

Oxisteróis Citotóxicos

Síntese e Avaliação Biológica

Dissertação desenvolvida sob orientação científica de:

Professora Doutora Maria Luisa Sá e Melo

Laboratório de Química Farmacêutica, Faculdade de Farmácia Universidade de
Coimbra



Faculdade de Farmácia
Universidade de Coimbra

2012

Hélia Jeremias

Este trabalho foi realizado na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, em colaboração com o Centro de Neurociências e Biologia Celular de Coimbra e está inserido num projecto que visa desenvolver novas moléculas biologicamente activas, com a finalidade de serem usadas como fármacos no tratamento do cancro.

"The most beautiful thing we can experience is the mysterious. It is the source of all true art and science." (Albert Einstein) and "The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not "Eureka!" (I've found it!), but "That's funny..." (Isaac Asimov)

Aos meus Pais, ao meu Irmão e aos meus Avós

Agradecimentos

Este espaço é dedicado a todos aqueles que directa ou indirectamente contribuíram para a realização deste trabalho e participaram na minha formação académica.

À Professora Doutora Maria Luísa Sá e Melo agradeço a oportunidade que me proporcionou em ter aceitado ser minha orientadora, para que eu pudesse crescer no mundo da Ciência. Agradeço a confiança que depositou em mim e toda a contribuição científica na revisão do presente documento.

Ao Professor Doutor João Nuno Moreira agradeço a simpatia com que me recebeu no grupo de Vectores e Terapia Génica e a possibilidade de acesso a toda a logística essencial no desenvolvimento dos estudos de carácter biológico.

À Professora Maria Manuel o meu agradecimento pela sua colaboração ao longo de todo o procedimento experimental, transmitindo-me os seus conhecimentos.

À Daniela e ao Bruno o meu agradecimento, por me terem acolhido no laboratório de química farmacêutica e pela disponibilidade que sempre demonstraram em ajudar, respondendo sempre às minhas questões.

À Ângela e ao Nuno agradeço a boa disposição e simpatia com que me receberam no laboratório de Vectores e Terapia Génica, bem como os ensinamentos transmitidos ao longo dos estudos de índole biológica.

Às minhas colegas Lígia e Eunice agradeço todo o apoio prestado durante este ano e toda a disponibilidade que sempre demonstraram em me ajudar.

À Mariana, à Diana e ao Ricardo pelo apoio incondicional. Amigas e namorado que sempre estiveram ao meu lado, sentaram para ouvir os meus desabafos dando-me força para continuar e que de alguma forma sempre me conseguiam pôr um sorriso no rosto. Sem vocês muitas vezes não teria conseguido ultrapassar os meus medos e sem vocês não teria vivido as maiores das felicidades. Em muito contribuíram para a realização deste trabalho e por isso as palavras não chegam para vos agradecer.

À minha família que sempre acreditou em mim, me apoiou e demonstrou o seu orgulho, o meu mais sincero agradecimento. Em especial às minhas avós Graça e Isaura porque sem o seu apoio não tinha sido possível percorrer todo o caminho.

O meu mais profundo agradecimento é aos meus pais Dulce e Zé Manel e ao meu irmão Miguel, por me terem carregado no colo desde sempre, pela amizade e votos de confiança sem nunca desistirem. Muitos foram os sacrifícios ultrapassados sem arrependimentos ou queixas para que um dia eu alcançasse a meta onde chego hoje. Sem vocês e toda a força que me transmitiram não teria conseguido. Este trabalho pertence-vos.

Agradeço ainda àqueles que algum dia, de forma sincera, me desejaram sorte.

Resumo

Os oxisteróis representam um grupo de lípidos derivados do colesterol que tem atraído muita atenção nos últimos anos devido à sua relevante bioactividade, que varia de acordo com alterações estruturais observadas no núcleo esteróide. Os oxisteróis estão implicados numa série de importantes processos biológicos, como por exemplo na regulação da homeostase do colesterol, inflamação e diferenciação celular, no entanto, foi o seu perfil citotóxico que mais despertou o nosso interesse, focado em sintetizar, isolar e avaliar a bioactividade destas moléculas.

No presente dissertação, foi sintetizada uma biblioteca de novos derivados oxisteróis acetalizados nos anéis A e B do núcleo esteróide, com o objectivo de obter novas moléculas que induzam a toxicidade celular em células cancerígenas. Nos processos de síntese efectuados, ao longo de todo o procedimento, o custo, a toxicidade e a estabilidade dos reagentes usados foram tidos em conta, procurando seguir os princípios da química verde. As reacções efectuadas foram rápidas, simples e apresentaram bons rendimentos.

No presente estudo relatamos ainda a avaliação *in vitro* de seis novos oxisteróis em células humanas de cancro do pulmão e estabelecemos estudos de relações estrutura-actividade. A actividade anti-proliferativa destes novos compostos foi comprovada quando se verifica uma alteração estrutural no anel B, que envolve uma acetalização e a presença de um hidroxilo na posição 3 β do colestano. Os resultados obtidos revelaram a actividade citotóxica dos oxisteróis a concentrações micromolares de uma forma dose-dependente.

Por outro lado, comprovamos também que a acetalização do esteróide no anel A não é uma opção a ter em linha de conta. Esta série de derivados dos oxisteróis não apresentou actividade citotóxica relevante.

Em suma, dependendo das características estruturais dos oxisteróis, podemos afirmar que alguns destes compostos poderão ser candidatos para desenvolvimento com vista à sua utilização na terapia do cancro.

Abstract

The oxysterols represent a cholesterol-derived lipid group that has gained significant interest in the last few years due to its own bio-activity relevance, which changes according to structural modifications observed in the steroid core. This group of steroids is implicated in a serie of important biological processes, such as cholesterol homeostasis regulation, inflammation and cellular differentiation. However, it is their cytotoxic characteristics that has justifies the interest to synthesize, isolate and evaluate the bio-activity of these molecules.

In the present work, a library of new acetal oxysterol derivatives in rings A and B of the steroid core was synthesized with the goal of generating new molecules that induce the cell toxicity in cancer cells. During the synthetic processes develops, the reagents were use, thinking in their cost account, toxicity and stability, considering the principles of green chemistry. The reactions developed were quick, simple and with good yields.

The present study also comprises the evaluation *in vitro* of six new oxysterols in lung cancer applied to human cells and the analysis of structure–activity relationships. The anti-proliferative activity of these new compounds was proven when a structural modification in the B-ring, involving an acetalization, and the presence of a hydroxyl group in the 3 β position of the colestane has occurred. The results obtained revealed a cytotoxic activity at micromolar concentrations and in a dose-dependent form.

On the other hand, it was also proven that the acetalization of the steroid on the A-ring is not an option to be considered for further anti-cancer therapies.

As a concluding remark, depending on the oxysterols structural features, one can say that some of these compounds can be viable candidates to develop for anti-cancer drugs.

Lista de abreviaturas

A549 – Linha celular de adenocarcinoma epitelial do pulmão

A β – Amilóide- β

AB – Ensaio de citotoxicidade Alamar Blue

Acetil CoA – Acetilcoenzima A

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ARPE-19 – Linha celular do epitélio pigmentado da retina

ADMET – Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade

ADN – Ácido desoxirribonucleico

BJ – Linha celular de fibroblastos

Cdk1 – *Cycling-dependent Kinase 1*

Ch25h – Colesterol 25-Hidroxilase

COX – Ciclooxygenase

CYP27A1 – Esterol 27-hidroxilase. Citocromo P450, família 27, subfamília A, polipeptido 1

CYP3A4 – Citocromo P450, família 3, subfamília A, polipeptido 4

CYP3A5 – Citocromo P450, família 3, subfamília A, polipeptido 5

CYP 450 – Citocromo P450

CYP7A1 – Colesterol 7 α -hidroxilase. Citocromo P450, família 7, subfamília A, polipeptido 1

DMSO – Dimetilsulfóxido

DEPT – *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EM (ID-ES) – Espectroscopia de massa. Infusão directa e ionização por electrospray

EPR – Epitélio pigmentado da retina

EtOH – Etanol

ERKs – *Extracellular signal-regulated kinases*

HT-29 – Linha celular de adenocarcinoma do colón

HEPES – Ácido N-(2-hidroxietilo)-piperazina-N'-2-etanesulfónico

HepG2 – Linha celular de carcinoma do fígado

HMG-CoA – Hidroximetil glutaril coenzima A

IC₅₀ – Concentração que inibe 50% da viabilidade celular

IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*

IV – Espectroscopia de Infravermelho

LAMA-84 – Linha celular de leucemia crónica mieloide

m-CPBA – Ácido *meta*-cloroperbenzóico

MCF -7 – Linha celular de adenocarcinoma da mama

MeOH – Metanol

MMP – *Matrix metalloproteinases*

MMPP – *Magnesium monoperoxyphthalate hexahydrate*

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolio

NADPH – *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – *Phosphate-buffered saline*

PC3 – Linha celular de cancro da próstata

Penstrep – Penicilina-Estreptomicina

PLA₂ – *Fosfolipase A₂*

QSAR – *Quantitative structure–activity relationships*

RMN ¹H – Ressonância magnética nuclear de próton

RMN ¹³C – Ressonância magnética nuclear de carbono

SAR – *Structure–activity relationships*

SFB – Soro fetal de bovino

SH-SY5Y – Linha celular de neuroblastomas

SNC – Sistema nervoso central

Scap – *SREBP-Cleavage activating protein*

SREBP – *Sterol regulatory element binding proteins*

THF – Tetrahidrofurano

TIMP – *Tissue inhibitors of metalloproteinases*

TLC – *Thin layer chromatography*

t-BHP – *tert-Butyl hydroperoxide*

VEGEFb – Proteína sinalizadora que estimula a angiogenese e a vasculogénese

WHO – World Health Organization

Índice

Resumo	xi
Abstract	xii
Lista de abreviaturas	xiii
Índice de figuras	xix
Índice de esquemas	xxi
Índice de tabelas	xxii
Problemática	1
Objectivos científicos	3
a. Objectivo geral	3
b. Objectivos específicos	3

CAPITULO I

1. Fundamentos teóricos	7
1.1. Química Medicinal	7
1.2. A química dos esteróides e a sua importante actividade biológica	9
1.3. Esteróis	12
1.3.1. Colesterol	12
1.4. Oxisteróis	13
1.4.1. Oxisteróis como produtos do metabolismo do colesterol	16
1.4.2. Oxisteróis e doença	17
1.4.2.1. Doença macular degenerativa	18
1.4.2.2. Aterosclerose	19
1.4.2.3. Doenças neurodegenerativas	21
1.4.3. Oxisteróis na medicina regenerativa	24
1.4.4. Oxisteróis com potencial actividade terapêutica – Antitumorais	26

CAPITULO II

2. Síntese química de oxisteróis.....	33
2.1. Introdução	33
2.2. Resultados e discussão	34
2.2.1. Síntese de derivados 3,4- e 6,7-acetais directamente a partir dos respectivos álcoois alílicos, Δ^4-3β- e Δ^5-7β-hidroxi esteróides	34
2.2.1.1. Preparação dos substratos colest-4-en-3β-ol (2), acetato de 7β-hidroxicolest-5-en-3β-ilo (5) e colest-5-eno-3β,7β-diol (6) para síntese de acetais	35
2.2.1.2. Síntese de 3,4- e 6,7-acetais a partir dos substratos colest-4-en-3β-ol (2), acetato de 7β-hidroxicolest-5-en-3β-ilo (5) e colest-5-eno-3β,7β-diol (6)	37
2.2.2. Síntese de 3,4- e 6,7-acetais a partir dos epóxidos correspondentes, 4ξ,5ξ-epoxi-3β-hidroxi- e 5ξ,6ξ-epoxi-7β-hidroxi esteróides.....	40
2.2.2.1 Epoxidação de Olefinas	40
2.2.2.2. Síntese de 3,4- e 6,7-acetais a partir dos substratos 4ξ,5ξ-epoxicolestan-3β-ol (13), acetato de 5ξ,6ξ-epoxi-7β-hidroxicolestan-3β-ilo (14) e 5ξ,6ξ-epoxicolestano-3β,7β-diol (15).....	42
2.2.3. Aspectos espectrais dos derivados acetal de oxisteróis.....	45
2.3. Procedimento experimental.....	50
2.3.2. Equipamento	50
2.3.3. Reagentes e solventes	51
2.3.4. Preparação dos substratos colest-4-en-3β-ol (2), acetato de 7β-hidroxicolest-5-en-3β-ilo (5) e colest-5-eno-3β,7β-diol (6)	51
2.3.4.1. Síntese do colest-4-en-3β-ol (2)	51
2.3.4.2. Síntese do acetato de 7β-hidroxicolest-5-en-3β-ilo (5)	52
2.3.4.3. Síntese do colest-5-eno-3β,7β-diol (6).....	53
2.3.5. Síntese de derivados 3,4- e 6,7-acetais directamente a partir dos respectivos álcoois alílicos, Δ^5-7β- e Δ^4-3β-hidroxi esteróides	54
2.3.5.1. Síntese de 3,4-acetais tendo o colest-4-en-3β-ol (2) como substrato	54
2.3.5.2. Síntese de 6,7-acetais começando com o acetato de 7β-hidroxicolest-5-en-3β-ilo (5).....	56

2.3.5.3. Síntese de 6,7-acetais a partir do colest-5-eno-3 β ,7 β -diol (6)	57
2.3.6 Epoxidação de Olefinas	59
2.3.6.1. Procedimento geral para a síntese dos epóxidos a partir dos correspondentes álcoois alílicos. Síntese do 4 ξ ,5 ξ -epoxicolestan-3 β -ol (13).....	59
2.3.6.2. Síntese do acetato de 5 ξ ,6 ξ -epoxi-7 β -hidroxicolestan-3 β -ilo (14)	59
2.3.6.3. Síntese do 5 ξ ,6 ξ -epoxicolestano-3 β ,7 β -diol (15).....	59
2.3.7. Síntese de 3,4- e 6,7-acetais a partir dos respectivos epóxidos, 4 ξ ,5 ξ -epoxi-3 β -hidroxi- e 5 ξ ,6 ξ -epoxi-7 β -hidroxi esteróides.....	60
2.3.7.1. Síntese de 3,4-acetais a partir do 4 ξ ,5 ξ -epoxicolestan-3 β -ol (13)	60
2.3.7.2. Síntese de 6,7-acetais partindo do acetato de 5 ξ ,6 ξ -epoxi-7 β -hidroxicolestan-3 β -ilo (14).....	62
2.3.7.3. Síntese de 6,7-acetais partindo 5 ξ ,6 ξ -epoxicolestano-3 β ,7 β -diol (15).....	64

CAPITULO III

3. Avaliação citotóxica de oxisteróis	69
3.1. Introdução	69
3.2. Resultados e discussão	70
3.2.1. Efeito citotóxico do DMSO na linha celular A549	70
3.2.2. Efeito citotóxico de seis novos derivados acetal de oxisteróis em células humanas de cancro do pulmão	71
3.3. Alguns comentários sobre os possíveis mecanismos de citotoxicidade dos oxisteróis.....	75
3.3.1. Citotoxicidade por indução da apoptose	75
3.3.2. Citotoxicidade por inibição da síntese do colesterol	76
3.3.3. Citotoxicidade por inibição da replicação do ADN.....	77
3.3.4. Efeitos dos oxisteróis na biofísica membranar	78
3.5. Procedimento experimental	79
3.5.1. Equipamento	79
3.5.2. Reagentes.....	79

3.5.3.	Material biológico.....	79
3.5.4.	Condições de trabalho.....	80
3.5.5.	Culturas celulares	80
3.5.6.	Ensaio de citotoxicidade	81
3.5.7.	Análise estatística	82

CAPITULO IV

4.	Conclusões e Perspectivas futuras	84
-----------	--	-----------

CAPITULO V

5.	Referências Bibliográficas.....	89
-----------	--	-----------

Índice de figuras

CAPITULO I

Figura 1.1. Representação da configuração do núcleo esteróide. a) Estrutura e numeração do núcleo esteróide, cicloentanoperidrofenantreno. b) Numeração das cadeias presentes na maioria dos esteróides.....	9
Figura 1.2. Estrutura do colesterol.	13
Figura 1.3. Biossíntese dos oxisteróis por oxidação enzimática e não enzimática do colesterol.....	15
Figura 1.4. Estrutura do 7 β -Hidroxicolesterol.	16
Figura 1.5. Estrutura do 7-oxocolesterol.	18
Figura 1.6. Diferentes estados da aterosclerose.	19
Figura 1.7. Estrutura do 24(S)-hidroxicolesterol (A). Estrutura do 27-hidroxicolesterol (B).	22
Figura 1.8. Fluxo de oxisteróis através da barreira hemato-encefálica.....	23
Figura 1.9. Efeito dos oxisteróis nas vias de regulação em células-tronco mesenquimais..	25
Figura 1.10. Características das células tumorais..	26
Figura 1.11. Características morfológicas da apoptose e da necrose.....	27
Figura 1.12. Estruturas de novos oxisteróis recentemente sintetizados com citotoxicidade relevante	28

CAPITULO II

Figura 2.1. Espectro de RMN ^1H do acetato de 5 α -hidroxi-6 β ,7 β -isopentilidenodioxicolestano-3 β -ilo (10).....	46
Figura 2.2. Espectro de RMN ^{13}C do acetato de 5 α -hidroxi-6 β ,7 β -isopentilidenodioxicolestano-3 β -ilo (10).....	47
Figura 2.3. Espectro de DEPT 135 do composto 5 α -hidroxi-6 β ,7 β -isopentilidenodioxicolestano-3 β -ilo (10).....	47
Figura 2.4. Espectro de DEPT 90 do composto 5 α -hidroxi-6 β ,7 β -isopentilidenodioxicolestano-3 β -ilo (10).....	48
Figura 2.5. Espectro de RMN ^1H do 3 β ,4 β -ciclopentilidenodioxicolestano-5 α -ol (16).....	49
Figura 2.6. Espectro de IV do composto acetato de 5 α -hidroxi-6 β ,7 β -ciclopentilidenodioxicolestano-3 β -ilo (18).....	50

CAPITULO III

Figura 3.1. Curva de dose-resposta do DMSO isolado..... 70
Figura 3.2. Curvas de dose-resposta dos compostos derivados da série colest-5-eno-3 β ,7 β -diol (**6**).. 72
Figura 3.3. Diagrama representativo das interações SERBP-Scpa-Insig..... 76
Figura 3.4. O ciclo celular.. 77

Índice de esquemas

CAPITULO II

Esquema 2.1. Redução da colest-4-en-3-ona (1) a colest-4-en-3 β -ol (2).....	35
Esquema 2.2. Oxidação alílica do acetato de colesterol (3) para obtenção do acetato de 7-oxo-colest-5-en-3 β -ilo (4) com a posterior redução a acetato de 7 β -hidroxicolest-5-en-3 β -ilo (5)	36
Esquema 2.3. Hidrólise do acetato de 7 β -hidroxicolest-5-en-3 β -ilo (5) em colest-5-eno-3 β ,7 β -diol (6)..	37
Esquema 2.4. Síntese de 3,4-acetais a partir do colest-4-en-3 β -ol (2).....	38
Esquema 2.5. Síntese de 6,7-acetais a partir do acetato de 7 β -hidroxicolest-5-en-3 β -ilo (5) e do colest-5-eno-3 β ,7 β -diol (6).	39
Esquema 2.6. Epoxidação de Δ^5 -7 β - e Δ^4 -3 β -hidroxi esteróides.	41
Esquema 2.7. Síntese de 3,4-acetais a partir do 4 ξ ,5 ξ -epoxicolestan-3 β -ol (13).	42
Esquema 2.8. Síntese de 6,7-acetais a partir do acetato de 5 ξ ,6 ξ -epoxi-7 β -hidroxicolestano-3 β -ilo (14) e do 5 ξ ,6 ξ -epoxicolestano-3 β ,7 β -diol (15).....	43
Esquema 2.9. Método 2 para a síntese do 6 β ,7 β -ciclohexilidenodioxicolestano-3 β ,5 α -diol (21)..	44

CAPITULO III

Esquema 3.1. Redução da resazurina em resofurina pelas enzimas mitocondriais.....	82
--	----

Índice de tabelas

CAPITULO I

Tabela 1.1. Classificação das séries de esteróides com base no número de átomos de carbono do esqueleto esteróide.....	10
Tabela 1.2. Relevância patológica dos oxisteróis em doenças degenerativas relacionadas com a idade.....	17
Tabela 1.3. Citotoxicidade dos esteróides na linha celular HT-29	29

CAPITULO II

Tabela 2.1. Tempos reaccinoais dos derivados cicloalquílideno acetais conseguidos a partir dos epóxidos correspondentes.....	43
Tabela 3.1. Citotoxicidade dos novos oxisteróis derivados da série colest-5-eno-3 β ,7 β -diol (14 , 15 e 16) e da série colest-4-en-3 β -ol (10 , 11 , 16), na linha celular A549 após 96 horas de incubação...73	73

Problemática

O cancro é uma das doenças que mais mortalidade causa no mundo e estima-se que o número global de óbitos aumentará 45% no período de 2007 a 2030. Prevê-se um aumento de 11.7 milhões para 15.5 milhões de novos casos de morte, influenciado em parte pelo aumento da população global. No mesmo período são esperados novos casos de cancro, de 11.3 milhões de doentes em 2007 para 15.5 milhões em 2030 (WHO-World Health Organization, 2008). Em Portugal, é a segunda maior causa de morte, logo a seguir às doenças cardiovasculares (Araújo *et al.*, 2009).

O cancro do pulmão, que foi considerado relativamente raro no início do século XX, é actualmente diagnosticado mais frequentemente do que qualquer outro tipo de cancro em todo o mundo (Zamboni, 2002). Numa perspectiva global, o cancro do pulmão é responsável por cerca de 1,4 milhões de mortes por ano, o equivalente a 30% das mortes devidas a cancro, ultrapassando a percentagem de óbitos devido ao cancro da mama, da próstata, dos ovários e do cólon somadas (Harras *et al.*, 1996). Segundo a organização mundial de saúde (OMS), em 2012 será o principal factor de mortalidade entre os homens e o segundo entre as mulheres. Anualmente são registados cerca de 1,6 milhões de novos casos no mundo. Em Portugal registaram-se 4064 mortes em 2010, o que reflete um aumento de 24,2 % relativamente ao ano 2000 e um acréscimo de 5,6 % em relação a 2009 (dados do Instituto Nacional de Estatística).

A OMS considera o tabagismo um grande factor de risco e o principal responsável pelo cancro do pulmão. Cerca de 90% dos doentes que apresentam esta patologia, são, ou foram fumadores activos. Nos últimos anos tem-se observado uma diminuição dos casos de cancro do pulmão no homem e um aumento na mulher, que coincide com a redução do tabagismo em indivíduos do sexo masculino e o aumento no sexo feminino (Zamboni, 2002).

O quadro actual é caracterizado pela existência de tratamentos de elevado custo e índice terapêutico relativamente reduzido. Pode afirmar-se que os gastos com o tratamento do cancro ficam aquém do que seria necessário e portanto parece estar a ser sub-financiado (Araújo *et al.*, 2009). Por outro lado, há diversas classes farmacológicas de agentes quimioterápicos, disponíveis para o tratamento do cancro, mas nenhuma delas se tem mostrado capaz de erradicar as células cancerígenas sem afectar os tecidos saudáveis (Salmon *et al.*, 2003). Como tal, muitos têm sido os esforços no sentido de encontrar um

tratamento para o cancro do pulmão, no entanto, ainda não existem indicações sobre os efeitos dos oxisteróis acetalizados nesta patologia específica. Pelo que, será interessante efectuar estudos que avaliem a actividade dos oxisteróis acetalizados e esclareçam acerca do seu contributo para terapia do cancro do pulmão.

O envelhecimento populacional é também um dos maiores desafios da saúde pública contemporânea e tem-se vindo a verificar de uma forma acentuada. Em paralelo a estas modificações, observadas na pirâmide populacional, as doenças associadas ao envelhecimento ganham também maior expressão. Viver o maior número de anos possível é uma aspiração de qualquer sociedade, no entanto não chega por si só, é necessário conseguir-se agregar qualidade ao envelhecimento (Lima-Costa *et al.*, 2008). A medicina regenerativa é uma especialidade que está integrada nos conceitos mais avançados da medicina anti-envelhecimento e que se encontra em crescente evolução (Gurtner *et al.*, 2007; Bajada *et al.*, 2008).

Os oxisteróis, derivados oxigenados do colesterol, estão actualmente a atingir um nível de interesse bastante elevado devido principalmente à sua actividade citotóxica (Vejux *et al.*, 2009) e à sua intervenção na via de sinalização de Hedgehog, a qual tem um papel chave na morfogénese (Kha *et al.*, 2004; Dwyer *et al.*, 2007) e consequentemente na medicina regenerativa.

Objectivos científicos

a. Objectivo geral

De acordo com o problema anteriormente exposto, e com base em conhecimentos prévios no que respeita à correlação do perfil citotóxico de oxisteróis endógenos e derivados polioxigenados sintéticos, esta dissertação teve como objectivos construir uma biblioteca de oxisteróis acetalizados e avaliar o perfil citotóxico destes novos compostos.

b. Objectivos específicos

A primeira parte desta dissertação teve como principais objectivos a síntese de novos oxisteróis. Utilizando como materiais de partida compostos de fácil preparação, ou até mesmo comercialmente disponíveis, tentou-se obter directamente, numa reacção tipo *one-pot*, acetais de oxisteróis com características estruturais específicas. Características estas que pressupomos estarem associadas a uma actividade anti-tumoral, como são por exemplo, a formação de acetalis quer no anel A, quer no anel B do núcleo esteróide. Experimentalmente esta dissertação teve como objectivo principal a aprendizagem de técnicas utilizadas em síntese química e em análise estrutural.

Numa segunda abordagem e após a caracterização dos novos oxisteróis, o principal objectivo foi testar a sua eficácia biológica. Utilizando uma linha celular de cancro do pulmão (A549), e incubando essas mesmas células com os oxisteróis sintetizados, tentou-se chegar a uma concentração mínima em que fosse notória a morte de 50% das células. Sob o ponto de vista experimental, o principal objectivo desta dissertação foi a aprendizagem das técnicas utilizadas em ensaios de citotoxicidade e manuseamento de culturas celulares.

Capítulo I

Fundamentos Teóricos

1. Fundamentos teóricos

1.1. Química Medicinal

A química medicinal é uma ciência interdisciplinar que transita entre subáreas da química orgânica e das ciências da vida. Das mais importantes podem destacar-se a síntese orgânica, cristalografia de raios-X e espectroscopia pela química, bioquímica, farmacologia, genética, imunologia, farmacocinética e toxicologia pelas ciências da vida, bem como técnicas de simulação computacionais de análise e verificação de dados (Wermuth *et al.*, 2003; Barreiro *et al.*, 2008). Foi brilhantemente reconhecida por Arthur Kornberg, Prémio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1959, quando afirmou num congresso da *American Association for the Advance of Science*, em 1987:

“We have the paradox of the two cultures, chemistry and biology, growing further apart even as they discover more common ground. For the chemists, the chemistry of biological systems is either too mundane or too complex (...)”.

O desenvolvimento da química medicinal, e a preocupação por parte dos cientistas, durante a sua fase inicial, estavam essencialmente direccionados para o isolamento de agentes medicinais encontrados em plantas. Hoje em dia, segundo a definição da *International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC, a química medicinal preocupa-se com a descoberta, design, desenvolvimento e identificação de compostos biologicamente activos (Wermuth *et al.*, 1998). Não se restringindo apenas ao fármaco mas sim a compostos bioactivos em geral, o químico medicinal foca-se também na interpretação do modo de acção de cada composto e no estudo do seu metabolismo, a nível molecular, estabelecendo relações estrutura química - actividade farmacológica (SAR, *structure–activity relationships*) (Wermuth *et al.*, 2008).

Um projecto de química medicinal compreende três etapas fundamentais, a descoberta, a optimização e o desenvolvimento de uma substância química de estrutura bem definida. O principal objectivo do estudo é chegar a um composto que seja dotado de acção farmacológica, para que possa vir a ser usado no tratamento, prevenção ou diagnóstico de doenças, designando-se fármaco (Prista *et al.*, 2003; Guido *et al.*, 2010). As

etapas de optimização e desenvolvimento são as mais relevantes no que respeita à química medicinal.

A fase da descoberta consiste na escolha do alvo terapêutico, útil para o tratamento de uma determinada fisiopatologia e na identificação ou descoberta de novas substâncias activas, denominadas *hits*, que interajam com o alvo seleccionado. Para tal, são usadas estratégias de modificação molecular clássicas da química medicinal, o bioisoterismo, homologação, simplificação e hibridação molecular, ou técnicas de simulação computacionais como a modelagem molecular e a relação quantitativa estrutura actividade (QSAR, *quantitative structure–activity relationships*) (Barreiro *et al.*, 2001; Lima *et al.*, 2005). O *hit* é uma molécula química, isolada ou preparada sinteticamente, que ao estar devidamente identificada e caracterizada adquire a denominação de *hit* validado (Wermuth *et al.*, 2008).

A etapa de optimização baseia-se na melhoria do composto activo, através de modificações subestruturais. As principais preocupações são o aumento da potência e selectividade, diminuição da toxicidade e adequação do perfil farmacocinético (ADMET, absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade). Pretende-se que o composto tenha grande afinidade para o alvo terapêutico, para que demonstre uma boa actividade em concentrações mais baixas e que seja o mais específico possível para o alvo seleccionado, de modo a reduzir significativamente os efeitos secundários. Estas características são estabelecidas com base em estudos de SAR que têm em conta o modo de acção molecular da substância activa, que nesta fase se designa *lead*. O *lead* é o composto de uma série de compostos que tem actividade e selectividade comprovadas, e preenche alguns critérios fundamentais no desenvolvimento de um fármaco, como são a originalidade, patenteabilidade e acessibilidade (Lima, 2007; Wermuth *et al.*, 2008).

A fase de desenvolvimento continua a ser um período de aperfeiçoamento das propriedades farmacocinéticas e de um ajuste meticuloso das propriedades farmacêuticas do composto activo, como são o odor, sabor, entre outras, no sentido de o tornar apropriado para uso clínico. Este aperfeiçoamento, com base em transformações químicas na molécula, consiste também em melhorar a sua absorção, libertação, solubilidade e na eliminação de propriedades que possam causar reacções adversas ao doente durante e após a sua ingestão (Wermuth *et al.*, 2008).

Actualmente verifica-se uma grande diversidade de compostos usados em química medicinal e os esteróides não são excepção. Devido ao seu papel activo e importante na fisiologia humana, muitos esteróides são amplamente utilizados na terapia de diversas patologias (Donald, 2008) e são substratos funcionalizáveis que podem ser utilizados como materiais de partida para a síntese de muitas outras moléculas biologicamente activas, quer por vias químicas ou microbiológicas (Carvalho, 2010).

1.2. A química dos esteróides e a sua importante actividade biológica

Os esteróides são lípidos de estrutura complexa conhecidos desde 1935 e constituem uma importante classe de compostos orgânicos. Estão presentes na maioria dos organismos vivos e desempenham um papel fundamental na sua sobrevivência, podendo actuar como reguladores fisiológicos (Schroepfer, 2000; Olkkonen *et al.*, 2012), hormonas (Turgeon *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2012), provitaminas (Cannell *et al.*, 2008; Glossmann, 2010), entre outros. O núcleo esteróide é composto por dezassete átomos de carbono, ligados entre si formando uma molécula tetracíclica, constituída por três anéis ciclohexanos (anéis A, B e C) e um ciclopentano (anel D) (**Fig. 1.1**). Esta estrutura, comum a todos os esteróides, denomina-se ciclopentanoperidrofenantreno (Moss, 1989).

