investigação acerca dos fármacos com o máximo de benefícios e com o mínimo de riscos. Neste contexto, existem diferentes abordagens terapêuticas para o tratamento do CM hormono-dependente [47]. A terapia endócrina do cancro baseia-se em, pelo menos, um dos seguintes princípios: privação de hormonas pela inibição da sua biossíntese ou favorecimento da remoção/inativação da hormona produzida pelo tecido; antagonismo hormonal através da aplicação de fármacos que se ligam e inibem os recetores das hormonas esteroides; interferência hormonal pela aplicação de elevadas doses de hormonas que atuam através de mecanismos diretos, ou através de mecanismos de *feedback* negativo, inibindo o crescimento do tumor (figura 8) [48].

Como já foi referido anteriormente, o tratamento adequado para cada tipo de CM também se baseia no *status* dos ER, isto é, se são negativos ou positivos. A maioria dos CM são ER<sup>+</sup> e dependem dos estrogénios para o seu crescimento e replicação, logo a terapia que se poderia adequar melhor para estes tipos de CM é a administração de antiestrogénios. As abordagens de tratamento mais habituais atualmente envolvem a utilização de moduladores seletivos dos recetores de estrogénios (SERMs) ou inibidores da biossíntese de estrogénios, especificamente, inibidores da aromatase (AIs) [49].

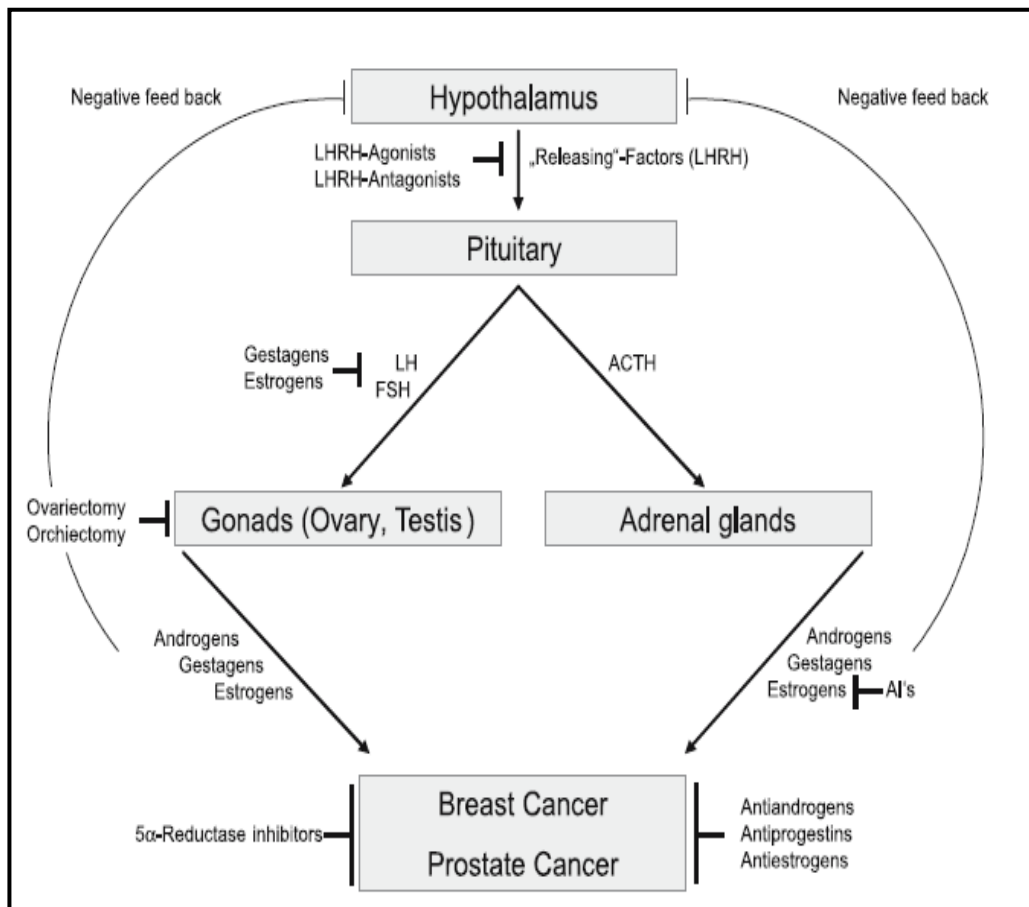


Figura 8 - Ciclo de *feedback* endócrino. Adaptado da literatura [48].

### -Administração de antiestrogénios

Os efeitos observados depois da ooforectomia cirúrgica e a descoberta das hormonas esteroides, assim como dos seus recetores, conduziram ao conceito de que a inibição da função dos recetores das hormonas esteroides por antagonistas pode evitar o crescimento do tumor [48]. A primeira estratégia de ação para o tratamento de CM sensíveis a estrogénios, é geralmente o uso de antiestrogénios. Os antiestrogénios são agentes químicos que se ligam aos ER, inativando um dos passos envolvidos na sua função (por exemplo o complexo recetor-antiestrogénio heterodimérico não é formado ou não induz a transcrição do mRNA) [50].

A introdução do conhecido antiestrogénio tamoxifeno alterou o tratamento do CM em todas as fases, sendo o método de escolha não só para as mulheres pós-menopáusicas, mas também como forma de prevenção em mulheres com elevado risco de desenvolverem CM

[48]. O tamoxifeno tem-se mostrado um agente hormonal crucial para o tratamento adjuvante do CM, reduzindo o risco de recorrência em 41% e a mortalidade por CM em 34% [51].

Os moduladores seletivos dos ER, que podem incluir o tamoxifeno, são compostos sintéticos que têm a capacidade de atuarem como agonistas dos estrogénios nuns tecidos (ossos, fígado e sistema cardiovascular) e como antagonistas noutros (glândulas mamárias e cérebro), enquanto que no útero podem atuar como agonistas e antagonistas.

Actualmente existem diversos SERMs (figura 9), divididos em várias gerações em função da relação benefício/risco, que foi sendo melhorada ao longo do tempo. O tamoxifeno é o protótipo e pertence à primeira geração [48]. O ICI 164,384 e o fulvestrant (ICI 182,780) representam a primeira geração dos antiestrogénios puros com estrutura esteróide, com actividade desestabilizadora ER (figura 10). Estes compostos são análogos do 17 $\beta$ -estradiol, substituídos na posição 7 $\alpha$ .

Estudos recentes demonstraram que o uso contínuo do tamoxifeno pode levar à quimioresistência do tumor [51], daí a necessidade em desenvolver combinações de terapias seletivas para o tratamento do CM, ou mesmo de terapias alternativas.

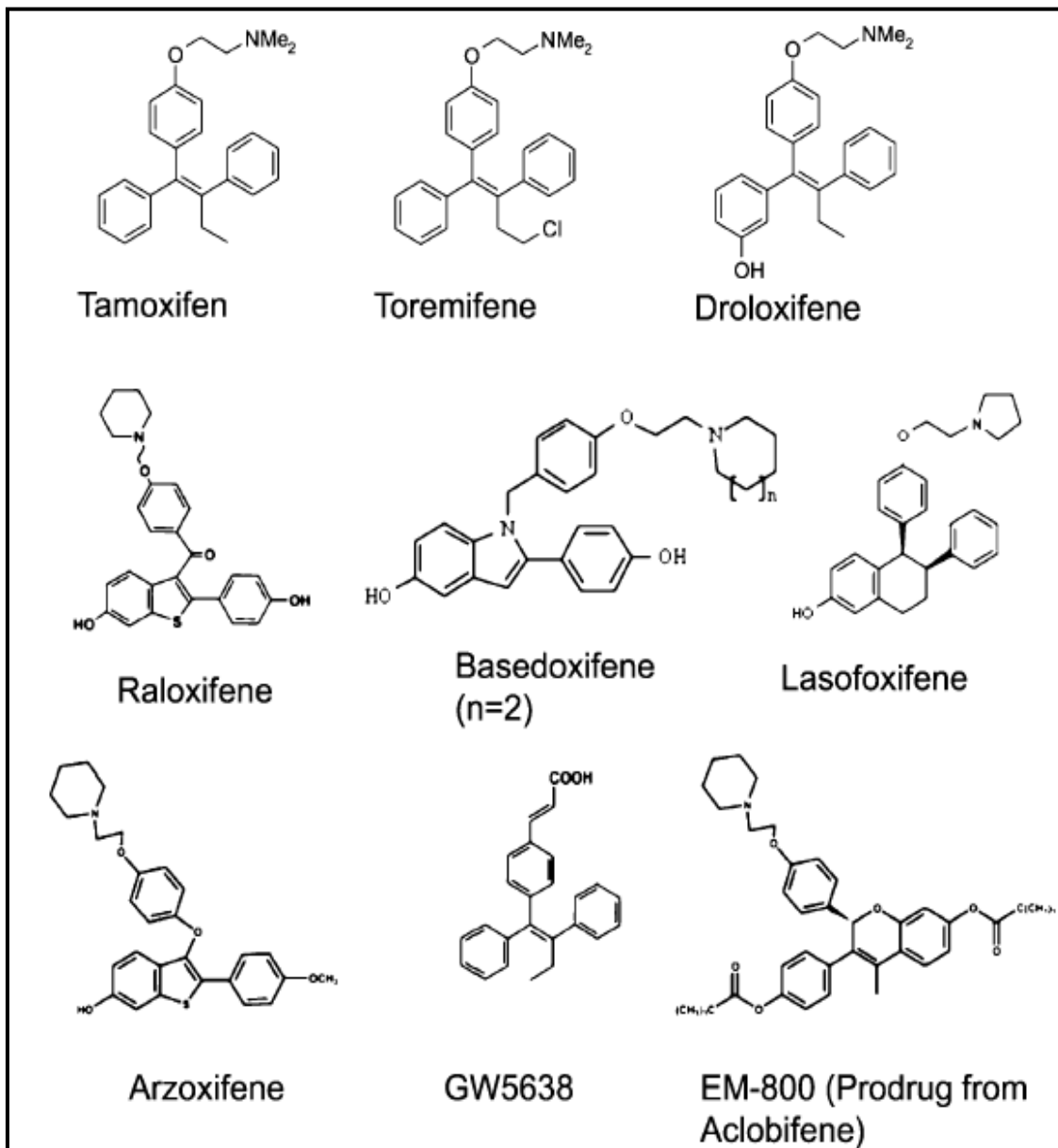


Figura 9 - Estrutura química da primeira e segunda geração dos antiestrogénios não-esteróides (tamoxifeno e os seus derivados) e a nova terceira geração (arzoxifeno e lasofoxifeno) de SERMs. Adaptado da literatura [48].

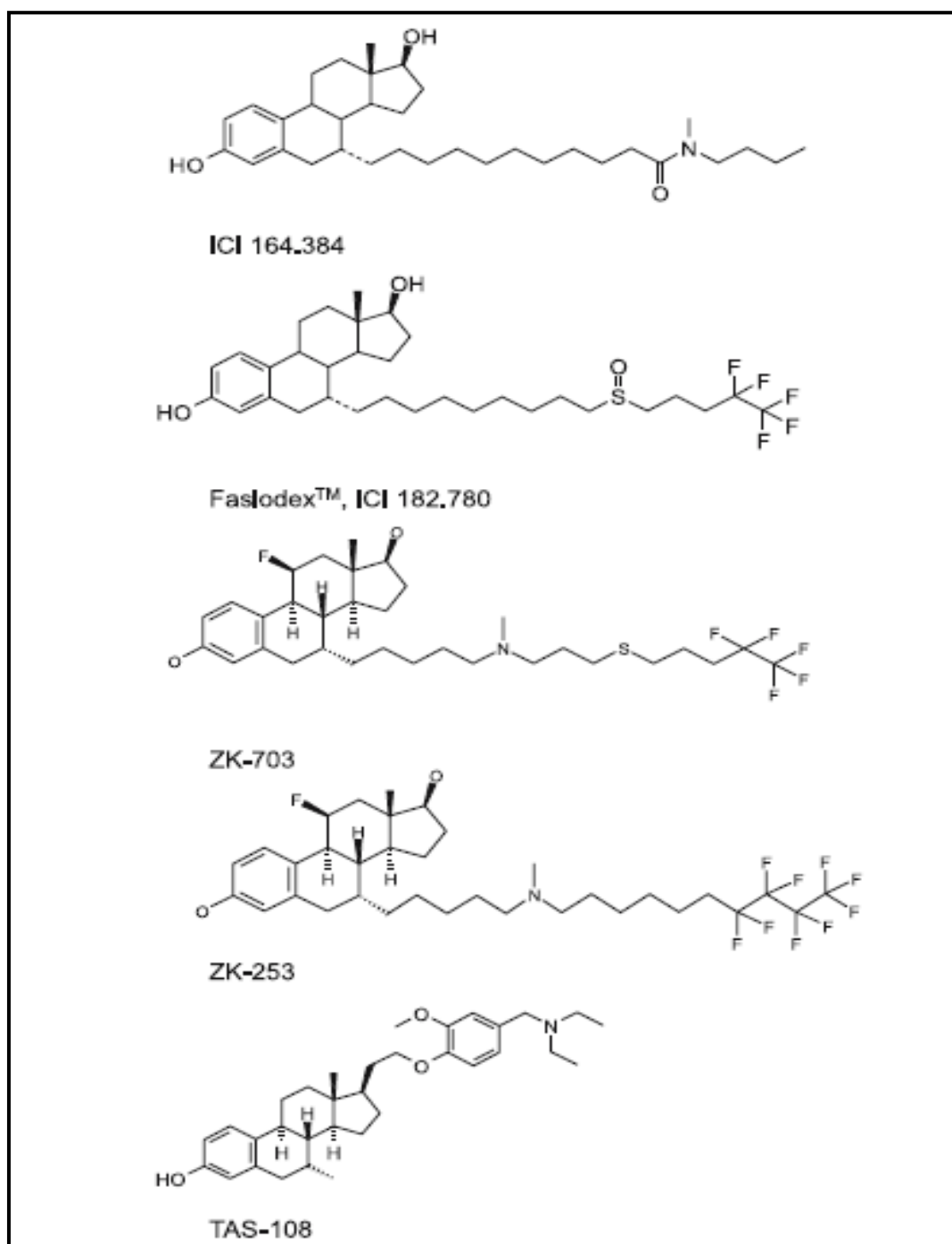
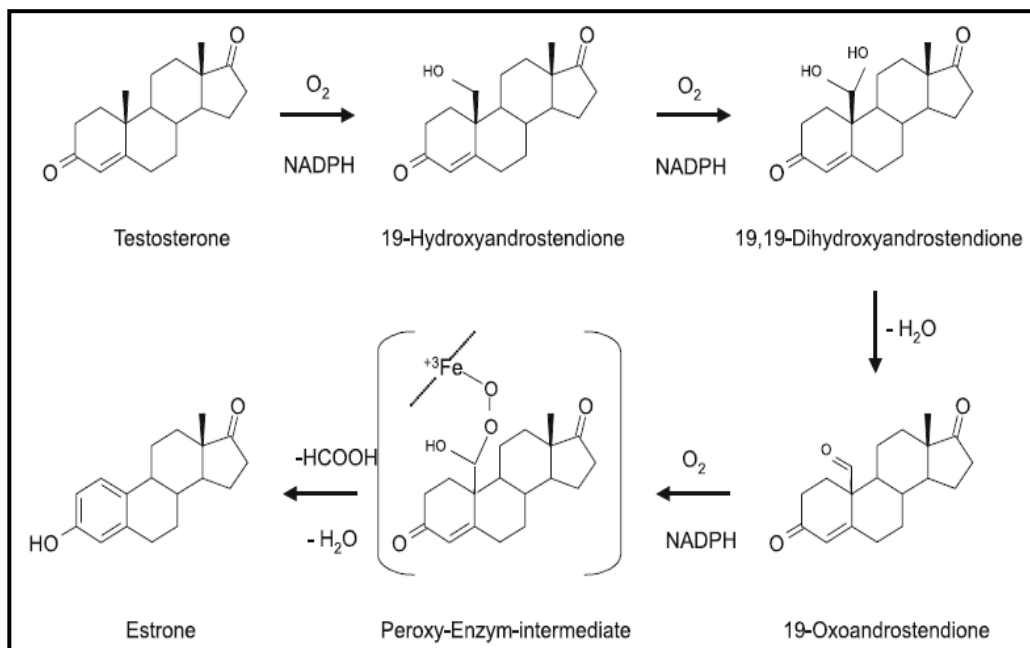


Figura 10 - Estrutura química dos antiestrogênicos esteroides. Adaptado da literatura [48].

## -Inibidores da aromatase (AIs)

Para além da administração de antiestrogénios, a redução dos níveis de concentração de estrogénios nos tumores através do uso de inibidores de enzimas, representa a segunda forma de ação da hormonoterapia no CM. Uma abordagem para interferir com a sinalização do ER consiste na redução dos níveis de  $E_2$  através da inibição da enzima aromatase. A aromatização é o passo final da síntese do  $E_2$ . Esta reacção é catalisada pelo complexo monooxigenase aromatase P450 (CYP19) que está presente no retículo endoplasmático liso da placenta e nas células da granulosa dos folículos ovarianos. Através de três reacções de hidroxilação, a  $E_1$  e o  $E_2$  são sintetizados a partir dos seus precursores, AD e testosterona, respectivamente (figura 11).



**Figura 11** - Reações enzimáticas que conduzem à aromatização (exemplificada para a estrona). Adaptado da literatura [48].

A aromatase encontra-se nos tecidos periféricos, incluindo o tecido adiposo, fígado, músculos, cérebro e tecidos do CM. No período peri-menopáusico, os ovários, como resultado da perda completa dos folículos primordiais, cessam a produção de estrogénios. Este fenómeno conduz ao declínio da produção de  $E_2$  nos ovários, no entanto as concentrações séricas de  $E_2$  podem variar consideravelmente. Em mulheres pós-menopáusicas, a concentração plasmática dos níveis de  $E_2$  é de aproximadamente 20 pmol/L, e a maioria de  $E_2$  é formado pela conversão periférica extra-gonadal da testosterona. Como a atividade periférica da aromatase aumenta com a idade, a produção periférica de estrogénios aumenta

para o dobro, sendo a  $E_1$  o estrogénio predominante nestas mulheres. Os tecidos do CM contêm todas as enzimas responsáveis pela biossíntese local do  $E_2$  a partir de precursores circulantes. Os Als podem, portanto, inibir a síntese de estrogénios *in situ*, tanto nos tecidos do CM como nos tecidos adjacentes não-malignos, isto é, nos tecidos adiposos.

Os Als competitivos consistem em compostos químicos que competem com o substrato para a ligação não-covalente do local ativo da enzima, para diminuir a quantidade de produto formado. A aminoglutetimida foi o primeiro AI estudado em pacientes com CM sendo, por conseguinte, referido como primeira geração de AI. Devido à sua inibição inespecífica, esta possui efeitos secundários severos, daí a procura e o desenvolvimento ter sido direcionado para Als de segunda geração (tipo imidazole: fadrozole) e de terceira geração (tipo triazole: vorozole, anastrozole, letrozole) (figura 12).

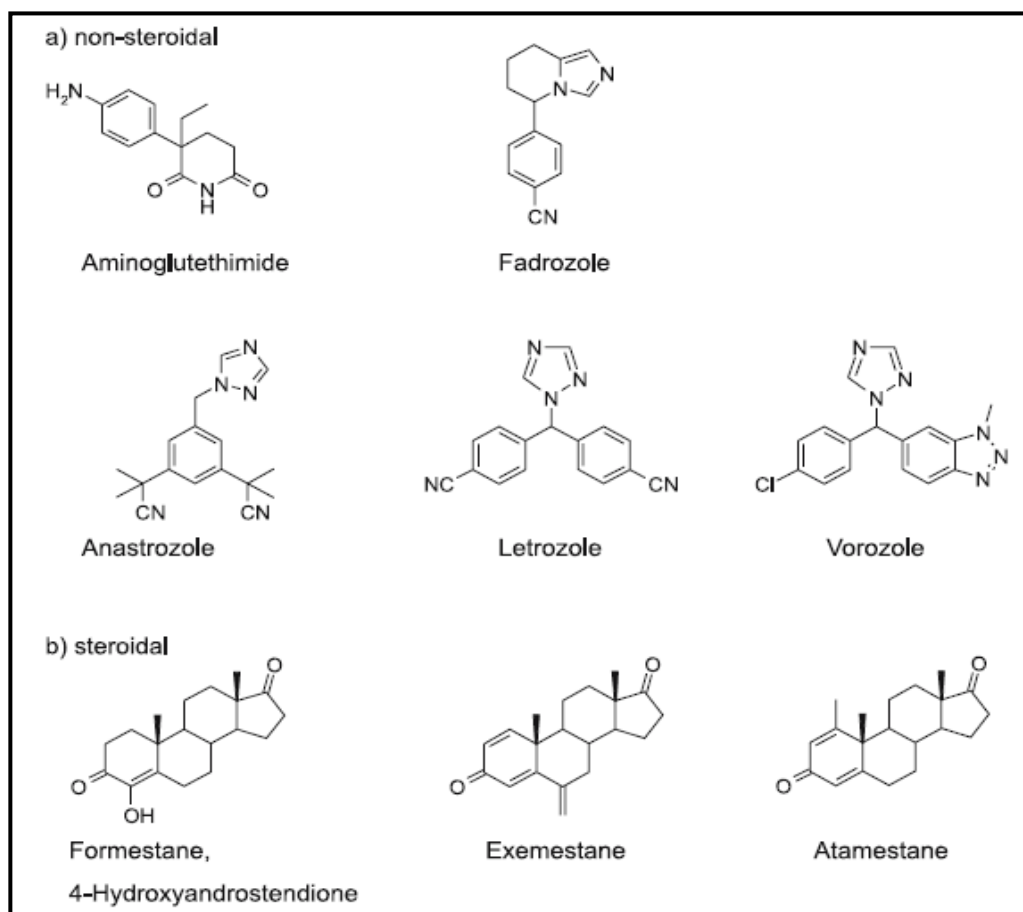


Figura 12 - Estruturas químicas dos inibidores da aromatase. Adaptado da literatura [48].

Os AIs esteroides foram sintetizados usando como ponto de partida, a estrutura da AD. Estes inibidores ligam-se à aromatase da mesma forma que o substrato AD. A maioria dos inibidores esteroides são inibidores irreversíveis e como exemplo temos o 4-hidroxiandrostenodiona, o exemestano e o atamestano (figura 12). Estes inibidores irreversíveis possuem diversas vantagens, tais como: são altamente específicos para a enzima, produzem inibição prolongada e exibem baixa toxicidade.

Outros inibidores conhecidos da aromatase são, por exemplo, os flavonóides. Estes inibem a enzima, através da diminuição da biossíntese e dos níveis circulantes de estrogénios. Os flavonóides abrangem as flavonas, isoflavonas, flavanonas e flavonóis, com um sistema de anéis benzopirranonas como esqueleto principal. O desenvolvimento de flavonóides sintéticos, análogos da cromona ou da xantona, com atividade inibitória da aromatase permitiu a identificação de diversos compostos potentes e seletivos. De um modo geral, as flavonas e flavanonas são inibidores mais potentes, comparativamente às isoflavonas.

Em resumo, os AIs são uma alternativa à terapia endócrina para o tratamento do CM em estado avançado e estudos clínicos têm demonstrado que estes são superiores ao tamoxifeno, tanto no tratamento de primeira linha como na quimioterapia neoadjuvante [48].

## 3.2. Cancro da próstata

Actualmente, o cancro da próstata (CP) é o tumor maligno mais comumente diagnosticado e a segunda principal causa de morte, relacionada com cancros em homens, nos Estados Unidos. Com base em estimativas de 2010, mais de 200.000 novos casos de CP serão diagnosticados e mais de 30.000 homens morrerão desta doença anualmente [52]. O CP, tal como a maior parte dos cancros, desenvolve-se como resultado de uma mistura de fatores genéticos e epigenéticos ambos podendo ser afetados por fatores ambientais [53]. Entre os fatores já conhecidos como importantes para o desenvolvimento de CP destacam-se a idade, a história familiar e a etnia [52, 53].

### 3.2.1. Desenvolvimento do cancro da próstata

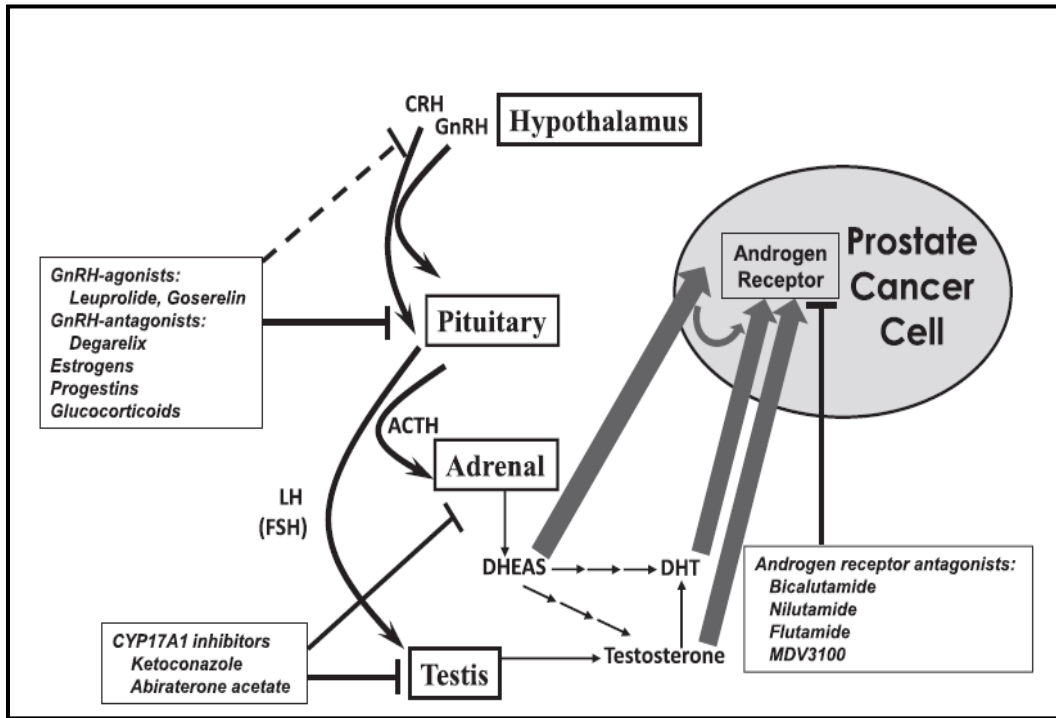
No interior do epitélio da próstata, morfológicamente, existem duas populações de células: as células luminais colunares altas, que revelam atividade secretora, e as células basais esticadas, que aderem à membrana basal. O epitélio da próstata, na sua totalidade, deriva de uma população de células estaminais que possuem um longo período de vida e uma capacidade proliferativa ilimitada, residentes no interior do compartimento da célula basal. A duplicação de células estaminais dá origem a uma cópia de células estaminais (auto-renovação) e a células progenitoras com um tempo de vida relativamente curto, e com

capacidades proliferativas limitadas. Pela proliferação transitória, esta população de células amplifica o epitélio da próstata, resultando eventualmente em células terminais diferenciadas, que estão destinadas a sofrer apoptose. Este modelo está em conformidade com o conceito de hierarquia das células estaminais dos tecidos de auto-renovação, como a pele e os tecidos. As perturbações da diferenciação das células estaminais têm sido propostas, além de outros factores, como estando envolvidas no conceito patogénico da hiperplasia benigna da próstata e da carcinogénese da próstata [54].

Os avanços no tratamento e no rastreio do CP permitiram a deteção destes tumores numa fase precoce, quando a doença ainda pode ser curável por meio de excisão cirúrgica ou radioterapia. Estes tratamentos têm um bom prognóstico no caso do CP localizado, o que não se tem verificado num estado avançado da doença [55].

### 3.2.2. Conversão periférica de hormonas (fonte de androgénios)

O crescimento e a progressão do CP é frequentemente estimulado pelos androgénios, através da sua ação em AR. No homem, a biossíntese dos androgénios, testosterona e DHT, o seu metabolito mais potente, está dependente de um mecanismo complexo e regulável que envolve o hipotálamo, a hipófise anterior, os testículos, as glândulas supra-renais, a próstata, a pele e vários tecidos esteroideogénicos como o muscular e o adiposo (figura 13). Os androgénios assim produzidos medeiam uma série de respostas fisiológicas e eventos relacionados com o desenvolvimento do homem, sendo particularmente importantes na diferenciação sexual *in utero* e na expressão das características sexuais secundárias na puberdade [55]. Os principais órgãos produtores de androgénios são os testículos (nas células de Leydig) e as glândulas supra-renais (*zona reticularis*). Os primeiros são responsáveis por cerca de 90-95% dos androgénios do organismo, sendo as glândulas supra-renais responsáveis pelos restantes 5-10% na forma de precursores desses androgénios (DHEA e AD) [56]. Estes precursores são depois metabolizados em tecidos esteroideogénicos e na próstata para originarem os androgénios testosterona e DHT. A hormona libertadora da hormona luteinizante (LHRH) hipotalâmica estimula a hipófise anterior a produzir LH que por sua vez atua nos testículos e estimula a síntese dos androgénios (figura 13) [57].



**Figura 13** - Eixos adrenais-pituitária-hipotálamo e testiculares e mecanismos de inibição farmacológicos. As linhas com extremidade plana indicam a ação inibitória, as linhas a tracejado significam que são os esteroides e não análogos da GnRH, que atuam no hipotálamo. As setas mais escuras indicam estimulação, as setas finas indicam a produção ou síntese e as setas mais largas (cinzentas) indicam ativação do recetor. Adaptado da literatura [57].

### 3.2.3. Tratamento do cancro da próstata através da terapia endócrina

Dentro dos principais androgénios, a testosterona e DHT, a testosterona é o mais abundante na circulação sistémica e o DHT é o que tem maior afinidade para o AR. Os efeitos dos androgénios resultam da ligação ao AR. O AR é um membro da superfamília de recetores esteroides e nucleares, que funciona como um fator de transcrição dependente de um ligando, e cujos níveis de expressão mais elevados ocorrem na próstata, glândulas supra-renais e epidídimo. O AR também existe no tecido muscular esquelético, no fígado e no sistema nervoso central. Os androgénios ligam-se ao AR e desencadeiam uma série de eventos que resultam na síntese de proteínas específicas como o antigénio específico da próstata (PSA) e no despoletar da proliferação celular [58, 59].

As principais abordagens terapêuticas para o tratamento do CP incluem a remoção cirúrgica através da prostatectomia e da radioterapia (principalmente se o tumor se confina ao órgão) ou à terapia endócrina (principalmente se o tumor atravessa a cápsula). Um dos maiores problemas no tratamento do CP que não se confina ao órgão é que as terapias com o tempo tendem a ser apenas paliativas. Para o tratamento do CP metastizado ou localmente

avançado, as únicas terapias com alguma efetividade são as que interferem com as ações dos androgénios ou a quimioterapia “clássica”.

A maioria dos CP são dependentes de androgénios, pelo que a remoção destes resulta na inibição da proliferação do tumor. A maioria das terapias que têm como alvo os AR baseiam-se na depleção dos ligandos, através da redução dos níveis séricos de testosterona por meio da orquiectomia, da utilização de análogos da LHRH, de inibidores da CYP17, de elevadas doses de estrogénios e do bloqueio dos AR.

Com o passar do tempo (meses) acaba por ocorrer a progressão de tumores da próstata para a independência de androgénios que pode ter vários motivos: activação dos AR por androgénios residuais nas células tumorais sensíveis a androgénios; ARs mutantes ativados por outras hormonas esteroides endógenas; ativação do AR independente do ligando por vias de transdução de sinais mediadas por fatores de crescimento; eficácia insuficiente de antiandrogénios (figura 14). Deste modo, o bloqueio completo de todas as funções do AR, pelos antiandrogénios desestabilizadores dos AR, representa uma importante opção de terapêutica para o tratamento do CP.

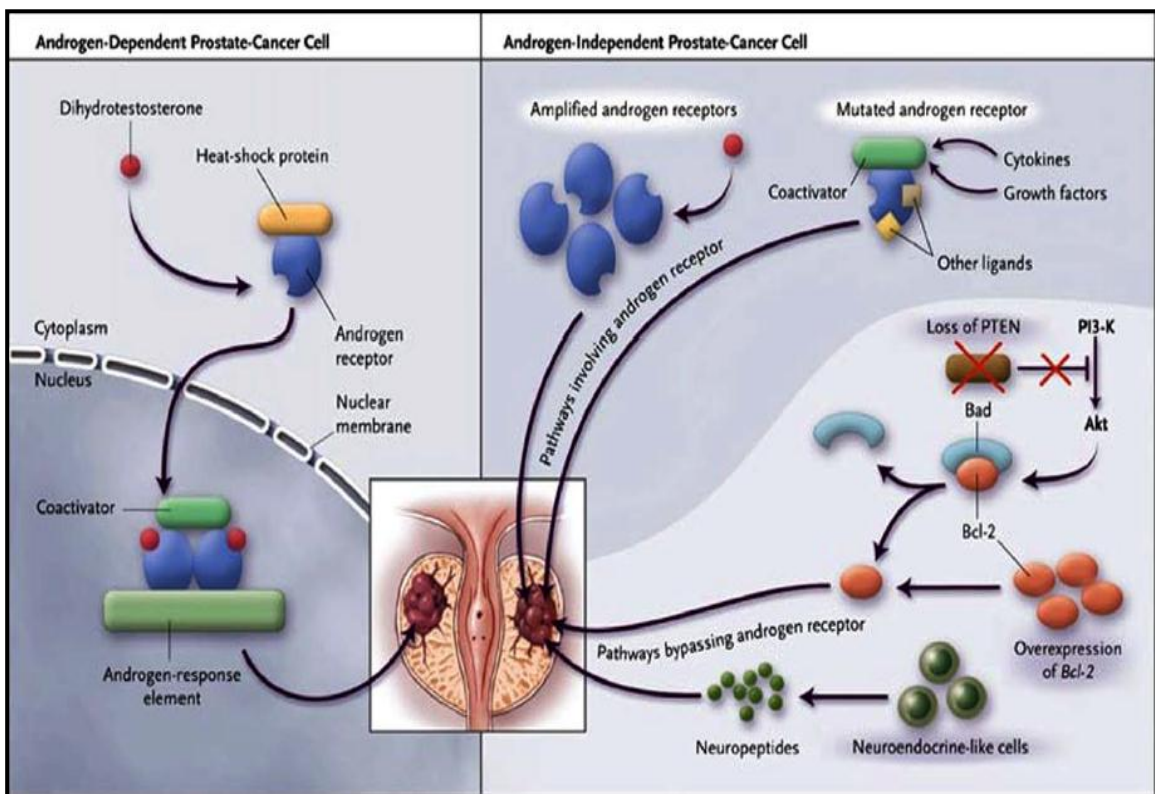


Figura 14 - Mecanismo de resistência à castração no cancro da próstata. Adaptado da literatura [50].

