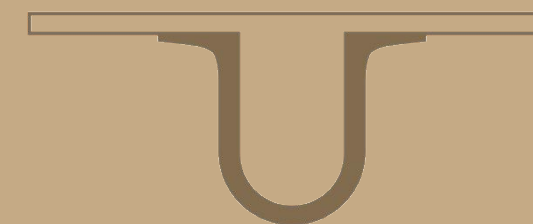




UNIVERSIDADE DE
COIMBRA



Vasco Santos Justino

**SÍNTESE DE DERIVADOS DO ESTRADIOL COM
POTENCIAL ATIVIDADE NEUROPROTETORA**

Dissertação de Mestrado em Química Farmacêutica Industrial,
orientada pelo Professor Doutor Alcino Jorge Lopes Leitão e pela
Professora Doutora Maria Manuel Cruz Silva apresentada à Faculdade
de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2018

Síntese de derivados do estradiol com potencial atividade neuroprotetora

Dissertação de Mestrado em Química Farmacêutica Industrial, orientada pelo Professor Doutor Alcino Jorge Lopes Leitão e pela Professora Doutora Maria Manuel Cruz Silva apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Vasco Santos Justino



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

FACULDADE
DE
FARMÁCIA

“Science seeks the truth. And it does not discriminate. For better or worse it finds things out. Science is humble. It knows what it knows and it knows what it doesn’t know. If you take something like fiction or any holy book and destroyed it in 1,000 years, that wouldn’t come back just as it was. Whereas if you destroyed all the science books, in 1,000 years they’d all be back because all the same tests would be the same result.”

Richy Gervais

Agradecimentos

Agradeço ao Professor Doutor Alcino Jorge Lopes Leitão e à Professora Doutora Maria Manuel Cruz Silva, orientadores desta dissertação e manifesto o meu sincero reconhecimento pelos ensinamentos ministrados, pelo apoio, pela dedicação, compreensão, paciência e sobretudo pela amizade que me dispensaram ao longo deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, Filipa Salvador, Mariana Gouveia, Daniela Marques, Salete Batista, Sofia Valdeira, Bruno Gonçalves, Vanessa Mendes e Carla Calçada pela amizade, boa disposição, companheirismo e entreaajuda.

Ao laboratório UCQFarma da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e ao Dr. Rui Manadas pelos espetros de infravermelhos dos compostos sintetizados.

Os dados de RMN foram coletados no laboratório de RMN da Universidade de Coimbra, que é apoiado em parte pelo FEDER, através do Programa COMPETE e pelos Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e Tecnologia por meio de doações REEQ/ 481/ QUI/2006, RECI/ QEQ-QFI/ 0168/ 2012, CENTRO-07 CT62-FEDER-002012, e Rede Nacional de Ressonância Magnética Nuclear (RNRMN).

À D. Graça Santiago e D. Anabela Pinto pela simpatia e apoio prestados.

Aos meus pais, amigos, colegas de mestrado e colegas de equipa o meu sincero agradecimento por todos os momentos de apoio e incentivo.

Índice

Índice de figuras	VI
Abreviaturas	VII
Resumo	IX
Abstract	X
1. Introdução	1
1.1 Esteroides	1
1.2 Estrogénios	3
1.2.1 Diferenças químicas, biológicas e estruturais entre estrogénios	3
1.2.2 Biossíntese de estrogénios	4
1.2.3 Aromatase	5
1.3 Doenças neurodegenerativas	6
1.4 Neuroproteção e hormonas sexuais	6
1.4.1 Evidências da neuroproteção por parte das hormonas sexuais	6
1.4.2 Terapia de Reposição Hormonal	8
1.4.3 Mecanismos de neuroproteção dos estrogénios	8
1.5 Relação estrutura/atividade	11
2. Objetivos	13
3. Resultados/ discussão	14
3.1 Funcionalização no anel B, na posição 6	14
3.2 Funcionalização da posição 2 do anel A	18
3.2.1 Proteção do hidroxilo por metilação	18
3.2.2 Proteção do hidroxilo com o MOMCl	19
3.2.3 Introdução do grupo hidroxilo na posição 2 do anel A	19
3.2.4 Acilação da posição 2 do anel A	20
4. Conclusão	22
5. Parte experimental	23
5.1 Equipamento laboratorial	23
5.2 Solventes e reagentes	23
5.3 Química	25
5.3.1 1,3,5(10)-estratrieno-3,17 β -diol diacetato (3,17-di-acetato- β -estradiol) (3)	25
5.3.2 3,17 β -dihidróxi-1,3,5(10)-estratrien-6-ona diacetato (6-oxo- β -estradiol diacetato) (5)	26
5.3.3 3,17 β -dimetoxi-1,3,5(10)-estratrieno (3,17-dimetil- β -estradiol) (7)	27

5.3.4	3,17 β -bis(metoximetoxi)-1,3,5(10)-estratrieno (3,17-di(metoximetoxi)- β -estradiol) (9) ...	28
5.3.5	3,17 β -bis(metoximetoxi)-1,3,5(10)-estratrien-2-ol (2-hidroxi-3,17-di(metoximetoxi)- β -estradiol) (11)	29
5.3.6	2-acetil-1,3,5(10)-estratrieno-3,17 β -diol (2-acetil- β -estradiol) (13).....	30
5.3.7	3-hidróxi-1,3,5(10)-estratrien-17-ona acetato (3-acetato-estrona) (4)	31
5.3.8	3-metóxi-1,3,5(10)-estratrien-17-ona (3-metil-estrona) (8)	32
5.3.9	3,17 β -(metoximetoxi)-1,3,5(10)-estratrien-17-ona (3-metoximetoxi-estrona) (10)	33
5.3.10	2-hidróxi-3,17 β -(metoximetoxi)-1,3,5(10)-estratrien-17-ona (2-hidroxi-3-metoximetoxi-estrona) (12).....	34
6.	Bibliografia	35

Índice de figuras

Figura 1 - Moléculas do colesterol (esquerda) e núcleo ciclopentano-peridro-fenantreno, comum aos esteroides (adptado de (Prokai e Simpkins, 2007))	1
Figura 2 - Representação esquemática geral da síntese de esteroides (Taraborrelli, 2015).....	2
Figura 3 - Metabolismo dos estrogénios (Thomas e Potter, 2013).....	3
Figura 4 - Estetrol (E4).....	4
Figura 5 - Síntese de esteroides (Arevalo, Azcoitia e Garcia-Segura, 2015).....	5
Figura 7 – Esquema geral do plano de trabalho	13
Figura 8 - Oxidação do estradiol e da estrona (Silvestre e Salvador, 2007).....	14
Figura 9 – Esquema reacional de funcionalização a C-6	15
Figura 10 - Primeiro passo da reação de oxidação com KMnO_4	17
Figura 11 – Espectro de $^{13}\text{CRMN}$ do diacetato de 6-oxo-17 β -estradiol (5).....	17
Figura 12 - Esquema da reação de metilação no E1 e E2.....	18
Figura 13 - Esquema da reação de proteção com MOMCl em E1 e E2.....	19
Figura 14 - Introdução do grupo hidroxilo na posição 2 do anel A.....	20
Figura 15 - Acilação de Friedel-Crafts em E1 e E2 (Mecanismo adaptado de (Vollhardt e Schore, 2014))	21

Abreviaturas

AD - Doença de Alzheimer

ALS - Esclerose Lateral Amiotrófica

ANT - Nucleotídeos de adenina mitocondrial

COX - Ciclooxygenase

DMAP - Dimetilaminopiridina

E1 - Estrona

E2 - Estradiol

ER α e ER β - Recetores de estrogénio α e β

GnRH - Hormona libertadora de gonadotrofinas

GP1R - Proteína G acoplada à ER1

HD - Doença de Huntington

HRT - Terapia de Reposição Hormonal

IMM - Membrana mitocondrial interna

iNOS - Sintetase de óxido nítrico

IV - Infravermelho

MS - Esclerose Múltipla

mtDNA - DNA mitocondrial

NF-kB - Fator kB nuclear

NRF-1 - Fator respiratório nuclear-1

OMM - Membrana mitocondrial externa

OMS - Organização Mundial de Saúde

P450_{scc} - Citocromo P450 enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol

PCC - Clorocromato de piridina

PD - Doença de Parkinson

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

SNC - Sistema nervoso central

StAR - Proteína reguladora aguda esteroidogénica

TFAM - Transcrição mitocondrial

TSPO - Proteína translocadora de 18 KDa

VDAC - Canal seletivo de iões dependente de voltagem

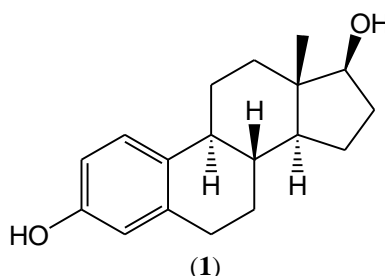
WHI - Women's Health Initiative

Resumo

Os estrogénios são potentes neuroprotetores tanto *in vitro* como *in vivo* em modelos de neurotoxicidade. Num modelo *in vivo* de neuroproteção, isquemia cerebral transitória, os estrogénios foram ativos na proteção do tecido cerebral contra esta lesão pro-oxidante.

Apesar de grande parte dos efeitos dos estrogénios no cérebro serem mediados através de recetores de estrogénio (ERs), evidências mostram que a neuroproteção também pode ser mediada por mecanismo que não envolvem o ER. Os estrogénios provavelmente atuam através do ciclo redutivo que envolve a glutatona e a HMS. Recentes estudos sugerem que os estrogénios são capazes de potenciar o potencial redutivo do HMS, e a redução do GSSH em GSH através do NADPH-induzido.

Pequenas modificações estruturais no 17β - estradiol (1) podem eliminar parcialmente ou mesmo totalmente a ligação aos ERs. Por exemplo o 17α -estradiol (17α -E2), diastereómero do 17β -E2, que é produzido naturalmente, apresenta consideravelmente menos afinidade para os recetores ER α e Er β . Estudos de estrutura atividade revelaram que modificações no anel A são as mais prováveis de aumentar o efeito neuroprotetor, no entanto modificações no anel B e C também podem ser eficientes.



Partindo do trabalho já existente de novas reações e processos para obtenção de esteróides bioativos, foram exploradas modificações seletivas de posições-chave do esqueleto de estradiol para preparar novos derivados.

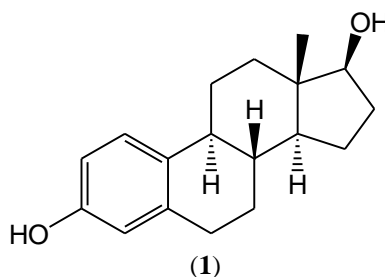
Diversas estratégias sintéticas foram usadas para modificar a estrutura do estradiol tanto no anel A como B.