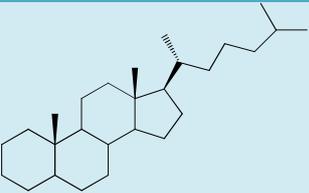
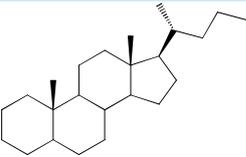
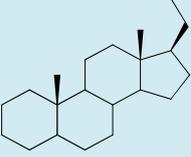
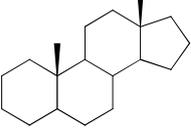
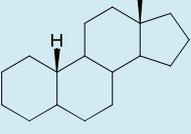


Figura 1.1. Representação da configuração do núcleo esteróide. a) Estrutura e numeração do núcleo esteróide, ciclopentanoperidrofenantreno. b) Numeração das cadeias presentes na maioria dos esteróides (Zeelen, 1990).

Normalmente, as substituições em R_1 e R_2 compreendem grupos metilo, enquanto que em R_3 se verifica uma cadeia carbonada mais ou menos extensa, que varia no número de átomos de carbono que a constitui (Zeelen, 1990). Com base no número total de

carbonos, os esteróides são divididos em classes, como demonstrado na tabela abaixo (Tabela 1.1.).

Tabela 1.1. Classificação das séries de esteróides com base no número de átomos de carbono do esqueleto esteróide.

Classe	Exemplos	Número de átomos de carbono	Estrutura
Colestanos	Colesterol	27	
Colanos	Ácido cólico	24	
Pregnanos	Progesterona	21	
Androstanos	Testosterona	19	
Estranos	Estradiol	18	

Adaptado de Kasal, 2003.

Os esteróides também variam de acordo com os grupos funcionais ligados à estrutura base, com o estado de oxidação de cada anel e com a estereoquímica do núcleo esteróide, que afecta marcadamente não só a sua reactividade química, como também a actividade biológica destes compostos. A maioria dos esteróides mais importantes biologicamente apresenta uma dupla ligação entre as posições 4 e 5, ou 5 e 6, não se verificando assim qualquer relação *cis* ou *trans* entre os anéis A e B.

Ao longo das últimas décadas, centenas de compostos esteróides foram isolados de fontes naturais e alguns milhares foram obtidos por via sintética. Este interesse mantém-se actualmente, verificando-se uma intensa investigação no sentido de sintetizar ou isolar e identificar novos compostos esteróides que demonstrem novas actividades biológicas.

Os esteróides, como agentes antitumorais, actuam normalmente bloqueando a sinalização de hormonas para as células cancerígenas e são por isso englobados na terapia hormonal. No tratamento endócrino do cancro da mama são usados esteróides que inibem a aromatase, enzima que catalisa a conversão de androgénios em estradiol e estrona (Brueggemeier *et al.*, 2005), como é o caso do examestano que se liga covalente e irreversivelmente à aromatase, inactivando-a. Continuamente são feitos estudos no sentido de aumentar o número de inibidores esteróides desta enzima procurando melhorias na sua actividade (Amaral *et al.*, 2012). No tratamento endócrino do cancro da próstata tem sido indicado o uso de medicamentos esteróides com actividade antiandrogénica (Brueggemeier *et al.*, 2002), como é o caso do fosfato de estramustina que suprime os níveis de testosterona (Cox *et al.*, 1995), destrói a organização dos microtubos (Stearns *et al.*, 1988) e inibe a mitose (Beryl, 1984). É um exemplo de um medicamento híbrido, que compreende na mesma molécula dois fármacos (Gediya *et al.*, 2009). Os glicocorticóides constituem um outro grupo de compostos esteróides utilizados desde a década de 60 no combate à leucemia infantil (Frei III *et al.*, 1965), como é o caso da dexametasona, devido à sua capacidade de induzir a apoptose dos linfócitos (Planey *et al.*, 2000; Kuperman *et al.*, 2012). Para além da sua actividade na terapia do cancro, os esteróides também são aplicados no tratamento de doenças hepáticas, pelo uso dos ácidos biliares e é ainda de evidenciar as suas propriedades antivirais e antifúngicas que se encontram ainda por explorar (Virtanen *et al.*, 2004). Por fim, e entre muitas outras actividades biológicas, podemos também destacar as propriedades cardiotónicas dos esteróides. Estes compostos naturais têm a capacidade de influenciar a frequência cardíaca, como é o caso da Digoxin (Gheorghiade *et al.*, 2006).

1.3. Esteróis

Os esteróides que contêm adicionalmente um grupo hidroxilo na posição C3 do anel A e uma cadeia alifática na posição C17 β designam-se esteróis e a maior parte apresenta o esqueleto da série colestano (Zeelen, 1990), como é o caso do colesterol. As características químicas atrás referidas tornam os esteróis compostos anfifílicos, que estão presentes em todos os organismos eucariotas, desempenhando um papel fundamental para a sua sobrevivência (Dupont *et al.*, 2011).

1.3.1. Colesterol

O colesterol é o esteroide mais importante presente nos animais, representa cerca de 99% dos esteróis em mamíferos (Zolotushko *et al.*, 2011). Está também presente em plantas, embora em menores quantidades (Johnson *et al.*, 1963), e pode ser encontrado em algumas algas vermelhas (Nasir *et al.*, 2011).

Desde o seu isolamento a partir de cálculos biliares, em 1789, o colesterol tem sido amplamente estudado. Inicialmente, pela sua biossíntese e metabolismo complexos, atraiu a atenção dos químicos e com as suas características físicas e estruturais únicas, fascinou os biofísicos (Ikonen *et al.*, 2008).

O colesterol é um álcool policíclico de cadeia longa, derivado da série colestano, que possui um grupo hidroxilo na posição 3 e uma dupla ligação na posição 5 (**Fig. 1.2.**) (Silva *et al.*, 2011). É um componente essencial da membrana plasmática das células eucarióticas e tem como principais funções a manutenção da permeabilidade membranar e a regulação da sua fluidez. O colesterol também regula a função de proteínas membranares e participa em vários processos de sinalização celular. Para além disso, este composto é ainda necessário à biossíntese de várias hormonas, da vitamina D e de ácidos biliares (Ikonen *et al.*, 2008). Uma vez que é uma molécula apolar, o colesterol é transportado através da corrente sanguínea ligado a proteínas e outros lípidos, formando complexos denominados de lipoproteínas (Olson, 1998).

A nível celular, a síntese do colesterol ocorre no retículo endoplasmático. É sintetizado a partir da acetilcoenzima A (acetil CoA), através de uma cascata de reacções iniciadas pela hidroximetil glutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase (Sato *et al.*, 1995).

O colesterol, sendo um composto lipídico insaturado, é instável e susceptível à oxidação. Por sua vez, muitos dos óxidos de colesterol formados são substâncias de interesse químico, bioquímico, farmacológico, toxicológico, tecnológico e também clínico (Morales-Aizpurúa *et al.*, 2002). As posições relevantes a considerar na auto-oxidação do colesterol são a insaturação no anel B e as posições alílicas a essa dupla ligação e os dois carbonos terciários na cadeia lateral.

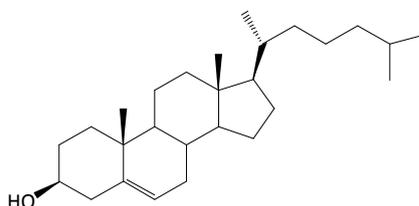


Figura 1.2. Estrutura do colesterol.

1.4. Oxiesteróis

A oxidação do colesterol leva à formação de um outro grupo de compostos, os oxiesteróis. São derivados do colesterol contendo um ou mais oxigénios adicionais na estrutura anelar ou na cadeia lateral (Silva *et al.*, 2011). Ou seja, possuem adicionalmente grupos funcionais álcool, cetona e epóxido (Morales-Aizpurúa *et al.*, 2002). Encontram-se distribuídos em fluidos e tecidos animais e em alimentos de origem animal, e são transportados no plasma pelas lipoproteínas, (Silva *et al.*, 2011). Estes produtos da oxidação do colesterol estão presentes no organismo em quantidades muito menores que o colesterol (Schroepfer, 2000).

In vivo, os oxiesteróis são formados por oxidação do colesterol, quer enzimática envolvendo um conjunto de enzimas oxidativas, quer não-enzimática (Fig. 1.3) (Silva *et al.*, 2011). O balanço entre a síntese, a degradação e a conversão do colesterol é regulado em

parte por enzimas do citocromo P450 (CYP 450) (Shinkyo *et al.*, 2011). Os oxisteróis mais representativos deste grupo são o 4 β -hidroxicolesterol, que pode ser usado como um marcador endógeno da actividade das CYP3A4 (citocromo P₄₅₀ 3A4) e CYP3A5 (citocromo P₄₅₀ 3A5), o 7 α -hidroxicolesterol, um dos primeiros intermediários na biossíntese de ácidos biliares, metabolizado pela 7 α -hidroxilase (CYP7A1), uma enzima hepática, e os oxisteróis de cadeia lateral (Silva *et al.*, 2011; Iuliano, 2011). O 25-hidroxicolesterol é um subproduto da enzima esterol 27-hidroxilase (CYP27A1), e é sintetizado por uma hidroxilase específica, a colesterol 25-hidroxilase (Ch25h) que não pertence ao CYP 450. As hidroxilases utilizam oxigénio como co-factor para catalisar reacções de hidroxilação (Iuliano, 2011).

A oxidação não-enzimática, uma simples auto-oxidação do colesterol, ocorre principalmente na insaturação do anel B e nas posições alílicas a essa dupla ligação, a qual é susceptível ao ataque de radicais livres, ou metais de transição. E pode também ocorrer nos dois carbonos terciários presentes na cadeia lateral (Silva *et al.*, 2011; Iuliano, 2011). De facto, os produtos predominantes da auto-oxidação são os derivados oxidados na posição 7 e na da dupla ligação (Maerker, 1987; Morales-Aizpurúa *et al.*, 2002). O carbono na posição 4, alílico à dupla ligação, também representa um ponto sensível à oxidação da molécula, no entanto, o ataque ao C4 raramente ocorre, devido à presença do grupo hidroxilo em C3 e do carbono trissubstituído em C5 (Wasowicz, 2003).

A oxidação não-enzimática do colesterol pode verificar-se dentro das membranas celulares ou nas lipoproteínas e pode ocorrer através de reacções iniciadas por radicais livres, sendo este o primeiro evento no processo de peroxidação lipídica. A auto-oxidação do colesterol também pode ocorrer através de reacções que envolvam espécies não radicalares de oxigénio altamente reactivas, como são o oxigénio atómico, o ozono e o cloro molecular (Iuliano, 2011).

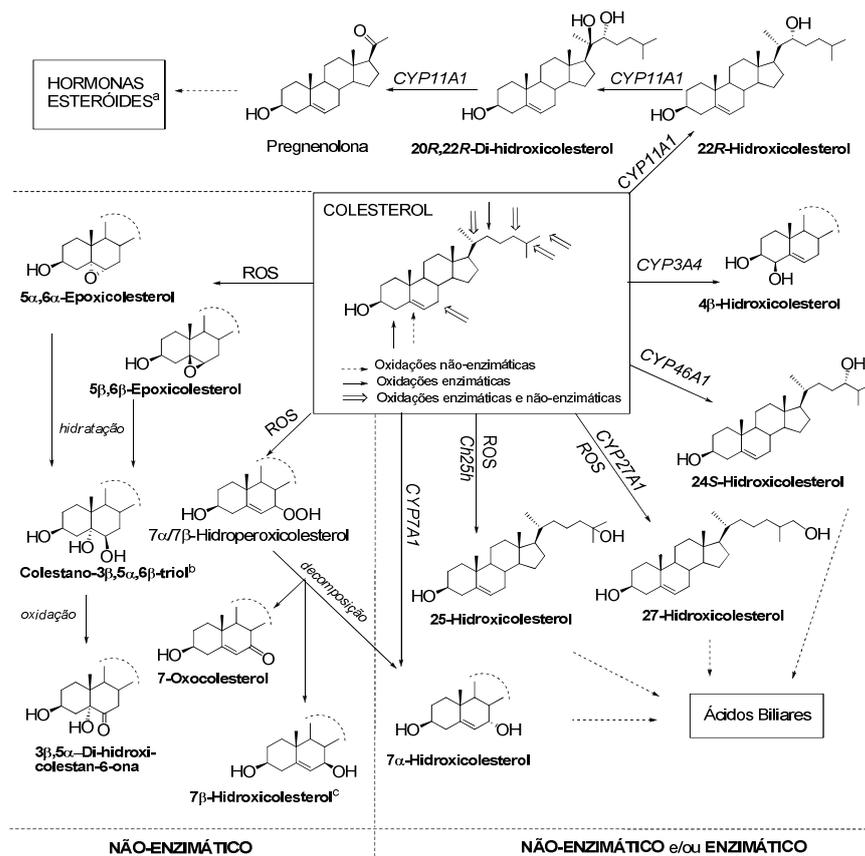


Figura 1.3. Biossíntese dos oxisteróis por oxidação enzimática e não enzimática do colesterol. ROS: espécies reativas de oxigênio. Enzimas: CYP3A4; CYP7A1; CYP11A1: colesterol desmolase (P450scc); Ch25h; CYP27A1; CYP46A1: colesterol 24-hidroxilase. . a) Clivagem da cadeia lateral originando hormonas esteróides; b) a formação de colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol pode também ser mediada *in vivo* através da biotransformação do 5,6-epoxicolesterol pela respectiva hidrolase; c) a 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase (CYP11B1) tipo 1 reduz o 7-oxocolesterol. Esta foi descrita como uma via de síntese do 7 β -hidroxicolesterol, que poderá contribuir para o rápido metabolismo do 7-oxocolesterol no fígado (Silva *et al.*, 2011).

Os oxisteróis constituem um conjunto heterogêneo de moléculas que, de acordo com a posição do oxigênio no esterol, revelam diferentes propriedades biofisiológicas de membrana, diferentes capacidades de transferência na membrana e várias funções celulares (Carvalho *et al.*, 2011).

Conhecidos desde há várias décadas, os oxisteróis têm ganho muita atenção nos últimos anos, devido à sua relevante bioactividade, e assim a sua síntese selectiva assume elevada importância. O isolamento do primeiro oxisterol, o 7 β -hidroxicolesterol (Fig. 1.4.), data de 1939 a partir de fígado bovino (Haslewood, 1939). Todavia, a partir dos anos 70 os efeitos biológicos dos oxisteróis começaram a ser conhecidos, nomeadamente os seus efeitos antiproliferativos (Silva *et al.*, 2011). Estão implicados numa série de importantes

processos biológicos, como por exemplo a regulação da homeostase do colesterol (Gill *et al.*, 2008), inflamação, diferenciação celular e na aterosclerose (Carvalho *et al.*, 2009a). Como muitos esteróides, estes compostos oxidados são também intermediários na biossíntese de ácidos biliares e hormonas esteróides, participam na via de sinalização de Hedgehog e são importantes reguladores dos *rafts* lipídicos (Carvalho *et al.*, 2011).

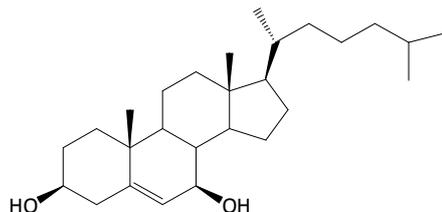


Figura 1.4. Estrutura do 7β-hidroxicolesterol.

1.4.1. Oxiesteróis como produtos do metabolismo do colesterol

Os oxiesteróis podem actuar como intermediários no catabolismo do colesterol (Jusakul *et al.*, 2011). Devido à sua natureza anfifílica atravessam as membranas celulares mais facilmente que o colesterol (Diczfalusy *et al.*, 1996), podendo estar envolvidos na eliminação deste do organismo (Bjorkhem, 2002). Alguns autores apontaram também, a formação não enzimática de oxiesteróis, como sendo uma forma do colesterol exercer uma actividade antioxidante *in vivo* (Girao *et al.*, 1999). A introdução de um oxigénio aumenta a velocidade de degradação do colesterol em produtos mais polares, o que facilita a saída da célula e posterior eliminação (Silva *et al.*, 2011). Para além disso, os oxiesteróis são sintetizados em vários tecidos por hidroxilases específicas, constituindo uma via de remoção do colesterol em excesso do cérebro, pulmões e outros órgãos, pela transformação deste em derivados oxidados, que serão convertidos em diversos compostos como é o caso dos ácidos biliares (Radhakrishnan *et al.*, 2007). Por outro lado, os oxiesteróis formados por via enzimática inibem a enzima HMG-CoA reductase, enzima chave na biossíntese do colesterol (Wang *et al.*, 2008).

1.4.2. Oxiesteróis e doença

Os oxiesteróis têm sido relacionados com diversas situações patológicas, devido às suas propriedades citotóxicas, oxidativas e pro-inflamatórias. No ano 2000 os estudos de Schroepfer mostraram que os oxiesteróis podiam induzir a morte celular programada e afectar o desenvolvimento da calcificação nas células vasculares. Desde há muito, grandes avanços têm sido feitos em tecnologias para o isolamento, identificação e quantificação de oxiesteróis, com o intuito de compreender o potencial fisiopatológico destes compostos em medicina e biologia (Schroepfer, 2000).

Na actualidade, é amplamente aceite o envolvimento dos oxiesteróis na aterosclerose (Shibata *et al.*, 2010) e em doenças neurodegenerativas (Gabbi *et al.*, 2009) e parecem também estar associados a outras patologias como a doença macular degenerativa (Rodríguez *et al.*, 2010), cataratas e osteoporose (**Tab. 1.2.**) (Vejux *et al.*, 2009). Pensa-se que a inflamação poderá ser uma importante força motriz destas doenças e que a formação de oxiesteróis será um passo crucial no desenvolvimento de *stress* celular e dano tecidual, levando à iniciação e progresso destas patologias (Leonarduzzi *et al.*, 2008).

Tabela 1.2. Relevância patológica dos oxiesteróis em doenças degenerativas relacionadas com a idade.

Pathologies	Organs involved (tissues and/or cells)	Associated oxysterols	References
Atherosclerosis	Cardiovascular system (cells of the vascular wall)	7-Ketocholesterol; 7 β -hydroxycholesterol	Brown and Jessup (1999), García-Cruset <i>et al.</i> (1999), García-Cruset <i>et al.</i> (2001), Hodis <i>et al.</i> (1991), Zhou <i>et al.</i> (2000), Zieden <i>et al.</i> (1999)
Alzheimer's disease	Brain (neurons)	24S-Hydroxycholesterol; 22(R)-hydroxycholesterol; 25-hydroxycholesterol; 27-hydroxycholesterol	Björkhem (2006), Fukumoto <i>et al.</i> (2002), Koldamova <i>et al.</i> (2003), Lütjohann <i>et al.</i> (2000), Papassotiropoulos <i>et al.</i> (2000), Sun <i>et al.</i> (2003), Vaya and Schipper (2007), Vega <i>et al.</i> (2003)
Parkinson's disease	Brain (dopaminergic neurons)	24S-Hydroxycholesterol; 27-hydroxycholesterol	Bosco <i>et al.</i> (2006), Rantham Prabhakara <i>et al.</i> (2008)
Multiple sclerosis	Central nervous system	7-Ketocholesterol; 24S-hydroxycholesterol; 27-hydroxycholesterol	Diestel <i>et al.</i> (2003), Leoni <i>et al.</i> (2002), Leoni <i>et al.</i> (2004), Teunissen <i>et al.</i> (2003)Teunissen <i>et al.</i> (2007)
Osteoporosis	Bones (osteoblasts, osteoclasts)	Cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol	Liu <i>et al.</i> (2005)
Age-related macular degeneration	Eyes (retina)	7-Ketocholesterol; 24S-hydroxycholesterol	Malvitte <i>et al.</i> (2006), Ong <i>et al.</i> (2003), Rodriguez <i>et al.</i> (2004)
Cataract	Eyes (cornea)	7-Ketocholesterol; 7 β -hydroxycholesterol 5 α ,6 α -epoxycholestanol; 20 α -hydroxycholesterol; 25-hydroxycholesterol	Girao <i>et al.</i> (1998)

Retirado de Vejux *et al.*, 2009.

1.4.2.1. Doença macular degenerativa

A doença macular degenerativa é uma doença que afecta a mácula, no entanto torna-se cada vez mais consensual a possibilidade do desenvolvimento da doença estar relacionado também com uma disfunção no epitélio pigmentado da retina (EPR), provocando uma progressiva perda de visão (Rodríguez *et al.*, 2010). É actualmente considerada a causa mais comum de cegueira em idosos e envolve uma componente inflamatória, associada às doenças do envelhecimento (Klein *et al.*, 2004). Estudos recentes têm vindo a revelar que as propriedades inflamatórias dos oxisteróis podem afectar a retina e o EPR (Chakravarthy *et al.*, 2010). Um oxisterol em particular, o 7-oxocolesterol (**Fig. 1.5.**) conhecido por ter potentes propriedades farmacológicas que conduzem à inflamação e morte celular, foi encontrado abundantemente na retina. Tem sido demonstrado que o 7-oxocolesterol está associado a grande parte da citotoxicidade provocada pelas lipoproteínas oxidadas sendo altamente tóxico para as células do EPR em cultura (Ong *et al.*, 2003). *In vitro*, o 7-oxocolesterol é capaz de induzir a transcrição e libertação de citocinas pró-inflamatórias em diferentes tipos de células.

Em células do EPR, o 7-oxocolesterol induz a formação de uma proteína sinalizadora que estimula a angiogénese e a vasculogénese, a VEGFb que quando em abundância pode causar a doença macular degenerativa. O 25-hidroxicolesterol também parece estar associado ao processo inflamatório importante na progressão da doença, devido ao facto de estimular a expressão e libertação da interleucina-8, uma citocina inflamatória (Rydberg *et al.*, 2003). No entanto, não há ainda nenhuma evidência directa, na literatura, que esclareça acerca dos mecanismos que envolvem os oxisteróis no desencadeamento da doença macular degenerativa (Rodríguez *et al.*, 2010).

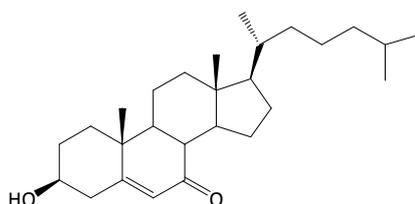


Figura 1. 5. Estrutura do 7-oxocolesterol.

1.4.2.2. Aterosclerose

A aterosclerose é considerada uma doença inflamatória crônica bem como uma desordem no metabolismo lipídico (Shibata *et al.*, 2010). Acontece quando os monócitos migram da corrente sanguínea para a parede arterial e se transformam em células que acumulam substâncias gordas. Esta acumulação de células forma a placa aterosclerótica, que contém no seu interior uma substância esponjosa composta por diversas substâncias gordas, principalmente o colesterol. À medida que a placa cresce as artérias tornam-se cada vez mais estreitas e a placa pode sofrer ruptura. Essa ruptura desencadeia a formação de um coágulo sanguíneo que por sua vez leva à oclusão das artérias (**Fig. 1.6.**) (Falk, 2006).

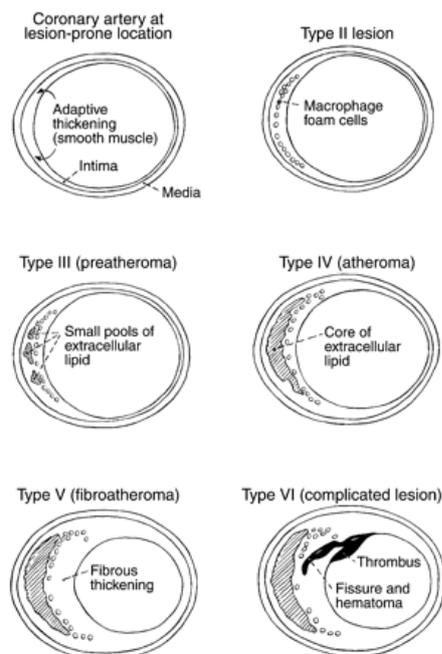


Figura 1.6. Diferentes estados da aterosclerose. A progressão da aterosclerose é retratada desde as primeiras fases (canto superior esquerdo) até à mais avançada que culmina com a ruptura da placa aterosclerótica e consequente trombose. Retirado de Stoker *et al.*, 2004.

Muitos estudos já revelaram que vários oxisteróis podem ser encontrados na placa aterosclerótica em elevadas concentrações, como é o caso do 7 β -hidroxicolesterol, 5 β ,6 β -epoxicolesterol e do 7-oxocolesterol, presentes com níveis substancialmente mais elevados em lesões avançadas, em comparação com tecidos normais (Murphy *et al.*, 2008).

Os oxisteróis induzem a morte celular em diversos tipos de células da vasculatura (Schroepfer, 2000), sendo este um processo importante na aterogénese (Panini *et al.*, 2001; Falk, 2006).

Actualmente existe um consenso de que a aterosclerose representa um estado de *stress* oxidativo caracterizado pela elevada oxidação de lípidos e proteínas na parede vascular (Stoker *et al.*, 2004). Os oxisteróis, sendo uma consequência da acção dos radicais livres de oxigénio, são também pró-oxidativos (Silva *et al.*, 2011). Estudos em ratos indicam que a administração de oxisteróis conduz a um aumento da expressão e da actividade de enzimas antioxidantes e à redução das concentrações de glutatião total e reduzido, sugerindo uma interferência com os mecanismos de defesa antioxidante (Ringseis *et al.*, 2004). Foi também demonstrado que os oxisteróis contribuem para a oxidação mediada pelas lipoproteínas, por activação da NADPH-oxidase por libertação do ácido araquidónico e produção do anião superóxido (Rosenblat *et al.*, 2002).

A aterosclerose, tal como uma vasta gama de doenças associadas ao envelhecimento, envolve uma componente inflamatória - interacções moleculares e celulares que facilitam o retorno à homeostase fisiológica e à reparação dos tecidos (Vasto *et al.*, 2007). Estudos *in vivo* demonstraram que diversos oxisteróis estimulam a produção de citocinas, como a interleucina-8, uma quimocina associada à inflamação (Lemaire-Ewing *et al.*, 2009), apontando assim para uma actividade pró-inflamatória dos oxisteróis, que contribui para a aterogénese (Silva *et al.*, 2011).

Vários estudos sugerem também uma contribuição significativa dos oxisteróis em vários passos-chave da remodelação vascular, que ocorre na aterosclerose. Segundo G. Poli e seus colegas, estes compostos estão envolvidos na disfunção das células endoteliais, na adesão de células do sangue circundante, na instabilidade da placa e na formação de células esponjosas, (Poli *et al.*, 2009). O 7-oxocolesterol favorece a diferenciação *in vitro* dos monócitos e a formação das células esponjosas (Hayden *et al.*, 2002).

O desenvolvimento e a progressão da aterosclerose dependem de uma variedade de eventos patológicos, incluindo excesso de metaloproteínases da matriz (MMPs, *matrix metalloproteinases*), enzimas que regulam o comportamento das células da parede vascular. A mistura de oxisteróis, que é encontrada em altas concentrações nas lesões ateroscleróticas avançadas aumenta a expressão e a actividade da MMP-9. Entre os vários oxisteróis presentes, o 27-hidroxicolesterol e o 7-hidroxicolesterol são os principais

responsáveis pela elevada produção de MMP-9 pelos macrófagos. Este aumento provoca um desequilíbrio entre a MMP e os seus inibidores endógenos (TIMP, *tissue inhibitors of metalloproteinases*). A desregulação do sistema MMP/TIMP contribui para a vulnerabilidade da placa aterosclerótica (Gargiulo *et al.*, 2011).

1.4.2.3. Doenças neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas podem ser essencialmente definidas como doenças nas quais ocorre a destruição progressiva e irreversível de neurónios. Pode acontecer por perda gradual da função e/ou estrutura destas células nervosas ou até mesmo a morte (Gao *et al.*, 2008).

Estas patologias podem ser associadas à presença de células apoptóticas, processos oxidativos e inflamatórios, e distúrbios lipídicos. Como tal, os oxisteróis têm sido implicados em doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer e de Parkinson (Vejuj *et al.*, 2009). Diversos estudos têm procurado esclarecer os efeitos dos oxisteróis no cérebro, identificar possíveis alvos terapêuticos e identificar oxisteróis que possam funcionar como biomarcadores de doenças neurodegenerativas (Silva *et al.*, 2011). Alguns oxisteróis já se encontram relacionados com diversos mecanismos.

O cérebro contém 25% do valor total de colesterol presente no organismo. Este esteróide tem grande importância fisiológica neste órgão e é quase todo sintetizado localmente. A barreira hemato-encefálica protege as trocas com o colesterol das lipoproteínas em circulação e não tem capacidade de estabelecer trocas com outros tecidos ou órgãos, mantendo os elevados níveis cerebrais de colesterol por mecanismos homeostáticos altamente eficientes (Bjorkhem *et al.*, 2004).

Na idade adulta, a síntese de colesterol no cérebro é pouco significativa (Dietschy *et al.*, 2004), no entanto, este tem de possuir um mecanismo de eliminação do esteróide, prevenindo a sua acumulação. A colesterol 24-hidroxilase é uma enzima do citocromo P450 responsável pela maioria do *turnover* do colesterol no sistema nervoso central (SNC) (Russell *et al.*, 2009). Bjorkhem e os seus colegas, depois de várias investigações, propuseram que a formação de 24(S)-hidroxicolesterol (**Fig. 1.7. 7A**) pode representar uma nova via para o mecanismo de eliminação do colesterol. Este oxisterol é formado no cérebro, pela oxidação

enzimática do colesterol, e posteriormente é excretado para a circulação, por difusão espontânea através da barreira hemato-encefálica (Russell *et al.*, 2009; Björkhem *et al.*, 1997; Diczfalusy *et al.*, 1996).

O 24(S)-hidroxicolesterol parece também ser útil como agente terapêutico para as doenças neurodegenerativas. O aumento deste oxiesterol e consequente redução dos níveis de colesterol inibe a produção de amilóide- β (A β), um péptido que pode provocar demência (Brown *et al.*, 2004). A β é um fragmento proteolítico, da proteína precursora amilóide, que é libertado por clivagens sequenciais da β - e γ -secretases. No entanto, a via predominante para estas clivagens dá-se através da α - e γ -secretases, que cortam no interior da sequência A β evitando a sua formação (Postina, 2008; Björkhem *et al.*, 2009). O 24(S)-hidroxicolesterol estimula a actividade da α -secretase, diminuindo a deposição do peptídeo A β neurotóxico, ao contrário do 7 β -hidroxicolesterol, que diminui a actividade da α -secretase (Nelson *et al.*, 2005; Famer *et al.*, 2007). Todavia, efeitos pró-inflamatórios e neurotóxicos foram também reportados para o 24(S)-hidroxicolesterol (Alexandrov *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2011).

Ao contrário do 24S-hidroxicolesterol, o 27-hidroxicolesterol (**Fig. 1.7. 7B**) faz o fluxo inverso, da circulação para o cérebro (**Fig. 1.8.**), podendo regular uma série de enzimas-chave dentro deste órgão. Estudos *in vitro* sugerem que o equilíbrio entre os níveis destes dois oxiesteróis é também importante para a amiloidogénese (Björkhem *et al.*, 2009). Por outro lado, o 27-hidroxicolesterol mostrou ser capaz de suprimir a expressão da actividade da proteína ARC em células do hipocampo de ratos. Esta proteína é importante na consolidação da memória, que é reduzida em doentes com Alzheimer (Mateos *et al.*, 2009).