Ao longo dos anos, tem-se tentado desenvolver antiandrogénios altamente potentes que bloqueiem completamente os efeitos mediados pelos AR.

A biologia e a relação estrutura-atividade dos antagonistas dos ARs têm sido discutidas em muitos artigos de revisão. Com base nas suas estruturas, os antagonistas dos AR podem-se classificar em esteroides e não-esteroides. Alguns compostos esteroides têm sido usados como antiandrogénios, como por exemplo o acetato ciproterona (CPA). O CPA é uma progestina que suprime a libertação de gonadotropina (diminuindo os níveis de testosterona), liga-se ao AR e inibe o crescimento das células do CP. Também foram desenvolvidos ligandos não-esteroides que possuem elevada especificidade para o AR, têm boa biodisponibilidade oral e atingem seletivamente os tecidos alvo. Os antiandrogénios não-esteroides desenvolvidos e mais conhecidos são a bicalutamida, a flutamida e a nilutamida (figura 15).

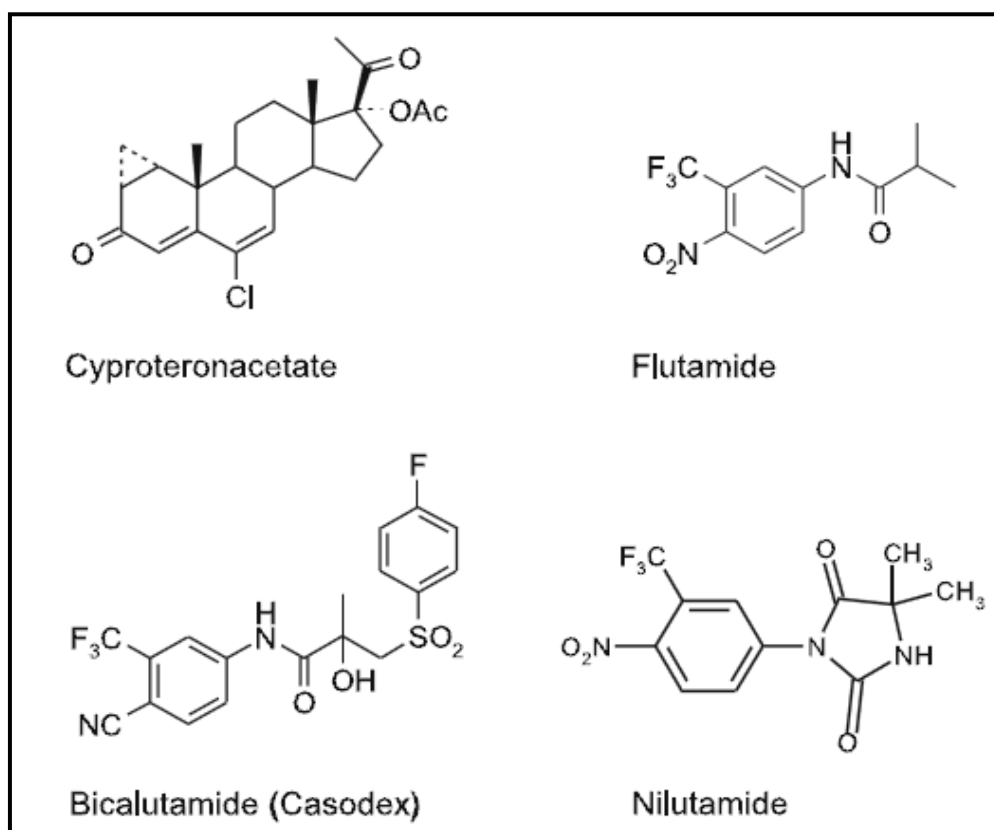


Figura 15 - Estrutura química dos antiandrogénios. Adaptado da literatura [48].

Ao contrário do CPA, estes toluides são considerados antiandrogénios puros, porque possuem pouca, ou nenhuma, atividade androgénica intrínseca quando ligados ao AR e não reagem de forma cruzada com qualquer um dos outros recetores esteroides. Como tal, os

antiandrogénios não-esteroides são principalmente usados no tratamento de CP sensíveis a androgénios ou na hiperplasia benigna da próstata [48].

Recentemente foi introduzida na terapêutica do CP uma nova molécula, o acetato de abiraterona, que atua inibindo a biossíntese de androgénios inibindo a enzima CYP17, e que mostrou resultados promissores no tratamento de tumores resistentes à castração e após tratamento com docitaxel [60].

#### 4. Esteroides estrogénicos com potencial ação antitumoral

Os esteroides da série estrano podem desempenhar muitos efeitos nos sistemas biológicos, sendo, em muitos casos, reguladores fisiológicos [61]. A presença de diferentes grupos funcionais no núcleo tetracíclico fundido, característico deste grupo de compostos, é que explica o facto de estes interagirem com diferentes alvos no organismo humano desempenhando, por isso, diversas ações biológicas [62]. Deste modo, não é surpreendente que após pequenas modificações ou sínteses parciais, os derivados esteroides possam ser úteis como fármacos contra um grande número de doenças, como por exemplo o cancro e a osteoporose [61].

Inicialmente o presente trabalho de investigação tinha como objetivo o desenvolvimento de inibidores da 17 $\beta$ -HSD 1 mediante a funcionalização (especialmente por oxidação) de estrogénios esteroides, assim como a sua avaliação biológica, através do estudo da sua capacidade de inibição enzimática e da sua citotoxicidade em três tipos diferentes de células. Como já referido, a 17 $\beta$ -HSD 1 é uma enzima importante para a produção de E<sub>2</sub> a partir de E<sub>1</sub>, gerada pela via da aromatase e da sulfatase. Esta enzima é responsável pela redução da cetona em C17 da E<sub>1</sub> ao grupo 17 $\beta$ -hidroxilo, usando NADPH como cofator (figura 16) [63].

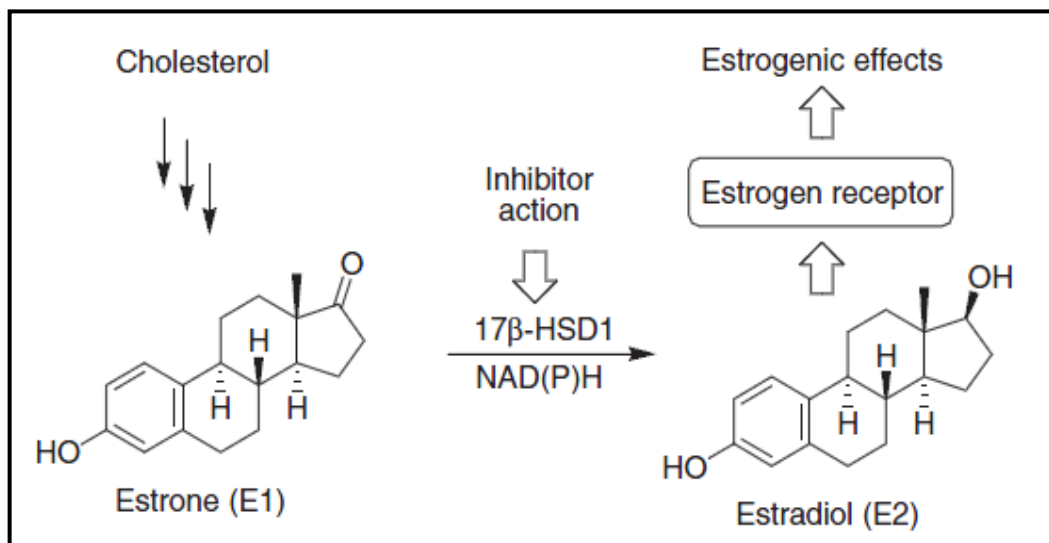


Figura 16 - Papel da 17 $\beta$ -HSD 1 na síntese do potente estrogénio, E<sub>2</sub>. Adaptado da literatura [64].

A importância da atividade da 17 $\beta$ -HSD 1 no desenvolvimento e crescimento do tumor da mama é evidenciada por níveis de E<sub>2</sub> intratumorais elevados. Além disso, apesar da conversão de E<sub>1</sub> em E<sub>2</sub> ter sido observada tanto na mama humana normal como em tumores malignos mamários, a atividade redutora é superior em tumores do que no tecido mamário normal.

Assim, justifica-se o interesse em desenvolver potentes inibidores do tipo 1 da 17 $\beta$ -HSD para reduzir a formação local de E<sub>2</sub> no tumor mamário [12]. A elucidação da estrutura cristalina desta enzima melhorou substancialmente o *design* de inibidores, e a avaliação da relação estrutura-atividade (SAR), assim como a compreensão do modo de ligação da enzima ao esteroide [63]. Existem diversas classes estruturais de inibidores da 17 $\beta$ -HSD 1 que genericamente podem dividir-se em esteroides e não-esteroides [65, 66, 67]. Estes inibidores, de acordo com o seu mecanismo de ação, podem também ser agrupados em três classes: compostos que competem com o cofator (NADPH) para o local de ligação; compostos que competem com o substrato natural, sendo a maioria compostos esteroides, e compostos híbridos [66]. Para a avaliação da inibição da atividade enzimática usam-se, normalmente, homogeneizados de células HEK-293 transfetadas com a enzima em causa, células T-47D, células MCF-7 também transfetadas e a fração citosólica da placenta humana, calculando-se a quantidade de E<sub>1</sub> transformada em E<sub>2</sub> [64]. De acordo com o método usado, a capacidade de inibição apresenta-se normalmente ou sob a forma de percentagem ou através do valor de IC<sub>50</sub> (concentração de composto que inibe a atividade enzimática em 50%). Os compostos considerados potentes são caracterizados por um IC<sub>50</sub> baixo, idealmente inferior ao da E<sub>1</sub>. No desenvolvimento destes compostos também interessa avaliar a estrogénicidade dos compostos, usando-se, para isso células sensíveis a estrogénios, tais como as T-47D, ZR-75-1 e MCF-7 [68], pois os compostos a desenvolver, além de potentes inibidores enzimáticos, também devem ter baixa atividade estrogénica, isto é, não devem ter ação agonista dos ER (que podem contrariar o seu efeito inibidor da 17 $\beta$ -HSD 1).

Os derivados da E<sub>1</sub> e do E<sub>2</sub> revelaram ser potentes inibidores da enzima 17 $\beta$ -HSD 1, embora os derivados da E<sub>1</sub> apresentem melhor capacidade inibitória do que os derivados da E<sub>2</sub>, devido ao grupo carbonilo no carbono 17. Com base nos estudos de SAR, verificou-se, no anel A, que substituições na posição 2 reduzem a atividade estrogénica (ex: 2-etil e 2-metoxi), assim como substituições com grupos hidrofóbicos pequenos. Neste contexto, também foi demonstrado que o grupo hidroxilo na posição 3 é importante para a interação com a enzima [66].

No anel B salientou-se a importância de substituintes com configuração  $\beta$  para uma boa atividade inibitória [65, 66] e, no anel C, apesar das substituições descritas para este serem raras, quando efectuadas, foram-no em conjunto com substituições no anel D (carbonos 15, 16 e 17) [65].

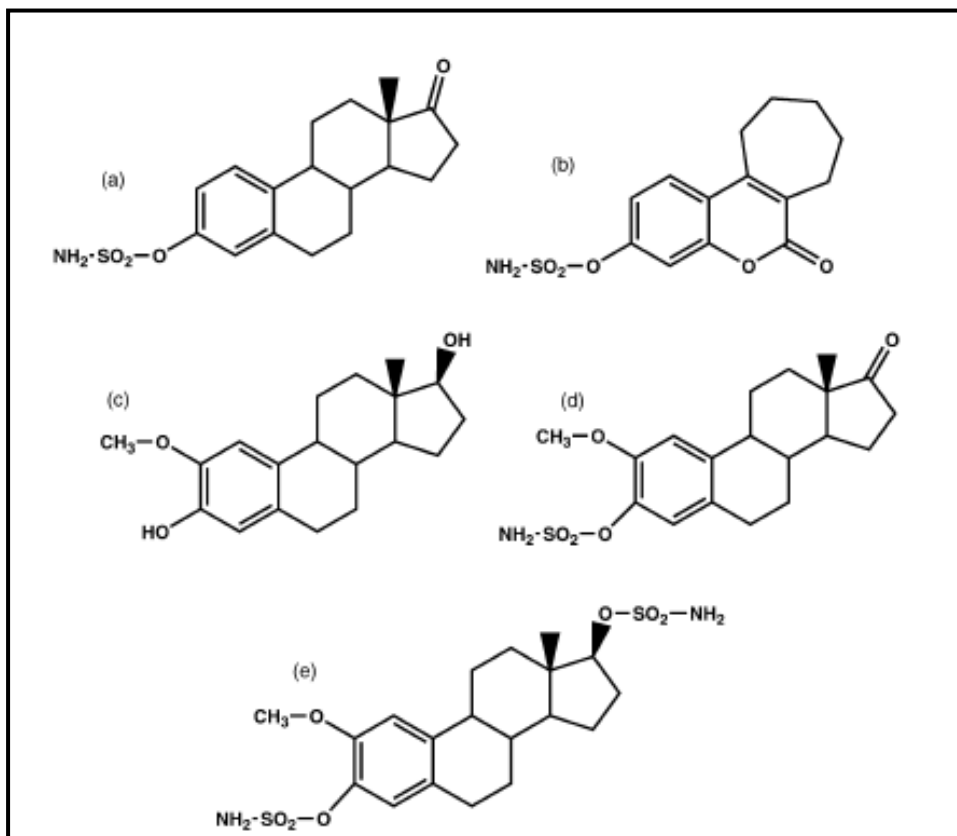
De todos os anéis, o anel D é o que mais habitualmente é funcionalizado e na série C15, os melhores inibidores têm grupos amida, ésteres, carbonilos, álcoois, éteres, entre outros, em combinação com substituintes adequados no C2 e C3.

Substituições no C16 são as mais comuns e incluem, nomeadamente, inibidores irreversíveis, especialmente os  $\beta$ -substituídos. Além disso, podem apresentar atividade dupla: a de inibidores da 17 $\beta$ -HSD 1 e antagonistas dos ER.

Os inibidores esteroides com anel E heterocíclico derivados da E<sub>1</sub>, que contêm anéis de cinco ou seis membros, nomeadamente pirazóis substituídos na posição C5', mostraram ser inibidores potentes e seletivos desta enzima [65, 66].

Adicionalmente, derivados da D-homoestrone (anel D de seis membros) com grupos feniletil e alilo na posição 2, revelaram também ser potentes inibidores da 17 $\beta$ -HSD 1 [65, 69, 70, 71]. Foi com base neste tipo de estruturas que se gerou a ideia inicial deste trabalho, que consistiu no desenvolvimento de D-homoesteroides análogos destes (17 $\alpha$ -oxa-D-homoesteroides), obtidos de forma mais simples - pela reacção de Baeyer-Villiger, explorando adicionalmente funcionalizações do núcleo esteróide nos anéis A (posição 2) e C (que está pouco explorada neste contexto).

Como já foi referido ao longo deste trabalho, o desenvolvimento de inibidores enzimáticos para bloquear a síntese de estrogénios, parece ser uma abordagem promissora para o tratamento de cancros hormono-dependentes. Nesse sentido existem os Als, já usados na prática clínica, e a via da esteroide sulfatase que também contribui para a produção de E<sub>2</sub> ao nível do tumor. Além disso, a esteroide sulfatase (STS) é ainda responsável pela formação de DHEA a partir da DHEA-sulfato. A redução posterior da DHEA dá origem ao androstenediol (Adiol). Apesar do Adiol ser um androgénio, este pode ligar-se aos ER e também estimular o crescimento de células cancerígenas *in vitro* e *in vivo*. A produção de Adiol é independente da via da aromatase, mas dependente da via da sulfatase. Portanto, para além da inibição da via da aromatase, a inibição da via da sulfatase, também tem um potencial considerável interesse terapêutico. A identificação de um farmacóforo ativo requerido para a inibição da STS, isto é, um *O*-sulfamato ligado a um anel aromático, levou à síntese e avaliação biológica de derivados esteroides e não-esteroides inibidores desta enzima. Neste estudo, o EMATE (figura 17) foi identificado como o inibidor irreversível da STS mais potente, ativo no local dirigido.



**Figura 17** - Estrutura da (a) estrona-3-O-sulfamato (EMATE), (b) 6-oxo-8,9,10,11-tetrahidro-7H-ciclohepta-[c][1]benzopirano-3-O-sulfamato (667 COUMATE), (c) 2-metoxiestradiol (2-MeOE2), (d) 2-metoxiestrona-3-O-sulfamato (2-MeOEMATE), (e) 2-metoxiestradiol-3,17-O-O-bis-sulfamate (2-MeOE2bisMATE).

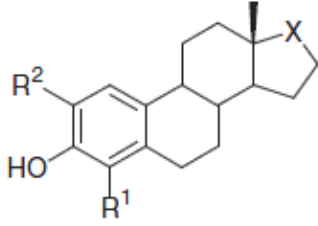
Estudos efetuados *in vivo* com este composto, mostraram, contudo, que este é altamente estrogénico, sendo cinco vezes mais potente, em aplicação oral, que o etinilestradiol. Esta investigação levou à identificação de sulfamatos coumarínicos tricíclicos, como por exemplo o 667 COUMATE, que é não-estrogénico e ainda ativo *in vitro* e *in vivo*, sendo a capacidade deste em inibir *in vivo* a STS equivalente à do EMATE, inibindo-a igualmente de forma irreversível. No âmbito do desenvolvimento de inibidores da STS, foram ainda sintetizados e testados esteroides não-estrogénicos, análogos ao EMATE, modificados no anel A, sendo o composto líder neste estudo o 2-metoxiestrona-3-O-sulfamato (2-MeOEMATE). As principais razões para a síntese deste composto foram:

a) atividade antiproliferativa associada ao 2-metoxiestradiol (2-MeOE2), que é um metabolito endógeno do E<sub>2</sub> conhecido por suprimir o crescimento do tumor e inibir a angiogénese;

b) as substituições na posição 2 do núcleo esteroide reduzem a estrogenicidade associada com o composto precursor. Quando testado em células cancerígenas do cancro da mama (MCF-7), o 2-MeOEMATE revelou ser um agente antiproliferativo até mais potente que o 2-MeOE2.

Os mecanismos exatos através dos quais o 2-MeOE2 e o 2-MeOEMATE exercem os seus efeitos ainda são pouco conhecidos, no entanto mostrou-se que o 2-MeOE2 se liga ao local da colchicina da tubulina inibindo a taxa de polimerização da tubulina *in vitro*. Os potentes efeitos inibitórios do crescimento, a atividade anti-microtubulina e as propriedades inibitórias da STS levou a que Raobaikady *et al.* [72] avaliassem os efeitos antiproliferativos do composto 2-metoxiestradiol-3,17-bis-sulfamato (2-MeOE2bisEMATE), comparando a sua potência com o 2-MeOE2, com o EMATE e com o 667 COUMATE. Neste estudo conclui-se que o 2-MeOEMATE induziu a paragem do ciclo celular na fase G2-M, fosforilação do Bcl-2 e apoptose nas células MCF-7, sendo até mais potente que o 2-MeOE2. Como agente antiproliferativo, verificou-se que o 2-MeOE2bisEMATE era mais potente que o 2-MeOE2. O EMATE e o 667 COUMATE, que não possuem um grupo metoxi, não tiveram qualquer efeito na proliferação celular, o que sugere que a substituição metoxi na posição 2 do núcleo esteroide é um pré-requisito estrutural essencial para os compostos apresentarem propriedades antiproliferativas. Outro ponto interessante de notar, é que substituições 2-metoxi na E<sub>1</sub> ou E<sub>2</sub>, reduzem fortemente a estrogenicidade dos compostos parentes. Assim, foi identificado o 2-MeOE2bisEMATE, que embora seja derivado do EMATE e, tal como o 2-MeOE2, também apresenta atividade antiproliferativa relevante. Como a maioria dos cancros acabará por se tornar resistente a agentes hormonais, ainda é necessário o desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas. Assim, tendo em vista as propriedades antiproliferativas e antiangiogénicas associadas ao 2-MeOE2, estes derivados sulfamoidados devem possuir eficácia melhorada, biodisponibilidade e longa duração de ação e, mais importante ainda, duplo mecanismo de ação, isto é, como inibidores da STS, indutores da apoptose e agentes anti-microtubulina, para potencial uso terapêutico para o tratamento de cancros hormono-dependentes e não-dependentes [72].

Num outro estudo, Phan e colaboradores [73] analisaram modificações no anel A dos esteroides de onde se concluiu que a 2-nitroestrone (IC<sub>50</sub> = 17 µM) e o 2-bromoestrone (IC<sub>50</sub> = 40 µM) revelaram ser melhores inibidores da STS do que a própria estrone (IC<sub>50</sub> = 51 µM), enquanto que os derivados da estrone 4-hidroximetil, 4-aminoetil, 4-amino e 4-vinil revelaram ser fracos inibidores. Substituintes na posição 4 da estrone, tais como Br, CN, F ou NO<sub>2</sub> aumentam significativamente a potência inibitória (figura 18), sendo a 4-nitroestrone o melhor inibidor nesta série com um IC<sub>50</sub> de 2.4 µM [73].



Compound	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	X	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>
5	CHO	H	C=O	1.5 μM (K <sub>i</sub> )
15	CHO	H	C(OH)Bn (β)	85 nM (K <sub>i</sub> )
E1	H	H	C=O	51
17	CH <sub>2</sub> OH	H	C=O	ND <sup>b</sup>
18	CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	H	CHOH (β)	ND <sup>c</sup>
19	NH <sub>2</sub>	H	CHOH (β)	ND <sup>d</sup>
20	CH=CH <sub>2</sub>	H	C=O	ND <sup>e</sup>
21	CO <sub>2</sub> H	H	C=O	215
22	Br	H	C=O	4.8
23	F	H	C=O	3.3
24	CN	H	C=O	6.7
25	NO <sub>2</sub>	H	C=O	2.4
26	NO <sub>2</sub>	H	CHOH (β)	2.8
12	H	NO <sub>2</sub>	C=O	17
27	NO <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub>	C=O	26

<sup>a</sup> Errors are ±5%. ND – not determined.  
<sup>b</sup> 46% inhibition at 50 μM.  
<sup>c</sup> 4% inhibition at 50 μM.  
<sup>d</sup> 43% inhibition at 50 μM.  
<sup>e</sup> 45% inhibition at 50 μM.

**Figura 18** - Inibição da sulfatase com derivados da estrona substituídos na posição 4. Adaptado da literatura [73].

Dado o interesse da inibição desta enzima, ao longo dos anos foram sendo desenvolvidos vários outros inibidores e genericamente, nos compostos esteroides, têm sido favorecidas as substituições nas posições 2, 3 e 4 do anel A e a funcionalização do anel D de estrogénios, incluindo alguns D-homoesteroides para a inibição da STS. De destacar o potencial inibitório desta enzima pelo composto 17a-oxa-D-homoestrone-3-O-sulfamato que é estruturalmente próximo a alguns compostos a estudar nesta dissertação [74, 75].

Como referido acima, o 2-MeOE2 tem sido estudado ao longo dos anos, tendo revelado elevado interesse como agente antitumoral em diversos tipos de tumores, incluindo tumores da próstata e da mama. Actualmente, este composto encontra-se em Fase III de ensaios clínicos como agente antitumoral. Assim, não é de admirar que nos estudos de relação estrutura-atividade se tenham estudados vários análogos deste composto tendo em vista, não

só diversificar as moléculas com este potencial, mas também desenvolver potenciais futuros fármacos com melhor binómio eficácia/segurança. Destes estudos surgiram vários estrogénios funcionalizados nas posições 2, 3 e 17 do E<sub>2</sub> que, além de inibirem de forma potente a polimerização da tubulina, também revelaram actividades antiproliferativas extremamente interessantes em vários tipos de linhas celulares tumorais [76, 77].

De acordo com o descrito acima fica claro que a funcionalização do anel C dos estrogénios está relativamente pouco explorada. Neste âmbito, uma forma fácil de funcionalizar esse anel, nomeadamente no E<sub>2</sub>, foi a utilização de nitrato de cério e amónio (CAN), obtendo-se os correspondentes derivados 9 $\alpha$ -hidroxilados,11 $\beta$ -nitratos. Apesar dos compostos obtidos terem actividade estrogénica (podendo ser interessantes em terapia hormonal de substituição e em contraceptivos orais), podem ser utilizados como intermediários sintéticos, inclusivamente para obter antiestrogénios [78]. Apesar desta acção estrogénica, Rzhiznikov et al. [79] avaliaram as propriedades antitumorais destes compostos em modelos *in vivo* de cancro da mama. A principal razão para tal estudo, é o facto dos nitratos esteroides gerarem óxido nítrico, um agente conhecido por produzir ação citotóxica. Os compostos sintetizados incluem derivados da E<sub>1</sub>, do acetato de estrona, diacetato oxima, e os derivados do etinilestradiol. Os autores concluíram que para os derivados da estrona numa fase inicial havia acção antitumoral, mas que ao fim de 15 dias observava-se estímulo do crescimento tumoral, associado, possivelmente à referida ação estrogénica. Apenas para o derivado do etinilestradiol se observou ação antitumoral mesmo ao fim de 15 dias de exposição [79].

No contexto de esteroides estranos com potencial interesse biológico surge também o derivado não aromático 10 $\beta$ -hidroxi-3-quinona da estrona, estando reportado, entre outras atividades, como sendo citotóxico contra algumas linhas celulares (linhas celulares leucémicas e também foi testado na atividade antiviral, como no caso do HIV) [80] estando também implicado em mecanismos de proteção anti-oxidante [81]. Sendo uma estrutura não-aromática, espera-se que a sua (bio)química seja substancialmente diferente da dos outros estrogénios catecólicos. Nesse estudo, determinaram que o quinol não tinha afinidade para os ER, ou seja, este derivado quinol não tem ação estrogénica significativa [82].

As lactonas esteroides no anel D possuem também importantes atividades biológicas, entre as quais, anticancerígenas, antibacterianas e androgénicas [83]. Como exemplo temos a testolactona (figura 19) que foi o primeiro esteroide usado no tratamento clínico do cancro da mama e retirado do mercado há alguns anos atrás. Mais recentemente foi reportada a sua atividade como AI, o que levou alguns autores a estudar a sua síntese. A principal estratégia para a obtenção destes compostos biologicamente ativos é através da oxidação de Baeyer-Villiger (BV) [84].

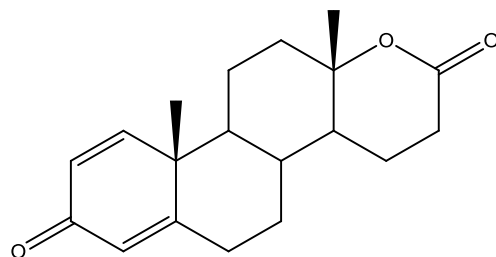


Figura 19 - Testolactona.

Neste contexto, Djurendić *et al.* sintetizaram alguns compostos na série androstano designadamente 17-oxa-D-homo lactonas 17a-substituídas com o sistema 3 $\beta$ -hidroxi-5-eno, 3-ceto-4-eno e 3-ceto-1,4,6-trieno, e lactonas D-homo com função epóxido. Estes compostos epóxidos esteroides foram sintetizados com o objetivo de estudarem as suas atividades citotóxicas contra várias linhas celulares (MCF-7, MDA-MB-231 e PC3). As principais conclusões desse estudo foram que a função epóxido no anel A e B, assim como no anel D-lactonizado, têm um efeito favorável na atividade citotóxica dos derivados androstanos. Os compostos mais ativos foram os representados na figura 20, os quais exibiram elevada citotoxicidade contras as linhas celulares PC3 e MDA-MB-231 [85].

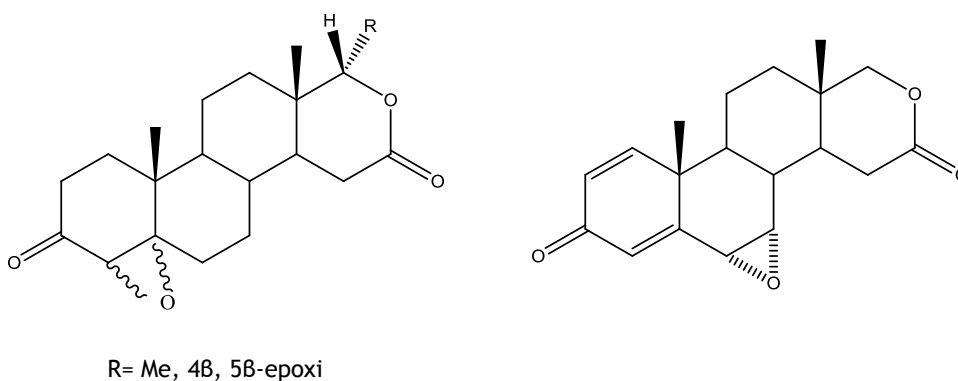


Figura 20 - Compostos mais ativos da série androstano. Adaptado da literatura [85].

Assim, tendo em consideração o descrito acima, nesta dissertação será explorada a funcionalização química dos anéis A, C e D da estrona (ou do seu derivado 3-acetilado), pretendendo-se obter compostos com potencial acção anticancerígena em tumores hormono-dependentes.

## 5. Objetivos

Este trabalho tem por objetivo geral a descoberta e desenvolvimento de esteroides estrogénicos com potencial atividade anticancerígena seletiva contra o cancro da mama e da próstata. Mais especificamente, os objetivos propostos são:

-Síntese de compostos esteroides estrogénicos derivados da estrona e da 17a-oxa-D-homoestrona funcionalizados nos anéis A e C, explorando, quando necessário, as condições reacionais;

-Avaliação biológica da ação citotóxica destes compostos em linhas celulares humanas de cancro da mama (MCF-7) e do cancro da próstata (LNCaP) hormono-dependentes e em fibroblastos da derme humana saudáveis (NHDF), pelo método MTT;

-Estabelecimento de relação entre estas estruturas e a atividade biológica em causa;

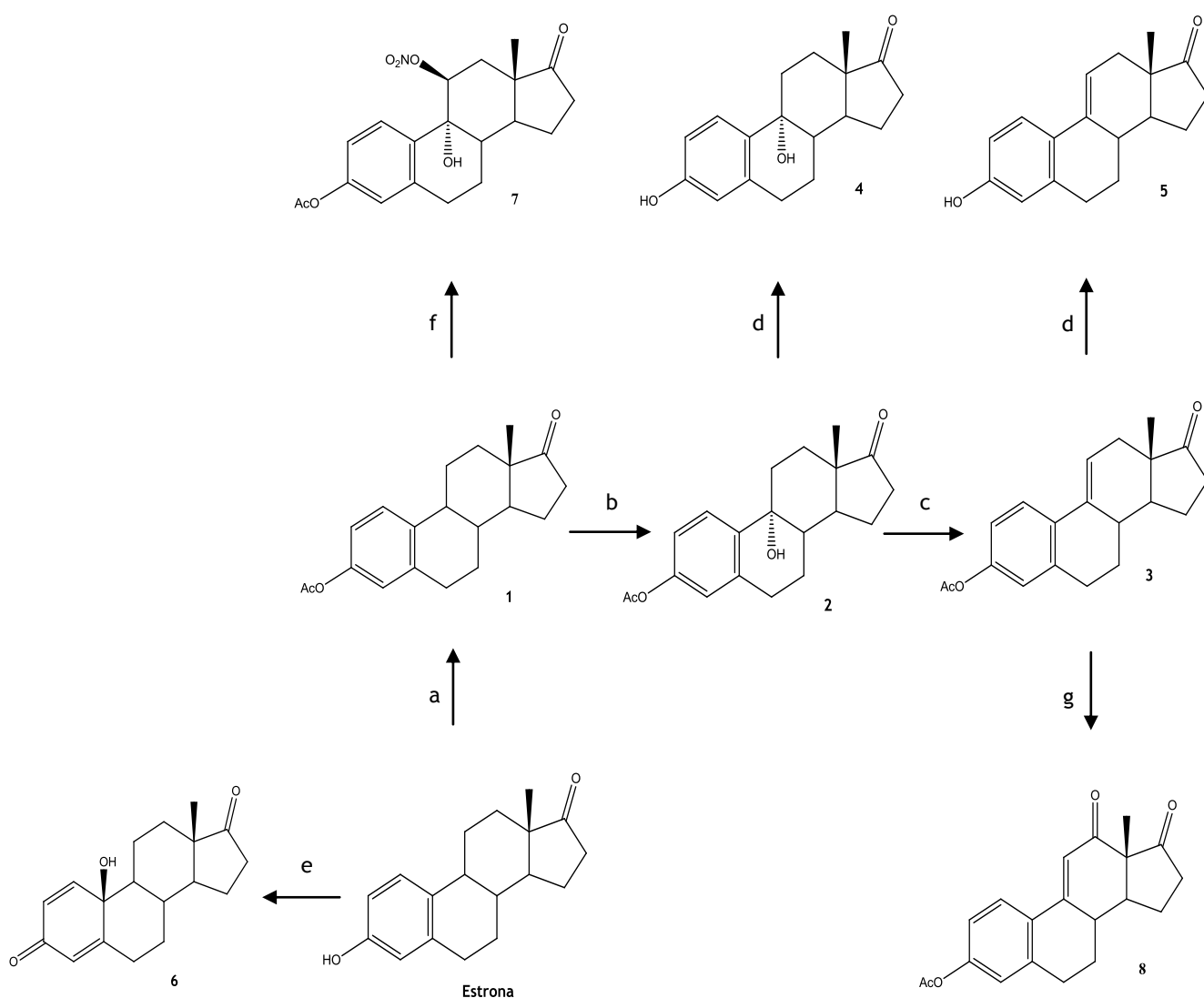
### 5.1. Estratégia de síntese

De acordo com o estudo que serviu de base ao presente trabalho, vários derivados da estrona, incluindo alguns substituídos nas posições 2 e 16 revelaram ser bons inibidores da 17β-HSD 1, potencialmente importantes no tratamento do cancro da mama. O estudo da relação estrutura-atividade foi estendido a outros esqueletos de esteroides, tal como a D-homoestrona, na qual o anel D de 5 membros da estrona é expandido a um anel de 6 membros.

