



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Enonas esteroides como potenciais agentes antitumorais

Filipe José Miguel Lopes

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

Orientador: Professor Doutor Samuel Martins Silvestre

Covilhã, outubro 2017

“Never forget what you are, for surely the world will not. Make it your strength. Then it can never be your weakness. Armor yourself in it, and it will never be used to hurt you.”

George R.R. Martin, A Game of Thrones

Agradecimentos

Em primeiro lugar queria agradecer ao meu orientador, Professor Doutor Samuel Martins Silvestre, por me ter dado a oportunidade de trabalhar consigo neste mundo que é a química orgânica, pela disponibilidade, conhecimentos, conselhos e ajuda que me proporcionou ao longo deste ano de caminhada.

Em segundo lugar queria também agradecer aos meus colegas de laboratório, pelos momentos passados, riso, desesperos e trabalhos realizados, principalmente ao Octávio Ferreira por ter sido o meu camarada de laboratório e às minhas amigas Maria Gomes e Mariana Lucas pela grande ajuda que foram naquele momento decisivo.

Queria também agradecer a todos os meus outros amigos, que de uma maneira direta ou indireta, me ajudaram neste percurso, não só na realização da dissertação, mas também por esta aventura que foi a universidade, a todos e vocês sabem quem são, um grande obrigado.

Resumo

A oxidação alílica é um processo sintético de grande importância industrial devido à sua ampla variedade de aplicações na síntese de produtos químicos e farmacêuticos. Alguns exemplos relevantes deste tipo de reação incluem a oxidação de Δ^5 -esteroides aos seus derivados Δ^5 -7-oxoesteroides correspondentes. Os métodos clássicos para realização destas reações envolvem o uso de um excesso de reagentes indesejáveis de crómio, manganésio ou selénio. Recentemente o uso de hidroperóxidos, em combinação com diferentes tipos de catalisadores metálicos em formas homogêneas e heterogêneas, tem despertado interesse. Posteriormente, outros processos diferentes foram relatados e, entre estes, a combinação de clorito de sódio, como oxidante, e *N*-hidroxiftalimida, como catalisador, revelou ser um procedimento eficiente e mais aceitável em termos ambientais para esta transformação. Para acelerar esta reação de oxidação, o potencial de vários catalisadores metálicos foi explorado. Na presente dissertação descrevem-se oxidações alílicas de Δ^5 -esteroides nestas condições, mas explorando o uso de compostos de vanádio, como o $\text{VO}(\text{acac})_2$, bem como de outros catalisadores metálicos. Curiosamente, o consumo total de substrato foi observado após 15 minutos de reação; no entanto, um produto secundário também foi detetado, além dos Δ^5 -7-oxoesteroides esperadas. Na tentativa de ultrapassar esta observação, diferentes condições de oxidação foram também investigadas com o objetivo de melhorar este processo oxidativo.

Para além disso, foi também estudado o efeito antiproliferativo de alguns Δ^5 -esteroides e os seus correspondentes Δ^5 -7-oxoesteroides, em linhas celulares PC3 e N27. Este estudo foi realizado com o intuito de avaliar o potencial destes compostos como agentes anticancerígenos, tendo sido calculado o IC_{50} de cada um destes compostos. Interessantemente, verificou-se que os compostos 7-oxidados da diosgenina e da pregnenolona se apresentaram mais tóxicos que os precursores não oxidados para a linha celular PC3.

Palavras-chave

Δ^5 -Esteroides; Oxidação alílica; 7-Oxoesteroides; Citotoxicidade; Desidroepiandrosterona; 7-Oxodesidroepiandrosterona.

Abstract

Allylic oxidations are industrially important synthetic processes due to their wide variety of applications in the synthesis of pharmaceuticals and fine chemicals. Relevant examples include the oxidation of Δ^5 -steroids to the corresponding Δ^5 -7-ketone derivatives. Classical methods to perform these reactions involve the use of large excess of undesirable chromium, manganese or selenium reagents. Of particular interest is the use of hydroperoxides, combined with different types of metal catalysts in homogeneous and heterogeneous forms. Later, other different processes were reported and, among these, the combination of sodium chlorite as the oxidant and *N*-hydroxyphthalimide as catalyst revealed to be a green procedure for this transformation. In order to accelerate this oxidation reaction, the potential interest of several metal catalysts was explored. Here is reported the very fast allylic oxidations of Δ^5 -steroids by using vanadium compounds such as $\text{VO}(\text{acac})_2$ as well as other metal catalysts. Interestingly, total substrate consumption was observed after 15 minutes of reaction; however, a side product was also detected in addition to the expected Δ^5 -7-ketones. Therefore, different oxidation conditions were also explored to improve this oxidation process.

Moreover, it was also studied the antiproliferative effects of some Δ^5 -steroids and their corresponding Δ^5 -7-ketones on PC3 and N27 cell lines to understand the potential of these compounds as anticancer agents and the corresponding IC_{50} was also calculated. Interestingly, it was observed that 7-oxodiosgenin and 7-oxopregnenolone have higher cytotoxicity against PC3 cells than the observed with the corresponding precursors.

Keywords

Δ^5 -Steroids; Allylic Oxidation; 7-Oxosteroids; Cytotoxicity; Dehydroepiandrosterone; 7-Oxodehydroepiandrosterone.

Índice

CAPÍTULO 1-INTRODUÇÃO	1
1.1 GENERALIDADES SOBRE ESTEROIDES	1
1.1.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS.....	1
1.1.2 IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA.....	2
1.2 Δ^5-7-OXOESTEROIDES	4
1.2.1 MÉTODOS QUÍMICOS PARA A SUA OBTENÇÃO.....	4
1.2.2 IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA E SINTÉTICA	6
CAPÍTULO 2-OBJETIVOS	9
CAPÍTULO 3-MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1 REAGENTES E EQUIPAMENTOS	11
3.2 ACETILAÇÃO DE 3B-HIDROXI-Δ^5-ESTEROIDES	11
3.3 REAÇÕES DE OXIDAÇÃO ALÍLICA	12
3.3.1 OXIDAÇÃO ALÍLICA DO ACETATO DE DESIDROEPIANDROSTERONA	12
3.3.2 OXIDAÇÃO ALÍLICA DO ACETATO DE PREGNENOLONA COM NaClO_2 , NHPI E O CATALISADOR $\text{VO}(\text{ACAC})_2$	15
3.3.3 OXIDAÇÃO ALÍLICA DO ACETATO DE COLESTERILO COM NaClO_2 , NHPI E O CATALISADOR $\text{VO}(\text{ACAC})_2$..	15
3.3.4 OXIDAÇÃO ALÍLICA DA DESIDROEPIANDROSTERONA COM BiCl_3 E TBHP	16
3.3.5 OXIDAÇÃO ALÍLICA DO ACETATO DE PREGNENOLONA COM BiCl_3 E TBHP	16
3.3.6 OXIDAÇÃO ALÍLICA DA DIOSGENINA COM BiCl_3 E TBHP	16
3.3.7 OXIDAÇÃO ALÍLICA DO ACETATO DE DIOSGENINA COM TBAC, CuBr E TBHP.....	17
3.4 REAÇÕES DE HIDRÓLISE	17
3.4.1 HIDRÓLISE DO ACETATO DE 7-OXODIOSGENINA	17
3.4.2 HIDRÓLISE DO ACETATO DE 7-OXOPREGNENOLONA	18
3.5 REAÇÕES DE OXIDAÇÃO BENZÍLICA	18
3.5.1 OXIDAÇÃO BENZÍLICA DO XANTENO	18
3.5.2 OXIDAÇÃO BENZÍLICA DO FLUORENO	19
3.6 REAÇÃO DE 5B,6B-EPOXIDAÇÃO DO ACETATO DE DESIDROEPIANDROSTERONA	19
3.7 ENSAIOS CELULARES	20
3.7.1 CULTURAS CELULARES	20
3.7.2 TRIPSINIZAÇÃO, CONTAGEM E SEMEITEIRA DAS CULTURAS.....	20
3.7.3 AVALIAÇÃO ANTIPROLIFERATIVA DOS COMPOSTOS POR ENSAIOS COM O MÉTODO MTT.....	21
3.7.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
CAPÍTULO 4-RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1 REAÇÕES QUÍMICAS	23
4.2 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR	31
CAPÍTULO 5-CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	37
CAPÍTULO 6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

Lista de Figuras

Figura 1-Estrutura química e numeração do esqueleto esteroide.....	2
Figura 2-Esteroidogênese, enzimas e vias e intermediários.....	3
Figura 3-Oxidação alílica de Δ^5 -esteroides a 7-oxo- Δ^5 -esteroides.....	4
Figura 4-Esteroides como agentes antitumorais.....	7
Figura 5-Esquema geral das reações de oxidação alílica e benzílica efetuadas.	23
Figura 6-Espectro ^1H -RMN da reação de oxidação do acetato de DHEA 1.....	26
Figura 7-Ampliação do espectro da figura 6.	27
Figura 8-Ampliação do espectro da figura 6.	28
Figura 9-5 β ,6 β -Epoxidação do acetato de desidroepiandrosterona.....	28
Figura 10-Hidrólise alcalina do acetato de 7-oxodiosgenina 13.	31
Figura 11-Efeito na viabilidade celular nas células N27 dos compostos a 30 μM , após 72h de exposição.	31
Figura 12-Efeito na viabilidade celular nas células PC3 dos compostos a 30 μM , após 72h de exposição.	32
Figura 13-Efeito dos compostos DHEA 4 e 7-oxoDHEA 9 na viabilidade celular das células N27, após 72h de exposição; * $p < 0,05$ (teste t -Student).	32
Figura 14-Efeito dos compostos diosgenina 12 e 7-oxodiosgenina 14 na viabilidade celular das células N27, após 72h de exposição; * $p < 0,05$ (teste t -Student).	33
Figura 15-Efeito dos compostos pregnenolona 5 e 7-oxopregnenolona 10 na viabilidade celular das células N27, após 72h de exposição; * $p < 0,05$ (teste t -Student).	33
Figura 16-Efeito dos compostos DHEA 4 e 7-oxoDHEA 9 na viabilidade celular das células PC3, após 72h de exposição; * $p < 0,05$ (teste de t -Student).	33
Figura 17-Efeito dos compostos diosgenina 12 e 7-oxodiosgenina 14 na viabilidade celular das células PC3, após 72h de exposição; * $p < 0,05$ (teste de t -Student).	34
Figura 18-Efeito dos compostos pregnenolona 5 e 7-oxopregnenolona 10 na viabilidade celular das células PC3, após 72h de exposição; * $p < 0,05$ (teste de t -Student).	34

Lista de Tabelas

Tabela 1-Resultados do estudo da oxidação alílica do acetato de DHEA 1.	25
Tabela 2-Reações de oxidação alílica a 50°C com catalisador de vanádio VO(acac) ₂ (0,0125mmol).....	29
Tabela 3-IC ₅₀ e r ² dos compostos nas duas linhas celulares estudadas.	35

Lista de Acrónimos

¹ H-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Protão
5-FU	5-Fluorouracilo
7-oxoDHEA	7-Oxodesidroepiandrosterona
7-oxoDiosge	7-Oxodiosgenina
7-oxoPreg	7-Oxopregnenolona
Ac	Acetilo
acac	Acetilacetato
CCF	Cromatografia de Camada Fina
d	Dupleto
dd	Duplo Dupleto
DHEA	Desidroepiandrosterona
Diosge	Diosgenina
DMAP	Dimetilaminopiridina
DMSO	Dimetilsulfóxido
IC ₅₀	Concentração de composto que induz metade do efeito máximo
m	Múltiplo
N27	Células Neurais Dopaminérgicas de rato
ND	Não definido
NHPI	<i>N</i> -hidroxiftalimida
PC3	Células do Cancro da Próstata
PDC	Dicromato de Piridina
PP	Produto Principal
ppm	Partes por milhão
Preg	Pregnenolona
PS	Produto Secundário
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Singleto
TBAC	Cloreto de tetrabutilamónio
TBHP	<i>tert</i> -butilhidroperóxido
TEMPO	Radical 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxil
THF	Tetrahidrofurano
η	Rendimento

Capítulo 1-Introdução

1.1 Generalidades sobre Esteroides

1.1.1 Características estruturais

Os esteroides são compostos anfipáticos muito abundantes, da família dos lípidos, que se encontram em quase todos os seres vivos [1]. Apresentam várias atividades específicas a nível celular, e é conhecida uma grande variedade de tipos diferentes de compostos biologicamente ativos deste grupo [2-5], os quais justificam o interesse na sua obtenção por síntese química [1,7-9]. De facto, estes compostos estão presentes em medicamentos úteis [1,4] no tratamento de vários tipos de doenças, incluindo na terapia de múltiplos tipos de cancro [10-13].

Apresentando uma grande gama de diferentes compostos, quer naturais, quer sintéticos, os esteroides, como já foi referido, são uma opção viável na terapêutica de vários tipos de doenças, através da sua utilização como hormonas sexuais, corticosteroides, ácidos biliares, derivados da vitamina D, ou outros, que demonstram vasta aplicação em diversos estados clínicos [1]. Devido à sua relevância, vários tipos diferentes de esteroides têm sido isolados de diferentes fontes animais [1,6], ou sintetizados com alterações específicas [6-8].

Estruturalmente, os esteroides são compostos que possuem o esqueleto de um ciclopentanoperidrofenantreno, formado por 17 carbonos, que consiste em quatro anéis fundidos (designados A, B, C, D), dos quais três dos anéis são de 6 átomos de carbono e um de 5 átomos de carbono (Figura 1). Além disso, habitualmente apresentam grupos metilo ligados aos carbonos 10 e 13. As principais alterações ocorrem no carbono 17, sendo a principal a presença de uma cadeia alquilo [1,14]. Os carbonos da estrutura são numerados segundo o IUPAC-IUB (*International Union of Pure and Applied Chemistry/International Union of Biochemistry*), na *Joint Commission on Biochemical Nomenclature*, e, por convenção, qualquer átomo ou grupo substituinte acima do plano do composto tem estereoquímica β , enquanto os localizados abaixo do plano são designados de α -substituintes [14].

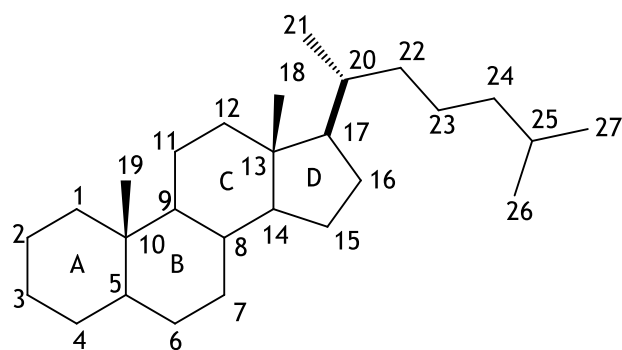


Figura 1-Estrutura química e numeração do esqueleto esteroide.

1.1.2 Importância biológica

O processo de esteroidogénese (produção de hormonas esteroides) é realizado por poucas estruturas do organismo, sendo elas as glândulas suprarrenais, as gónadas (ovários, testículos) e, em caso de gravidez, a placenta [2-5].

Neste processo (Figura 2), o colesterol (composto de 27 átomos de carbono) é clivado em progesterona e derivados (compostos de 21 átomos de carbono), que precedem os androgénios (compostos de 19 átomos de carbono) e finalmente os estrogénios (compostos de 18 átomos de carbono) [3,4]. As hormonas esteroides são divididas em duas classes: os corticosteroides, que compreendem os mineralocorticoides e os glucocorticoides, e as hormonas sexuais, as quais compreendem os progestagénios, os androgénios e os estrogénios. Todos estes estão envolvidos em várias funções, como a regulação do metabolismo celular, o desencadeamento de processos de inflamação, a regulação da homeostasia, o desenvolvimento das características sexuais secundárias ou a resposta a infeções e a doenças [2-5]. Outro tipo de esteroide incluem os ácidos biliares e a vitamina D, que apresenta semelhanças com as famílias dos corticosteroides e das hormonas sexuais [15,16].

As glândulas adrenais, que se encontram imediatamente acima dos rins, têm o seu córtex dividido em três áreas e cada uma delas é responsável pela produção de um tipo específico de hormona [2,3]. As três áreas são: a zona glomerulosa, camada mais externa e produz aldosterona, que ajuda na regulação da homeostase do organismo; a zona fasciculada/intermédia, que produz cortisol, que interfere na metabolização dos hidratos de carbono e na resposta dos vasos sanguíneos às catecolaminas; e a zona reticular, camada mais interna, que produz precursores de androgénios, como o desidroepiandrosterona (DHEA) e a sua forma sulfatada [2-5].

Ao nível das gónadas, elas produzem maioritariamente estrogénios, progestagénios e androgénios [3-5].

A produção destas hormonas esteroides inicia-se sempre com o colesterol (Figura 2), que foi o primeiro esteroide a ser descoberto há mais de 230 anos por cientistas franceses. Este foi alvo de uma grande investigação, na qual foram atribuídos alguns prémios nobel por pesquisas, levando um vencedor a referi-lo como “a molécula pequena mais versátil em biologia” [17]. A sua síntese é um processo complexo que ocorre no fígado e que inicia a partir do mevalonato [2].

A produção das hormonas é regulada por sinalização interna, designadamente através da corticotrofina (ACTH), da hormona luteinizante (LH) e da hormona foliculo estimulante (FSH). Envolvidas nesta síntese encontram-se muitas enzimas, sendo as principais da família do citocromo P450. Após a síntese, estas são transportadas no sangue por proteínas específicas, como a glicoproteína que se liga às hormonas esteroides (SHBG), indo atuar de forma específica e restrita em diferentes tipos de células alvo [3-5].