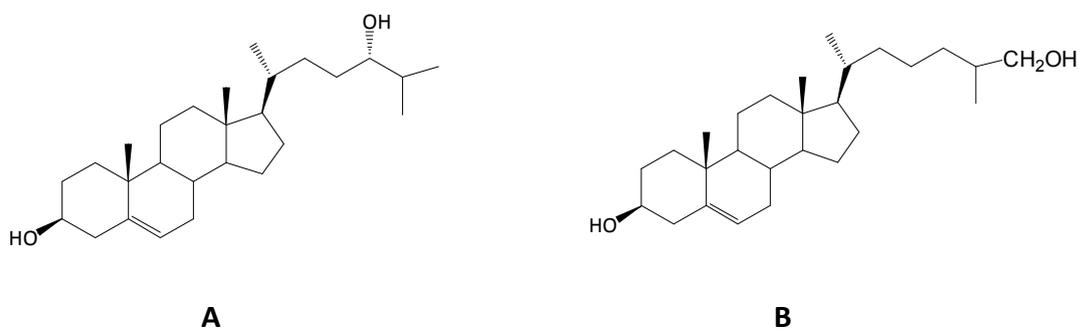


Figura 1.7. Estrutura do 24(S)-hidroxicolesterol (A). Estrutura do 27-hidroxicolesterol (B).

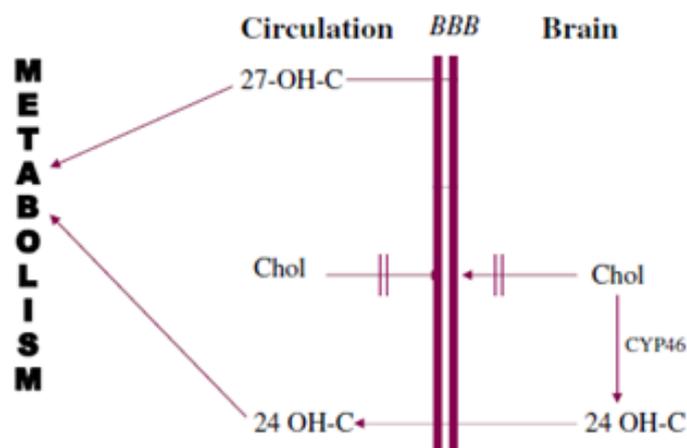


Figura 1.8. Fluxo de oxisteróis através da barreira hemato-encefálica. A barreira hemato-encefálica restringe o movimento de colesterol entre o cérebro e a circulação sanguínea. No entanto, os oxisteróis são capazes de atravessar. O 24S-hidroxicolesterol pode sair do cérebro e serve como uma forma de excreção do colesterol, enquanto 27-hidroxicolesterol pode passar da circulação para o cérebro. Adaptado de Björkhem *et al.*, 2009.

O 25-hidroxicolesterol, outro derivado oxigenado do colesterol, exerce efeitos tóxicos no SNC. Oligodendrócitos são células gliais que em doenças neurodegenerativas estão associadas a processos inflamatórios. O 25-hidroxicolesterol demonstra alterar a morfologia destas células e provocar apoptose (Trousseau *et al.*, 2009).

Como substâncias lipofílicas, os oxisteróis acumulam-se nas membranas celulares, chegando rapidamente a elevadas concentrações, suficientes para induzir a apoptose. O 7-oxocolesterol, por exemplo, tem a capacidade de induzir a morte neuronal (Jang *et al.*, 2011). Por outro lado, vários estudos demonstram que há um aumento dos níveis de oxisteróis em áreas do cérebro que se encontram em estado de neuroinflamação, após um dano excitotóxico. Este composto também foi apontado como desencadeador da excitotoxicidade e da liberação de neurotransmissores nas áreas afetadas, agravando a neuroinflamação (Ma *et al.*, 2010).

Os oxisteróis também podem contribuir para um diagnóstico precoce de doenças neurodegenerativas, sendo usados como biomarcadores da neurodegeneração. Algumas descobertas já foram feitas neste sentido. O 24(S)-hidroxicolesterol foi apontado como um marcador no plasma. Pacientes com doença de Alzheimer avançada mostraram níveis significativamente reduzidos deste composto no plasma. Com a progressão da doença pode haver um aumento da perda de células neuronais com capacidade de sintetizar 24(S)-hidroxicolesterol. Outro método usado consiste em quantificar os níveis de oxisteróis no

líquido cefalorraquidiano. O 27-hidroxicolesterol também aumenta em pacientes com neurodegeneração, no entanto, ainda não se conhece o mecanismo através do qual isto acontece (Björkhem *et al.*, 2009). Poderá estar relacionado com o facto de os oxisteróis poderem aumentar o grau de degeneração da barreira hemato-encefálica, permitindo um fluxo maior de 27-hidroxicolesterol (Leoni *et al.*, 2011).

1.4.3. Oxisteróis na medicina regenerativa

A medicina regenerativa tem como objectivo principal a reparação e a substituição terapêutica de tecidos lesados e degenerados por complexos celulares ou moleculares saudáveis, com estruturas e funções equivalentes, através da utilização de células estaminais.

A regeneração tecidular na vida adulta depende de uma população de células-tronco pluripotentes, que estão presentes numa grande variedade de tecidos e principalmente no estroma da medula óssea. Estas células têm a capacidade de se diferenciar em diversas linhas celulares incluindo osteoblastos, fibroblastos e adipócitos (Dwyer *et al.*, 2007). O envelhecimento e a osteoporose estão associados a uma diminuição do número e da actividade de células osteoblásticas e a um aumento paralelo do número de adipócitos. Como as células tronco da medula têm a capacidade de se diferenciar igualmente nestes dois tipos celulares, o desenvolvimento da osteoporose tem vindo a ser associado à diferenciação preferencial das células tronco em adipócitos, a partir de uma certa idade. Assim, a intervenção de moléculas que consigam induzir preferencialmente a diferenciação osteoblástica, revela-se um potencial benefício na capacidade de formação óssea na osteoporose (Kha *et al.*, 2004).

Os oxisteróis participam na morfogénese, processo de desenvolvimento do organismo, através da via de sinalização de Hedgehog. Esta via é um dos reguladores chave no desenvolvimento pós-embrionário, na homeostase dos tecidos dos adultos e na fisiologia das células estaminais (Simpson *et al.*, 2009). Como referido acima, tendo em conta o importante papel desta via em várias patologias, moléculas que regulem a sua actividade representam potenciais agentes terapêuticos. É através da activação, pelos oxisteróis, da

via de Hedgehog em células mesenquimais pluripotentes, que estes demonstram o seu efeito osteoindutor. Vários estudos revelam que o 20(S)-hidroxicolesterol associado ou não ao 22(S)- ou ao 22(R)-hidroxicolesterol participa na diferenciação osteogénica e inibe a adipogénese (Dwyer *et al.*, 2007).

Consistente com relatórios anteriores, que referem que os oxisteróis estimulam o metabolismo do ácido araquidónico (Lahoua *et al.*, 1991), os efeitos osteogénicos do 20(S)-hidroxicolesterol são em parte mediados pela ciclooxigenase (COX) / fosfolipase A₂ (PLA₂, *phospholipase A₂*) e por uma proteína cinase activada por mitogénio (Vejux *et al.*, 2009). As COX estão presentes em células osteoblásticas e parecem ser responsáveis pela homeostase e reparação óssea. O metabolismo do ácido araquidónico em prostaglandinas, pelas COX, medeia os efeitos osteogénicos destas enzimas e a activação da PLA₂ liberta ácido araquidónico a partir de fosfolípidos celulares, tornando-o disponível para o metabolismo das COX (Kha *et al.*, 2004).

A activação de uma outra via parece ser igualmente importante para o crescimento, diferenciação e bom funcionamento de células osteoblásticas, a via das cinases reguladoras extracelulares (ERKs, *extracellular signal-regulated kinases*). Mas mais interessante foi o facto das ERKs se terem revelado inibidoras da diferenciação dos adipócitos, sendo que estas cinases também são activadas pelos oxisteróis (Fig. 1.9.) (Kha *et al.*, 2004). No entanto, qualquer um destes mecanismos deverá ainda ser melhor explorado.

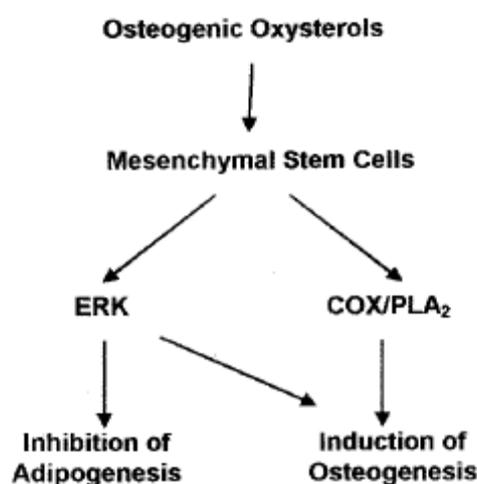


Figura 1.9. Efeito dos oxisteróis nas vias de regulação em células-tronco mesenquimais. Os oxisteróis actuam nas células tronco por activação de duas vias: ERK e COX/PLA₂, implicadas na osteogénese. A ERK pode actuar quer por induzir a osteogénese quer por a adipogénese. A COX/PLA₂ foi apontada como um importante estimulador da osteogénese. Adaptado de Kha *et al.*, 2004.

1.4.4. Oxiesteróis com potencial actividade terapêutica – Antitumorais

O cancro é actualmente uma das principais causas de morte no mundo. As células tumorais são caracterizadas por sofrerem um desequilíbrio nos mecanismos de controlo dos processos de proliferação e diferenciação celular (Visvader, 2011). As células neoplásicas distinguem-se das células normais pela perda das suas funções, poder de invasão e de gerarem metástases (**Fig. 1.10.**) (Bernardi *et al.*, 2003).

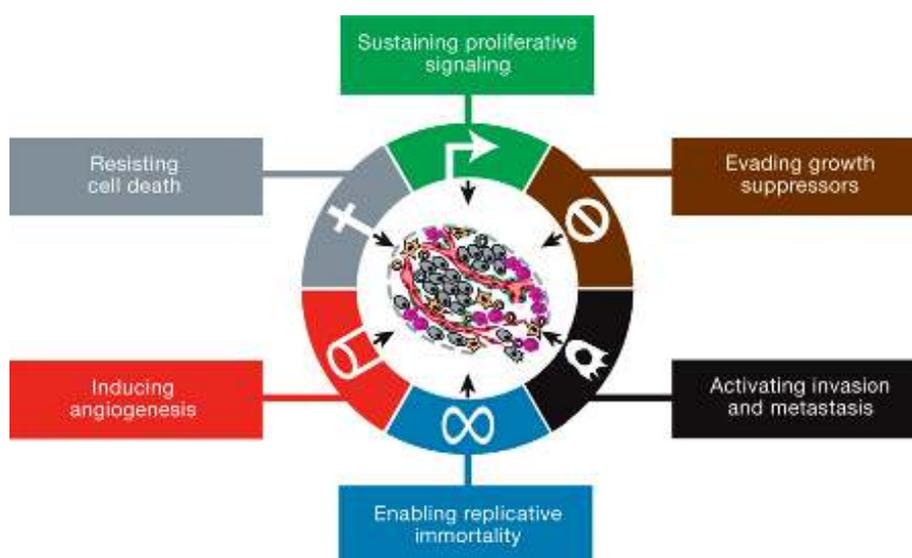


Figura 1.10. Características das células tumorais. Retirado de Hanahan *et al.*, 2011.

Continuamente são feitos estudos, com o objectivo de encontrar tratamentos alternativos para o cancro, nas mais diversas áreas. Os oxiesteróis não são excepção, despertando muita atenção em biologia celular e fisiopatologia devido à grande variedade de fenómenos biológicos em que estão envolvidos (Carvalho *et al.*, 2010). Estudos envolvendo a avaliação citotóxica de uma biblioteca de oxiesteróis endógenos e sintéticos e a análise de SAR revelam os oxiesteróis como promissores anti-cancerígenos (Carvalho *et al.*, 2011). A sua potencial actividade anti-tumoral é conhecida de há muito, sendo que, já na década de 70 o primeiro oxiesterol conhecido, o 7 β -hidroxicolesterol, se revelou citotóxico (Chen *et al.*, 1974; Kandutsch *et al.*, 1978). A citotoxicidade de diferentes oxiesteróis tem vindo a ser estudada em diversas linhas celulares, quer tumorais, quer não-tumorais (Silva *et al.*, 2011).

Como já foi referido, o efeito citotóxico dos oxisteróis tem sido relacionado com a aterosclerose, por induzir apoptose em linhas celulares da vasculatura (Panini *et al.*, 2001). No entanto muitos estudos reportam a sua actividade citotóxica também para células neoplásicas. Esta citotoxicidade está relacionada com a estrutura do oxisterol e a sua concentração, com a linha celular em estudo e com o tempo de incubação (Panini *et al.*, 2001; Ryan *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2011).

O mecanismo através do qual a morte celular ocorre pode ser classificado por duas vias: apoptose ou necrose (**Fig. 1.11.**). A apoptose é caracterizada por ocorrer uma compactação da cromatina, condensação e fragmentação do núcleo, bem como a degradação do ácido desoxirribonucleico, ADN (Lizard *et al.*, 1996) e é induzida por muitos agentes químicos, físicos e biológicos (Vejux *et al.*, 2009). Ao contrário da apoptose, a necrose é considerada uma maneira inespecífica de morte celular induzida por diversos estímulos, como por exemplo hipoxia e produtos químicos tóxicos. A necrose leva à ruptura citoplasmática e das membranas nucleares, tumefacção da mitocôndria e floculação da cromatina (Lizard *et al.*, 1996).

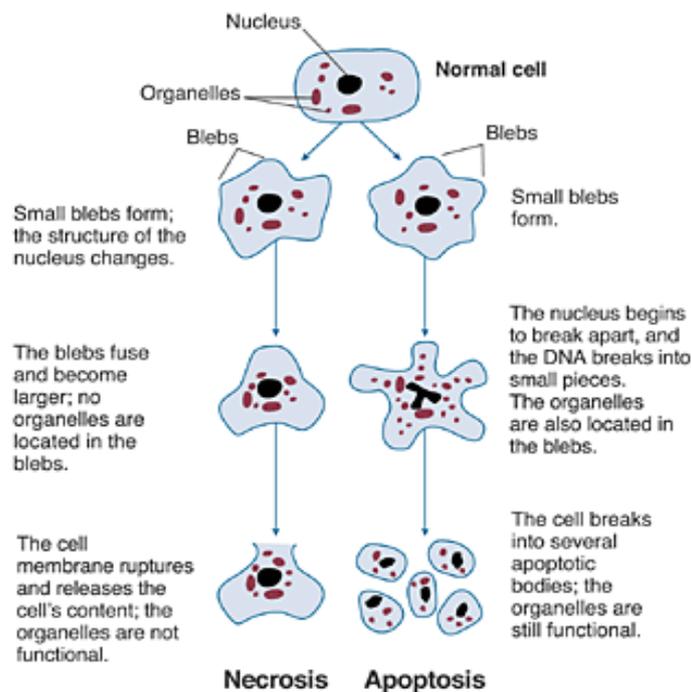


Figura 1.11. Características morfológicas da apoptose e da necrose. Adaptado de Van der Meer *et al.*, 2010.

Estes mecanismos de morte celular mostraram-se mais acentuados com oxisteróis oxigenados no núcleo esteróide do que com oxisteróis oxigenados na cadeia lateral, sendo portanto, estes últimos, menos citotóxicos (Silva *et al.*, 2011).

Os oxisteróis estão realmente a ganhar grande importância e muitos têm sido isolados de organismos marinhos (**Fig. 1.12.**) (Tian *et al.*, 2011; Bunyathaworn *et al.*, 2010), alguns dos quais foram sintetizados e os seus efeitos citotóxicos posteriormente estudados (Fernández-Herrera *et al.*, 2010).

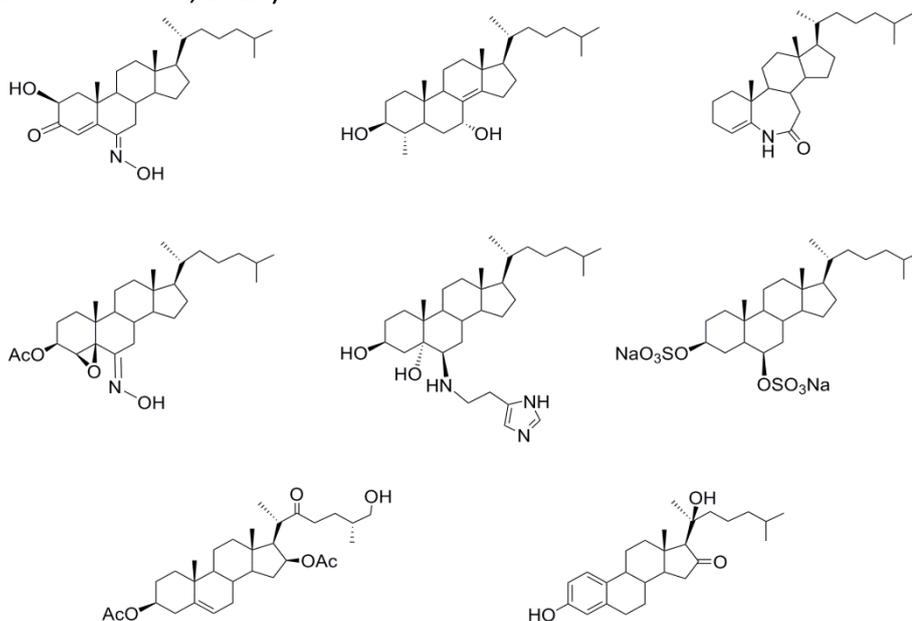
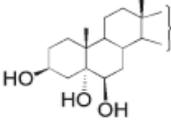
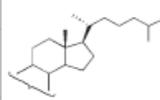
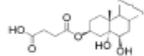
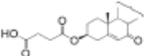
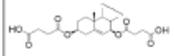
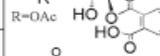
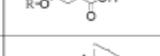
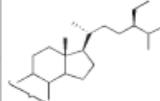


Figura 1.12. Estruturas de novos oxisteróis recentemente sintetizados com citotoxicidade relevante. Retirado de Silva *et al.*, 2011.

Sá e Melo e colaboradores sintetizaram e avaliaram oito oxisteróis endógenos em células de adenocarcinoma do cólon (HT-29) e do epitélio pigmentado da retina (ARPE-19) a fim de estudarem os requisitos estruturais da molécula para induzir citotoxicidade celular (Carvalho *et al.*, 2010). Pela primeira vez, a actividade citotóxica destes derivados oxigenados no anel A e B, foi estudada sob as mesmas condições experimentais, permitindo tirar conclusões acerca do tipo de cadeia lateral e substituintes no anel B capazes de fornecer oxisteróis sintéticos com maior potência e selectividade para células tumorais (Silva *et al.*, 2011). Uma biblioteca de esteróides foi sintetizada para testar a influência de modificações químicas em C17, do padrão de oxigenação no anel B e da esterificação de grupos OH, na capacidade dos oxisteróis induzirem a morte celular. Esteróides oxigenados em C6 ou C7 com um grupo 3 β -OH e cadeia lateral em C17, mostraram citotoxicidade mais potente (**Tab. 1.3.**) (Carvalho *et al.*, 2010).

Tabela 1.3. Citotoxicidade dos esteróides na linha celular HT-29 (IC₅₀ em mM, após 48 h de incubação). Retirado de Carvalho *et al.*, 2010.

3β,5α,6β-Trihydroxysteroids			IC ₅₀	Further Synthetic Oxysterols			IC ₅₀
	4		12.9 ±0.3		18		19.4 ±1.2
	9		>50		19		18.3 ±0.6
	10		>50		20		28.0 ±1.4
	11		>50		21		17.6 ±0.9
	12		>50		22		12.0 ±0.7
	13		>50		23		24.4 ±2.1
	14		>50		24		13.5 ±0.5
	15		>50		25		17.0 ±0.4
	16		>50		26		16.5 ±0.5
	17		>50		27		14.2 ±0.3
Cisplatin		13.8 ±0.6		29		48.0 ±1.6	
Doxorubicin		1.23 ±0.14		30		21.4 ±1.1	

A influência da posição e estereoquímica do grupo epóxido no anel A ou B, assim como da presença de outros grupos oxigenados, também foi estudada por Sá e Melo e colaboradores, após síntese químico-enzimática de uma biblioteca de epóxidos epimericamente puros (Carvalho *et al.*, 2009a).

Epóxidos enantiopuros são intermediários sintéticos úteis para as indústrias química e farmacêutica, devido à sua versatilidade sintética, que os torna valiosos para novas transformações enantiocontroladas. Alguns epóxidos são igualmente responsáveis por reacções electrofílicas em importantes alvos biológicos, como o ADN e proteínas, e são essenciais na síntese de fármacos importantes. O grupo de investigação acima referido testou a citotoxicidade de epóxidos diastereomericamente puros em duas linhas celulares de cancro, HT-29 e LAMA-84 (linha celular de leucemia crónica mielóide) e numa linha normal de células de fibroblastos (BJ). A acilação/desacilação catalítica na posição C3 de 5α, 6α- e 5β, 6β-epoxiesteróis também foi estudada anteriormente (Silva *et al.*, 2004) os quais mostraram relevantes efeitos citotóxicos nas células tumorais. Posteriormente verificaram

que os epoxiesteróis são citotóxicos de uma forma dose-dependente, em quantidades micromolares e apresentam maior actividade nas células cancerígenas do que em células não tumorais (Carvalho *et al.*, 2009a).

Em 2011, o mesmo grupo de investigação, sintetizou e avaliou novamente diversos oxisteróis, oxigenados no anel A e B, contra sete linhas celulares cancerígenas, HT-29, HepG2 (linha celular de carcinoma do fígado), A549 (linha celular de adenocarcinoma epitelial do pulmão), PC3 (linha celular de cancro da próstata), LAMA-84, MCF-7 (linha celular de adenocarcinoma da mama) e SH-SY5Y (linha celular de neuroblastomas), e em duas linhas celulares normais, ARPE-19 e BJ. Por modificações do estado de oxidação dos oxisteróis, novas relações estrutura-actividade foram assinaladas, contribuindo para identificar novos compostos com boa actividade citotóxica e melhor selectividade para células cancerígenas. Os compostos estudados mostraram uma ampla actividade antiproliferativa, sobretudo nas linhas celulares LAMA-84, HT-29, HepG2 e MCF-7. Foi possível concluir que mudanças na oxidação do anel A por si só não afectam a citotoxicidade, sendo de particular relevância o aumento desta quando se efectua uma hidroxilação na posição C5. A citotoxicidade mais elevada foi alcançada pela acetilação quer na posição 3 β - quer na 4 β -. É de realçar que as diferentes modificações químicas no anel B mostraram valores de toxicidade mais elevados nas células cancerígenas (Carvalho *et al.*, 2011).

Capítulo II

Síntese química de oxiesteróis

2. Síntese química de oxisteróis

2.1. Introdução

Recentemente, Sá e Melo e seus colaboradores prepararam uma colecção estruturalmente diversa de oxisteróis citotóxicos com actividade micromolar. Neste contexto foram sintetizados três acetónidos, provenientes de três substratos diferentes, o colest-4-en-3 β -ol (**2**), o acetato de 7 β -hidroxicolest-5-en-3 β -ilo (**5**) e o colest-5-eno-3 β ,7 β -diol (**6**). Após a sua caracterização estrutural, os três acetónidos foram testados biologicamente, revelando que a acetalização do núcleo esteróide está associada a uma actividade citotóxica em várias linhas celulares (Carvalho, 2010), tendo sido considerados agentes antitumorais com razoável actividade. Nesta sequência, é de grande interesse aumentar a biblioteca deste tipo de derivados oxisteróis, mais especificamente, oxisteróis que tenham presente na sua estrutura uma função acetal.

Com base no conhecimento acima referido, cada um dos três substratos, derivados da série colestano, foi sintetizado novamente no nosso laboratório e foi utilizado como substrato para a síntese de novos derivados acetal de oxisteróis. Os compostos carbonílicos usados nestas reacções foram a 3-pentanona, a ciclopentanona e a ciclohexanona e foi possível obter os acetais directamente, a partir dos referidos álcoois alílicos, ou indirectamente, a partir dos respectivos epóxidos.

Pretende-se desta forma obter bibliotecas de derivados de oxisteróis, acetalizados nos anéis A e B do núcleo esteróide, que diferem entre si consoante o substrato e o composto carbonílico utilizado. No final foram obtidas três novas séries de derivados acetal a partir de três oxisteróis diferentes.

Ao longo de todo o protocolo foram utilizados variados reagentes sempre tendo em conta o seu custo, facilidade de manutenção, a sua estabilidade e procurando sempre ter em atenção os princípios da química verde.

Este trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, integrado no Grupo de Química Bioorgânica e Medicinal, sob orientação da Professora Doutora Maria Luísa Sá e Melo.

2.2. Resultados e discussão

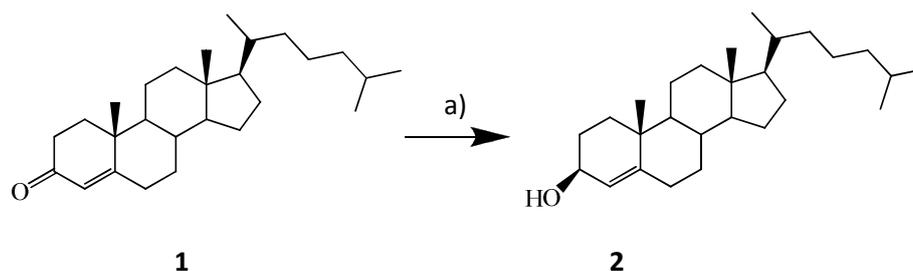
2.2.1. Síntese de derivados 3,4- e 6,7-acetais directamente a partir dos respectivos álcoois alílicos, Δ^4 -3 β - e Δ^5 -7 β -hidroxi esteróides

Os oxiesteróis **7**, **8**, **9**, **10**, **11** e **12** que têm presente na sua constituição um grupo acetal, foram obtidos através de uma metodologia rápida e eficaz, tipo *one-pot*, previamente descrita para a síntese de di-hidroxiesteróides trans-diaxiais e para a preparação de acetonidos (Carvalho *et al.*, 2010). A di-hidroxilação trans pode ser conseguida sujeitando a olefina à presença de um peroxiácido e de um ácido de Lewis, num procedimento em duas etapas. Numa primeira fase formam-se epóxidos, utilizando MMPP (Carvalho *et al.*, 2009b), que posteriormente se convertem em di-hidroxi derivados trans-diaxiais, através da abertura do anel epóxido na presença de Bi(OTf)₃ (Carvalho *et al.*, 2010). O mesmo procedimento foi adaptado para a formação de acetonidos (isopropilideno acetais) (Carvalho, 2010). Desta forma, começando com os álcoois alílicos Δ^4 -3 β - e Δ^5 -7 β -hidroxi esteróides, utilizando o MMPP e quantidades catalíticas de Bi(OTf)₃ em acetona, foi descrita a obtenção dos correspondentes acetonidos **7**, **9**, **11**, como produtos primários da reacção, ao fim de 1 hora. A formação dos acetais pode ser explicada pelo ataque nucleófilo do álcool à cetona, catalisado pelo ácido. Tal facto sugere que após a epoxidação mediada pelo MMPP à temperatura de refluxo, o Bi(OTf)₃ catalisa a abertura estereoselectiva trans-diaxial do anel à temperatura ambiente, obtendo-se os compostos 3 β ,4 β ,5 α - e 3 β ,5 α ,6 β ,7 β -polihidroxiados, de acordo com os substratos utilizados. Por fim, o ataque electrofílico do ácido à cetona origina a acetonização dos *cis*-dióis vicinais (Carvalho, 2010). A hidroxilação trans diaxial é imposta pelo próprio substrato, sendo que a estereoquímica é modulada pelo impedimento estérico dos grupos metilo em C10 e C13 do núcleo esteróide, sob condições ácidas, o que se verifica tanto na epoxidação como na abertura do anel (Carvalho *et al.*, 2010).

2.2.1.1. Preparação dos substratos colest-4-en-3 β -ol (**2**), acetato de 7 β -hidroxicolest-5-en-3 β -ilo (**5**) e colest-5-eno-3 β ,7 β -diol (**6**) para síntese de acetais

Síntese do colest-4-en-3 β -ol (**2**)

A colest-4-en-3-ona (**1**) foi utilizada como substrato para a síntese do colest-4-en-3 β -ol (**2**) através da reacção de redução de Luche, utilizando $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ que coordena os grupos carbonilo de modo a ocuparem uma das faces da molécula e ligando-se o NaBH_4 à outra face. O $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ confere deste modo estereoselectividade à reacção e o NaBH_4 reduz a cetona a álcool secundário (**Esq. 2.1**) (Luche *et al.*, 1978).



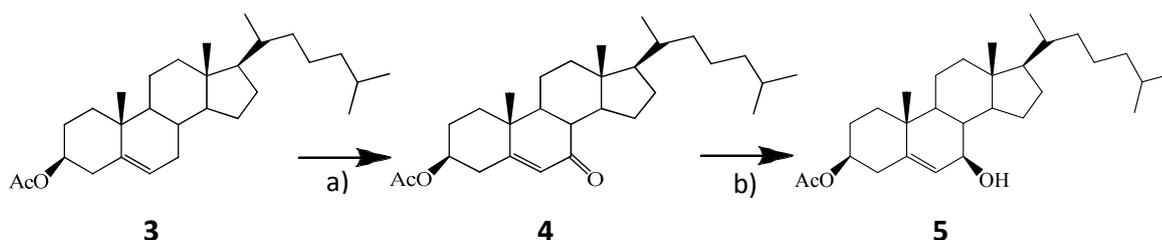
Esquema 2.1. Redução da colest-4-en-3-ona (**1**) a colest-4-en-3 β -ol (**2**). a) $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, THF, MeOH e NaBH_4 , 0°C, 15 min.

O $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, utilizado na síntese do substrato colest-4-en-3 β -ol (**2**), é um catalisador eficiente, relativamente barato e estável ao ar e à água (Khan *et al.*, 2006). Tem sido utilizado como ácido de Lewis, pois é capaz de activar grupos carbonilo para que ocorra o ataque nucleofílico. Além disso não é tóxico, representando uma alternativa ambientalmente favorável aos ácidos de Lewis utilizados até então, como é o caso do AlCl_3 e o FeCl_3 (Bartoli *et al.*, 2004; Lucas *et al.*, 2009). No caso da reacção descrita, este agente confere estereoselectividade à reacção.

Síntese do acetato de 7β-hidroxicolest-5-en-3β-ilo (5)

O acetato de colesterol (**3**) foi utilizado como substrato na preparação do acetato de 7-oxo-colest-5-en-3β-ilo (**4**) através de uma reacção de oxidação alílica utilizando o hidroperóxido de *t*-butilo (*t*-BHP, *tert*-Butyl hydroperoxide) como agente oxidante e iodeto de cobre como catalisador (Salvador *et al.*, 1997). A oxidação alílica define-se como uma reacção em que ocorre a formação de uma nova ligação C-O (cetonas, álcoois, ésteres, éteres, etc), em posição alílica a um grupo funcional, geralmente uma dupla ligação C=C (Sheldon *et al.*, 1981).