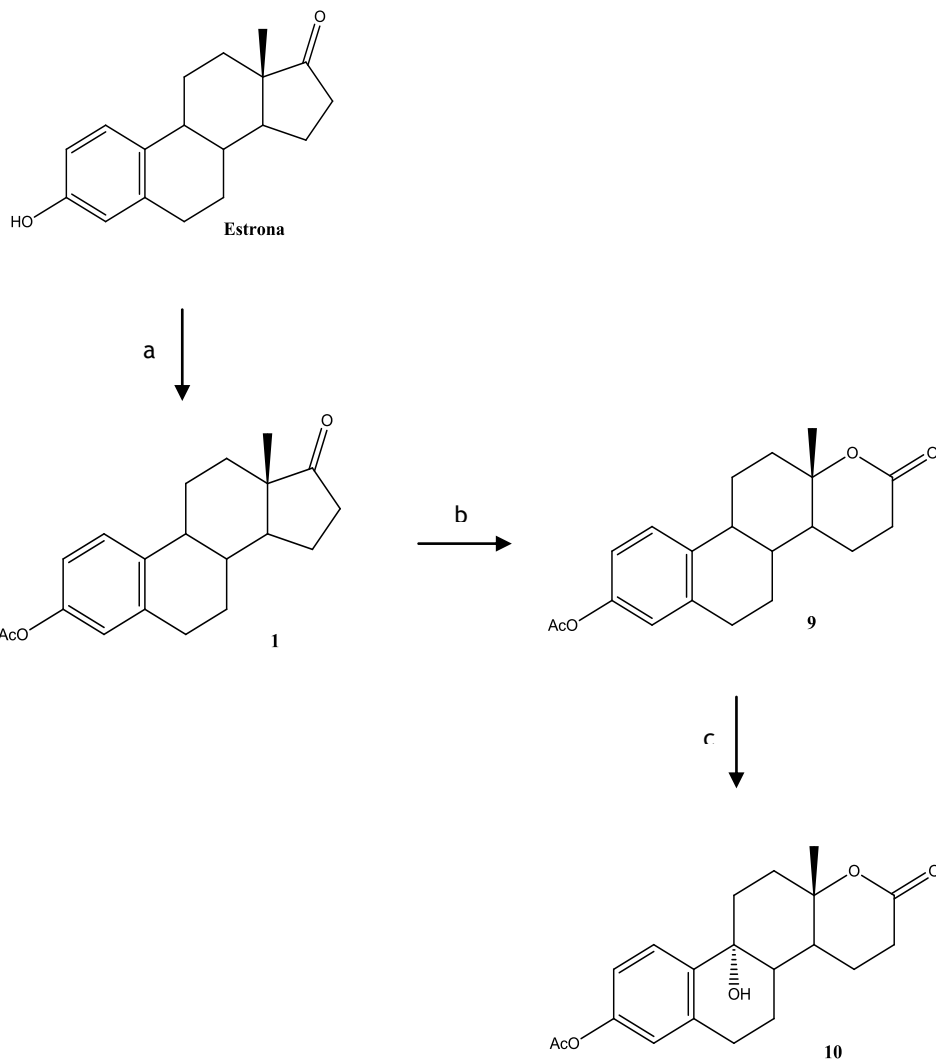
Assim, pretende-se sintetizar especialmente por oxidação da estrona compostos com estruturas análogas aos obtidos nesse estudo, para que estes sejam mais potentes e tenham baixa toxicidade e estrogenicidade. Além disso, neste trabalho pretende-se também alargar o conhecimento sobre a relação entre estas estruturas e a atividade biológica em causa explorando outras posições do esqueleto esteroide. Os derivados da D-homoestrona a serem desenvolvidos neste trabalho serão obtidos pela oxidação de Baeyer-Villiger do acetato de estrona, obtendo-se, num só passo, derivados 17a-oxa-D-homo-17-ona.

As sínteses propostas para obter os compostos neste trabalho estão indicadas nos esquemas 1 e 2, utilizando os reagentes indicados na legenda. A primeira série de compostos corresponde a derivados da estrona, sem alterações no anel D, e a segunda série são compostos resultantes da já referida oxidação de Baeyer-Villiger no anel D (esteroides 17a-oxa-D-homo-17-ona). O substrato de partida é a estrona, cujo álcool será protegido por

acetilação, formando-se o composto **1**. A protecção do grupo OH fenólico é relevante para evitar reações laterais por oxidação deste grupo perante as condições oxidativas em várias reações da síntese proposta. Este composto **1** será sujeito à oxidação benzílica/hidroxilação, formando-se o 9 $\alpha$ -hidroxilo **2**. De seguida será efectuada a desidratação, para obter o derivado  $\Delta^{9,11}$  **3**. Os produtos das duas reações anteriores serão sujeitos à hidrólise alcalina do éster, para obter os derivados 3-hidroxilados **4** e **5**, respetivamente. O derivado  $\Delta^{9,11}$  **3** será ainda sujeito a condições de oxidação alílica de forma a tentar obter-se o composto **8**. A partir da oxidação do fenol da estrona, deverá obter-se o derivado quinol **6** e, por oxidação pelo CAN, deverá obter-se o composto **7**. Através da referida oxidação de Baeyer-Villiger do acetato de estrona pretende-se obter o composto **9**, que será hidroxilado na posição 9 $\alpha$ , para se obter o composto **10**.



**Esquema 1** - a) Anidrido acético / DMAP; b) Oxone® / Acetona / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / H<sub>2</sub>O / NaHCO<sub>3</sub> / TBAHS / 15°C; c) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / -20°C; d) CH<sub>3</sub>OH / KOH; e) KMNO<sub>4</sub> / Acetato de etilo / HCl aq.; f) CAN / Ácido acético / H<sub>2</sub>O; g) BiCl<sub>3</sub> / TBHP.

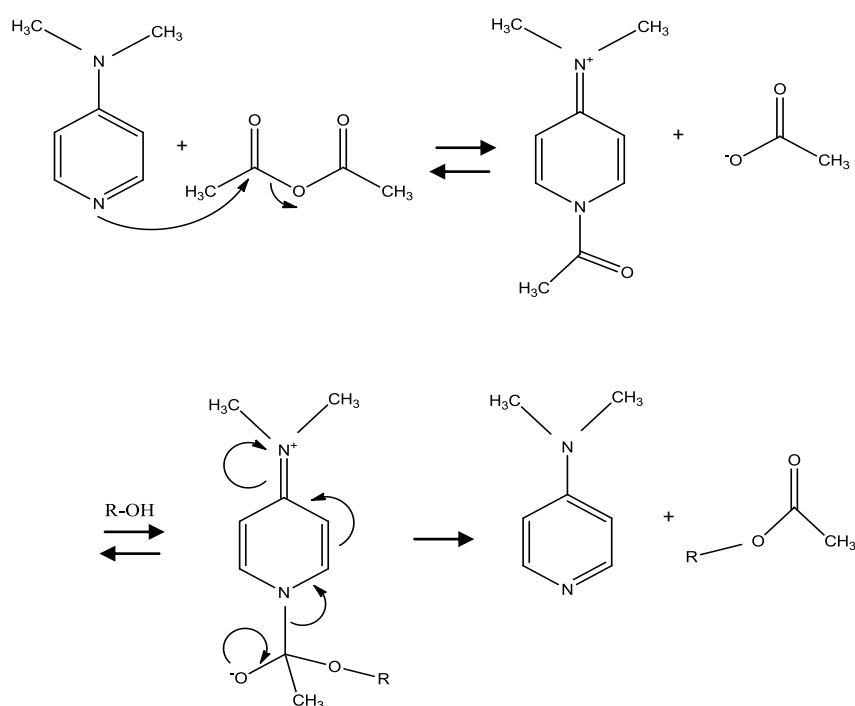


**Esquema 2** - a) Anidrido acético / DMAP; b) Ácido *meta*-cloroperoxibenzóico / THF / H<sub>2</sub>O / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; c) Oxone® / Acetona / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / H<sub>2</sub>O / NaHCO<sub>3</sub> / TBAHS / 15°C.

### 5.1.1. Acetilação

A proteção de grupos hidroxilo dos álcoois e dos fenóis na forma de ésteres é uma das transformações mais importantes e é extensamente usada em química orgânica. A proteção de tais grupos funcionais é fundamental durante o curso de várias transformações numa seqüência sintética, especialmente na construção de moléculas polifuncionais tais como esteroides e produtos naturais [86]. Os reagentes mais utilizados nesta transformação são os haletos de acilo ou anidridos. Desde a década de 60 que o 4-dimetilaminopiridina (DMAP) é conhecido como um poderoso catalisador orgânico nucleofílico [87], sendo usado sobretudo em reações de acilação mais difíceis, permitindo também obter elevadas regio- e estereosseletividades [88]. Para além disso, este composto também é útil na acilação de aminas, fenóis e enolatos, em particular na acilação de álcoois secundários ou terciários impedidos estéricamente [89].

Deste modo, o grupo hidroxilo do substrato de partida (estrona) será protegido por acetilação com anidrido acético numa reação catalisada por DMAP, pretendendo-se obter o acetato de estrona 1. O mecanismo atualmente aceite para as reações de acetilação de álcoois nestas condições envolve a formação de um catião acilpiridina por reacção do DMAP com o doador acilo (figura 21). O álcool, em seguida, reage com este intermediário, formando o éster, regenerando-se o catalisador.



**Figura 21** - Mecanismo reacional da acetilação usando como catalisador o 4-dimetilaminopiridina (DMAP).

### 5.1.2. Oxidação benzílica/Hidroxilação

A oxidação de ligações C-H benzílicas, tal como a oxidação alílica, constitui uma transformação com elevada importância em termos industriais, tendo os produtos obtidos interesse sintético para posterior transformação noutros derivados. Esta transformação consiste, habitualmente, dependendo do reagente e das condições, na conversão de grupos metilo ou metileno ligados a um anel aromático em peróxidos, álcoois, ésteres, aldeídos ou cetonas e ácidos carboxílicos [90, 91]. A oxidação selectiva nesta posição é compreensível porque o intermediário é estabilizado por ressonância com o anel aromático [91].

Os oxidantes normalmente usados neste tipo de oxidação são por exemplo o  $\text{SeO}_2$ , 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (DDQ),  $\text{HNO}_3$  diluído/bentonite e  $\text{ZnO}$ , em condições estequiométricas. Atualmente é conhecida uma grande variedade de métodos catalíticos na oxidação benzílica, sendo os peróxidos os oxidantes mais utilizados.

A oxidação benzílica selectiva de esteroides derivados de 1,3,5(10)-estratrienos, nomeadamente estrona e compostos análogos, constitui uma aplicação importante desta reação em química fina e farmacêutica. Contudo, há poucos processos conhecidos neste tipo de oxidação selectiva em esteroides e os rendimentos obtidos são geralmente baixos.

Atendendo à estrutura dos derivados esteroides da série estrano, com anel A aromático, há duas posições benzílicas suscetíveis de sofrer oxidação: a posição 6 e a posição 9 do núcleo esteroide (figura 22). No entanto, o produto pretendido deverá ser o 9 $\alpha$ -hidroxilado (geralmente é este o produto obtido, devido a impedimento estérico da face B). Dentro das metodologias conhecidas, selecionou-se para a hidroxilação na posição 9 $\alpha$  do esqueleto esteroide a utilização do oxidante Oxone<sup>®</sup> e de um catalisador de transferência de fase (TBAHS), para a obtenção do composto 2. Estas condições reacionais foram as eleitas devido à acessibilidade/disponibilidade dos reagentes e à simplicidade técnica. O mecanismo reacional deverá envolver a formação de dimetildioxirano *in situ* pela reação do Oxone<sup>®</sup> com a acetona, que deverá ser o oxidante efetivo, e posterior ataque oxidativo ao carbono terciário [92].

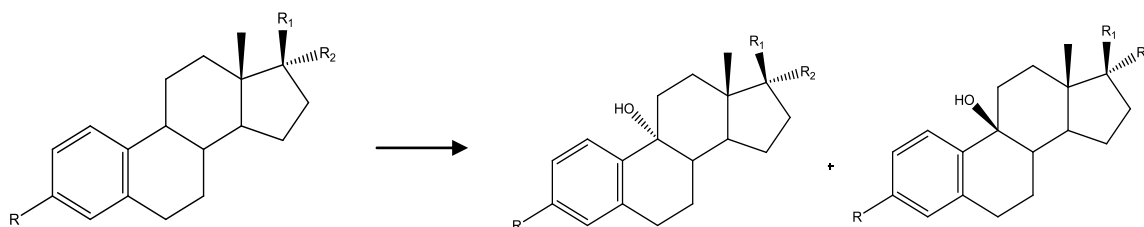


Figura 22 - Posições benzílicas suscetíveis de sofrerem oxidação. Adaptado de [92].

### 5.1.3. Desidratação

Apesar da mudança radical nas condições da reação, verifica-se que a desidratação não é fundamentalmente muito diferente da eliminação. Os álcoois podem converter-se em alcenos por desidratação - eliminação de uma molécula de água. A desidratação geralmente exige a presença de um ácido e a aplicação de calor, podendo realizar-se por um dos seguintes métodos: aquecimento do álcool com ácido sulfúrico ou fosfórico, ou passagem do vapor do álcool sobre um catalisador, normalmente a alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), a temperaturas elevadas. No nosso caso, será utilizado ácido sulfúrico, mas a reação decorrerá a  $-30^\circ\text{C}$ , pois, apesar de se reduzir a reatividade, pretende evitar-se a formação de produtos secundários, e também evitar que ocorra hidrólise ácida.

O mecanismo geralmente aceite para a desidratação dos álcoois secundários e terciários encontra-se representado na figura 23. O passo (1) é uma reação ácido-base rápida entre o álcool e o ácido catalisador, a qual origina o álcool protonado e a base conjugada do ácido. No passo (2) o álcool protonado sofre heterólise, formando o carbocátion e água. No passo (3) o carbocátion perde um protão em favor da base, produzindo o alceno [93]. Esta reação será aplicada ao composto **2**, resultando o derivado  $\Delta^{9,11}$  **3**. Segundo a literatura, estes derivados insaturados  $\Delta^{9,11}$  são também intermediários-chave na síntese de alguns compostos como por exemplo corticosteróides potentes, progestagénios e haptenos para ensaios imunológicos [92].

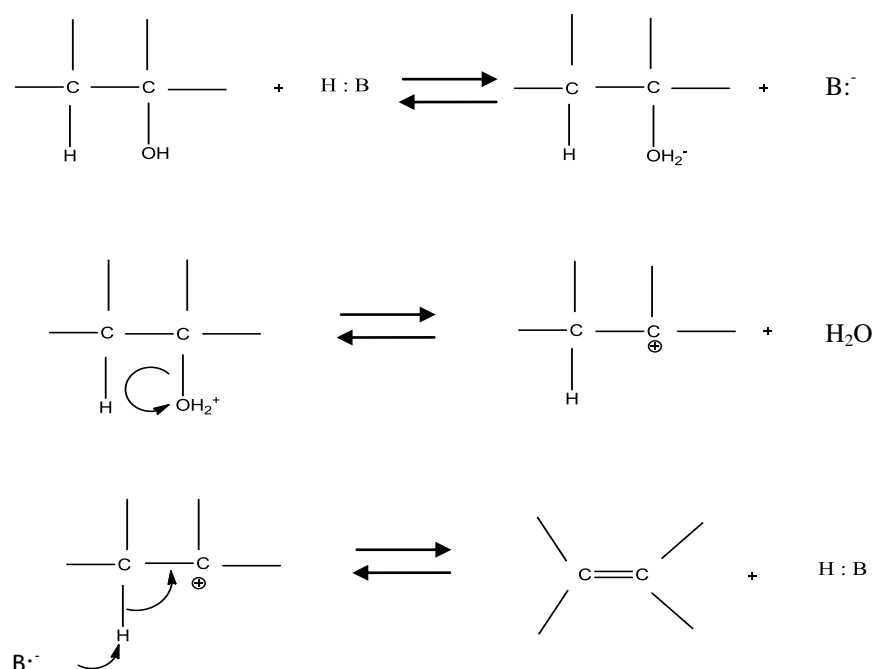


Figura 23 - Mecanismo reacional da desidratação de álcoois. Adaptado de [93].

#### 5.1.4. Hidrólise alcalina do éster

Os ésteres carboxílicos hidrolisam-se, com formação de um ácido carboxílico e de um álcool ou um fenol, quando aquecidos com soluções aquosas de ácido ou base. Em condições alcalinas obtém-se o ácido carboxílico sob a forma do respetivo sal, do qual se pode libertar, todavia, por adição de um ácido forte. As bases promovem a hidrólise dos ésteres por fornecerem um reagente fortemente nucleófilo, o OH<sup>-</sup>. Neste caso, a reação é essencialmente irreversível, visto o ião carboxilato, estabilizado por efeito de ressonância, denotar pouca tendência a reagir com o álcool (figura 24).

Na hidrólise alcalina dos ésteres a cisão ocorre por ataque nucleofílico ao átomo de carbono carbonílico pelo ião hidróxido com formação intermediária de um composto tetraédrico. A velocidade de formação do intermediário é influenciada por fatores eletrónicos e estéricos. Posteriormente regenera-se o grupo carbonilo, saindo o melhor “leaving group” [94]. Esta reação será aplicada aos compostos **2** e **3**, pretendendo obter-se os compostos **4** e **5**, respetivamente.

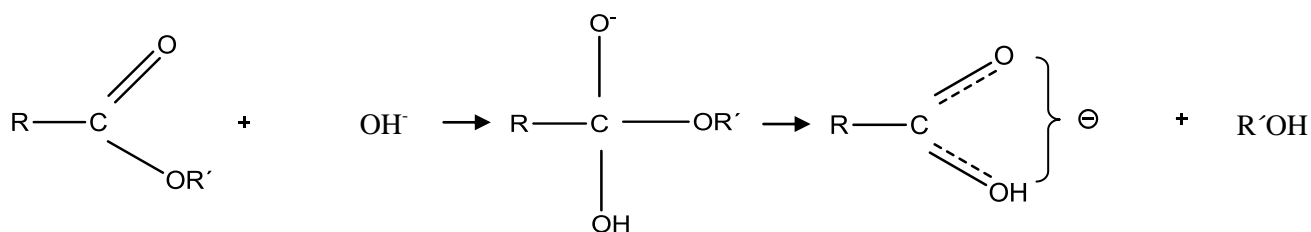


Figura 24 - Hidrólise alcalina dos ésteres. Adaptado de [94].

#### 5.1.5. Oxidação da estrona

Os processos conhecidos para a oxidação direta da estrona ou do estradiol nas correspondentes 10 $\beta$ -hidroxi-3-quinonas são escassos. O primeiro processo conhecido baseia-se na foto-oxigenação do composto fenólico na presença de Rosa Bengal como sensibilizador e de uma corrente de oxigénio. Posteriormente, foi descrita a utilização de um composto *salen* de cobalto(II) como catalisador na presença de oxigénio sob pressão, ou a irradiação do esteróide com uma lâmpada de tungsténio de 60W na presença de ácido *meta*-cloroperoxibenzóico (*m*-CPBA) e de peróxido de benzoílo como indicador radicalar. Os rendimentos reportados nestes processos são relativamente baixos, não ultrapassando 57%.

Recentemente, o 17 $\beta$ -estradiol foi seletivamente oxidado na correspondente 10 $\beta$ -hidroxi-3-quinona com permanganato de potássio (KMNO<sub>4</sub>) com um rendimento elevado, facto que nos levou a seleccionar este método.

No caso da oxidação da estrona, a hipótese mecanística mais provável envolve a abstracção do hidrogénio ligado ao oxigénio do fenol, seguida do rearranjo com formação da enona e ataque por espécies oxidantes na posição 10, pela face  $\beta$ , com formação da hidroxiquinona (figura 25) [92]. Esta reacção será aplicada à estrona, pretendendo obter-se o composto 6.

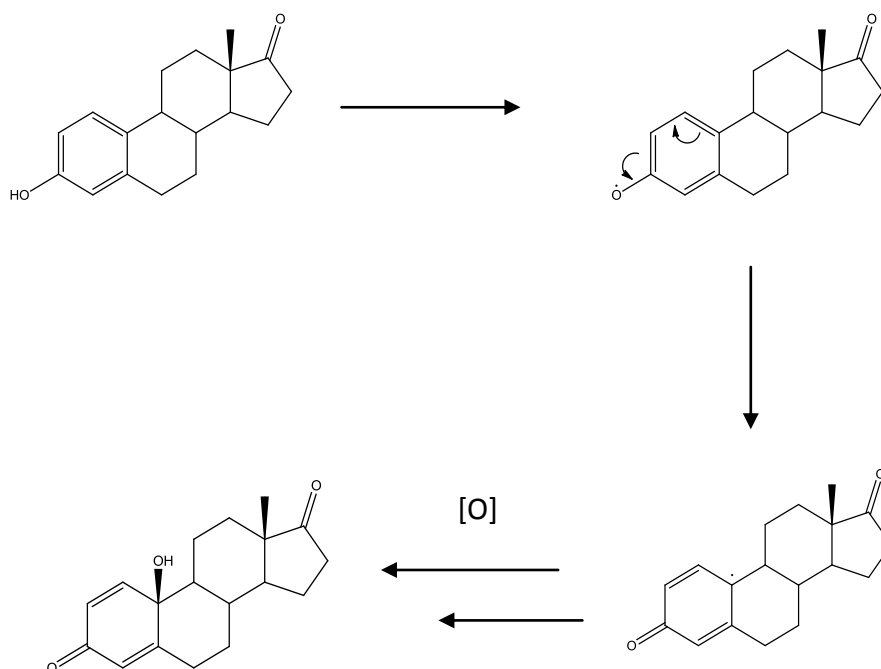
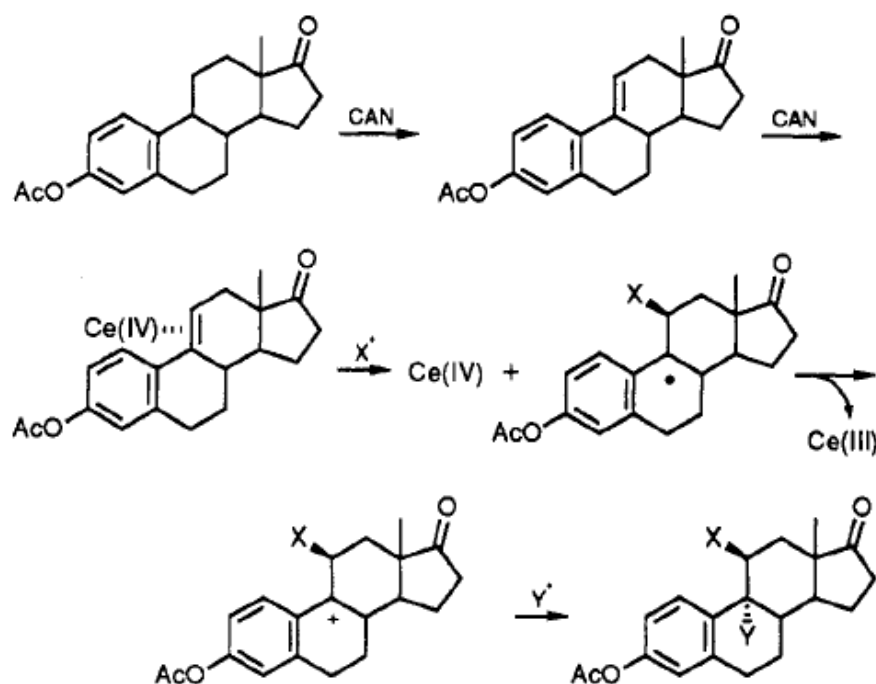


Figura 25 - Mecanismo hipotético para a oxidação do fenol. Adaptado de [92].

### 5.1.6. Oxidação pelo nitrato de cério e amónio (CAN)

Os esteroides com grupos nitrato não se encontram na natureza, tendo a sua síntese elevado interesse. Adicionalmente, a preparação de ésteres nitrato pode também ser um meio de proteção de grupos hidroxilos [79]. Normalmente, para a síntese de nitratos esteroides recorre-se ao nitrato de acetilo, tendo sido também reportada em estrogénios a introdução direta do grupo  $\text{ONO}_2$  com CAN [94]. O CAN nos derivados esteroides com anel A aromático, leva à hidroxilação do átomo C9 benzílico e à nitração oxidativa da posição homobenzílica C11 [95]. O mecanismo geralmente aceite está representado na figura 26, e deverá envolver uma desidratação em C9-C11 seguida de uma adição nucleofílica em C11 formando-se um radical em C9 que reage com o cério(IV) formando-se um ião carbónio, que deverá reagir com um segundo nucleófilo que origina o OH [96].



**Figura 26** - Mecanismo hipotético para a oxidação pelo nitrato de cério e amónio ( $X = \text{ONO}_2$ ,  $Y = \text{OH}$ ) [96].

### 5.1.7. Oxidação alílica

A oxidação alílica consiste numa reação orgânica de elevado interesse em síntese química, com aplicação nas áreas dos produtos agrícolas aos farmacêuticos [97] e consiste na produção de álcoois, ésteres, éteres alílicos e compostos carbonílicos  $\alpha,\beta$ -insaturados. Inicialmente, os reagentes mais comuns para a oxidação alílica eram os compostos de crómio (IV), que foram sendo substituídos sobretudo devido às desvantagens em termos ambientais e económicos [98]. De forma a eliminar estes problemas, têm sido desenvolvidos métodos, usando oxidantes mais aceitáveis em termos ambientais, onde se destacam os hidroperóxidos, como o *terc*-butil-hidroperóxido (TBHP) combinados com diferentes tipos de catalisadores metálicos ou não metálicos [99]. Dentro destes, o catalisador bismuto é considerado um composto relativamente seguro, quando comparado com outros catalisadores metálicos, não estando registada toxicidade ou efeitos carcinogénicos significativos associados [98]. Dadas as vantagens deste processo, o método selecionado para a oxidação alílica do substrato **3** foi a combinação de TBHP com tricloreto de bismuto ( $\text{BiCl}_3$ ), o qual se tem revelado bastante selectivo.

Em termos mecanísticos a oxidação alílica é um processo que envolve tipicamente radicais livres podendo os ácidos de Lewis também catalisar processos radicalares. A hipótese mecanística mais provável poderá estar relacionada com a clivagem homolítica do hidroperóxido de *t*-butilo pelo Bi (III), formando-se radicais *t*-butoxilo e *t*-butilperoxilo. Essas espécies radicalares podem abstrair um hidrogénio alílico no substrato esteroide, permitindo a ligação dos radicais *t*-butilperoxilo, nessa posição. O produto resultante é posteriormente clivado, originando álcoois e cetonas alílicas [92].

Esta reação será aplicada ao composto **3** pretendendo obter-se o composto **8**.

### 5.1.8 Oxidação de Baeyer-Villiger

A oxidação de Baeyer-Villiger é uma reação proeminente em química orgânica sintética que devido à sua versatilidade tem diversas aplicações, incluindo a síntese de antibióticos, esteroides, feromonas e monômeros para polimerização [100]. Este tipo de oxidação é um método útil para a conversão de aldeídos e cetonas em ésteres através da inserção de um átomo de oxigênio tipicamente proveniente de um ácido peroxicarboxílico ( $\text{RCO}_3\text{H}$ ). Este tipo de oxidação é também largamente utilizada para sintetizar lactonas (ésteres cíclicos) a partir de cetonas [101].

Tradicionalmente, esta reação é executada recorrendo a peroxiácidos como oxidantes, tais como o ácido trifluoroperacético, ácido perbenzóico e ácido *m*-cloroperóxibenzóico (*m*-CPBA) [102]. Hoje em dia cada vez se reconhece mais que estes compostos são problemáticos para uso industrial pois geram quantidades estequiométricas de ácidos carboxílicos como co-produtos, o que leva a um aumento dos custos do processo no que diz respeito à reciclagem do ácido e à regeneração do oxidante [90].

O mecanismo proposto para a oxidação Baeyer-Villiger por um ácido peroxicarboxílico está representado na figura 27.

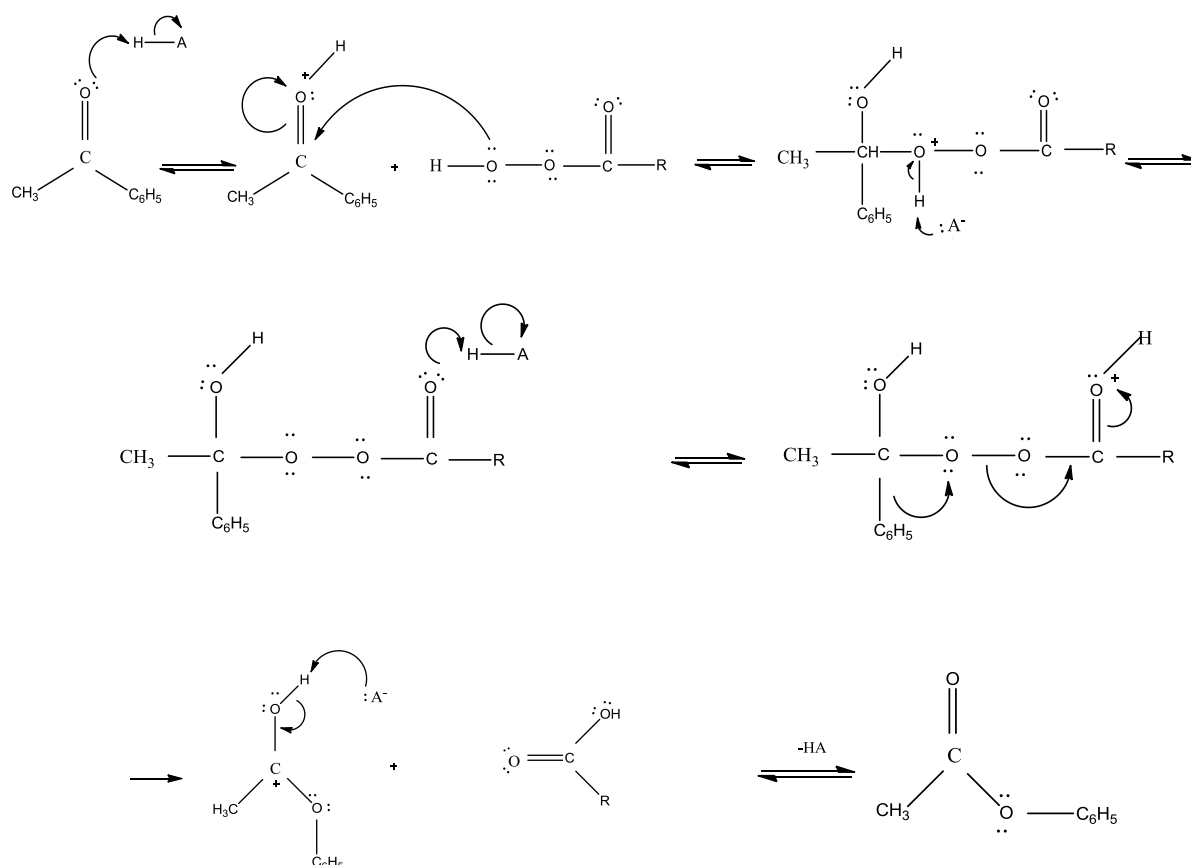


Figura 27- Mecanismo proposto para a oxidação de Baeyer-Villiger. Adaptado de [101].

## 5.2. Estratégia de avaliação da ação citotóxica dos compostos preparados

Os efeitos dos compostos sintetizados e purificados foram avaliados em três linhas celulares: NHDF, MCF-7 e LNCaP.