Abstract

Estrogens are potent and efficient neuroprotectives both *in vitro* and *in vivo* in several models of neurotoxicity. In an *in vivo* model for neuroprotection, transient cerebral ischemia, estrogens were active in protection of brain tissue from this pro-oxidant insult.

Although many of the effects of estrogens in the brain are mediated through estrogen receptors (ERs), there is evidence that neuroprotective activity of estrogens can be mediated by non-ER mechanisms. The estrogens are likely to work through a redox cycle that involves glutathione and the HMS. Recent studies suggest they are able to tap the large reducing potential of the HMS, and through NADPH-induced reduction of GSSH to GSH, and able to apply this reducing potential to lipid membranes using estrogens as a mediator.

Minor modifications to the structure of 17β -E2 (1) can partially or completely eliminate ER-binding. For example, 17α -estradiol (17α -E2), a diastereomer of 17β -E2 produced naturally in ungulates binds to both ER α and ER β with a 40-fold lower affinity than 17β -E2. Previous studies showed that, modifications on the A ring are the most likely to enhance the neuroprotection, although modifications on rings B and C can also be efficient.



Within our framework of new reactions and processes towards bioactive steroids we have been exploring the selective modification of key positions of the estradiol scaffold to prepare new derivatives.

Diverse synthetic strategies were explored to modify the structure of estradiol rings A and B

I. Introdução

I.1 Esteroides

Os esteroides são moléculas ancestrais desenvolvidas há cerca de 2 bilhões de anos como bioreguladores primitivos entre células primordiais. São um grupo específico de lípidos, com uma grande variedade de funções e encontram-se tanto em animais como plantas (Stefanick, 2005). Nos seres humanos atuam como moléculas de sinalização e hormonas, regulando o desenvolvimento e processos fisiológicos desde a fase embrionária até à vida adulta. O colesterol (Figura 1) serve como precursor de todas as hormonas esteroides (Jefcoate, 2002; Mesmin e Maxfield, 2009). Todos os esteroides se caracterizam por terem uma estrutura comum do tipo ciclopentano-peridro-fenantreno, formando um sistema de 4 anéis (Figura 1)

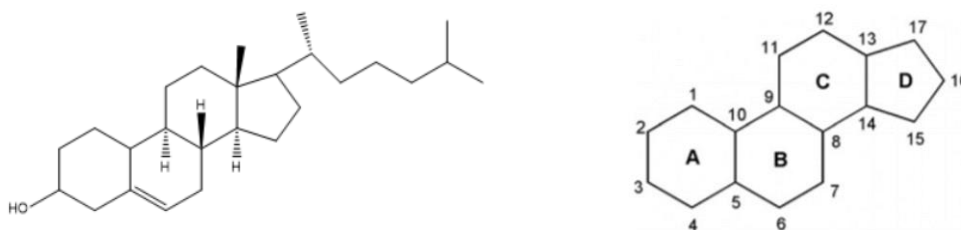


Figura 1 - Moléculas do colesterol (esquerda) e núcleo ciclopentano-peridro-fenantreno, comum aos esteroides (adptado de (Prokai e Simpkins, 2007))

A esteroidogénese é o processo biológico no qual os esteroides são gerados a partir do colesterol. Este processo quimioenzimático inicia-se com o corte na cadeia lateral do anel D do colesterol, e permite conversão do colesterol em sucessivamente em progestagénios (21C), androgénios (19C) e estrógenos (18C) dependendo das vias enzimáticas, como demonstra a (Figura 2).

Os esteroides são produzidos a nível mitocondrial e do retículo endoplasmático, em todos os tecidos humanos e, dependendo do órgão onde isto ocorre, diferentes esteroides são sintetizados:

- Os corticosteroides são produzidos no córtex adrenal;
- A testosterona é convertida em estrógenos tanto no género feminino como no género masculino;

- Os estrogénios e a progesterona são principalmente produzidos nos ovários, mas também são sintetizados noutros tecidos, incluindo o ósseo, adiposo, nervoso e ainda na placenta, durante a gravidez;

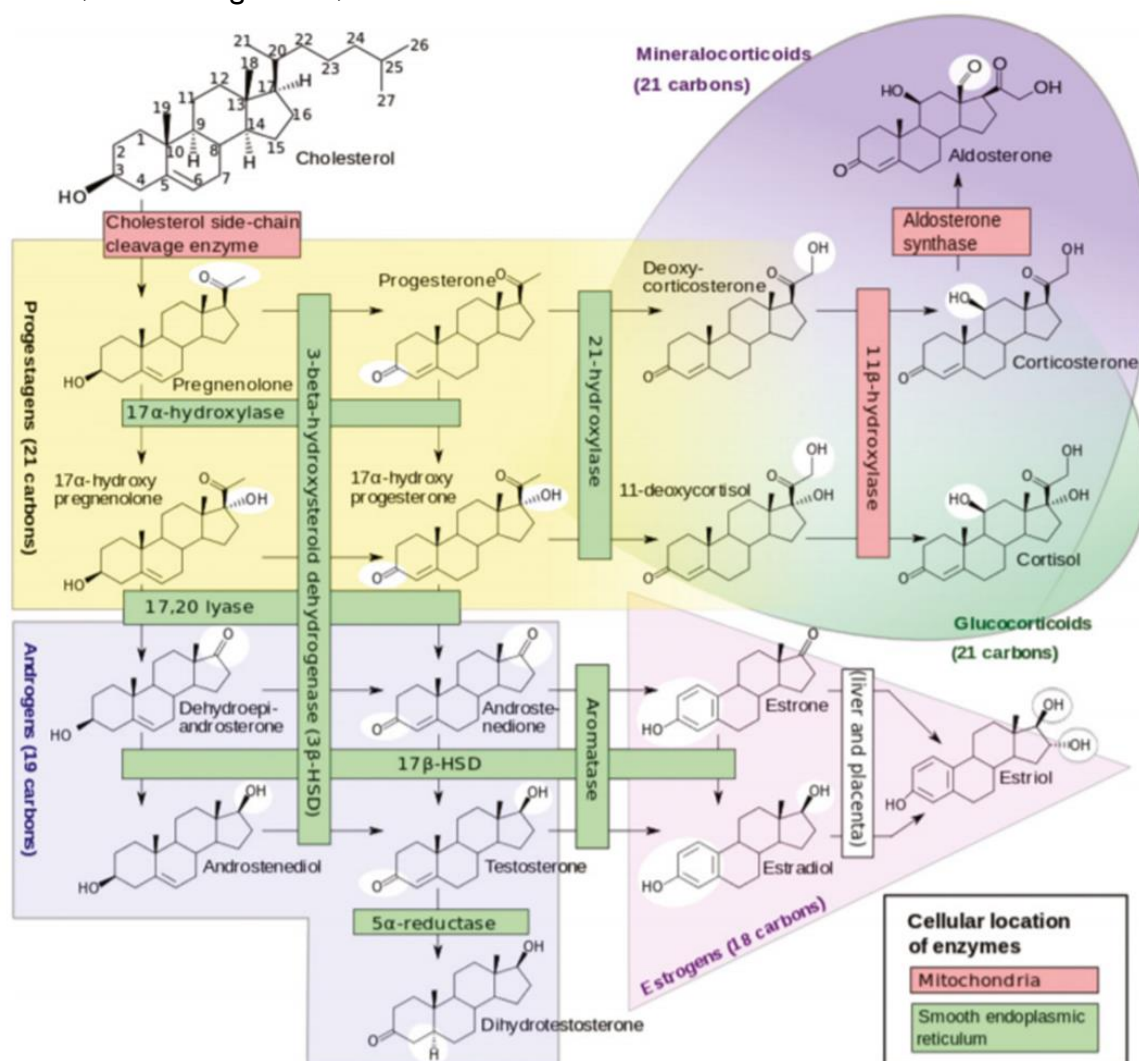


Figura 2 - Representação esquemática geral da síntese de esteroides (Taraborrelli, 2015)

Desde a sua descoberta em 1935, os esteroides são usados para o tratamento de doenças. Inicialmente foram usados na Doença de Addison (Žakelj-Mavrič et al., 1995), mas nas décadas seguintes foram encontradas novas áreas de ação como contraceção, anti-inflamatórios, antineoplásicos e a neuroproteção (Taraborrelli, 2015). Devido à sua grande variedade de propriedades farmacológicas, os esteroides são muitas vezes usados com ponto de partida em estudos de procura de novos fármacos.

1.2 Estrogénios

1.2.1 Diferenças químicas, biológicas e estruturais entre estrogénios

Os estrogénios têm vários papéis importantes no ser humano, não se limitando apenas à reprodução e ciclo menstrual. (PEPE e ALBRECHT, 1995; Silberstein e Merriam, 2000; Kamel, 2010; Linn, Murtaugh e Casey, 2012). Atuam também na prevenção de doenças cardíacas (Hu, Yin e Hartmann, 2012), na neuroproteção, na regulação do apetite no comportamento alimentar (Hirschberg, 2012) e no metabolismo de gorduras, estando também associados a alguns estados patológicos, como o cancro da mama (Chang, 2011), o desenvolvimento de osteoporose (Linn, Murtaugh e Casey, 2012) e esquizofrenia (Oosthuysen e Bosch, 2012) entre outros.

A estrutura clássica dos estrogénios é formada por 18 carbonos (18C), com uma estrutura fenólica no anel A. Os estrogénios naturalmente produzidos no corpo humano são o estradiol, a estrona, o estriol, o estetrol e os seus conjugados (Miller e Auchus, 2011). Existe um sistema dinâmico de conversão entre o 17 β -estradiol (17 β -E2), que é mais ativo, a estrona e os conjugados inativos como o sulfato de estrona e o sulfato de estradiol, como ilustrado na figura 3.