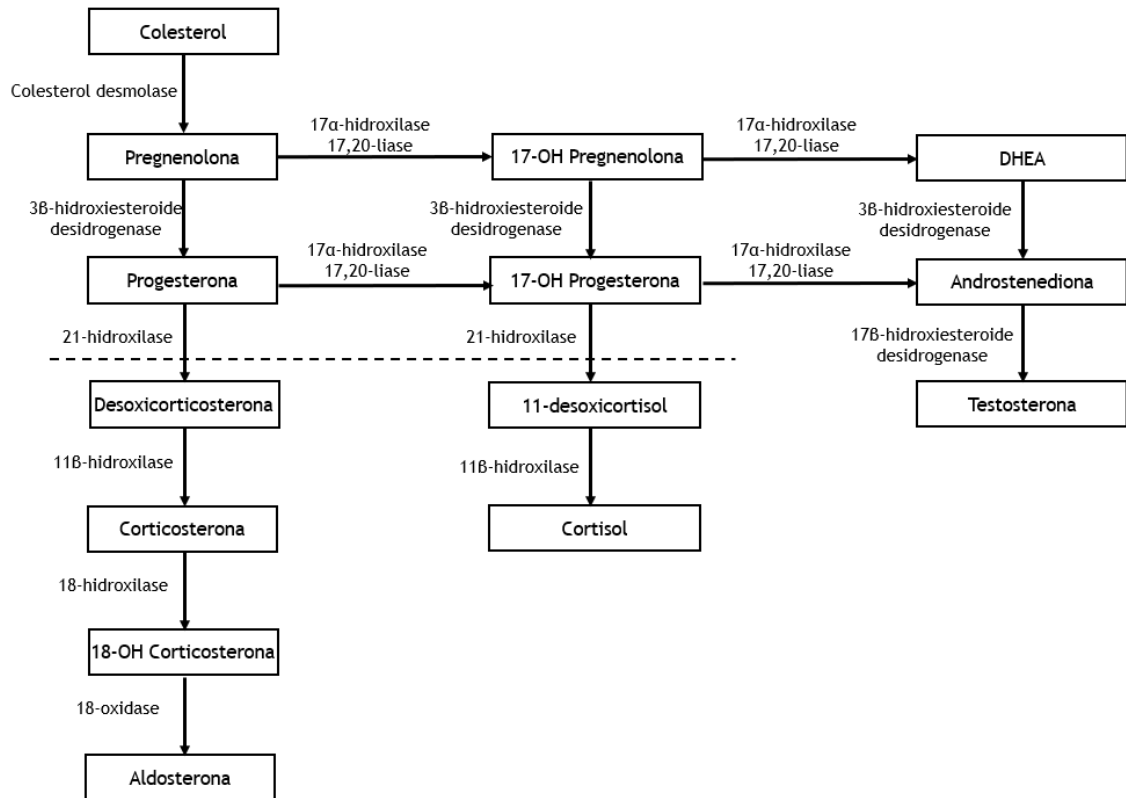


Figura 2-Esteroidogénese, enzimas e vias e intermediários.

Para além das hormonas esteroides, um outro tipo de esteroides é sintetizado pelo organismo, como a vitamina D e os ácidos biliares. Estes desempenham funções diferente das hormonas, apesar de serem sintetizados a partir do mesmo precursor, o colesterol [15,16].

A vitamina D é sintetizada nas células da epiderme da pele, a partir do 7-desidrocolesterol que se encontra nestas células. Este processo envolve a radiação solar UV e ocorre a conversão em pré-colecalciferol (pré-vitamina D₃), uma forma não ativa que posteriormente é ativada nos rins e fígado, sendo depois transportada na corrente sanguínea. A vitamina D tem como função principal manter a homeostase do cálcio, designadamente interferindo na absorção de minerais ao nível do intestino. A vitamina D pode também ser obtida na alimentação [15].

Os ácidos biliares são esteroides ácidos conhecidos por ajudar na digestão, na absorção de lípidos e na homeostase do colesterol. Existem vários tipos no organismo e encontram-se divididos em 2 grupos, os primários, sintetizados no fígado, e os secundários, produzidos por ação enzimática de bactérias no cólon. Quando sintetizados no fígado, antes de serem libertados para o estômago, são conjugados com uma de duas moléculas, a taurina ou a glicina,

formando um de oito ácidos biliares possíveis, que são também comumente conhecidos por sais biliares [16].

Todos os esteroides sintetizados são eliminados do organismo, depois de cumprirem as suas funções. Os ácidos biliares e as hormonas esteroides, já sem a cadeia lateral do colesterol, são geralmente hidroxilados, e conjugados com sulfato ou ácido glucurónico, sendo então eliminados na urina e por via hepatobiliar [4,6].

1.2 Δ^5 -7-oxoesteroides

1.2.1 Métodos químicos para a sua obtenção

De todas as alterações químicas que podem ser efetuadas nos esteroides, um dos tipos mais praticados são os que envolvem a oxidação de posições específicas do esteroide através de diferentes métodos de oxidação [1,7-9]. Estas reações têm sido alvo de um vasto e extenso estudo ao longo dos anos, tais como as oxidações alílicas com formação álcoois, ésteres e compostos α,β -insaturados, epoxidação, ou outros tipos de funcionalizações [7,8]. Neste sentido, têm sido alcançados grandes progressos, envolvendo otimizações do tempo de reação requerido, utilização de reagentes novos e mais amigos para o ambiente, melhorando a eficiência, obtendo-se cada vez melhores rendimentos [8,9,17-19].

Uma das transformações que tem demonstrado maior interesse na química dos esteroides é a reação de oxidação alílica com introdução de uma função cetona no carbono 7, mais especificamente os 7-oxo- Δ^5 -esteroides, que são obtidos a partir dos respetivos Δ^5 -esteroides (Figura 3) [19-22]. Uma oxidação alílica define-se habitualmente como a formação de uma nova ligação carbono oxigénio, numa posição alílica a um grupo funcional, geralmente a ligação dupla de um alceno. Se a oxidação ocorrer na posição α em relação a um composto aromático esta designa-se por oxidação benzílica. Esta reação ocorre quando a abstração do hidrogénio alílico/benzílico é parte dominante em relação ao ataque eletrofílico na ligação dupla, mantendo esta, podendo assim serem realizadas funcionalizações posteriores [22,23]. Esta transformação é um processo que normalmente envolve radicais livres, e geralmente ocorre na presença de metais de transição [24].



Figura 3-Oxidação alílica de Δ^5 -esteroides a 7-oxo- Δ^5 -esteroides.

Para a realização desta transformação, muitas são as opções que foram já descobertas e aplicadas ao longo dos anos, tendo-se vindo a melhorar o rendimento, o tempo e o tipo de reagentes usados. Na maior parte das reações é necessária a proteção do grupo 3 β -hidroxilo, geralmente na forma de acetato ou benzoato, pois em algumas condições podia ocorrer também a oxidação daquele grupo, se este não se encontrasse protegido [8,19,23].

Inicialmente, eram principalmente utilizados compostos de crómio (IV), como trióxido de crómio (CrO₃), cromato de *t*-butilo e cromato/dicromato de sódio em ácido acético [25,26] para estas oxidações. É também recorrente o uso de complexos de CrO₃, como CrO₃-piridina, 3,5-dimetilpirazol combinado com CrO₃ [27], benzotriazole-CrO₃, clorocromato de piridina e dicromato de piridina [28,29].

No entanto, a requerida utilização de grandes quantidades dos reagentes de crómio e outros metais de transição alguns muito tóxicos, bem como a necessidade de grandes volumes de solventes, e os complexos processos de purificação ou os tempos de reação longos inviabilizam as suas aplicações à escala industrial.

Esta reação foi também realizada por via de outros métodos estequiométricos, como foi o caso da utilização de radiação de soluções na presença de *N*-bromossuccinimida [30,31] ou de HgBr₂ (brometo de mercúrio) e ar [32]. Também foi reportada a combinação de ar ou oxigénio molecular com *N*-hidroxiftalimida (NHPI) para formação de várias enonas esteroides [33] e também a utilização de reagentes de iodo hipervalente [34].

Em contraste com estes métodos, foram desenvolvidos processos catalíticos, menos agressivos a nível ambiental e também mais rentáveis a nível económico. São exemplos o uso de hidroperóxidos em combinação com vários tipos de catalisadores metálicos para se conseguir vários tipos de reações [35-38], ou imobilização do oxidante e catalisador em suportes heterogéneos, tornando mais fáceis os processos de separação, podendo haver aumento dos rendimentos do produto [39,40].

Neste âmbito, foi demonstrando que com quantidades catalíticas de reagentes com crómio(VI), nomeadamente CrO₃, em combinação com *t*-butilhidroperóxido (TBHP) é possível obter bons rendimentos de 7-oxo-esteroides, com a reação de epoxidação a ser residual [41]. A atividade catalítica de outros metais, como Cr(CO)₆ [42] ou RuCl₃ [43] em conjugação com o TBHP está também descrita. No entanto, este tipo de reações continua a apresentar elevada toxicidade, principalmente as que envolvem os metais crómio e ruténio. Adicionalmente, sendo estas reações exotérmicas e necessitando de grandes quantidades de TBHP, mostrou-se que em condições de escala alargada na presença do ruténio há também o perigo de explosão, o que levou os investigadores a continuarem as pesquisas na procura de reações menos tóxicas e mais simples e seguras. Uma alternativa económica é, por exemplo, a utilização de catalisadores de cobre em conjunto com o TBHP [44,45]. Mais recentemente, outros investigadores reportaram o uso de Mn(OAc)₃·2H₂O como catalisador homogéneo combinado com TBHP para oxidação de alcenos simples e alguns Δ^5 -esteroides [46].

Adicionalmente foram também desenvolvidos processos que envolvem a utilização de oxidantes baratos e de fácil acesso, o hipoclorito de sódio (lixívia comum) e o clorito de sódio [47,48].

Este último oxidante pode ser usado em combinação com o NHPI para realizar reações de oxidação alílica ou benzílica sem a presença de metais de transição, sendo possível obter com bons rendimentos os esteroides 7-oxidados. Neste âmbito, o clorito de sódio é um oxidante barato bastante usado na indústria têxtil e do papel, ou na purificação de águas para o consumo humano, que pode também ser usado como oxidante em reações de oxidação, o qual pode ser facilmente separado e eliminado no fim da reação, excluindo assim os muitos problemas de separação e eliminação os quais se apresentam por exemplo nas reações com metais de transição (Ex: reagentes de crómio(VI)) muito recorrentemente usados neste tipo de reações [47].

1.2.2 Importância biológica e sintética

Ao longo dos anos, vários estudos foram realizados envolvendo os Δ^5 -7-oxoesteroides, comprovando a ampla aplicação e importância ao nível biológico e medicinal destes compostos [49].

Um dos exemplos é o 7-oxocolesterol, produto natural que resulta da auto-oxidação do colesterol no organismo, e que é também produzido por enzimas específicas. Atualmente sabe-se que este composto tem diferentes funções no organismo, como regular a própria síntese de colesterol, estar envolvido na regulação do ciclo celular com iniciação da sinalização da apoptose ou necrose, iniciação de processos inflamatórios e oxidativos e está também associado à regulação e acumulação de fosfolípidos [50,51]. Outro exemplo também conhecido é o do 7-oxo-DHEA, conhecido por ter influência na produção e regulação de enzimas termogénicas [52], através do condicionamento do potencial de membrana com abertura de canais específicos na mitocôndria [53] e na sua forma acetilada foi demonstrado a influência positiva no aumento da memória de ratos com idade já avançada [54]. Devido a estas e outras aplicações, o composto encontra-se atualmente disponível no mercado e é usado como nutracêutico [55] e pode ser útil no tratamento e prevenção de ataques de Raynaud primários [56]. Além disso, este tipo de compostos pode ser usado para tratar doenças resultantes de deficiências imunológicas ou mesmo problemas neuronais, como é o caso da doença de Alzheimer [57].

Adicionalmente, foi também provado que este tipo de esteroides oxigenados afeta e tem influência no tratamento de vários tipos de cancro [11-13], tendo-se demonstrado a capacidade de inibir a replicação celular [58-60]. Muitos dos esteroides com utilidade no tratamento do cancro (Figura 4) são inibidores de enzimas específicas que desempenham funções importantes no seu desenvolvimento, tais como aromatase ou sulfatase no cancro da mama, 5 α -redutase ou CYP17 em cancro da próstata avançado [11]. Conhecendo e tendo em conta a forma de atuar dos esteroides e os mecanismos na origem do cancro que envolvem estas mesmas moléculas, existem várias estratégias que podem ser utilizadas, entre as quais o uso de compostos biossintéticos, como é o caso dos Δ^5 -7-oxo-esteroides, como inibidores enzimáticos ou antagonistas de recetores, interrompendo vias de sinalização importantes para o tumor [12]. Os esteroides são também importantes pelo facto de serem lipossolúveis, o que facilita a sua entrada nas células e, tendo em conta que com as alterações os oxoesteroides podem perder

as suas funções base (Ex: hormonais), estes podem servir como moléculas inibidoras da iniciação e progressão de tumores (Figura 4), apresentando-se, assim, como uma estratégia no combate do cancro, quer por provocarem citotoxicidade, quer por inibirem vias de proliferação [11,12].

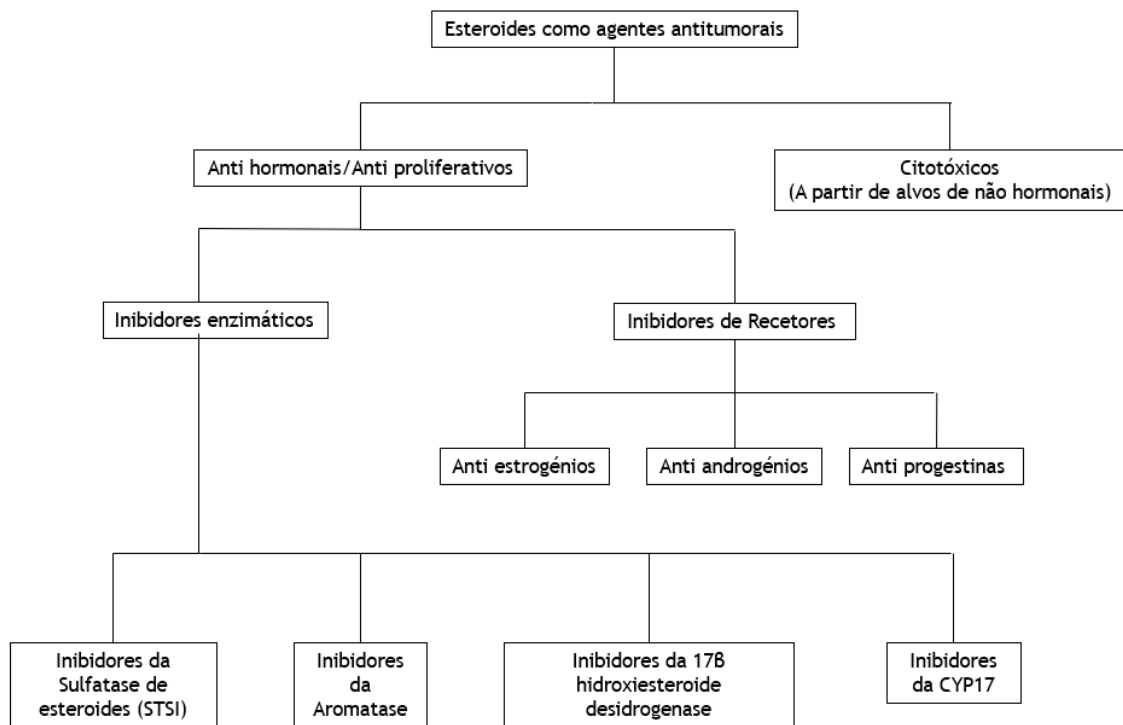


Figura 4-Esteroides como agentes antitumorais.

Para além dos esteroides derivados do colesterol, produzidos no organismo humano, existem outros compostos como as saponinas ou os glicosídeos cardiotónicos, que são usados na farmacologia como base de medicamentos para o tratamento de vários tipos de patologias, como resultados interessantes [11,12].

Os glicosídeos cardiotónicos, são, por exemplo, encontrados principalmente como produtos secundários produzidos em plantas e são compostos orgânicos que têm a capacidade de aumentar a força da contração cardíaca, diminuindo ao mesmo tempo a sua frequência através da interação com a bomba de sódio e potássio na membrana celular, apresentando uma grande gama de aplicações a nível biológico [61], sendo até sugerido a sua aplicação no tratamento do cancro [62]. No entanto, as suas relativas toxicidades, impede que sejam usados em grande extensão [61,62].

A diosgenina é um produto obtido da hidrólise alcalina/ácida ou por ação de enzimas da saponina dioscina, extraída de diferentes tipos de tubérculos de algumas plantas. É usada como precursor na síntese comercial de algumas hormonas esteroides, como a cortisona e a progesterona, usados em tratamentos hormonais, e mais recentemente tem demonstrado interesse como potencial agente antitumoral [63,64].

Capítulo 2-Objetivos

Tendo em conta a importância das modificações nos anéis de esteroides, e sendo já conhecido um vasto espectro de reagentes e condições reacionais a usar, este trabalho tem como objetivo encontrar uma reação de oxidação alílica mais simples e rápida de forma a obter diferentes esteroides 7-oxidados puros.

Sendo também conhecidas as várias aplicações dos 7-oxoesteroides, nas quais o possível tratamento de diferentes tipos de cancro, após a sua síntese, propõe-se a posterior avaliação biológica da citotoxicidade dos compostos DHEA, pregnenolona e diosgenina e seus derivados 7-oxidados, comparando os seus efeitos e calculando o IC_{50} , em células cancerígenas humanas do cancro da próstata PC3 e células dopaminérgicas neuronais de rato N27.