As células foram cultivadas em frascos de 75 cm<sup>2</sup>, em meio apropriado, e quando estavam na fase exponencial de crescimento, fez-se a sementeira destas em placas *multiwells*, na densidade adequada para o estudo. Seguidamente, as células foram expostas aos compostos durante 72 horas, de modo similar ao efetuado em outros estudos do género deste. Passado esse tempo avaliou-se o efeito dos compostos na proliferação das células cancerígenas, MCF-7 e LNCaP, e não cancerígenas (fibroblastos da derme humana), para tentar aferir a seletividade dos potenciais efeitos antiproliferativos. Para avaliar os efeitos dos referidos compostos na proliferação celular após exposição aos mesmos utilizou-se o conhecido ensaio MTT.

O ensaio MTT é um método espectrofotométrico que avalia a atividade metabólica das células quantificando a redução metabólica do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) por desidrogenases mitocondriais, no que resulta a produção de cristais de formazano no interior das células. A redução do MTT só acontece quando enzimas reductases celulares estão ativas, e assim a conversão é usualmente usada como uma medida de proliferação ou viabilidade celular (figura 28) [103, 104]. O formazano formado é dissolvido e é efectuada a avaliação espectrofotométrica a 570nm.

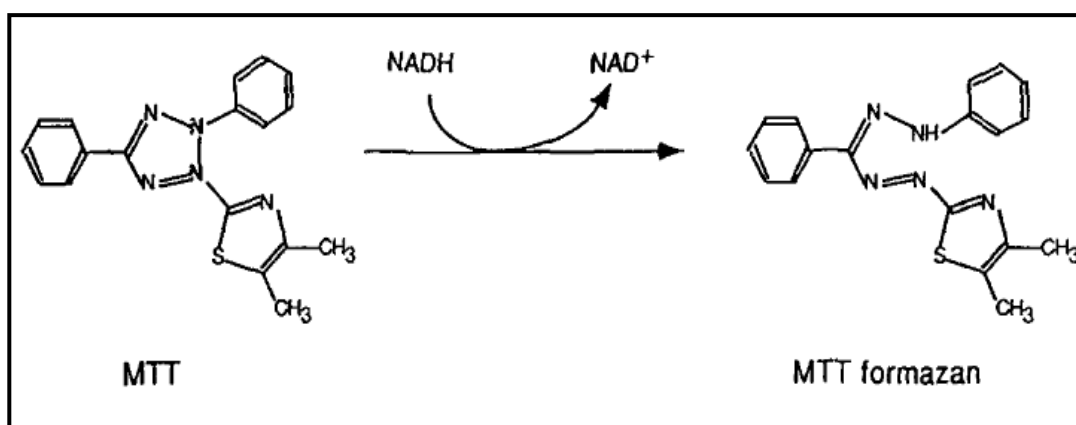


Figura 28- Estruturas químicas do MTT e do MTT formazano. Adaptado da literatura [104].

# 6. Parte experimental

## 6.1. Síntese química

### Materiais:

Todas as sínteses foram efetuadas com compostos adquiridos comercialmente e usados nas condições em que foram recebidos. O esteroide estrona, o bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), o Oxone®, o sulfito de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ), o *terc*-butil-hidroperóxido (TBHP), o ácido *meta*-cloroperoxibenzóico (*m*-CPBA), o ácido benzenoselenínico ( $\text{SeO}_2\text{C}_6\text{H}_6$ ), monoperoxifalato de magnésio hexahidratado (MMPP) o nitrato de cério amónio (CAN), o peróxido de hidrogénio 30% em água ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o tetrahidrofurano (THF) e o anidrido trifluoroacético (TFA) foram adquiridos à Sigma-Aldrich. Os sólidos como sílica gel 60 (0,063-0,200 mm), sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) e tetraetilamónio monohidratado [ $(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{NCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ ] foram adquiridos à Merck, a 4-dimetilaminopiridina (DMAP) à Fluka, o permanganato de potássio ( $\text{KMNO}_4$ ) à Riedel-de-Haën, o cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ) e o fosfato dissódico de hidrogénio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) à Panreac, o tricloreto de bismuto ( $\text{BiCl}_3$ ) à Fluka e o hidróxido de potássio (KOH) à Pronalab. Em relação aos solventes, o diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), o éter dietílico, o éter de petróleo 40-60°C e o clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) foram adquiridos à Fisher Chemical, o ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), o ácido acético glacial e o ácido clorídrico 37% (HCl 37%) à Panreac, o acetonitrilo à Fluka, o metanol e o acetato de etilo à VWR Prolabo, o anidrido acético e o tolueno à Merck, a acetona pura à Labsolve.

### Separação:

As sínteses químicas foram controladas por cromatografia em camada fina (CCF), para as quais se utilizaram placas comerciais Kieselgel 60  $F_{254}$ , da Merck, que foram posteriormente observadas à luz ultra-violeta (254nm) e reveladas usando a mistura etanol- $\text{H}_2\text{SO}_4$  (95:5), seguida de aquecimento a cerca de 120°C. O eluente utilizado variou consoante a reação, estando indicado no procedimento experimental segundo a proporção v/v de solventes.

O isolamento dos produtos foi efetuado por cromatografia em coluna, cuja fase estacionária consistiu num gel de sílica 0,063-0,200 mm, sendo a proporção v/v da fase móvel indicada no procedimento experimental.

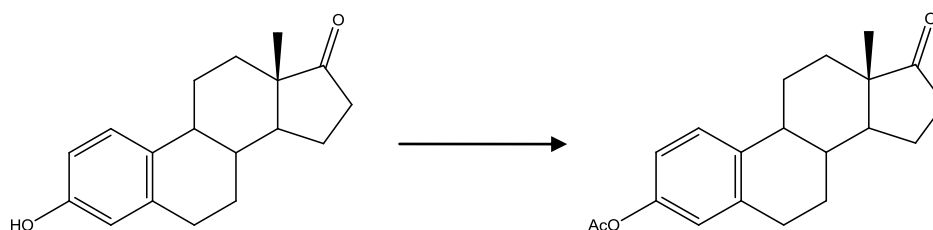
## Instrumentos e equipamentos:

Para a evaporação dos solventes usou-se um evaporador rotativo Heidolph. Para a efetuar uma das sínteses, recorreu-se ao microondas MultiSYNTH Milestone. Os espectros de infra-vermelho (IV) foram obtidos num espectrofotómetro Nicolet iS10 (Thermo Scientific), e foram efetuados pelo método ATR. Os dados destes espectros indicam-se pela frequência máxima, expressa em  $\text{cm}^{-1}$ . Os espectros de RMN foram obtidos num espectrofotómetro Bruker Avance III 400 e registados a 400 MHz para  $^1\text{H}$  RMN e a 100 MHz para  $^{13}\text{C}$  RMN. Nos espectros obtidos usou-se  $\text{CDCl}_3$  como solvente e tetrametilsilano (TMS) como padrão interno ( $\delta=0$  ppm). Os dados dos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN estão indicados pela ordem seguinte: solvente, desvio químico em ppm, multiplicidade, atribuição da molécula e, quando necessário, o valor da constante de acoplamento,  $J$ , em Hz. Os dados de  $^{13}\text{C}$  RMN estão indicados pela ordem: solvente, desvio químico e carbono respectivo.

## Procedimento experimental:

A nomenclatura dos compostos orgânicos referenciados nesta dissertação seguiu genericamente as recomendações descritas em Fernandes, A.C.; Herold, B.; Maia, H.; Rauter, A. P.; Rodrigues, J. A. R. *Guia IUPAC para a Nomenclatura de Compostos Orgânicos*, Tradução Portuguesa nas Variantes Europeia e Brasileira, Lidel: Lisboa-Porto-Coimbra, 2002. No entanto, ao longo desta dissertação, alguns esteróides são designados de forma abreviada ou usando nomes triviais. A síntese de todos os compostos encontra-se descrita de forma mais detalhada na literatura.

### 6.1.1. Síntese do acetato de estrona (composto 1) [88]



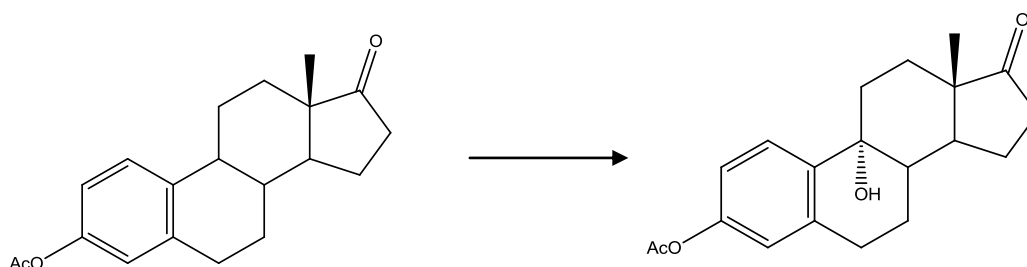
Num balão de fundo redondo de 250 ml dissolveu-se, à temperatura ambiente e com agitação magnética, estrona (1081,51 mg; 4 mmoles) em THF (32 ml), e a esta solução adicionou-se anidrido acético (0,4 ml) e DMAP (64,8 mg).

O controlo da reacção por CCF [eluente: éter dietílico:tolueno 3:7] mostrou, ao fim de 3 horas, que o substrato de partida tinha sido completamente consumido, obtendo-se apenas uma mancha de  $R_f=0,6$  com absorção no UV (254 nm), que corresponde ao produto principal da reacção.

A mistura reacional foi evaporada até à secura em evaporador rotativo. De seguida, dissolveu-se o produto obtido em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (300 ml) e esta fase orgânica foi lavada com solução saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (2x40 ml) e com água destilada (2x40 ml), seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, filtrada e evaporada em evaporador rotativo, obtendo-se um produto sólido, branco, que foi seco na estufa de vácuo. O rendimento do produto final 1 foi de 95,1% (1189 mg).

O produto bruto da reacção foi analisado por IV e  $^1\text{H}$  RMN [105]. IV ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1206, 1491, 1605, 1732, 2929, 3057;  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  0,89 (3H, s, H18), 2,26 (3H,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 6,79 (1H, d, H4), 6,85 (1H, dd, H2), 7,27 (1H, d, H1).

#### 6.1.2. Síntese do acetato de 9 $\alpha$ -hidroxi-17-oxoestra-1,3,5(10)-trien-3-ilo (composto 2) [106]



Num balão de fundo redondo de 250 ml dissolveu-se o acetato de estrona 1 (937,08 mg; 3 mmoles) em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (21,4 ml). De seguida adicionou-se, pela seguinte ordem, água destilada (23,6 ml),  $\text{NaHCO}_3$  (6,857 g), acetona pura (19 ml) e o catalisador  $(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{NCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$  (12 mg), e a mistura reacional foi mantida a 15°C durante a adição do oxidante. A esta solução adicionou-se de 15 em 15 minutos, durante 2,5 horas, o oxidante Oxone® (total: 14,25 g).

O controlo da reacção por CCF [eluente: acetato de etilo:éter de petróleo 40-60°C 2:1] após 7 horas revelou a presença de uma mancha de  $R_f=0,7$  que corresponde ao produto principal da reacção, com absorção no UV (254nm), e de vestígios de produto secundário e de matéria-prima inalterada.

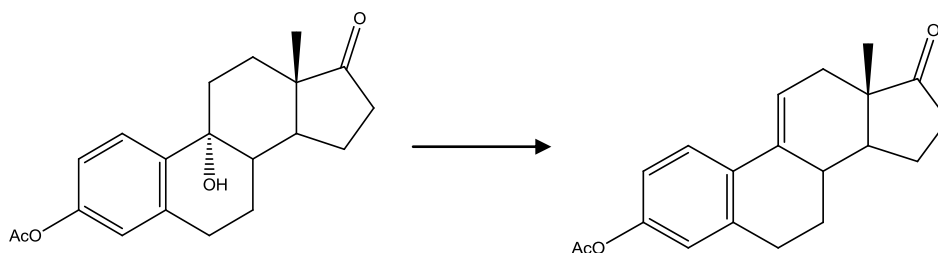
À mistura reacional após parar a reacção adicionou-se 60 ml de água destilada e extraiu-se a fase aquosa com acetato de etilo (3x80 ml). A fase orgânica foi lavada com  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  10% (60 ml) e água destilada (60 ml), seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, filtrada e evaporada em evaporador rotativo, obtendo-se um produto sólido, branco, que foi seco em estufa de vácuo.

O rendimento do produto final **2** foi de 91,35 % (900 mg). Este produto foi usado na reação seguinte sem purificação adicional.

Para avaliação nas células e caracterização estrutural, parte desta mistura foi submetida a cromatografia em coluna [eluente: éter de petróleo 40-60°C:acetato de etilo 4:1] para obter um produto o mais puro possível.

O produto bruto da reação foi analisado por IV,  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN [107]. IV ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1196; 1491, 1607, 1725, 2927, 3059, 3417;  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  0,89 (3H, s, H18), 2,26 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 6,79 (1H, d, H4), 6,83 (1H, dd, H2), 7,27 (1H, d, H1);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  70,43 ( $\text{C}^9$ ), 118,97 ( $\text{C}^2$ ), 121, 80 ( $\text{C}^4$ ), 126,63 ( $\text{C}^1$ ), 137,62 ( $\text{C}^5$ ), 138,23 ( $\text{C}^{10}$ ), 148,77 ( $\text{C}^3$ ), 170,05 ( $\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$ ), 221,45 ( $\text{C}^{17}$ ).

### 6.1.3. Síntese do acetato de 17-oxoestra-1,3,5(10),9(11)-tetraen-3-ilo (Composto 3) [106]



Num balão de fundo redondo de 250 ml dissolveu-se o composto **2** (328,40 mg; 1 mmol) em diclorometano (7,41 ml). Esta solução foi mantida a  $-20^\circ\text{C}$  e de seguida adicionou-se  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado (0,037 ml) e manteve-se a mistura reacional sob agitação vigorosa, durante 2 horas.

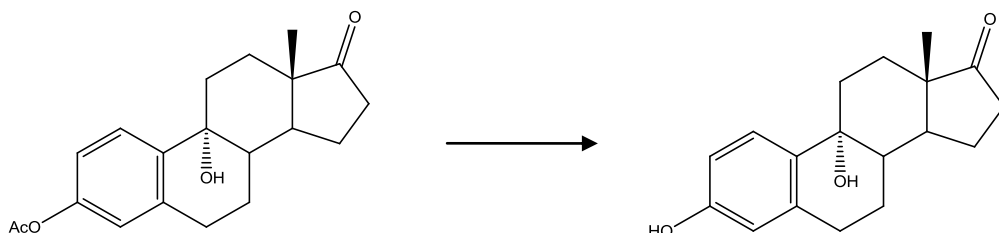
O controlo da reacção por CCF [eluente: éter de petróleo 40-60°C:acetato de etilo 2:1] após 2 horas revelou a presença de uma mancha de  $R_f=0,8$ , com absorção intensa no UV (254nm) e de cor esverdeada, que corresponde ao produto principal da reação e de vestígios de produto secundário e de matéria-prima inalterada.

Após parar a reação, adicionou-se  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (80 ml) à mistura reacional e esta fase orgânica foi lavada com solução saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (10 ml) e água destilada (10 ml), seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, filtrada e evaporada em evaporador rotativo, obtendo-se um produto sólido, castanho claro, que foi seco em estufa de vácuo. O rendimento do produto final **3** foi de 97,9% (304 mg). Este produto foi usado na reação seguinte sem purificação adicional.

Para avaliação nas células e caracterização estrutural, parte desta mistura foi submetida a cromatografia em coluna [eluente: éter de petróleo 40-60°C:acetato de etilo 4:1] para obter um produto o mais puro possível.

O produto bruto da reação foi analisado por IV,  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN [107]. IV ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1199, 1491, 1621, 1736, 2925, 3022;  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  0,91 (3H, s, H18), 2,26 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 6,22 (brt, H11), 6,84 (dd,  $J_1 = 8,57$  Hz, H2), 6,81 (d, H4), 7,57 (d,  $J = 8,59$  Hz, H1);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  119,31, 119,58, 121,97 ( $\text{C}^2$ ,  $\text{C}^4$  ou  $\text{C}^{11}$ ), 125,45 ( $\text{C}^1$ ), 127 ( $\text{C}^9$ ), 135,37 ( $\text{C}^{10}$ ), 137,59 ( $\text{C}^5$ ), 149,63 ( $\text{C}^3$ ), 169,86 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 221,20 ( $\text{C}^{17}$ ).

#### **6.1.4. Síntese da 3,9 $\alpha$ -dihidroiestra-1,3,5(10)-trien-17-ona (composto 4) [106]**



Num balão de fundo redondo de 100 ml dissolveu-se o composto 2 (82,1 mg; 0,25 mmoles) em metanol (1,31 ml), e a esta solução adicionou-se KOH (0,065 g). A reação decorreu durante 4 horas, a 40°C, sob agitação magnética.

O controlo da reacção por CCF [eluente: acetato de etilo:éter de petróleo 40-60°C 2:1] após 4 horas revelou a presença de uma mancha de  $R_f=0,3$  que corresponde ao produto principal da reação, com absorção no UV (254nm), e de vestígios de produto secundário e de matéria-prima inalterada.

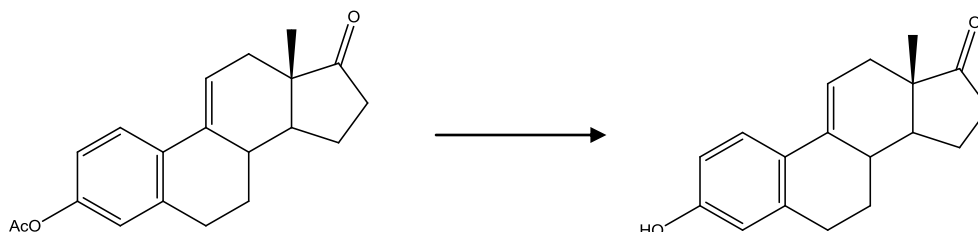
Após terminar a reação, a mistura reaccional foi evaporada parcialmente em evaporador rotativo. De seguida, adicionou-se HCl 5% até a solução neutralizar e extraiu-se o produto obtido com acetato de etilo (3x20 ml) e lavou-se a fase orgânica com água destilada (20 ml). A fase orgânica foi seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, filtrada e evaporada em evaporador rotativo, obtendo-se um produto sólido amarelo claro, que foi seco em estufa de vácuo. O rendimento do produto final 4 foi de 84 % (60 mg).

Para avaliação nas células e caracterização estrutural, parte desta mistura foi submetida a cromatografia em coluna [eluente: éter de petróleo:acetato de etilo 4:1] para obter um produto o mais puro possível.

O produto bruto da reação foi analisado por IV,  $^1\text{H}$  RMN [108]. IV ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1223, 1453, 1616, 1715, 2927, 3020; 3256. O espectro de  $^1\text{H}$  será apresentado na secção de resultados. Dada a multiplicidade dos sinais observados, não se apresentam os dados do espectro do  $^{13}\text{C}$ .

#### 6.1.5. Síntese do 3-hidroxiestra-1,3,5(10),9(11)-tetraen-17-ona (Composto 5)

[106]



Num balão de fundo redondo de 100 ml dissolveu-se o composto **3** (77,6 mg; 0,25 mmoles) em metanol (1,31 ml) e de seguida adicionou-se KOH (0,065 g). A reação decorreu a 40°C, sob agitação magnética, durante 4 horas.

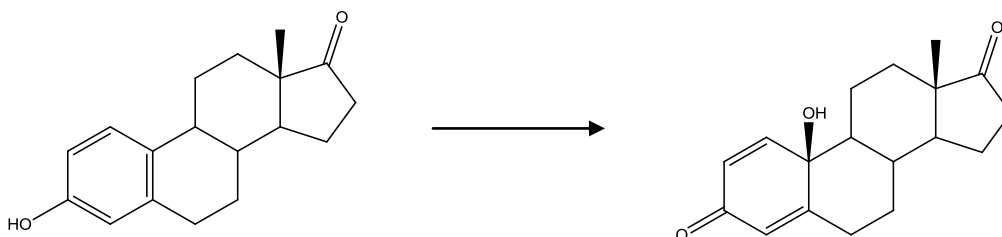
O controlo da reação por CCF [eluente: acetato de etilo:éter de petróleo 40-60°C 2:1] após 4 horas revelou a presença de uma mancha de  $R_f=0,6$  que corresponde ao produto principal da reação, com absorção no UV (254nm).

Após terminar a reação, a mistura reaccional foi evaporada parcialmente em evaporador rotativo. De seguida, adicionou-se HCl 5% até a solução neutralizar e extraiu-se o produto obtido com acetato de etilo (3x20 ml) e lavou-se a fase orgânica com água destilada (20 ml). A fase orgânica foi seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, filtrada e evaporada em evaporador rotativo, obtendo-se um produto sólido amarelo claro, que foi seco em estufa de vácuo. O rendimento do produto final **5** foi de 93% (64 mg).

Para avaliação nas células e caracterização estrutural, parte desta mistura foi submetida a cromatografia em coluna [eluente: éter dietílico:acetato de etilo 3:7] para obter um produto o mais puro possível.

Contudo, através da análise dos espectros de  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN verificamos que afinal havia mistura de produtos, não sendo possível tirar conclusões sobre a sua caracterização.

### 6.1.6. Síntese do 10B-hidroxiestra-1,4-dieno-3,17-diona (Composto 6) [109]



Num balão de fundo redondo de 50 ml dissolveu-se  $\text{KMnO}_4$  (78,378 mg), à temperatura ambiente, em HCl aquoso (0,05M) (10,8 ml), sob agitação vigorosa. De seguida adicionou-se a estrona (68 mg; 0,25 mmoles) dissolvida em acetato de etilo (10,81 ml).

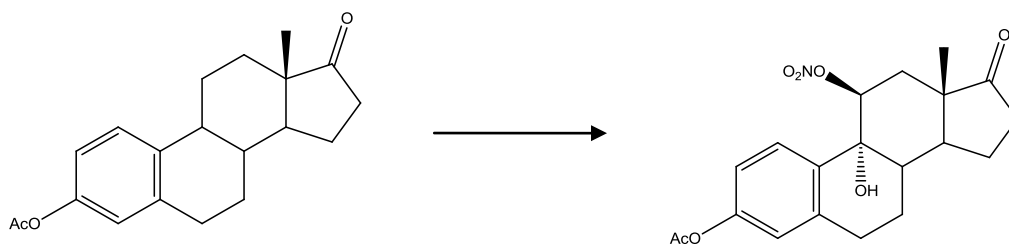
O controlo da reação por CCF [eluente: acetato de etilo:éter de petróleo 40-60°C 2:1] após 30 segundos revelou a presença de apenas uma mancha de  $R_f=0,5$ , que corresponde ao produto principal da reação, com absorção no UV (254nm).

Após finalizar a reação, a mistura reaccional foi extraída com acetato de etilo (3x30 ml) e recolheu-se a fase orgânica. A fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaCl (30 ml) e com água destilada (10 ml), seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, filtrada e evaporada em evaporador rotativo, obtendo-se um produto sólido branco, que foi seco em estufa de vácuo. O rendimento do produto final **6** foi de 76,36% (55 mg).

Para avaliação nas células e caracterização estrutural, parte desta mistura foi submetida a cromatografia em coluna [eluente: acetato de etilo:éter de petróleo 2:1] para obter um produto o mais puro possível.

O produto bruto da reação foi analisado por IV,  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN [92]. IV ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1455, 1622, 1663, 1732, 2924, 3090, 3350;  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  0,93 (3H, s, H18), 5,95 (1H, s, H4), 6,14 (1H, d, H2), 7,06 (1H, d, H1);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  69,08 ( $\text{C}^{10}$ ), 121,99 ( $\text{C}^4$ ), 127,17 ( $\text{C}^2$ ), 149,57 ( $\text{C}^1$ ), 164,44 ( $\text{C}^5$ ), 184,69 ( $\text{C}^3$ ), 220,48 ( $\text{C}^{17}$ ).

**6.1.7. Síntese do acetato de 9 $\alpha$ -hidroxi-11 $\beta$ -nitrooxi-17-oxoestra-1,3,5(10)-trien-3-ilo (composto 7) [110]**



Num balão de fundo redondo de 100 ml dissolveu-se o acetato de estrona **1** (79,4 mg; 0,25 mmoles), sob agitação magnética e à temperatura ambiente, em ácido acético glacial (3,75 ml). Num outro balão de 25 ml, dissolveu-se o CAN (0,63 mg) em água destilada (0,5 ml), e esta solução foi adicionada, gota-a-gota, à solução anterior. A solução alaranjada foi mantida, à temperatura ambiente e sob agitação magnética, durante 1 hora.

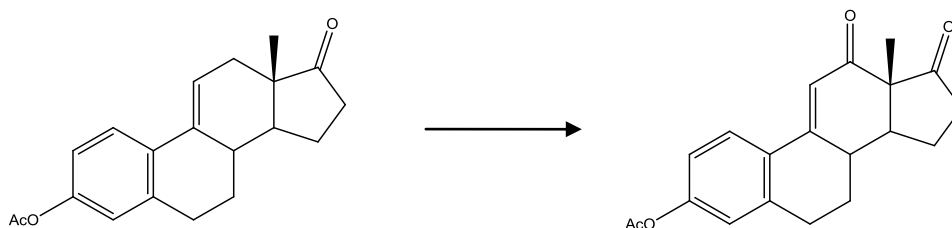
O controlo da reação por CCF [eluente: acetato de etilo:éter de petróleo 40-60°C 2:1] após 1 hora, revelou a presença de uma única mancha de  $R_f=0,8$  que corresponde ao produto principal da reação, com absorção no UV (254nm).

Após parar a reação, adicionou-se à mistura reacional 3 ml de água destilada e extraiu-se com acetato de etilo (3x50 ml). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (25 ml) e solução saturada de  $\text{NaCl}$  (25 ml), seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, filtrada e evaporada em evaporador rotativo, obtendo-se um produto sólido castanho claro, que foi seco em estufa de vácuo. O rendimento do produto final **7** foi de 89,5% (88,43 mg).

Para avaliação nas células e caracterização estrutural, parte desta mistura foi submetida a cromatografia em coluna [eluente: éter de petróleo 40-60°C:acetato de etilo 2:1] para obter um produto o mais puro possível.

O produto da reação foi analisado por IV,  $^1\text{H}$  RMN [110] e  $^{13}\text{C}$  RMN. IV ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1204, 1495, 1634, 1729, 2962, 3447;  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  1,01 (3H, s, H18), 2,26 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 5,80 (1H, t, H11 $\alpha$ ), 6,88 (1H, brs, H4), 6,92 (1H, d, H2), 7,28 (1H, d, H1);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  71,87 ( $\text{C}^9$ ), 81,43 ( $\text{C}^{11}$ ), 120,53 ( $\text{C}^2$ ), 123,16 ( $\text{C}^4$ ), 126,13 ( $\text{C}^1$ ), 134,94 ( $\text{C}^{10}$ ), 139,90 ( $\text{C}^5$ ), 150,66 ( $\text{C}^3$ ), 169,65 ( $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 217,90 ( $\text{C}^{17}$ ).

**6.1.8. Síntese do acetato de 12,17-dioxoestra-1,3,5(10),9(11)-tetraen-3-ilo (composto 8) [97]**



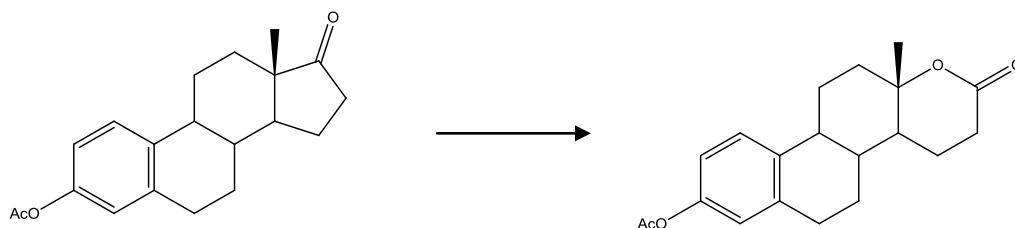
Num balão de fundo redondo de 25 ml dissolveu-se o produto **3** (78,21 mg; 0,25 mmoles) em acetonitrilo (1,5 ml). A reação decorreu a 70°C, sob agitação magnética e, de seguida, adicionou-se BiCl<sub>3</sub> (13 mg) e o TBHP (5,0-6,0M em *n*-decano) (0,45 ml).

O controlo da reação por CCF [eluyente: acetato de etilo:éter de petróleo 40-60°C 2:1] após 25 horas revelou a formação de vários produtos, sem destaque aparente para algum.

Após parar a reação, à mistura reaccional adicionou-se Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 10% (75 ml) e manteve-se sob agitação durante 2 horas e 30 minutos. Seguidamente fez-se extracção com éter dietílico (3x40 ml) e esta fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> (25 ml) e água destilada (25 ml), seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrada e evaporada em evaporador rotativo, obtendo-se um produto sólido branco, que foi seco em estufa de vácuo.

Através da CCF final, observou-se a formação de muitos produtos secundários, não sendo possível a caracterização estrutural e conseqüentemente este produto não foi sujeito a avaliação biológica.

**6.1.9. Tentativas para a síntese do acetato de 17a-oxa-D-homoestrona (acetato de 17a-oxa-17-oxo-homoestra-1,3,5(10)trien-3-ilo) (composto 9)**



**6.1.9.1. Ácido benzenoselenínico / THF / H<sub>2</sub>O / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [111]**

Num balão de fundo redondo de 100 ml dissolveu-se o ácido benzenoselenínico (948,4 mg; 3 mmoles) em THF (4,5 ml), à temperatura ambiente, com agitação magnética. Adicionou-se de seguida H<sub>2</sub>O (3 ml) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (solução aquosa a 30%) (3,4 ml). Passados 5 minutos adicionou-se o acetato de estrona **1** (78,12 mg; 0,25 mmoles) dissolvido em THF (3 ml).

O controlo de reação por CCF [eluente: éter de petróleo 40-60°C:acetato de etilo 2:1] mostrou que a reação estava completa ao fim de 24 horas, tendo o substrato sido completamente consumido. Na CCF observou-se apenas uma mancha correspondente ao produto da reação com R<sub>f</sub>=0,4 e com absorção UV (254nm).

Após parar a reação, adicionou-se à mistura reacional 50 ml de solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> e extraiu-se a fase aquosa com acetato de etilo (3x80 ml). A fase orgânica foi de seguida lavada com água destilada (60 ml), seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrada e evaporada em evaporador rotativo, obtendo-se um produto sólido branco, que foi seco em estufa de vácuo. O rendimento do produto final foi de 78,52% (783 mg).

O produto bruto da reação foi analisado por IV, <sup>1</sup>H RMN e <sup>13</sup>C RMN [83]. IV (cm<sup>-1</sup>): 1203, 1493, 1720, 1752, 2928; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 1,32 (3H, s, H18), 2,26 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2,36 (2H, t, H16), 6,79 (1H, s, H4), 6,85 (1H, dd, H2), 7,25 (1H, d, H1); <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ 83,43 (C<sup>13</sup>), 119,18 (C<sup>2</sup>), 121,66 (C<sup>4</sup>), 126,59 (C<sup>1</sup>), 136,88 (C<sup>10</sup>), 137,88 (C<sup>5</sup>), 148,94 (C<sup>3</sup>), 169,99 (CH<sub>3</sub>CO), 171,56 (C<sup>17</sup>).

### 6.1.9.2. MMPP / diclorometano-metanol / H<sub>2</sub>O [112]

Num balão de fundo redondo de 50 ml dissolveu-se o acetato de estrona 1 (50,14 mg; 0,16 mmoles) em diclorometano e metanol (7,3 ml + 14,7 ml), à temperatura ambiente, sob agitação magnética. De seguida, adicionou-se o MMPP (1,70 g) e H<sub>2</sub>O (0,422 ml).

O controlo da reação por CCF [eluente: éter de petróleo 40-60°C:acetato de etilo 2:1] mostrou que a reação estava completa ao fim de 22 horas, tendo o substrato sido completamente consumido. Na CCF observou-se apenas uma mancha correspondente ao produto da reação com Rf=0,4 e com absorção UV (254nm).

Após parar a reação, adicionou-se à mistura reacional 20 ml de solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> e extraiu-se a fase aquosa com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2x50 ml). A fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> (15 ml) e água destilada (40 ml), seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrada e evaporada em evaporador rotativo, obtendo-se um produto sólido branco, que foi seco em estufa de vácuo. O rendimento do produto final foi de 95% (50 mg).

O produto bruto da reação foi analisado por IV e <sup>1</sup>H RMN [83]. IV (cm<sup>-1</sup>): 1203, 1493, 1720, 1751, 2923; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 1,32 (3H, s, H18), 2,26 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2,36 (2H, t, H16), 6,79 (1H, d, H4), 6,83 (1H, dd, H2), 7,24 (1H, d, H1).

### 6.1.9.3. Ureia-peróxido de hidrogénio (UHP) / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / anidrido trifluoroacético (TFA) [92]

Num balão de fundo redondo de 25 ml dissolveu-se o acetato de estrona 1 (79,6 mg; 0,25 mmoles) em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, à temperatura ambiente, sob agitação magnética. De seguida, adicionou-se o UHP (235 mg) e, antes da adição do TFA (0,18ml), mergulhou-se o balão em gelo para evitar reação exotérmica.

O controlo da reação por CCF [eluente: éter de petróleo 40-60°C:acetato de etilo 2:1] mostrou que a reação estava completa ao fim de 7 horas e 30 minutos, tendo o substrato sido completamente consumido. Na CCF observaram-se duas manchas principais, com Rf=0,2 e 0,3 com absorção UV (254nm).