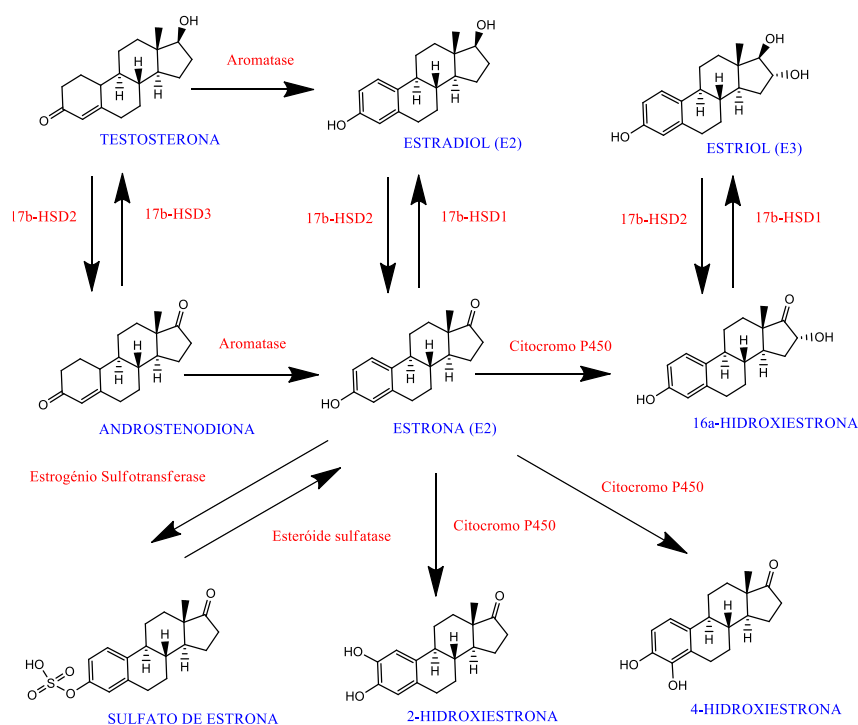


Figura 3 - Metabolismo dos estrogénios (Thomas e Potter, 2013)

O 17β -E2 é o estrogénio mais potente e importante do corpo humano. Este caracteriza-se por ter na estrutura um grupo hidroxilo na posição 17β , (ou seja, acima do plano da molécula). Para além do seu papel essencial na reprodução, o 17β -E2 tem efeitos nos mais variados processos metabólicos. É sintetizado nos ovários, placenta, células de Leydig e células adrenais, bem como fígado, endométrio, cérebro, tecidos musculares e tecidos gordos. A sua concentração varia durante o ciclo menstrual, sendo mais baixa no início da fase folicular e mais elevada na fase pré-ovulatória. Durante a gravidez a sua concentração aumenta até cerca de 100 vezes, e na pós-menopausa os seus níveis diminuem consideravelmente.

O estriol é o produto final do metabolismo estradiol-estona. É maioritariamente produzido pela redução da 16α -hidroxiestrona e pode ser reconvertido neste produto mas não na estrona ou no estradiol. O estriol é menos potente que a estrona e que o 17β -estradiol, em termos de afinidade aos recetores $ER\alpha$ e $ER\beta$.

O estetrol (Figura 4) é sintetizado no fígado fetal, e a sua função ainda é desconhecida(Thomas e Potter, 2013).

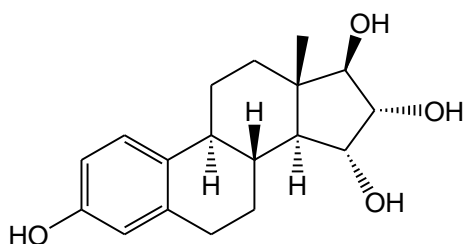


Figura 4 - Estetrol (E4)

1.2.2 Biossíntese de estrogénios

Como referido anteriormente, os estrogénios derivam do colesterol. O primeiro passo é a conversão do colesterol em pregnenolona, na membrana mitocondrial interna (IMM) (Midzak *et al.*, 2011). Neste processo estão envolvidas várias proteínas, como a proteína reguladora aguda esteroidogénica (StAR), a proteína translocadora de 18 KDa (TSPO), e o citocromo P450, enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol (P450_{scc}). A StAR e a TSPO estão envolvidas no transporte do colesterol da membrana mitocondrial externa (OMM) para a IMM. Na IMM o colesterol é então transformado em pregnenolona pelo

P450scc. A StAR, a TSPO e o P450scc formam um complexo multimolecular, em conjunto com outras proteínas, incluindo o canal seletivo de iões dependente de voltagem (VDAC), na OMM, e o translocador de nucleotídeos de adenina mitocondrial (ANT) na IMM (Arevalo, Azcoitia e Garcia-Segura, 2015), como demonstra a figura 5.

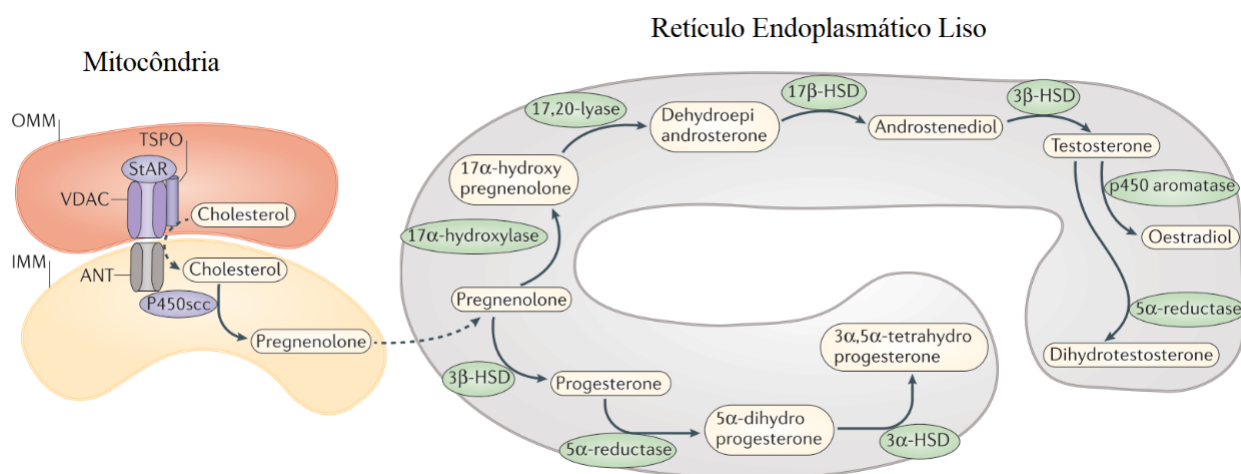


Figura 5 - Síntese de esteroides (Arevalo, Azcoitia e Garcia-Segura, 2015)

Posteriormente, a pregnenolona vai para o retículo endoplasmático liso, onde sofre hidrolisação, dando origem à progesterona, que, por sua vez, vai dar origem, através de várias reações, à testosterona e a outros esteroides, como demonstra a figura 5. Neste processo, estão envolvidas diversas enzimas, com destaque para a aromatase que, como o nome indica, permite a aromatização do anel A.

1.2.3 Aromatase

A aromatase é a enzima responsável por um passo crucial e limitador na síntese de estrogénios. É um membro da família do citocromo P450 e é responsável pela aromatização dos androgénios em estrogénios, através de uma série de hidroxilações (SIMPSON *et al.*, 1994). Esta enzima é largamente expressa em diferentes regiões do cérebro (Kuhl, 2005; Vierk *et al.*, 2012), e estudos recentes indicam que a síntese de estrogénios no hipocampo é regulada pela hormona libertadora de gonadotrofinas GnRH (Bian *et al.*, 2014), que deverá coordenar a síntese de estrogénios no cérebro e nos ovários. Além disto, a atividade da aromatase, bem como a consequente produção de estrogénios, é rapidamente regulada no cérebro pelas

sinapses glutamatérgicas. A localização sináptica da aromatase, em conjunto com a rápida regulação da sua atividade pelos neurotransmissores, sugere que os estrogénios atuam como rápidos neuromoduladores sinápticos. (Prange-Kiel *et al.*, 2008; Cornil, Ball e Balthazart, 2012;). De facto, rápidas alterações dos níveis de aromatese no cérebro estão ligadas a alterações na função sináptica, atividade cerebral e comportamento (Prange-Kiel *et al.*, 2008; Remage-Healey, Saldanha e Schlinger, 2011). Assim, a síntese de estrogénios no cérebro é modelada pelas alterações da atividade da aromatase, mostrando que esta enzima tem um papel importante na regulação da função cerebral.

1.3 Doenças neurodegenerativas

A população mundial está a envelhecer a esperança de vida à nascença aumentou 6 anos nas últimas 3 décadas, esperando-se que, em 2050, a proporção de adultos com mais de 60 anos atinja os 22%, a nível mundial. Este aumento tem como consequência direta um crescimento da incidência de doenças relacionadas com a idade, em particular as doenças neurodegenerativas. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças neurodegenerativas em conjunto com as doenças cardiovasculares, são a maior causa de morte no mundo ocidental. A OMS estima que 47 milhões de pessoas sofram de demência, com cerca de 10 milhões de novos casos todos os anos. (world health statistics, 2017)

As doenças neurodegenerativas incluem mais de 600 doenças e caracterizam-se pela degeneração progressiva e/ou morte neuronal. Esta degradação pode afetar o movimento do corpo – ataxias – e o funcionamento do cérebro, originando demência. Existem vários tipos de doenças neurodegenerativas como são exemplos a Doença de Alzheimer (AD), a Doença de Parkinson (PD), Esclerose Lateral Amiotrófica (ALS), a Doença de Huntington (HD) e a Esclerose Múltipla (MS) (Nuzzo e Marino, 2016; Paganoni e Schwarzschild, 2017).

1.4 Neuroproteção e hormonas sexuais

1.4.1 Evidências da neuroproteção por parte das hormonas sexuais

Apesar de o envelhecimento afetar tanto o género feminino com o masculino, em todas as espécies de animais, incluindo os humanos, vários estudos demonstram que existem diferenças entre os géneros. De fato, em todos os mamíferos, seres do género feminino têm esperança média de vida mais elevada (Promislow, 1991). A PD tem uma maior prevalência em homens do que em mulheres, em idades mais baixas (Gillies *et al.*, 2014), e ainda, homens com mais de 40 anos têm volumes menores em diferentes áreas do cérebro (Coffey *et al.*, 1998; Jack *et al.*, 2015), e piores performances em testes de memória, do que as mulheres da mesma idade (Jack *et al.*, 2015). Por outro lado, mulheres na pós-menopausa têm uma maior prevalência para a AD do que homens, bem como um declínio cognitivo mais rápido (Li e Singh, 2014; Zagni, Simoni e Colombo, 2016). Apesar de poder parecer um paradoxo que as mulheres vivam mais que os homens depois da menopausa, estudos mostram uma correlação entre a menopausa em idade mais avançada e a longevidade, o que sugere que a exposição ao estrogénio durante mais tempo retarda o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Shadyab *et al.*, 2017).

Um fator que comprova que os estrogénios deverão ter um papel importante nesta diferença entre os sexos é que os recetores de estrogénio (ERs) estão largamente distribuídos pelo cérebro (Hara *et al.*, 2015), tendo um importante papel na regulação de inúmeros processos como a cognição, regulação da temperatura corporal, ansiedade e comportamento sexual (Rego, Do *et al.*, 2009).

Estudos em ratos de género feminino demonstraram que, diminuindo os níveis de estradiol no plasma através de uma ovariectomia, aumenta o dano cerebral em ratos com doenças neurodegenerativas (Azcoitia *et al.*, 1999, 2001; Overk *et al.*, 2012; Yue *et al.*, 2005). Além disso, provou-se também que diminuía o metabolismo de glucose no cérebro, e que aumentavam a β -amiloide oligomerase, em modelos de ratos com AD. Por sua vez, com a reposição dos níveis de estradiol nos ratos que foram ovariectomizados, através de hormonoterapia, mostrou-se a redução lesão cerebral (Azcoitia *et al.*, 1999; Ding *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2018), normalizando também o metabolismo da glucose cerebral e diminuindo a β -amiloide oligomerase.