Capítulo 3-Materiais e Métodos

3.1 Reagentes e equipamentos

Todos os reagentes foram utilizados conforme recebidos, sendo a sua pureza analítica. O sulfato de sódio anidro foi adquirido à empresa José Manuel Gomes do Santos e o ácido clorídrico foi adquirido à Panreac. Os solventes metanol, acetato de etilo, éter de petróleo 40-60°C e diclorometano foram adquiridos à empresa Fisher Scientific UK. O acetonitrilo, ácido sulfúrico e areia foram adquiridos à empresa VWR international. O *tert*-butanol e o catalisador óxido de vanádio (V_2O_5) e o ortovanadato de sódio (Na_3VO_4) foram adquiridos da empresa Merck. O fluoreno, pregnenolona, progesterona, o catalisador acetilacetato de vanádio ($VO(acac)_2$) (*acac*=acetilacetato), TBAC (cloreto de tetrabutilamónio) e o gel de sílica (0,060-0,200 mm, 60 A) foram adquiridos à Acros Organics. O *tert*-butil hidroperóxido (solução 5,0-6,0M em *n*-decano e solução aquosa a 70%) anidrido acético, acetato de pregnenolona, colesterol, clorito de sódio, DHEA, os compostos 4-dimetilaminopirimidina, NHPI, e os catalisadores nitrato de cério(IV) amónia, metavanadato de amónio (NH_4VO_3), o trifluorometanossulfonato de bismuto (III) e a H_2O_2 (30% V/V) foram adquiridos à Sigma Aldrich, bem como o $BiCl_3$, $KMnO_4$, pregnenolona e $FeSO_4 \cdot H_2O$. As placas de CCF (cromatografia em camada fina) foram adquiridas à Macherey-Nagel e foram observadas à luz ultravioleta 254nm e reveladas com uma mistura de etanol:ácido sulfúrico (95:5) com posterior secagem e aquecimento numa placa para o efeito a 120°C. Na cromatografia em coluna, o eluente encontra-se indicado como proporção v/v de solventes.

Os espectros de RMN foram registados a 400MHz para 1H -NMR num espectrofotómetro Bruker XS 400 utilizando $CDCl_3$ como solvente. Os principais dados dos espectros são apresentados na seguinte ordem: desvio químico em ppm, multiplicidade e atribuição do sinal.

3.2 Acetilação de 3 β -hidroxi- Δ^5 -esteroides

Num balão de fundo redondo de 100mL dissolveu-se 3mmol do substrato em THF (16 ml), adicionando-se, de seguida anidrido acético (1 ml) e DMAP (1,4mmol). A reação decorreu à temperatura ambiente. O controlo da reação foi feito por CCF usando um eluente de éter etílico:éter de petróleo 40-60°C (2:1).

Após a paragem da reação foi adicionado à mistura 20ml de água e a extração realizada com adição de 200mL de diclorometano (CH_2Cl_2) (2x). Seguidamente, a fase orgânica foi lavada sucessivamente com 20mL de HCl a 10%, 20mL $NaHCO_3$ à saturação e 30mL de água (2x). A mistura foi então seca com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente, obtendo-se um produto sólido branco que foi seco na estufa a vácuo.

A acetilação da DHEA demorou uma hora e trinta minutos; 0,9563g, η =96%.

A acetilação do colesterol durou uma hora e trinta minutos; 0,9511g, η =95%.

A acetilação da diosgenina durou uma hora e vinte minutos; 0,9624g, $\eta=96\%$.

3.3 Reações de Oxidação alílica

3.3.1 Oxidação alílica do acetato de desidroepiandrosterona

I. Num balão de fundo redondo de 50mL dissolveu-se acetato de DHEA (0,25mmol) num solvente de acetonitrilo:água (2:1; 3mL). À solução previamente estabilizada à temperatura de 50°C adicionou-se lentamente NaClO_2 (sólido, 80%) (0,375mmol) e NHPI (0,025mmol). A reação decorreu, com agitação magnética e à temperatura de 50°C, durante 6 horas, sendo a mesma completa. O controlo da reação foi feito por CCF com um eluente de éter etílico:éter de petróleo 40-60°C (1:1).

A reação foi parada e a mistura reacional foi colocada em contacto com uma solução de sulfito de sódio a 10% (40ml), durante várias horas. De seguida, fez-se extração com acetato de etilo (3x 40mL) e posterior lavagem da fase orgânica com solução saturada de bicarbonato de sódio (20mL) e água destilada (20mL), secou-se com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se à secura, obtendo-se um produto sólido branco, que foi seco na estufa a vácuo [9], 0,0551g, $\eta=64\%$.

^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ 0,82 (s, 3H, 18- H_3), 1,17 (s, 3H, 19- H_3), 1,98 (s, 3H, CH_3CO), 4,65 (m, 1H, 3 α -H), 5,58 (s, 1H, 6H)

II. À reação realizada em condições semelhantes à 3.3.1.I, foi adicionado um catalisador de cério $[\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6]$ (0,025mmol), imediatamente após a adição do NHPI. A reação decorreu durante 6 horas observando-se formação de produto, mas sem consumo total do substrato, não tendo sido realizada extração.

III. À reação realizada em condições semelhantes à 3.3.1.I, foi adicionado um catalisador de bismuto (BiCl_3) (0,025mmol). A reação decorreu durante 6 horas. Após extração e isolamento do produto realizados de forma similar à reação descrita em à 3.3.1.I, foi obtido um óleo esbranquiçado; 0,753g ($\eta=87\%$).

IV. À reação realizada em condições semelhantes à 3.3.1.I, foi adicionado um catalisador de bismuto $[\text{Bi}(\text{OTf})_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}]$ (0,025mol). A reação decorreu durante 6 horas, observando-se formação de produto, mas sem se observar consumo total do substrato não tendo sido realizada extração.

V. À reação realizada em condições semelhantes à 3.3.1.I, foi adicionado um catalisador metálico de vanádio $[\text{VO}(\text{acac})_2]$. A reação decorreu durante 6 horas, sem se observar consumo total do substrato, não tendo sido realizada extração.

VI. Na reação realizada em condições semelhantes a **3.3.1.V**, foi usado 0,0125 mmol do catalisador metálico $[\text{VO}(\text{acac})_2]$ e 0,05mmol de NHPI. A reação decorreu durante 6 horas, sem se observar consumo total do substrato, não tendo sido realizada extração.

VII. Na reação realizada em condições semelhantes a **3.3.1.III**, a quantidade de NaClO_2 foi alterada para 0,75mmol, a de NHPI para 0,05mmol e a de BiCl_3 para 0,0125 mmol, tendo-se observado o consumo total do substrato ao fim de 15 minutos. Após extração e isolamento efetuado de forma similar à reação **3.3.1.I**, obteve-se um produto em óleo; 0,0670g ($\eta=77\%$).

VIII. Na reação realizada em condições semelhantes à **3.3.1.V**, a quantidade de NaClO_2 foi alterada para 0,75mmol, a de NHPI para 0,05mmol e a de $[\text{VO}(\text{acac})_2]$ para 0,0125 mmol, tendo-se observado o consumo total do substrato ao fim de 15 minutos. Após extração e isolamento efetuado de forma similar à reação **3.3.1.I**, obteve-se um produto em óleo; 0,0673g ($\eta=78\%$).

IX. Na reação realizada em condições semelhantes à **3.3.1.VIII**, a quantidade de NaClO_2 foi alterada para 0,5625mmol, tendo-se observado o consumo total do substrato ao fim de 15 minutos. Após extração e isolamento efetuado de forma similar à reação **3.3.1.I**, obteve-se um produto em óleo; 0,0446g ($\eta=51\%$).

X. Na reação realizada em condições semelhantes à **3.3.1.IX**, a quantidade de catalisador foi alterada para 0,004mmol, tendo-se observado o consumo total do substrato ao fim de 30 minutos. Após extração e isolamento efetuado de forma similar à reação **3.3.1.I**, obteve-se um produto em óleo; 0,0551g ($\eta=64\%$).

XI. A reação realizada em condições semelhantes à **3.3.1.IX**, decorreu à temperatura ambiente (15-20°C), tendo a reação decorrido durante 6 horas, sem se observar consumo total do substrato, não tendo sido realizada extração.

XII. A reação realizada em condições semelhantes à **3.3.1.IX**, decorreu à temperatura de 25°C, tendo-se observado o consumo total do substrato ao fim de 3 horas. Após extração e isolamento efetuado de forma similar à reação **3.3.1.I**, obteve-se um produto em óleo; 0,0426g ($\eta=51\%$).

XIII. Na reação realizada em condições semelhantes à **3.3.1.IX**, foi usado alternativamente o catalisador V_2O_5 , tendo-se observado o consumo total do substrato ao fim de 15 minutos. Após extração e isolamento efetuado de forma similar à reação **3.3.1.I**, obteve-se um produto em óleo; 0,0419g ($\eta=49\%$).

XIV. Na reação realizada em condições semelhantes à 3.3.1.IX, foi usado alternativamente o catalisador Na_3VO_4 , tendo-se observado o consumo total do substrato ao fim de 4 horas. Após extração e isolamento efetuado de forma similar à reação 3.3.1.I, obteve-se um produto em óleo; 0,680 ($\eta=79\%$).

XV. Na reação realizada em condições semelhantes à 3.3.1.IX, foi usado alternativamente o catalisador NH_4VO_3 , tendo-se observado o consumo total do substrato ao fim de 1 hora. Após extração e isolamento efetuado de forma similar à reação 3.3.1.I, obteve-se um produto em óleo; 0,0654 ($\eta=76\%$).

XVI. Na reação realizada em condições semelhantes à 3.3.1.IX, foi utilizando o TEMPO em vez de NHPI. A reação decorreu durante 6 horas, sem se observar consumo total do substrato, não tendo sido realizada extração.

XVII. A reação realizada em condições semelhantes à 3.3.1.IX, mas utilizando o TBHP (solução aquosa a 70%) em vez de NaClO_2 decorreu durante 6 horas, sem se observar consumo total do substrato, não tendo sido realizada extração.

XVIII. A reação realizada em condições semelhantes à 3.3.1.IX, utilizando o H_2O_2 (30% V/V) em vez de NaClO_2 decorreu durante 30 horas, sem se observar consumo total do substrato. Após extração e isolamento efetuado de forma similar à reação 3.3.1.I, obteve-se um produto em óleo; 0,0674 ($\eta=87\%$).

XIX. A reação realizada em condições semelhantes à 3.3.1.IX, utilizando o H_2O_2 (30% V/V) em vez de NaClO_2 , e com adição de 7 μL de solução de oxidante a cada 15 minutos durante 2 horas, decorreu durante 30 horas, sem se observar consumo total do substrato, não tendo sido realizada extração, não tendo sido realizada extração.

XX. A reação realizada em condições semelhantes à 3.3.1.IX, utilizando alternativamente 1,4mmol H_2O_2 (30% V/V) em vez de NaClO_2 , decorreu durante 30 horas, sem se observar consumo total do substrato, não tendo sido realizada extração.

XXI. A reação realizada em condições semelhantes à 3.3.1.IX, mas utilizando 1mmol NHPI e fazendo adição gradual do oxidante durante 2 horas, decorreu durante 30 horas, sem se observar consumo total do substrato, não tendo sido realizada extração.

XXII. A reação realizada em condições semelhantes à 3.3.1.IX, mas utilizando o formaldeído em vez de NHPI decorreu durante 30 horas, observando-se o consumo praticamente total do substrato. Após extração e isolamento efetuado de forma similar à reação 3.3.1.I, obteve-se um produto em óleo; 0,0638g ($\eta=74\%$).

XXIII. A reação realizada em condições semelhantes à 3.3.1.IX, com 1mmol de substrato, NaClO_2 (2,25mmol), NHPI (2,25mmol) e o catalisador $\text{VO}(\text{acac})_2$ (0,05mmol), decorreu durante 3 horas. Após extração e isolamento efetuado de forma similar à reação 3.3.1.I, obteve-se um produto na forma de óleo esbranquiçado, 0,305g ($\eta=84\%$). Esse óleo foi dissolvido em 2ml de acetato de etilo e foi realizada uma coluna cromatográfica com sílica-gel, com um eluente de acetato de etilo:éter de petróleo 40-60°C (1:5), obtendo-se um produto sólido branco; 0,1480g ($\eta=41\%$) [9].

3.3.2 Oxidação alílica do acetado de pregnenolona com NaClO_2 , NHPI e o catalisador $\text{VO}(\text{acac})_2$

Num balão de fundo redondo de 50mL dissolveu-se acetato de pregnenolona (0,25mmol) em acetonitrilo:água (2:1; 3mL). À solução previamente estabilizada à temperatura de 50°C adicionou-se lentamente NaClO_2 (sólido, 80%) (0,5625mmol), NHPI (0,05mmol) e o catalisador $\text{VO}(\text{acac})_2$ (0,125mmol). A reação decorreu, com agitação magnética e à temperatura de 50°C, durante 15 minutos, tendo sido o controlo da reação realizado por CCF com eluente éter etílico:éter de petróleo 40-60°C (1:1).

A reação foi parada e a mistura reacional foi colocada em contacto com uma solução saturada de sulfito de sódio (40 ml) durante algumas horas. De seguida, fez-se extração com acetato de etilo (3x 40mL) e a fase orgânica foi sucessivamente lavada com uma solução saturada de bicarbonato de sódio (20mL) e água destilada (20mL), seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada até à secura, obtendo-se um produto oleoso após secagem na estufa a vácuo, 0,0760g ($\eta=84\%$) [9].

^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ 0,58 (s, 3H, 18- H_3), 1,15 (s, 3H, 19- H_3), 1,98 (s, 3H, 21- H_3), 4,65 (m, 1H, 3 α -H), 5,64 (s, 1H, 6H)

3.3.3 Oxidação alílica do acetado de colesterilo com NaClO_2 , NHPI e o catalisador $\text{VO}(\text{acac})_2$

Num balão de fundo redondo de 50mL dissolveu-se acetato de colesterilo (0,25mmol) em acetonitrilo:água (2:1; 3mL). À solução previamente estabilizada à temperatura de 50°C adicionou-se lentamente NaClO_2 (sólido, 80%) (0,5625mmol), NHPI (0,05mmol) e o catalisador $\text{VO}(\text{acac})_2$ (0,0125mmol). A reação decorreu, com agitação magnética e à temperatura de 50°C, durante 1 dia, sem haver formação significativa de produto, de acordo com a análise por CCF.

3.3.4 Oxidação alílica da desidroepiandrosterona com BiCl_3 e TBHP

Num balão de fundo redondo de 50mL dissolveu-se DHEA (0,5mmol) em acetonitrilo (3mL). À solução previamente estabilizada à temperatura a 70°C adicionou-se TBHP em solução 5,0-6,0M de *n*-decano (5mmol) e o catalisador BiCl_3 (0,05mmol). A reação decorreu, com agitação magnética e à temperatura de 70°C, durante aproximadamente 1 dia e 6 horas, sendo o controlo feito por CCF com eluente de éter etílico:éter de petróleo 40-60°C (2:1).

A reação foi parada e a mistura reacional foi colocada em contacto com uma solução saturada de sulfito de sódio (40 ml) durante algumas horas. De seguida, fez-se extração com acetato de etilo (3x 40mL) e a fase orgânica foi sucessivamente lavada com uma solução saturada de bicarbonato de sódio (20mL) e água destilada (20mL), seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada à secura, obtendo-se o produto, em óleo branco 0,0546g ($\eta=36\%$).

Após seco na estufa a vácuo, o produto foi diluído em éter etílico (2ml) e separado numa coluna cromatográfica de sílica-gel, com um eluente de éter etílico:éter de petróleo 40-60°C (1:5). Após separação, o solvente foi evaporado e o produto foi seco na estufa a vácuo, obtendo-se um produto sólido branco 0,0271 g ($\eta=18\%$) [36].

^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ 0,83 (s, 3H, 18- H_3), 1,16 (s, 3H, 19- H_3), 3,63 (m, 1H, 3 α -H), 5,68 (s, 1H, 6H)

3.3.5 Oxidação alílica do acetato de pregnenolona com BiCl_3 e TBHP

Num balão de fundo redondo de 50mL dissolveu-se o acetato de pregnenolona (0,5mmol) em acetonitrilo (3mL). À solução previamente estabilizada à temperatura a 70°C adicionou-se TBHP em solução 5,0-6,0M de *n*-decano (5mmol) e o catalisador BiCl_3 (0,05mmol). A reação decorreu, com agitação magnética e à temperatura de 70°C, durante 1 dia e 6 horas, sendo o controlo da reação realizado por CCF com eluente de éter etílico:éter de petróleo 40-60°C (2:1).

A reação foi parada e a mistura reacional foi colocada em contacto com uma solução saturada de sulfito de sódio (40ml) durante algumas horas. De seguida, fez-se extração com acetato de etilo (3x 40mL) e a fase orgânica foi sucessivamente lavada com uma solução saturada de bicarbonato de sódio (20mL) e água destilada (20mL), seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada à secura, obtendo-se um produto sólido branco 0,0584g ($\eta=35\%$).

Após seco na estufa a vácuo, o produto foi diluído em éter etílico (2 ml) e separado numa coluna cromatográfica de sílica-gel, com um eluente de éter etílico:éter de petróleo 40-60°C (1:5). No final, o solvente foi evaporado e o produto foi seco na estufa a vácuo, obtendo-se um produto sólido branco 0,0745g ($\eta=48\%$) [65].