Após parar a reação, adicionou-se 50 ml de NaHCO<sub>3</sub> à mistura reacional e ficou a agitar durante 24 horas. Passadas as 24 horas, extraiu-se a fase aquosa com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4x50 ml) e a fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> (40 ml) e água destilada (40 ml), seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrada e evaporada em evaporador rotativo, obtendo-se um produto sólido branco, que foi seco em estufa de vácuo. Obtiveram-se 46,6 mg de produto, o qual não foi caracterizado, uma vez que se tratava de uma mistura de substâncias cujo Rf na CCF não corresponde ao do produto pretendido.

#### 6.1.9.4. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / TFA / Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [113]

Num balão de fundo redondo de 100 ml dissolveu-se acetato de estrona 1 (46,854 mg; 0,25 mmoles) e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (399 mg) em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 ml), à temperatura ambiente, sob agitação magnética. Num outro balão de fundo redondo de 25 ml adicionou-se pela seguinte ordem, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (9,5 ml), TFA (2,5 ml) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (solução aquosa a 30%) (0,132 ml), a 0°C sob agitação magnética durante 5 minutos. Passados os 5 minutos, adicionou-se esta última solução à solução anterior e a mistura reacional foi mantida a 0°C (banho de gelo) durante 6 horas.

O controlo da reação por CCF [eluente: éter de petróleo 40-60°C:acetato de etilo 2:1] após 6 horas, não mostrou a formação de qualquer produto. Após mais 24 horas de reação, a CCF mostrou não ter ocorrido reação, observando-se apenas uma mancha correspondente ao substrato inicial inalterado, que foi recuperado.

#### 6.1.9.5. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / TFA / CHCl<sub>3</sub> [114]

Num balão de fundo redondo de 100 ml juntou-se H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (solução aquosa a 30%) (0,24 ml), TFA (1,5 ml) e CHCl<sub>3</sub> (1,8 ml). Num outro balão de fundo redondo de 25 ml, dissolveu-se o acetato de estrona 1 (46,854 mg; 0,15 mmoles) em CHCl<sub>3</sub> (6 ml), a 0°C, e adicionou-se esta solução à solução anterior. A mistura reacional foi mantida à temperatura ambiente, durante 3 horas e 30 minutos, sob agitação magnética.

O controlo da reação por CCF [eluente: éter de petróleo 40-60°C:acetato de etilo 2:1] mostrou que a reação estava completa ao fim de 3 horas e 30 minutos, tendo o substrato sido completamente consumido. Na CCF observou-se uma única mancha correspondente ao produto da reação com R<sub>f</sub>=0,4 e com absorção UV (254nm).

Após parar a reação, a mistura reacional foi adicionada a 60 ml de uma solução aquosa a 10 % de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> e ficou sob agitação magnética durante 1 hora. A fase aquosa foi extraída com acetato de etilo (3x50 ml) e a fase orgânica lavada com solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> (25 ml) e água destilada (25 ml), seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrada e evaporada em evaporador rotativo, obtendo-se um produto sólido branco, que foi seco em estufa de vácuo. O rendimento do produto final foi de 45% (22 mg).

O produto bruto da reação foi analisado por IV e <sup>1</sup>H RMN [83]. IV (cm<sup>-1</sup>): 1200, 1496, 1721, 1752, 2937; <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 1,32 (3H, s, H18), 2,26 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO), 2,36 (2H, t, H16), 6,79 (1H, d, H4), 6,83 (1H, dd, H2), 7,24 (1H, d, H1).

#### 6.1.9.6. CAN / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / *m*-CPBA [115]

Num balão de fundo redondo de 100 ml dissolveu-se o acetato de estrona 1 (46,854 mg; 0,15 mmoles) em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 ml) e de seguida adicionou-se o CAN (5,4826 mg) e o *m*-CPBA (48,32 mg; 0,2 mmoles). A mistura reacional foi mantida à temperatura ambiente durante 12 horas.

O controlo da reação por CCF [eluente: éter de petróleo 40-60°C:acetato de etilo 2:1] mostrou, ao fim de 12 horas, que o substrato não foi consumido, não havendo a formação de qualquer produto.

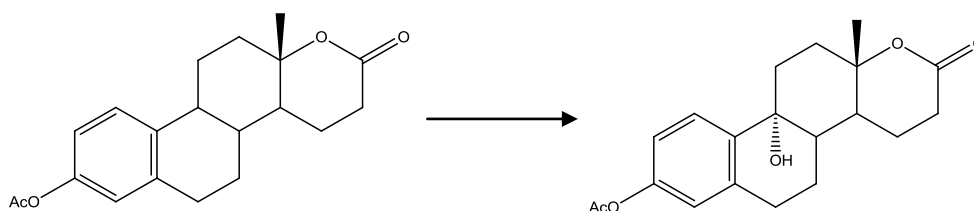
Para parar a reação, adicionou-se água gelada (10 ml), e extraiu-se a fase aquosa com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x50 ml) e a fase orgânica foi lavada com Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 10% (30 ml), água destilada (25 ml) e NaHCO<sub>3</sub> (25 ml). De seguida, a fase orgânica foi seca com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrada e evaporada em evaporador rotativo, reaproveitando-se o substrato para a reação descrita em 6.1.9.7.

#### 6.1.9.7. *m*-CPBA / CHCl<sub>3</sub> [116]

A mistura de *m*-CPBA (71,09 mg; 0,3172 mmoles) e o acetato de estrona 1 (38 mg) dissolvido em CHCl<sub>3</sub> (0,8133 ml), foram irradiados num aparelho de microondas (MultiSYNTH Milestone) a 350 W, 105°C e 7,1 bar durante 5 minutos.

O controlo da reação por CCF [eluente: éter de petróleo 40-60°C:acetato de etilo 2:1] mostrou a formação de muitos produtos, não sendo possível o isolamento destes nem a sua respetiva caracterização estrutural.

#### 6.1.10. Síntese do acetato de 9 $\alpha$ -hidroxi-17 $\alpha$ -oxa-D-homoestrona (acetato de 9 $\alpha$ -hidroxi-17 $\alpha$ -oxa-17-oxo-homoestra-1,3,5(10)trien-3-ilo) (composto 10)



Num balão de fundo redondo de 250 ml dissolveu-se o produto da reação 6.1.9.1 (76 mg; 0,25 mmoles) em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1,83 ml). De seguida adicionou-se, pela seguinte ordem, água destilada (2 ml), NaHCO<sub>3</sub> (0,568 g), acetona pura (1,58 ml) e o catalisador (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub>NCl·H<sub>2</sub>O

(7,17 mg), e a mistura reacional foi mantida a 15°C durante a adição do oxidante. A esta solução adicionou-se, de 15 em 15 minutos, durante 2,5 horas, o oxidante Oxone® (total: 1,186 g).

O controlo da reação por CCF [eluente: acetato de etilo:éter de petróleo 40-60°C 2:1] após 6 horas revelou a presença de apenas uma mancha de  $R_f=0,7$  que corresponde ao produto principal da reação, com absorção no UV (254nm).

Após parar a reação, adicionou-se 80 ml de água destilada à mistura reacional e extraiu-se a fase aquosa com acetato de etilo (3x80 ml). A fase orgânica foi lavada com  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (solução aquosa a 10%) (80 ml) e água destilada (80 ml), seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro e evaporada em evaporador rotativo, obtendo-se um produto sólido, branco, que foi seco em estufa de vácuo. O rendimento do produto final **10** foi de 74% (58,8 mg).

Para avaliação nas células e caracterização estrutural, parte desta mistura foi submetida a cromatografia em coluna [eluente: acetato de etilo:éter de petróleo 40-60°C 3:1] para obter um produto o mais puro possível.

O produto bruto da reação foi analisado por IV,  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN. IV ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1200, 1499, 1608, 1694, 1759, 2954, 3490;  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  1,32 (3H, s, H18), 2,27 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ), 6,83 (1H, brd, H4), 6,91 (1H, dd,  $J_1= 8,5$  Hz,  $J_2= 2,43$  Hz, H2), 7,50 (1H, d,  $J= 8,51$  Hz, H1);  $^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  19,75, 19,91, 20,16, 21,42, 28,98, 29,96, 33,90, 35,12, 38,97, 44,25, 69,23, 83,46, 120,09, 122,38, 126,71, 138,46, 138,85, 150,42, 169,93, 171,73.

## 6.2. Avaliação biológica

### 6.2.1. Material

#### 6.2.1.1. Componentes

- Meio de cultura RPMI-1640 (*RoswellPark Memorial Institute*), Sigma-Aldrich
- HEPES, Sigma-Aldrich
- L-Glutamina, Sigma-Aldrich
- Piruvato de sódio, Sigma-Aldrich
- Soro bovino fetal (FBS), Biochrom AG
- Antibiótico AB (Solução de estreptomicina e penicilina e anfotericina-B)
- Antibiótico SP (Solução de estreptomicina e penicilina)
- Meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), Sigma-Aldrich
- 0,025 % Tripsina em PBS/EDTA (1 g tripsina para 666 ml de PBS/EDTA)
- Corante azul triptano (0,4 %), Merck
- Dimetilsulfóxido (DMSO), Sigma-Aldrich
- Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio (MTT), Sigma Aldrich
- Tampão fosfato salino [(PBS), 90 % água MilliQ e 10 % de PBS 10x]
- Tampão glicina Sørensen (Solução de 0,1 M glicina, 0,1 M NaCl com pH ajustado a 10,5 com 0,1 M NaOH)

#### 6.2.1.2. Instrumentação

- Estufa Bioblock Scientific, a 37°C em atmosfera humidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>
- Microscópio Olympus CKX 41
- Centrífuga Bioblock Scientific 3K18C
- Leitor espectrofotométrico de microplacas, Anthos 2010 e 2020

## 6.2.2. Ensaios em linhas celulares

### 6.2.2.1. Linhas celulares utilizadas nos ensaios e sua cultura

Para a avaliação dos compostos em estudo utilizaram-se três tipos de linhas celulares: fibroblastos da derme humana não cancerígenos (NHDF), células epiteliais humanas de cancro da mama sensíveis a estrogénios (MCF-7) e células de adenocarcinoma da próstata sensíveis a androgénios (LNCaP).

As células NHDF (*Normal Human Dermal Fibroblasts*) são obtidas da derme de adultos e são células aderentes, que não se encontram completamente diferenciadas ou especializadas. Estas células foram cultivadas em caixas de 75 cm<sup>2</sup>, mantidas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS), 20mM de L-glutamina, 10mM de HEPES, 1mM de piruvato de sódio e 1 % de antibiótico/antimicótico AB (10,000 unidades/ml de penicilina, 10mg/ml de estreptomicina e 25µg/ml de anfotericina B), a 37°C numa atmosfera humidificada com 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi substituído a cada 2-3 dias e aquando da confluência das células, estas foram tripsinizadas e divididas para novos frascos de cultura. Nos ensaios as células foram usadas nas passagens 3 e 8.

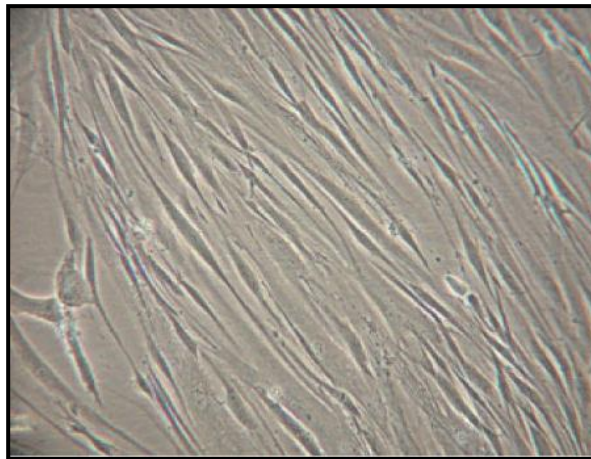


Figura 29 - Células NHDF [www.lgcstandards.com].

As células MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation-7*) consistem numa linha celular, isolada pela primeira vez em 1970, a partir de uma efusão pleural de uma mulher caucasiana com 69 anos, a quem tinha sido diagnosticado adenocarcinoma mamário metastático. Estas possuem características aderentes, crescimento em monocamada e recetores de estrogénios. As células MCF-7 foram cultivadas em caixas de 75 cm<sup>2</sup> e mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de FBS, 1% de antibiótico/antimicótico AB (10,000 unidades/ml de penicilina, 10mg/ml de estreptomicina e 25µg/ml de anfotericina B), a 37°C numa atmosfera humidificada com 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi substituído a cada 2-3 dias e aquando da confluência das células, estas foram tripsinizadas e divididas para novos frascos de cultura. Nos ensaios as células foram usadas nas passagens 9 e 35-37.

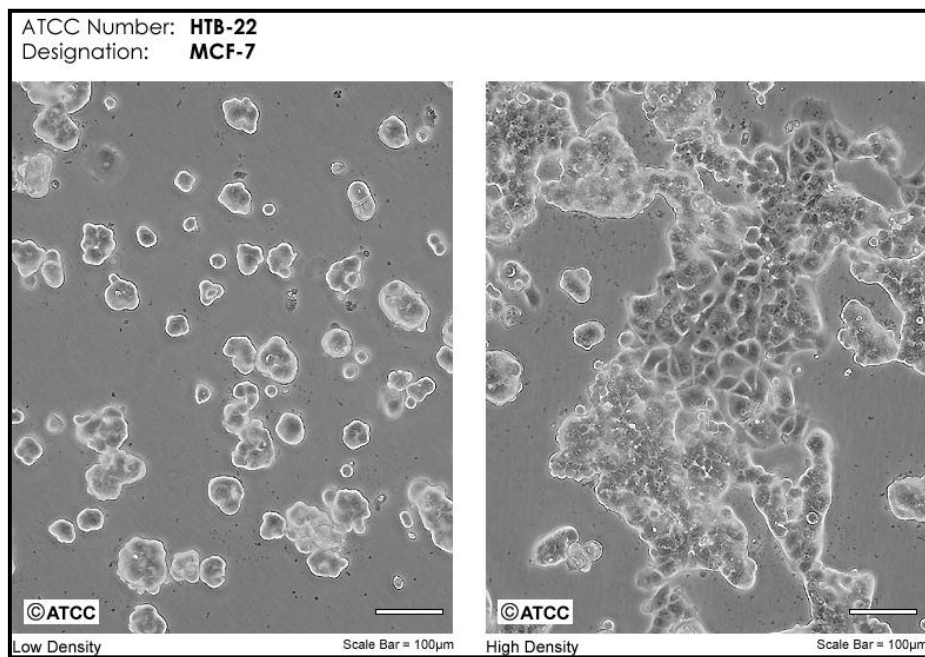


Figura 30 - Células MCF-7 ([www.lgcstandards.com](http://www.lgcstandards.com)).

As células LNCaP (*Lymph node carcinoma of the prostate*) são uma linha celular de células humanas do adenocarcinoma da próstata sensíveis a androgénios, tendo sido isoladas em 1977 a partir de uma metástase de um nódulo linfático supraclavicular de um homem caucasiano com 50 anos. Relativamente às suas propriedades, consistem em células epiteliais aderentes que podem crescer sob a forma de agregados ou células isoladas. Estas células foram cultivadas em caixas de 75 cm<sup>2</sup>, mantidas em meio RPMI suplementado com 10% de FBS e com 1% de antibiótico SP (10,000 unidades/ml de penicilina e 10 mg/ml de estreptomicina), a 37°C numa atmosfera humidificada com 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi substituído a cada 2-3 dias e aquando da confluência das células, estas foram tripsinizadas e divididas para novos frascos de cultura. Nos ensaios as células foram usadas nas passagens 22 e 23.

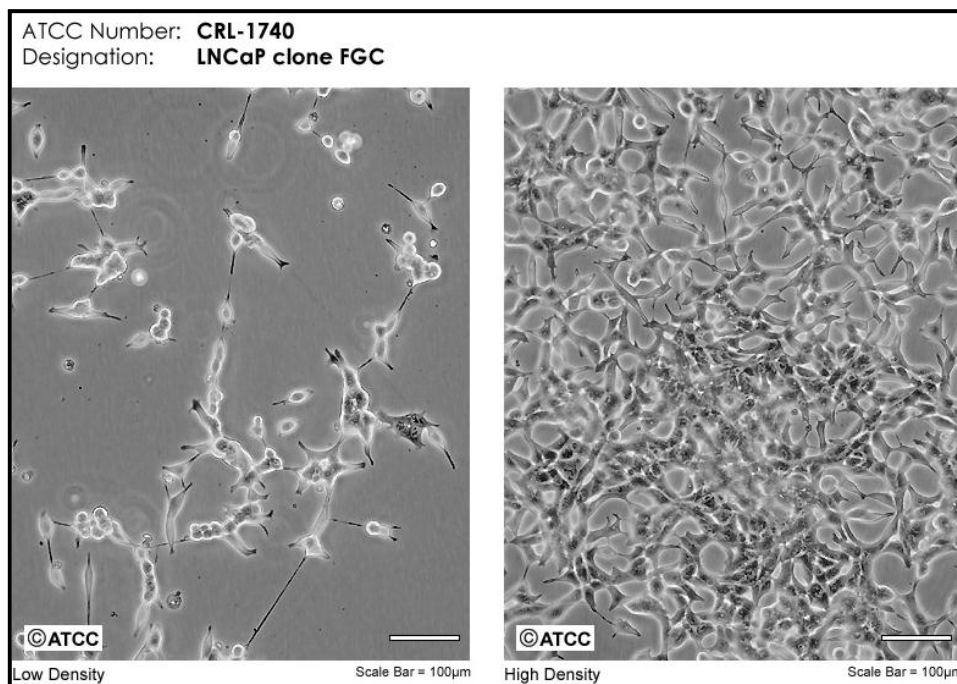


Figura 31 - Células LNCaP ([www.lgcstandards.com](http://www.lgcstandards.com)).

#### 6.2.2.2. Tripsinização

Quando as células atingem cerca de 80% a 90% de confluência (fase exponencial de crescimento celular), procedeu-se à tripsinização e expansão das células, para outros frascos de cultura. Resumidamente, o procedimento da tripsinização segue a seguinte ordem:

- 1) Aspiração do meio de cultura que se encontra no frasco;
- 2) Lavagem das células com PBS, seguida de aspiração deste;
- 3) Adição de tripsina e incubação a 37°C numa atmosfera humidificada com 5% de CO<sub>2</sub>;
- 4) Observação ao microscópio a fim de confirmar a suspensão das células;
- 5) Adição de meio completo previamente aquecido e transferência da suspensão celular para um falcon;
- 6) Centrifugação;
- 7) Aspiração do sobrenadante;
- 8) Ressuspensão do *pellet* com meio completo previamente aquecido;
- 9) Distribuição da suspensão celular para novos frascos de cultura quando se pretendeu expandir as células;

10) Quando se pretendeu realizar o estudo da avaliação dos efeitos dos compostos na sua proliferação celular, preparou-se o volume pretendido com a concentração adequada de células para semear em caixas *multiwells*.

#### 6.2.2.3. Contagem e sementeira das células

Conforme referido acima, após a ressuspensão do *pellet* com meio completo previamente aquecido, pode proceder-se à contagem das células. Para tal, retirou-se 10 µl da suspensão celular para um *ependorf* e adicionou-se 10 µl de corante azul triptano. Os 20 µl foram aplicados numa câmara de *Neubauer* e contabilizou-se o número de células existentes por quadrante. Para o cálculo do volume a retirar da suspensão celular, procedeu-se do seguinte modo: cálculo da média das células existentes por quadrante e multiplicação do valor desta por dois (devido à diluição provocada pela adição da solução de azul triptano), para obtenção da concentração de células pretendida por poceto. Foram usadas placas *multiwells* de 48 pocetos e distribuiu-se, por cada poceto, 250 µl de suspensão celular, excepto nos *wells* definidos como zeros (250 µl de meio completo) e incubou-se durante 48 horas.

Nas células NHDF e MCF-7, a densidade celular inicial foi de  $2 \times 10^4$ , e nas células LNCaP  $1 \times 10^4$ .

#### 6.2.2.4. Incubação dos compostos

Passadas as 48 horas de incubação, procedeu-se à preparação das concentrações pretendidas para os compostos a testar. Os compostos foram dissolvidos em 1 ml de DMSO, de modo obter uma solução-mãe com concentração final de 10 mM. A partir desta solução-mãe prepararam-se, em meio adequado para cada tipo de células, as restantes concentrações para cada composto: 0,01 µM; 0,1 µM; 1 µM; 10 µM, 50 µM e 100 µM. O tempo de exposição das células aos compostos foi de 72 horas e em todas as experiências efectuadas, a concentração final de DMSO nos pocetos foi sempre inferior a 1 % (de acordo com estudos anteriores, esta concentração de DMSO não tem qualquer efeito na viabilidade celular). Para o controlo (continha apenas meio de cultura) e para todas as concentrações dos compostos testados, foram efectuados ensaios usando um n=5 para as células NHDF e MCF-7, e n=3 para as LNCaP, para posterior análise estatística (figura 32).

Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z
Z	C	0,01	0,1	1	10	50	100
Z	C	0,01	0,1	1	10	50	100
Z	C	0,01	0,1	1	10	50	100
Z	C	0,01	0,1	1	10	50	100
Z	C	0,01	0,1	1	10	50	100

**Figura 32** - Distribuição dos zeros (Z), controlos (C) e das concentrações (0,01  $\mu\text{M}$ ; 0,1  $\mu\text{M}$ ; 1  $\mu\text{M}$ ; 10  $\mu\text{M}$ ; 50  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ ) numa placa de 48 wells.

#### 6.2.2.5. Ensaio de proliferação celular (MTT)

O potencial dos compostos sintetizados para inibirem a proliferação celular das células NHDF, MCF-7 e LNCaP foi estudado recorrendo ao ensaio MTT.

Após as 72 horas de exposição das células aos compostos, os sobrenadantes foram aspirados e aplicou-se, na ausência de luz, a solução de MTT (5 mg/ml em PBS). Esta permaneceu em contacto com as células durante 4 horas (placas embrulhadas em papel de alumínio), a 37°C numa atmosfera humidificada com 5 % de CO<sub>2</sub>. Passadas as 4 horas de incubação, aspirou-se o conteúdo dos pocetos e adicionou-se DMSO (200  $\mu\text{l}$ ), para a solubilização dos cristais e tampão glicina Sorensen (25  $\mu\text{l}$ ). Posteriormente, transferiu-se os 225  $\mu\text{l}$  de cada poceto para uma microplaca de 96 wells e, através do leitor espectrofotométrico de microplacas, quantificou-se a absorvância a 570nm.

A média dos valores de absorvância obtida nos cinco pocetos do ensaio controlo foi definida como 100 %, em termos de viabilidade celular. Todos os restantes valores obtidos, foram considerados em relação ao ensaio controlo, de forma a uniformizar os resultados obtidos e comparar as viabilidades celulares na ausência dos compostos testados, com a presença dos mesmos. Deste modo, a extensão de morte celular foi expressa como percentagem de viabilidade celular em comparação com as células controlo.

### **6.3. Análise estatística**

Os gráficos obtidos (concentração dos compostos vs percentagem de viabilidade celular) foram expressos como valores médios  $\pm$  desvio padrão. A comparação entre os diferentes ensaios foi analisada através do cálculo do teste *t*-Student, para determinar a existência de diferenças significativas entre as médias. Esta diferença foi considerada estatisticamente significativa quando  $p < 0,05$ .

# 7. Resultados e Discussão

## 7.1. Aplicação da estratégia de síntese

A estrona foi acetilada a acetato de estrona **1**, não sendo necessário a purificação deste uma vez que, pela análise da CCF se verificou que o substrato tinha sido completamente consumido, obtendo-se apenas uma mancha que correspondia ao produto pretendido. A análise por IV e  $^1\text{H}$  RMN foi ao encontro do descrito na literatura para este composto [105]. De forma similar, o produto  $9\alpha$ -hidroxilado (composto **2**), foi também obtido sem problemas. Este composto foi sujeito a coluna cromatográfica antes de ser caracterizado no IV,  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN, e os resultados obtidos foram também concordantes com os descritos na literatura [107].

O composto **3** (derivado  $\Delta^{9,11}$  acetilado), após coluna cromatográfica e pela análise da CCF, aparentemente parecia estar puro, pois apenas se observava uma mancha com absorção UV intensa. Contudo, pela análise por  $^1\text{H}$  RMN (figura 33) verificamos que havia mistura de produtos (figuras 34 e 35).

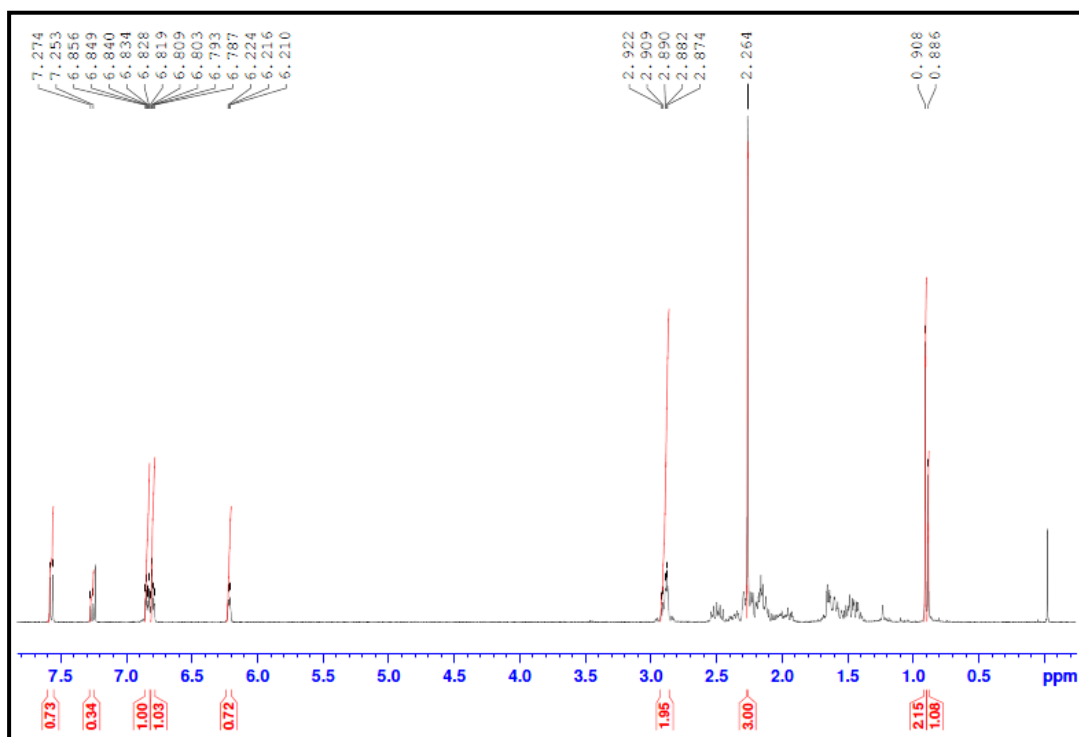


Figura 33 - Espectro  $^1\text{H}$  RMN completo do composto **3**.

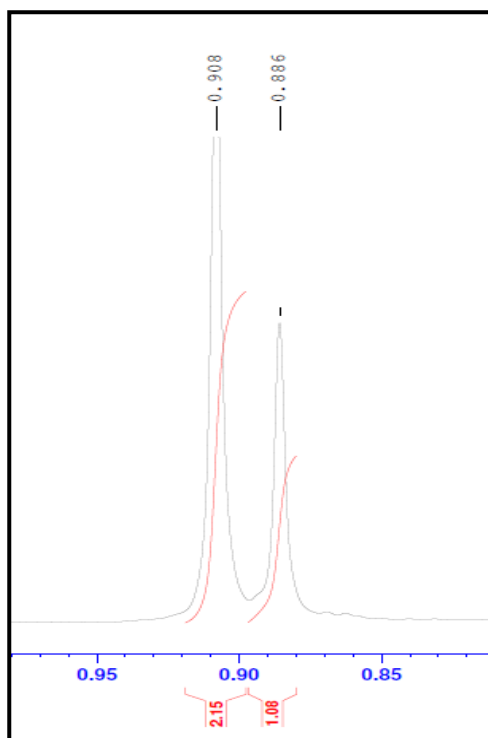


Figura 34 - Expansão 1 do Espectro  $^1\text{H}$  RMN completo do composto 3.

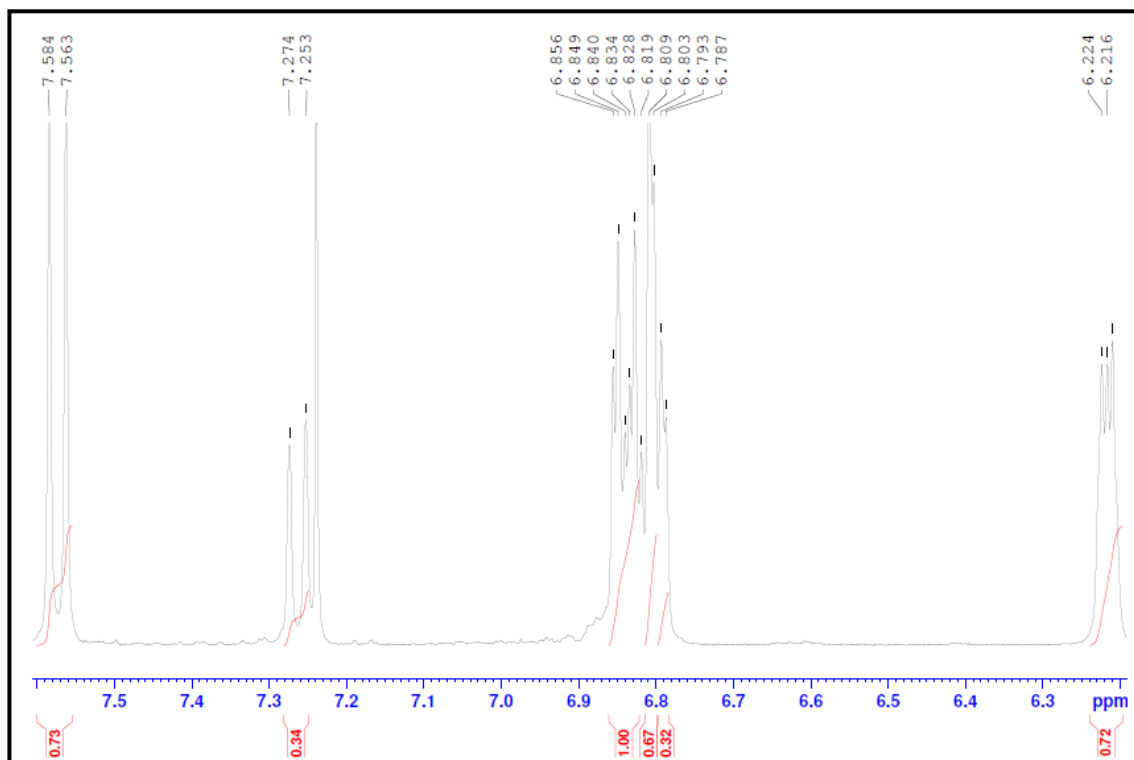


Figura 35 - Expansão 2 do Espectro  $^1\text{H}$  RMN completo do composto 3.

Os principais sinais dos espectros de IV,  $^1\text{H}$  RMN e  $^{13}\text{C}$  RMN obtidos foram concordantes com os descritos na literatura, mas uma análise mais pormenorizada do espectro de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  revelou sinais adicionais. Para termos a confirmação desses sinais, fizemos expansões do espectro  $^1\text{H}$  (figuras 34 e 35). Através da integração dos sinais do espectro, concluímos que cerca de 70% correspondia ao produto pretendido e 30% a um produto secundário. O sinal a 6,22 ppm, que corresponde ao H11 (figura 33), não aparece com menor intensidade a valores próximos deste, o que sugere que o produto secundário não tenha a dupla ligação do produto principal. Uma vez que na CCF só se observa uma mancha, faz sentido equacionar um isômero posicional, sendo o mais plausível o derivado com a dupla ligação entre o C8 e o C9. Contudo, só com estudos de RMN mais aprofundados se poderia obter mais informações. No espectro de  $^{13}\text{C}$ , como esperado, surgiram sinais adicionais aos correspondentes ao produto pretendido.

No caso do composto 4 ocorreu uma situação similar à descrita para o composto 3. Após cromatografia em coluna, segundo a CCF apenas se observou uma mancha novamente. Contudo, na análise do  $^1\text{H}$  RMN (figura 36) verificamos que tínhamos mais sinais do que aqueles que estão descritos na literatura para o composto esperado.