O acetato de 7-oxo-colest-5-en-3β-ilo (**4**) foi utilizado como intermediário para a síntese do acetato de 7β-hidroxicolest-5-en-3β-ilo (**5**) através de uma reacção de redução de Luche utilizando $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e NaBH_4 como já descrita na secção 2.2.1.1 (Esq. 2.2).

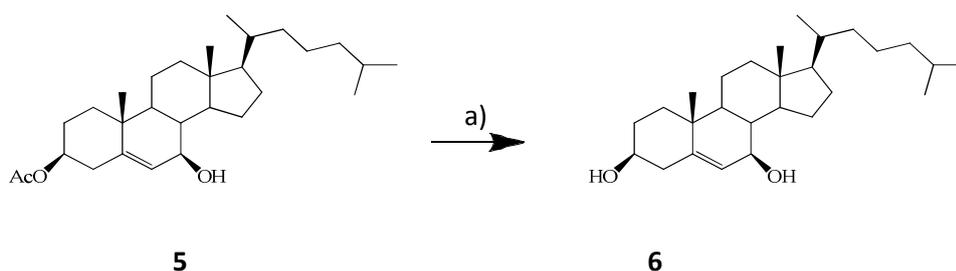


Esquema 2.2. Oxidação alílica do acetato de colesterol (**3**) para obtenção do acetato de 7-oxo-colest-5-en-3β-ilo (**4**) com a posterior redução a acetato de 7β-hidroxicolest-5-en-3β-ilo (**5**). a) CuI , CH_3CN e *t*-BHP, refluxo, 1h. b) Tetrahydrofurano, THF, MeOH, $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e NaBH_4 , 0°C, 15 min.

O *t*-BHP foi o seleccionado para a oxidação alílica do 7-oxo-colest-5-en-3β-ilo (**4**) por ser um dos mais estáveis peróxidos orgânicos e o mais utilizado dos hidroperóxidos de alquilo, sendo também ambientalmente menos agressivo em comparação com o peróxido de hidrogénio, por exemplo (Sharpless *et al.*, 1979; Olah *et al.*, 2003). Para além disso, este composto é económico, comercialmente disponível e solúvel em solventes orgânicos e aquosos, o que facilita o isolamento dos produtos da reacção. A adição faseada no tempo de *t*-BHP em pequenas quantidades, neste protocolo, aumenta o rendimento dos produtos, provavelmente devido ao facto de se evitar a decomposição do *t*-BHP (Carvalho *et al.*, 2009a).

Síntese do colest-5-eno-3 β ,7 β -diol (6)

O acetato de 7 β -hidroxicolest-5-en-3 β -ilo (5), sintetizado e purificado anteriormente foi utilizado como substrato para a síntese do colest-5-eno-3 β ,7 β -diol (6) através de uma reacção de hidrólise alcalina em etanol, EtOH (**Esq. 2.3**). As vantagens da hidrólise alcalina, utilizando o NaOH remetem do facto da reacção ocorrer de forma irreversível e os produtos serem fáceis de separar (Bruice *et al.*, 1962).

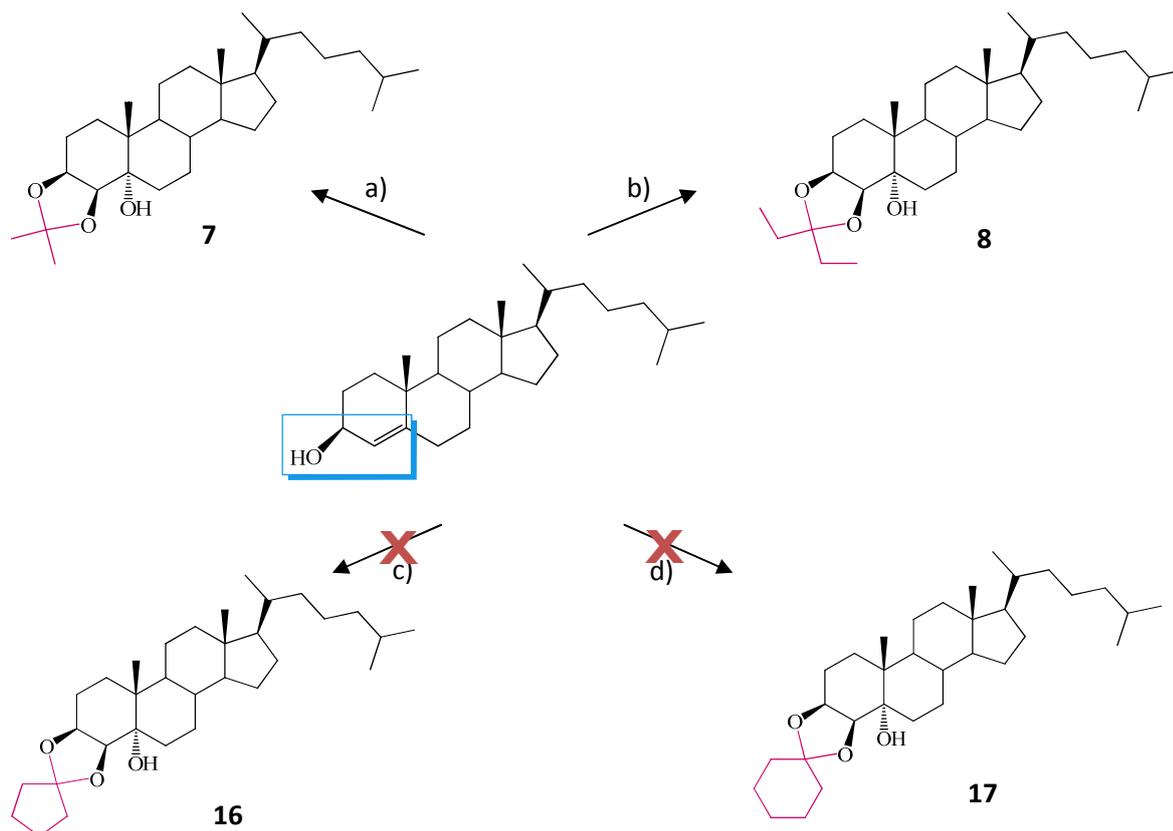


Esquema 2.3. Hidrólise do acetato de 7 β -hidroxicolest-5-en-3 β -ilo (5) em colest-5-eno-3 β ,7 β -diol (6).
a) EtOH, CH₂Cl₂, NaOH, temperatura ambiente, 2h.

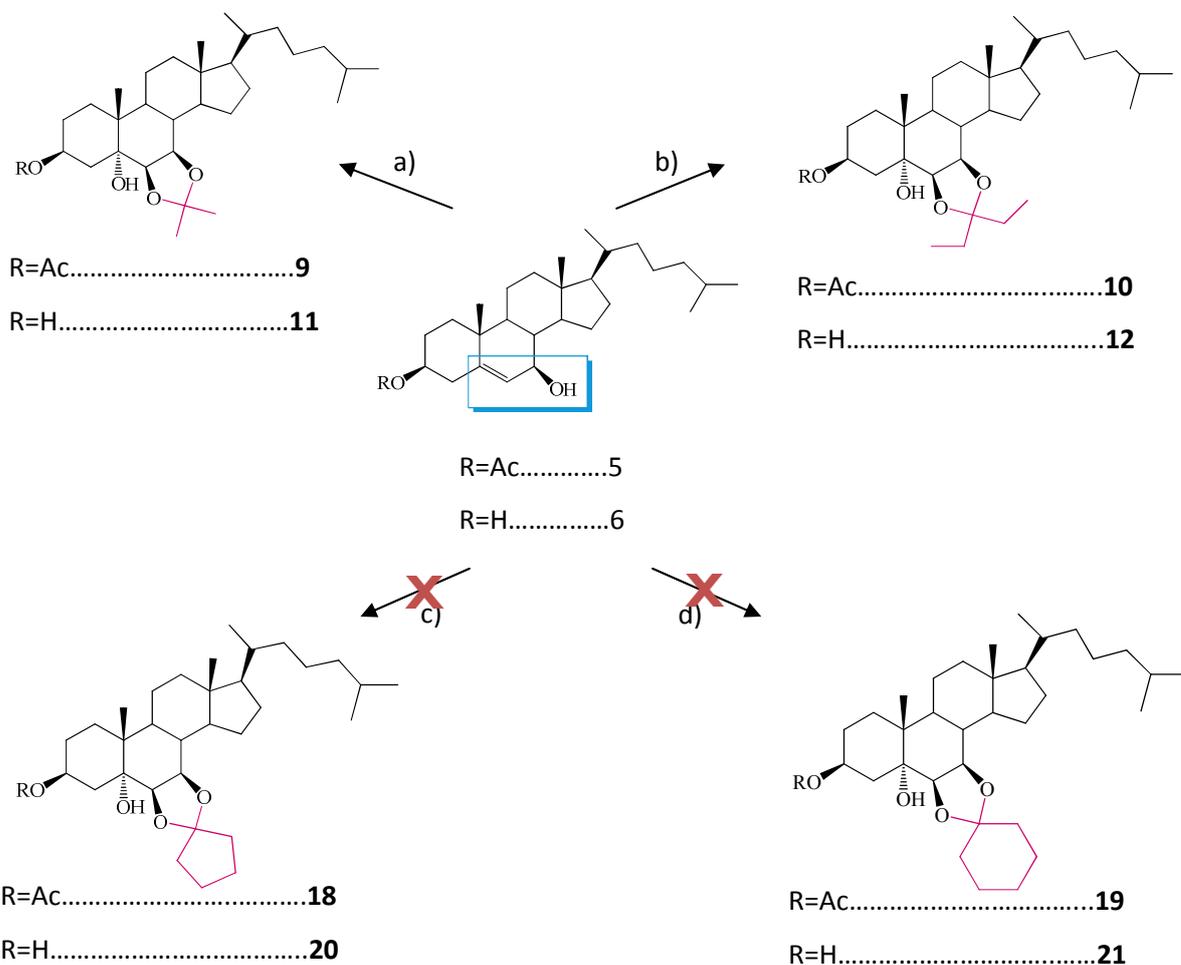
2.2.1.2. Síntese de 3,4- e 6,7-acetais a partir dos substratos colest-4-en-3 β -ol (2), acetato de 7 β -hidroxicolest-5-en-3 β -ilo (5) e colest-5-eno-3 β ,7 β -diol (6)

Os acetonidos **7**, **9** e **11** foram novamente preparados através de um procedimento previamente descrito (Carvalho, 2010). Os derivados isopropilideno acetais **8**, **10** e **12**, foram sintetizados de novo, utilizando o mesmo processo (**Esq. 2.4 e 2.5**).

A diferença observada neste processo de síntese do acetonido e da nova síntese, a partir dos mesmos substratos mas em que o composto carbonílico utilizado foi a 3-pentanona, foi apenas o aumento do tempo reaccional após a adição do Bi(OTf)₃. Tal facto sugere que ao aumentar a cadeia carbonílica do reagente, o processo se tornou mais demorado.



Esquema 2.4. Síntese de 3,4-acetais a partir do colest-4-en-3 β -ol (**2**). Condições: a) 1. MMPP, acetona, refluxo, 30 min, filtração. 2. Bi(OTf)₃, temperatura ambiente, 30 min; b) MMPP, 3-pentanona, refluxo, 30 min, filtração. 2. Bi(OTf)₃, temperatura ambiente, 2h. c) 1. MMPP, ciclopentanona, refluxo, 30 min, filtração. 2. Bi(OTf)₃, temperatura ambiente, 1 dia; d) MMPP, ciclohexanona, refluxo, 30 min, filtração. 2. Bi(OTf)₃, temperatura ambiente, 1 dia.



Esquema 2. 5. Síntese de 6,7-acetais a partir do acetato de 7 β -hidroxicolest-5-en-3 β -ilo (**5**) e do colest-5-eno-3 β ,7 β -diol (**6**). Condições: a) 1. MMPP, acetona, refluxo, 30 min, filtração, 2. Bi(OTf)₃, temperatura ambiente, 30 min; b) MMPP, 3-pentanona, refluxo, 30 min, filtração, 2. Bi(OTf)₃, temperatura ambiente, 2h. c) 1. MMPP, ciclopentanona, refluxo, 30 min, filtração. 2. Bi(OTf)₃, temperatura ambiente, 1 dia; d) MMPP, ciclohexanona, refluxo, 30 min, filtração. 2. Bi(OTf)₃, temperatura ambiente, 1 dia.

A síntese de acetais que derivam das reacções com as duas cetonas cíclicas, a ciclopentanona e a ciclohexanona, não foi possível até então numa reacção do tipo *one-pot* com resultados satisfatórios. De acordo com as análises efectuadas por TLC, durante o decorrer da reacção, para além da baixa reactividade observada por parte dos álcoois alílicos na presença das cetonas cíclicas, este processo origina uma quantidade considerável de produtos secundários difíceis de isolar e conseqüentemente de caracterizar.

2.2.2. Síntese de 3,4- e 6,7-acetais a partir dos epóxidos correspondentes, 4 ξ ,5 ξ -epoxi-3 β -hidroxi- e 5 ξ ,6 ξ -epoxi-7 β -hidroxi esteróides

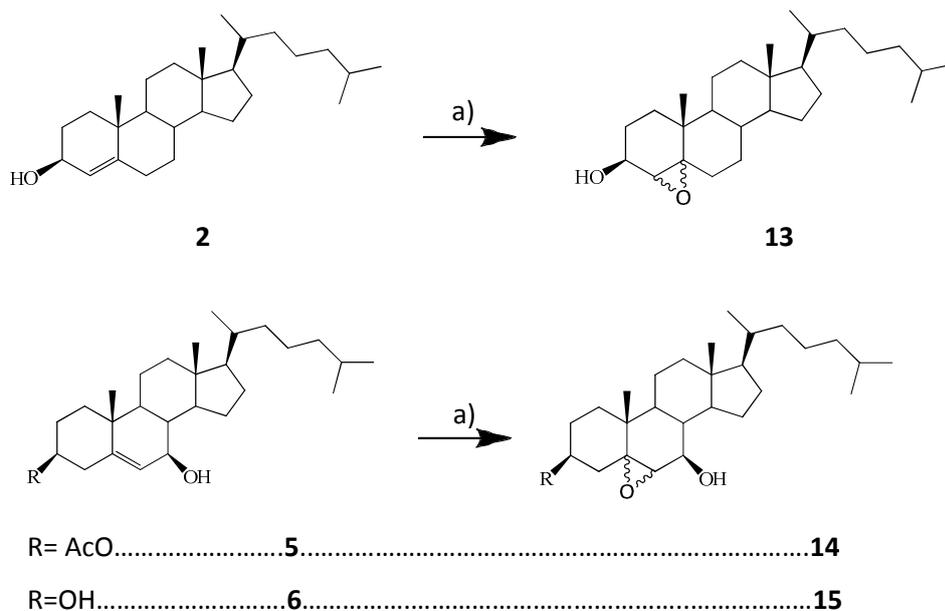
O desenvolvimento de processos ambientalmente aceitáveis têm vindo a tornar-se um requisito fundamental no progresso da química verde. Cada vez mais as investigações em química farmacêutica caminham nesse sentido, e como tal, um grande esforço tem sido feito no sentido de desenvolver reacções *one-pot*.

Uma das preocupações presentes ao longo deste trabalho, passou por estudar as sínteses de diferentes oxisteróis em reacções tipo *one-pot*, seguindo o processo já descrito na literatura, para a formação de acetonidos (Carvalho, 2010). No entanto esta condição não se verificou em todos os procedimentos, como explicado na secção 2.2.3.1. Para ultrapassar este problema, foram sintetizados numa primeira etapa, os epóxidos a partir de cada um dos três substratos em acetonitrilo, como já foi descrito (Carvalho *et al.*, 2009). Após secagem prolongada numa estufa de vácuo, sujeitou-se o epóxido a uma segunda reacção sob condições ácidas, onde se verificou a abertura do epóxido e posterior formação dos acetais pretendidos, de acordo com o composto carbonílico usado na reacção.

2.2.2.1 Epoxidação de Olefinas

A epoxidação de olefinas consiste na introdução de um átomo de oxigénio que se liga aos dois carbonos da dupla ligação formando um anel oxirano. Esta reacção tem primordial importância em síntese orgânica devido à versatilidade sintética dos epóxidos, que os torna intermediários chave para a síntese de compostos com um vasto número de grupos funcionais, através de reacções de abertura do anel epóxido. Para além do interesse em química orgânica, a função epóxido está também presente em muitos compostos que demonstram actividade biológica como é o caso de epoxisteróides (Sello *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2009b).

Neste trabalho experimental sintetizámos 4 ξ ,5 ξ -epoxi-3 β -hidroxi- e 5 ξ ,6 ξ -epoxi-7 β -hidroxi- esteróides, utilizando o monoperóxido de magnésio hexahidratado, MMPP, como agente oxidante, de modo a obtermos intermediários úteis para a síntese de acetais de esteróis (Esq. 2.6).



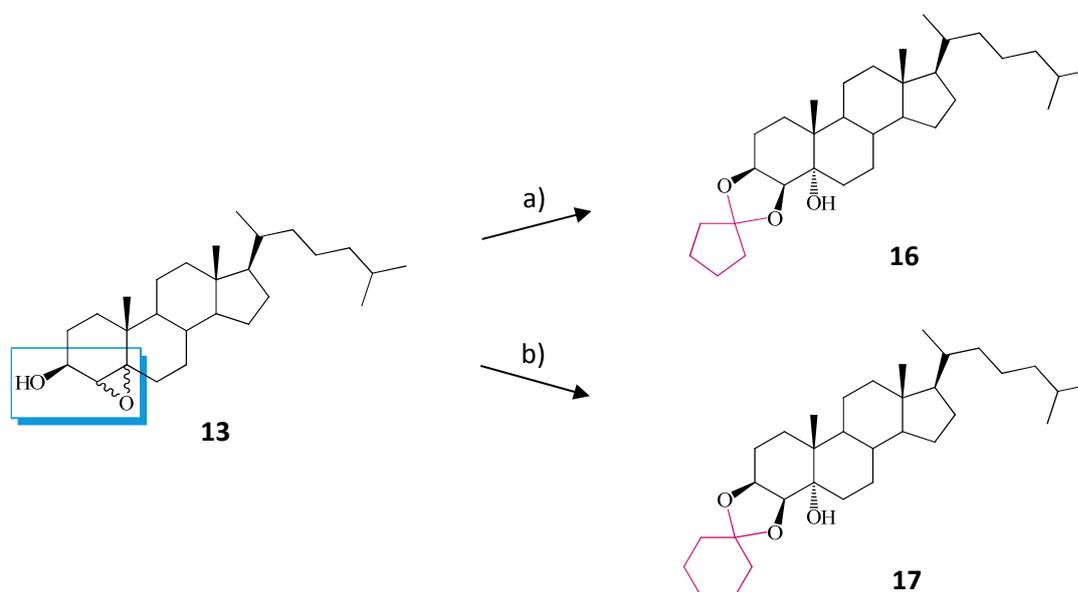
Esquema 2.6. Epoxidação de Δ^5 -7 β - e Δ^4 -3 β -hidroxi esteróides. a) MMPP, CH₃CN, refluxo, 10 min.

Nas reacções de epoxidação, utilizou-se o MMPP em substituição do comum ácido *meta*-cloroperbenzóico, *m*-CPBA, no processo de oxidação das olefinas (Carvalho *et al.*, 2009b). Apesar de terem propriedades químicas semelhantes, o MMPP tem demonstrado possuir um número elevado de propriedades vantajosas. É um composto estável no estado sólido, de mais baixo custo, não-tóxico e seguro de manusear, enquanto que o *m*-CPBA é sensível ao choque e potencialmente explosivo, o que limita o seu uso, em especial em processos de *scale-up* e nas suas aplicações industriais. Além disso, o MMPP é solúvel em água o que facilita a sua remoção nos processos de *work-up* (Brougham *et al.*, 1987; Heaney, 1993). No que respeita às reacções de epoxidação, a utilização do MMPP em acetonitrilo à temperatura de refluxo, é um método vantajoso para a epoxidação selectiva de Δ^4 - e Δ^5 -esteróides, oferecendo condições de reacção simples, bons rendimentos e curtos tempos reaccionais (Carvalho *et al.*, 2009b). Neste protocolo experimental, não foi efectuada a separação dos dois epóxidos por cromatografia.

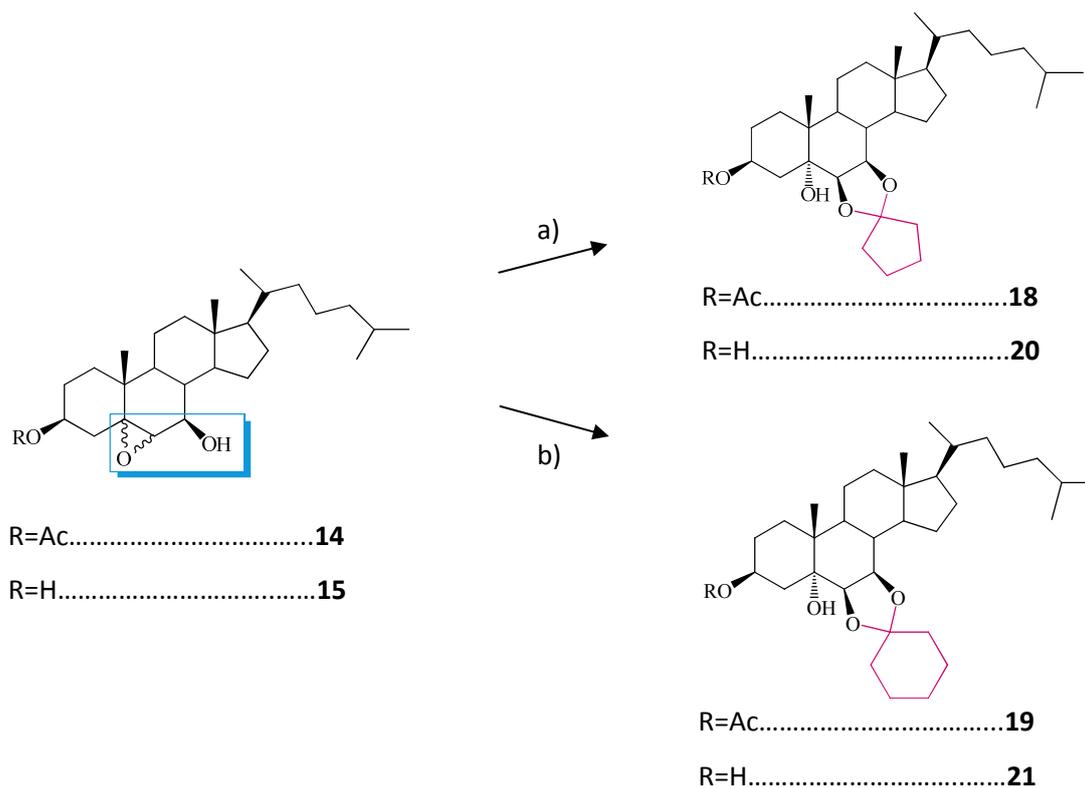
2.2.2.2. Síntese de 3,4- e 6,7-acetais a partir dos substratos 4ξ,5ξ-epoxicolestan-3β-ol (13), acetato de 5ξ,6ξ-epoxi-7β-hidroxicolestan-3β-ilo (14) e 5ξ,6ξ-epoxicolestano-3β,7β-diol (15)

As sínteses dos derivados cicloalquilideno acetais de oxisteróis **16**, **17**, **18**, **19**, **20** e **21**, foram conseguidas a partir dos epóxidos derivados dos substratos **2**, **5** e **6** (Esq. 2.7 e 2.8). Embora esta estratégia de síntese envolva dois passos, através das reacções a partir dos epóxidos, obtiveram-se os acetais cicloalquílicos em condições satisfatórias.

O processo de formação destes acetais, a partir dos respectivos epóxidos, verifica-se mais rápido (45 min) quando o substrato utilizado é o 4ξ,5ξ-epoxicolestan-3β-ol (**13**). Ao utilizamos o 5ξ,6ξ-epoxicolestano-3β,7β-diol (**15**) o tempo reaccional sofreu um ligeiro aumento, sendo de 1.5h e novo aumento se verifica ao prepararmos a série derivada do acetato de 5ξ,6ξ-epoxi-7β-hidroxicolestan-3β-ilo (**14**), que demorou 2h, sendo a mais demorada a sintetizar (Tab. 2.1.). Estes resultados sugerem que um possível impedimento estereoquímico provocado pelo grupo acetato, presente em C3 na série derivada do acetato de 7β-hidroxicolest-5-en-3β-ilo (**5**), pode afectar a acetalização nas posições C6 e C7.

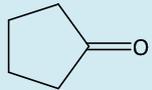
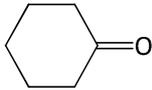
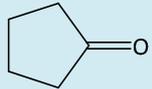
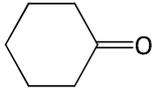
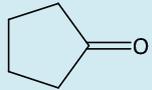
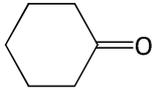


Esquema 2.7. Síntese de 3,4-acetais a partir do 4ξ,5ξ-epoxicolestan-3β-ol (**13**). Condições: a) Bi(OTf)₃, ciclohexanona, temperatura ambiente, 45 min; b) Bi(OTf)₃, ciclohexanona, temperatura ambiente, 45 min.

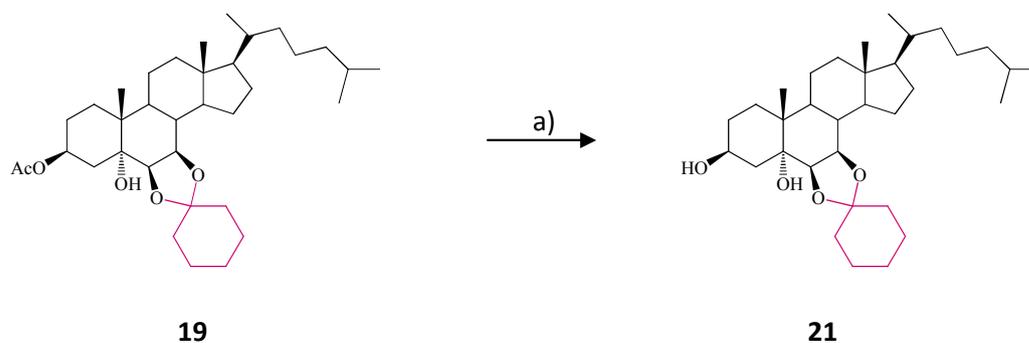


Esquema 2.8. Síntese de 6,7-acetais a partir do acetato de 5 ξ ,6 ξ -epoxi-7 β -hidroxicolestan-3 β -ilo (**14**) e do 5 ξ ,6 ξ -epoxicolestano-3 β ,7 β -diol (**15**). Condições: a) Bi(OTf)₃, ciclopentanona, temperatura ambiente, 2h (composto **18**), 1.5h (composto **20**); b) Bi(OTf)₃, ciclohexanona, temperatura ambiente, 2h (composto **19**), 1.5h (composto **21**).

Tabela 2.1. Tempos reaccionais dos derivados cicloalquilideno acetais conseguidos a partir dos epóxidos correspondentes.

Substrato	Reagente	Acetais cicloalquílicos	Tempo reaccional
4 ξ ,5 ξ -Epoxicolestan-3 β -ol (13)		16	45 min
		17	45 min
Acetato de 5 ξ ,6 ξ -epoxi-7 β -hidroxicolestan-3 β -ilo (14)		18	2 h
		19	2 h
5 ξ ,6 ξ -Epoxicolestano-3 β ,7 β -diol (15)		20	1.5 h
		21	1.5 h

O composto 6 β ,7 β -ciclohexilidenodioxicolestano-3 β ,5 α -diol (**21**) não foi conseguido pelo método geral de preparação de 3,4- e 6,7-acetais, apesar de ocorrer a reacção (Esq. 2.8). Para obtenção deste composto, o epóxido **15** reage com Bi(OTf)₃, que catalisa a abertura do anel epóxido e com a ciclohexanona, que irá originar o acetal. A ciclohexanona é um composto cíclico que apresenta um ponto de ebulição elevadíssimo, 156°C, o que dificulta a sua evaporação após o *work-up* e consequente secagem do produto. Em alternativa, foi proposto um segundo método para a síntese deste acetal (**21**) (Esq. 2.9). Partindo do acetato de 5 α -hidroxi-6 β ,7 β -ciclohexilidenodioxicolestano-3 β -ilo (**19**) puro e bem seco foi efectuada uma reacção de hidrólise alcalina, que originou o ciclohexilideno acetal **21**.



Esquema 2.9. Método 2 para a síntese do 6 β ,7 β -ciclohexilidenodioxicolestano-3 β ,5 α -diol (**21**). Condições: a) MeOH, THF, carbonato de sódio, temperatura ambiente, 4 dias.

Nas reacções de formação de acetais utilizou-se o Bi(OTf)₃ que, de acordo com alguns autores, catalisa a abertura do anel epóxido imediatamente antes da formação do acetal (Ollevier *et al.*, 2004; Ollevier *et al.*, 2008). O que ocorre é uma reacção de hidrólise, à temperatura ambiente, para evitar a formação de produtos secundários característica deste ácido a temperaturas elevadas (Carvalho *et al.*, 2010). O Bi(OTf)₃ tem ganho bastante atenção nos últimos anos por ser um ácido de Lewis de baixo custo, baixa toxicidade, boa estabilidade e comercialmente disponível ou facilmente preparado (Gaspard-Illoughmane *et al.*, 2004). Em comparação com outros ácidos de Lewis, neste processo, o Bi(OTf)₃ é mais eficiente e permite reacções mais rápidas, possivelmente por ser facilmente hidrolisado pela água, originando o ácido triflico. Segundo alguns autores serão os protões, resultantes da hidrólise dos complexos metálicos, os verdadeiros catalisadores (Dumeunier *et al.*, 2004;

Salvador *et al.*, 2009). Nas reacções tipo *one-pot*, em que foi utilizado na primeira etapa o MMPP, foi imprescindível efectuar uma correcta filtração deste oxidante. Caso contrário seria necessário utilizar quantidades estequiométricas de Bi(OTf)₃, o que enfraquece o processo, apesar das suas características de química verde (Carvalho *et al.*, 2010).

De uma forma geral, as reacções efectuadas foram rápidas, simples, com recurso a reagentes de baixa toxicidade e apresentaram bons rendimentos. Para obter produtos de elevada pureza, as colunas cromatográficas foram uma constante ao longo de todos os processos.

2.2.3. Aspectos espectrais dos derivados acetal de oxisteróis

A elucidação estrutural dos compostos sintetizados de novo foi feita com base nas técnicas de ressonância magnética nuclear de protão, RMN ¹H, ressonância magnética nuclear de carbono, RMN ¹³C, intensificação da distorção por transferência de polarização (DEPT, *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*), espectroscopia de massa, EM e espectroscopia de infravermelho, IV.

Nos espectros de RMN ¹H dos derivados acetal de oxisteróis observou-se um padrão constante onde são facilmente identificados à esquerda espectro, os desvios correspondentes aos protões ligados aos carbonos terciários que suportam o acetal, C3 e C4 ou C6 e C7, consoante a série em questão. Tomando como exemplo o composto **13** observou-se um sinal a 3.91 ppm (1H, dd, *J*=8.5, 5.5 Hz) que corresponde ao protão presente na posição 7 α -H e um dubleto a 3.73 ppm (1H, d, *J*=5.5 Hz), correspondente ao protão presente na posição 6 α -H, como é visível na **Figura 2.1**. No caso específico dos derivados acetal do acetato de 7 β -hidroxicolest-5-en-3 β -ilo (**5**) foi ainda visível um multipletto à esquerda do espectro a 5.14 ppm, correspondente à posição 3 α -H. Em relação aos CH₂ presentes na função acetal, do composto **10**, dificilmente são observados, encontrando-se no envelope metilénico. No entanto é possível observar dois tripletos que correspondem aos CH₃ do acetal com desvios químicos de 0.83 ppm (3H, t, *J*=7.5 Hz, CH₃) e 0.93 ppm (3H, t, *J*=7.5 Hz, CH₃).