Outra importante evidência de que o estradiol é neuroprotetor é-nos dada pela observação, em ratos e aves, de que a resposta do cérebro a uma lesão é um aumento da expressão e atividade da aromatase. Este facto foi inicialmente observado em ratos, do sexo masculino e feminino, que depois de uma lesão excitotóxica no hipotálamo e depois de lesões

provocadas por ferimentos de facada no córtex cerebral, hipotálamo e outras regiões cerebrais, registaram um aumento da expressão e da atividade da aromatase (Garcia-Segura *et al.*, 1999). O mesmo foi posteriormente observado em aves (Peterson *et al.*, 2004). Além disso, a expressão da aromatase foi detetada num padrão sexualmente dimórfico nas células endoteliais, após lesão cerebral (Zuloaga *et al.*, 2014).

A importância da aromatase como enzima neuroprotetora em humanos é evidenciada pela existência de variações genéticas da enzima que conferem um aumento do risco de AD. Estas diferenças genéticas resultam numa diminuição na síntese de estradiol no cérebro (Chace *et al.*, 2012; Huang, 2006; Iivonen *et al.*, 2004; Medway *et al.*, 2014)

1.4.2 Terapia de Reposição Hormonal

Estudos em animais demonstram que a Terapia de Reposição Hormonal (HRT) é benéfica (Ding *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2018) e inúmeros estudos pré-clínicos, epidemiológicos, bem como alguns estudos clínicos demonstram que a HRT tem efeitos na memória, cognição e reduzem o risco de AD (Sherwin, 2006). Apesar disto, um estudo da Women's Health Initiative (WHI), sendo o maior envolvendo mulheres na pós-menopausa, sugere o contrário (Rettberg, Yao e Brinton, 2014). No entanto, a população deste estudo era diferente dos anteriores, porque a maioria das mulheres já tinha tido o início da menopausa anos antes do início de estudo. Uma análise mais aprofundada dos dados, apoiada em mais estudos epidemiológicos, sugere que a HRT apenas é benéfica para o cérebro num limitado período de tempo após o início da menopausa, quando o cérebro ainda está saudável, por isso a HRT deve ser começada antes do início da menopausa (Rettberg, Yao e Brinton, 2014)(Miller e Harman, 2017). É ainda de referir que existem outros fatores que são necessários ter em conta quando é avaliada a efetividade da HRT, como o tipo de estrogénios usados, bem como a sua conjugação com a progesterona, a via de administração (oral ou transdérmica) e a posologia(Miller e Harman, 2017).

1.4.3 Mecanismos de neuroproteção dos estrogénios

Tal como outras hormonas esteroides, os estrogénios exercem a sua atividade ligando-se aos recetores de estrogénio (ER α e ER β), que atuam como fatores de transcrição

dependentes de ligantes para regular a expressão de genes alvo (McDevitt *et al.*, 2008). No entanto, nos últimos anos ficou claro que a neuroproteção por parte dos estrogénios não está apenas associada à sua ligação aos recetores, sendo que esta resposta também é desencadeada por outras vias, como a ação sobre a proteína G acoplada à ERI (GPER1) (Rettberg, Yao e Brinton, 2014) e ainda à atividade antioxidante que é obtida pela interação dos estrogénios no citoplasma com radicais-livres, parando o processo oxidativo/inflamatório (Green, Bishop e Simpkins, 1997).

Além de serem expressos em grande quantidade e em regiões relacionadas com a reprodução e com funções neuroendócrinas, como o hipotálamo, os recetores de estrogénio estão largamente representados no cérebro e presentes em compartimentos nucleares e não nucleares, incluindo a mitocôndria (Kelly e Levin, 2001; Li *et al.*, 2015; Psarra e Sekeris, 2008). Apesar do mecanismo pelo qual os estrogénios regulam funções na mitocôndria ainda não estar totalmente compreendido, foi descrito que estes têm funções diretas e indiretas nessa regulação (Klinge, 2017). Os estrogénios estão envolvidos em diferentes ações das mitocôndrias na função neuronal, incluindo biogénese (Arevalo, Azcoitia e Garcia-Segura, 2015; Garcia-Segura *et al.*, 1998; Kemper *et al.*, 2014; Mo *et al.*, 2013; Nilsen e Brinton, 2003) e ainda morfologia (Arnold, Araujo, de e Beyer, 2008). A maioria dos processos envolvendo os estrogénios nestes organelos são mediados pela presença de ERs. A sua presença sugere que os estrogénios devem modular as funções da mitocôndria através da transcrição de DNA mitocondrial (mtDNA) (Chen *et al.*, 2004). Os estrogénios, para além deste mecanismo, também regulam funções através do mecanismo nuclear clássico, regulando a transcrição nuclear de diversas proteínas como por exemplo o fator respiratório nuclear-1 (NRF-1) co-ativador da transcrição génica PGC-1 (Kemper *et al.*, 2014; Klinge, 2017). Estas proteínas estão envolvidas na biogénese mitocondrial, assim como, nas cadeias mitocondriais de transporte de eletrões (Klinge, 2017). Além disso, também regulam a transcrição mitocondrial (TFAM), que é responsável pela transcrição e replicação de mtDNA (Virbasius e Scarpulla, 1994; Kang, Kim e Hamasaki, 2007). Os efeitos do estrogénio na mitocôndria são bastante relevantes se considerarmos que a acumulação de mutações de mtDNA deverá estar relacionada com o início de algumas desordens a nível neurológico (Barja, 2004; Cantuti-C *et al.*, 2005; Kujoth *et al.*, 2007).

O sistema nervoso central (SNC) é um tecido imuno-privilegiado, isto é, as células periféricas não têm acesso ao cérebro e tem células imunes residentes para o proteger contra

possíveis agressores. Num cérebro saudável, a microglia está num estado de repouso, sendo a primeira linha em caso de algum distúrbio (Chakrabarti *et al.*, 2014). A microglia é composta por células imunes que estão envolvidas nas doenças neurodegenerativas e os estrogénios têm parte integrante nesta atividade. Estudos em animais demonstram que ratos do género feminino jovens têm níveis mais baixos de neuroinflamação induzida, enquanto os ratos fêmeas com os ERs comprometidos demonstram níveis superiores e semelhantes a ratos do género masculino (Villa *et al.*, 2016). A regulação neuroinflamatória por parte dos estrogénios tem um papel importante na neuroproteção, suprimindo a ativação da microglia, no recrutamento de monócitos e inibição de mediadores pró-inflamatórios como as citocinas, quimiocinas e sintetase de óxido nítrico (iNOS) (Chakrabarti *et al.*, 2014; Stacey, Bhav e Uht, 2016). Os estrogénios controlam a localização do fator kB nuclear (NF-kB) nas células. Esta proteína controla a expressão de DNA, inibindo assim a sua translocação para o núcleo e ligação aos genes promotores. Durante este processo os estrogénios controlam a expressão de inúmeros genes, incluindo genes pró-inflamatórios como a ciclooxigenase (COX) (Villa *et al.*, 2016). A expressão excessiva da COX-2 contribui para a morte neuronal e foram encontrados níveis elevados de COX-2 no hipotálamo de doentes de Alzheimer após a sua morte (Stacey, Bhav e Uht, 2016).

Uma das causas de danos neuronais são os radicais-livres, que estão associados com o desenvolvimento e progressão de doenças neurodegenerativas (Varadarajan *et al.*, 2000). Os estrogénios têm efeito antioxidante devido à sua capacidade de eliminar estes radicais livres (Prokai-Tatrai *et al.*, 2008), que foi possível descobrir pelo estudo em relações de estrutura/atividade. O processo envolve a transferência do átomo de hidrogénio (H) interrompendo a reação da cadeia de radicais-livres, como no caso da peroxidação lipídica (Prokai-Tatrai *et al.*, 2008) ($R = LO$, onde L representa um lípido), como indicado na figura 6.

Apesar de vários investigadores terem tentado limitar a atividade neuroprotetora dos estrogénios a apenas um mecanismo predominante, parece claro que isso não é possível e que todos os mecanismos são importantes, o que torna difícil o processo de tentar potenciar a sua atividade e bastante importante fazer alterações estruturais nas moléculas para melhor perceber a sua estrutura/atividade.

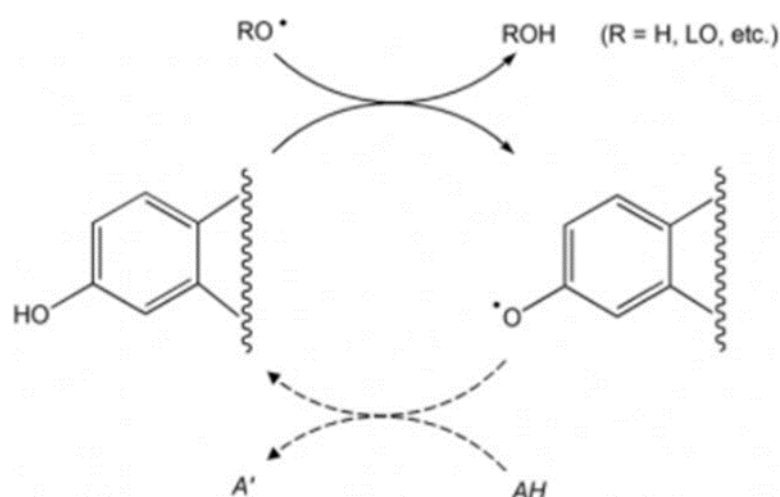


Figura 6 - Mecanismo antioxidante; O esquema mostra apenas a parte da molécula que participa nesse modo de ação. As setas contínuas representam a transferência do átomo H de quebra de cadeia, enquanto as setas tracejadas indicam a conversão do radical fenoxil de volta ao composto fenólico por um redutor endógeno (AH)(Prokai e Simpkins, 2007).

1.5 Relação estrutura/atividade

Apesar de não existir apenas um mecanismo de ação que explique a neuroproteção por parte dos estrogénios, é possível estabelecer algumas relações entre a estrutura da molécula e a neuroproteção. O estrogénio que tem mais afinidade para os recetores é o 17β -estradiol tornando-o o mais potente ativador da via genómica clássica (Turgeon, 2004) e estudos demonstram que até pequenas alterações na sua estrutura diminuem esta atividade, como é exemplo o 17α -E2 que tem muito menos afinidade para os recetores (Perez *et al.*, 2005). Com base no 17β -E2 foram feitos estudos demonstrando que, em geral, os ERs não são tolerantes a alterações do 17β -E2 com substituintes polares. Foi demonstrado também que substituintes hidrofóbicos de pequenas dimensões nas posições 4, 12β , 14, e 16α podiam aumentar a afinidade aos ER e ainda que substituintes hidrofóbicos de grandes dimensões eram tolerados nas posições 7α , 11β e 17α (Anstead, Carlson e Katzenellenbogen, 1997; Paterni *et al.*, 2014).