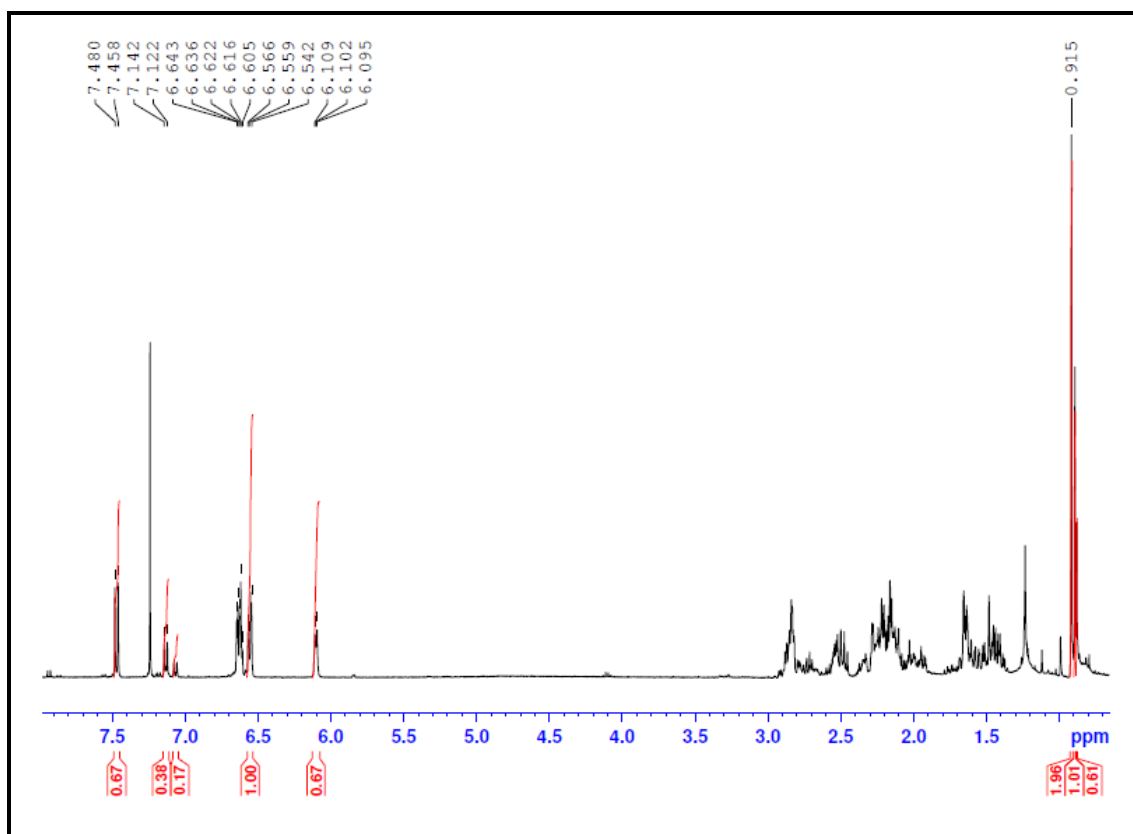


Figura 36 - Espectro  $^1\text{H}$  RMN completo do composto 4.

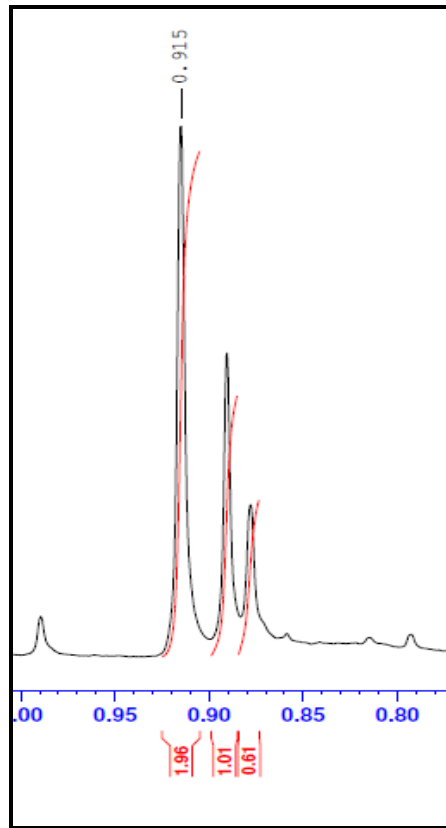


Figura 37 - Expansão 1 do Espectro  $^1\text{H}$  RMN completo do composto 4.

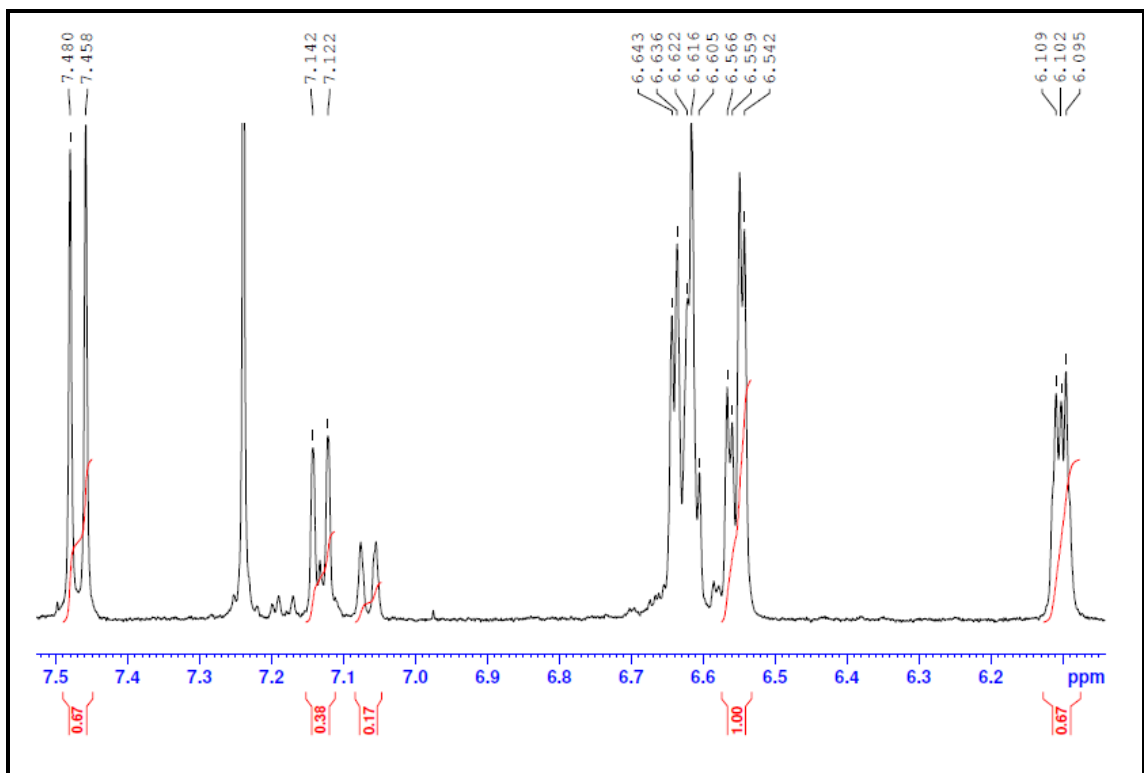


Figura 38 - Expansão 2 do Espectro  $^1\text{H}$  RMN completo do composto 4.

Da análise do espectro verifica-se que se obteve não só o composto pretendido, mas também poderá ter ocorrido desidratação parcial, pois surge um sinal atribuível ao H11 a cerca de 6,1 ppm (integração: 0,67) (figura 36), similar ao observado no espectro do composto **3** (derivado  $\Delta^{9,11}$  acetilado). Provavelmente e tal como ocorreu no caso do composto **3**, há ainda o segundo possível isómero posicional resultante da desidratação. Através da integração dos espectros concluímos que cerca de 55% correspondia a um produto, cerca de 30% a outro produto e cerca de 15% a outro produto. Dado o valor de integração do sinal a 6,1 ppm, o produto principal poderá ser o derivado  $\Delta^{9,11}$ . Uma vez que no espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN apareceram muitos sinais este não foi considerado para análise.

Surpreendentemente, a reação de hidrólise aplicada ao composto **3** para obtenção do composto **5** não foi efetuada com sucesso, de acordo com os dados obtidos no espectro de RMN, e por este motivo os dados da avaliação biológica não são apresentados.

A oxidação do fenol ao quinol (composto **6**), bem como a oxidação com CAN (obtenção do composto **7**) ocorreram com sucesso, tendo os referidos produtos sido obtidos com relativamente bons rendimentos. No entanto, a oxidação alílica do derivado  $\Delta^{9,11}$  acetilado (composto **3**) não teve sucesso, tendo-se observado a formação de mistura de produtos na CCF, não tendo sido, por isso efetuada a purificação e caracterização de produtos. Possivelmente, devido a tratar-se de uma reacção com mecanismo radicalar (como referido acima), a selectividade da reacção deverá ter sido muito baixa.

Na oxidação de Baeyer-Villiger o oxidante clássico é o *m*-CPBA [101], no entanto, estas reações são muito longas, o que nos levou a explorar condições reaccionais que permitissem reações mais rápidas, as quais que se encontram descritas na tabela 1. Apesar da reação com as condições  $\text{H}_2\text{O}_2$  / TFA /  $\text{CHCl}_3$  ter sido mais rápida (3 horas e 30 minutos) do que com o ácido benzenoselenínico (24 horas), o rendimento usando este oxidante foi superior (78,52%). Comparando os rendimentos obtidos usando os oxidantes ácido benzenoselenínico e o MMPP, 78,52% e 95%, respetivamente, o escolhido deveria ser o MMPP, no entanto, optamos pelo ácido benzenoselenínico devido à acessibilidade/disponibilidade deste reagente.

Tabela 1: Tentativas da síntese do composto 9 através da oxidação de Baeyer-Villiger.

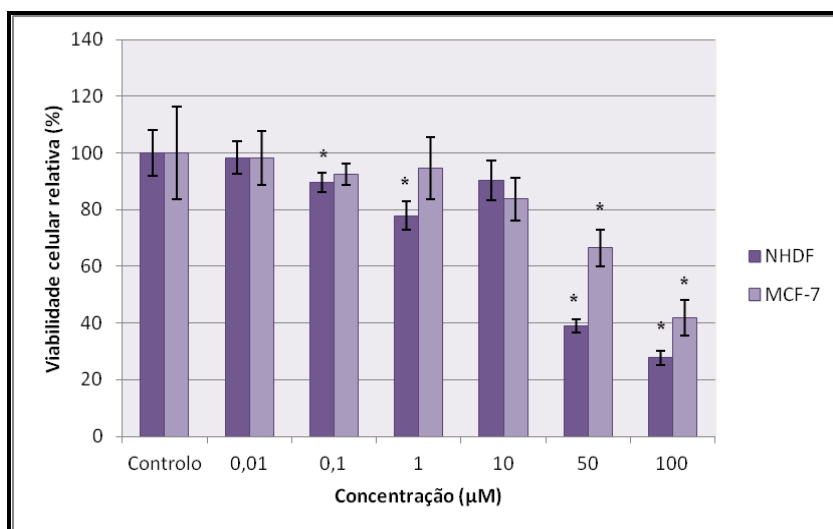
Condições reacionais	Tempo de reação	Rendimento	Observações [Eluente: éter de petróleo 40- 60°C:acetato de etilo 2:1]	Referência
Ácido benzenoselenínico/THF/H <sub>2</sub> O/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	24 horas	78,52%	Uma única mancha de Rf=0,4	[111]
MMPP/diclorometano-metanol/H <sub>2</sub> O	22 horas	95%	Uma única mancha de Rf=0,4	[112]
UHP/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /ácido acético/TFA	7 horas e 30 minutos	55,7%	Duas manchas, uma de Rf=0,2 e a outra de Rf=0,3	[92]
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /TFA/Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6 horas		Não se formou nenhum produto.	[113]
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /TFA/CHCl <sub>3</sub>	3 horas e 30 minutos	45%	Uma única mancha de Rf=0,4	[114]
CAN/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /m-CPBA	12 horas		Não se formou nenhum produto.	[115]
m-CPBA/CHCl <sub>3</sub> (Microondas, 350 W, 105°C, 7.1 bar, 5 minutos)	5 minutos		Mistura de produtos.	[116]

Finalmente, de acordo com a nossa pesquisa bibliográfica, foi preparado com sucesso (74%) um composto novo, o acetato de 9 $\alpha$ -hidroxi-17 $\alpha$ -oxa-17-oxo-homoestra-1,3,5(10)trien-3-ilo (composto **10**), por hidroxilação benzílica estereosselectiva na posição 9 do acetato de 17 $\alpha$ -oxa-D-homoestrone. A sua caracterização estrutural foi relativamente acessível tendo em conta os sinais dos espectros atribuídos quer ao acetato de 17 $\alpha$ -oxa-D-homoestrone (composto **9**), quer ao acetato de 9 $\alpha$ -hidroxi-17-oxoestra-1,3,5(10)-trien-3-ilo (composto **2**), que são compostos conhecidos.

Adicionalmente, foram incluídos na avaliação biológica os compostos 2-iodoestrone e 2-nitroestrone, que foram previamente preparados, purificados e caracterizados pela aluna Aura Vaz .

## 7.2. Avaliação biológica

### 7.3.1. Efeito da estrone nas células NHDF, MCF-7 e LNCaP

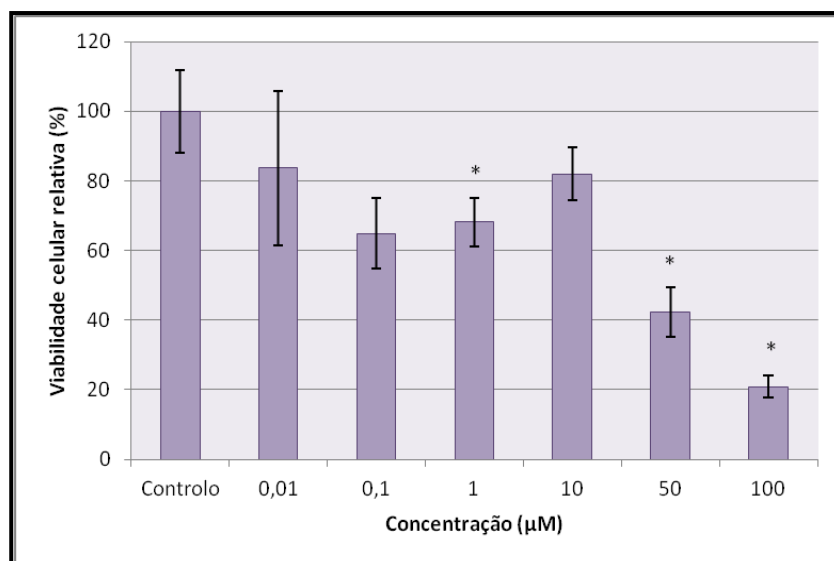


**Gráfico 1** - Efeito na viabilidade celular nas células NHDF e MCF-7, após 72 horas de exposição à estrone nas diferentes concentrações. \*p < 0,05 em relação ao controlo (Teste *t*-Student).

Pela análise do gráfico 1, podemos verificar que a estrone em concentrações baixas não estimulou o crescimento celular, e nas concentrações mais elevadas (50 e 100 µM) revelou-se tóxica, embora mais para as células NHDF do que para as MCF-7. Poderia questionar-se se a estrone deveria estimular o crescimento celular, dado tratar-se de um estrogénio (embora fraco) e de estas células terem a possibilidade de a converter em

estradiol, o que não se observou. Possivelmente o tempo de contacto poderá não ter sido suficiente para que isso acontecesse. Além disso, os meios de cultura têm estradiol, o que poderá “dissimular” o efeito estimulante do crescimento celular causado pela estrona.

Em relação aos efeitos da estrona nas células LNCaP, verifica-se novamente apenas toxicidade mais marcada nas duas concentrações mais elevadas. Contudo, pode equacionar-se um duplo comportamento dado verificar-se que a 10  $\mu\text{M}$  a não há acção antiproliferativa, ao contrário do que se observa a 1, 50 e 100  $\mu\text{M}$ , o que poderá sugerir mais do que um mecanismo de actuação destes compostos na sua ação antiproliferativa.



**Gráfico 2** - Efeito na viabilidade celular nas células LNCaP, após 72 horas de exposição à estrona nas diferentes concentrações. \* $p < 0,05$  em relação ao controlo (Teste  $t$ -Student).

### 7.3.2. Efeito do estradiol nas células NHDF, MCF-7 e LNCaP

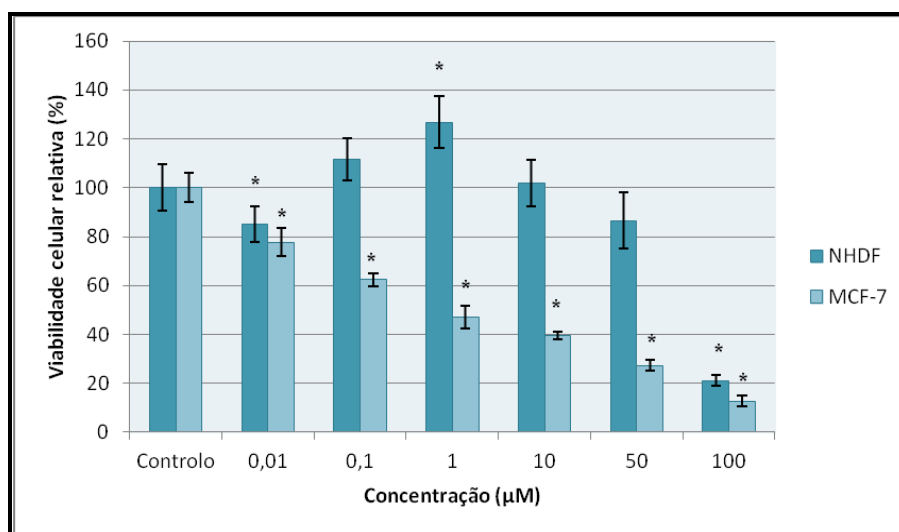


Gráfico 3 - Efeito na viabilidade celular nas células NHDF e MCF-7, após 72 horas de exposição ao estradiol nas diferentes concentrações. \* $p < 0,05$  em relação ao controlo (Teste  $t$ -Student).

Pela análise do gráfico 3 podemos concluir que nas células NHDF, na concentração de  $1 \mu\text{M}$  houve um estímulo do crescimento celular e apenas a  $100 \mu\text{M}$  se verificou um decréscimo da proliferação. Nas células MCF-7, ao contrário do esperado, uma vez que se trata do estrogénio por excelência, observou-se uma acção antiproliferativa, com um  $\text{IC}_{50}$  de cerca de  $1 \mu\text{M}$ . As razões para este resultado poderão estar associadas a pouco tempo de exposição das células ao composto, ao facto do meio de cultura conter FBS e vermelho de fenol e ao facto de as concentrações poderem ser consideradas elevadas em relação ao que se verifica endógenamente, quer nas mulheres em pré-, quer em pós-menopausa [42]. Assim, o ensaio deveria ser repetido, mas expondo as células durante mais dias ao estradiol, e usando meio sem vermelho de fenol e com soro ao qual se extraíram os esteróides, tal como efectuado por Maltais e colaboradores [119].

Nas células LNCaP (gráfico 4), de modo similar ao que se verificou nas células MCF-7, também foi observado um efeito antiproliferativo, mais marcado a partir de 10  $\mu\text{M}$ .

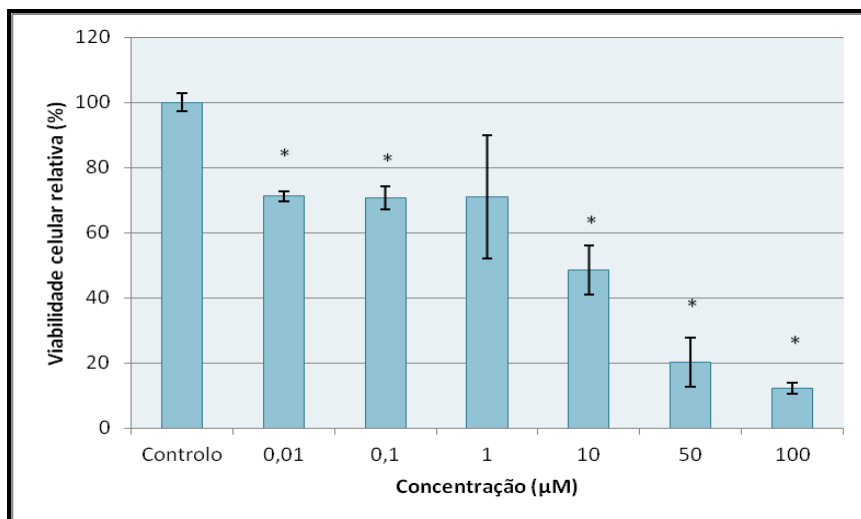


Gráfico 4 - Efeito na viabilidade celular nas células LNCaP, após 72 horas de exposição ao estradiol nas diferentes concentrações. \* $p < 0,05$  em relação ao controlo (Teste  $t$ -Student).

### 7.3.3. Efeito do composto 1 nas células NHDF, MCF-7 e LNCaP

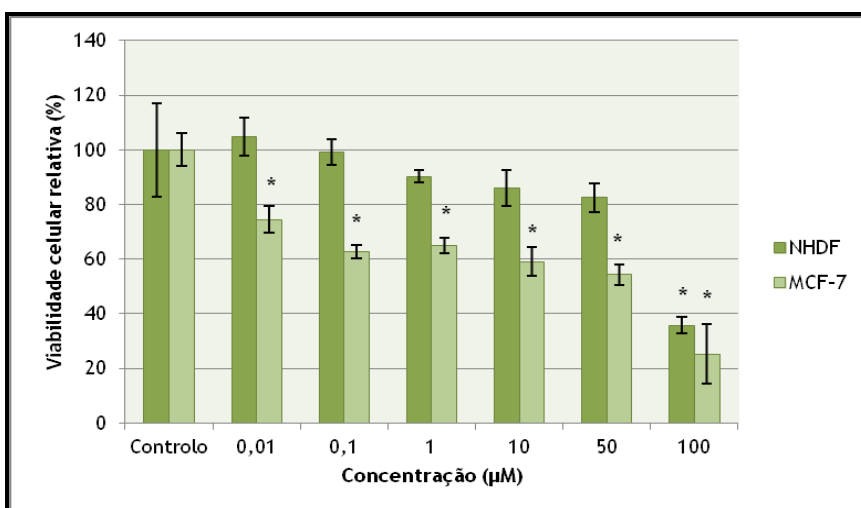


Gráfico 5 - Efeito na viabilidade celular nas células NHDF e MCF-7, após 72 horas de exposição ao composto 1 nas diferentes concentrações. \* $p < 0,05$  em relação ao controlo (Teste  $t$ -Student).

Para o acetato de estrona (composto 1) observou-se um comportamento intermédio entre o da estrona e o do estradiol nas células MCF-7. Na análise dos seus efeitos deve-se

equacionar a metabolização deste composto a estrona por esterases e também a redução pelas 17-HSDs [120]. Já nas células NHDF, ao contrário do que se verificou para o estradiol, não se observa qualquer estímulo do crescimento celular, e há acção antiproliferativa a 100  $\mu\text{M}$ . Nas células LNCaP (gráfico 6) observa-se novamente um efeito antiproliferativo, mais acentuado a 100  $\mu\text{M}$ .

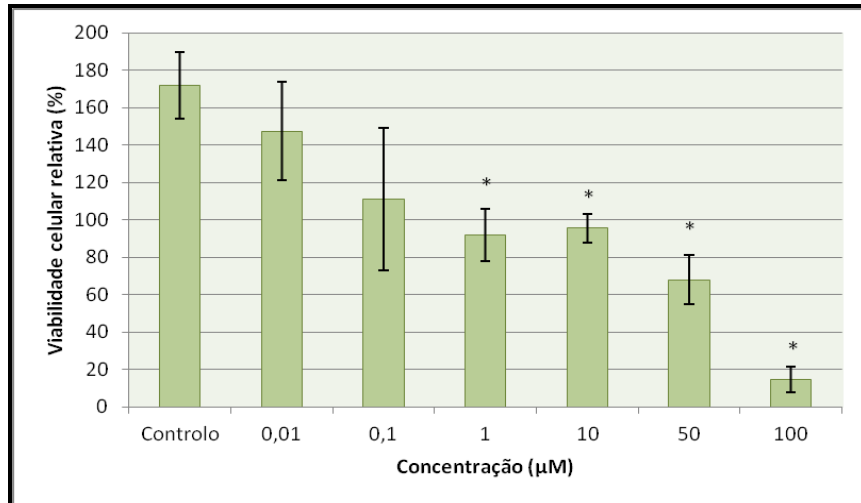


Gráfico 6 - Efeito na viabilidade celular nas células LNCaP, após 72 horas de exposição ao composto 1 nas diferentes concentrações. \* $p < 0,05$  em relação ao controlo (Teste  $t$ -Student).

#### 7.3.4. Efeito do composto 2 nas células NHDF, MCF-7 e LNCaP

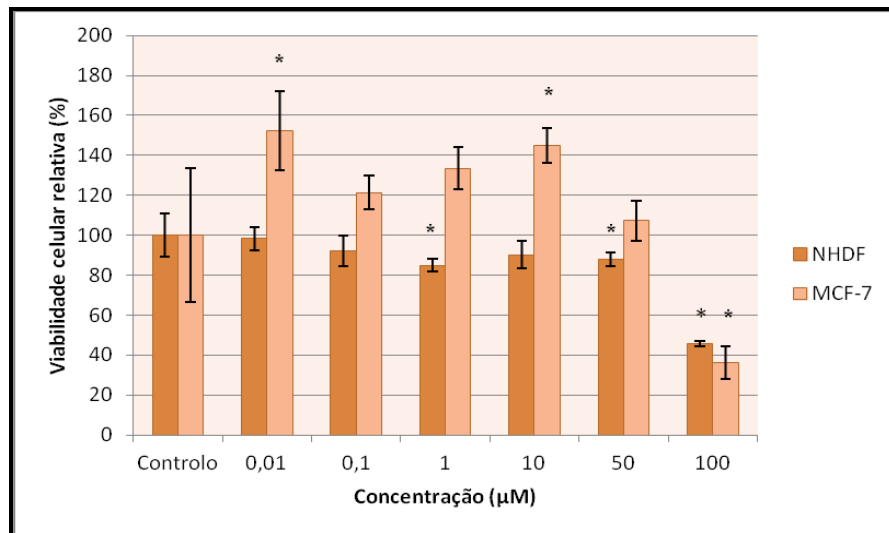
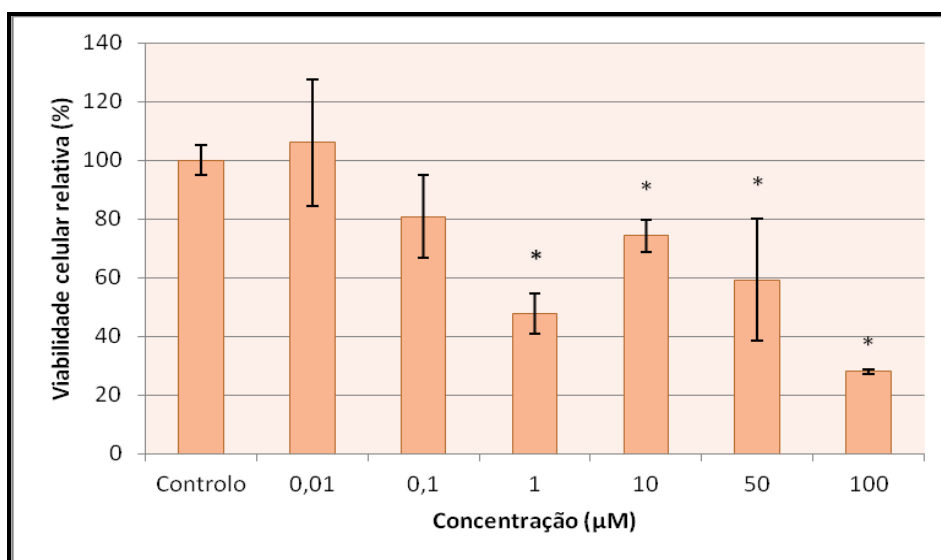


Gráfico 7 - Efeito na viabilidade celular nas células NHDF e MCF-7, após 72 horas de exposição ao composto 2 nas diferentes concentrações. \* $p < 0,05$  em relação ao controlo (Teste  $t$ -Student).

A introdução do 9 $\alpha$ -OH ao acetato de estrona, de que resultou o composto 2, originou um efeito interessante nas células MCF-7 (gráfico 7), em que se verificou um estímulo do crescimento celular em relação ao controlo. Na nossa pesquisa bibliográfica não foram encontradas indicações de que a introdução deste grupo ao esqueleto estrano favoreça a interacção e maior activação dos receptores de estrogénios, o que pode constituir uma novidade importante, pois este tipo de estrutura pode, assim, por um lado ser interessante como agente estrogénico, nomeadamente em anticoncepção e em terapia hormonal de substituição, e por outro lado ser muito perigoso no que respeita a tumores hormono-dependentes. Nas células NHDF (gráfico 7) não se destacam efeitos proeminentes, a não ser acção antiproliferativa mais acentuada a 100  $\mu$ M.

Nas células LNCaP (gráfico 8), observa-se um comportamento não muito diferente do observado para a estrona (gráfico 2).



**Gráfico 8** - Efeito na viabilidade celular nas células LNCaP, após 72 horas de exposição ao composto 2 nas diferentes concentrações. \* $p < 0,05$  em relação ao controlo (Teste  $t$ -Student).

### 7.3.5. Efeito do composto 3 nas células NHDF, MCF-7 e LNCaP

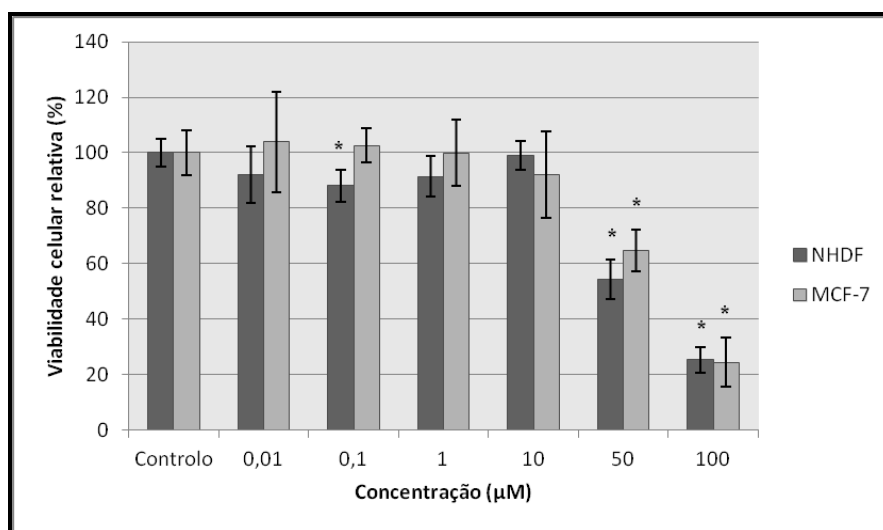


Gráfico 9 - Efeito na viabilidade celular nas células NHDF e MCF-7, após 72 horas de exposição ao composto 3 nas diferentes concentrações. \*p < 0,05 em relação ao controlo (Teste *t*-Student).

Para o composto 3 (obtido por desidratação do composto 2, sendo maioritariamente o derivado com uma dupla ligação em C9-C11, ainda 3-acetilado) observa-se claramente que a saída do grupo OH do composto 2 tem um efeito marcado na sua actividade citotóxica nas células MCF-7, já não se observando um estímulo do seu crescimento (gráfico 9). Nas células NHDF observa-se um comportamento similar ao ocorrido nas MCF-7.

Nas células LNCaP (gráfico 10), a introdução desta dupla ligação levou a que, excepto a 100 µM, já não se observassem os efeitos antiproliferativos observados para os compostos descritos acima. Possivelmente a inexistência do grupo polar OH pode interferir negativamente na interacção com alvos biológicos.

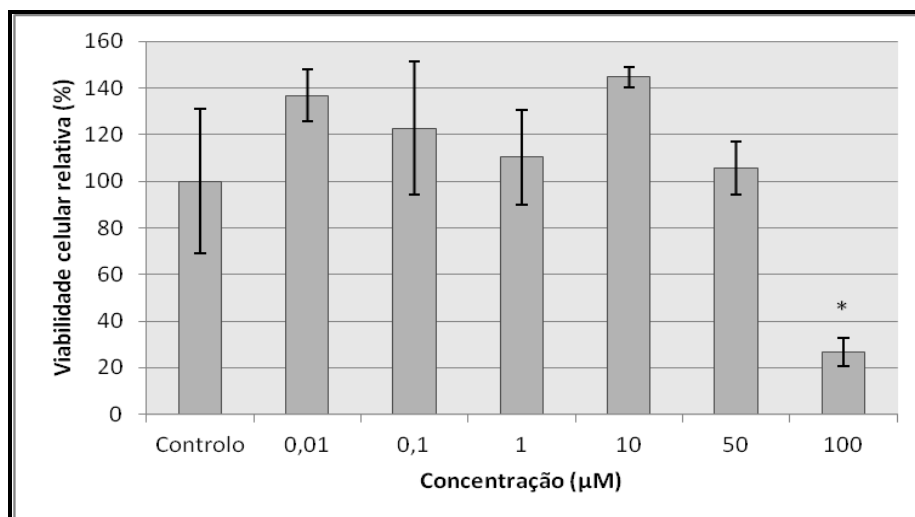


Gráfico 10 - Efeito na viabilidade celular nas células LNCaP, após 72 horas de exposição ao composto 3 nas diferentes concentrações. \*p < 0,05 em relação ao controlo (Teste *t*-Student).

### 7.3.6. Efeito do composto 4 nas células NHDF, MCF-7 e LNCaP

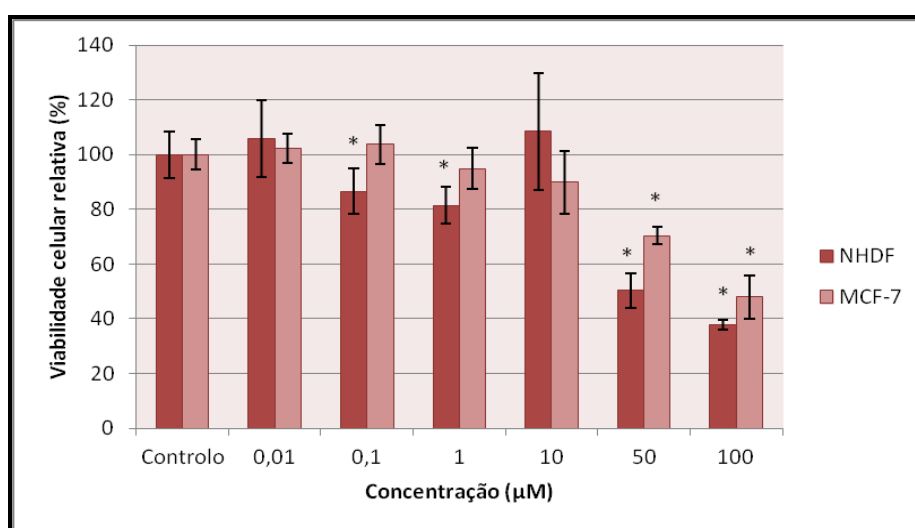


Gráfico 11 - Efeito na viabilidade celular nas células NHDF e MCF-7, após 72 horas de exposição ao composto 4 nas diferentes concentrações. \*p < 0,05 em relação ao controlo (Teste *t*-Student).