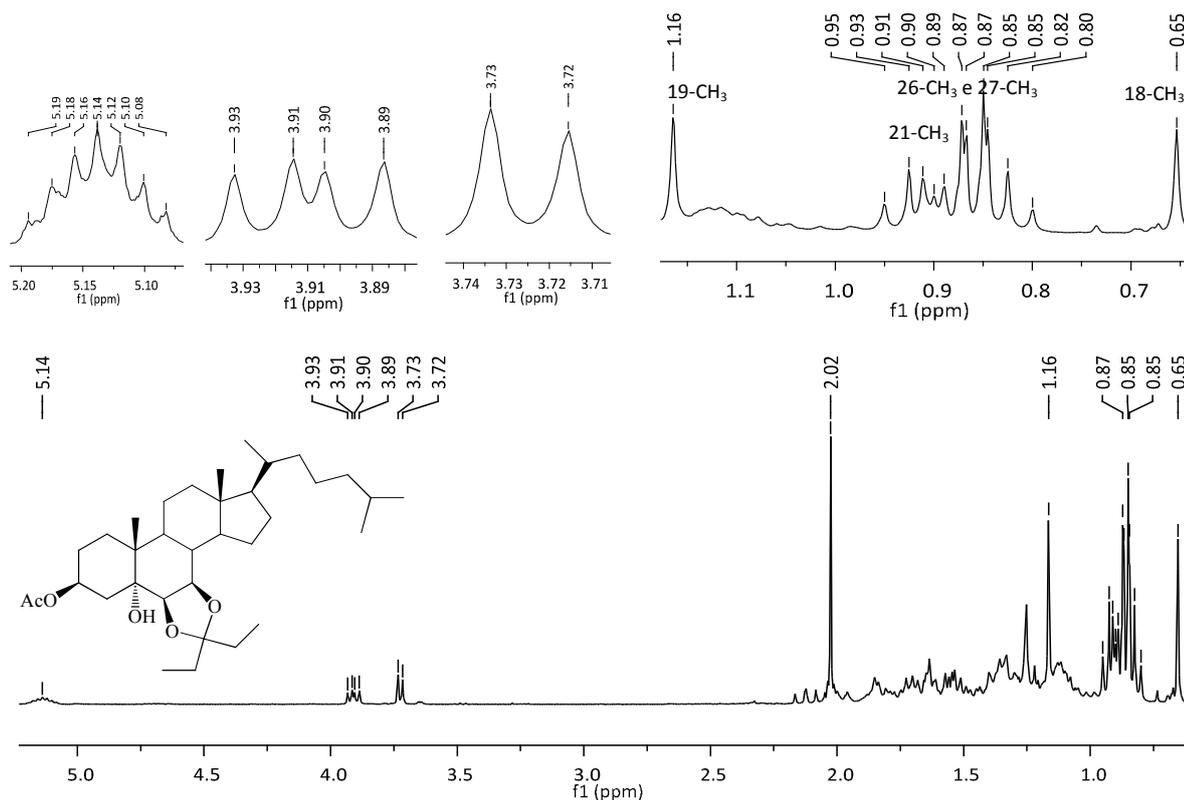


Figura 2.1. Espectro de RMN ^1H do acetato de 5 α -hidroxi-6 β ,7 β -isopentilidenodioxicolestano-3 β -ilo (**10**).

Através dos espectros de RMN ^{13}C foi possível determinar o número de carbonos presente na molécula. Ao analisar o espectro da **Figura 2.2.** relativa ao composto **10**, observaram-se 34 sinais, correspondentes aos 34 carbonos presentes na estrutura do composto. Os dois sinais mais à esquerda do espectro, com desvios químicos de 113.1 e 171.1 correspondem aos carbonos presentes nas funções acetal e acetato, respectivamente.

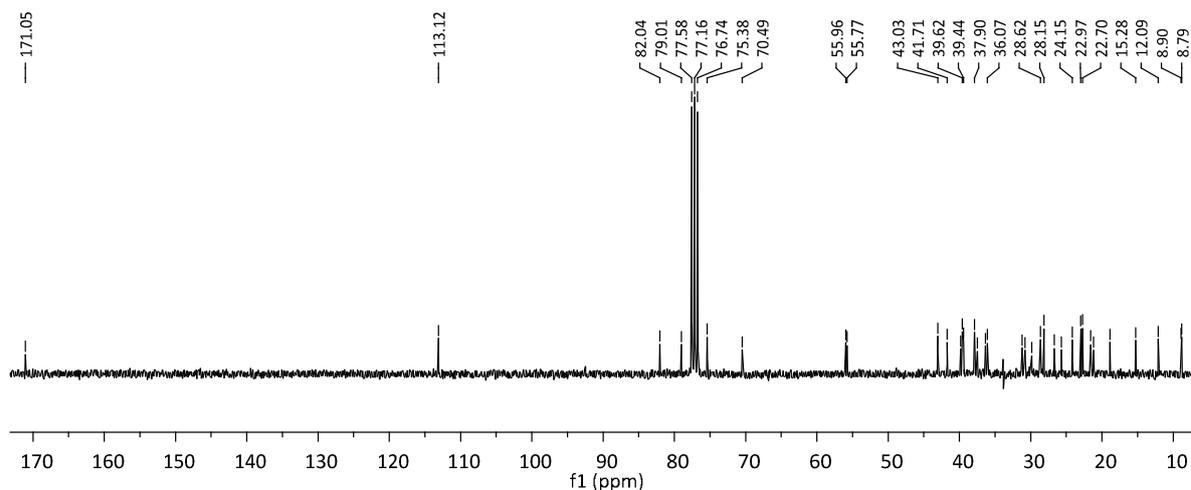


Figura 2.2. Espectro de RMN ^{13}C do acetato de 5α -hidroxi- $6\beta,7\beta$ -isopentilidenodioxicolestan- 3β -ilo (**10**).

Os espectros de DEPT, 90 e 135, permitiram-nos verificar a origem dos carbonos. Observando a **Figura 2.3**, verificamos que a molécula **10** apresenta 17 ($\text{CH}+\text{CH}_3$) e 12 CH_2 . Recorrendo ao DEPT 90 (**Fig 2.4.**) observamos 9 sinais, que correspondem a 9 CH. Ao cruzar as duas informações, retiradas dos espectros de DEPT, concluímos que o composto tem na sua constituição 8 CH_3 . Ao cruzar ainda todos estes dados com os 34 sinais, observados por RMN ^{13}C , é possível afirmar que a molécula apresenta 5 carbonos quaternários na sua estrutura.

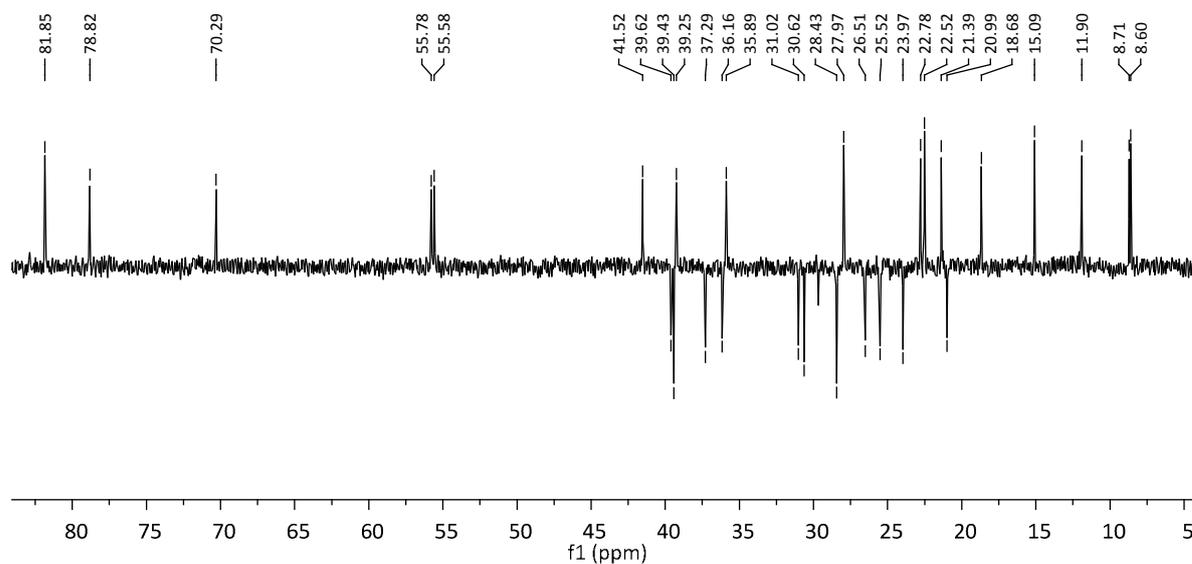


Figura 2.3. Espectro de DEPT 135 do composto 5α -hidroxi- $6\beta,7\beta$ -isopentilidenodioxicolestan- 3β -ilo (**10**).

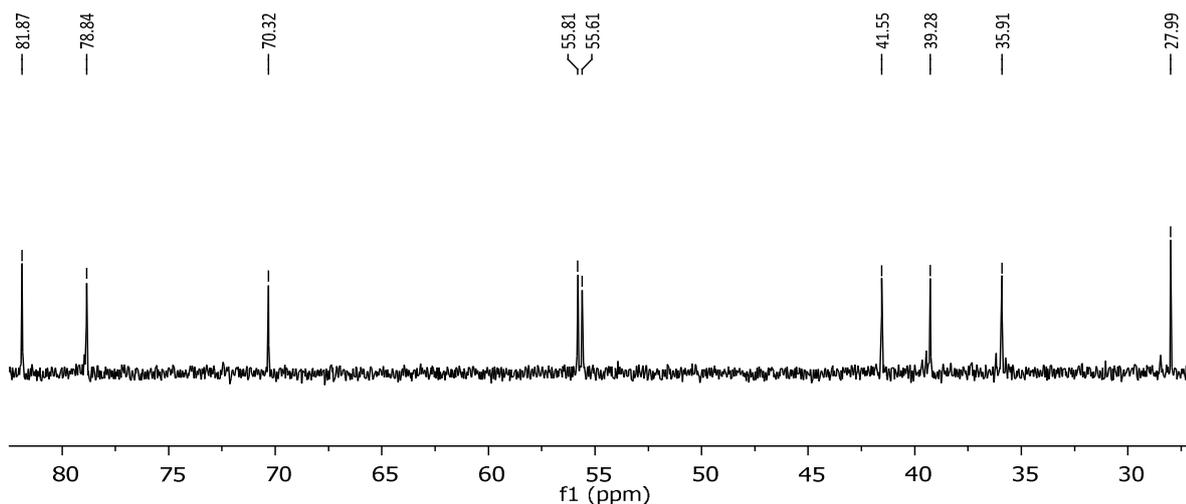


Figura 2.4. Espectro de DEPT 90 do composto 5 α -hidroxi-6 β ,7 β -isopentilidenedioxicolestano-3 β -ol (**10**).

Nos espectros de RMN ^1H dos compostos derivados da série colest-4-en-3 β -ol (**2**) observou-se um padrão constante onde facilmente se verifica a presença do acetal nas posições C3 e C4. Tomando como exemplo o espectro do 3 β ,4 β -ciclopentilidenedioxicolestano-5 α -ol (**16**) (**Fig. 2.5.**) é visível um sinal a 3.65 ppm (1H, d, $J=5.5$ Hz) que corresponde ao próton presente na posição 4 α -H, e um multipletto a 4.26 (1H, m) correspondente ao próton da posição 3 α -H. Sendo este um derivado acetal cíclico composto por CH_2 na função acetal, dificilmente se observa os desvios químicos desses prótons. No entanto confirma-se o fecho da cadeia carbonada pelo desaparecimento dos dois tripletos a 0.83 e 0.93 ppm, quando comparado ao espectro do composto acíclico **10**.

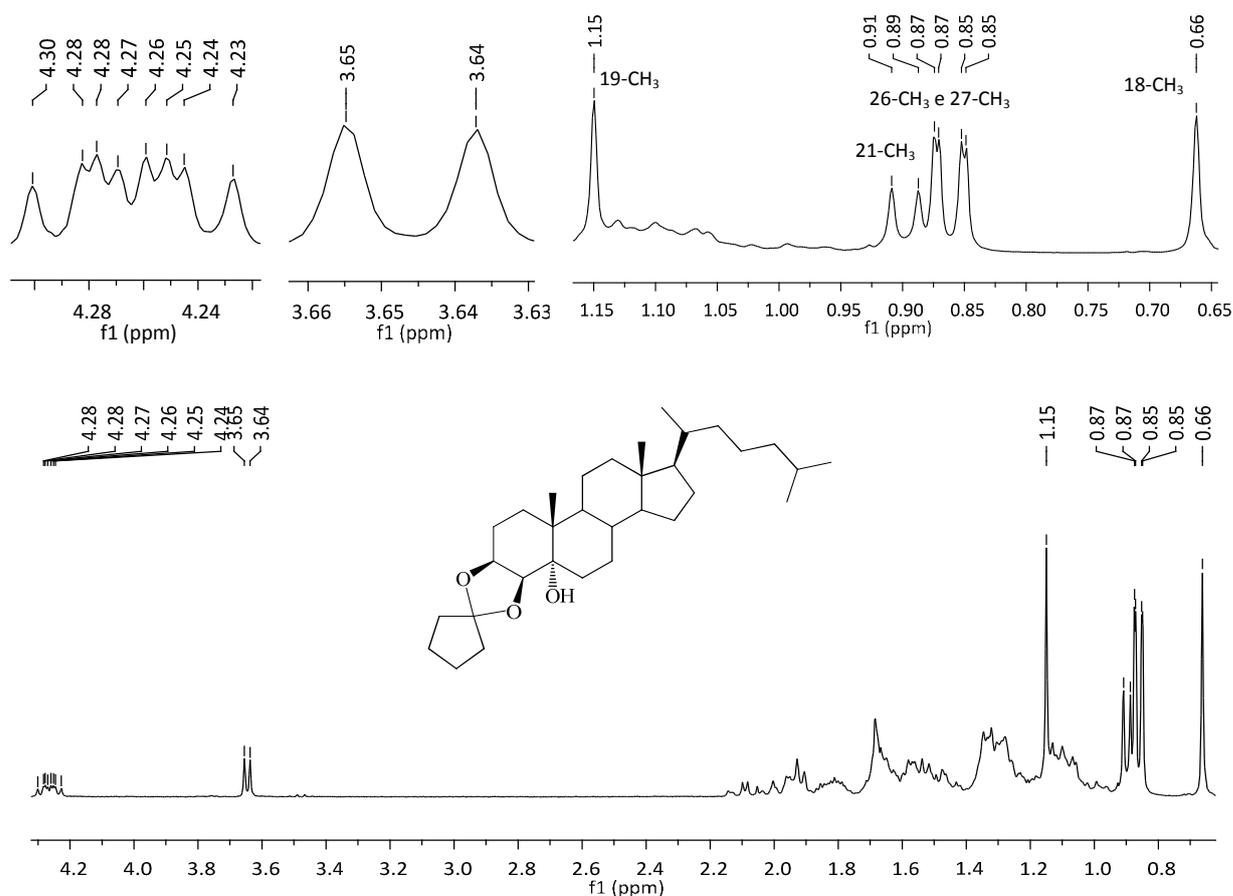


Figura 2.5. Espectro de RMN ^1H do $3\beta,4\beta$ -ciclopentilidenodioxicolestano- 5α -ol (**16**).

O padrão de IV verificado em todos os compostos foi facilmente identificado e corresponde à ligação OH presente em C5, aos CH₂ e CH₃ da molécula e às ligações C-O correspondentes às funções acetal e álcool. No caso específico da série derivada do acetato de 7β -hidroxicolest-5-en- 3β -ilo (**5**) ainda se observaram as bandas correspondentes às ligações C=O e C-O presentes na função acetato. Tomando como exemplo o espectro de IV do composto **18** (Fig. 2.6.), foi possível observar uma banda larga a 3437 cm^{-1} (banda 1), que corresponde à frequência de vibração por alongação da ligação –OH. Observou-se também uma banda forte a 2951 cm^{-1} (banda 2) correspondente às ligações CH. A 1714 cm^{-1} (banda 4) verificou-se a banda que corresponde à ligação C=O presente no acetato que é característica desta série de derivados. A 1465 cm^{-1} (banda 5) encontrou-se uma banda mais fraca correspondente aos CH₂ e a 1364 cm^{-1} (banda 6) é possível identificar a banda do CH₃. Os comprimentos de onda correspondentes às ligações C-O encontram-se entre 1300 e 1000 cm^{-1} . Como tal, no caso particular da série derivada do acetato de 7β -hidroxicolest-5-en- 3β -

ilo (5), observou-se a 1264 cm^{-1} (banda 8) a banda correspondente à ligação C-O, presente na função éster do acetato em C3. O sinal a 1103 cm^{-1} (banda 9) poderá corresponder à ligação C-O do álcool. Por fim, confirmando a formação do acetal que apresenta valores característicos entre $1200 - 1020\text{ cm}^{-1}$, observou-se uma banda C-O a 1030 cm^{-1} (banda 10).

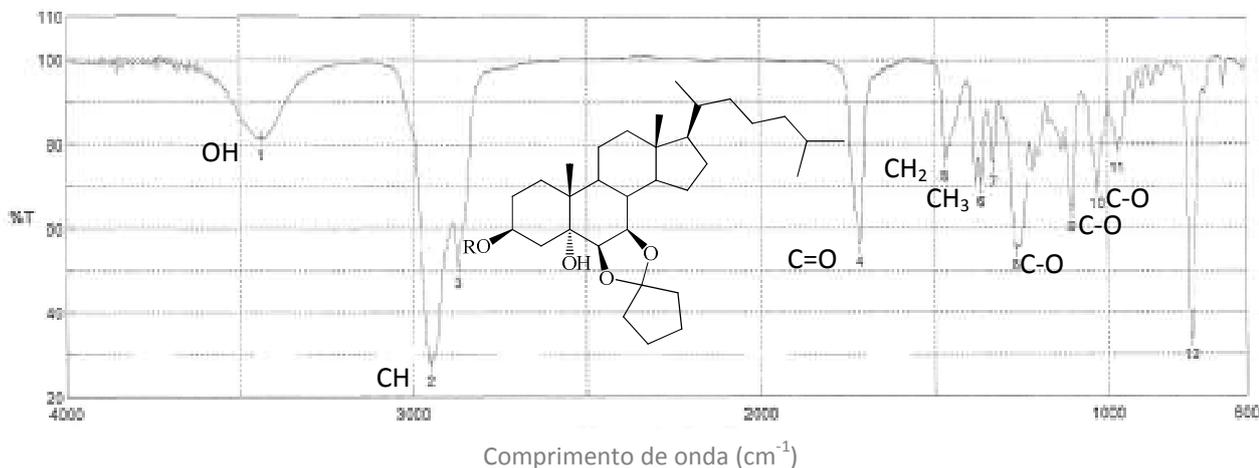


Figura 2.6. Espectro de IV do acetato de 5α-hidroxi-6β,7β-ciclopentilidenedioxicolestano-3β-ilo (18).

2.3. Procedimento experimental

2.3.2. Equipamento

Os espectros de ressonância magnética nuclear de prótons, RMN ^1H e de carbono 13, RMN ^{13}C , foram obtidos num espectrómetro Varian Unity 500, a 500 MHz, e num espectrómetro Bruker Avance III de 400 Mz. A caracterização dos carbonos metílicos, metilénicos, metínicos e quaternários foi efectuada por intensificação da distorção por transferência de polarização (DEPT, *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*). Os desvios químicos são dados na escala δ (ppm) e são relativos ao clorofórmio deuterado como padrão interno. Os espectros de infravermelho (IV) foram obtidos num espectrómetro Jasco FT/IR-420. Os espectros de massa (EM) foram obtidos num espectrómetro de massa quadrupolo/ion trap (QIT-EM), LCQ Advantage MAX da Thermo Finnigan. Os pontos de fusão foram determinados num aparelho Büchi-540 e não estão corrigidos.

2.3.3. Reagentes e solventes

Todos compostos comercialmente disponíveis foram usados como fornecidos pelos fabricantes.

Colest-4-en-3-ona, tricloreto de cério heptahidratado ($\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), acetato de colesterol, iodeto de cobre (CuI), monoperoxifalato de magnésio hexahidratado, MMPP, triflato de bismuto ($\text{Bi}(\text{OTf}_3)$), 3-pentanona, ciclopentanona e ciclohexanona, foram adquiridos à Sigma-Aldrich Co. O hidroperóxido de *t*-butilo, *t*-BHP foi adquirido à Fluka. Tetrahidrofurano, THF, metanol, MeOH, acetona e etanol, EtOH foram obtidos da VWR Co. Acetonitrilo, CH_3CN , diclorometano CH_2Cl_2 , borohidreto de sódio, NaBH_4 , hidróxido de sódio (NaOH), celite[®] 545, sílica gel 60 (cromatografia em coluna) e TLC sílica gel 60 F₂₅₄ foram adquiridos da MERK Co.

Os solventes usados no *work-up* e nas colunas cromatográficas foram de grau analítico, adequados para a investigação em química de acordo com as especificações dos fornecedores e foram obtidos da Fisher Scientific.

O revelador utilizado nas cromatografias em camada fina, TLC's, foi uma mistura de etanol (95%) e ácido sulfúrico (5%), adquiridos à MERK Co.

2.3.4. Preparação dos substratos colest-4-en-3 β -ol (2), acetato de 7 β -hidroxicolest-5-en-3 β -ilo (5) e colest-5-eno-3 β ,7 β -diol (6)

2.3.4.1. Síntese do colest-4-en-3 β -ol (2)

A uma solução de colest-4-en-3-ona (1, 400 mg; 1.040 mmol) e $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (387.5 mg; 1.040 mmol) numa mistura de THF (6 mL) e MeOH (3 mL) foi adicionado lentamente NaBH_4 (78.7 mg; 2.08 mmol). A reacção decorreu a 0°C durante 15 min com agitação e os solventes foram removidos concentrando a solução sob vácuo.

A reacção foi controlada por análise de TLC, utilizando uma mistura de éter do petróleo com acetato de etilo (4:2).

O *work-up* foi efectuado dissolvendo o resíduo sólido com acetato de etilo. A fase orgânica foi lavada sequencialmente com HCl (5%), NaHCO₃ (10% - solução saturada) e H₂O, e seca com MgSO₄ anidro. Depois de seca a fase orgânica foi filtrada, de modo a remover o sal, e evaporada sob vácuo, obtendo-se um composto sólido de cor branca.

O colest-4-en-3 β -ol (**2**, 362 mg, 90%) foi isolado por cromatografia em coluna utilizando como eluente uma mistura de éter do petróleo com acetato de etilo (16:1) e controlada por TLC utilizando a mesma mistura de solventes (Carvalho *et al.*, 2009a).

2.3.4.2. Síntese do acetato de 7 β -hidroxicolest-5-en-3 β -ilo (**5**)

A uma solução de acetato de colesterol (**3**, 1950 mg; 4.549 mmol) e CuI (520 mg; 2.729 mmol) em CH₃CN (30 mL) adicionou-se 1.171 mL de *t*-BHP (70%, 45.49 mmol), a cada 45 min, até perfazer 5 adições. A reacção decorreu à temperatura de refluxo durante 1h em agitação e o solvente foi removido concentrando a mistura reaccional sob vácuo.

A reacção foi controlada por análise de TLC, utilizando uma mistura de éter do petróleo com acetato de etilo (4:2).

O *work-up* foi efectuado dissolvendo o resíduo sólido em éter dietílico e para eliminar o iodeto de cobre foi necessário filtrar numa coluna de celite. A solução filtrada ficou em agitação durante 2h em Na₂SO₃ (10%). Extraiu-se a fase orgânica com éter dietílico e as lavagens foram efectuadas com NaHCO₃ (10%, solução saturada) e H₂O. Depois de secar com Na₂SO₄ anidro, a fase orgânica foi filtrada, de modo a remover o sal, e evaporada sob vácuo, obtendo-se um produto sólido de cor amarela.

O acetato de 7-oxo-colest-5-en-3 β -ilo (**4**, 1027 mg, 51%) foi isolado por cromatografia em coluna usando como eluente uma mistura de éter do petróleo com acetato de etilo (10:1) e controlada por TLC utilizando a mesma mistura de solventes (4:2), obtendo-se um sólido de cor branca (Carvalho *et al.*, 2009a).

A uma solução de acetato de 7-oxo-colest-5-en-3 β -ilo (**4**, 677 mg; 1.529 mmol) em THF (8 mL) e MeOH (4 mL) contendo CeCl₃.7H₂O (575.8 mg; 1.529 mmol) foi adicionado NaBH₄ (144.6 mg; 3.822 mmol). A reacção decorreu durante 15min à temperatura ambiente e os solventes foram removidos evaporando a solução sob vácuo.

A reacção foi controlada por análise de TLC utilizando uma mistura de éter do petróleo com acetato de etilo (4:2).

Para efectuar o *work-up* o produto sólido foi dissolvido em éter dietílico. A fase orgânica foi lavada com HCl (5%), NaHCO₃ (10% - solução saturada) e H₂O, sequencialmente e foi seca com MgSO₄ anidro. Depois de seca a fase orgânica foi filtrada, de modo a remover o sal, e evaporada sob vácuo, obtendo-se um composto sólido de cor branca.

A cromatografia em coluna foi efectuada usando como eluente uma mistura de éter do petróleo com acetato de etilo na proporção 2:1 obtendo-se o composto acetato de 7β-hidroxicolest-5-en-3β-il puro (**5**, 650 mg, 96%). A cromatografia foi controlada por TLC utilizando como eluente uma mistura de éter do petróleo com acetato de etilo na proporção 4:2 (Carvalho *et al.*, 2009a).

2.3.4.3. Síntese do colest-5-eno-3β,7β-diol (**6**)

A uma solução de acetato de 7β-hidroxicolest-5-en-3β-ilo (**5**, 407 mg; 0.915 mmol) em EtOH (12 mL) e CH₂Cl₂ (4 mL) adicionou-se NaOH 15% (1.8 mL; 6.862 mmol). A reacção esteve em agitação durante 2h à temperatura ambiente, foi neutralizada com HCl (5%) e os solventes foram removidos evaporando a solução sob vácuo.

A reacção foi controlada por análise de TLC utilizando uma mistura de éter do petróleo com acetato de etilo na proporção 4:3.

No *work-up* o produto sólido foi dissolvido em acetato de etilo e após extracção a fase orgânica foi lavada apenas com H₂O e foi seca com Na₂SO₄ anidro. Depois de seca a solução foi filtrada de modo a remover o sal e concentrada novamente sob vácuo obtendo-se um produto sólido de cor branca.

O colest-5-eno-3β,7β-diol (**6**, 350 mg, 95%) foi isolado por cromatografia em coluna utilizando como eluente uma mistura de éter do petróleo com acetato de etilo (2:1) e controlada por TLC utilizando a mesma mistura de solventes (Carvalho *et al.*, 2009a).

2.3.5. Síntese de derivados 3,4- e 6,7-acetais directamente a partir dos respectivos álcoois alílicos, Δ^5 -7 β - e Δ^4 -3 β -hidroxi esteróides

2.3.5.1. Síntese de 3,4-acetais tendo o colest-4-en-3 β -ol (**2**) como substrato

Procedimento geral. Síntese do 3 β ,4 β -isopropilidenodioxicolestan-5 α -ol (**7**)

A uma solução de colest-4-en-3 β -ol (**2**, 200 mg; 0.517 mmol) em acetona (5.2 mL) adicionou-se MMPP (384 mg; 0.776 mmol) e a reacção decorreu à temperatura de refluxo durante 30 min. Após o arrefecimento da mistura reaccional à temperatura ambiente, a mesma foi filtrada de modo a remover o MMPP e o filtrado foi lavado com acetona (máx. 5.2 mL). À solução lavada adicionou-se Bi(OTf)₃ (85.3 mg; 0.129 mmol) e deixou-se em agitação durante 30 min.

O decorrer da reacção foi controlado por análise de TLC utilizando uma mistura de éter do petróleo com acetato de etilo (4:1).

Para efectuar o *work-up* a reacção foi parada por evaporação sob vácuo e o produto sólido resultante foi dissolvido em acetato de etilo. A fase orgânica foi lavada sequencialmente com NaHCO₃ e H₂O e foi seca com Na₂SO₄ anidro. Depois de seca a solução foi filtrada e evaporada sob vácuo, obtendo-se um composto sólido de cor branca. (Carvalho, 2010).

O 3 β ,4 β -isopropilidenodioxicolestan-5 α -ol puro (**7**, 60%) foi obtido por cromatografia em coluna utilizando como eluente uma mistura de éter do petróleo como acetato de etilo e trietilamina (6:0.5:0.1) e controlada por TLC utilizando como eluente uma mistura de éter do petróleo acetato de etilo na (4:1).

A análise estrutural efectuada ao composto **7** estava concordante com a análise descrita na literatura (Carvalho, 2010).

P. f. 139.3 - 141.4 °C.

RMN ¹H (400 MHz, *CDCl*₃) δ ppm 0.66 (3H, s, 18-CH₃), 0.85 e 0.87 (cada 3H, 2d, *J*= 6.7 Hz, 26-CH₃ e 27-CH₃), 0.89 (3H, d, *J*=6.4 Hz, 21-CH₃), 1.16 (3H, s, 19-CH₃), 1.31, (3H, s, CH₃), 1.52 (3H, s, CH₃), 3.79 (1H, d, *J*=5.3 Hz, 4α-H), 4.29 (1H, m, 3α-H).

3β,4β-Isopentilidenodioxicolestano-5α-ol (8)

De acordo com o procedimento anterior mas a partir de uma solução de colest-4-en-3β-ol (**2**, 200 mg; 0.517 mmol) em 3-pentanona (5.47 mL) e a reacção decorreu durante 2h após a adição do Bi(OTf)₃. Após secagem e isolamento por cromatografia, obteve-se um composto sólido de cor branca (**8**, 82.4%).

O 3β,4β-Isopentilidenodioxicolestano-5α-ol (**8**) foi purificado por cromatografia em coluna utilizando como eluente uma mistura de éter do petróleo, acetato de etilo e trietilamina (10:0.5:0.1).

P. f.: 170.6 - 174.9 °C.

IV (filme): 2950, 1455, 1382, 1216, 1049, 868, 758, 668 cm⁻¹.

RMN ¹H (400 MHz, *CDCl*₃) δ ppm: 0.66 (3H, s, 18-CH₃), 0.85 (3H, t, *J*=7.5, CH₃), 0.85 e 0.88 (cada 3H, 2d, *J*= 6.4 Hz, 26-CH₃ e 27-CH₃), 0.90 (3H, d, *J*=6.8 Hz, 21-CH₃), 0.95 (3H, t, *J*=7.5), 1.16 (3H, s, 19-CH₃), 1.76 (2H, q, *J*=7.5, CH₂), 3.79 (1H, d, *J*=5.5 Hz, 4α-H), 4.30 (1H, m, 3α-H).