Vários estudos demonstram que, para a manutenção da atividade neuroprotetora, é necessário a manutenção do anel A fenólico. Modificações no anel D têm pouco efeito na neuroproteção e a adição de grupos polares nos anéis B e C tende a reduzir a neuroproteção (Perez *et al.*, 2005). Foi demonstrado também um aumento acentuado na neuroproteção com

a adição de grupos não polares nas posições 2 e 4 no anel A, e ainda que grupos muito grandes no anel A também aumentam a neuroproteção. A presença de duplas ligações no anel B e C também aumenta a neuroproteção (Engler-Chiurazzi, Covey e Simpkins, 2017). Derivados de estrogénios com substituintes lipofílicos aumentam a distribuição pela membrana aumentando a sua atividade, e diminuem a afinidade aos ERs evitando os efeitos de feminização. A introdução de grupos hidroxilo nas posições 2 e 4 do anel A, aumenta a capacidade antioxidante e conseqüentemente aumenta a neuroproteção (Prokai-Tatrai *et al.*, 2008; Engler-Chiurazzi, Covey e Simpkins, 2017).

2. Objetivos

O estradiol e a estrona são moléculas endógenas no corpo humano com uma grande multiplicidade de atividades no ser humano, entre elas, a neuroproteção. Por isso, este estudo tem como objetivo principal realizar alterações estruturais nestas moléculas que possam potenciar a sua atividade neuroprotetora.

Em estudos previamente realizados, foi descrito que as alterações nos anéis A, B e C poderiam potenciar a atividade neuroprotetora destes compostos. Neste seguimento, foram realizadas experiências no sentido de obter o maior número de moléculas diferentes por modificações tanto no anel A como no anel B, o esquema geral do plano de trabalho encontra-se representado na figura 7.

Estas moléculas serão futuramente avaliadas biologicamente, testando a sua atividade neuroprotetora no hipotálamo.

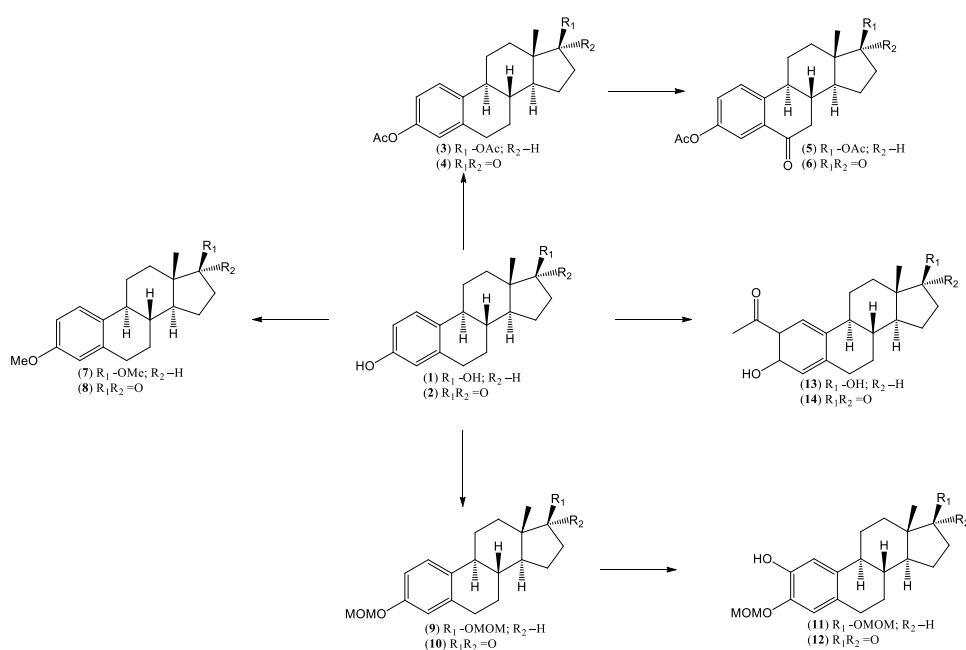


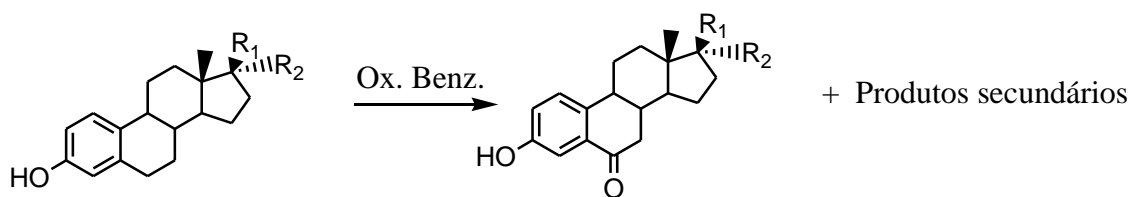
Figura 7 – Esquema geral do plano de trabalho

3. Resultados/ discussão

3.1 Funcionalização no anel B, na posição 6

Para funcionalizar o anel B decidimos fazer uma oxidação benzílica, que nos permite introdução de um grupo carbonilo, de uma oxima ou um grupo hidroxilo ou até mesmo uma dupla ligação entre 6-7 entre outras alterações. As oxidações alílica e benzílica são reações de enorme interesse sintético. Este tipo de reações é considerado um dos métodos fundamentais para a funcionalização C-H e, através desta funcionalização o interesse sintético e comercial da molécula tem um aumento bastante significativo (Weidmann e Maison, 2013). Na química clássica, as oxidações eram feitas com quantidades estequiométricas de reagentes à base de crómio ou selénio, ou então com procedimentos de várias etapas envolvendo halogenação, substituição do halogeno por um grupo hidroxilo e finalmente a oxidação. Mas estes procedimentos não seguem os princípios da química verde, porque o crómio e o selénio são extremamente tóxicos, e os outros procedimentos têm uma economia atômica insatisfatória, não sendo aceitáveis na química industrial moderna (Anastas e Warner, 1998).

A oxidação benzílica seletiva de esteroides, nomeadamente estradiol e estrona, constitui uma aplicação importante desta reação em química fina e farmacêutica. Contudo, há poucos processos conhecidos neste tipo de oxidação em esteroides e os rendimentos obtidos são geralmente baixos porque se formam vários compostos como demonstra a figura 8, neste trabalho apenas tentamos isolar o 6-oxo-17 β -estradiol.



Produtos secundários possíveis

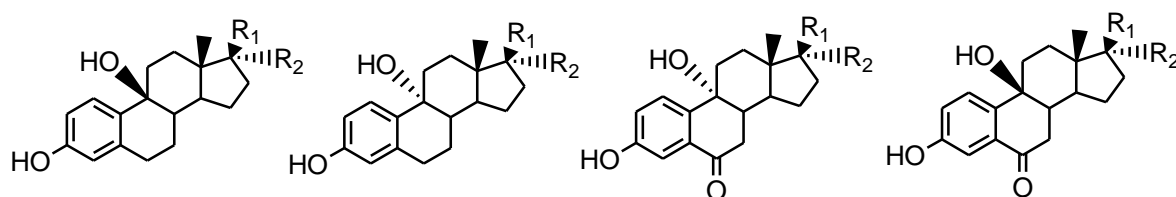


Figura 8 - Oxidação do estradiol e da estrona (Silvestre e Salvador, 2007)

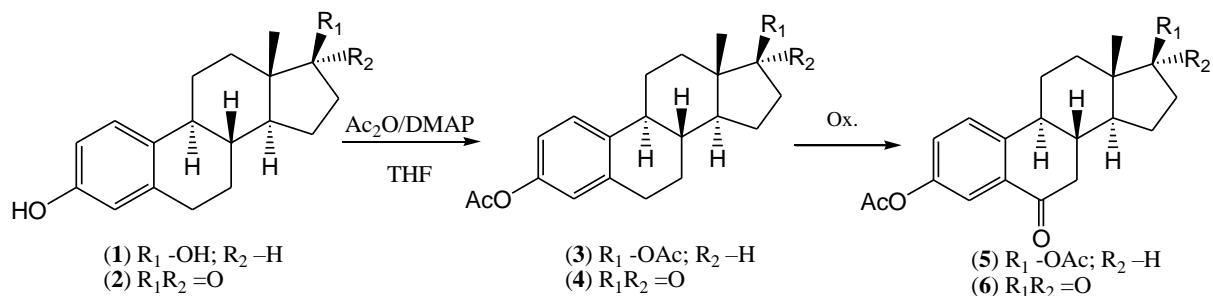


Figura 9 – Esquema reacional de funcionalização a C-6

Para oxidar o anel B, é necessário proteger grupos hidroxilo. Na estrona existe apenas um hidroxilo, na posição 3 do anel A, mas no estradiol existem 2, na posição 3 (anel A) e na posição 17 (anel D). Através da análise da literatura existente, optámos por acetilar os grupos hidroxilo, por ser uma reação simples e versátil para proteção de grupos com grande reatividade como aminas, álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos, grupos hidroxilo (Avery, 1999; Sartori et al., 2004). A maneira mais comum de acetilação na presença de grupo hidroxilo é utilização o anidrido acético em piridina. Como a piridina é um solvente muito tóxico e com mau odor, foi usado tetrahydrofurano (THF) como solvente e a 4-dimetilaminopiridina (DMAP) como base, em quantidades catalíticas (Gonçalves et al., 2016).

Após a proteção, foram testadas várias formas de oxidar o substrato apenas na posição 6 do anel B mas nenhuma foi específica nem completa, mantendo bastante substrato inicial, e formando diversos produtos. Na tabela seguinte encontram-se os procedimentos usados para oxidar bem como os seus resultados.

Tabela 1. Estudos da oxidação benzílica no composto 3

Procedimento	Resultados
Fez-se reagir o substrato, dissolvido em diclorometano com clorocromato de piridína (PCC) (até 3 equivalentes molares) (Mons, S.; Lebrau, L.; Mioskowski, 1998)	O substrato continuou em grande quantidade, e formaram-se 3 diferentes produtos, com um rendimento inferior a 10%.
Fez-se reagir o substrato, dissolvido com benzeno com PCC e celite em refluxo a 80 °C, durante a noite. (até 2 equivalentes molares) (Mons, S.; Lebrau, L.; Mioskowski, 1998)	O substrato continuou em grande quantidade, e formaram-se 3 diferentes produtos, com um rendimento inferior a 10%.
Fez-se reagir o substrato, dissolvido em diclorometano com uma mistura de MnO ₂ e KMnO ₄ (até 3 equivalentes molares) (Shaabani et al., 2004)	O substrato continuou em grande quantidade, e formaram-se diferentes produtos, com um rendimento inferior a 10%.
Fez-se reagir o substrato, dissolvido em diclorometano com uma mistura de KMnO ₄ e Fe ₂ (SO ₄) ₃ , adicionou-se também água e t-butanol. (até 3 equivalentes molares) (Singh e Lee, 2001)	O substrato continuou em grande quantidade, embora menor que nas reações anteriores. Formaram-se diferentes produtos, com um rendimento inferior a 20%, apesar disso, foi possível recuperar o substrato e repetir a reação.