O “composto 4”, sendo uma mistura de estruturas, em que poderá predominar o derivado com uma dupla ligação em C9-C11, mas com o OH-3 livre, de acordo com o discutido acima, origina, nas células NHDF e MCF-7 (gráfico 11), efeito aproximadamente similar ao observado para o composto 3. Contudo, nas células LNCaP (gráfico 12) observa-se uma toxicidade marcada, possivelmente associada à existência do OH livre.

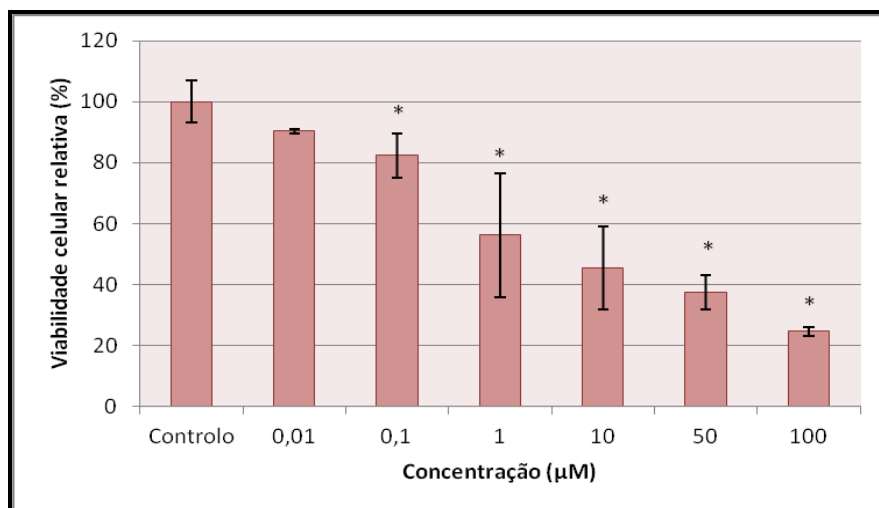


Gráfico 12 - Efeito na viabilidade celular nas células LNCaP, após 72 horas de exposição ao composto 4 nas diferentes concentrações. \*p < 0,05 em relação ao controlo (Teste *t*-Student).

### 7.3.7. Efeito do composto 6 nas células NHDF, MCF-7 e LNCaP

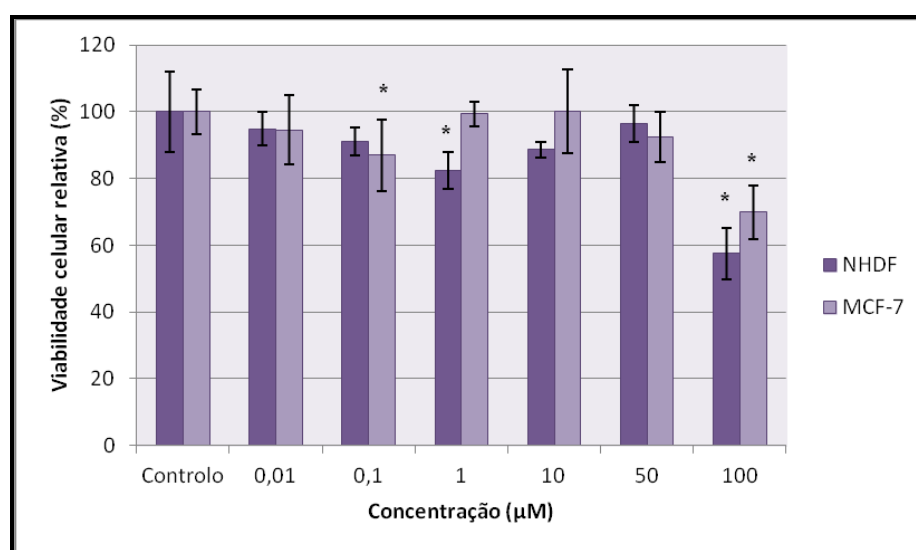


Gráfico 13 - Efeito na viabilidade celular nas células NHDF e MCF-7, após 72 horas de exposição ao composto 6 nas diferentes concentrações. \*p < 0,05 em relação ao controlo (Teste *t*-Student).

O composto 6 (quinol) revelou fraca toxicidade nas células MCF-7 e NHDF (gráfico 13), excepto a 100 μM. Tal como esperado, uma vez que está descrito que tem fraca capacidade estrogénica [82] também não se observou um estímulo no crescimento celular.

Nas células LNCaP (gráfico 14), apesar da variabilidade de resultados também parece não exercer efeitos marcados na proliferação, novamente exceptuando a concentração de 100  $\mu\text{M}$ .

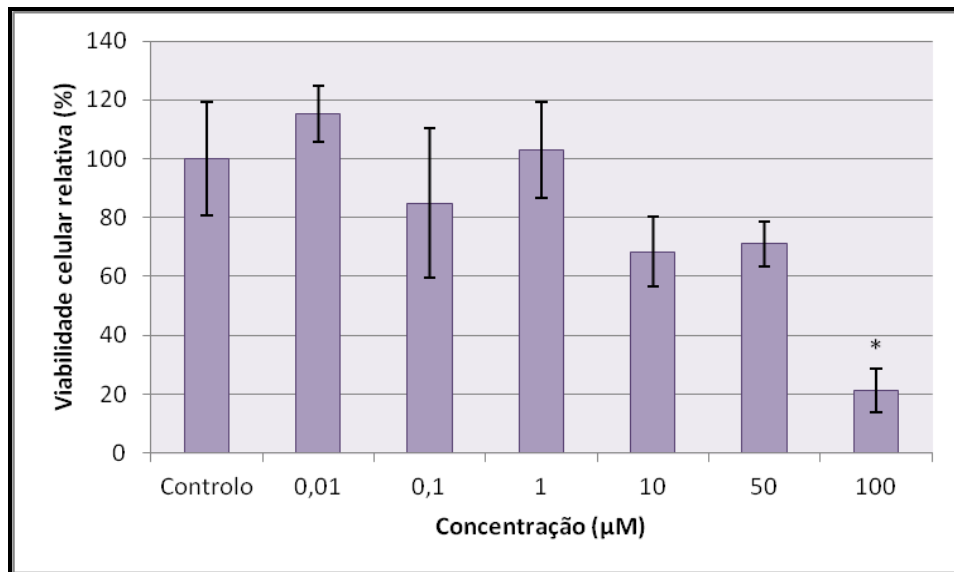


Gráfico 14 - Efeito na viabilidade celular nas células LNCaP, após 72 horas de exposição ao composto 6 nas diferentes concentrações. \* $p < 0,05$  em relação ao controlo (Teste  $t$ -Student).

### 7.3.8. Efeito do composto 7 nas células NHDF, MCF-7 e LNCaP

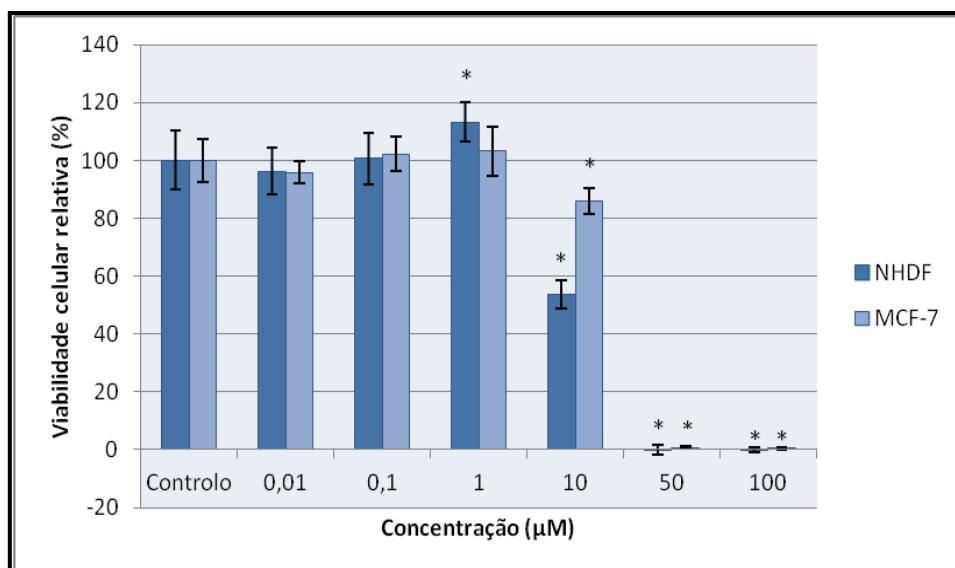


Gráfico 15 - Efeito na viabilidade celular nas células NHDF e MCF-7, após 72 horas de exposição ao composto 7 nas diferentes concentrações. \* $p < 0,05$  em relação ao controlo (Teste  $t$ -Student).

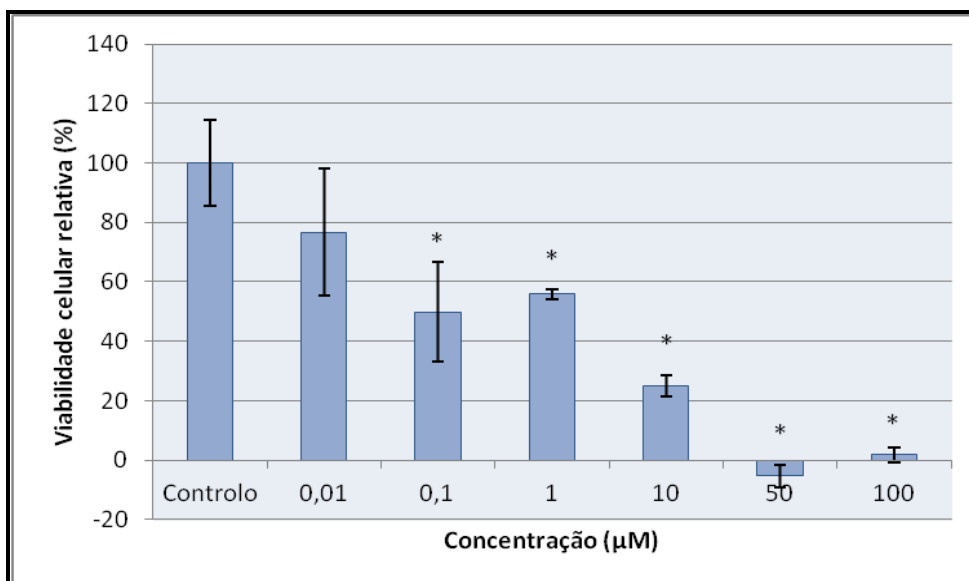


Gráfico 16 - Efeito na viabilidade celular nas células LNCaP, após 72 horas de exposição ao composto 7 nas diferentes concentrações. \*p < 0,05 em relação ao controlo (Teste *t*-Student).

O composto 7 (acetato de 9 $\alpha$ -hidroxi-11 $\beta$ -nitrooxi-17-oxoestra-1,3,5(10)-trien-3-ilo) tem um comportamento diferente dos anteriores (gráfico 15). Apesar de já ter sido estudado em modelos *in vivo* de tumores mamários [78, 79] e ter mostrado inicialmente que tinha ação antitumoral e que, com o passar dos dias, devido à sua actividade estrogénica, acabar por estimular o crescimento tumoral, nunca tinha sido estudado nestas células (de acordo com a pesquisa bibliográfica efectuada). O que observamos neste estudo é que nas concentrações de 50 e 100  $\mu$ M ocorre morte total das células, confirmando as observações anteriores de que tinha acção antiproliferativa. No futuro dever-se-á estudar os efeitos destes compostos em tempos mais longos para confirmar os resultados anteriores. De destacar ainda que este composto, além de estimular o crescimento das células NHDF a 1  $\mu$ M, parece ser, contudo, mais tóxico para estas células ( $IC_{50}$  ~ 10  $\mu$ M) do que para as MCF-7 ( $IC_{50}$  entre 10  $\mu$ M e 50  $\mu$ M) (gráfico 15).

Nas células LNCaP (gráfico 16) também se observa um efeito antiproliferativo marcado.

### 7.3.9. Efeito do composto 9 nas células NHDF, MCF-7 e LNCaP

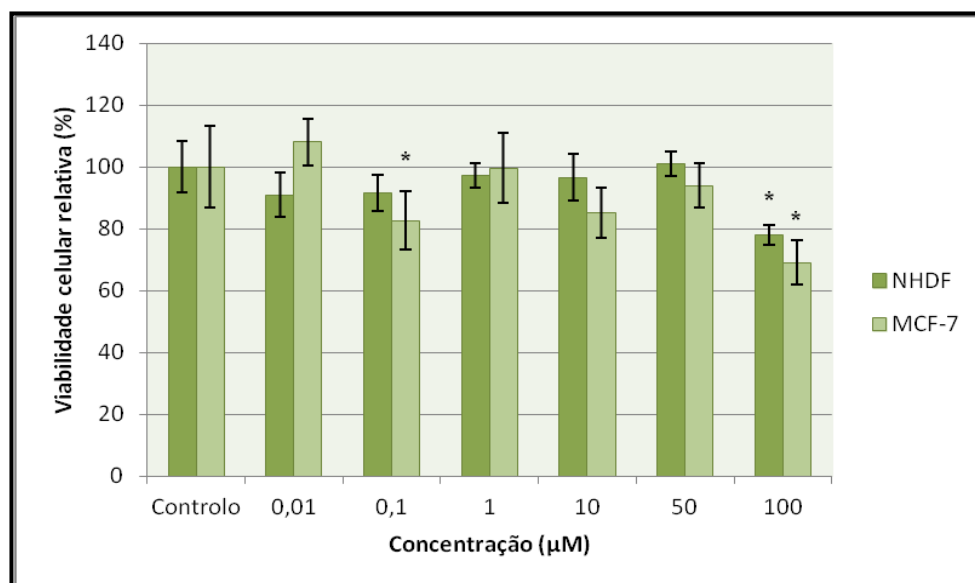


Gráfico 17 - Efeito na viabilidade celular nas células NHDF e MCF-7, após 72 horas de exposição ao composto 9 nas diferentes concentrações. \* $p < 0,05$  em relação ao controlo (Teste  $t$ -Student).

O composto 9 (acetato de 17 $\alpha$ -oxa-D-homoestrona), apesar de ter uma lactona no anel D praticamente não evidencia efeitos antiproliferativos nas células MCF-7 e NHDF (gráfico 17). Este resultado é um pouco surpreendente dado estarem descritos vários esteróides com o anel D lactonizado com 6 membros, incluindo a testolactona, com potencial acção antitumoral [83, 85]. Além disso, os estudos de afinidade para a enzima 17 $\beta$ -HSD-1 efectuados pela aluna Aura Vaz [117] revelaram que compostos com esta função tinham elevada afinidade para esta enzima, sendo, por isso potenciais inibidores da mesma. No entanto, muito recentemente, Minorics e colaboradores [118] reportaram que a D-homoestrona e a 13-*epi*-D-homoestrona e os seus éteres metílicos revelaram fraca acção antiproliferativa contra as células MCF-7 ( $IC_{50} > 30 \mu M$ ).

Já para as células LNCaP (gráfico 18), observa-se que há acção antiproliferativa marcada em todas as concentrações, em comparação com o controlo, o que pode ser de elevado interesse para explorar futuramente, dada a potencial selectividade perante as células MCF-7 e NHDF.

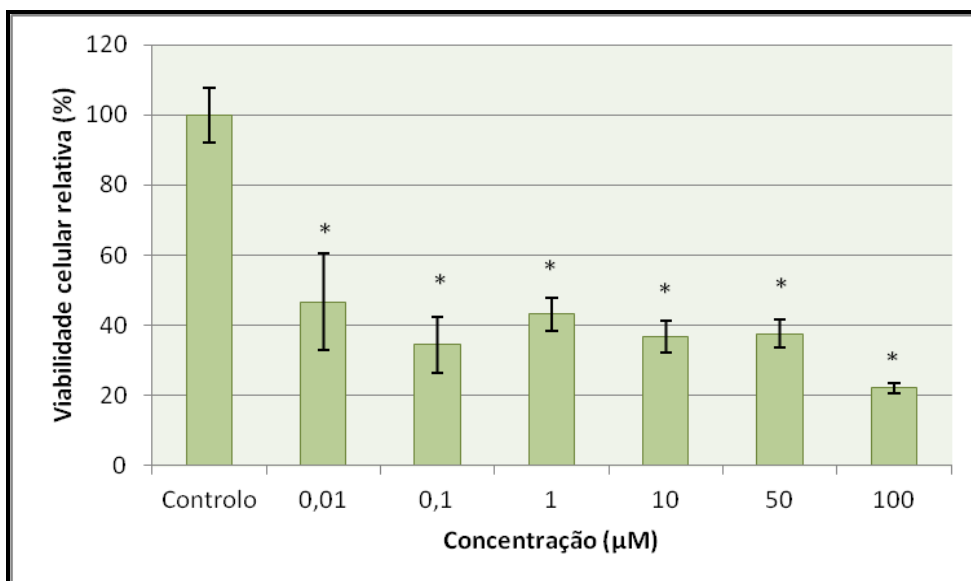


Gráfico 18 - Efeito na viabilidade celular nas células LNCaP, após 72 horas de exposição ao composto 9 nas diferentes concentrações. \*p < 0,05 em relação ao controlo (Teste *t*-Student).

### 7.3.10. Efeito do composto 10 nas células NHDF, MCF-7 e LNCaP

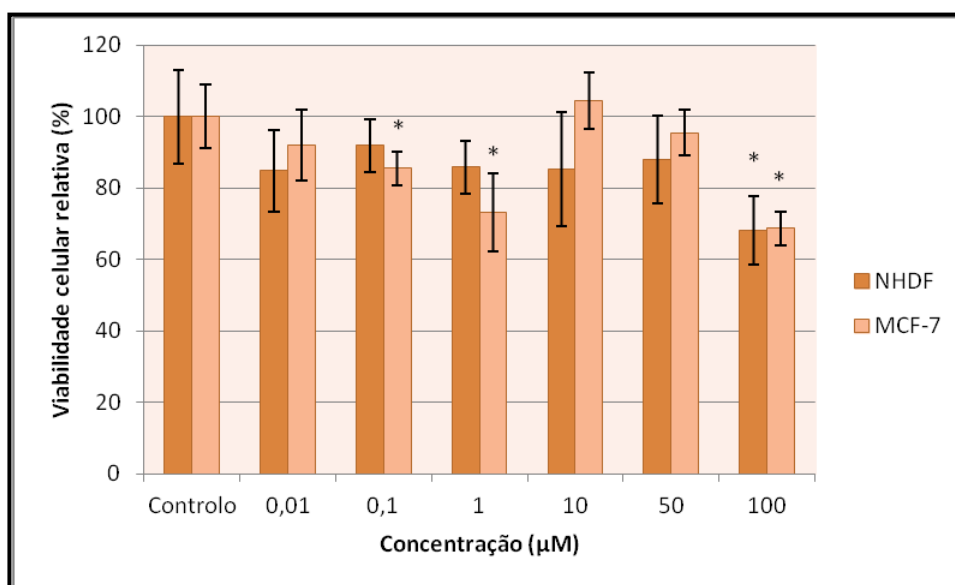
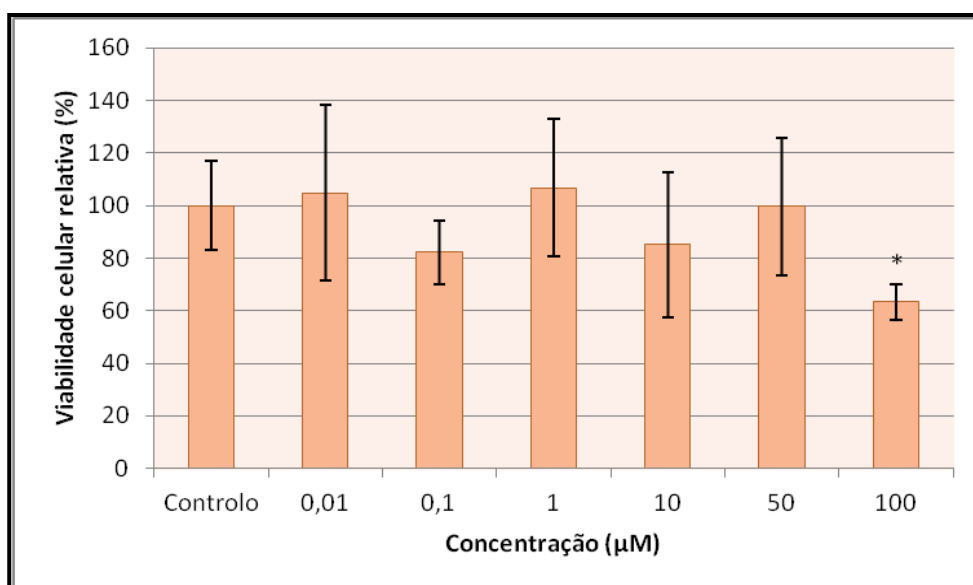


Gráfico 19 - Efeito na viabilidade celular nas células NHDF e MCF-7, após 72 horas de exposição ao composto 10 nas diferentes concentrações. \*p < 0,05 em relação ao controlo (Teste *t*-Student).

De acordo com a pesquisa bibliográfica efectuada, o composto **10** (acetato de 9 $\alpha$ -hidroxi-17 $\alpha$ -oxa-D-homoestrone) é um composto novo e portanto também não terá sido avaliado como potencial agente antiproliferativo. Da análise dos gráficos 19 e 20 verifica-se que não tem efeitos antiproliferativos marcados. Ao comparar com o composto **2** (gráficos 7 e 8) verifica-se que já não ocorre a acção proliferativa nas células MCF-7 e antiproliferativa nas LNCaP observadas para o composto **2**, o que sugere que a introdução da referida lactona pode mitigar potenciais efeitos estrogénicos. Em relação aos efeitos nas células LNCaP, observa-se que neste composto há fraca acção antiproliferativa, o que parece não ser concordante nem com os resultados observados nestas células com o composto **2** nem com o composto **9**.



**Gráfico 20** - Efeito na viabilidade celular nas células LNCaP, após 72 horas de exposição ao composto **10** nas diferentes concentrações. \* $p < 0,05$  em relação ao controlo (Teste  $t$ -Student).

### 7.3.11. Efeito do composto 2-iodoestrone nas células NHDF, MCF-7 e LNCaP

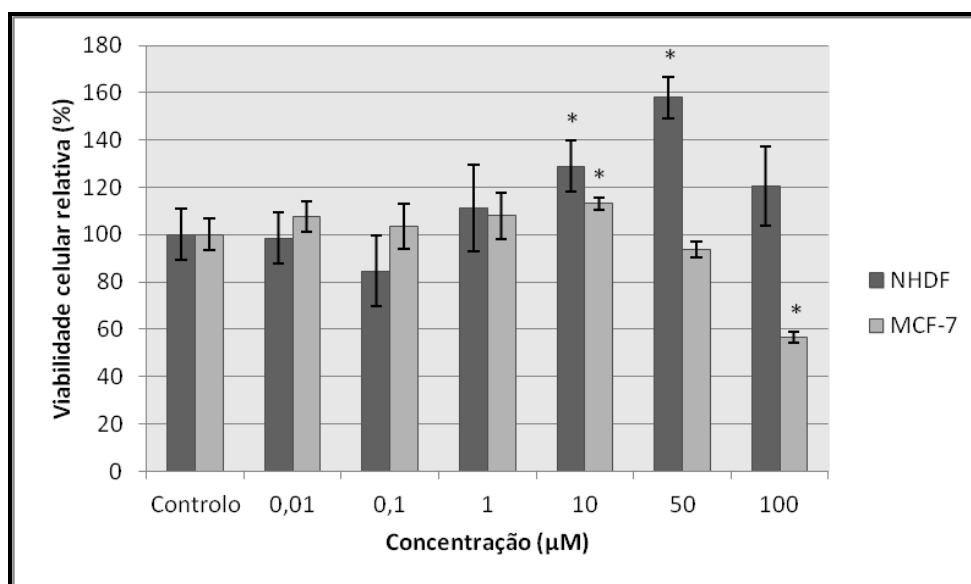


Gráfico 21 - Efeito na viabilidade celular nas células NHDF e MCF-7, após 72 horas de exposição à 2-iodoestrone nas diferentes concentrações. \*p < 0,05 em relação ao controlo (Teste t-Student).

A 2-iodoestrone nas células NHDF levou a uma proliferação celular significativa nas concentrações 10 e 50 μM, e nas células MCF-7 não tem efeitos marcados na proliferação celular (gráfico 21). Dado o comportamento deste composto, são necessários mais estudos para confirmar este resultado e tentar elucidar o que estará na base deste resultado.

Nas células LNCaP (gráfico 22) não se podem tirar conclusões claras uma vez que os desvios-padrão são muito elevados. A razão dos desvios-padrão elevados nos ensaios com as células LNCaP é que na fase de aspiração do sobrenadante após a incubação das células com o MTT, há alguns cristais de formazano que se soltam e que são aspirados.

Estes resultados são um pouco surpreendentes uma vez que está reportado que o 2-iodoestradiol é um relativamente potente agente antiproliferativo contra células de cancro da mama (MDA-MB-435), da próstata (DU-145) e várias outras [120].

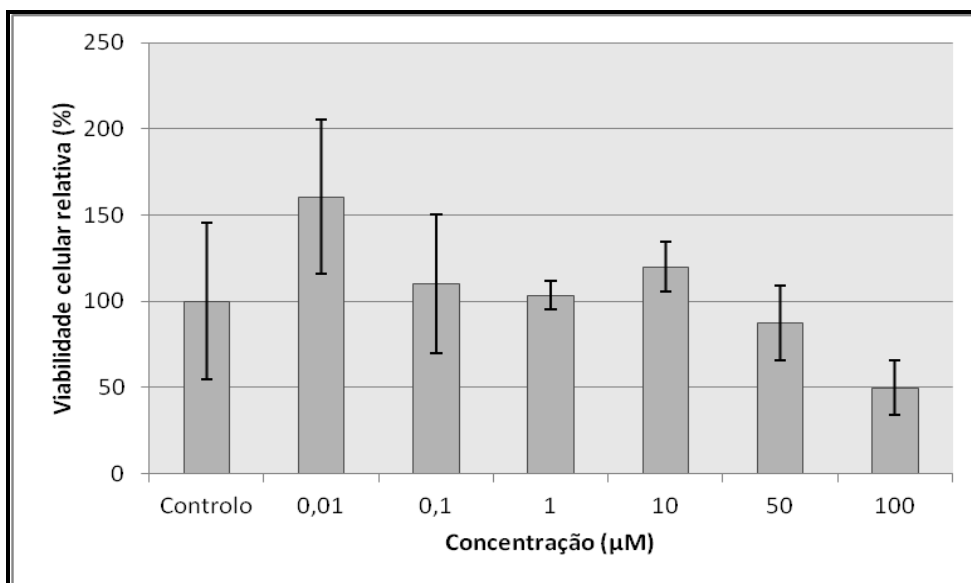


Gráfico 22 - Efeito na viabilidade celular nas células LNCaP, após 72 horas de exposição à 2-iodoestrone nas diferentes concentrações. \*p < 0,05 em relação ao controlo (Teste *t*-Student).

### 7.3.12. Efeito do composto 2-nitroestrone nas células NHDF, MCF-7 e LNCaP

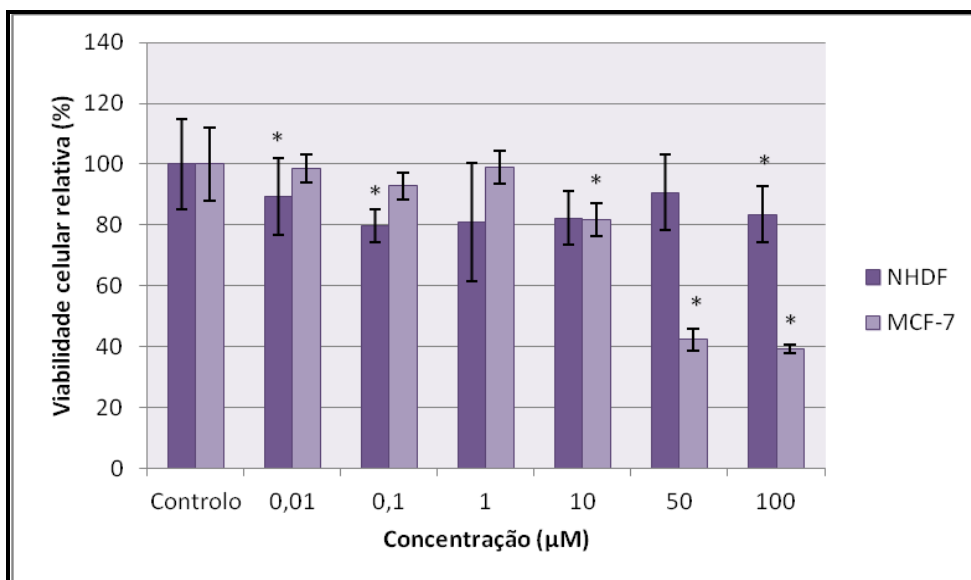
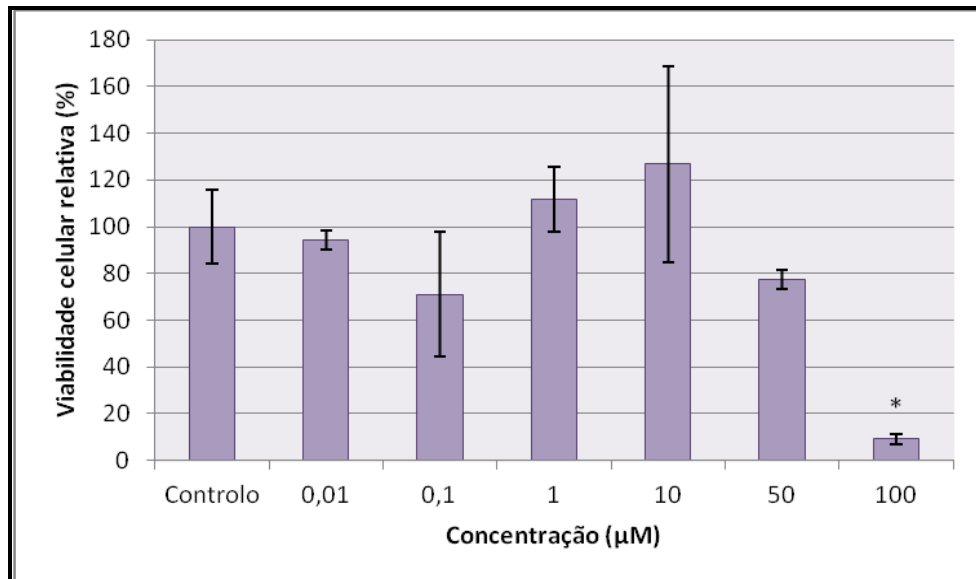


Gráfico 23 - Efeito na viabilidade celular nas células NHDF e MCF-7, após 72 horas de exposição à 2-nitroestrone nas diferentes concentrações. \*p < 0,05 em relação ao controlo (Teste *t*-Student).

A 2-nitroestrone, conhecida por não ter efeitos estrogénicos marcados [82], como esperado, não estimulou o crescimento celular das células MCF-7. Nas concentrações 50 e 100

$\mu\text{M}$  observa-se até uma acção antiproliferativa selectiva para estas células em relação às NHDF (gráfico 23).

Nas células LNCaP (gráfico 24), verifica-se que apenas a 100  $\mu\text{M}$  há efeitos antiproliferativos significativos.



**Gráfico 24** - Efeito na viabilidade celular nas células LNCaP, após 72 horas de exposição à 2-nitroestrone nas diferentes concentrações. \* $p < 0,05$  em relação ao controlo (Teste  $t$ -Student).

## 8. Conclusão

Os cancros hormono-dependentes dos quais fazem parte alguns cancros da mama, da próstata e do endométrio, encontram-se entre as principais doenças do mundo moderno. Neste contexto, o cancro da mama é a principal causa de morte relacionada com cancro em mulheres em todo o mundo, o que justifica a premente necessidade de desenvolver fármacos úteis contra esta patologia. Assim, o objetivo geral do presente trabalho consistiu na funcionalização de estrogénios esteroides, para tentar desenvolver potenciais agentes antitumorais.

As sínteses propostas e parcialmente realizadas basearam-se em estudos de relação estrutura-actividade já conhecidos e entre os vários compostos sintetizados purificados e caracterizados estruturalmente, foi preparado um composto, ao que tudo indica, novo: o acetato de 9 $\alpha$ -hidroxi-17 $\alpha$ -oxa-17-oxo-homoestra-1,3,5(10)trien-3-ilo. No decorrer dos estudos sintéticos foram ainda explorados vários processos para efectuar a reacção de Baeyer-Villiger no acetato de estrona.