^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ 0,59 (s, 3H, 18- H_3), 1,15 (s, 3H, 19- H_3), 1,99 (s, 3H, 21- H_3), 2,07 (s, 3H, CH_3CO), 4,65 (m, 1H, 3 α -H), 5,65 (s, 1H, 6H)

3.3.6 Oxidação alílica da diosgenina com BiCl_3 e TBHP

Num balão de fundo redondo de 50mL dissolveu-se a diosgenina (0,5mmol) em acetonitrilo (3 mL). À solução previamente estabilizada à temperatura a 70°C adicionou-se TBHP em solução

5,0-6,0M de *n*-decano (5mmol) e o catalisador BiCl₃ (0,05mmol). A reação decorreu, com agitação magnética e à temperatura de 70°C, durante 1 dia e 6 horas, sendo o controlo da reação realizado por CCF com eluente de éter etílico:éter de petróleo 40-60°C (2:1).

A reação foi parada e a mistura reacional foi colocada em contacto com uma solução saturada de sulfito de sódio (40ml) durante algumas horas. De seguida, fez-se extração com acetato de etilo (3x 40mL) e a fase orgânica foi sucessivamente lavada com uma solução saturada de bicarbonato de sódio (20mL) e água destilada (20mL), seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada à secura, obtendo-se um produto sólido branco 0,0633g (η =39%) [65].

Após seco na estufa a vácuo, o produto foi diluído em éter etílico (2 ml) e tentou-se purificar numa coluna cromatográfica de sílica-gel, com um eluente de éter etílico:éter de petróleo 40-60°C (1:5), não tendo sido possível extrair o produto no final da coluna.

3.3.7 Oxidação alílica do acetato de diosgenina com TBAC, CuBr e TBHP

Num balão de fundo redondo de 50mL adicionou-se acetato de diosgenina (0,5mmol) brometo de cobre (0,34mmol), TBAC (0,6mmol), que foram dissolvidos em diclorometano (2,5mL). O TBHP (70% em H₂O) foi adicionado em 3 partes às 0, 1,5 e 3 horas, numa quantidade de 0,32mL. A reação foi realizada à temperatura ambiente e decorreu durante 4 horas, sendo o controlo da reação realizado por CCF com eluente de éter etílico/éter de petróleo 40-60°C (1:2).

A reação foi parada e a mistura reacional foi colocada em contacto com uma solução saturada de sulfito de sódio (500 ml) durante várias horas. De seguida, fez-se extração com diclorometano (2x 60mL) e a fase orgânica foi sucessivamente lavada com HCl 10%, solução saturada de bicarbonato de sódio (20mL) e água destilada (20mL), seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada à secura, obtendo-se um produto sólido amarelado (0,0349 g). Após seco na estufa a vácuo, o produto foi dissolvido em éter etílico e separado numa coluna cromatográfica de sílica-gel com um eluente de éter etílico:éter de petróleo 40-60°C (1:9), obtendo-se um produto sólido branco, 0,0335 g (η =14%). A reação foi realizada tendo em conta a referência 45.

3.4 Reações de hidrólise

3.4.1 Hidrólise do acetato de 7-oxodiosgenina

Num balão de fundo redondo de 50mL dissolveu-se o acetato de 7-oxodiosgenina (0,330g) em etanol (1ml) e uma solução aquosa de KOH 10%, (350 μ L) foi adicionada, tendo a reação decorrido à temperatura ambiente durante cerca de meia hora, sendo o controlo da reação realizado por CCF com eluente de éter etílico:éter de petróleo 40-60°C (1:3). A mistura reacional foi concentrada no evaporador rotativo, e à mistura resultante foi adicionado diclorometano (100ml) e água (20ml), seguindo-se agitação magnética durante 2 horas. A fase orgânica foi extraída com diclorometano (2x 200ml) e lavada com água (2x 20mL), seca com

sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada, e seca na estufa a vácuo, obtendo-se o composto sólido branco 0,0115g ($\eta=5\%$) [65].

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 0,72 (s, 3H, 18-H3), 1,15 (s, 3H, 19-H3), 3,65 (m, 1H, 3 α -H), 5,63 (s, 1H, 6-H)

3.4.2 Hidrólise do acetato de 7-oxopregnenolona

Num balão de fundo redondo de 50mL dissolveu-se o acetato de 7-oxopregnenolona (0,0745g) em etanol (1ml) e uma solução de KOH 10%, (350 μL) foi adicionada, tendo a reação decorrido à temperatura ambiente durante cerca de meia hora, sendo o controlo da reação realizado por CCF com eluente de éter etílico:éter de petróleo 40-60°C (1:3). A mistura reacional foi concentrada no evaporador rotativo, e à mistura resultante foi adicionado diclorometano (100ml) e água (20ml), seguindo-se agitação magnética durante 2 horas. A fase orgânica foi extraída com diclorometano (2x 200ml) e lavada com água (2x 20mL), seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada, e seca na estufa a vácuo, obtendo-se o composto sólido branco 0,0424g ($\eta=64\%$) [9].

$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 0,59 (s, 3H, 18-H3), 1,14 (s, 3H, 19-H3), 2,07 (s, 3H, 21-H3), 3,61 (m, 1H, 3 α -H), 5,64 (s, 1H, 6-H)

3.5 Reações de oxidação benzílica

3.5.1 Oxidação benzílica do Xanteno

I. Num balão de fundo redondo de 50mL dissolveu-se o Xanteno (0,25mmol) em acetonitrilo:água (2:1; 3mL). À solução previamente estabilizada à temperatura de 50°C, adicionou-se lentamente NaClO_2 (sólido, 80%) (0,5625mmol), NHPI (0,05mmol) e o catalisador de vanádio [$\text{VO}(\text{acac})_2$] (0,0125mmol). A reação decorreu, com agitação magnética e à temperatura de 50°C, tendo sido o controlo da reação realizado por CCF com eluente éter etílico:éter de petróleo 40-60°C (1:1).

A reação foi parada e a mistura reacional foi colocada em contacto com uma solução saturada de sulfito de sódio (40 ml) durante várias horas. De seguida, fez-se extração com acetato de etilo (3x 40mL) e a fase orgânica foi sucessivamente lavada com solução saturada de bicarbonato de sódio (20mL) e água destilada (20mL), seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada, obtendo-se o produto sólido, branco que foi seco na estufa a vácuo, 0,0373g ($\eta=76\%$), e após análise do $^1\text{H-RMN}$, foi confirmada a obtenção da xantona [9].

$^1\text{H-RMN}$ δ (CDCl_3 , 400 MHz) 7,36 (t, 2H, 2-H, 7-H), 7,49 (d, 2H, 4-H, 5-H), 7,70 (m, 2H, 3-H, 6-H), 8,34 (dd, 2H, 1-H, 8-H)

II. Foi efetuada uma reação igual à anterior, mas à temperatura de 25°C, tendo ficado completa ao fim de 3 horas. A extração e purificação foram realizadas de forma similar em 3.4.1.I, obtendo-se um produto [0,0455g (η =92%)], com as mesmas características e espectro ¹H-RMN similar.

3.5.2 Oxidação benzílica do Fluoreno

I. Num balão de fundo redondo de 50mL dissolveu-se o Fluoreno (0,25mmol) em acetonitrilo:água (2:1; 3mL). À solução previamente estabilizada à temperatura de 50°C adicionou-se lentamente NaClO₂ (sólido, 80%) (0,5625mmol), NHPI (0,05mmol) e o catalisador de vanádio [VO(acac)₂] (0,0125mmol). A reação decorreu, com agitação magnética e à temperatura de 50°C, tendo sido o controlo da reação realizado por CCF com eluente éter etílico:éter de petróleo 40-60°C (1:1).

A reação foi parada e a mistura reacional foi colocada em contacto com uma solução saturada de sulfito de sódio (40ml) durante várias horas. De seguida, fez-se extração com acetato de etilo (3x 40mL) e a fase orgânica foi sucessivamente lavada com solução saturada de bicarbonato de sódio (20mL) e água destilada (20mL), seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada, obtendo-se o produto sólido branco que foi seco na estufa a vácuo, 0,0407g (η =90%), e após análise do ¹H-RMN, foi confirmada a obtenção de fluorenona [9].

¹H-RMN δ (CDCl₃, 400 MHz) 7,26 (m, 2H, 2-H, 7-H), 7,48 (m, 4H, 3-H, 4-H, 5-H, 6-H), 7,65 (d, 2H, 1-H, 8-H).

II. Foi efetuada uma reação igual à anterior, mas à temperatura de 25°C, tendo ficado completa ao fim de 3 horas. A extração e purificação foram realizadas de forma similar ao descrito em 3.5.2.I obtendo-se um produto [0,0415g (η =91%)] com as mesmas características e espectro ¹H-RMN similar.

3.6 Reação de 5 β ,6 β -epoxidação do acetato de desidroepiandrosterona

Num balão de fundo redondo, dissolveu-se o substrato acetato de DHEA (0,25mmol) em 3,23ml de CH₂Cl₂. À parte, misturou-se muito bem, num almofariz, os sais permanganato de potássio (KMnO₄) e Fe₂(SO₄).7H₂O, 0,215g e 0,107g respetivamente. De seguida, adicionaram-se os sais misturados no balão da reação. Adicionou-se ainda 53,65 μ l de água e, de seguida, 270 μ l de *terc*-butanol (catalisador de transferência de fase). A reação decorreu, à temperatura ambiente sob agitação magnética, observando-se alteração da cor do permanganato de potássio de roxo para acastanhado, deixando-se reagir por 24 horas, sendo o controlo da reação realizado por CCF com um eluente de acetato de etilo:éter de petróleo 40-60°C (1:2) .

Após o término da reação, adicionou-se de éter etílico (20mL) ao balão e fez-se filtração, sob vácuo, por uma coluna de celite (\pm 3/4cm) de forma a reter a parte sólida (sais inorgânicos) e

outras impurezas da reação, lavando-se a coluna com éter dietílico (2x10mL). De seguida, adicionou-se mais 200ml de éter dietílico e a fase orgânica foi lavada com uma solução aquosa de NaOH 10% (40mL), água (40mL), e seca com sulfato de sódio anidro. Depois de filtrada, a fase orgânica foi evaporada em evaporador rotativo e obteve-se um produto sólido branco que foi seco em estufa de vácuo. 0,0817g ($\eta=95\%$) [9].

^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ 0,77 (s,3H,18-H₃), 0,96 (s, 3H, 19-H₃), 1,96 (s, 3H, CH₃CO), 3,07 (m, 1H, 6 α -H) 4,7 (m,1H, 3 α -H)

3.7 Ensaios Celulares

3.7.1 Culturas Celulares

Neste trabalho foram utilizadas duas linhas celulares distintas; células PC-3 do cancro da próstata e células N27, dopaminérgicas neuronais de rato.

As células PC-3 consistem numa linha celular, que não expressa o recetor dos androgénios, nem o PSA, sendo androgénio independentes [66,67], as células N27, obtidas a partir de embriões de ratos, são uma linha celular clonal muito usada em estudos da doença de Parkinson, apresentando características dopaminérgicas, apresentando atividade tirosina hidroxilase e baixa concentração de transportadores dopaminérgicos [68,69].

Estas células foram cultivadas em caixas de 75 cm², com meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute* - Sigma Aldrich, Portugal) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS, Biochrom AG, Portugal), e 1% de antibiótico/antimicótico (10,000 unidades/ml de penicilina, 10mg/ml de estreptomicina e 25 μg /ml de anfotericina B), e foram mantidas na estufa (*Bioblock Scientific*) a 37°C em atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂. Substituiu-se o meio de cultura a cada dois dias.

Importa referir ainda que após preparação, os meios utilizados foram esterilizados através de filtração por uma membrana com um poro de 0,2 μm e diâmetro 50mm, sob um sistema de vácuo em câmara de fluxo laminar vertical. O seu armazenamento foi feito a 4°C, sendo necessário um aquecimento prévio, num banho de água a 37°C, para a sua utilização.

3.7.2 Tripsinização, contagem e sementeira das culturas

Quando as células nas caixas de cultura atingiam uma confluência de 80-90%, (observação ao Microscópio, Olympus CK 40), foram expandidas para mais frascos de cultura ou utilizadas para a experiências de avaliação dos efeitos dos compostos na sua proliferação e tendo em conta que as células em estudo são aderentes, procedeu-se à utilização do método da tripsinização, que permite que as células aderentes ao fundo das caixas se soltem para poderem ser trabalhadas. O meio de cultura é em primeiro lugar aspirado, seguido da lavagem das células com tampão fosfato salino (10mL de tampão para uma caixa de 75cm²). Após aspirar o tampão, é adicionado um volume de tripsina-EDTA 0,025% (Sigma-Aldrich®, Missouri, Portugal) suficiente para cobrir as células, fazendo com que as células se soltem do fundo da caixa, após

incubação dos frascos a uma temperatura de 37°C em atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂ durante cinco minutos. Após se verificar ao microscópio que as células já não se encontravam aderidas, neutralizou-se a tripsina com meio de cultura completo, transferindo-se o conteúdo para um falcon que é levado à centrífuga durante oito minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido com meio de cultura. Nesta fase, pode efetuar-se a contagem das células. Quando se pretendeu expandir as células, a suspensão celular foi semeada novamente em novos frascos de cultura; quando se pretendeu realizar o estudo da avaliação dos efeitos dos compostos na sua proliferação foi preparado o volume pretendido com a concentração adequada de células para semear em caixas *multiwells* de 96 poços e retiraram-se 10µL da solução de células ressuspendida para um tubo eppendorf ao qual se adicionou um volume igual de solução de azul de triptano 0,4% (Merck, Alemanha). Colocou-se a suspensão resultante sob uma lamela numa câmara de Neubauer para se contabilizar ao microscópio o número de células existente em cada quadrante. Após a contagem das células, calculou-se a média de células existente por quadrante e duplicou-se o valor obtido (devido à diluição provocada pela adição da solução de azul de triptano), obtendo-se através da fórmula de Neubauer a concentração de células na suspensão celular. A partir deste valor preparou-se, por diluição, o volume pretendido de suspensão celular com uma densidade de 2x10⁴ células/mL, procedendo-se à cultura das células nas placas aos quais foram adicionados 100µL de suspensão celular em cada poço. As placas foram depois colocadas na incubadora a 37°C numa atmosfera humidificada com 5% de CO₂, durante 48h, para aderência e crescimento.

3.7.3 Avaliação antiproliferativa dos compostos por ensaios com o método MTT

As soluções dos compostos a estudar nas células foram preparadas a partir de uma solução-mãe dos compostos a 10µM. A partir desta solução mãe foram preparadas diluições sucessivas nos meios de cultura específicos, de modo a obter as concentrações específicas para estudos de concentração-resposta e determinação do IC₅₀: 0,01µM, 0,1µM, 1µM, 10µM, 50µM e 100µM, estudando-se um Δ⁵-esteróide e o seu derivado 7-oxidado por caixa de 96 *wells*. Para os *screenings* foi preparada uma solução de 30µM.

Ao fim de 48h de incubação após a sementeira, o meio foi substituído pelas soluções previamente preparadas, tendo sido realizados dois ensaios independentes, com quatro poços para cada composto. Após 72h de incubação das células na presença dos compostos em estudo, o meio foi aspirado e os poços lavados com algumas gotas de tampão fosfato salino (PBS).

Para avaliar a citotoxicidade dos compostos foi utilizado o ensaio do brometo de 3-(4,5 dimetiliazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio (MTT), usando-se uma solução deste composto a 5mg/mL em PBS nos ensaios, seguindo-se incubação de 4h.

O teste do MTT é um método sensível para testar compostos potencialmente anticancerígenos e é útil para medir a citotoxicidade *in vitro* e a proliferação celular. É um teste preciso,

sensível, conveniente, rápido e económico, que depende do número de células presentes e da atividade mitocondrial por célula; a sensibilidade depende também do tipo de linhagem celular. Este teste fundamenta-se no facto da enzima mitocondrial succinato desidrogenase ser capaz de clivar o sal de tetrazólio e transformá-lo num produto insolúvel de coloração azul-arroxeadada (formazano) que é impermeável às membranas celulares. Sendo assim, considera-se que a quantidade de formazano produzida é proporcional à quantidade de células viáveis, pois os cristais acumulam-se nas células vivas [65]. Os cristais são habitualmente solubilizados com DMSO após se aspirar o sobrenadante e efetua-se leitura espectrofotométrica a 570nm.

O ensaio tem de ser realizado sem luz pois o MTT é um composto sensível à luz.

O controlo negativo continha apenas meio de cultura e a média obtida da absorvância dessas quatro *wells* foi considerada como sendo 100% de viabilidade celular; todos os outros valores foram considerados em relação ao controlo negativo.

Juntamente com os esteroides usados no estudo, foi utilizado também o composto 5-FU, como controlo positivo. Este composto é um fármaco utilizado no tratamento de vários tipos de cancro [70] e serve para comparação no qual se pode inferir a atividade relativa dos esteroides em estudo.

3.7.4 Análise estatística

Para comparar os resultados obtidos nas células, recorreu-se a uma análise estatística.

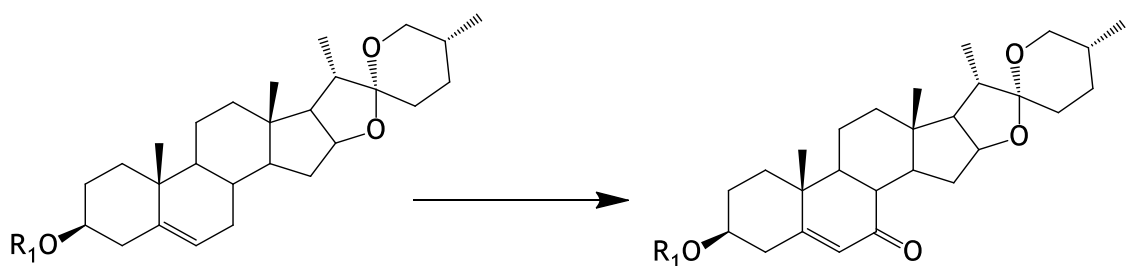
Os resultados obtidos foram analisados e os gráficos produzidos através do software *GraphPad Prism 6* como valores médios \pm desvio padrão. A comparação entre o controlo negativo e os efeitos dos compostos/concentrações foi efetuada pelo teste *t*-Student, com um intervalo de significância de 95%, para determinar a existência de diferenças significativas entre as médias. A diferença entre grupos foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$ e a coluna assinalada com um *. Os valores de IC_{50} respeitantes à ação antiproliferativa dos compostos foram calculados a partir da curva dose-resposta por cálculos de ajustamento sigmoide, utilizando-se as seis concentrações diferentes de cada composto.