Como demonstra a tabela, os melhores resultados para a oxidação foram obtidos com o permanganato de potássio. O permanganato é bastante usado na síntese orgânica por ser um reagente pouco dispendioso e por ser solúvel em água, sendo por isso, normalmente usado em solução aquosa. Apesar disso a maioria dos substratos não é solúvel em água por este fato usa-se uma mistura miscível com água e solvente orgânico, para tanto o permanganato como o substrato se encontrarem dissolvidos. O mecanismo do KMnO₄ é bastante complicado e atua de várias formas mas o primeiro passo encontra-se demonstrado na figura 10 (Chauhan, 2014).

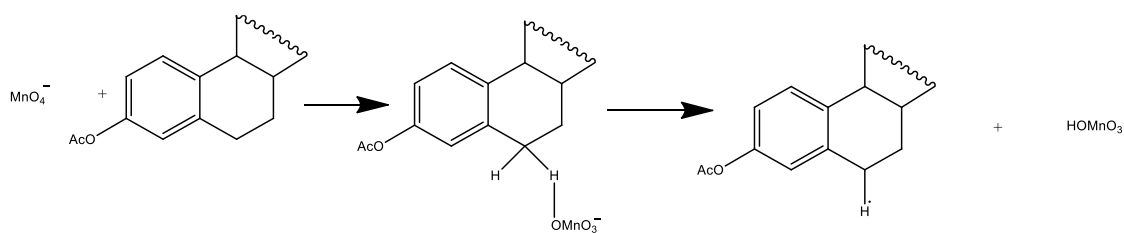


Figura 10 - Primeiro passo da reação de oxidação com KMnO_4

Através da análise do espectro de carbono da figura 9, fica claro que o composto obtido é o 6-oxo- β -estradiol diacetato (**5**), porque o sinal que se encontra a 196,85 ppm é o carbono 6 do anel B e os sinais a 171,10 e 169,47 ppm correspondem aos carbonos carbonílicos dos grupos acetato a 3 e 17.

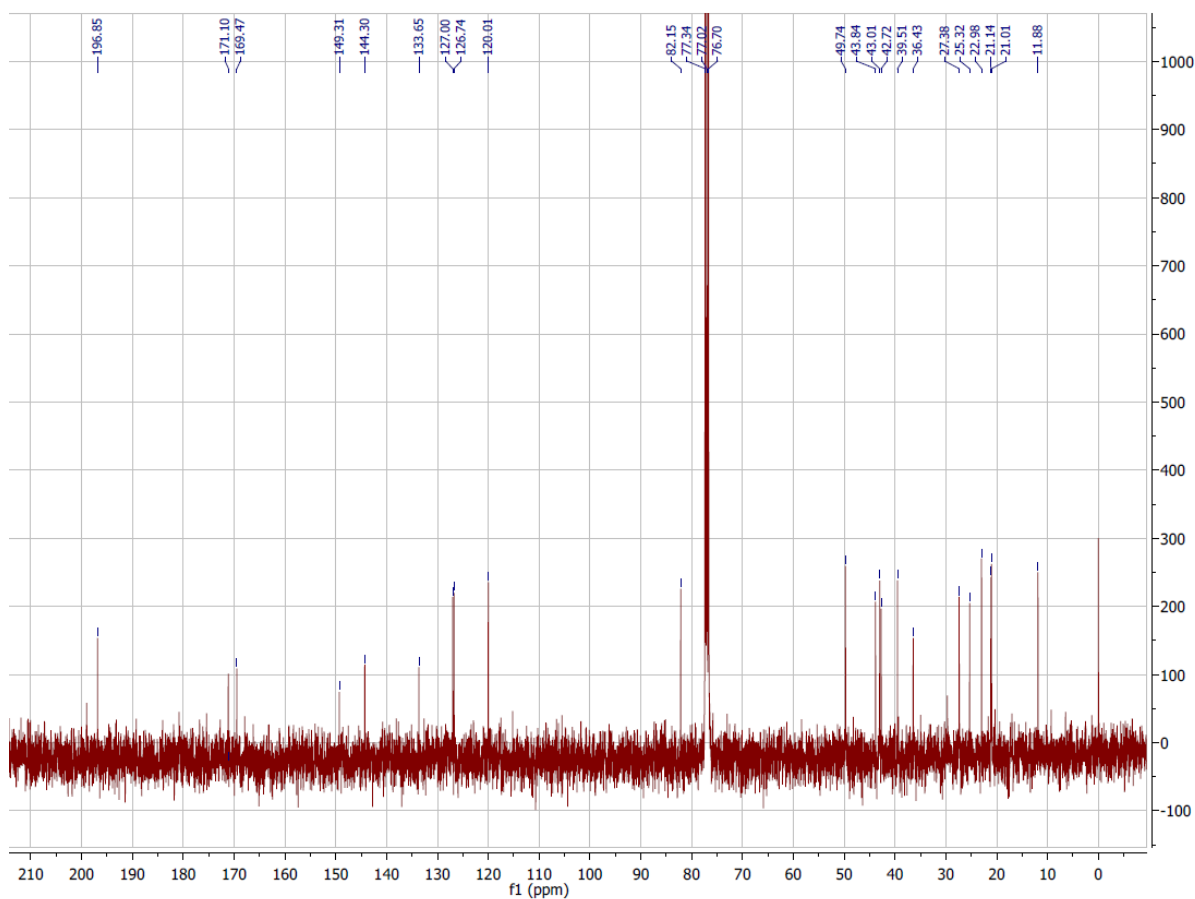


Figura 11 – Espectro de $^{13}\text{CRMN}$ do 6-oxo- β -estradiol diacetato (**5**)

3.2 Funcionalização da posição 2 do anel A

Nos estudos de relação estrutura-atividade de estrogénios atrás indicados, indica-se que a modificação do anel A, quer pela introdução de grupos hidroxilo na posição 2, quer pela introdução de grupos não polares, potenciava a sua atividade neuroprotetora. Por isso, um dos objetivos deste trabalho foi a alteração do anel A do estradiol e a consequente obtenção deste tipo de derivados. Os rendimentos obtidos foram inferiores aos encontrados na literatura mas não tivemos oportunidade de otimizar as condições reacionais.

Em alguns casos, foi necessário proteger previamente os grupos hidroxilo, tanto na estrona como no estradiol e, para isso, optamos por duas técnicas distintas: a metilação e a introdução do grupo dimetil éter.

3.2.1 Proteção do hidroxilo por metilação

Para a metilação dos substratos testámos duas técnicas na literatura, uma com iodeto de metilo (ICH_3) (Lugemwa, Shaikh e Hochstedt, 2013), e outra com dimetilsulfato ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_4\text{S}$) (Brosa et al., 1989). Optamos pelo dimetilsulfato porque o iodeto de metilo é muito reativo e o seu manuseamento torna-o perigoso. Nesta reação o hidróxido de potássio (KOH) atua como catalisador, o dimetilsulfato actua como um reagente eletrófilo, na presença do hidróxido de potássio, e utilizou-se também o THF como solvente. A reação baseia-se numa substituição eletrofílica com a introdução do grupo metilo.

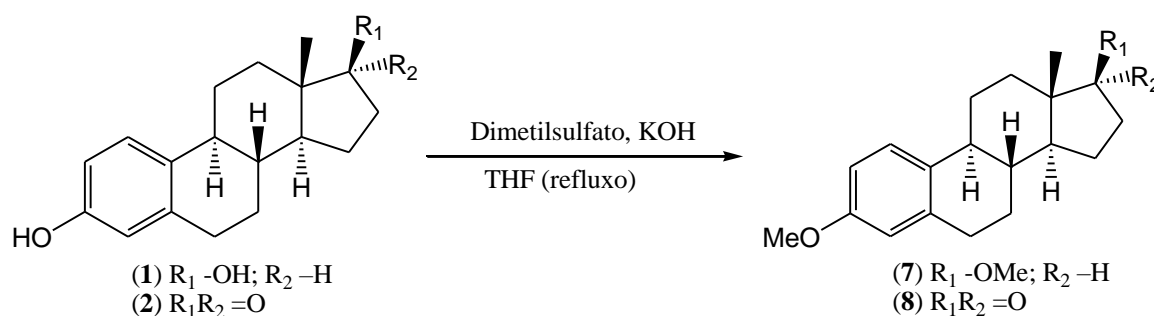


Figura 12 - Esquema da reação de metilação no E1 e E2

3.2.2 Proteção do hidroxilo com o MOMCl

O clorometil metil eter (MOMCl) é um reagente mais usado quando se quer proteger grupos álcool e grupos fenólicos e torna-os não suscetíveis a condições básicas, e participa numa grande variedade de reações de formação de ligações C-C como precursor eletrofílico (Avery, 1999). O MOMCl é bastante perigoso de manusear e recentes estudos indicam ser carcinogénico (Berliner e Belecki, 2005).

A di-isopropilamina é uma amina secundária, e uma base orgânica forte que vai retirar os prótons dos grupos hidroxilo, deixando-os disponíveis para a introdução dos grupos MOMO.

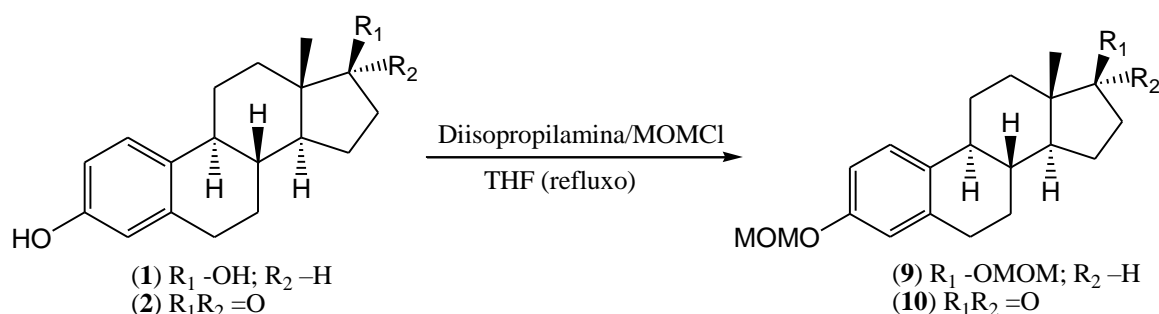


Figura 13 - Esquema da reação de proteção com MOMCl em E1 e E2

3.2.3 Introdução do grupo hidroxilo na posição 2 do anel A

Devido à falta de tempo, apenas introduzimos o grupo hidroxilo no substrato protegido com o dimetil éter, que nos pareceu o grupo protetor mais indicado para o processo seguinte. Após a proteção como o grupo dimetiléter (MOMO), foi introduzido o grupo hidroxilo na posição 2 do anel A. Devido à elevada reatividade dos reagentes esta reação teve de ocorrer a $-78^{\circ}C$. O *sec*-butilítio é um reagente de organólítio que funciona como uma base forte, capaz de desprotonar o carbono 2 do anel A por estar numa posição orto- e esta ser a posição mais desimpedida. (Wietelmann e Bauer, 2000). Posteriormente foi adicionado ao meio reacional o trimetóxido de boro $B(OMe)_3$ que funciona como um eletrófilo e retira o lítio formando $LiOMe$. Por fim é adicionado o perborato de sódio $NaBO_3$ que vai oxidar a posição 2 formando o composto desejado como mostra na figura 14.