RMN ¹³C (100 MHz, *CDCl*₃) δ ppm: 8.8 (CH₃), 8.9 (CH₃), 12.3 (CH₃), 15.5 (CH₃), 18.8 (CH₃), 20.9 (CH₂), 22.7 (CH₃), 23.0 (CH₃), 24.0 (CH₂), 24.2 (CH₂), 25.4 (CH₂), 26.7 (CH₂), 28.2 (CH), 28.4 (CH₂), 29.3 (CH₂), 30.9 (CH₂), 31.7 (CH₂), 34.8 (CH), 36.0 (CH), 36.3 (CH₂), 38.4 (C), 39.6 (CH₂), 40.1 (CH₂), 42.9 (C), 46.9 (CH), 56.3 (CH), 56.4 (CH), 73.5 (CH), 74.3 (C), 82.1 (CH), 113.3 (C).

EM (ID-IES) m/z (%): 487 (4.9) [M - H]⁻, 478.9 (4.4), 463.2 (1.8), 449.1 (4.0), 447.4 (2.7), 445.3 (2.0), 435.4 (4.0), 434.4 (26.1), 433.4 (100), 431.3 (2.0), 419.4 (2.3), 403.4 (2.1).

2.3.5.2. Síntese de 6,7-acetais começando com o acetato de 7 β -hidroxicolest-5-en-3 β -ilo (5)

Acetato de 5 α -hidroxi-6 β ,7 β -isopropilidenodioxicolestano-3 β -ilo (9)

O procedimento efectuado para esta reacção foi idêntico ao procedimento geral, descrito para a síntese de 3,4- e 6,7-acetais directamente a partir dos respectivos álcoois alílicos, mas utilizando como substrato o acetato de 7 β -hidroxicolest-5-en-3 β -ilo (**5**, 224 mg; 0.517 mmol). Após secagem e isolamento por cromatografia, obteve-se um composto sólido de cor branca (**9**, 50%).

Tal como o acetal **7**, o acetato de 5 α -hidroxi-6 β ,7 β -isopropilidenodioxicolestan-3 β -ilo (**9**) foi sintetizado anteriormente, e a análise estrutural efectuada nesta nova síntese estava concordante com a descrita na literatura (Carvalho, 2010).

P. f.: 170.1 - 173.4 °C.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 0.66 (3H, s, 18-CH₃), 0.85 e 0.87 (cada 3H, 2d, J = 6.7 Hz, 26-CH₃ e 27-CH₃), 0.90 (3H, d, J =6.4 Hz, 21-CH₃), 1.18 (3H, s, 19-CH₃), 1.28 (3H, s, CH₃), 1.46 (3H, s, CH₃), 2.01 (3H, s, 3 β -CH₃COO), 2.11 (1H, J = 13.1, 11.9 HZ), 3.73 (1H, d, J =5.2 Hz, 6 α -H), 3.92 (1H, dd, J =8.5, 5.2 Hz, 7 α -H), 5.14 (1H, m, 3 α -H).

Acetato de 5 α -hidroxi-6 β ,7 β -isopentilidenodioxicolestan-3 β -ilo (10)

De acordo com o procedimento geral, para a síntese de 3,4- e 6,7-acetais directamente a partir dos respectivos álcoois alílicos, mas foi preparado com uma solução de acetato de 7 β -hidroxicolest-5-en-3 β -ilo (**5**, 224 mg; 0.517 mmol) em 3-pentanona (5.47 mL) e a reacção esteve em agitação durante 2h após a adição do Bi(OTf₃). Após evaporar a fase orgânica à secura obtém-se um composto sólido de cor branca (**10**, 75.8%).

O 5 α -hidroxi-6 β ,7 β -isopentilidenodioxicolestan-3 β -ilo (**10**) puro foi obtido por cromatografia em coluna utilizando como eluente uma mistura de éter do petróleo, acetato de etilo e trietilamina (10:0.5:0.1).

P. f.: 118.5 - 121.8 °C.

IV (filme): 3436, 2948, 1714, 1467, 1379, 1266, 1216, 1173, 1080, 1031, 923, 759, 667 cm^{-1} .

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 0.65 (3H, s, 18- CH_3), 0.85 e 0.87 (cada 3H, 2d, $J=6.7$ Hz, 26- CH_3 e 27- CH_3), 0.83 (3H, t, $J=7.5$ Hz, CH_3), 0.90 (3H, d, $J=6.6$ Hz, 21- CH_3), 0.93 (3H, t, $J=7.5$ Hz, CH_3), 1.16 (3H, s, 19- CH_3), 2.03 (3H, s, 3 β - CH_3COO), 3.73 (1H, d, $J=5.5$ Hz, 6 α -H), 3.91 (1H, dd, $J=8.5, 5.5$ Hz, 7 α -H), 5.14 (1H, m, 3 α -H).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 8.8 (CH_3), 8.9 (CH_3), 12.1 (CH_3), 15.3 (CH_3), 18.9 (CH_3), 21.2 (CH_2), 21.6 (CH_3), 22.7 (CH_3), 23.0 (CH_3), 24.2 (CH_2), 25.7 (CH_2), 26.7 (CH_2), 28.2 (CH), 28.6 (CH_2), 29.9 (CH_2), 30.8 (CH_2), 31.2 (CH_2), 36.0 (CH), 36.3 (CH_2), 37.4 (CH_2), 37.9 (C), 39.4 (CH), 39.6 (CH_2), 39.8 (CH_2), 41.7 (CH), 43.0 (C), 55.8 (CH), 56.0 (CH), 70.5 (CH), 75.4 (C), 79.0 (CH), 82.0 (CH), 113.1 (C), 171.1 (C).

EM (ID-IES) m/z (%): 545.6 (100) $[\text{M} - \text{H}]^-$, 544.9 (17.0), 543.9 (11.9), 527.1 (6.9), 519.7 (6.3), 506.5 (7.5), 493.6 (5.9), 491.6 (12.4), 449.5 (9.0), 435.2 (8.3), 433.6 (20.0), 404.9 (6.1).

2.3.5.3. Síntese de 6,7-acetais a partir do colest-5-eno-3 β ,7 β -diol (**6**)

6 β ,7 β -Isopropilidenodioxicolestano-3 β ,5 α -diol (**11**)

O procedimento seguido nesta reacção foi idêntico ao procedimento geral, descrito para a síntese de 3,4- e 6,7-acetais directamente a partir dos respectivos álcoois alílicos, mas utilizando como substrato o colest-5-eno-3 β ,7 β -diol (**6**, 208 mg; 0.517 mmol). Após evaporação sob vácuo obtém-se um composto sólido de cor branca (**11**, 42%).

Tal como os acetais **7** e **9**, o 6 β ,7 β -isopropilidenodioxicolestano-3 β ,5 α -diol (**11**) foi sintetizado anteriormente pelo nosso grupo e a análise estrutural efectuada estava concordante com a descrita na altura, apresentada abaixo (Carvalho, 2010).

P.f.: 141.7 - 144.5 °C.

RMN ¹H (400 MHz, *CDCl*₃) δ ppm 0.66 (3H, s, 18-CH₃), 0.85 e 0.87 (cada 3H, 2d, *J*= 6.6 Hz, 26-CH₃ e 27-CH₃), 0.90 (3H, d, *J*=6.6 Hz, 21-CH₃), 1.17 (3H, s, 19-CH₃), 1.30 (3H, s, CH₃), 1.47 (3H, s, CH₃), 3.74 (1H, d, *J*=5.2 Hz, 6α-H), 3.90 (1H, dd, *J*=8.7, 5.2 Hz, 7α-H), 4.07 (1H, m, 3α-H).

6β,7β-Isopentilidenodioxicolestano-3β,5α-diol (12)

De acordo com o procedimento geral para a síntese de acetais directamente a partir dos respectivos álcoois alílicos, mas preparando uma solução de colest-5-eno-3β,7β-diol (**6**, 208 mg; 0.517 mmol) em 3-pentanona (5.47 mL). A reacção decorreu durante 1h e 30min após a adição do Bi(OTf)₃ e depois de evaporar a fase orgânica à secura obteve-se um composto sólido de cor branca (**12**, 54.3%).

O 6β,7β-Isopentilidenodioxicolestano-3β,5α-diol (**12**) foi purificado através de cromatografia em coluna utilizando como eluente uma mistura de éter do petróleo e acetato de etilo (4:1).

P. f.: 157.9 - 161.9 °C.

IV (filme): 3404, 2950, 1709, 1468, 1381, 1173, 1080, 1051, 922, 780 cm⁻¹.

RMN ¹H (400 MHz, *CDCl*₃) δ ppm: 0.66 (3H, s, 18-CH₃), 0.85 e 0.87 (cada 3H, 2d, *J*= 6.7 Hz, 26-CH₃ e 27-CH₃), 0.83 (3H, t, *J*=7.5 Hz, CH₃), 0.90 (3H, d, *J*=6.4 Hz, 21-CH₃), 0.93 (3H, t, *J*=7.5 Hz, CH₃), 1.16 (3H, s, 19-CH₃), 3.73 (1H, d, *J*=5.4 Hz, 6α-H), 3.89 (1H, dd, *J*=8.6, 5.4 Hz, 7α-H), 4.06 (1H, m, 3α-H).

RMN ¹³C (100 MHz, *CDCl*₃) δ ppm: 8.8 (CH₂), 8.9 (CH₂), 12.1 (CH₂), 15.5 (CH₂), 18.9 (CH₂), 21.3, 22.7(CH₂), 23.0 (CH₂), 24.1, 25.7, 28.1 (CH₂), 28.6, 30.8, 31.0, 31.5, 36.0 (CH₂), 36.4, 37.9 (CH₂), 39.5, 39.6, 39.9, 41.5 (CH₂), 42.0 (CH₂), 43.1, 55.9, 55.9, 67.1, 75.9, 79.0 (CH), 82.0 (CH), 113.1 (C).

EM (ID-IES) *m/z* (%): 503.37 (100) [M - H]⁻, 499.8 (1.8), 498.7 (2.2), 497.6 (5.1), 493.2 (5.2), 463.3 (2.5), 461.6 (3.3), 435.3 (2.1), 433.5 (1.8), 419.8 (1.8), 418.6 (11.1), 417.5 (39.8).

2.3.6 Epoxidação de Olefinas

2.3.6.1. Procedimento geral para a síntese dos epóxidos a partir dos correspondentes álcoois alílicos. Síntese do 4 ξ ,5 ξ -epoxicolestan-3 β -ol (13)

A uma solução de cholest-4-en-3 β -ol (**2**, 77.33 mg; 0.20 mmol) em CH₃CN (5 mL) foi adicionado MMPP (108.8 mg; 0.22 mmol). A reacção decorreu durante 10 min em agitação à temperatura de refluxo e o esgotamento do substrato foi controlado por TLC utilizando como eluente uma mistura de éter do petróleo e acetato de etilo (4:2). Após o arrefecimento da mistura reaccional, à temperatura ambiente, a mesma foi filtrada e o solvente foi removido por evaporação sob vácuo.

O *work-up* foi efectuado extraíndo o resíduo em éter dietílico e a fase orgânica foi lavada sequencialmente com Na₂SO₃ (10%), NaHCO₃ (10% - solução saturada) e H₂O. O excesso de H₂O foi removido secando a fase orgânica com Na₂SO₄ anidro e posteriormente filtrada de modo a remover o sal (Carvalho *et al.*, 2009b). Após concentrar sob vácuo obtém-se um produto oleoso que revela uma mistura dos dois isómeros, epóxidos α e β .

2.3.6.2. Síntese do acetato de 5 ξ ,6 ξ -epoxi-7 β -hidroxicolestan-3 β -ilo (14)

O acetato de 5 ξ ,6 ξ -epoxi-7 β -hidroxicolestan-3 β -ilo (**14**) foi sintetizado de acordo com o procedimento geral para a síntese de epóxidos (Secção 2.3.6.1.) mas tendo como substrato o acetato de 7 β -hidroxicolest-5-en-3 β -ilo (**5**, 88.94 mg; 0.20mmol).

2.3.6.3. Síntese do 5 ξ ,6 ξ -epoxicolestano-3 β ,7 β -diol (15)

O 5 ξ ,6 ξ -epoxicolestano-3 β ,7 β -diol (**15**) foi sintetizado de acordo com o procedimento geral para a síntese de epóxidos (Secção 2.3.6.1.) mas tendo como substrato o colest-5-eno-3 β ,7 β -diol (**6**, 80.53 mg; 0.20mmol).

2.3.7. Síntese de 3,4- e 6,7-acetais a partir dos respectivos epóxidos, 4 ξ ,5 ξ -epoxi-3 β -hidroxi- e 5 ξ ,6 ξ -epoxi-7 β -hidroxi esteróides

2.3.7.1. Síntese de 3,4-acetais a partir do 4 ξ ,5 ξ -epoxicolestan-3 β -ol (**13**)

3 β ,4 β -Ciclopentilidenodioxicolestan-5 α -ol (**16**)

A uma solução de 4,5-epoxicolestan-3 β -ol (**13**, 208 mg; 0,517 mmol) em ciclopentanona (4.58 mL) adicionou-se Bi(OTf)₃ (85.3 mg; 0.129 mmol). A reacção decorreu durante 45 min à temperatura ambiente e foi parada adicionando H₂O.

O esgotamento do substrato foi controlado por TLC utilizando como eluente uma mistura de éter de petróleo e acetato de etilo na proporção 4:1.

O *work-up* foi realizado extraíndo o produto com éter dietílico, a fase orgânica foi lavada com solução saturada de NaHCO₃ e H₂O e foi seca com Na₂SO₄ anidro. Depois de seca a solução foi filtrada, de modo a remover o sal, e evaporada sob vácuo, obtendo-se um composto sólido de cor branca (**16**, 75.8%).

O 3 β ,4 β -ciclopentilidenodioxicolestan-5 α -ol (**16**) puro foi obtido por cromatografia em coluna utilizando como eluente uma mistura de éter do petróleo, acetato de etilo e trietilamina (10:0.5:0.1) e controlada por TLC utilizando uma mistura de éter do petróleo e acetato de etilo (4:1), como eluente.

P. f.: 152.9 - 155.8 °C.

IV (filme): 2952, 2360, 1215, 1103, 758, 668 cm⁻¹.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.66 (3H, s, 18-CH₃), 0.85 e 0.87 (cada 3H, 2d, *J*= 6.6 Hz, 26-CH₃ e 27-CH₃), 0.90 (3H, d, *J*=6.6 Hz, 21-CH₃), 1.15 (3H, s, 19-CH₃), 3.65 (1H, d, *J*=5.5 Hz, 4 α -H), 4.26 (1H, m, 3 α -H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 12.3 (CH₃), 15.6 (CH₃), 18.8 (CH₃), 20.8 (CH₂), 22.7 (CH₃), 23.0 (CH₃), 23.7 (CH₂), 23.8 (CH₂), 24.0 (CH₂), 24.2 (CH₂), 25.5 (CH₂), 25.8 (CH₂), 28.2 (CH), 28.4 (CH₂), 29.3 (CH₂), 31.8 (CH₂), 34.8 (CH), 36.0 (CH), 36.3 (CH₂), 37.8 (CH₂), 38.0 (CH₂), 38.6

(C), 39.7 (CH₂), 40.1 (CH₂), 42.9 (C), 47.0 (CH), 56.4 (2CH), 73.5 (CH), 74.2 (C), 82.7 (CH), 119.1 (C).

EM (ID-IES) m/z (%): 485.3 (32.7) [M - H]⁻, 479.2 (5.9), 477.2 (4.6), 450.3 (3.4), 449.2 (6.4), 447.4 (4.1), 445.2 (6.9), 435.5 (3.2), 434.6 (23.8), 433.6 (100), 401.5 (4.8), 329.2 (4.3), 96.9 (5.0).

3β,4β-Ciclohexilidenodioxicolestan-5α-ol (17)

De acordo com o procedimento anterior para a síntese de 3,4- e 6,7-acetais a partir dos respectivos epóxidos mas começando com uma solução de 4,5-epoxicolestan-3β-ol (**13**, 208 mg; 0,517 mmol) em ciclohexanona (5,35 mL). Após evaporação sob vácuo obtém-se um composto sólido de cor branca (**17**, 97.32% rendimento).

O 3β,4β-ciclohexilidenodioxicolestan-5α-ol (**17**) puro foi obtido por cromatografia em coluna utilizando como eluente uma mistura de éter do petróleo, acetato de etilo e trietilamina (10:0.5:0.1) e controlada por TLC utilizando uma mistura de 4:1, éter do petróleo e acetato de etilo, como eluente.

P. f.: 152.9 - 156.3 °C.

IV (filme): 3479, 2936, 2866, 1448, 1365, 1112, 932, 757 cm⁻¹.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.66 (3H, s, 18-CH₃), 0.85 e 0.87 (cada 3H, 2d, J= 6.6 Hz, 26-CH₃ e 27-CH₃), 0.90 (3H, d, J=6.7 Hz, 21-CH₃), 1.17 (3H, s, 19-CH₃), 3.77 (1H, d, J=5.4 Hz, 4α-H), 4.29 (1H, m, 3α-H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 12.34 (CH₃), 15.5 (CH₃), 18.8 (CH₃), 20.8 (CH₂), 22.7 (CH₃), 23.0 (CH₃), 23.9 (CH₂), 24.0 (CH₂), 24.2 (CH₂), 24.3 (CH₂), 25.3 (CH₂), 25.5 (CH₂), 26.9 (CH₂), 28.2 (CH), 28.4 (CH₂), 29.4 (CH₂), 31.7 (CH₂), 33.7 (CH), 33.8 (C), 34.8 (CH), 35.5 (CH₂), 36.0 (CH), 36.3 (CH₂), 38.5 (CH₂), 39.7 (CH₂), 40.1 (CH₂), 42.9 (C), 46.9 (CH), 56.3 (CH), 73.6 (CH), 74.3 (CH), 77.4 (C), 81.7 (CH), 110.0 (C).

EM (ID-IES) m/z (%): 499.7 (17.0) [M - H]⁻, 498.7 (36.8), 497.7 (100), 479.3 (2.2), 463.4 (1.5), 449.5 (1.7), 437.2 (1.8), 435.8 (2.9), 434.7 (9.8), 433.7 (29.4), 431.4 (2.1), 429.5 (2.0).

2.3.7.2. Síntese de 6,7-acetais partindo do acetato de 5 ξ ,6 ξ -epoxi-7 β -hidroxicolestan-3 β -ilo (**14**)

Acetato de 5 α -hidroxi-6 β ,7 β -ciclopentilidenodioxicolestan-3 β -ilo (**18**)

O procedimento seguido nesta reacção foi idêntico ao procedimento geral para a síntese de 3,4- e 6,7-acetais a partir dos respectivos epóxidos mas utilizando como substrato o acetato de acetato de 5,6-epoxi-7 β -hidroxicolestan-3 β -ilo (**14**, 238 mg; 0.517 mmol). A mistura reaccional esteve em agitação durante 2h. Após evaporar a fase orgânica à secura obtém-se um composto sólido de cor branca (**18**, 70.6%).

O 5 α -hidroxi-6 β ,7 β -ciclopentilidenodioxicolestan-3 β -ilo (**18**) foi purificado por cromatografia em coluna utilizando como eluente uma mistura de éter do petróleo, acetato de etilo e trietilamina na proporção 10:0.5:0.1 e controlada por TLC utilizando como eluente uma mistura de éter do petróleo e acetato de etilo (4:1).

P. f.: 171.6 - 174.9 °C.

IV (filme): 3437, 2951, 2870, 1714, 1469, 1364, 1330, 1264, 1103, 1031, 973, 759 cm⁻¹.

RMN ¹H (400 MHz, CDCL₃) δ ppm: 0,66 (3H, s, 18-CH₃), 0.85 e 0.87 (cada 3H, 2d, J = 6.7 Hz, 26-CH₃ e 27-CH₃), 0.90 (3H, d, J =6.4 Hz, 21-CH₃), 1.16 (3H, s, 19-CH₃), 2.02 (3H, s, 3 β -CH₃COO), 3.57 (1H, d, J =5.2 Hz, 6 α -H), 3.88 (1H, dd, J =8.3, 5.0 Hz, 7 α -H), 5.14 (1H, m, 3 α -H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCL₃) δ ppm: 12.0 (CH₃), 15.6 (CH₃), 18.9 (CH₃), 21.2 (CH₂), 21.6 (CH₃), 22.7 (CH₃), 23.0 (CH₃), 23.6 (CH₂), 23.7 (CH₂), 24.1 (CH₂), 25.9 (CH₂), 26.7 (CH₂), 28.2 (CH), 28.6 (CH₂), 29.9 (CH₂), 31.3 (CH₂), 36.0 (CH), 36.4 (CH₂), 37.7 (CH₂), 38.0 (CH₂), 38.1 (C), 38.4 (CH), 39.6 (CH₂), 39.8 (CH₂) 41.8 (CH), 43.0 (C), 55.6 (CH), 55.9 (CH), 70.4 (CH), 75.4 (C), 79.1 (CH), 82.5 (CH), 119.0 (C), 171.0 (C).

EM (ID-IES) m/z (%): 543.6 (100) [M - H]⁻, 489.6 (1.9), 464.0 (1.9), 434.7 (3.6), 433.7 (11.3), 431.58 (1.8), 429.55 (1.8), 339.66 (2.2), 301.2 (2.2), 255.5 (2.2), 235.3 (1.8), 97.0 (1.9).

Acetato de 5 α -hidroxi-6 β ,7 β -ciclohexilidenodioxicolestano-3 β -ilo (19)

De acordo com o procedimento geral para a síntese de 3,4- e 6,7-acetais a partir dos respectivos epóxidos mas começando com uma solução de acetato de 5,6-epoxi-7 β -hidroxicolestano-3 β -ilo (**14**, 208 mg; 0,517 mmol) em ciclohexanona (5,35 mL) e a reação permaneceu à temperatura ambiente durante 2h. Após evaporação sob vácuo obtém-se um composto sólido de cor branca (**19**, 56.8%).

O acetato de 5 α -hidroxi-6 β ,7 β -ciclohexilidenodioxicolestano-3 β -ilo (**19**) puro foi obtido por cromatografia em coluna utilizando como eluente uma mistura de éter do petróleo, acetato de etilo e trietilamina (10:0.5:0.1) e controlada por TLC utilizando uma mistura de 4:1 éter do petróleo e acetato de etilo, como eluente.

P. f.: 175.3 - 178.5 °C.

IV (filme): 3411, 2937, 1712, 1364, 1216, 1031, 759, 667 cm⁻¹.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.65 (3H, s, 18-CH₃), 0.85 e 0.87 (cada 3H, 2d, J = 6.7 Hz, 26-CH₃ e 27-CH₃), 0.90 (3H, d, J =6.4 Hz, 21-CH₃), 1.18 (3H, s, 19-CH₃), 2.04 (3H, s, 3 β -CH₃COO), 3.70 (1H, d, J =5.2 Hz, 6 α -H), 3.89 (1H, dd, J =8.5, 5.1 Hz, 7 α -H), 5.14 (1H, m, 3 α -H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 12.1 (CH₃), 15.4 (CH₃), 18.9 (CH₃), 21.2 (CH₂), 21.6 (CH₃), 22.7 (CH₃), 23.0 (CH₃), 24.0 (CH₂), 24.1 (CH₂), 24.2 (CH₂), 25.3 (CH₂), 25.9 (CH₂), 26.7 (CH₂), 28.2 (CH), 28.7 (CH₂), 31.3 (CH₂), 35.8 (CH₂), 36.1 (CH), 36.4 (CH₂), 37.6 (CH₂), 38.1 (C), 38.4 (CH₂), 39.5 (CH), 39.6 (CH₂), 39.8 (CH₂), 41.7 (CH), 43.0 (C), 55.6 (CH), 55.9 (CH), 70.5 (CH), 75.4 (C), 79.1 (CH), 81.7 (CH), 109.8 (C), 171.0 (C).

EM (ID-IES) m/z (%): 558.3 (100) [M - H]⁻, 557.4 (91.4), 548.2 (3.1), 547.3 (6.4), 546.4 (13.3), 545.4 (12.8), 544.3 (6.8), 543.6 (4.4), 434.7 (3.7), 433.8 (8.3), 225.4 (3.9), 95.0 (3.8).

2.3.7.3. Síntese de 6,7-acetais partindo 5 ξ ,6 ξ -epoxicolestano-3 β ,7 β -diol (15)

6 β ,7 β -Ciclopentilidenodioxicolestano-3 β ,5 α -diol (20)

O procedimento seguido nesta reacção foi idêntico ao procedimento geral para a síntese de 3,4- e 6,7-acetais a partir dos respectivos epóxidos mas utilizando como substrato o 5,6-epoxicolestano-3 β ,7 β -diol (**15**, 216 mg; 0.517 mmol) e a mistura reaccional esteve em agitação durante 1.30h.

O esgotamento do substrato foi controlado por TLC, utilizando uma mistura de éter do petróleo e acetato de etilo (2:2). Após evaporação exaustiva obtém-se um composto sólido de cor branca (**20**, 77.1%).

O 6 β ,7 β -ciclopentilidenodioxicolestano-3 β ,5 α -diol (**20**) puro foi obtido por cromatografia em coluna utilizando como eluente uma mistura de éter de petróleo e acetato de etilo na proporção 1:2 e foi controlada por TLC utilizando como eluente uma mistura de éter do petróleo em acetato de etilo (1:1).

P. f.: 183.6 - 186.6 °C.

IV (filme): 3401, 2951, 1468, 1382, 1330, 1107, 1040, 760 cm⁻¹.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.66 (3H, s, 18-CH₃), 0.85 e 0.87 (cada 3H, 2d, J = 6.6 Hz, 26-CH₃ e 27-CH₃), 0.90 (3H, d, J =6.4 Hz, 21-CH₃), 1.16 (3H, s, 19-CH₃), 3.59 (1H, d, J =5.1 Hz, 6 α -H), 3.87 (1H, dd, J =8.7, 5.1 Hz, 7 α -H), 4.07 (1H, m, 3 α -H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 12.1, 15.8, 18.9, 21.3 (CH₂), 22.7, 23.0, 23.6 (CH₂), 23.7 (CH₂), 24.1 (CH₂), 25.9 (CH₂), 28.2, 28.6 (CH₂), 31.0 (CH₂), 31.7 (CH₂), 36.0, 36.4 (CH₂), 38.0 (CH₂), 38.0 (CH₂), 38.1, 38.4 (CH₂), 39.7 (CH₂), 39.9 (CH₂), 41.6, 42.1, 43.1, 55.7, 55.9, 67.1, 75.8, 79.1 (CH), 82.5 (CH), 119.0 (C).

EM (ID-IES) m/z (%): 501.5 (100) [M - H]⁻, 499.6 (1.2), 495.6 (1.5), 493.5 (1.8), 463.3 (2.3), 461.3 (2.5), 435.6 (2.1), 433.4 (1.2), 420.6 (1.3), 419.6 (1.8), 418.6 (6.9), 417.6 (22.1).

6 β ,7 β -ciclohexilidenodioxicolestano-3 β ,5 α -diol (21)

Método 1: De acordo com o procedimento geral para a síntese de 3,4- e 6,7-acetais a partir dos respectivos epóxidos mas começando com uma solução de 5,6-epoxicolestano-3 β ,7 β -diol (**15**, 216 mg; 0,517 mmol) em ciclohexanona (5,35 mL). A reacção decorreu durante 1.5h e foi controlada utilizando uma mistura de éter do petróleo e acetato de etilo na proporção 4:2. Após efectuado o *work-up* a secagem da solução não foi conseguida, quer por evaporação sob vácuo, quer após um longo período de tempo numa estufa de vácuo.

Método 2: A uma solução de 5 α -hidroxi-6 β ,7 β -ciclohexilidenodioxicolestano-3 β -ilo (**19**) puro (50.294 mg; 0,09 mmol) em MeOH (8.09 mL) e THF (6 mL) adicionou-se carbonato de sódio (19 mg; 0,18 mmol). A mistura reaccional esteve em agitação durante 4 dias à temperatura ambiente e os solventes foram removidos por evaporação sob vácuo.

O decorrer da reacção foi controlado por análise de TLC utilizando uma mistura de éter do petróleo com acetato de etilo na proporção 2:2.

O *work-up* foi realizado extraíndo o produto com diclorometano e a fase orgânica foi lavada H₂O e foi seca com Na₂SO₄ anidro. Depois de seca a solução foi filtrada, de modo a remover o sal, e evaporada sob vácuo, obtendo-se um composto sólido de cor branca (**21**, 74.4%).

P. f.: 190.6 - 193.5 °C.

IV (filme): 2937, 1216, 758, 670 cm⁻¹.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 0.65 (3H, s, 18-CH₃), 0.85 e 0.87 (cada 3H, 2d, *J*= 6.3 Hz, 26-CH₃ e 27-CH₃), 0.90 (3H, d, *J*=6.5 Hz, 21-CH₃), 1.17 (3H, s, 19-CH₃), 3.70 (1H, d, *J*=5.0 Hz, 6 α -H), 3.88 (1H, dd, *J*=8.4, 5.1 Hz, 7 α -H), 4.08 (1H, m, 3 α -H).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 12.01, 15.6, 18.9, 21.3 (CH₂), 22.7, 23.0, 24.0 (CH₂), 24.1 (CH₂), 24.2 (CH₂), 25.3 (CH₂), 25.8 (CH₂), 28.2, 28.7 (CH₂), 31.0, 31.6 (CH₂), 35.8 (CH₂), 36.0 (CH₂), 36.4, 38.1 (CH₂), 38.4 (CH₂), 39.6, 39.6 (CH₂), 39.9 (CH₂), 41.5 (CH₂), 42.0, 43.0, 55.8, 55.9, 67.1, 75.8, 79.1 (CH), 81.7 (CH), 109.8 (C).

EM (ID-IES) m/z (%): 501.5 (100) [M - H]⁻, 461.4 (6.19), 450.8 (44.2), 449.3 (80.3), 436.7 (16.0), 435.4 (40.0), 434.0 (5.3), 433.7 (3.4), 421.5 (4.5), 420.6 (7.3), 419.1 (26.5), 417.8 (77.9).

Capítulo III

Avaliação citotóxica de oxiesteróis

3. Avaliação citotóxica de oxisteróis

3.1. Introdução

A acetalização é vulgarmente utilizada em síntese orgânica como um método de protecção de grupos carbonilo, no entanto, para além disso tem sido bastante utilizada na indústria farmacêutica. Várias investigações reportam a introdução de acetais como um método para aumentar a actividade biológica dos fármacos. Como tal, a acetalização tem sido utilizada para melhorar as propriedades anti-inflamatórias de glicocorticóides como é o caso da fluocinolona (Pearson *et al.*, 2006). A introdução de grupos acetal em diferentes moléculas tem demonstrado quer efeitos benéficos quer nocivos no que respeita à actividade biológica, incluindo a citotoxicidade (Tsukida *et al.*, 2004; Yuan *et al.*, 2009).

A segunda parte deste trabalho baseou-se em avaliar a actividade biológica das novas séries de derivados acetal dos oxisteróis, previamente sintetizados. Após caracterização dos compostos em estudo, e tendo por base investigações realizadas no nosso grupo, onde se verificou que alterações estruturais no anel B do esteróide demonstram maior citotoxicidade, optamos por avaliar inicialmente a série de novos oxisteróis que derivam do colest-5-eno-3 β ,7 β -diol (**6**). No entanto, revelou-se importante estabelecer uma relação estrutura-actividade dos novos oxisteróis sintetizados. Neste sentido, foram efectuados ensaios de citotoxicidade numa linha celular de adenocarcinoma do pulmão de origem humana (A549) com três compostos da série colest-5-eno-3 β ,7 β -diol e três compostos da série colest-4-en-3 β -ol.