Capítulo 4-Resultados e Discussão

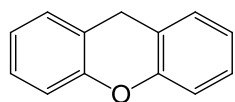
4.1 Reações químicas



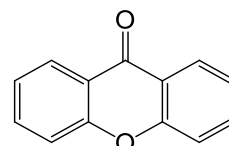
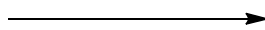
- 1.....R₁=Ac; R₂, R₃=O.....6
- 2.....R₁=Ac; R₂=COCH₃; R₃=H.....7
- 3.....R₁=Ac; R₂=C₈H₁₇; R₃=H.....8
- 4.....R₁=H; R₂, R₃=O.....9
- 5.....R₁=H; R₂=COCH₃; R₃=H.....10



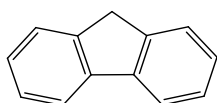
- 11....R₁=Ac...13
- 12....R₁=H....14



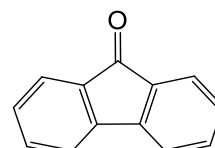
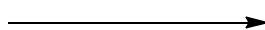
15



17



16



18

Figura 5-Eschema geral das reações de oxidação alílica e benzílica efetuadas.

Este trabalho foi realizado com o intuito de descobrir e otimizar um novo processo para a produção de enonas esteroides e baseou-se num trabalho [47] que reporta a utilização de NaClO_2 como oxidante e NHPI como catalisador radicalar. No entanto, e apesar da obtenção de rendimentos razoáveis a bons, de Δ^5 -7-oxoesteroides, o tempo de reação era ainda uma variável a explorar, tendo sido reportados os tempos de 6 a 144 horas de reação.

Foi então colocada a possibilidade da utilização de um segundo catalisador, neste caso um catalisador metálico, tendo em conta a vasta gama dos mesmos, usados em reações conhecidas para a oxidação de Δ^5 -esteroides [7,8,20,36,37].

Primeiramente, procedeu-se à acetilação dos compostos colesterol, DHEA e diosgenina, pois, como já foi referido, nas condições reacionais utilizadas poderia ocorrer concomitantemente a oxidação do grupo hidroxilo no carbono 3.

Na tabela 1 podem ser observadas as diferentes condições reacionais exploradas, incluindo reagentes utilizados e quantidades dos mesmos, tempos de reação e dados retirados da observação dos espectros $^1\text{H-RMN}$, tendo sido usado como reagente para todas as reações o acetato de DHEA 1 (Figura 5).

Inicialmente foi realizada a reação já descrita [9], tendo-se obtido o produto sólido pretendido ao fim de 6 horas de reação (Tabela 1, entrada 1), com um rendimento de 65%.

De seguida, utilizando as condições descritas na entrada 1, foram testados 4 catalisadores metálicos diferentes, um de cério, dois de bismuto e um de vanádio (Tabela 1, entradas 2-5, respetivamente), nos quais apenas se observou consumo total do substrato quando se usou o catalisador BiCl_3 , ao fim de 6 horas, e obteve-se um rendimento de 87% de produto. No entanto, parecia observar-se, principalmente quando se usou o catalisador $\text{VO}(\text{acac})_2$, que a reação era bem mais rápida que a não catalisada, mas sem consumir o substrato na totalidade. Assim, levantou-se a possibilidade de estar a haver consumo não produtivo de oxidante e/ou degradação do catalisador NHPI.

Assim, optou-se então pelo aumento da quantidade do NHPI para o dobro e redução da quantidade do catalisador de vanádio para metade da inicial, sem efeitos significativos, quer no consumo de substrato, quer no tempo total da reação (Tabela 1, entrada 6), seguindo-se o estudo do aumento da concentração do oxidante para o dobro, na presença do catalisador BiCl_3 , no qual se observou que a reação foi completa ao fim de 15 minutos (entrada 7). De seguida, foi repetida esta reação, mas com utilização, desta vez, do catalisador $\text{VO}(\text{acac})_2$ (Tabela 1, entrada 8), observando-se os resultados similares obtidos na reação da entrada anterior, tendo as 2 reações apresentado rendimentos semelhantes, de 77 e 78%, respetivamente.

A partir da análise mais cuidada dos espectros $^1\text{H-RMN}$ do produto das reações efetuadas, observou-se, porém, algum grau de duplicação do sinal dos picos característicos, o que sugere a presença de um produto secundário, bem como de um sinal suspeito com desvio químico na zona dos 3ppms, como pode ser observado na figura 6.

Tabela 1-Resultados do estudo da oxidação alílica do acetato de DHEA 1.

Entrada	Oxidante/ mmol	Catalisador Orgânico/ mmol	Catalisador Metálico/ mmol	Temperatura/ °C	Tempo	Rendimento (%)	Rácio (%) PP/PS ^a
1	NaClO ₂ /0,375	NHPI/0,025	--	50	6h	64	90/10
2	NaClO ₂ /0,375	NHPI/0,025	Ce(NH ₄) ₂ (NO ₃) ₆ /0,025	50	6h	--	--
3	NaClO ₂ /0,375	NHPI/0,025	BiCl ₃ /0,025	50	6h	87	70/30
4	NaClO ₂ /0,375	NHPI/0,025	Bi(OTf) ₃ .xH ₂ O/0,025	50	6h	--	--
5	NaClO ₂ /0,375	NHPI/0,025	VO(acac) ₂ /0,025	50	6h	--	--
6	NaClO ₂ /0,375	NHPI/0,05	VO(acac) ₂ /0,0125	50	6h	--	--
7	NaClO ₂ /0,75	NHPI/0,05	BiCl ₃ /0,0125	50	15min	77	65/35
8	NaClO ₂ /0,75	NHPI/0,05	VO(acac) ₂ /0,0125	50	15min	78	65/35
9	NaClO ₂ /0,5625	NHPI/0,05	VO(acac) ₂ /0,0125	50	15min	51	65/35
10	NaClO ₂ /0,5625	NHPI/0,05	VO(acac) ₂ /0,004	50	30min	64	75/25
11	NaClO ₂ /0,5625	NHPI/0,05	VO(acac) ₂ /0,0125	15 a 20	6h	--	--
12	NaClO ₂ /0,5625	NHPI/0,05	VO(acac) ₂ /0,0125	25	3h	51	75/25
13	NaClO ₂ /0,5625	NHPI/0,05	V ₂ O ₅ /0,0125	50	15min	49	75/25
14	NaClO ₂ /0,5625	NHPI/0,05	Na ₃ VO ₄ 0,0125	50	4h	79	75/25
15	NaClO ₂ /0,5625	NHPI/0,05	NH ₄ VO ₃ 0,0125	50	1h	76	75/25

^a PP = produto principal (7-oxoesteróide); PS = produto secundário; o ratio PP/PS foi determinado com base no sinal do 3 α -H no espectro ¹H-RMN.

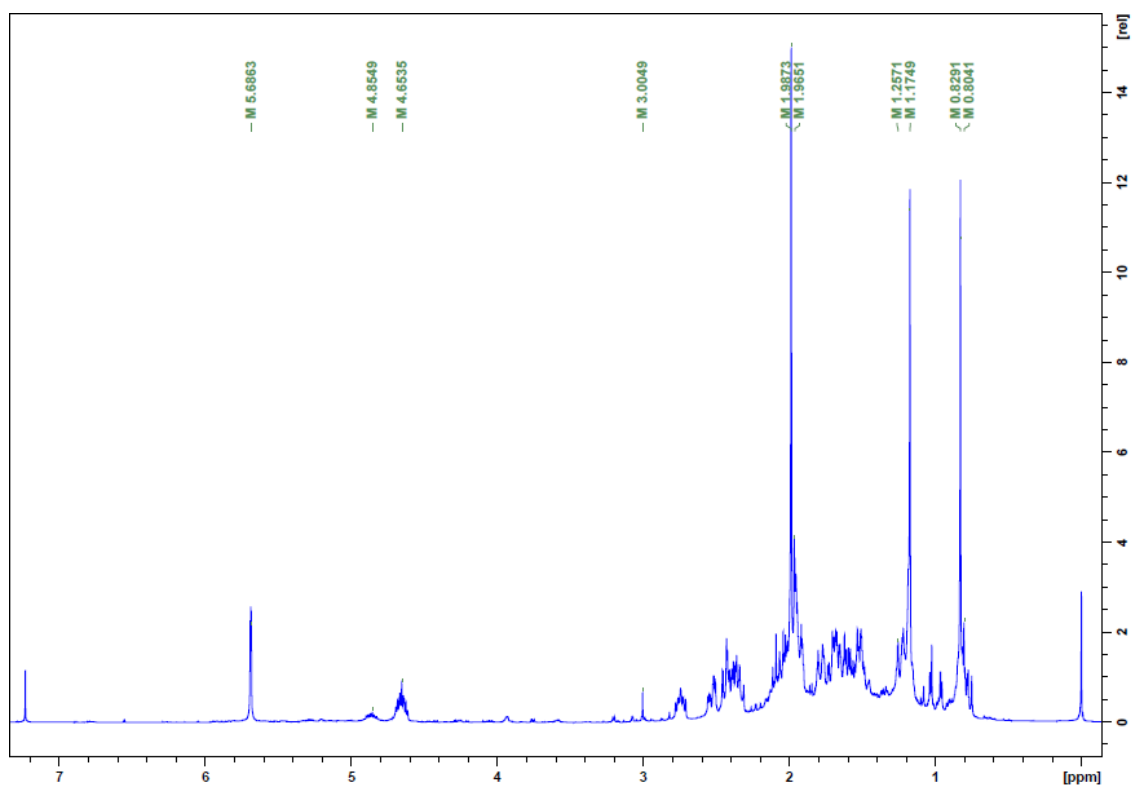


Figura 6-Espectro ^1H -RMN da reação de oxidação do acetato de DHEA 1.

Partindo da integração relativa do sinal do $3\alpha\text{-H}$ ($\delta\pm/ -4,65\text{-}4,85$), foi possível inferir a percentagem da presença do produto pretendido, o acetato de 7-oxo-DHEA, em relação ao produto secundário, que não foi possível identificar por análise dos restantes picos presentes no espectro (Figuras 6 e 7). É de notar que mesmo na reação sem catalisador metálico (Tabela 1, entrada 1) há uma pequena percentagem de produto secundário.

Já sabendo que a reação, no mínimo, demoraria 15 minutos, tentou-se reduzir as quantidades necessárias de reagentes para se obter os mesmos resultados. Inicialmente estudou-se a diminuição apenas da quantidade do oxidante NaClO_2 (Tabela 1, entrada 9), observando-se o mesmo tempo reacional, e o mesmo espectro ^1H -RMN, com identificação do produto principal e o produto secundário, porém, o rendimento de crude isolado foi inferior. Seguidamente avaliou-se a diminuição da quantidade de catalisador, conseguindo-se que a reação fosse completa ao fim de 30 minutos (Tabela 1, entrada 10), com o mesmo espectro ^1H -RMN, apenas com uma maior percentagem de produto em relação ao secundário e com rendimento de crude um pouco superior.

Outra variável estudada foi a temperatura, sendo que primeiramente a reação foi realizada à temperatura ambiente (cerca de 15 a 20°C) (Tabela 1, entrada 11), não se observando consumo total do substrato. No entanto, a reação realizada num banho a 25°C (Tabela 1, entrada 12), já ficou completa ao fim de 3 horas, e observou-se uma maior percentagem de produto principal, quando comparada com a reação similar a 50°C (Tabela 1, entrada 9), o que revela que a temperatura representa um papel fundamental na reação estudada.

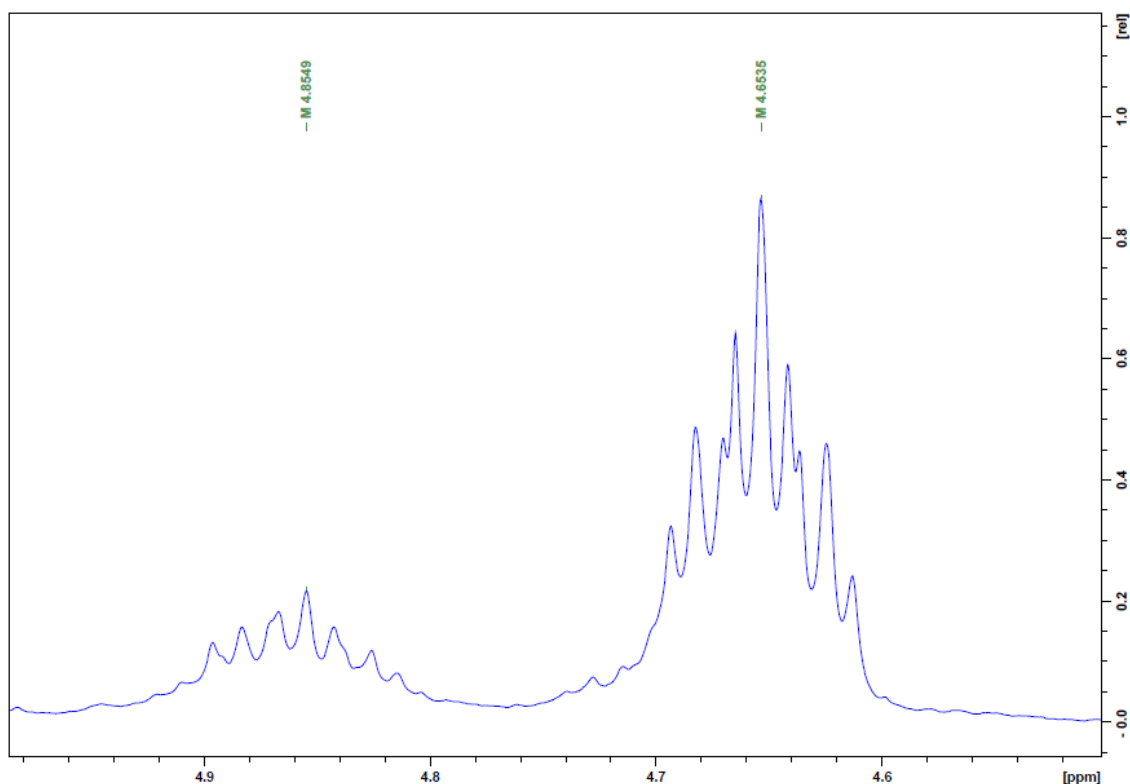


Figura 7-Ampliação do espectro da figura 6.

Finalmente, estudaram-se diferentes catalisadores de vanádio, em condições reacionais semelhantes às da entrada 9 da Tabela 1. Quando se usou o V_2O_5 (Tabela 1, entrada 13), a reação foi completa ao fim de 15 minutos, com o Na_3VO_4 , a reação foi completa ao fim de quatro horas e com o NH_4VO_3 a reação terminou ao fim de uma hora. Em todas estas 3 reações, observou-se um perfil similar sinais de produto principal/produto secundário no espectro de 1H -RMN. Porém, os rendimentos obtidos foram mais elevados com os dois últimos catalisadores. Em relação à natureza do produto secundário, tendo em atenção a observação do espectro, foi possível levantar a hipótese de que a alteração ocorria na zona da ligação dupla, pois o sinal do 6H era o único que não se encontrava duplicado, e foi também observado um sinal relevante perto de 3ppms (Figura 8), como já referido. Embora a integração deste sinal não fosse concordante com a proporção de produto secundário, tendo em conta o desvio químico, e o tipo de reação usada, foi equacionado que o produto secundário poderia ser um epóxido. Para testar esta teoria e comparar os espectros, para se verificar se o sinal correspondia ou não ao sinal já obtido nos outros espectros, realizou-se uma reação de 5 β ,6 β -epoxidação do acetato de DHEA (Figura 9), e foi possível constatar que o sinal do 6 α -H do epóxido não correspondia ao sinal observado nos espectros das reações de oxidação alílica, o que indica que o produto secundário muito provavelmente não será um epóxido. Ainda para tentar identificar o produto secundário, tentou-se separá-lo do produto principal, tendo sido, para isso, realizada uma reação seguindo as condições da entrada 9 da tabela 1, mas partindo de 1mmol de substrato. No final da reação, efetuou-se uma coluna cromatográfica com sílica-gel, da qual foi possível obter sete frações diferentes. Destas frações, foi obtido um

produto sólido em quatro delas, após evaporação, sendo que o produto pretendido se encontrava na quarta fração retirada da coluna. Contudo, após análise por $^1\text{H-RMN}$, foi constatado de que o espectro se encontrava similar aos obtidos anteriormente, identificando-se a presença do produto secundário em conjunto com o principal, não tendo sido possível, assim, separar os dois. As outras frações foram todas analisadas por $^1\text{H-RMN}$, no entanto, não foi possível tirar qualquer conclusão, pois os espectros não foram claros.