Para tentar determinar a sua potencialidade antiproliferativa, os compostos sintetizados foram testados em três tipos de linhas celulares, NHDF, MCF-7 e LNCaP, tendo-se chegado a várias observações/conclusões mais relevantes:

-a estrona, em concentrações elevadas, revelou toxicidade principalmente nas células LNCaP, e mostrou-se mais tóxico para as células NHDF do que para as MCF-7. Por sua vez, o estradiol na concentração de 1  $\mu$ M estimulou o crescimento das células NHDF e mostrou atividade antiproliferativa marcada nas células MCF-7 e LNCaP;

-comparando os gráficos da estrona com os do acetato de estrona, verificou-se que a presença do 3 $\beta$ -acetato teve maior efeito antiproliferativo nas células MCF-7 do que se observou na estrona, mas levou a menor toxicidade nas células NHDF; o acetato de estrona nas células LNCaP teve aparentemente maior acção antiproliferativa do que a estrona, embora o perfil de actuação não seja muito similar;

-a introdução do grupo 9 $\alpha$ -hidroxilo ao acetato de estrona, surpreendentemente, provocou um estímulo significativo do crescimento nas células MCF-7, o que não aconteceu nas células NHDF; nas células LNCaP observou-se um comportamento similar ao originado pela estrona (dual);

-no composto 3, apesar de haver mistura de produtos, observa-se que a saída do grupo 9-OH e a introdução de uma dupla ligação em C9-C11 já não originou efeito proliferativo nas células MCF-7, ocorrendo até redução da proliferação nas duas concentrações mais elevadas; nas células LNCaP tem fraca toxicidade;

-o “composto 4”, apesar de ser uma mistura de compostos com predomínio da dupla ligação C9-C11 e com o OH livre, tem efeito aproximadamente similar ao composto 3 nas células MCF-7 e NHDF, mas nas células LNCaP observa-se uma citotoxicidade marcada, que pode ser associada ao OH-3 livre;

-o composto 6 (quinol), revelou fraca acção antiproliferativa, mas também não favoreceu a proliferação celular;

-o composto 7 (derivado com os grupos 9 $\alpha$ -OH e 11 $\beta$ -nitro) revelou-se muito tóxico nas 3 linhas celulares, especialmente nas três concentrações mais elevadas;

-os D-homoderivados, tendo ou não o grupo OH-9 não se mostraram significativamente antiproliferativos nas células MCF-7 e NHDF; contudo, nas células LNCaP o derivado sem o grupo 9-OH revelou-se marcadamente citotóxico, ao contrário do análogo hidroxilado;

-a funcionalização da posição 2 da estrona não só não levou a actividades antiproliferativas marcadas, como no caso da 2-iodoestrone nas células NHDF levou a um aumento da proliferação a 10 e a 50  $\mu$ M, o que implica estudos futuros designadamente no que respeita à segurança deste composto;

Assim, dos resultados observados não podem ser tiradas conclusões muito concretas dada a variabilidade de resultados obtidos. Podemos, contudo, concluir genericamente que:

-as respostas observadas para o estradiol, estrone e acetato de estrone não foram ao encontro do esperado, sendo inclusivamente o estradiol e o acetato de estrone os compostos com maior acção antiproliferativa nas células MCF-7;

-a introdução do grupo 9 $\alpha$ -OH teve diferentes tipos de implicações na proliferação das células estudadas nas condições referidas;

-a introdução da dupla ligação em C9-C11 e da lactona no anel D parecem não ter efeito muito relevante nas acções antiproliferativas;

-nas células LNCaP, exceptuando para os derivados D-homo, a acção antiproliferativa mais marcada está associada à presença de grupos OH em C3 ou em C9.

## 9. Perspetivas futuras

-Estudo das condições reacionais das reações de desidratação e hidrólise de forma a obter com melhores rendimentos e seletividades os produtos pretendidos, assim como a oxidação alílica, uma vez que, segundo a nossa pesquisa bibliográfica, o composto que se pretendia obter é novo e, portanto, não avaliado.

-Estudos de inibição das enzimas 17 $\beta$ -HSD tipo 1 e das esteróides sulfatases pelos compostos sintetizados.

-Combinar alterações no anel D com outras funcionalizações no núcleo esteróide, para aumentar a informação disponível sobre a relação estrutura-actividade

-Estudar tempos de exposição mais prolongados aos compostos, nomeadamente durante 6 dias e realizar ensaios na ausência de esteróides e de vermelho de fenol, para esclarecimento do comportamento das células MCF-7 relativamente a este composto.

-Avaliação dos tipos de morte celular no caso dos compostos que revelaram ter maior actividade antiproliferativa

-Esclarecimento dos efeitos dos compostos em que há potencialidade para originarem efeitos potencialmente tóxicos, nomeadamente da 2-iodoestrone nas células NHDF e da acetato de 9 $\alpha$ -hidroxiestrone nas células MCF-7.

# 10. Bibliografia

- [1] Faller A., Schuenke, M. The Human Body, An Introduction to Structure and Function, **2004**.
- [2] Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 6th Ed., D.A. Williams; T.L. Lemke, Lippincott Williams & Wilkins, **2008**, Cap. 33.
- [3] BIOQUÍMICA Organização Molecular da Vida, A. Quintas; A.P. Freire; M.J. Halpern, Lidel, **2008**, 459-464.
- [4] Lucki, N. C.; Sewer, M. B. The interplay between bioactive sphingolipids and steroid hormones, *Steroids*, **2010**, *75*, 390-399.
- [5] Human Physiology, 8<sup>th</sup> Ed., S.I. Fox, The McGraw-Hill, **2003**, 292.
- [6] Tsai, L. L.; Beavo, J. A. The roles of cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) in steroidogenesis, *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2011**, *11*, 670-675.
- [7] Vinson G. P. Adrenocortical zonation and ACTH, *Microsc. Res. Tech.*, **2003**, *61*, 227-239.
- [8] Kawata, M. Role of steroid hormones and their receptors in structural organization in the nervous system, *Neurosci. Res.*, **1995**, *24*, 1-46.
- [9] Wynsberghe, D. V.; Noback, C. R.; Carola, R. *Human Anatomy & Physiology*, McGraw-Hill, Inc.: Boston-Burr Ridge-Dubuque-Madison-New York-SanFrancisco-St.Louis, **1995**.
- [10] Guyton, A. C., Hall, J. E., *Textbook of Medicinal Physiology*, WB Saunders Company: Philadelphia, **2000**.
- [11] Fishman, J.; Nisselbaum, J. S.; Menendez-Botet, C. J.; Schwartz, M. K. Estrone and estradiol content in breast tumors, *J. Steroid Biochem.*, **1977**, *8*, 893-896.
- [12] Cadot, C.; Laplante, Y.; Kamal, F.; Luu-The, V.; Poirier, D. C6-(N,N-butyl-methyl-heptanamide) derivatives of estrone and estradiol as inhibitors of type 1 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase: Chemical synthesis and biological evaluation. *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, *15*, 714-726, e referências aí citadas.
- [13] Adams, J. B. Control of secretion and the function of C<sub>19</sub>- $\Delta^5$ -steroids of the human adrenal gland. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **1985**, *41*, 1-17.

- [14] Payne, A. H.; Hales, D. B. Overview of Steroidogenic Enzymes in the Pathway from Cholesterol to Active Steroid Hormones, *Endocr. Rev.*, **2004**, *25*, 947-970.
- [15] Phillips-Wren, G.; Sharkey, P. & Dy, S. M. Mining lung cancer patient data to assess healthcare resource utilization, *Expert Syst. Appl.*, **2008**, *35*, 1611-1619.
- [16] Shah, S.; Kusia, A. Cancer gene search with data-mining and genetic algorithms, *Comp. Biol. Med.*, **2007**, *37*, 251-261.
- [17]. Grander D. How do mutated oncogenes and tumor suppressor genes cause cancer?, *Med. Oncol.*, **1998**, *15*, 20-26.
- [18] Tysnes, B. B.; Bjerkvig, R. Cancer initiation and progression: Involvement of stem cells and the microenvironment, *Biochim. Biophys. Acta.*, **2007**, *1775*, 283-297.
- [19] Brožič, P.; Rižner, L.; Gobec, S. Inhibitors of 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1, *Curr. Med. Chem.*, **2008**, *15*, 137-150.
- [20] Goldhirsch, A.; Glick, J. H. Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer, 2005, *Ann. Oncol.*, **2005**, *10*, 1569.
- [21] Choudhary, M. I.; Alam, M. S.; Atta-ur-Rahman; Yousuf, S.; Wu, Y.; Lin, A.; Shaheen, F. Pregnenolone derivatives as potential anticancer agents, *Steroids*, **2011**, *76*, 1554-1559.
- [22] Kamangar, F.; Dores, G. M.; Anderson, W. F. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world, *J. Clin. Oncol.*, **2006**, *14*, 2137-2150.
- [23] Delen, D.; Walker, G.; Kadam, A. Predicting breast cancer survivability: a comparison of three data mining methods, *Art. Intel. Med.*, **2005**, *34*, 113-127.
- [24] Abdulkareem, I. H.; Zurmi, I.B.; Review of hormonal treatment of breast cancer, *J. Clin. Pract.*, **2012**, *15*, e referências aí citadas.
- [25] Hartman, J.; Ström, A.; Gustafsson, J. Estrogen receptor in breast cancer - Diagnostic and therapeutic implications, *Steroids*, **2009**, *74*, 635-641, e referências aí citadas.
- [26] Visvader, J. E. Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis, *Genes. Dev.*, **2009**, *23*, 2563-77.

- [27] Shackleton, M.; Vaillant, F.; Simpson, K. J.; Stingl, J.; Smyth, G. K.; Asselin-Labat, M. L., et al. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell, *Nature*, **2006**, *439*, 84-8.
- [28] Hennighausen, L.; Robinson, G. W. Information networks in the mammary gland, *Nat. Rev.*, **2005**, *6*, 714-25.
- [29] Hovey, R. C.; Trott, J. F.; Vonderhaar, B. K. Establishing a framework for the functional mammary gland: from endocrinology to morphology, *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia*, **2002**, *7*, 17-38.
- [30] Tlstv, T. D.; Hein, P. W. Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **2001**, *11*, 54-9.
- [31] Gupta, G. P.; Massague, J. Cancer metastasis: building a framework, *Cell.*, **2006**, *127*, 679-95.
- [32] Polyak, K.; Haviv, I. Campbell, I. G. Co-evolution of tumor cells and their microenvironment, *Trends. Genet.*, **2009**, *25*, 30-8.
- [33] Pasqualini, J. R.; Chetrite, G. S. Recent insight on the control of enzymes involved in estrogen formation and transformation in human breast cancer, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **2005**, *93*, 221-236, e referências aí citadas.
- [34] Tremblay, M. R.; Poirier, D. Overview of a Rational Approach to Design Type I 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Inhibitors Without Estrogenic Activity: Chemical Synthesis and Biological Evaluation, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **1998**, *66*, 179-191.
- [35] Mostafa, Y. A; Taylor, S. D. 17 $\beta$ -Arylsulfonamides of 17 $\beta$ -aminoestra-1,3,5(10)-trien-3-ol as highly potent inhibitors of steroid sulfatase, *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, *20*, 1535-1544.
- [36] Raam, S.; Robert, N.; Pappas, C. A. Tamura H. Defective estrogen receptors in human mammary cancers: their significance in defining hormone dependence, *J. Natl. Cancer Inst.*, **1988**, *80*, 756-761.
- [37] Fuqua, S. A. W.; Fitzgerald, S. D.; Chamness, G. C.; Tandon, A. K.; McDonnell, D. P.; Nawaz, B. W.; O'Malley, B. W.; McGuire, W. L. Variant human breast tumor estrogen receptor with constitutive transcriptional activity, *Cancer Res.*, **1991**, *51*, 105-109.

- [38] Hewitt, S. C.; Harrell, J. C.; Korach, K.S. Lessons in estrogen from knockout and transgenic animals, *Annu. Rev. Physiol.*, **2005**, *67*, 285-308.
- [39] Suzuki T., Moriya, T., Ishida T., Ohuchi, N., Sasano, H. Intracrine mechanism of estrogen synthesis in breast cancer, *Biomed. Pharmacot.*, **2003**, *57*, 460-462.
- [40] Kumar, S., Lata, K., Mukhopadhyay, S., Mukherjee, T. P. Role of estrogen receptors in pro-oxidative and anti-oxidative actions of estrogens: A perspective, *Biochim. Biophys. Acta*, **2010**, *1800*, 1127-1135.
- [41] Wölfling, J., Mernyák, E., Frank, E., Falkay, G., Márkib, Á., Minorics, R., Schneider, G. Synthesis and receptor-binding examinations of the normal and 13-*epi*-D-homoestrones and their 3-methyl ethers, *Steroids*, **2003**, *68*, 277-288.
- [42] Nakata, T., Takashima, S., Shiotsu, Y., Murakata, C., Ishida, H., Akinaga, S., Li, P., Sasano, H., Suzuki, T., Saeki, T. Role of steroid sulfatase in local formation of estrogen in post-menopausal breast cancer patients, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **2003**, *86*, 455-460, e referências aí citadas.
- [43] Cepa, M. M.; Tavares da Silva, E. J.; Correia da Silva, G.; Roleira, F. M; Teixeira, N. A. Structure-Activity Relationships of New A,D-Ring Modified Steroids as Aromatase Inhibitors: Design, Synthesis, and Biological Activity Evaluation, *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 6379, 6385.
- [44] Labrie, F.; Luu-The, V.; Lin, S.; Simard, J.; Labrie, C. Role of 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenases in Sex Steroid Formation in Peripheral Intracrine Tissues, *Oncol. Mol. Endocr. Res.*, **2000**, *11*, 421-427.
- [45] Moreno-Aspitia, A.; Perez E. A. Anthracycline- and/or Taxane-Resistant Breast Cancer: Results of a Literature Review to Determine the Clinical Challenges and Current Treatment Trends, *Clin. Therap.*, **2009**, *31*, 1619-1640.
- [46] Conte, P. F.; Bengala, C.; Guarneri, V. Controversies of chemotherapy for the treatment of metastatic breast cancer, *Eur. J. Cancer Suppl.*, **2007**, *5*, 11-16.
- [47] Águas, F.; Martins, A.; Gomes, T. P.; Sousa, M. D.; Silva, D. P. Prophylaxis approach to asymptomatic post-menopausal women: Breast cancer, *Maturitas*, **2005**, *52 (Supp II)*, 23-31.
- [48] Hoffmann, J.; Sommer, A. Anti-hormone Therapy: Principles of Endocrine Therapy of Cancer, *Top. Med. Chem.*, **2007**, *1*, 19-82.

- [49] Kittaneh, M.; Glück, S. Exemestane in the Adjuvant Treatment of Breast Cancer in Postmenopausal Women, *Breast Cancer: Basic and Clinical Research*, **2011**, *5*, 209-226.
- [50] Petru, E.; Schmühl, D. On the Role of Additive Hormone Monoherapy with Tamoxifen, Medroxyprogesterone Acetate and Aminoglutethimide, in Advanced Breast Cancer, *Klin Wochenschr*, **1987**, *65*, 959-966.
- [51] Sánchez-Muñoz, A.; Ribelles, N.; Alba, E. Optimal adjuvant hormonal therapy in postmenopausal women with hormone-receptor-positive early breast cancer: have we answered the question?, *Clin. Transl. Oncol.*, **2010**, *9*, 614-620.
- [52] Peter H.; Gann, M. D. Risk Factors for Prostate Cancer, *Rev. Urol.*, **2002**, *4*, 3-10.
- [53] Cussento, O.; Valeri, A.; Berthon, P.; Fournier, G.; Mangin, P. Hereditary prostate cancer and other genetic predispositions to prostate cancer, *Urol. Int.*, **1998**, *60*, 30-34.
- [54] Hudson, D. L.; Guy, A. T.; Fry, P.; O'Hare, M. J.; Watt, F. M.; Masters, J. R. W. Epithelial Cell Differentiation Pathways in the Human Prostate: Identification of Intermediate Phenotypes by Keratin Expression, *J. Histochem. Cytochem.*, **2001**, *49*, 271-278.
- [55] Gao, W.; Bohl, C. E.; Dalton, J. T. Chemistry and Structural Biology of Androgen Receptor, *Chem. Rev.*, **2005**, *105*, 3352-3370.
- [56] Vasaitis, T. S.; Bruno, R. D.; Njar, V. C. O. CYP17 inhibitors of prostate cancer, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **2011**, *125*, 23-31.
- [57] Sharifi, N.; Auchus, R. J. Steroid biosynthesis and prostate cancer, *Steroids*, **2012**, *77*, 719-726.
- [58] Koivisto, P.; Kolmer, M.; Visakorpi, T.; Kallioniemi, O. Androgen Receptor Gene and Hormonal Therapy Failure of Prostate Cancer, *Americ. J. Pathol.*, **1998**, 152.
- [59] Debes, J. D.; Tindall, D. J. Mechanisms of androgen-refractory prostate cancer, *N. Engl. J. Med.*, **2004**, *351*, 1488-1490.
- [60] Salvador, J. A. R.; Moreira, V. M.; Silvestre, S. M. Steroidal CYP17 Inhibitors for Prostate Cancer Treatment. From Concept to Clinic.", accepted for publication in the book "Prostate Cancer", ISBN 980-953-307-719-7, Editor: Gerhard Hamilton, Publisher: InTech.

- [61] Braune, S.; Deb, S.; Wahaka, K. Homologation of estrone or estradiol. Appending a carbon substituent into the 3-hydroxyestra-1,3,5-triene skeleton, *Curr. Org. Chem.*, **2007**, *11*, 383-405.
- [62] Bandy, A. H.; Shameem, S. A.; Gupta, B. D.; Kumar, H. M. D-ring substituted 1,2,3-triazolyl 20-keto pregnenanes as potential anticancer agents: Synthesis and biological evaluation, *Steroids*, **2010**, *75*, 801-804.
- [63] Hong, Y.; Chen, S. Aromatase, Estrone Sulfatase, and 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase: Structure-Function Studies and Inhibitor Development, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **2011**, *340*, 120-126.
- [64] Ouellet, E.; Poirier, Ayan, D.; Poirier, D. Synthesis and preliminary evaluation of a modified estradiol-core bearing a fused  $\gamma$ -lactone as non-estrogenic inhibitor of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2011**, *21*, 5510-5513.
- [65] Poirier, D.; Contribution to the development of inhibitors of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 7: Key tools for studying and treating estrogen-dependent diseases; *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **2011**, *125*, 83-94.
- [66] Broi, P.; Riner, T. L. and Broi, S. G.; Inhibitors of 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1; *Curr. Med. Chem.*, **2008**, *15*, 137-150.
- [67] Klein, T.; Henn, C.; Negri, M.; Frotscher, M.; Structural Basis for Species Specific Inhibition of 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 (17 $\beta$ -HSD-1): Computational Study and Biological Validation; *PLoS ONE* 6(8): e22990 doi: 10.1371/journal.pone.0022990.
- [68] Day, J. M.; Tutill, H.; Purohit, A.; Reed, M.; Design and validation of specific inhibitors of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases for therapeutic application in breast and prostate cancer, and in endometriosis; *Endocr. Rel. Cancer*, **2008**, *15*, 665-692.
- [69] Moller, G.; Deluca, D.; Gege, C.; Rosinus, A.; Kowalik, D.; Peters, O.; Droescher, P.; Elger, W.; Adamski, J.; Hillisch, A.; Structure-based design, synthesis and in vitro characterization of potent 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors based on 2-substitutions of estrone and D-homo-estrone, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, *19*, 6740-6744.
- [70] Broi, P.; Riner, T. L. and Broi, S. G.; Inhibitors of 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1; *Curr. Med. Chem.*, **2008**, *15*, 137-150.

[71] Hillisch, A.; Peters, O.; Gege, C.; Regenhardt, W.; Moeller, G.; Deluca, D.; Adamski, J.; Elger, W.; Schneider, B. US Patent 7,435,757,B2, **2008**.

[72] Raobaikady, B.; Purohit, A.; Chander, S. K.; Woo, L. W. L.; Leese, M. P.; Potter, B. V. L.; Reed, M. J. Inhibition of MCF-7 breast cancer cell proliferation and in vivo steroid sulphatase activity by 2-methoxyoestradiol-bis-sulphamate, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **2003**, *84*, 351-358.

[73] Phan, C.; Liu, Y.; Kim, B.; Mostafa, Y.; Taylor, S. D. Inhibition of steroid sulfatase with 4-substituted estrone and estradiol derivatives, *Bioorg. Med. Chem.*, **2011**, *19*, 5999-6005.

[74] Nussbaumer, P.; Billich, A. Steroid Sulfatase Inhibitors, *Med. Res. Rev.*, **2004**, *24*, 529-576.

[75] Woo, L. W. L.; Purohit, A.; Potter, B. V. L. Development of steroid sulfatase inhibitors, *Mol. Cell. Endocr.*, **2011**, *340*, 175-185.

[76] Mueck, A. O.; Seeger, H. 2-Methoxyestradiol - Biology and mechanism of action, *Steroids*, **2010**, *75*, 625-631.

[77] Peyrat, J.; Brion, J.; Alami, M. Synthetic 2-Methoxyestradiol Derivatives: Structure-Activity Relationships, *Curr. Med. Chem.*, **2012**, *19*, 4142-4156.

[78] Rzheznikov, V. M.; Golubovskaya, L.E.; Minailova, O. N.; Ivanenko, T. I.; Fedotov, V. P. STEROID NITRATES. II. SYNTHESIS AND HORMONAL ACTIVITY OF 9 $\alpha$ ,11 $\beta$ -DIHIDROXYESTRA-1,3,5(10)-TRIENE 11-NITRATES, *Pharm. Chem. J.*, **2007**, *41*, 22-25.

[79] Rzheznikov, V. M.; Golubovskaya, L. E.; Minailova, O. N.; Osetrova, I. P.; Smirnova, Z. S. STEROIDAL NITRATES: SYNTHESIS AND ANTITUMOR ACTIVITY OF 9 $\alpha$ ,11 $\beta$ -DIHYDROXYESTRA-1,3,5(10)-TRIENE 11-NITRATES, *Pharm. Chem. J.*, **2003**, *33*, 12-14.

[80] Milić, D. R.; Kapor, A.; Markov, B.; Ribar, B.; Strümpel, M.; Juranić, Z.; Gašić, M. J.; Šolaja, B. A. X-Ray Crystal Structure of 10 $\beta$ -Hydroxy-4 $\beta$ ,5 $\beta$ -epoxyestr-1-en-3,17-dione and Antitumor Activity of its Congeners, *Molecules*, **1999**, *4*, 338-352.

[81] Prokai, L.; Prokai-Tatrai, K.; Perjési, P.; Simpkins, J. W. Mechanistic Insights into the Direct Antioxidant Effects of Estrogens, *Drug. Dev. Res.*, **2006**, *66*, 118-125.

- [82] Prokai, L.; Prokai-Tatrai, K.; Perjesi, P.; Zharikova, A.; Perez, E. J.; Liu, R.; Simpkins, J. W. Quinol-based cyclic antioxidant mechanism in neuroprotection, *PNAS*, **2003**, *100*, 11741-11746.
- [83] Siddiqui, A. U.; Satyanarayana, Y.; Ahmed, I.; Siddiqui, A. H., Heterocyclic steroids: Synthesis of steroidal seleno, telluro, and thio lactones of estrane series, *Steroids*, 1996, *61*, 302-304.
- [84] Zinczuk, J.; Bacigaluppo, J.A.; Colombo, M. I.; Cravero, R. M.; González-Sierra, M.; Rúveda, E. A. An Efficient and Environmentally Benign Chemical Synthesis of Testolactone, *J. Braz. Chem. Soc.*, **2003**, *14*, 970-974.
- [85] Djurendić, E. A.; Sakač, M. N.; Zaviš, M.; Gaković, A. R.; Čanadi, J. J.; Andrić, S. A.; Klisurić, O. R.; Kojić, V. V.; Bogdanović, G. M.; Gaši, K. M. P. Synthesis and biological evaluation of some new A,B-ring modified steroidal D-lactones, *Steroids*, **2008**, *73*, 681-688.
- [86] Moghadam, M.; Tangestaninejad, S.; Mirkhani, V.; Mohammadpoor-Baltork, I.; Taghavi, S. A. Highly efficient and selective acetylation of alcohols and phenols with acetic anhydride catalyzed by a high-valent tin(IV) porphyrin, Sn(TPP)(BF<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, *J. Mol. Catal. A: Chem.*, **2007**, *274*, 217-223.
- [87] Poisson, T.; Oudeyer, S.; Levacher, V. Efficient C-3 functionalization of 4 dimethylaminopyridine (DMAP). A straightforward access to new chiral nucleophilic catalysts, *Tetrahedron Lett.*, **2012**, *53*, 3284-3287.
- [88] Murugan, R.; Scriven, E. F. V. Applications of dialkylaminopyridine (DMAP) catalysts in organic synthesis, *Aldrichima Acta*, **2003**, *36*, 21-27.
- [89] Sakakura, A.; Kawajiri, K.; Ohkubo, T.; Kosugi, Y.; Ishihara, K. Widely Useful DMAP-Catalyzed Esterification under Auxiliary Base- and Solvent-Free Conditions, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, *129*, 14775-14779.
- [90] Sheldon, R. A.; Kochi, J. K. *Metal-Catalyzed Oxidations of Organic Compounds*; Academic Press: New York, London, Toronto, Sidney, San Francisco, **1981**
- [91] Hudlický, M. *Oxidations in Organic Chemistry*; ACS Monograph 186; American Chemical Society: Washington, DC, **1990**, e referências aí citadas.
- [92] Silvestre, S. Novos processos de oxidação ambientalmente aceitáveis usando esteroides como substratos, Dissertação de Doutorado apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Coimbra, **2007**, e referências aí citadas.

- [93] *ORGANIC CHEMISTRY*, 6<sup>th</sup> Ed., Morrison, R. T.; Boyd, R. N. Prentice - Hall, Inc, 1992, Cap. 8, 20.
- [94] Golubovskaya, L. E.; Rzheznikov, V. M. Oxidation of 3-Acetoxy-17 $\beta$ -nitroxyestra-1,3,5(10)-triene with Ceric Ammonium Nitrate in the synthesis of Steroid Dinitrates, *Russ. J. Org. Chem.*, **2001**, *37*, 881-882.
- [95] Golubovskaya, L. E.; Rzheznikov, V. M. Oxidation of Estra-1,3,5(10)-triene-3,11 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol Triacetate with Ceric Ammonium Nitrate, *Russ. J. Org. Chem.*, **2007**, *43*, 1730-1732.
- [96] Peters, R. H.; Crowe, D. F.; Avery, M. A.; Chong, M. A.; Tanabe, M. 11 beta-nitrate estrane analogues: potent estrogens, *J. Med. Chem.*, **1989**, *32*, 2306-2310.
- [97] Salvador, J. A. R.; Silvestre, S. M., Bismuth-catalyzed allylic oxidation using t-butyl hydroperoxide, *Tetrahedron Lett.*, **2005**, *46*, 2581-2584.
- [98] Salvador, J. A. R.; Silvestre S. M.; Moreira V. M. Catalytic oxidative processes in steroid chemistry: Allylic oxidation, beta-selective epoxidation, alcohol oxidation and remote functionalization reactions, *Curr. Org. Chem.*, **2006**, *10*, 2227-2257.
- [99] Salvador, J. A. R., Silvestre S. M.; Moreira V. M. Recent Developments in Oxidative Processes in Steroid Chemistry, *Curr. Org. Chem.*, **2012**, *16*, 1243-1276].
- [100] (a) Krow, G. The Baeyer-Villiger oxidation of ketones and aldehydes, *Org. React.*, **1993**, *43*, 251-798; (b) Renz, M.; Meunier, B. 100 years of Baeyer-Villiger oxidations, *Eur. J. Org. Chem.*, **1999**, 737-750.
- [101] *ORGANIC CHEMISTRY*, 8<sup>th</sup> Ed., Solomons, T. W. G.; Fryhle, C. B. John Wiley & Sons , 2004, Vol 2, 34-36.
- [102] Mahmoodi, N. O.; Heirati, S. Z. D.; Ekhalasi-Kazaj, K. A mild and clean Baeyer-Villiger oxidation of ketones using sodium peroxydisulfate as oxidant catalyzed by silica-supported aluminum chloride, *J. Iran. Chem. Soc.*, **2012**, *9*, 521-528.
- [103] Mosmann, T. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity, *J. Immunol. Methods*, **1983** ,*65*, 55-63
- [104] Liu, Y. Understanding the biological activity of amyloid proteins in vitro: from inhibited cellular MTT reduction to altered cellular cholesterol homeostasis, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.*, **1999**, *23*, 377-395.
- [105] Simeón, J. L. L.; Morales, J. E. T.; Navarro, F. A. V.; Manchado, F. C.; Montoto, L. G. P. Actividad catalítica del acetato de vanadilo en la acetilación de alcoholes secundarios, *Revista CENIC Ciencias Químicas*, **2004**, *35*, 141-145.

- [106] Schwarz, S.; Schumacher, M.; Ring, S.; Nanninga, A.; Weber, G.; Thieme, I.; Undeutsch, B.; Elger, W. 17 $\beta$ -Hydroxy-11 $\alpha$ -(3'-sulfanylpropyl)oxy-estra-1,3,5(10)-trien-3-yl sulfamate - a novel hapten structure: Toward the development of a specific enzyme immunoassay (EIA) for estra-1,3,5(10)-triene-3-yl sulfamates, *Steroids*, **64**, **1999**, 460-471.
- [107] Quinkert, G.; Weber, W.; Schwartz, U. US Patent 4,357,278, 1982.
- [108] Ekhato, V.; Hurley, T.; Lovdahl, M.; Revitte, T. J.; Guo, L.; Huang, Y.; Clipper, S.; Colson, C. Norethindrone acetate (NA) and ethinyl estradiol (EE) related oxidative transformation products in stability samples of formulated drug product: synthesis of authentic references, *Steroids*, **2002**, **67**, 165-174.
- [109] Lista, L.; Manini, P.; Napolitano, A.; Pezzella, A.; D'Ischia, M. Practical one-pot conversion of 17 $\beta$ -estradiol to 10 $\beta$ -hydroxy- (*p*-quinol) and 10 $\beta$ -chloro-17 $\beta$ -hydroxyestra-1,4-dien-3-one, *Steroids*, **2006**, **71**, 670-673.
- [110] Golubovskaya, L. E.; Minailova, O. N.; Rzhiznikov, V. M. A SIMPLE METHOD OF OBTAINING 11-KETO-9 $\beta$ -ESTRA-1,3,5(10)-TRIENES: POTENTIAL REACTANTS FOR THE SYNTHESIS OF STEROIDAL ANTIGESTAGENS, *Pharm. Chem. J.*, **2002**, **36**, 47-49.
- [111] Grieco, A.; Yokoyama, Y.; Gilman, S.; Ohfuné, Y. Conversion of Ketones into Lactones with Acid and Hydrogen Peroxide (Benzeneperoxyseleninic Acid): a New Reagent for the Baeyer-Villiger Reaction, *J.C.S. Chem. Comm.*, **1977**.
- [112] Garrido, M.; Bratoeff, E.; Bonilla, D.; Soriano, J.; Heuze, Y.; Cabeza, M. New steroidal lactones as 5 $\alpha$ -reductase inhibitors and antagonists for the androgen-receptor, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **2011**, **127**, 367-373.
- [113] Takatsu, S.; Yazawa, N.; Ishiguro, M.; Morisaki, M.; Ikekawa, N. Stereoselective Synthesis of Plant Growth-promoting Steroids, Brassinolide, Castasterone, Typhasterol, and Their 28-Nor Analogues, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1984**, 139-146.
- [114] Voigt, B.; Porzel, A.; Golsch, D.; Adam, W.; Adam, G. Regioselective Oxyfunctionalization of Brassinosteroids by Methyl(trifluoromethyl)dioxirane: Synthesis of 25-Hydroxy-brassinolide and 25-Hydroxy-24-epibrassinolide by Direct C-H Insertion, *Tetrahedron*, **1996**, **52**, 10653-10658.
- [115] Goswami, P.; Hazarika, S.; Das, A. M.; Chowdhury, P. Ceric Ammonium Nitrate (CAN) Catalyzed Baeyer-Villiger Oxidation of Carbonyl Compounds, Specially 20-Oxosteroids, *J. Indian Chem.*, **2004**, **43**, 1275-1281.
- [116] Borah, J. M.; Chowdhury, P. Expedited Baeyer-Villiger oxidation of steroidal ketones by microwave irradiation, *Steroids*, **2011**, **76**, 1341-1345.

[117] Vaz, A. Descoberta e desenvolvimento de inibidores da 17 $\beta$ -HSD-1 potencialmente úteis no tratamento do cancro da mama, Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2012.

[118] Minorics, R.; Bózsity, N.; Wölfling, J.; Mernyák, E.; Schneider, G.; Márki, A.; Falkay, G.; Ocsóvszki, I.; Zupkó, I. Antiproliferative effect of normal and 13-*epi*-D-homoestrone and their 3-methyl ethers on human reproductive cancer cell lines, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **2012**, *132*, 168-175.

[119] Maltais, R.; Ayan, D.; Poirier, D. Crucial Role of 3-Bromoethyl in Removing the Estrogenic Activity of 17 $\beta$ -HSD1 Inhibitor 16 $\beta$ -(*m*-Carbamoylbenzyl)estradiol, *Med. Chem. Lett.*, **2011**, *2*, 678-681.

[120] Cushman, M.; Hu-Ming-He; Katzenellenbogen, J. A.; Lin, C.; Hamel, E. Synthesis, Antitubulin and Antimitotic Activity, and Cytotoxicity of Analogs of 2-Methoxyestradiol, an Endogenous Mammalian Metabolite of Estradiol That Inhibits Tubulin Polymerization by Binding to the Colchicine Binding Site, *J. Med. Chem.*, **1995**, *38*, 2041-2049.