Este trabalho experimental de índole biológica foi realizado no Centro de Neurociências e Biologia Celular de Coimbra no Grupo de Vectores e Terapia Génica, em colaboração com o Professor Doutor João Nuno Moreira e teve a duração de cerca de 3 meses.

3.2. Resultados e discussão

A linha celular em estudo foi previamente caracterizada no nosso laboratório, por este motivo não foi necessário realizar a curva de crescimento das células A549, bem como determinar o seu *doubling time*. No entanto, foi necessária uma análise do crescimento das células para se obter o número de células ideal para aplicar nas placas no início da experiência, de forma a garantir que estas só atinjam o estado de confluência no final do tempo de ensaio. Através do *doubling time* estimou-se a duração do ensaio de citotoxicidade, correspondente a quatro *doubling times* e determinou-se o tempo de incubação com os novos compostos, garantindo um ensaio estável e fiável.

3.2.1. Efeito citotóxico do DMSO na linha celular A549

Na preparação das concentrações a utilizar, foi necessário ter em atenção a percentagem de DMSO que é aplicada às células, por poço. Como tal foi traçada uma curva de dose-resposta para o dimetilsulfóxido, DMSO, sozinho, que traduz a citotoxicidade deste composto na linha celular A549 (**Fig 3.1**). As células foram incubadas com 0.25%, 0.5%, 1% e 2% de DMSO durante 96 horas, verificando-se que até valores de 1% de DMSO a quantidade deste solvente presente no meio não afecta significativamente a viabilidade celular.

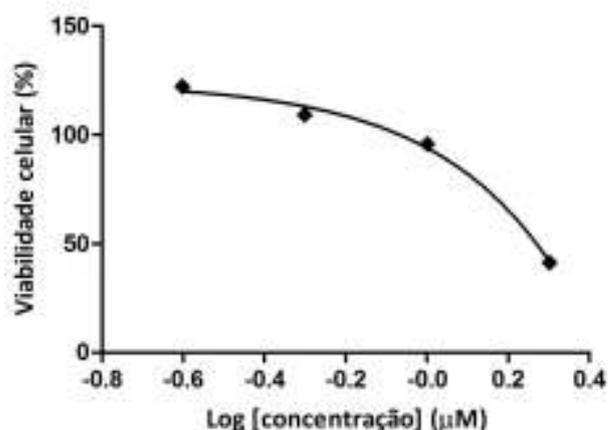


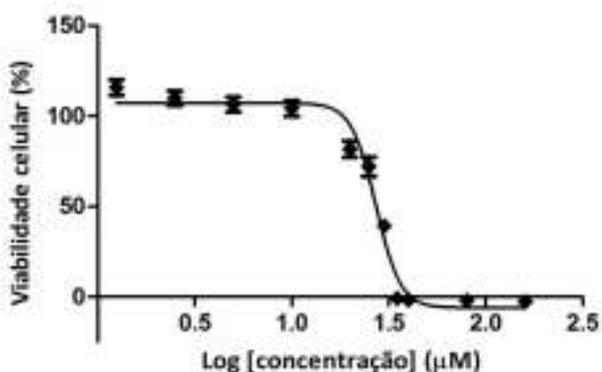
Figura 3.1. Curva de dose-resposta do DMSO isolado.

3.2.2. Efeito citotóxico de seis novos derivados acetal de oxisteróis em células humanas de cancro do pulmão

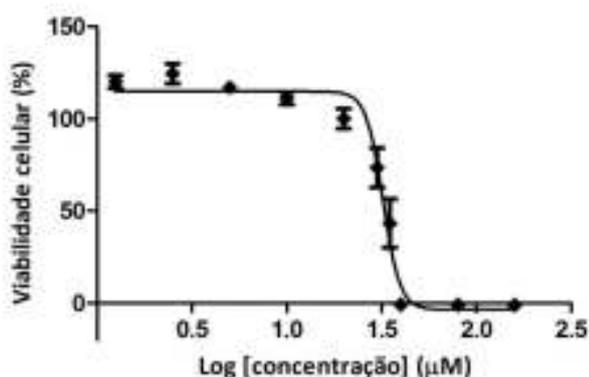
Os oxisteróis, como já foi referido anteriormente, têm ganho bastante interesse nos últimos anos devido à sua relevante actividade biológica. Principalmente porque têm demonstrado possuir propriedades anti-cancerígenas (Vejud *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2011). Com o objectivo de esclarecer se também os novos oxisteróis, sintetizados nesta dissertação, fazem parte desse conjunto de moléculas biologicamente activas, sujeitámos as células A549 à presença desses compostos.

Foram avaliadas duas novas séries de oxisteróis, uma com alterações estruturais no anel A e outra com oxigenação no anel A e alterações estruturais no anel B do núcleo esteróide. As curvas de dose-resposta apresentadas na **Figura 3.2.** para cada composto, são o resultado da aplicação de diferentes concentrações de fármaco às células A549 sujeitas a um período de incubação de 96 horas.

a) 6 β ,7 β -Isopropilidenodioxicolestano-3 β ,5 α -diol (**11**)



b) 6 β ,7 β -Isopentilidenodioxicolestano-3 β ,5 α -diol (**12**)



c) 6 β ,7 β -Ciclopentilidenodioxicolestano-3 β ,5 α -diol (**20**)

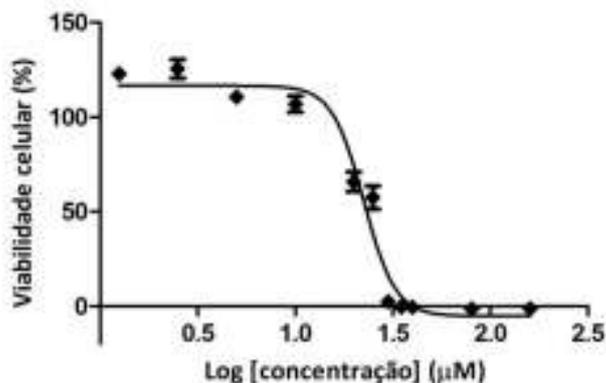


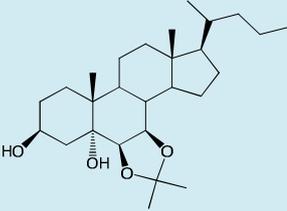
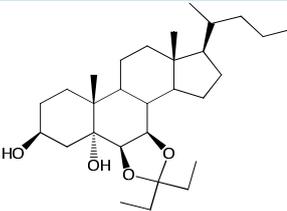
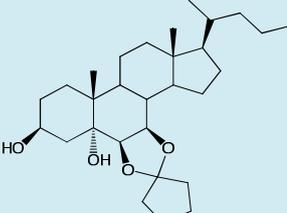
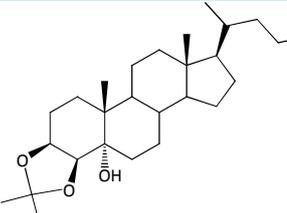
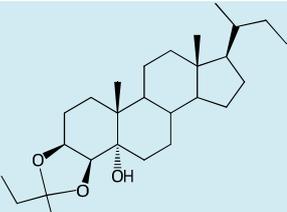
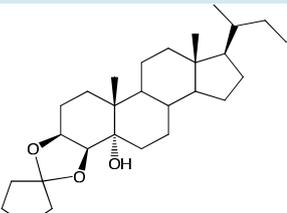
Figura 3.2. Curvas de dose-resposta dos compostos derivados da série colest-5-eno-3 β ,7 β -diol (**6**). As células foram incubadas com diferentes concentrações de fármaco, 160, 80, 40, 35, 30, 25, 20, 10, 5, 2.5 e 1.25 μ M. Os valores apresentados correspondem à média \pm desvio padrão de pelo menos três experiências efectuadas de forma independente.

O tempo do ensaio foi determinado com base no *doubling time* da linha celular em causa, de modo a garantir que todas as células passassem no mínimo por uma divisão celular. Ou seja, as 96 horas correspondem a quatro vezes o *doubling time* e neste caso é igual ao tempo de incubação efectuado.

As concentrações de fármaco aplicadas foram ajustadas, partindo de uma solução stock adequada, para que a quantidade presente de DMSO não ultrapasse 1% por poço. Sendo que a razão entre o volume de fármaco aplicado e o volume de meio de cultura foi de 0.8% de DMSO na concentração mais elevada, pode afirmar-se que a morte celular observada nas células A549 é induzida apenas pelo fármaco e é dependente da dose.

Os pontos apresentados no gráfico, que representam os valores de viabilidade celular, foram ajustados com uma função sigmóide para efectuar o cálculo do IC₅₀ de cada composto, representados na **Tabela 3.1**. O IC₅₀ foi o parâmetro utilizado para contabilizar a sensibilidade das células aos oxiesteróides.

Tabela 3.1. Citotoxicidade dos novos oxisteróis derivados da série colest-5-eno-3 β ,7 β -diol (**14**, **15** e **16**) e da série colest-4-en-3 β -ol (**10**, **11**, **16**), na linha celular A549 após 96 horas de incubação.

Composto	Estrutura	IC ₅₀ ^a (μ M)
11		27.17
12		32.19
20		22.45
7		>50
8		>50
16		>50

^a IC₅₀ é a concentração que inibe 50% da viabilidade celular. É uma medida quantitativa que determina a eficácia biológica de um determinado composto.

As curvas de dose-resposta dos compostos derivados do colest-4-en-3 β -ol (**2**) não estão representadas e os valores de IC₅₀ prevêm-se superiores a 50 μ M, sendo que não apresentam uma actividade anti-proliferativa relevante. As curvas obtidas revelam que os derivados acetal de oxisteróis **7**, **8** e **16**, que contém alterações no anel A do núcleo esteróide não actuam de uma forma dose-dependente e apenas se verificou alguma morte celular a concentrações bastante elevadas, não viáveis *in vivo*. Estes resultados comprovam o que Sá e Melo e seus colaboradores revelaram ao afirmar: “*We found that oxidative changes in ring A alone do not affect cytotoxicity.(...) Different chemical modifications involving ring B led to even higher toxicities toward cancer cells*” (Carvalho *et al.*, 2011).

É notório que o tratamento com os oxisteróis oxigenados no anel A e com alterações estruturais no anel B induziram um decréscimo na viabilidade das células A549 de uma forma dose-dependente. Podemos afirmar que apresentam uma ampla actividade anti-proliferativa contra as células cancerígenas A549.

O aumento da cadeia carbonada em derivados isopropilideno e isopentilideno acetais conduziu à diminuição da citotoxicidade, como se verifica pelos valores de IC₅₀ dos compostos **11** e **12**. No entanto, o derivado ciclopentilideno acetal, **20**, com o mesmo número de átomos de carbono do composto **12** mostra um aumento de actividade anti-proliferativa, que ultrapassa inclusive os valores do acetono **11**, revelando-se o acetal com maior actividade citotóxica.

Estes resultados comprovam novamente que os oxisteróis demonstram realmente propriedades anti-cancerígenas. No entanto, os mecanismos responsáveis pela citotoxicidade destes compostos estão longe de estar esclarecidos. Ao longo deste trabalho foi várias vezes referido que os oxisteróis estão envolvidos quer na proliferação, quer na morte celular e algumas hipóteses são propostas. Os oxisteróis mais comuns interferem com a estrutura da membrana e receptores celulares (Olkkonen *et al.*, 2009), e inibem a biossíntese do colesterol e do ADN podendo ser estes os factores responsáveis pela sua citotoxicidade (Radhakrishnan *et al.*, 2007).

3.3. Alguns comentários sobre os possíveis mecanismos de citotoxicidade dos oxистерóis

3.3.1. Citotoxicidade por indução da apoptose

Um grande número de estudos *in vitro*, como referido no capítulo 1, sugerem que os oxистерóis podem aumentar os níveis intracelulares de espécies reactivas de oxigénio, induzir modificações nas proteínas celulares e alterar várias vias de sinalização e expressão genica, o que pode levar à morte celular. Adicionalmente, estudos de SAR demonstram que os oxистерóis variam muito na forma como induzem a apoptose e portanto um mecanismo universal de apoptose induzida por oxистерóis ainda deverá ser esclarecido (Lordan *et al.*, 2009).

A activação da apoptose pode ser iniciada de duas maneiras distintas: pela via extrínseca, citoplasmática, que leva a activação directa das caspases (proteases de cisteína que clivam proteínas após um resíduo de ácido aspártico) ou pela via intrínseca, mitocondrial, que pode ser activada pelo stress do retículo endoplasmático, granzima B ou via de sinalização p53, contribuindo para inúmeras modificações morfológicas e bioquímicas, como é o caso da fragmentação do ADN nucleossomal (Grivicich *et al.*, 2007; Vejux *et al.*, 2009). Os oxистерóis podem induzir a apoptose por ambas as vias, no entanto grande parte das evidências sugerem que a maioria induz apoptose através da via intrínseca (Lordan *et al.*, 2009).

Em conclusão, embora os mecanismos de indução da apoptose pelos oxистерóis não estejam ainda bem esclarecidos, uma grande variedade de estudos tem mostrado que a criação de *stress* oxidativo, modificações biofísicas na membrana citoplasmática, excesso de radicais livres de oxigénio e oscilações na quantidade de Ca²⁺ intracelular, podem ser o inicio da transdução de factores apoptóticos dentro da célula (Lordan *et al.*, 2009; Vejux *et al.*, 2009).

3.3.2. Citotoxicidade por inibição da síntese do colesterol

Os oxiesteróis inibem a biossíntese do colesterol através da inibição proteolítica do seu principal mecanismo regulatório pelo SREBP (*sterol regulatory element binding proteins*). O SREBP é sintetizado nas membranas do retículo endoplasmático e transportado para o complexo de Golgi, onde proteases libertam um fragmento transcricionalmente activo que lhe permite entrar no núcleo. Neste, o SREBP activa a transcrição dos genes que codificam a HMG-CoA reductase e todas as outras enzimas envolvidas na síntese e absorção do colesterol. O transporte do SREBP, para o aparelho de Golgi, é feito através de uma proteína activadora da clivagem, chamada Scap (*cleavage activating protein*), que por sua vez se liga a uma outra proteína chamada Insig (**Fig. 4.3.**). Quando os níveis de colesterol são baixos, a Insig é libertada e o complexo SREBP-Scap migra para o complexo de Golgi. Os oxiesteróis ligam-se à Insig impedindo que esta se liberte, consequentemente o SREBP não migra para o aparelho de Golgi e o colesterol não é sintetizado (Schroepfer, 2000; Radhakrishnan *et al.*, 2007).

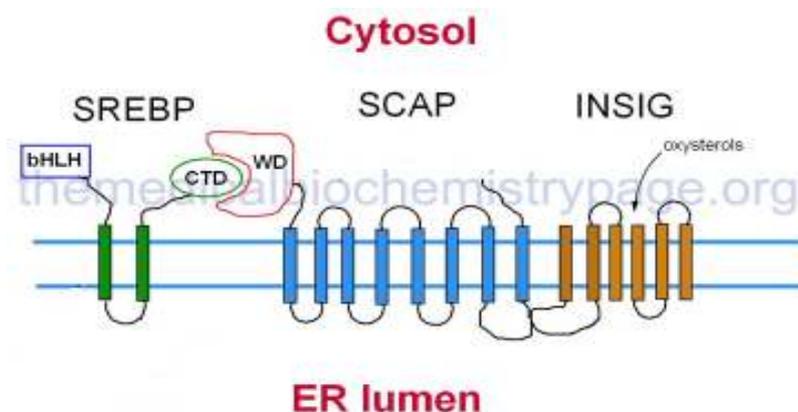


Figura 3.3. Diagrama representativo das interações SREBP-Scap-Insig. Adaptado de *The Medical Biochemistry Page*, disponível em <http://themedicalbiochemistrypage.org/cholesterol>.

O colesterol tem um papel essencial na proliferação celular, em particular na progressão da mitose, fase do ciclo celular onde ocorre a divisão nuclear (**Fig. 3.4.**). Fernández e colaboradores demonstraram que a falta de colesterol na célula diminui a actividade da proteína cinase ciclina-dependente (Cdk1, *cyclin-dependent kinase 1*), que regula a transcrição para a mitose induzindo a fase G2/M. Com a actividade da Cdk1

diminuída verifica-se uma acumulação de células na fase G₂. No entanto, foi também verificado que algumas células conseguem passar parcialmente pela mitose originando células poliplóides. Em suma, a deficiência em colesterol impede a conclusão da mitose originando células anormais, poliplóides e multinucleadas (Fernández *et al.*, 2010). Se lembrarmos, por fim, que os oxisteróis estão implicados na modulação da síntese do colesterol, pode ser este outro mecanismo para explicar a citotoxicidade destes derivados oxigenados.

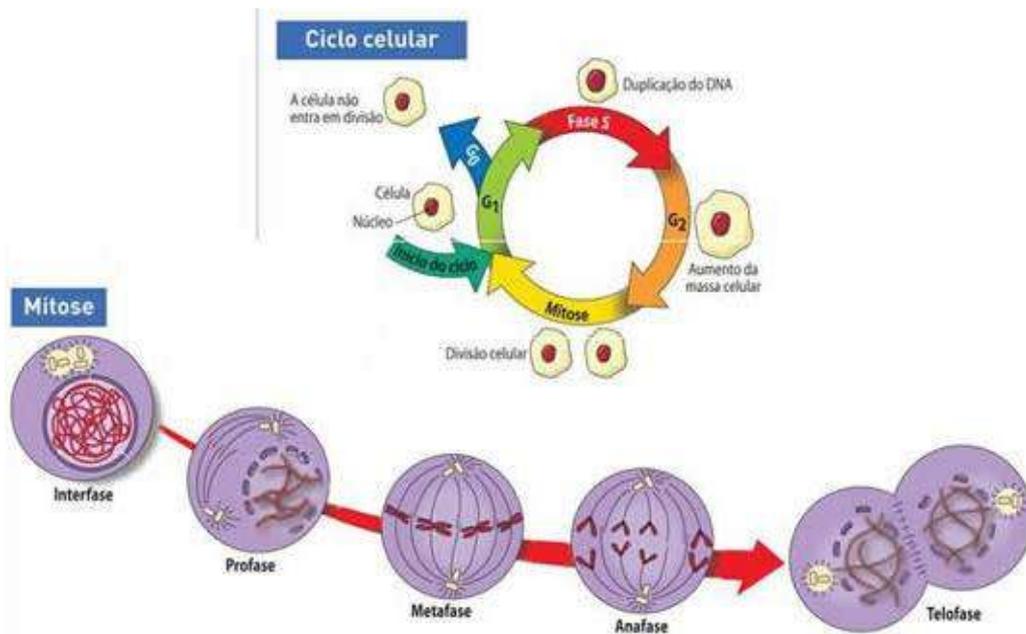


Figura 3.4. O ciclo celular. Ao conjunto de processos que ocorrem numa célula viva entre duas divisões celulares chama-se ciclo celular, que consiste na intérfase e na fase mitótica, que por sua vez inclui a mitose e a divisão celular. Retirado de Só biologia. Disponível em <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Citologia2/nucleo6.php>.

3.3.3. Citotoxicidade por inibição da replicação do ADN

A ADN polimerase catalisa a síntese de ligações internucleotídicas do ADN, formando a cadeia dupla. As ADN topoisomerases são enzimas que desempenham um papel importante no processo de replicação, transcrição, recombinação, integração e segregação cromossômica do ADN (Quintas *et al.*, 2008). Estas enzimas metabólicas, para além de serem essenciais para a replicação, reparação e recombinação do ADN, estão também envolvidas na divisão celular. A importância das polimerases e topoisomerases foi recentemente

reconhecida, sendo estas consideradas alvos celulares para a intervenção química no desenvolvimento de agentes anti-cancerígenos (Ishimaru *et al.*, 2008).

O colesterol e seus derivados, como é o caso dos oxisteróis, têm vindo a ser referenciados como inibidores da actividade das enzimas metabólicas do ADN e do processo de proliferação celular, o que suscita bastante interesse no que respeita a células cancerígenas. Foi demonstrado que o 5 α ,6 α -epoxicolesterol inibe a actividade das topoisomerases ligando-se directamente a estas enzimas, bem como a supressão do crescimento celular. Verificou-se também que os derivados do colesterol induzem a fragmentação do ADN nas células tumorais, levando a uma paragem do crescimento e consequente morte celular. Os estudos já realizados indicam que o 5 α ,6 α -epoxicolesterol pode actuar selectivamente em células cancerígenas, uma vez que não teve qualquer influência na proliferação de células normais, podendo vir a ser utilizado como um agente anti-tumoral (Ishimaru *et al.*, 2008).

Já em 1983, Astruc e seus colaboradores apontaram o 25-hidroxicolesterol como inibidor da síntese de ADN, propondo que este poderia exercer uma acção directa sobre o núcleo (Astruc *et al.*, 1983).

3.3.4. Efeitos dos oxisteróis na biofísica membranar

O mecanismo pelo qual os oxisteróis podem regular funções celulares baseia-se na modificação das propriedades biofísicas das membranas das células. O colesterol promove a formação de estruturas ordenadas dentro da bicamada lipídica, em particular a formação de *rafts* lipídicos, que são subdomínios da membrana de grande importância biológica, e que se encontram de forma abundante em proteínas sinalizadoras específicas. A maior parte das peroxidações lipídicas ocorre dentro das membranas, alterando a sua fluidez, estrutura e permeabilidade. Estas modificações interferem com as proteínas membranares e consequentemente com o funcionamento da célula. Os danos causados na membrana verificam-se também no interior da célula, devido à migração através de intermediários reactivos, os quais afectam outros constituintes celulares como ácidos nucleicos, açúcares e proteínas (Lordan *et al.*, 2009; Vejux *et al.*, 2009). Diferentes oxisteróis tanto podem potenciar como inibir a sequência lipídica, dependendo da sua conformação, que por sua

vez é influenciada pelo oxigênio adicional e a sua posição. Estas constatações poderão também explicar a diferente susceptibilidade das linhas celulares aos efeitos tóxicos dos oxiesteróis (Lordan *et al.*, 2009).

3.5. Procedimento experimental

3.5.1. Equipamento

As leituras de absorvância foram feitas no espectrômetro SPECTRAMax PLUS³⁸⁴ da Molecular Devices. As células da linha A549 cresceram numa incubadora Nuair ir autoflow, CO₂ water-jacketed a 37°C e com 5% de CO₂.

3.5.2. Reagentes

Meio de cultura RPMI-1640, meio RPMI-1640 sem vermelho de fenol, tampão Hepes, bicarbonato de sódio, NaHCO₃, antibiótico Penicilina-Estreptomicina, Penstrep (10 000 unidades de penicilina 10 mg de estreptomicina por mL em 0.9% NaCl) e o reagente Alamar blue[®] foram adquiridos à Sigma-Aldrich Co. O soro fetal de bovino (SFB, soro fetal de bovino) foi obtido da Gibco. O dimetilsulfóxido, DMSO, para culturas celulares e o ácido etilenodiamino tetra-acético, EDTA, foram adquiridos à AppliChem. O tetrahidrofurano, THF, foi obtido da VWR Co. O tampão fosfato salino 5x (PBS, *phosphate buffered saline*) foi preparado no laboratório.

3.5.3. Material biológico

No presente estudo foi utilizada a linha celular A549 imortalizada e isolada a partir de uma amostra de tecido humano de adenocarcinoma do pulmão adquirida à ATCC.

A linha celular A549 foi desenvolvida pela primeira vez em 1972 por Giard e seus colaboradores, através da remoção de tecido cancerígeno do pulmão, que foi isolado de um

indivíduo do sexo masculino, caucasiano, de 58 anos de idade. *In vitro* as células A549 crescem em monocamadas, são aderentes (Giard *et al.*, 1973) e apresentam um *doubling time* de 22 horas, segundo a ATCC.

As células A549 armazenadas no *National Institutes of Health* foram testadas sob a orientação dos regulamentos da *Food and Drug Administration* e *Current Good Manufacturing Practice*.

3.5.4. Condições de trabalho

- Todo o protocolo foi sujeito a uma otimização prévia.
- Todo o procedimento foi realizado numa câmara de fluxo laminar para garantir a esterilidade.
- Todo o material e reagentes usados estavam estéreis.

3.5.5. Culturas celulares

As culturas celulares são utilizadas quando se pretende manipular experimentalmente células e tecidos *in vitro*. É uma técnica que se baseia na criação de um sistema de proliferação celular, que apresente características o mais próximas possíveis do ambiente celular *in vivo*. Para tal é necessário utilizar um meio de cultura com concentrações adequadas de nutrientes, como aminoácidos, sais inorgânicos, vitaminas e hormonas de crescimento. É igualmente importante reproduzir as condições físicas naturais de modo a serem favoráveis ao crescimento celular, ajustando o pH, a temperatura, a humidade e a percentagem atmosférica de dióxido de carbono, CO₂, mantendo-as constantes. No entanto, as culturas celulares também têm algumas desvantagens, e neste ensaio a principal a ter em atenção foi a alteração do fenótipo e genótipo das células após um longo período de crescimento (Freshney, 2010).

A linha celular A549 cresceu em meio de cultura RPMI, contendo tampão HEPES e NaHCO₃, e foi suplementado com 10% de SFB e antibiótico Penstrep em condições estéreis. Foi mantida em cultura numa incubadora a 37°C com 5% de CO₂ e em atmosfera húmida.

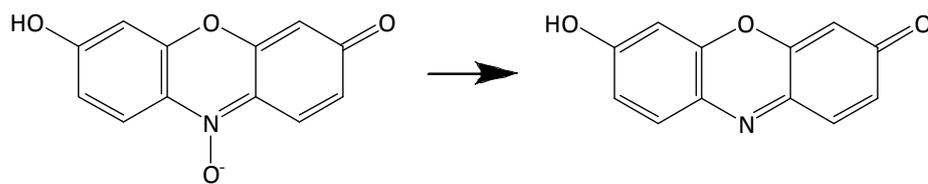
As células foram passadas periodicamente a cada 48 horas, tempo necessário para que apresentassem um estado de confluência de aproximadamente 80%. Para destacar as células (uma vez que são células aderentes) foi utilizado meio de dissociação, preparado com PBS 5x, água miliQ, EDTA 2% e contendo 5% de tripsina, que actua durante 10 minutos na incubadora.

Todas as experiências foram desenvolvidas em células cultivadas com 24 horas de antecedência, para garantir a aderência das células à superfície das placas de cultura, apresentando uma densidade celular apropriada para o ensaio e a partir de uma densidade celular inicial de 5 000 células por poço.

3.5.6. Ensaio de citotoxicidade

A análise da viabilidade celular é crucial em muitas áreas das ciências da vida, como é o caso do desenvolvimento de fármacos. A necessidade de efectuar ensaios de citotoxicidade constantemente leva a que se procure desenvolver testes que sejam rápidos, fáceis de manusear, e de simples detecção dos efeitos citotóxicos, em sistemas celulares *in vitro*. Um dos ensaios mais utilizados para análises de citotoxicidade e proliferação celular é o teste com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol)-2,5-difeniltetrazolio, o MTT, um ensaio colorimétrico baseado na redução de sais de tetrazólio, pelas células vivas, em cristais azul de formazan (Mosmann, 1983). No entanto, o MTT é bastante tóxico, destruindo as células e é mais demorado que o teste *Alamar blue* (AB), um outro ensaio colorimétrico quantitativo que mede a actividade metabólica celular (Bopp *et al.*, 2008).

A viabilidade celular da linha A549 foi determinada através do ensaio de AB, um teste que utiliza a resazurina para avaliar a o estado de proliferação das células e a citotoxicidade de compostos activos. A resazurina é um reagente não-fluorescente, azul, que ao ser aplicado em células metabolicamente activas, é convertido pelas enzimas mitocondriais em resorufina, um composto fluorescente cor de rosa (**Esq. 3.1**). Como tal a resofurina pode ser detectada espectrofotometricamente ou fluorometricamente (Schreer *et al.*, 2005; Bopp *et al.*, 2008). As grandes vantagens do ensaio AB em relação aos testes clássicos de viabilidade celular é ser extremamente estável, não-tóxico e de baixo custo (Al-Nasiry *et al.*, 2007).



Esquema 3.1. Redução da resazurina em resofurina pelas enzimas mitocondriais.

Para determinação da toxicidade dos compostos, as células foram incubadas durante 96 horas com diferentes concentrações de fármaco. Foram preparadas soluções stock 30mM dos compostos 6 β ,7 β -Isopropilidenodioxicolestano-3 β ,5 α -diol (**14**) 6 β ,7 β -Isopentilidenodioxicolestano-3 β ,5 α -diol (**15**) e 3 β ,4 β -ciclopentilidenodioxicolestano-5 α -ol (**16**) em DMSO. Foi também necessário preparar soluções intermédias 10 mM para garantir que na concentração de fármaco mais elevada a concentração de DMSO não ultrapassava 1% por poço. Para a série de acetais derivados do colest-4-en-3 β -ol foi necessário tratar as células com concentrações de fármaco mais elevadas, e como tal foram preparadas solução stock de 60 mM em DMSO+THF (1:1) dos compostos 3 β ,4 β -isopropilidenodioxicolestano-5 α -ol (**10**), 3 β ,4 β -isopentilidenodioxicolestano-5 α -ol (**11**) e 3 β ,4 β -ciclopentilidenodioxicolestano-5 α -ol (**16**). Após as 96 horas de incubação, o meio contendo os compostos foi aspirado das células e adicionou-se resazurina 10% v/v (150 μ L/poço). As células foram mantidas na incubadora com resazurina durante aproximadamente 60 minutos. O mesmo procedimento foi efectuado para realizar a curva de dose-resposta do DMSO isolado.

Os valores IC₅₀ dos diferentes compostos foram determinados a partir das curvas dose-resposta para o tempo de tratamento de 96 horas.

3.5.7. Análise estatística

Os resultados apresentados neste estudo correspondem à média de pelo menos três experiências realizadas de forma independente, expressas com os respectivos desvios padrão. A análise de resultados foi efectuada com recurso a funcionalidades do Microsoft® Exel 2007 e através do software GraphPad Prism 5.

Capítulo IV

Conclusões e Perspectivas futuras

4. Conclusões e Perspectivas futuras

O efeito citotóxico atribuído desde há muito aos oxisteróis, torna estes compostos fortes candidatos a serem utilizados na terapia anti-cancerígena e por isso representam um grupo de compostos que tem atraído bastante atenção nos últimos anos.

Neste trabalho foram sintetizadas três séries de novos derivados acetal de oxisteróis, que diferem de série para série consoante o oxisterol utilizado, e entre si apenas pela natureza e número de átomos de carbono do alquilideno e cicloalquilideno acetal preparado. Na síntese dos acetais foram usados como reagentes a 3-pentanona, a ciclopentanona e a ciclohexanona. No final obtiveram-se três séries de novos derivados acetal dos três oxisteróis usados nestas reacções, de acordo com o composto carbonílico usado. Durante todo o processo de síntese procurou-se seguir metodologias rápidas, eficazes e ambientalmente aceitáveis. Como tal, um dos principais objectivos foi conseguir acetalizações no núcleo esteróide através de reacções do tipo *one-pot*, como referido na preparação de derivados acetonidos descrita na literatura. Através deste processo, sintetizaram-se os três derivados da 3-pentanona, o 3 β ,4 β -isopentilidenodioxicolestano-5 α -ol (**8**), o acetato de 5 α -hidroxi-6 β ,7 β -isopentilidenodioxicolestano-3 β -ilo (**10**), e o 6 β ,7 β -isopentilidenodioxicolestano-3 β ,5 α -diol (**12**), aumentando assim a aplicabilidade do processo. No entanto, a formação de produtos secundários aliada a longos tempos de reacção, no caso da preparação de derivados cicloalquilideno acetais, levaram-nos a optar por outra metodologia. Esta envolveu a preparação de epóxidos, imitando o primeiro passo da reacção tipo *one-pot*, que depois de devidamente secos foram submetidos às condições do segundo passo do mesmo processo, tendo conduzido à formação dos acetais **16**, **17**, **18**, **19**, **20** e **21**. Desta forma superámos o problema de misturas de esteróides intratáveis.