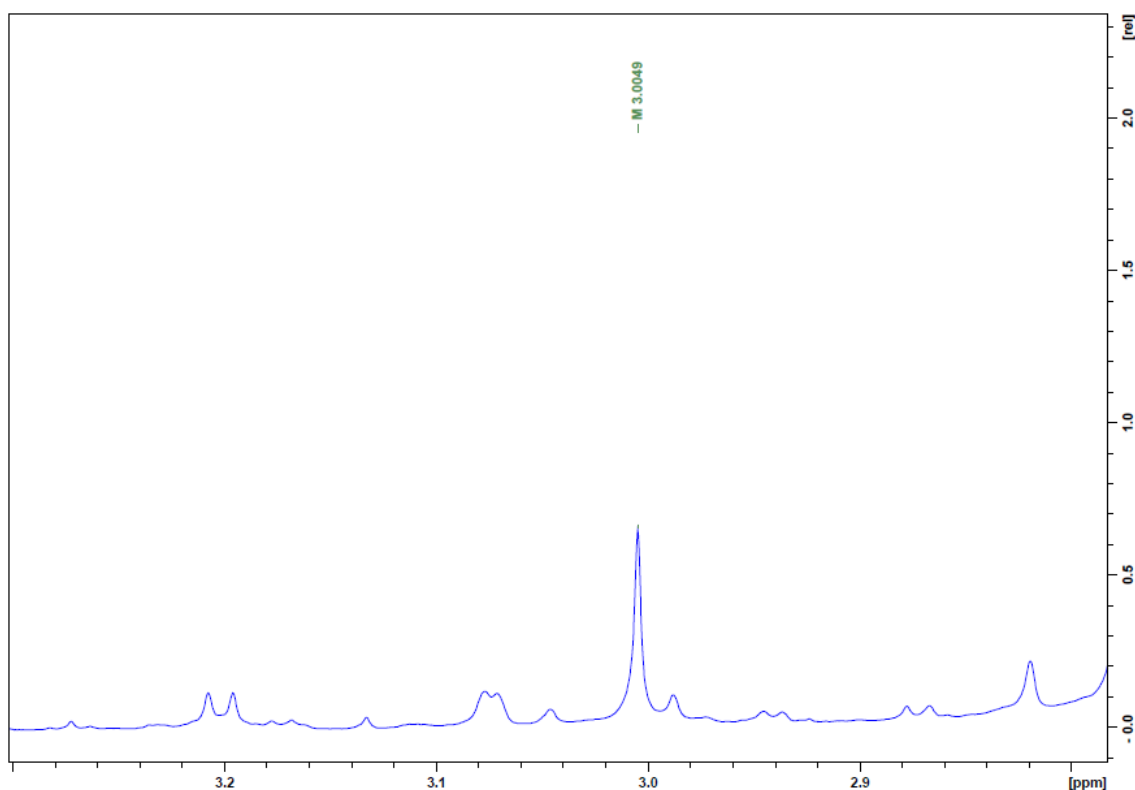


Figura 8-Ampliação do espectro da figura 6.

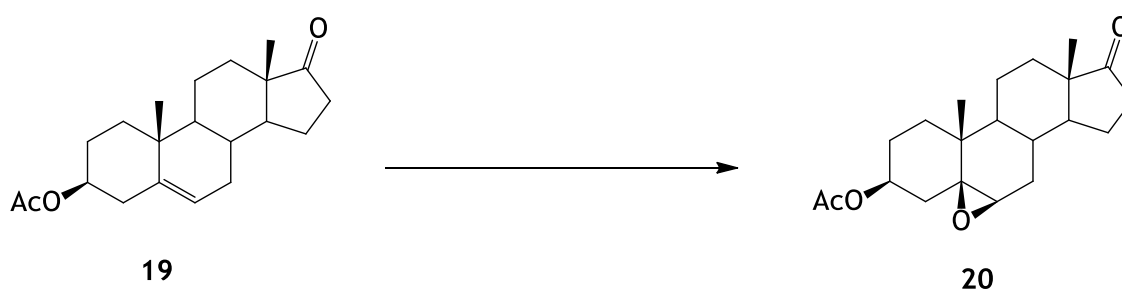


Figura 9-5B,6B-Epoxidação do acetato de desidroepiandrosterona.

Uma outra possibilidade para explorar o tipo de produto secundário formado que não foi estudada consiste na utilização de *scavengers* de hipoclorito, como o 2-metil-2-buteno ou mesmo DMSO como realizado em [71]. De facto, o clorito de sódio pode originar hipoclorito e este composto pode ser responsável, designadamente, por reações de cloração.

Seguidamente, o objetivo foi testar outros oxidantes, catalisadores e substratos (0,25mmol) como observado na tabela 2.

Tabela 2-Reações de oxidação alílica a 50°C com catalisador de vanádio VO(acac)₂ (0,0125mmol).

Entrada	Substrato/ 0,25 mmol	Oxidante/ mmol	Catalizador Organico/ mmol	Rendimento ^a	Tempo	Rácio (%) PP/PS
1	Ac DHEA 1	H ₂ O ₂ /0,5625	NHPI/0,05	87%	30h	--
2	Ac DHEA 1	H ₂ O ₂ /0,5625 ^b	NHPI/0,05	--	30h	--
3	Ac DHEA 1	H ₂ O ₂ /1,4	NHPI/0,05	--	30h	--
4	Ac DHEA 1	H ₂ O ₂ /1,4 ^b	NHPI/0,1	--	30h	--
5	Ac DHEA 1	NaClO ₂ /0,5625	TEMPO/0,05	--	6h	--
6	Ac DHEA 1	TBHP ^c /0,5625	NHPI/0,05	--	6h	--
7	Ac DHEA 1	NaClO ₂ /0,0125	CH ₂ O/0,05	74%	30h	--
8	Ac Pregnenolona 2	NaClO ₂ /0,5625	NHPI/0,05	84%	15min	60/30
9	Ac Colesterilo 3	NaClO ₂ /0,5625	NHPI/0,05	--	--	--

^aO rendimento da reação foi calculada para o crude obtido.

^bA adição do H₂O₂ (30% V/V) foi feita por fases, adicionando 7μL a cada 15 minutos durante duas horas após início da reação.

^cSolução aquosa a 70%.

Inicialmente, testou-se a utilização de peróxido de hidrogénio, em vez de clorito de sódio e, para isso, a reação foi realizada em condições similares às da entrada 9, da tabela 1, a qual foi deixada a reagir durante 30 horas, não se observando consumo completo do substrato (Tabela 2, entrada 1). No entanto, a extração de produto reacional foi feita para posterior análise por ¹H-RMN, a qual revelou a existência de produto principal, o substrato inalterado e a presença, mais uma vez, do produto secundário não identificado em proporções de 30, 55 e 15% respetivamente. Na entrada 2 da Tabela 2, a adição do H₂O₂ foi feita por fases, conforme descrito na parte experimental desta dissertação, tendo a reação decorrido igualmente por 30 horas. Apesar de parecer ter havido maior formação de produto, a reação não foi completa. Seguidamente, aumentou-se a quantidade de H₂O₂ (Tabela 2, entrada 3), com adição do oxidante de uma só vez, e não se observaram alterações relevantes na quantidade de produto consumido. Posteriormente, e para completar o estudo em relação à utilização do peróxido de hidrogénio como potencial oxidante, foi aumentada sua quantidade bem como a de NHPI (Tabela 2, entrada 4). No entanto, ao fim das mesmas 30 horas de reação, os resultados foram semelhantes aos anteriormente obtidos, em relação ao consumo do substrato.

Na literatura, o radical TEMPO encontra-se descrito como um inibidor radicalar que também pode atuar como agente oxidante [72-74]. Como o NHPI é um catalisador radicalar tentou-se verificar o seu envolvimento neste processo de oxidação que está descrito como um processo de natureza radicalar [9]. Assim, substituiu-se o NHPI pelo TEMPO (Tabela 2, entrada 5) com a finalidade de inibir a reação, a qual se veio a verificar.

Para além do peróxido de hidrogénio, foram testados mais oxidantes, designadamente o TBHP, observando-se fraca formação de produto ao fim de 6 horas de reação (Tabela 2, entrada 6), ao contrário do descrito na literatura num sistema similar, mas usando outros catalisadores

metálicos [35]. Uma vez que estava descrito o uso de aldeídos na promoção de reações com NaClO_2 [75], também foi estudada a combinação deste oxidante com o formaldeído (Tabela 2, entrada 7), sendo neste caso os resultados similares aos observados com o uso de H_2O_2 .

Foi também testada a reação na oxidação de outros esteroides (Figura 5), como o acetato de pregnenolona **2**, na qual a reação foi considerada completa ao fim de 15 minutos (Tabela 2, entrada 8), no entanto, e como nas reações com o acetato de DHEA **1**, foi observada a presença do produto 7-oxidado, bem como a existência de um produto secundário não identificado. A reação realizada com o acetato de colesterilo **3** como substrato não levou a qualquer formação evidente de produto **8**, no entanto, foi possível ver que a dissolução deste esteroide no solvente não foi completa, o que pode ter influenciado a mesma.

Esta reação não foi utilizada para a oxidação do acetato de diosgenina **11** pois já tinha sido reportado anteriormente [9] que nas condições reacionais utilizadas há degradação da cadeia lateral.

Com o intuito de completar mais um pouco o estudo e comprovar a aplicabilidade da reação foram oxidados outros substratos (Figura 5), designadamente o xanteno **15** e o fluoreno **16**. Ambos os substratos foram submetidos às condições reacionais descritas na entrada 9 da tabela 1, tanto a 50 como a 25°C, tendo as reações ficado completas ao fim de 15 minutos e 3h horas respectivamente, obtendo-se os produtos **17** e **18**, com um rendimento a rondar os 95%. Neste caso, os produtos foram obtidos puros sem qualquer contaminação ou formação de produtos secundários, como foi comprovado pelo espectro $^1\text{H-RMN}$.

À luz dos resultados obtidos e na impossibilidade de se obter produto puro para utilização nos estudos de citotoxicidade nas linhas celulares, foi necessário recorrer a outro tipo de reações para a obtenção dos esteroides 7-oxidados que foram usados nos estudos celulares.

Assim, fez-se a oxidação alílica dos substratos DHEA **4**, acetato de pregnenolona **2** e acetato de diosgenina **11**. Os 2 primeiros foram oxidados com TBHP e BiCl_3 em acetonitrilo a 70°C [36], tendo os substratos sido consumidos ao fim de 1 dias e 6 horas, obtendo-se os produtos **9** e **7** puros, após realização de uma coluna cromatográfica para purificação. O acetato de 7-oxopregnenolona **7** foi ainda hidrolisado para originar o correspondente derivado 3-hidroxilado **10**.

Uma vez que não se conseguiu isolar o derivado 7-oxidado na reação da diosgenina **12** com TBHP e BiCl_3 , foi então utilizado um outro método de oxidação alílica, reportado por Arsenou e colaboradores [45], na oxidação do acetato de diosgenina **11**, usando TBHP, brometo de cobre e TBAC, à temperatura ambiente. Apesar de ter sido completa ao fim de 4 horas, esta reação revelou alguns problemas na fase da purificação. Na hidrólise para obtenção do 7-oxodiosgenina **14** (Figura 10) também se encontraram algumas dificuldades, obtendo-se um rendimento muito baixo de apenas 5%.

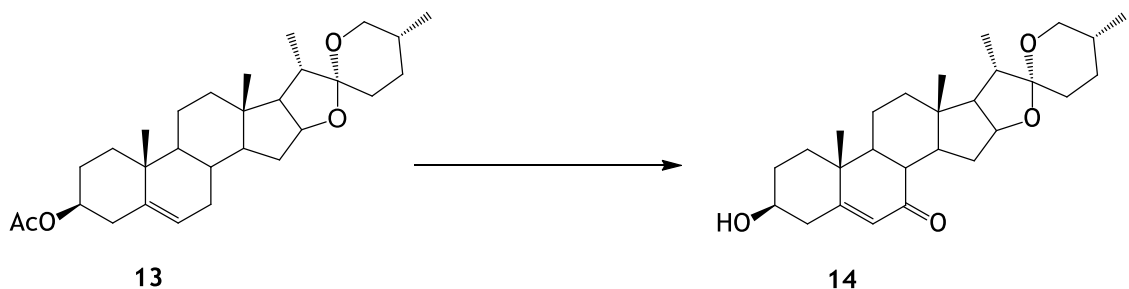


Figura 10-Hidrólise alcalina do acetato de 7-oxodiosgenina 13.

4.2 Ensaios de viabilidade celular

Após a preparação das soluções mãe dos seis compostos a estudar (DHEA 4, 7-oxoDHEA 9; diosgenina 12, 7-oxodiosgenina 14; Pregnenolona 5, 7-oxopregnenolona 10), e uma do composto 5-FU, foi realizado um primeiro ensaio de *screening* de citotoxicidade nas duas linhas celulares em estudo. Nas figuras 11 e 12 estão apresentados os resultados deste ensaio obtidos para as linhas celulares N27 e PC3, respetivamente. Observando as duas figuras, podemos tirar algumas conclusões em relação ao comportamento das células na presença dos compostos. Tendo em conta que as células N27 são células normais e as células PC3 são cancerígenas, um objetivo é observar se os compostos em estudo são ou não mais tóxicos para as células do cancro do que para células normais.

Observando a figura 11, podemos observar que a 7-oxodiosgenina 14 e a pregnenolona 5 se apresentam bastante tóxicos para as células, e que, em comparação com o 5-FU, todos os outros compostos são menos tóxicos. Em relação à figura 12, mais uma vez, um dos compostos mais tóxicos é a 7-oxodiosgenina 14 e, neste *screening*, a pregnenolona 5 e a 7-oxopregnenolona 10 foram tóxicos a níveis muito idênticos. Nestes estudos, é ainda de realçar que a oxidação da diosgenina 12 parece aumentar a sua citotoxicidade.

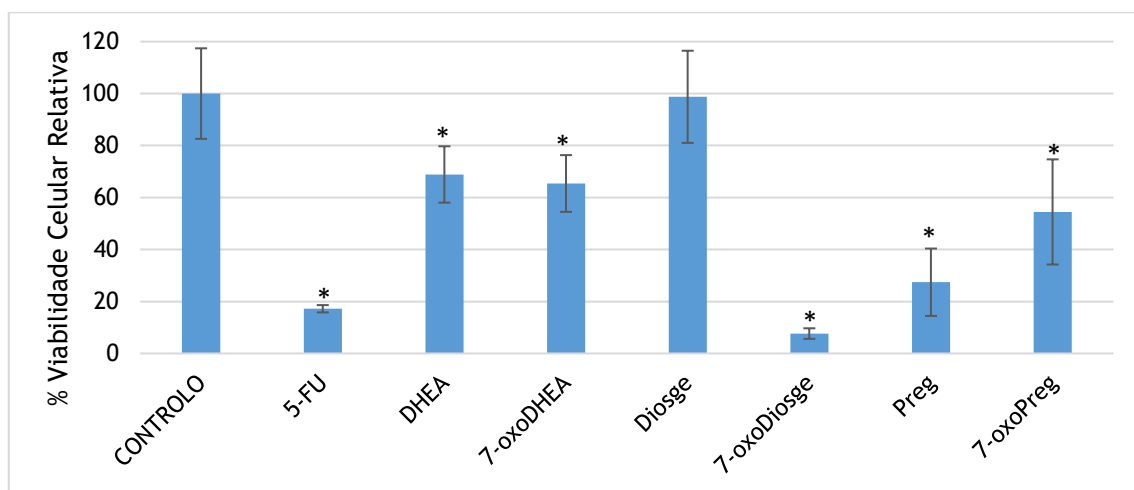


Figura 11-Efeito na viabilidade celular nas células N27 dos compostos a 30 μ M, após 72h de exposição.

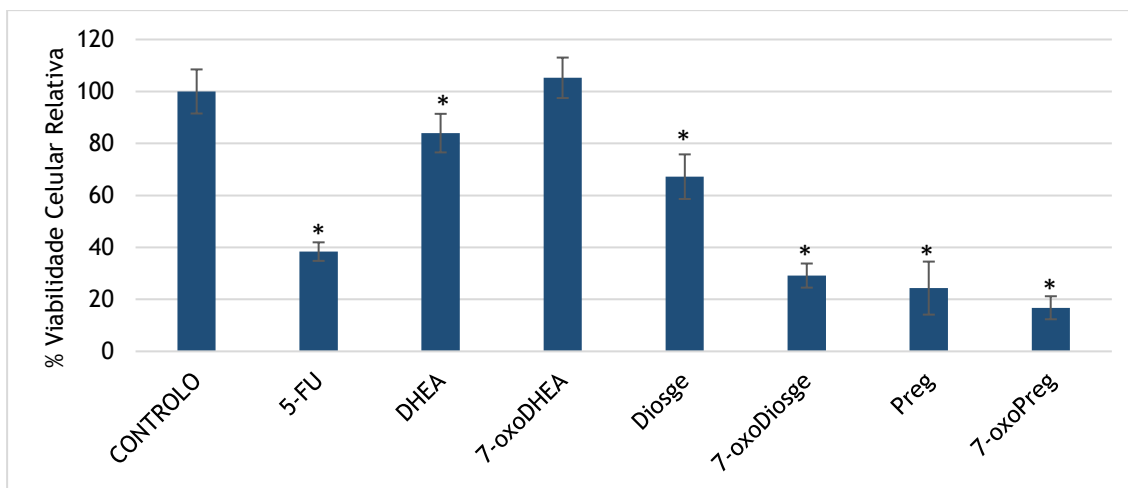


Figura 12-Efeito na viabilidade celular nas células PC3 dos compostos a 30µM, após 72h de exposição.

Seguidamente à realização dos *screenings* e observando o comportamento das células em relação às soluções a 30µM, foram realizados os ensaios para determinação dos IC₅₀, sendo apresentado a seguir as figuras dos resultados obtidos e o IC₅₀ calculado para cada composto.