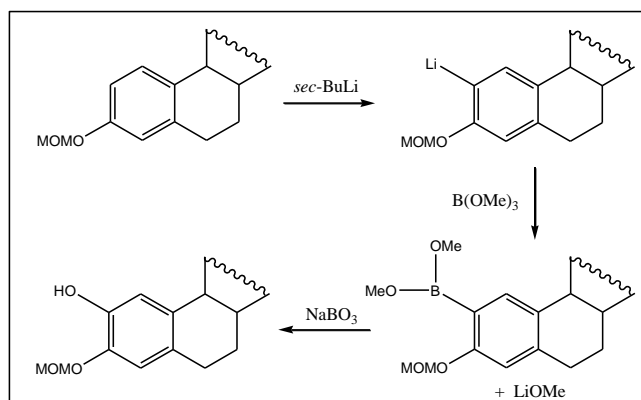
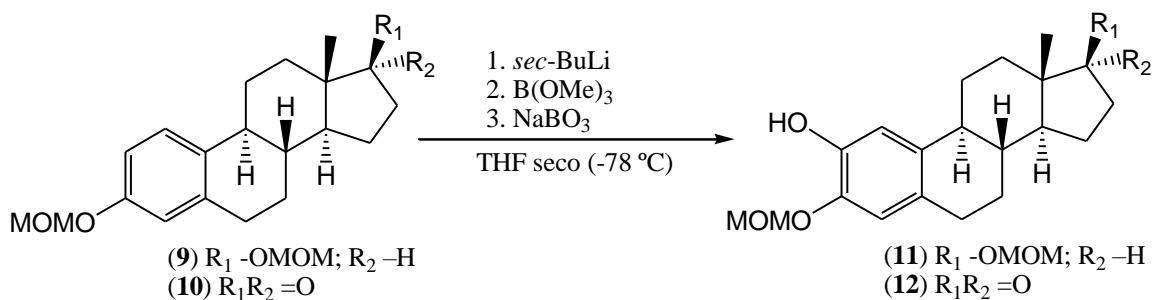


Figura 14 - Introdução do grupo hidroxilo na posição 2 do anel A

3.2.4 Acilação da posição 2 do anel A

A acilação de Friedel-Crafts foi a última reação que nos propusemos a realizar com o objetivo de introduzir um grupo acilo na posição 2 do anel A que, pela análise de relações de estrutura-atividade (Perez et al., 2005), nos parecia ser uma molécula potencialmente neuroprotetora. Contudo, apenas conseguimos realizar esta reação no estradiol e com rendimentos extremamente baixos. Na reação com a estrona formaram-se diversos compostos diferentes com fatores de retenção muito similares o que tornou impossível de separar todos os compostos, tanto por coluna como por placas cromatográficas preparativas.

Nesta reação usamos, como ácido de Lewis, o cloreto de alumínio anidro que é provavelmente o mais usado e mais poderoso. É muito reativo, e pode explodir em contacto com a água, sendo por isso necessário muito cuidado no seu manuseamento e garantir que o meio se encontra anidro. O anidrido acético é usado como um agente de acilação.

O esquema e o mecanismo desta reação encontram-se na figura 15.

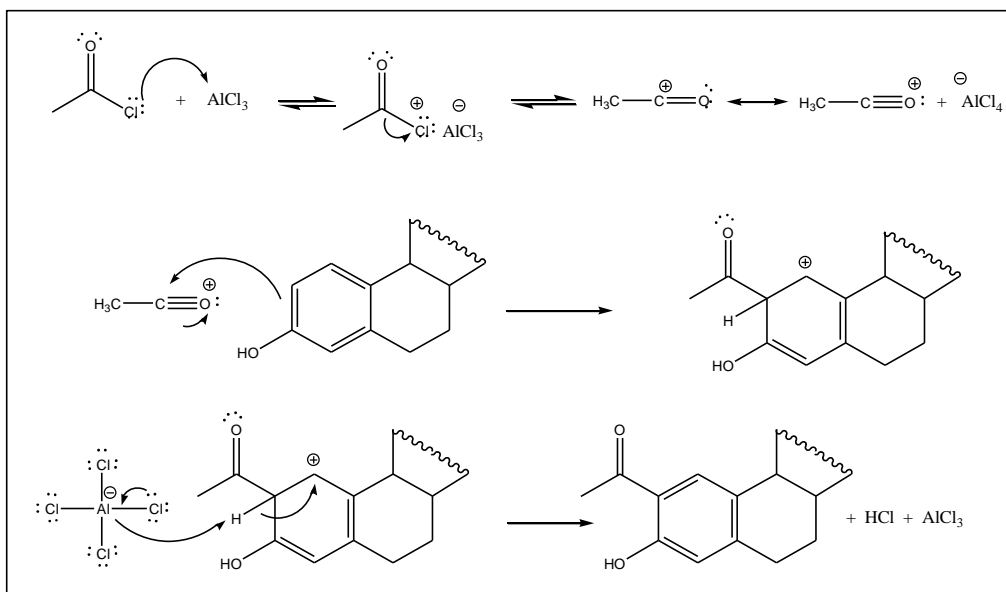
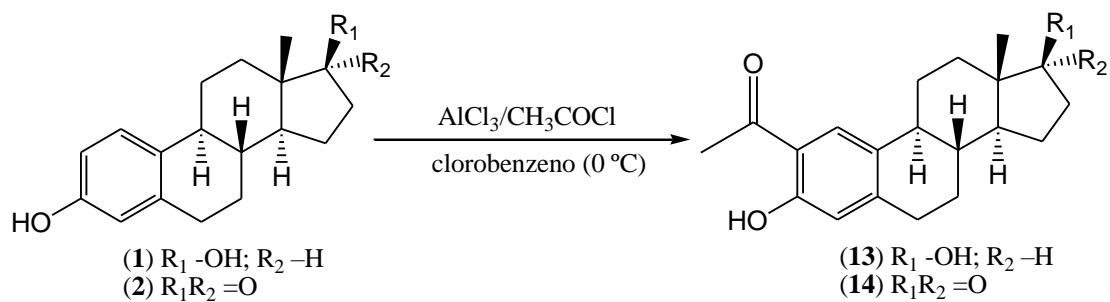


Figura 15 - Acilação de Friedel-Crafts em E1 e E2 (Mecanismo adaptado de (Vollhardt e Schore, 2014))

4. Conclusão

O elevado número de estudos realizados com derivados de estradiol nos últimos anos demonstra o potencial destes derivados na neuroproteção, por este facto serão necessários mais estudos estrutura/atividade para realmente compreender os locais que potenciam esta atividade, e também a síntese de um maior número de compostos.

Este trabalho tinha como objetivo sintetizar derivados do estradiol e da estrona com potencial atividade neuroprotetora e posterior elucidação estrutural, principalmente através de técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de protão e carbono e espectroscopia de infravermelho (IV).

A estratégia definida inicialmente passava pela modificação estrutural do anel A e B e sintetizar as moléculas que estão demonstradas na figura 7, em ambos os anéis conseguimos fazer modificações estruturais. Todas as reações realizadas foram de encontro às perspetivas teóricas iniciais, exceto a reação de Friedel-Crafts na estrona, que não foi possível purificar e caracterizar o composto e a oxidação benzílica também na estrona por ter um rendimento muito baixo. Alguns dos compostos tiveram um rendimento mais baixo que o esperado, por isso mesmo, uma otimização do processo será necessária.

A execução de testes de biológicos é uma prioridade, para confirmar se os compostos sintetizados apresentam atividade neuroprotetora. Perante os resultados biológicos outras modificações poderão ser efetuadas no sentido de melhorar as suas propriedades farmacológicas.

5. Parte experimental

5.1 Equipamento laboratorial

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram obtidos através de um espectrofotômetro Bruker Avance, a operar a 400 Mhz (^1H RMN) e 100 Mhz (^{13}C RMN). Foi usado principalmente clorofórmio deuterado (CDCl_3) como solvente. O desvio químico é apresentado em partes por milhão (ppm), usando o tetrametilsilano (TMS, $\delta=0$ ppm) como referência. Complementarmente, os sinais a $\delta=7,26$ (^1H RMN) e $\delta=77.00$ (^{13}C RMN) do clorofórmio deuterado podem servir como referencia. As constante de acoplamento (J) são expressas em Hz.

Os espectros de Infravermelho (IV) foram obtidos num espectrómetro Perkin Elmer Spectrum 400, FT-IR e FT-NIR e os resultados apresentados em número de onda (cm^{-1}) decrescente.

No controlo das recções químicas foram usadas placas cromatográficas de camada fina (TLC), Merck's 60 F_{254} constituídas por sílica com indicador UV, em placas de alumínio como suporte. A revelação foi feita por luz de ultravioleta (UV) com comprimento de onda de 254 nm e por submersão numa mistura de ácido sulfúrico:etanol (95:5%) com posterior aquecimento. A maioria dos compostos foram purificados cromatograficamente, usando placas preparativas com Kieselgel 60H F_{254} /kieselgel 60G ou colunas cromatográficas, com Kieselgel 60 (230-400 mesh, Merck), consoante a quantidade de produto a purificar.

5.2 Solventes e reagentes

As matérias primas iniciais, estrona (E1) e estradiol (E2) foram adquiridos à Steraloids e usados sem nenhuma prufificação. Os restantes reagentes, como clorometil metil éter, diisopropilamina, sec-Butil-lítio (sec-BuLi), trimetóxido de boro, perborato de sódio, cloreto de acetilo, cloreto de alumínio, clorobenzeno, hidróxido de potássio (KOH), dimetilsulfato, 4-dimetilaminopiridina (DMAP), anidrido acético, clorocromato de piridina (PCC), dióxido de manganês (MnO_4), celite, permanganato de potássio (KMnO_4), sulfato de ferro (III) ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$), foram adquiridos aos fornecedores habituais, como a Sigma Aldrich Co. e a Merck Co. e foram também usados diretamente salvo indicação em contrário na descrição experimental. Alguns

dos solventes usados nas reações foram purificados e secos de acordo com a literatura (Armarego e Chai, 2003)

Secar THF: refluxo de 7 horas com hidreto de cálcio (CaH_2), seguido de destilação. Foi depois guardado com molecular sieves 4 Å.