Futuramente será importante melhorar o processo de síntese, tipo *one-pot*, de modo a alcançar-se um processo com elevado rendimento, para todos os diferentes tipos de acetais.

Motivados por estudos anteriores e com o intuito de avaliar a bioactividade destas novas moléculas, no que respeita ao seu perfil citotóxico, submetemos a linha celular de cancro do pulmão, A549, a um tratamento com os acetais de duas das séries preparadas. A série de compostos com alterações estruturais apenas no anel A do núcleo esteróide, não revelou propriedades anti-proliferativas relevantes. A série que possui um grupo hidroxilo no

anel A e a função acetal nas posições C6 e C7 do esteróide demonstrou, nestes resultados preliminares para os três compostos testados, actividades anti-cancerígenas promissoras. Devido ao facto do derivado ciclopentilideno acetal **20** ter revelado a melhor citotoxicidade, deve ser igualmente testado o derivado ciclohexilideno **21**, já preparado.

Futuramente, deverão efectuar-se ensaios de citotoxicidade com os mesmos oxisteróis em linhas celulares saudáveis e possivelmente noutras linhas celulares cancerígenas. Por outras palavras, deverá avaliar-se o perfil citotóxico dos oxisteróis tendo em atenção a selectividade no que respeita a células não tumorais, como é o caso da linha celular ARPE-19. Será necessário continuar as investigações no que respeita ao esclarecimento dos mecanismos biológicos em que os oxisteróis se encontram envolvidos através de técnicas de citometria de fluxo, por exemplo, e é importante ter em atenção que alguns oxisteróis estão implicados em diversas patologias. Como tal, os esforços neste sentido deverão conseguir levar a um equilíbrio entre a actividade terapêutica, destes derivados oxigenados do colesterol, e os seus efeitos negativos para a saúde.

Capítulo V

Referências Bibliográficas

5. Referências Bibliográficas

- Al-Nasiry, S., Geusens, N., Hanssens, M. *et al.*, (2007). The use of alamarBlue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Hum. Reprod.* 22: 1304-1309.
- Alexandrov, P., Cui, J.G., Zhao, Y. *et al.*, (2005). 24S-hydroxycholesterol induces inflammatory gene expression in primary human neural cells. *Neuroreport* 16 (9): 909-13.
- Amaral, C., Borges, M., Melo, S. *et al.*, (2012). Apoptosis and Autophagy in Breast Cancer Cells following Exemestane Treatment. *PLoS One* 7 (8): e42398.
- Araújo, A., Barata, F., Barroso, S., *et al.*, (2009). Custo do tratamento do cancro em Portugal. *Acta Med Port.* 22: 525-536.
- Astruc, M., Roussillon, S., Defay, R. *et al.*, (1983). DNA and cholesterol biosynthesis in synchronized embryonic rat fibroblasts: II. Effects of sterol biosynthesis inhibitors on cell division. *BBA - Molecular Cell Research* 763 (1): 11-18.
- Bäckvall, J. E. (2004). *Modern Oxidation Methods*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim.
- Bajada, S., Mazakova, I., Richardson, J. B. *et al.*, (2008). Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2: 169-183.
- Baragliu, A. Grandolini, G. Rossi, C. *et al.*, (1980). Synthesis of 1,2,3-Trihydroxy-Para-Menthanes. *Tetrahedron* 36 (5): 645-649.
- Barreiro, E. J. & Manssour, C. A. M., (2001). *Química Medicinal: As Bases Moleculares da Acção dos Fármacos*. Art Med Editora Ltda, Porto Alegre.
- Barreiro, E. J. & Fraga, C. A. M., (2008). *Química Medicinal: As Bases Moleculares da Acção dos Fármacos*. Editora Art Med Ltda, Porto Alegre. 2ª Edição.
- Bartoli, G., Marcantoni, E. & Sambri, L., (2004). The CeCl₃·nH₂O/NaI System in Organic Synthesis: An Efficient Water Tolerant Lewis Acid Promoter. *ChemInform* 35 (6).
- Bernardi, A., Silva, M. & Lenz, G., (2003). Abordagem molecular no desenvolvimento de fármacos anti-tumorais. *Infarma*. 15 (9;10): 61-63.
- Beryl, H. -A., (1984). Estramustine-induced mitotic arrest in two human prostatic carcinoma cell lines DU 145 and PC-3. *Prostate* 5: 93-100.
- Björkhem, I., Cedazo-Minguez, A., Leoni, V., *et al.*, (2009). Oxysterols and neurodegenerative diseases. *Molecular Aspects of Medicine*. 30: 171-179.
- Björkhem, I., Lütjohann, D., Breuer, O. *et al.*, (1997) Importance of a novel oxidative mechanism for elimination of brain cholesterol. Turnover of cholesterol and 24(S)-hydroxycholesterol in rat brain as measured with 18O₂ techniques in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* 272 (48): 30178-84.
- Björkhem, I. & Meaney, S. (2004). Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24 (5): 806-15.

- Bopp, S. K. & Lettieri, T., (2008). Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. *BMC Pharmacology* 8: 8.
- Brougham, P., Cooper, M. S., Cummerson, D. A. *et al.*, (1987). Oxidation reactions using magnesium monopero-phthalate: a comparison with m-chloroperoxybenzoic acid. *Chem. Comm.* 1015-1017.
- Brown, J., Theisler, C., Silberman, S. *et al.*, (2004). Differential Expression of Cholesterol Hydroxylases in Alzheimer's Disease. *J. Biol. Chem.* 279 (33): 34674-81.
- Brueggemeier, R. W., Miller, D. D. & Dalton, J. T., (2002). Estrogen, progestins and androgens. In Foye's Principles of Medicinal Chemistry. *Lippincott Williams & Wilkins*, 5th Edition.
- Brueggemeier, R. W., Hackett, J. C. & Diaz-Cruz, E. S., (2005). Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer. *Endocr. Rev.* 26 (3): 331-45.
- Bruice, T. C. & Fife, T. H., (1962). Hydroxyl Group Catalysis. The Nature of Neighboring Hydroxyl Group Assistance in the Alkaline Hydrolysis of the Ester Bond. *J. Am. Chem. Soc.* 84 (10): 1973-1979.
- Bunyathaworn, P., Boonananwong S., Kongkathip, B. *et al.*, (2010). Further study on synthesis and evaluation of 3, 16, 20 - polyoxygenated steroids of marine origin and their analogs as potent cytotoxic agents. *Steroids* 75 (6): 432-44.
- Cannell, J. J. & Hollis, B. W., (2008). Use of vitamin D in clinical practice. *Altern. Med. Rev.* 13 (1): 6-20.
- Carvalho, J. F., (2010). Bioactive Sterols. Synthesis, Antitumoral Evaluation and Structure-Activity Studies. *Tese de Doutorado*. Cap. V.
- Carvalho, J., Silva, M., Moreira, J. *et al.*, (2009a). Efficient Chemoenzymatic Synthesis, Cytotoxic Evaluation, and SAR of Epoxysterols. *J. Med. Chem.* 52 (13): 4007-4019.
- Carvalho, J., Silva, M., Moreira, J. *et al.*, (2009b). Highly efficient epoxidation of unsaturated steroids using magnesium bis(monoperoxyphthalate) hexahydrate. *Tetrahedron* 65: 2773-2781.
- Carvalho, J., Silva, M., Moreira, J. *et al.*, (2011). Selective Cytotoxicity of oxysterols through Structural Modulation on Rings A and B. Synthesis, in Vitro Evaluation, and SAR. *J. Med. Chem.* 54 (18): 6375-93.
- Carvalho, J. F. S., Silva, M. M. C., & Sá e Melo, M.L., (2010). Efficient trans-diaxial hydroxylation of Δ^5 -steroids. *Tetrahedron* 66: 2455-2462.
- Chakravarthy, U., Evans, J., Rosenfeld, P. J. *et al.*, (2010). Age related macular degeneration. *BMJ.* 340: c981.
- Chen, H. W., Kandutsch, A. A. & Waymouth, C., (1974). Inhibition of cell growth by oxygenated derivatives of cholesterol. *Nature* 251: 419-421.
- Cox, R. L. & Crawford, E. D., (1995). Estrogens in the treatment of prostate cancer. *J. Urol.* 154 (6): 1991-8.
- Diczfalusy, U., Lund, E., Lütjohann, D. *et al.*, (1996). Novel pathways for elimination of cholesterol by extrahepatic formation of side-chain oxidized oxysterols. *Scand J. Clin. Lab. Investig.* 226: 9-17.
- Dietschy, John M. & Turley, Stephen D. (2004). Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J. Lipid. Res.* 45 (8): 1375-97.

- Dumeunier, R. & Markó, I. E., (2004). On the role of triflic acid in the metal triflate-catalysed acylation of alcohols. *Tetrahedron Lett.* 45 (4): 825–829.
- Donald, P., (2008). New cancer drugs targeting the biosynthesis of estrogens and androgens. *Drug Development Research* 69 (6): 304-318.
- Dupont, S., Beney, L., Ferreira, T. *et al.*, (2011). Nature of sterols affects plasma membrane behavior and yeast survival during dehydration. *BBA - Biomembranes* 1808 (6): 1520-1528.
- Dwyer, J. R., Sever, N., Carlson, M. *et al.*, (2007). Oxysterols Are Novel Activators of the Hedgehog Signaling Pathway in Pluripotent Mesenchymal Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 282 (12): 8959-8968.
- Falk, E. (2006). Pathogenesis of Atherosclerosis. *Journal of American College of Cardiology* 47 (8): 7-12.
- Famer, D., Meaney, S., Mousavi, M. *et al.*, (2007). Regulation of alpha- and beta-secretase activity by oxysterols: cerebrosterol stimulates processing of APP via the alpha-secretase pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 359 (1): 46-50.
- Fernández-Herrera, MA., López-Munõz, H., Hernández-Vásquez, JM. *et al.*, (2010) Synthesis of 26-hydroxy-22-oxocholestanic frameworks from diosgenin and hecogenin and their in vitro antiproliferative and apoptotic activity on human cervical cancer CaSki cells. *Bioorg. Med. Chem.* 18 (7): 2474-84.
- Frei III, E., Karon, M., Levin, R. H. *et al.*, (1965). The effectiveness agents of combinations of antileukemic agents in inducing and Maintaining remission in children with acute leukemia. *Blood* 26: 642-656.
- Freshney, I., (2010). Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. *Wiley-Blackwell*, 6th Edition.
- Gabbi, C., Warner, M. & Gustafsson J., (2009). Minireview: Liver x Receptor β : Emerging Roles in Physiology and Diseases. *Mol. Endocrinol.* 23 (2): 129-136.
- Gao, H. M. & Hong, J. S., (2008). Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. *Trends Immunol.* 29 (8): 357-365.
- Gargiulo, S., Sottero, B. & Gamba, P., (2011). Plaque oxysterols induce unbalanced up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in macrophagic cells through redox-sensitive signaling pathways: Implications regarding the vulnerability of atherosclerotic lesions. *Free Radical Biology & Medicine* 51: 844-855.
- Gaspard-Illoughmane, H. & Le Roux, C., (2004). Bismuth(III) Triflate in Organic Synthesis. *European Journal of Organic Chemistry* (12): 2517-2532.
- Gediya, K. L. & Njar, V. C. O., (2009). Promise and challenges in drug discovery and development of hybrid anticancer drugs. *Expert Opin. Drug Discov.* 4 (11): 1099-1111.
- Gheorghide, M., van Veldhuisen, D. J. & Colucci, W. S., (2006). Contemporary Use of Digoxin in the Management of Cardiovascular Disorders. *Circulation* 113 (21): 2556-2564.
- Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J. *et al.*, (1973). In vitro cultivation of human tumors: Establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute* 51 (5): 1417-23.
- Gill, S., Chow, R. & Brown, A.J., (2008). Sterol regulators of cholesterol homeostasis and beyond: the oxysterol hypothesis revisited and revised. *Progress in lipid research* 47 (6): 391-404.

- Girao, H., Mota, C. & Pereira, P., (1999). Cholesterol may act as an antioxidant in lens membranes. *Current Eye Research* 18 (6): 448-454.
- Glossmann, H. H., (2010). Origin of 7-dehydrocholesterol (provitamin D) in the skin. *J Invest Dermatol.* 130 (8): 2139-41.
- Grivicich, I., Regner, A., Rocha, A., *et al.*, (2007). Morte celular por apoptose. *Revista brasileira de cancerologia* 53 (3): 335-342.
- Guido, R. V. C., Andricopulo, A. D. & Oliva, G., (2010). Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. *Estud. av.* 24 (70): 81-98.
- Gurtner, G. C., Callaghan, M. J. & Longaker, M. T., (2007). Progress and Potential for Regenerative Medicine. *Annual Review of Medicine* 58: 299-312.
- Hanahan, D. & Weinberg, R., (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144 (5): 646-674.
- Harras, A., Edwards, B. K. , Blot, W. J. *et al*, (1996). Cancer rates and risks. Bethesda: Cancer Statistics Branch, *The National Cancer Institute*, 32-5.
- Haslewood, G., (1939). Metabolism of steroids. I. The isolation of 7-hydroxycholesterol and of the "hepatols" from ox liver. *British Postgraduate Medical School, London.* 709-712.
- Hayden, John M., Brachova, L., Higgins, K. *et al.* (2002). Induction of monocyte differentiation and foam cell formation in vitro by 7-ketocholesterol. *J. Lipid Res.* 43: 26-35.
- Heaney, H., (1993). Monoperoxyphthalic acid. *Aldrichimica Acta* 26: 35-45.
- Ikonen, E., (2008). Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nature reviews: Molecular Cell Biology* 9: 125-138.
- Ishimaru, C., Yonezawa, Y., Kuriyama, I., *et al.*, (2008). Inhibitory Effects of Cholesterol Derivatives on DNA Polymerase and Topoisomerase Activities, and Human Cancer Cell Growth. *Lipids* 43: 373-382.
- Iuliano, L., (2011). Pathways of cholesterol oxidation via non-enzymatic mechanisms. *Chemistry and Physics of Lipids* 164: 457-468.
- Jang, Eun-Ra & Lee, Chung Soo, (2011). 7-Ketocholesterol induces apoptosis in differentiated PC12 cells via reactive oxygen species-dependent activation of NF-κB and Akt pathways. *Neurochemistry International* 58: 52-59.
- Johnson, D.F., Bennett, R.D. & Heftmann, E., (1963). Cholesterol in Higher Plants. *Science* 140 (3563): 198-9.
- Jusakul, A., Yongvanit, P., Loilome, W. *et al.*, (2011). Mechanisms of oxysterol-induced carcinogenesis. *Lipids Health Dis.* 10: 44.
- Kandutsch, A. A., Chen, H. W. & Heiniger, H. J. (1978). Biological activity of some oxygenated sterols. *Science* 4355: 498-501.

- Kha, H. T., Basseri, B., Shouhed, D. *et al.*, (2004). Oxysterols Regulate Differentiation of Mesenchymal Stem Cells: Pro-Bone and Anti-Fat. *Journal of bone and mineral research*, 19 (5): 830-840.
- Khan, A. T., Choudhury, L. H., Parvin, T. *et al.*, (2006). CeCl₃·7H₂O: an efficient and reusable catalyst for the preparation of β-acetamido carbonyl compounds by multi-component reactions (MCRs). *Tetrahedron* 47 (46): 8137-8141.
- Klein, R., Peto, T., Bird A. *et al.*, (2004). The epidemiology of age-related macular degeneration. *Am. J. Ophthalmol.* 137: 486-495.
- Kornberg A., (1987). The two cultures: chemistry and biology. *Biochemistry* 26 (22): 6888-91.
- Kuperman, H., Odone, V., Cristofani, L. M. *et al.*, (2012). Evaluation of Adrenal Reserve in Children with Acute Lymphocytic Leukemia Treated with Prednisone or Dexamethasone. *Horm. Res. Paediatr.* 20: 73-80.
- Lahoua, Z., Vial, H., Michel, F. *et al.*, (1991). Oxysterol activation of arachidonic acid release and prostaglandin E2 biosynthesis in NRK 49F cells is partially dependent on protein kinase C activity. *Cell Signal.* 3 (6): 559-67.
- Lemaire-Ewing, S., Berthier, A., Royer, M.C. *et al.*, (2009). 7β-Hydroxycholesterol and 25-hydroxycholesterol-induced interleukin-8 secretion involves a calcium-dependent activation of c-fos via the ERK1/2 signaling pathway in THP-1 cells: oxysterols-induced IL-8 secretion is calcium-dependent. *Cell Biol. Toxicol.* 25(2): 127-39.
- Lima-Costa, M. F. & Veras, R., (2008). Saúde pública e envelhecimento. *Cad. Saúde Pública* 19 (3): 700-701.
- Lima, L. M. & Barreiro, E. J., (2005). Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. *Curr. Méd. Chem.* 12 (1): 23-49.
- Lima, L. M., (2007). Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira. *Quim. Nova* 30 (6): 1456-1468.
- Lizard, G., Deckert, V., Dubrez, L. *et al.*, (1996). Induction of Apoptosis in Endothelial cells Treated with Cholesterol Oxides. *American journal of Pathology.* 148 (5): 1625-1638.
- Leonarduzzi, G., Gamba, P., Gargiulo, S. *et al.*, (2008). Oxidation as a crucial reaction for cholesterol to induce tissue degeneration: CD36 overexpression in human promonocytic cells treated with a biologically relevant oxysterol mixture. *Aging Cell* 7 (3): 375-82.
- Leoni, V. & Caccia, C., (2011). Oxysterols as biomarkers in neurodegenerative diseases. *Chemistry and Physics of Lipids.* 164: 515-524.
- Lordan, S., Mackrill, J., & O'Brien, N., (2009). Oxysterols and mechanisms apoptotic signaling: implications in the pathology of degenerative diseases. *J. Nutritional Biochemistry* 20: 321-336.
- Lucas N., Bordoloi A., Amrute, A. P. *et al.*, (2009). A comparative study on liquid phase alkylation of 2-methylnaphthalene with long chain olefins using different solid acid catalysts. *Applied Catalysis A: General* 352: 74-80.
- Luche, J. L., Rodriguez-Hahn, L. & Abbo, P., (1978). Reduction of Natural Enones in Presence of Cerium Trichloride. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications* 14: 601-602.

- Ma, M. T., Zhang, J., Farooqui, A. A. Chen, P., *et al.*, (2010). Effects of cholesterol oxidation products on exocytosis. *Neurosci. Lett.* 476 (1): 36-41.
- Maddani, R. M. & Prabhu, K. R., (2011). Metal-Free Deprotection of Terminal Acetonides by Using *tert*-Butyl Hydroperoxide in Aqueous Medium. *Synlett* 6: 821-825.
- Maerker, G., (1987). Cholesterol Autoxidation-Current Status *J. Am. Oil Chem. Soc.* 64 (3): 388-392.
- Mateos, L., Akterin, S., Gil-Bea, F.J., *et al.*, (2009). Activity-regulated cytoskeleton-associated protein in rodent brain is down-regulated by high fat diet in vivo and by 27-hydroxycholesterol in vitro. *Brain Pathol.* (1): 69-80.
- Morales-Aizpurúa, I., & Tenuta-Filho, A., (2002). Óxidos de colesterol: ocorrência em alimentos, formação e efeitos biológicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 38 (4): 431-442.
- Mosmann, T., (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65 (1-2): 55-63.
- Moss, G. P., (1989). Nomenclatura de esteróides (Recomendações 1989). *Pure & Appl. Chem.* 61 (10): 1783-1822.
- Murphy, Robert C. & Johnson, Kyle M., (2008). Cholesterol, Reactive Oxygen Species, and the Formation of Biologically Active Mediators. *J. Biol. Chem.* 283 (23): 1552-15525.
- Nasir, M., Saeidnia, S., Mashinchian-Moradi, A. *et al.*, (2011). Sterols from the red algae, *Gracilaria salicornia* and *Hypnea flagelliformis*, from Persian Gulf. *Pharmacogn. Mag.* 7 (26): 97-100.
- Nelson T. J. & Alkon, D. L., (2005). Oxidation of cholesterol by amyloid precursor protein and beta-amyloid peptide. *J. Biol. Chem.* 280 (8): 7377-87.
- Olkkonen, V.M. & Hynynen, R., (2009). Interactions of oxysterols with membranes and proteins. *Molecular Aspects of Medicine* 30 (3): 123-133.
- Olkkonen, V. M., Béaslas, O., & Nissilä, E., (2012). Oxysterols and Their Cellular Effectors. *Biomolecules* 2: 76-103.
- Olah, G. A. & Molnár, A., (2003). Hydrocarbon Chemistry. *Wiley Interscience*, Hoboken, 2nd Ed, Cap. 9.
- Ollevier, T. & Lavie-Compin, G., (2004). Bismuth triflate-catalyzed mild and efficient epoxide opening by aromatic amines under aqueous conditions. *Tetrahedron Letters* 45: 49-52.
- Ollevier, T. & Nadeau, E., (2008). Microwave-enhanced bismuth triflate-catalyzed epoxide opening with aliphatic amines. *Tetrahedron Letters* 49: 1546-1550.
- Olson, R., (1998). Discovery of the Lipoproteins, Their role in fat transport and their significance as risk factors. *J. Nutrition* 128 (2): 439S-443S.
- Ong, J. M., Aoki, A. M., Seigel, G. M. *et al.*, (2003). Oxysterol-induced toxicity in R28 and ARPE-19 cells. *Neurochem. Res.* 6: 883-891.
- Panini, S.R. & Sinensky, M.S., (2001). Mechanisms of oxysterol-induced apoptosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 12 (5): 529-33.

- Pearson, P., Levy, B., Comstock, T. *et al.*, (2006). Fluocinolone Acetonide Intravitreal Implant to Treat Diabetic Macular Edema: 3-Year Results of a Multi-Center Clinical Trial. *Invest Ophthalmol Vis. Sci.* 47: E- Abstract 5442.
- Planey, S. L. & Litwack, G., (2000). Glucocorticoid-induced apoptosis in lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279 (2): 307-12.
- Poli G., Sottero, B., Gargiulo S., *et al.*, (2009). Cholesterol oxidation products in the vascular remodeling due to atherosclerosis. *Mol. Aspects Med.* 30 (3): 180-9.
- Postina, R. (2008). A closer look at alpha-secretase. *Curr Alzheimer Res.* 5 (2): 179-86.
- Prista, L. N., Alvez, C. A., Morgado, R. *et al.*, (2003). Tecnologia Farmacêutica. *Fundação Calouste Gulbenkian*, 6ª edição, vol.1.
- Quintas, A., Freire, A. P. & Halpern, M. J., (2008). *Bioquímica, Organização Molecular da vida*. Lidel.
- Radhakrishnan, A., Ikeda, Y., Kwon, H. *et al.*, (2007). Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Oxysterols block transport by binding to Insig. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 6511-6518.
- Ringseis, R. & Eder, K., (2004). Dietary oxidized cholesterol increases expression and activity of antioxidative enzymes and reduces the concentration of glutathione in the liver of rats. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 74 (1): 86-92.
- Rodríguez, I.R. & Larrayoz, I.M., (2010). Cholesterol oxidation in the retina: implications of 7KCh formation in chronic inflammation and age-related macular degeneration. *J. Lipid. Res.* 51 (10): 2847-62.
- Rosenblat, M. & Aviram, M., (2002). Oxysterol-induced activation of macrophage NADPH-oxidase enhances cell-mediated oxidation of LDL in the atherosclerotic apolipoprotein E deficient mouse: inhibitory role for vitamin E. *Atherosclerosis* 160 (1): 69-80.
- Russell, David W., Halford, Rebekkah W., Ramirez, Denise M.O. *et al.*, (2009). Cholesterol 24-Hydroxylase: An Enzyme of Cholesterol Turnover in the Brain. *Annu. Rev. Biochem.* 78: 1017-1040.
- Ryan, L., O'Callaghan, Y.C. & O'Brien, N. M., (2005). Oxidised Products of Cholesterol: Their Role in Apoptosis. *Current Nutrition & Food Science* 1: 41-51.
- Rydberg, E. K., Salomonsson, L., Hultén, L. M. *et al.*, (2003). Hypoxia increases 25-hydroxycholesterol-induced interleukin-8 protein secretion in human macrophages. *Atherosclerosis* 170 (2): 245-52.
- Salmon, S. E. & Sartorelli, A. C., (2003). Quimioterapia do câncer. *Farmacologia básica e clínica* 8 (55): 803-832.
- Salvador, J. A. R., Pinto, R. M. A., Santos, R. C. *et al.*, (2009). Bismuth triflate-catalyzed Wagner-Meerwein rearrangement in terpenes. Application to the synthesis of the 18alpha-oleanane core and A-neo-18alpha-oleanene compounds from lupanes. *Org. Biomol. Chem.* 7 (3): 508-517.
- Salvador, J. A. R., Sá e Melo, M. L. & Neves, A. S. C., (1997). Copper-Catalysed Allylic Oxidation of Δ^5 -Steroids by *t*-Butyl Hydroperoxide. *Tetrahedron* 38 (1): 119-122.
- Sato, R. & Takano, T., (1995). Regulation of intracellular cholesterol metabolism. *Cell Struct. Funct.* 20 (6): 421-7.

- Schreer, A., Tinson, C., Sherry, J.P. *et al.*, (2005). Application of Alamar blue/5-carboxyfluorescein diacetate acetoxymethyl ester as a noninvasive cell viability assay in primary hepatocytes from rainbow trout. *Anal. Biochem.* 344 (1): 76-85.
- Schroepfer, G., (2000). Oxysterols: Modulators of Cholesterol Metabolism and Other Processes. *Psychological Rev.* 80 (1): 361-554.
- Sello, G., Fumagalli, T. & Orsini, F., (2007). Recent Developments in Epoxide Preparation. *Curr. Org. Synth.* 3: 379-402.
- Sharpless, K. B. & Verhoeven, T. R., (1979). Metal-Catalyzed, Highly Selective Oxygenations of Olefins and Acetylenes with *tert*-Butyl Hydroperoxide. Practical Considerations and Mechanisms. *Aldrichimica Acta* 12 (4): 63-74.
- Sheldon, R. A. & Kochi, J. K. (1981). Metal-Catalyzed Oxidations of Organic Compounds. *Academic Press*: New York.
- Shibata, N., (2010). Macrophages, Oxysterols and Atherosclerosis. *Circulation Journal* 74: 2045-2951.
- Shinkyō, R., Xu, L. & Tallman, K., (2011). Conversion of 7-Dehydrocholesterol to 7-ketocholesterol is Catalyzed by human Cytochrome P450 7A1 and Occurs by direct oxidation without an Epoxide intermediate. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*.
- Silva, M., Carvalho, J. & Melo M., (2011). Oxiesteróis: o seu papel na saúde e na doença. *Química* 121: 53-58.
- Silva, M., Riva, S. & Melo M., (2004). Highly selective lipase-mediated discrimination of diastereomeric 5,6-epoxysteroids. *Tetrahedron: Asymmetry.* 15 (7): 1173-1179.
- Silva, T., Butera, A., Leal, D. *et al.*, (2007). Agentes antitumorais inibidores da angiogênese – modelos farmacofóricos para inibidores da integrina $\alpha\beta 3$. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.* 43 (1): 1-17.
- Simpson, F., Kerr, M. C. & Wicking, C., (2009). Trafficking, development and hedgehog. *Mechanisms of development*, 126: 279-288.
- Stearns, M. E., Wang, M., Tew, K. D. *et al.*, (1988). Estramustine binds a MAP-1-like protein to inhibit microtubule assembly in vitro and disrupt microtubule organization in DU 145 cells. *J. Cell Biol.* 107: 2647-2656.
- Stocker, R. & Keane, J.F. Jr., (2004). Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol. Rev.* 84 (4): 1381-478.
- Tian, X., Tang, H., Li, Y. *et al.*, (2011). New Cytotoxic Oxygenated Sterols from the Marine Bryozoan *Cryptosula pallasiana*. *Drugs.* 9: 162-183.
- Trousson, A., Bernard, S., Petit, P.X. *et al.*, (2009) 25-hydroxycholesterol provokes oligodendrocyte cell line apoptosis and stimulates the secreted phospholipase A2 type IIA via LXR beta and PXR. *J. Neurochem.* 109 (4): 945-58.
- Tsukida, T., Moriyama, H., Inoue, Y. *et al.*, (2004). Synthesis and biological activity of selective azasugar-based TACE inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14 (6): 1569-1572.

- Turgeon, J. L., Carr, M. C., Maki, P. M. *et al.*, (2006). Complex actions of sex steroids in adipose tissue, the cardiovascular system, and brain: Insights from basic science and clinical studies. *Endocr. Rev.* 27 (6): 575-605.
- Van der Meer, F., Faber, D. J., Aalders, M. C. J. *et al.*, (2010). Apoptosis- and necrosis-induced changes in light attenuation measured by optical coherence tomography. *Lasers Med Sci.* 25: 259-267.
- Vasto, S., Candore, G., Balistreri, C.R., *et al.*, (2007). Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. *Mech Ageing Dev.* 128 (1): 83-91.
- 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. *Mol Aspects Med.* 30 (3): 153-70.
- Virtanen, E. & Kolehmainen, E., (2004). Use of bile acids in pharmacological and supramolecular applications. *Eur. J. Org. Chem.* 2004 (16): 3385-3399.
- Visvader, J. E., (2011). Cells of origin in cancer. *Nature* 469 (7330): 314-322.
- Wang, Y., Rogers, P. M., Su, C. *et al.*, (2008). Regulation of Cholesterologenesis by the Oxysterol Receptor, LXR α . *J Biol Chem.* 283(39): 26332-26339.
- Wang, J. C., Gray, N. E., Kuo, T. *et al.*, (2012). Regulation of triglyceride metabolism by glucocorticoid receptor. *Cell Biosci.* 2 (1): 19.
- Wasowicz E. (2003). Cholesterol and phytosterols. In Chemical and functional properties of food lipids. Boca Raton: CRC press.
- Wermuth, C. G., Ganellin, C. R., Lindberg, P. *et al.*, (1998). Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations, 1997). Annual Reports In Medicinal Chemistry. *Academic Press*: San Diego, CA.
- Wermuth, C. G., (2003). The practice of medicinal chemistry. *Academic Press*: London.
- Wermuth's, (2008). The Practice of Medicinal Chemistry. 3rd Edition, Cap 2.
- Yuan, T. H., Jiang, Y., Wang, X. H. *et al.*, (2009). Synthesis, biological activity and tubulin binding poses of 1-deoxy-9-(R)-dihydrotaxane analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (4): 1148-1151.
- Zamboni, M., (2002). Epidemiologia do câncer do pulmão. *J. Pneumologia* 28 (1): 41-47.
- Zeelen, F. J., (1990). Medicinal chemistry of steroids. *Pharmaco Chemistry Library*. Vol. 15. Cap. 1.
- Zhao, S., Liao, W., Xu, N. *et al.*, (2009). Polar metabolite of cholesterol induces rat cognitive dysfunctions. *Neuroscience* 164 (2): 398-403.
- Zolotushko, J., Flusser, H., Markus, B., *et al.*, (2011). The desmosterolosis phenotype: spasticity, microcephaly and micrognathia with agenesis of corpus callosum and loss of white matter. *Eur J Hum Genet* 19: 942-946.