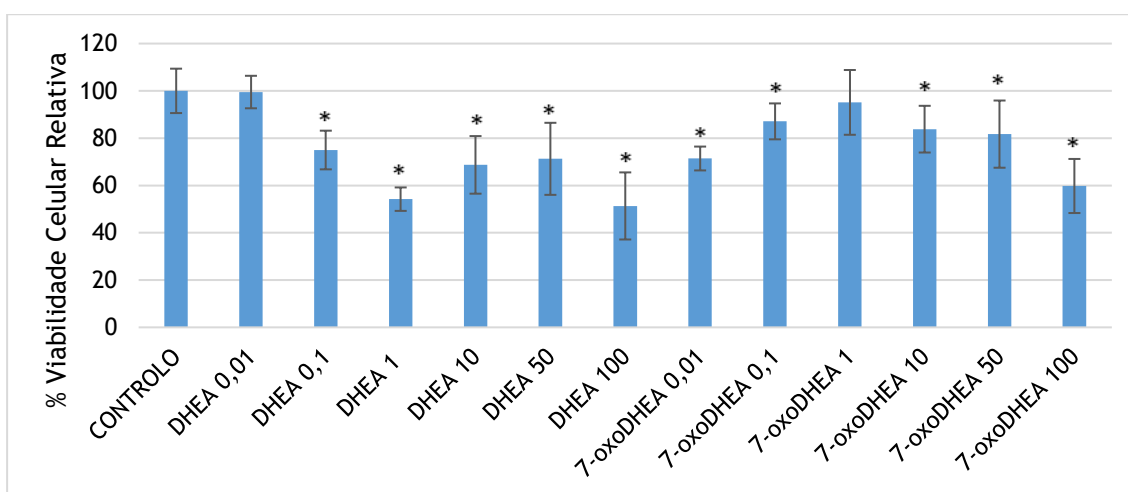


Figura 13-Efeito dos compostos DHEA 4 e 7-oxoDHEA 9 na viabilidade celular das células N27, após 72h de exposição; *p<0,05 (teste t-Student).

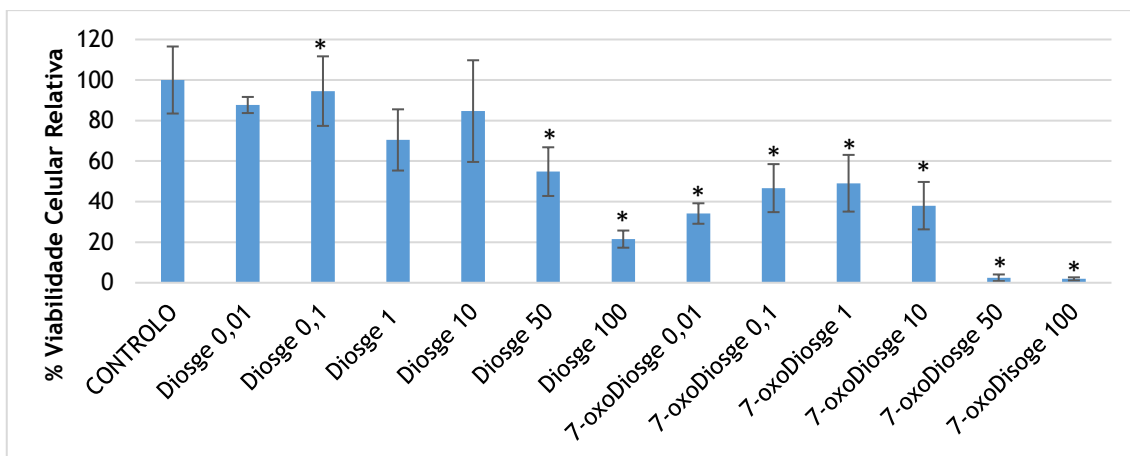


Figura 14-Efeito dos compostos diosgenina 12 e 7-oxodiosgenina 14 na viabilidade celular das células N27, após 72h de exposição; *p<0,05 (teste t-Student).

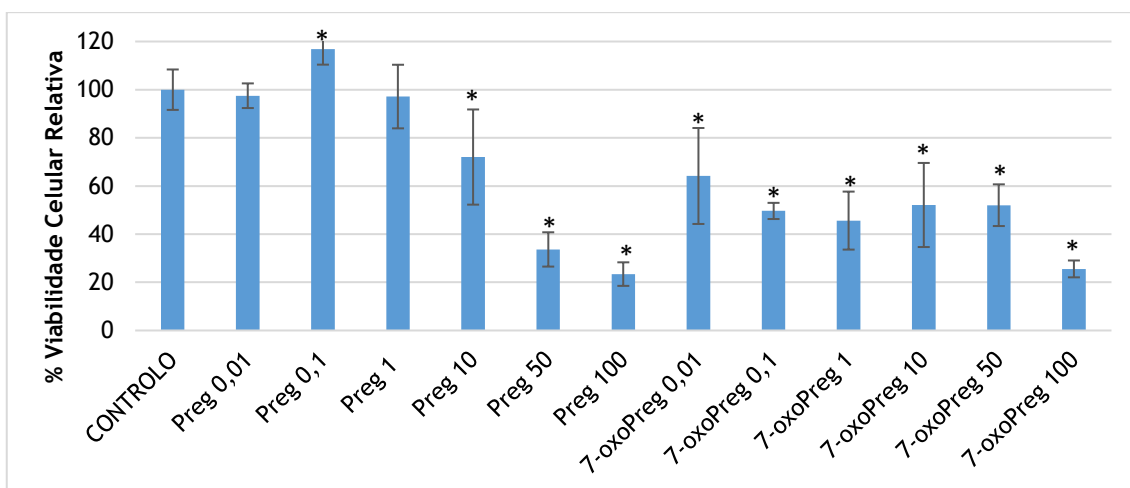


Figura 15-Efeito dos compostos pregnenolona 5 e 7-oxopregnenolona 10 na viabilidade celular das células N27, após 72h de exposição; *p<0,05 (teste t-Student).

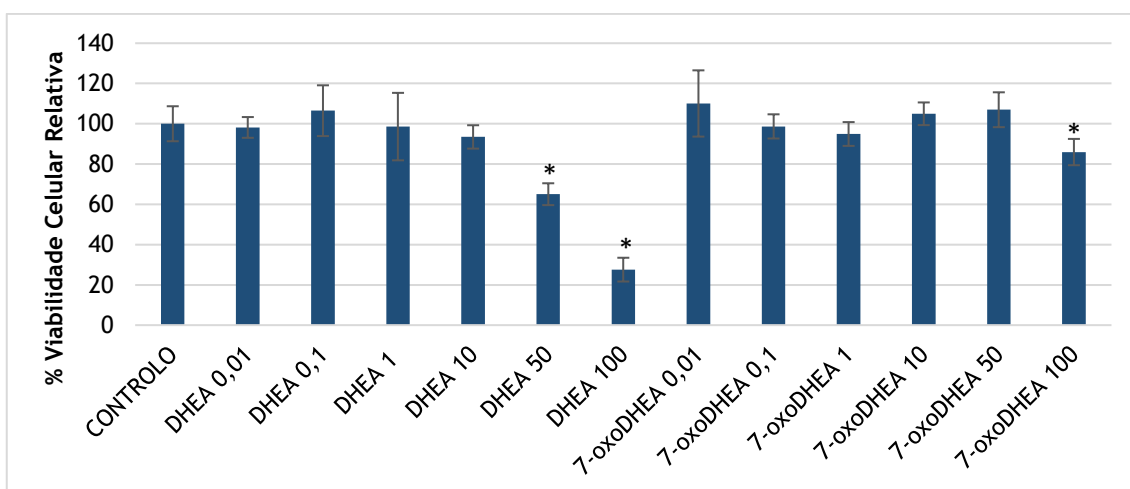


Figura 16-Efeito dos compostos DHEA 4 e 7-oxoDHEA 9 na viabilidade celular das células PC3, após 72h de exposição; *p<0,05 (teste de t-Student).

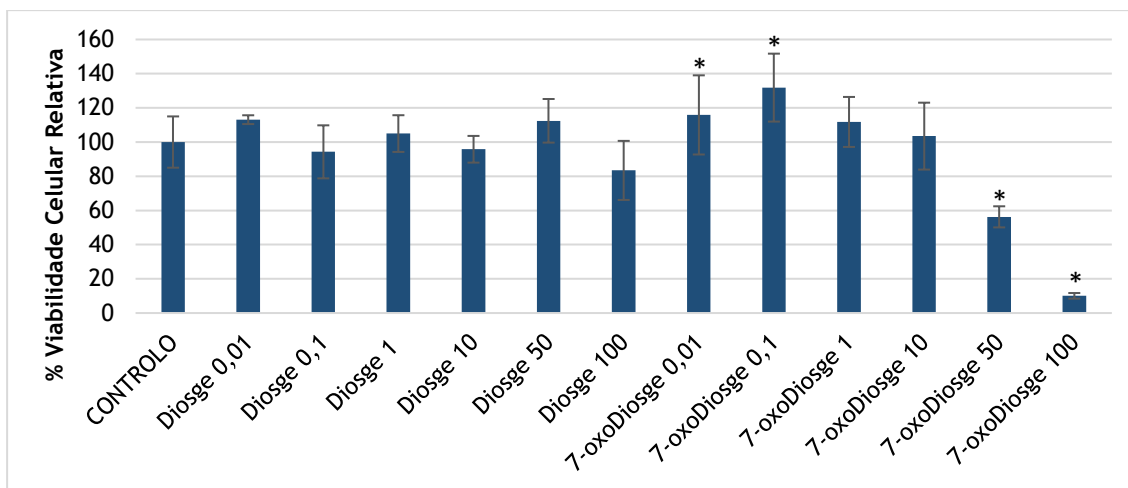


Figura 17-Efeito dos compostos diosgenina **12** e 7-oxodiosgenina **14** na viabilidade celular das células PC3, após 72h de exposição; * $p < 0,05$ (teste de t -Student).

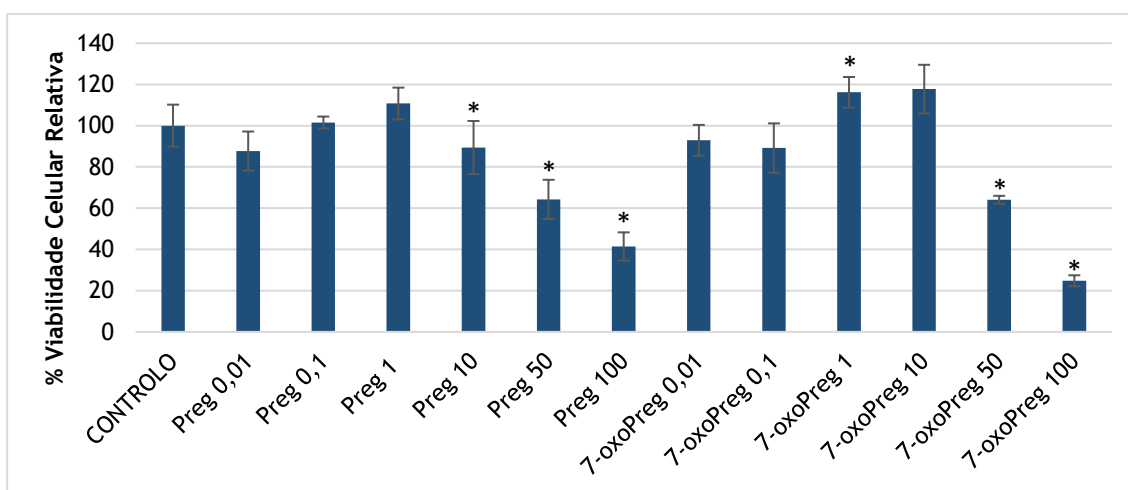


Figura 18-Efeito dos compostos pregnenolona **5** e 7-oxopregnenolona **10** na viabilidade celular das células PC3, após 72h de exposição; * $p < 0,05$ (teste de t -Student).

Tabela 3-IC₅₀ e r² dos compostos nas duas linhas celulares estudadas.

Linha Celular	Composto estudado	IC ₅₀ (μM)	r ²
N27	DHEA 4	ND ^a	ND ^a
	7-oxo-DHEA 9	>100	ND ^a
	Diosgenina 12	100,6	ND ^a
	7-Oxodiosgenina 14	31,35	0,7171
	Pregnenolona 5	13,65	0,8509
	7-Oxopregnenolona 10	ND ^a	ND ^a
	5-FU	0,5067	0,9097
PC3	DHEA 4	69,42	0,9096
	7-oxo-DHEA 9	>100	ND ^a
	Diosgenina 12	>100	ND ^a
	7-Oxodiosgenina 14	39,58	0,6650
	Pregnenolona 5	70,21	0,8169
	7-Oxopregnenolona 10	55	0,8889
	5-FU	61,17	0,9018

^a ND = não definido

Inicialmente e observando a figura 13, pode-se constatar que a variação da proliferação celular com o aumento da concentração observada para ambos os compostos não é a mais habitual, embora pareça haver maior toxicidade para o DHEA 4. Contudo, devia repetir-se este ensaio para se ter resultados mais claros em relação aos efeitos destes compostos. Quando comparados estes dados com os observados com estes compostos na linha celular cancerígena (Figura 16), parece haver maior toxicidade destes androstanos para as células normais.

Analisando a figura 14, respeitante ao conjunto diosgenina 12 e 7-oxodiosgenina 14, é evidente que o derivado 7-oxidado é bastante mais citotóxico para as células N27 que a diosgenina 12. De facto, apenas nas duas concentrações mais elevadas (50 e 100μM) de diosgenina, se observa uma redução evidente da proliferação celular. Para a 7-oxodiosgenina 14, o IC₅₀ calculado foi de 31,35μM (Tabela 3) e é superior ao determinado para a diosgenina 12. Também com estes compostos se observou menor toxicidade para as células tumorais (Figura 17).

De acordo com a figura 15, a pregnenolona 5 parece ser menos tóxica para as células N27 que o seu derivado 7-oxidado, embora quando se calcula os IC₅₀ dos 2 compostos os dados possam parecer enganadores (Tabela 3). Quando comparados estes dados com os observados com estes compostos na linha celular cancerígena (Figura 18), parece haver maior toxicidade da 7-oxopregnenolona 10 para as células normais.

Em relação aos dados obtidos nos ensaios com as células PC3, observam-se perfis diferentes em função da série de esteroides: o DHEA 4 é mais citotóxico que o 7-oxoDHEA 9 e o inverso acontece com a diosgenina 12/7-oxodiosgenina 14; no caso da pregnenolona 5 e derivado oxidado 10, a citotoxicidade deste também parece ser um pouco superior.

É conhecido que, uma vez que nas células, parte significativa da DHEA 4 e da pregnenolona 5 pode ser metabolizada a hormonas esteroides [65], e isto pode contribuir para um aumento da

viabilidade celular em concentrações mais baixas destes esteroides. De facto, na figura 15, observa-se um aumento da proliferação das células N27 na presença de 0,1 μ M de pregnenolona 5. Esta situação, teoricamente não deverá ocorrer para os seus 7-oxoderivados, pois estes já não serão metabolizados a hormonas [49,76], e este aspeto potencial de segurança destes compostos tem explicado parte do interesse neles ao longo dos anos. Neste âmbito, é interessante verificar que a introdução da cetona em C7 levou a um aumento dos efeitos antiproliferativos, particularmente no caso do 7-oxodiosgenina 14 nas células PC3, quando se compara com os esteroides precursores, facto que pode ser explorado em estudos posteriores. Neste contexto, foi observado que a introdução do grupo 7-cetona aumentou significativamente a atividade antileucémica de androstanos conjugados com clorambucilo em comparação com os correspondentes análogos não oxidados [77]. Porém, noutros estudos em células hepáticas (HepG2) e intestinais (Caco-2), observou-se que a DHEA 4 se revelou mais tóxica para as células do que a 7-oxoDHEA 9 [78]. Adicionalmente, estudos mais recentes envolvendo células MCF-7, LNCaP e NHDF corroboram estes últimos resultados [65].

Na extrapolação dos dados obtidos em ensaios celulares para o que deverá acontecer *in vivo*, é necessário ter em conta a heterogeneidade e as interações celulares inter e intratumorais, a escolha das concentrações dos fármacos relevante para determinado tipo de tumor, e a grande interferência das condições experimentais utilizadas. O próprio processo de cultura celular utilizada causa *stress* oxidativo, quer por facilitar a produção de espécies reativas de oxigénio, quer por poder impedir a regulação adaptativa de antioxidantes celulares existindo sempre erros associado a este tipo de testes [65].

Finalmente nas figuras 19 e 20 estão os resultados obtidos para o composto 5-FU, que foi usado para comparação, pois é um composto usado na clínica, e os seus efeitos estão bem conhecidos [70]. Os IC₅₀ calculados foram de 0,5067 μ M para as células N27 e 61,17 μ M, para as células PC3 e é evidente a elevada citotoxicidade deste composto para as células N27, ao contrário do observado nas células PC3.

Capítulo 5-Conclusões e Perspetivas Futuras

Após terminada a realização deste trabalho, as principais conclusões adquiridas foram que um novo processo para a oxidação alílica de Δ^5 -esteroides foi explorado, no qual foi possível ter consumos completos de substrato ao fim de 15 minutos de reação. No entanto, esta reação apresenta a presença de um produto secundário, o qual não foi possível identificar ou separar do produto principal.

Ao nível dos estudos da citotoxicidade nas linhas celulares, e cálculo do IC_{50} dos compostos, verificou-se que os compostos 7-oxidados da diosgenina e da pregnenolona se apresentaram mais tóxicos que os precursores não oxidados para a linha tumoral PC3. No entanto, estes estudos preliminares não nos permitem tirar conclusões de modos de atuação, mecanismos ou vias envolvidas que levam à sua atividade de diminuição da viabilidade celular.

Como perspetivas futuras e de forma a tentar ultrapassar o problema da formação do produto secundário, em estudos futuros é de considerar o uso de diferentes tipos de *scavengers* de hipoclorito como por exemplo o 2-metil-2-buteno, muito usado em reações com o $NaClO_2$, a utilização de diferentes temperaturas ou quantidade de reagentes, e um estudo mais intensivo dos espectros na tentativa de identificação do composto formado.

Ao nível celular, é proposto o estudo em diferentes tipos de linhas celulares e com outros esteroides 7-oxidados. Além disso, poderão realizar-se estudos de citometria de fluxo para confirmação dos processos de apoptose e de imunofluorescência para confirmação da localização dos compostos na célula e do seu local de atuação.

Capítulo 6-Referências Bibliográficas

[1] (2003). BURGER'S MEDICINAL CHEMISTRY AND Drug Discovery Volume 3. Medicinal Chemistry, edited by Abraham J.Donald. 593-628.

[2] Nes, W. David. (2011). Biosynthesis of cholesterol and other sterols. Chemical Reviews, 111(10), 6423-6451.

[3] Ghayee, H. K., Auchus, R. J. (2007). Basic concepts and recent developments in human steroid hormone biosynthesis. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders, 8(4), 289-300.

[4] Miller, W. L., Auchus, R. J. (2011). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. Endocrine Reviews, 32(1), 81-151.

[5] Häggström, M., Richfield, D. Stannered, Hoffmeier, Settersr (2014). Diagram of the pathways of human steroidogenesis. WikiJournal of medicine, 1(1), 2-6.

[6] Rodwell, W. Victor, Bender, A. David, Botham, M. Kathleen, Kennelly J. Peter, Weil Anthony P. (2006). Harper's Illustrated Biochemistry, 226-280

[7] Silvestre, S.M., Silva, M. M. C., Salvador, J. A. R., (2016). Recent Highlights in Green Oxidative Chemical Processes Applied to Steroid Chemistry, Green Nanotechnology. Overview and Further Prospects, Dr. Marcelo Larramendy (Ed.), InTech, Available from: <https://www.intechopen.com/books/green-nanotechnology-overview-and-further-prospects/recent-highlights-in-green-oxidative-chemical-processes-applied-to-steroid-chemistry>

[8] Salvador A. R., Silvestre S. M., Moreira, V M. (2012). Recent Developments in Oxidative Processes in Steroid Chemistry. Current Organic Chemistry, 16(10), 1243-1276.

[9] Silvestre, S. M. (2007). Tese de doutoramento: Novos Processos de oxidação ambientalmente aceitáveis usando esteroides como substratos, Universidade de Coimbra.

[10] Carvalho, J. F. S., Silva, M. M. C., Moreira, J. N., Simões, S., Sá E Melo, M. L. (2010). Sterols as anticancer agents: Synthesis of ring-B oxygenated steroids, cytotoxic profile, and comprehensive SAR analysis. Journal of Medicinal Chemistry, 53(21), 7632-7638.

[11] Salvador, J. A. R., Carvalho, J. F. S., Neves, M. A. C., Silvestre, S. M., Leitão, A. J., Silva, M. M. C., Sá e Melo, M. L. (2013). Anticancer steroids: linking natural and semi-synthetic compounds. Natural product reports (Vol. 30). 324-374

- [12] Gupta, A., Kumar S. B., Negi, A. S. (2013). Current status on development of steroids as anticancer agents. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 137, 242-270.
- [13] Blickenstaff, R. T. (1992). *The role of Steroids in Cancer Treatment*. Academic Press, 1-10.
- [14] Moss, G. P. (1989). *The nomenclature of steroids*. Queen Marry College, Mile end Road, London 186(3), 429-458.
- [15] Henry, H. L. (2011). Regulation of vitamin D metabolism. *Research Clinical Endocrinology Metabolism*, 25(4),531-541.
- [16] Chiang, J. Y. L. (2009). Bile acids: regulation of synthesis. *Journal of Lipid Research*, 50(10), 1955-1966.
- [17] Smith, L. L. (1996). Review of progress in sterol oxidations: 1987-1995. *Lipids*, 31(5), 453-487.
- [18] Salvador, J. A. R., Silvestre, S. M., Moreira, V. M. (2006). Catalytic Oxidative Processes in Steroid Chemistry: Allylic Oxidation, Selective Epoxidation, Alcohol Oxidation and Remote Functionalization Reactions. *Current Organic Chemistry*, 10, 2227-2257
- [19] Murphy, E. F., Mallat, T., Baiker, A. (2000). Allylic oxofunctionalization of cyclic olefins with homogeneous and heterogeneous catalysts. *Catalysis Today*, 57(1-2), 115-126
- [20] Parish, E. J., Kizito, S. A, Qiu, Z. (2004). Review of chemical syntheses of 7-keto- Δ^5 -sterols. *Lipids* 39(8), 801-804.
- [21] Wendell. SG, Edward.JP. (2016). A Short Review of Methods for the Allylic Oxidation of Δ^5 Steroidal Compounds to Enones. *Jornal of Steroids and Hormonal Science*, 7(2), 171.
- [22] Marwah, P., Marwah, A., Lardy, H. A. (2004). An economical and green approach for the oxidation of olefins to enones. *Green Chemistry*, 6(11), 570.
- [23] Fraunhoffer, K. J. (2014). Oxidation Adjacent to C C Bonds. *Comprehensive Organic Synthesis: Second Edition (Vol. 7)*. Elsier Lda.
- [24] Sheldon, R. A., Kochi, J. K. (1981). *Metal-Catalyzed Oxidations of Organic Compounds*, (Chapter 9), Olefins 289-293.
- [25] Marshall, C. W., Ray, E. J. (1957). Riegel B. Lavos I. 7-Keto Steroids. II. Steroidal 3 β -Hydroxy- Δ^5 -ones and $\Delta^{3,5}$ -ones, 79, 6308-6313

- [26] Dwight S., F., Chi-Ming C., (1976). In Situ Allylic Oxidations With Collins Reagent, *Synthetic Communications: An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry*, 6:3, 217-220
- [27] Edward J., P. S., C., (1985) Benzotriazole-Mediated Selective Chromium(VI) Oxidations, *Synthetic Communications: An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry*, 15:5, 393-399
- [28] Salmond, W. G., Barta, M. A., Havens, J. L. (1978). Allylic Oxidation with 3,5-Dimethylpyrazole. Chromium Trioxide Complex. Steroidal Δ^5 -7-Ketones. *Journal of Organic Chemistry*, 43(10), 2057-2059.
- [29] Parish, E. J., Wei, T-Y. (1987). Allylic Oxidation of Δ^5 -Steroids with Pyridinium Chlorochromate (PCC) and Pyridinium Dichromate (PDC). *Synthetic Communications*, 17(10), 1227-1233.
- [30] Finucane, B. W., Thomson J. B., (1972). Triterpenoids. Parte VIII. Allylic Oxidation by *N*-Bromosuccinimide. Department of Chemistry, University College, Dublin 4, Irland 1856-1862
- [31] Finucane, B. W., Thomson, J. B. (1969). Direct oxidation of allylic methylene to carbonyl. *Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications*, (20), 1220.
- [32] Tal, D. M., Elliott W. H. Doisy, E., A. (1983). Bile acides. LXVIII. Allylic and Benzylic Photo-Chemical Oxidations of Steroids. (5) 23-52
- [33] Ishii, Y., Sakaguchi, S., Iwahama, T. (2001). Innovation of Hydrocarbon Oxidation with Molecular Oxygen and Related Reactions. *Advanced Synthesis Catalysis*, 343(5), 393-427.
- [34] Ochiai, M., Ito, T., Takahashi, H., Nakanishi, A., Toyonari, M., Sueda, T., Goto S., Shiro, M. (1996). Hypervalent (*tert*-butylperoxy)iodanes generate iodine-centered radicals at room temperature in solution: Oxidation and deprotection of benzyl and allyl ethers, and evidence for generation of α -oxy carbon radicals. *Journal of the American Chemical Society*, 118(33), 7716-7730.
- [35] Zhao, Q., Qian, C., Chen, X-Z. (2015). *N*-Hydroxyphthalimide catalyzed allylic oxidation of steroids with *t*-butyl hydroperoxide. *Steroids*, 94, 1-6.
- [36] Salvador, J. A. R., Silvestre, S. M. (2005). Bismuth-catalyzed allylic oxidation using *t*-butyl hydroperoxide. *Tetrahedron Letters*, 46(15), 2581-2584.
- [37] Grainger, W. S., Parish, E. J. (2015). Allylic oxidation of steroidal olefins by vanadyl acetylacetonate and *tert*-butyl hydroperoxide. *Steroids*, 101, 103-109.

- [38] da Silva, J. A. L., da Silva, J. J. R. F., Pombeiro, A. J. L. (2011). Oxovanadium complexes in catalytic oxidations. *Coordination Chemistry Reviews*, 255(19-20), 2232-
- [39] Salvador, J. A. R., Clark, J. H. (2002). The allylic oxidation of unsaturated steroids by *tert*-butyl hydroperoxide using surface functionalised silica supported metal catalysts. *Green Chemistry*, 4(4), 352-356. P
- [40] Liu, J., Zhu, H.-Y., Cheng, X.-H. (2009). CrO₃/NHPI Adsorbed on Activated Clay: A New Supported Reagent for Allylic Selective Oxidation of Δ^5 -Sterols. *Synthetic Communications*, 39(6), 1076-1083.
- [41] Fouteris, M. A., Koutsourea, A. I., Nikolaropoulos, S. S., Riahi, A., Muzart, J. (2006). Improved chromium-catalyzed allylic oxidation of Δ^5 -steroids with *t*-butyl hydroperoxide. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 250(1-2), 70-74.
- [42] Pearson, A. J., Chen, Y. S., Hsu, S. Y., Ray, T. (1984). Oxidation of alkenes to enones using *tert*-butyl hydroperoxide in the presence of chromium carbonyl catalysts. *Tetrahedron Letters*, 25(12), 1235-1238.
- [43] Miller, R. A., Li, W., Humphrey, G. R. (1996). A ruthenium catalyzed oxidation of steroidal alkenes to enones. *Tetrahedron Letters*, 37(20), 3429-3432.
- [44] Salvador, J. A. R., E Melo, M. L. S., Neves, A. S. C., (1997). Copper-catalysed allylic oxidation of Δ^5 -steroids by *t*-butyl hydroperoxide. *Tetrahedron Letters*, 38(1), 119-122.
- [45] Arsenou, E. S., Koutsourea, A. I., Fouteris, M. A., Nikolaropoulos, S. S. (2003). Optimization of the allylic oxidation in the synthesis of 7-keto- Δ^5 -steroidal substrates. *Steroids*, 68(5), 407-414.
- [46] Shing, T. K. M., Yeung, Y. Y., Su, P. L. (2006). Mild manganese(III) acetate catalyzed allylic oxidation: Application to simple and complex alkenes. *Organic Letters*, 8(14),
- [47] Silvestre, S. M., Salvador, J. A. R. (2007). Allylic and benzylic oxidation reactions with sodium chlorite. *Tetrahedron*, 63(11), 2439-2445.
- [48] Marwah, P., Marwah, A., Lardy, H. a. (2004). An economical and green approach for the oxidation of olefins to enones. *Green Chemistry*, 6(11), 570.
- [49] Arsenou, E. S., Fouteris, M. A., Koutsourea, A. I., Nikolaropoulos, (2003) S. S. 7-Keto- Δ^5 -steroids: Key-Molecules Owning Particular Biological and Chemical Interest, Mini-Review. *Medical. Chemistry*, 3, 557-567

- [50] Vejux, A., Malvitte, L., Lizard, G. (2008). Side effects of oxysterols: Cytotoxicity, oxidation, inflammation, and phospholipidosis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 41(7), 545-556.
- [51] Vejux, A., Lizard, G. (2009). Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: Induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(3), 153-170.
- [52] Lardy, H., Kneer, N., Wei, Y., Partridge, B., Marwah, P. (1998). Ergosteroids II: Biologically active metabolites and synthetic derivatives of dehydroepiandrosterone. *Steroids*, 63(3), 158-165.
- [53] Bobyleva, V., Bellei, M., Kneer, N., Lardy, H. (1997). The effects of the ergosteroid 7-oxo-dehydroepiandrosterone on mitochondrial membrane potential: possible relationship to thermogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 341(1), 122-8.
- [54] Shi, J., Schulze, S., Lardy, H. A. (2000). The effect of 7-oxo-DHEA acetate on memory in young and old C57BL/6 mice. *Steroids*, 65(3), 124-129.
- [55] Liu, S., Cheng, C. (2015). HHS Public Access. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 4(5), 547-566.
- [56] Ihler, G., Chami-Stemmann, H. (2003). 7-oxo-DHEA and Raynaud's phenomenon. *Medical Hypotheses*, 60(3), 391-397.
- [57] Lardy, H. A. (1998). Treatment of Alzheimer's disease and modulation of immune system with Δ^5 -androstenes, US Patent 5,707,983
- [58] Auchus M. L., Auchus R. J., (2012). Human steroid biosynthesis for the oncologist. *Journal of Investigative Medicine*, 211-220.
- [59] Gong, G., Qin, Y., Huang, W., Zhou, S., Wu, X., Yang, X., Li, D. (2010). Protective effects of diosgenin in the hyperlipidemic rat model and in human vascular endothelial cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Chemico-Biological Interactions*, 184(3), 366-375.
- [60] Kandutsch, A. A., Chen, H. W., Heiniger, H. J. (1978). Biological activity of some oxygenated sterols. *Science*, 201(4355), 498-501.
- [61] Bagrov, A. Y., Shapiro, J. I., Fedorova, O. V. (2009). Endogenous cardiogenic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. *Pharmacological Reviews*, 61(1), 9-38.

- [62] Riganti, C., Campia, I., Kopecka, J., Gazzano, E., Doublier, S., Aldieri, E., ... Ghigo, D. (2011). Pleiotropic Effect of Cardioactive Glycosides. *Current Medicinal Chemistry*, 18, 872-885.
- [63] Jesus, M., Martins, A. P. J., Gallardo, E., Silvestre, S. (2016). Diosgenin: Recent Highlights on Pharmacology and Analytical Methodology. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*,
- [64] Rebelo, A. I. M. A. (2011). Diosgenina e derivados oxidados: potenciais agentes antitumorais e antifúngicos. Dissertação de Mestrado em Bioquímica, Universidade da Beira Interior.
- [65] Serralha, M. T. L. A. (2012). A oxidação de esteroides no desenvolvimento de potenciais agentes antioxidantes e antitumorais: Experiência Profissionalizante na Vertente de Farmácia Comunitária, Hospitalar e Investigação. Relatório de estágio em Ciências Farmacêuticas, Universidade da Beira Interior.
- [66] Kaighn, M.E., Narayan K. S., Ohnuki Y., Lechner J.F., Jones L.W., (1979). Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urology* 17:16-23.
- [67] Tai, S., Sun, Y., Squires, J. M., Zhang, H., Oh, W. K., Liang, C. Z., Huang, J. (2011). PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *Prostate*, 71(15), 1668-1679.
- [68] van Bokhoven, A., Varella-Garcia, M., Korch, C., Johannes, W. U., Smith, E. E., Miller, H. L., Lucia, M. S. (2003). Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *The Prostate*, 57(3), 205-225.
- [69] Gao, L., Zhou, W., Symmes, B., Freed, C. R. (2016). Re-cloning the N27 dopamine cell line to improve a cell culture model of Parkinson's disease. *PLoS ONE*, 11(8), 1-18.
- [70] <https://www.drugs.com/monograph/fluorouracil.html> (visualizado no dia 20/09/2017 às 18 horas e 33 minutos)
- [71] Geng X.-L., Wang Z., Li X.-Q., Zhang C. (2005). A simple Method for Epoxidation of Olefins Using Sodium Chlorite as an Oxidant without a Catalyst. *American Chemical Society*, 70, 9610-9613
- [72] Tao, X., Türkuilmaz, F., Daniliuc, C. G., Kehr, G., Erker, G. (2017). Reactions of strongly electrophilic alkenyl(pentafluorophenyl)boranes with the TEMPO radical. *Journal of Organometallic Chemistry*, 2017 (847), p. 167-172.
- [73] Iida, T., Namegawa, K., Nakane, N., Iida, K., Hofmann, A. F., Omura, K., (2016). Chemical Synthesis of Uncommon Natural Bile Acids: The 9 α -Hydroxy Derivatives of Chenodeoxycholic and Lithocolic Acids. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 64 (9), p. 1397-1402.

- [74] Zanka, A., (2003). A Simple and Highly Practical Oxidation of Primary Alcohols to Acids Mediated by 2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidinyloxy (TEMPO). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 51 (7), p. 888-889.
- [75] Raach, A., Reiser, O. (2000). Sodium Chlorite-Hydrogen Peroxide—A Mild and Selective Reagent for the Oxidation of Aldehydes to Carboxylic Acids. *Journal Fur Praktische Chemie*, 342(6), 605-608.
- [76] Kihel, L. E. (2012). Oxidative metabolism of dehydroepiandrosterone (DHEA) and biologically active oxygenated metabolites of DHEA and epiandrosterone (EpiA) - Recent reports, *Steroids*, 77, 10-26.
- [77] Arsenou, E. S., Foustieris, M. A., Koutsourea, A. I., Papageorgiou, A., Karayianni, V., Mioglou, E., Iakovidou, Z., Mourelatos, D., Nikolaropoulos, S. (2004). The allylic 7-ketone at the steroidal skeleton is crucial for the antileukemic potency of chlorambucil's active metabolite steroidal esters, *Anti-Cancer Drugs*, 15, 983-990.
- [78] Yoshida S, Honda A, Matsuzaki Y *et al*, (2003). Anti-proliferative action of endogenous dehydroepiandrosterone metabolites on human cancer cell lines, *Steroids*, 68, 73-83.