Acetato de Etilo: destilado a $77\text{ }^\circ\text{C} \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$

Clorobenzeno: guardado com molecular sieves 4 Å, previamente ativadas a $170\text{ }^\circ\text{C}$ durante 24h.

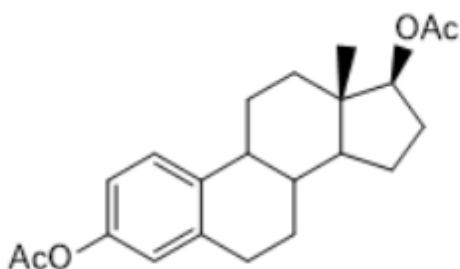
Cloreto de acetilo: destilação fracionada a $51\text{ }^\circ\text{C} \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$.

Anidrido acético: destilação fracionada a $140\text{ }^\circ\text{C} \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$.

5.3 Química

5.3.1 1,3,5(10)-estratrieno-3,17β-diol diacetato (3,17-di-acetato-β-estradiol) (3)

O composto **3** foi preparado de acordo com a literatura (Rao e Cessac, 2002). Dissolveu-se



o estradiol (300mg) em THF seco (5ml), à temperatura ambiente. Foi adicionado DMAP (15% da massa de estradiol) e anidrido acético seco (1,25ml). Após 2 horas, evaporou-se o solvente e extraiu-se com água, e EtOAc (3x), posteriormente, lavou-se com solução aquosa de HCL 5%, solução

aquosa de NaHCO₃ saturado, água e solução aquosa de NaCl, e por fim secou-se com Na₂SO₄ anidro. O exsiccante foi removido por filtração e a fase orgânica removida a pressão reduzida, obtendo um sólido branco, que foi usado nas reações seguinte sem necessitar de purificação; 96% de rendimento.

Dados analíticos:

Fórmula química: C₂₂H₂₈O₄

Massa molar: 356,46 g/mol

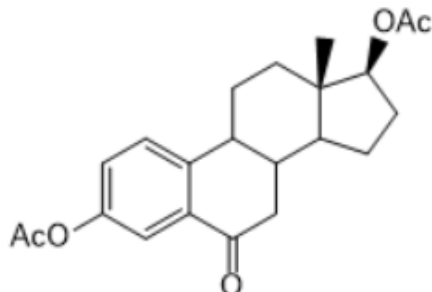
¹H RMN δ 7,28 (d, 1H, J=8Hz, H-3), 6,83(dd, 1H, J=8,4. 2,4Hz), 6,79 (d, 1H, J=2,3 Hz), 4,69 (dd, 1H, J= 8,9.8,0Hz), 2,27(s, 3H, CH₃CO), 2,06(s, 3H, CH₃CO), 0,82(s, 3H, H-18) ppm

¹³C RMN δ 171,21(CH₃CO). 169,85 (CH₃CO). 148,48. 138,17. 137,88. 126,42. 121,50. 118,58. 82,67. 76,72. 49,83. 43,98. 42,87. 38,20. 36,86. 29,50. 27,56. 27,02. 26,03. 23,26. 21,19. 12,04 (C-18).

FTIR-ATR (cm⁻¹) 2919,87. 2873,36. 1732,92. 1723,02. 1492,58. 1194,24. 1013,95 1037,20

5.3.2 3,17β-dihidróxi-1,3,5(10)-estratrien-6-ona diacetato (6-oxo-β-estradiol diacetato) (5)

O composto **5** foi preparado de acordo com a literatura (Singh e Lee, 2001). Dissolveu-se o



composto **3** (120mg) em diclorometano, e adicionou-se uma mistura de KMnO_4 (1556mg) e $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (528mg), que foi previamente reduzida a pó, adicionou-se também água (52μl) e t-butanol (0,24ml). A reação ficou a agitar durante 24h, depois dilui-se em diclorometano e filtrou-se com celite sob vácuo.

Posteriormente filtrou-se a mistura reacional através de sílica e celite e lavou-se a fase orgânica com solução de NaHCO_3 e água, secando em seguida com Na_2SO_4 anidro. O exsiccante foi removido por filtração e a fase orgânica removida a pressão reduzida obtendo um óleo amarelo-torrado. O produto foi purificado através de placas cromatográficas preparativas [tolueno/éter (10:1) (5:1)]; obtendo um sólido amarelo claro com um rendimento de 20%, foi também possível recuperar parte do substrato inicial que foi novamente usado.

Dados analíticos:

Fórmula química: $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_5$

Massa molar: 370,44 g/mol

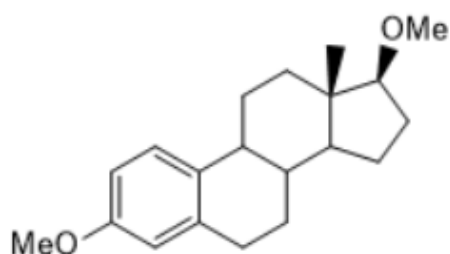
$^1\text{H RMN}$ δ 7,75(d, 1H, 2,6Hz), 7,44(d, 1H, 8,4Hz), 7,26(dd, 1H, 8,4. 2,7Hz), 4,75(m, 1H), 2,31(s, 3H, CH_3CO), 2,07(s, 3H, CH_3CO), 0,84(s, 3H, H-18)

$^{13}\text{C RMN}$ δ 196,85 (C-6). 171,10($\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}$). 169,47($\text{CH}_3\text{C}\underline{\text{O}}$). 149,31. 144,30. 133,65. 127,00. 126,74. 120,01. 82,15. 49,74. 43,84. 43,01. 42,72. 39,51. 36,43. 27,38. 25,32. 22,98. 21,14. 21,01. 11,88 (C-18).

FTIR-ATR (cm^{-1}) 2926,13. 1767,20. 1678,19. 1607,39. 1488,78. 1369,53. 1190,34. 1084,61. 1035,62. 1013,35

5.3.3 3,17β-dimetoxi-1,3,5(10)-estratrieno (3,17-dimetil-β-estradiol) (7)

O composto **7** foi preparado com algumas alterações à literatura (Brosa *et al.*, 1989), sob uma



atmosfera de azoto (N₂). Dissolveu-se o estradiol (150mg) em THF seco (5ml). Adicionou-se, de seguida, KOH (2 pastilhas pequenas; 0,16 g) e dimetilsulfato (0,1 ml). A mistura foi aquecida até 70°C (refluxo), até ao dia seguinte. No dia seguinte extraiu-se com água, e EtOAc (3x), posteriormente,

lavou-se com solução aquosa de HCL 5%, solução aquosa de NaHCO₃ saturado, água e solução aquosa de NaCl, e por fim secou-se com Na₂SO₄ anidro. A reação foi completa mas formaram-se 2 compostos, , por isso posteriormente foi purificado através de cromatografia preparativa [tolueno/eter (10:1) (5:1)]; 65% de rendimento

Dados analíticos:

Fórmula química: C₂₀H₂₈O₂

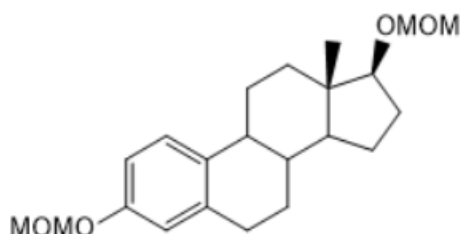
Massa molar: 300,44 g/mol

¹H RMN δ 7.20 (d, 1H, J= 8,6 Hz), 6.71 (dd, 1H, J= 8,6. 2,7 Hz), 6.62 (d, 1H, J = 2,5 Hz), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 3.38 (s, 3H, OCH₃), 0.79 (s, 3H)

¹³C RMN δ 157,43. 137,98. 132,70. 126,33. 113,79. 111,47. 90,82. 57,91(OCH₃). 55,21(OCH₃). 50,31. 43,93. 43,24. 38,62. 38,07. 29,83. 27,78. 27,24. 26,46. 23,06. 11,55.

5.3.4 3,17β-bis(metoximetoxi)-1,3,5(10)-estratrieno (3,17-di(metoximetoxi)-β-estradiol) (9)

O composto **9** foi preparado de acordo com a literatura (Rao *et al.*, 2008), sob uma atmosfera de argon (Ar). O estradiol (300mg) foi dissolvido em THF seco (5ml). Foi adicionado clorometil metil éter (0,4ml) e di-isopropilamina (1,2ml) e aquecido a 65°C, durante a noite. A mistura reacional foi arrefecida à temperatura ambiente e tratada com NH₄Cl, e extraída com EtOac (3x). A fase orgânica foi lavada com água (3x), solução de NaCl e seca com Na₂SO₄ anidro. O excicante foi removido por filtração e a fase orgânica removida a pressão reduzida, obtendo-se um óleo amarelo pálido que, posteriormente foi purificado através de cromatografia preparativa [tolueno/eter (10:1) (5:1)]; 86% de rendimento.



Dados analíticos:

Fórmula química: C₂₂H₃₂O₄

Massa molar: 360,49 g/mol

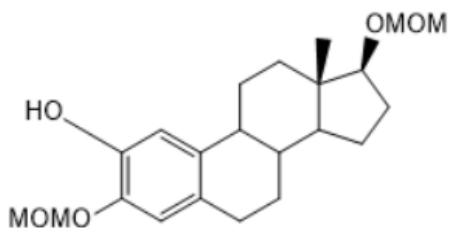
¹H RMN δ 7,19(d, 1H, J= 8.5 Hz), 6,82(dd, 1H, J= 8.5, 2.6 Hz), 6,76(d, 1H, J= 2.6 Hz), 5,13(s, 2H, OCH₂OCH₃), 4,65(s, 2H, OCH₂OCH₃), 3,46(s, 3H, OCH₂OCH₃), 3,37 (s, 3H, OCH₂OCH₃), 0,80(s, 3H, H-18).

¹³C RMN δ 155,05 (C-3). 138,06. 133,99. 126,35. 116,24. 113,73. 96,02 (OCH₂OCH₃). 94,49 (OCH₂OCH₃). 86,62. 55,87. 55,12. 50,02. 44,02. 42,98. 38,57. 37,29. 29,77. 28,09. 27,20. 26,28. 23,09. 11,74 (C-18).

FTIR-ATR (cm⁻¹) 2925,88. 1608,71. 1497,43. 1382,32. 1497,43. 1382,32. 1148,62. 1011,10

5.3.5 3,17β-bis(metoximetoxi)-1,3,5(10)-estratrien-2-ol (2-hidroxi-3,17-di(metoximetoxi)-β-estradiol) (II)

O composto II foi preparado de acordo com a literatura (Rao *et al.*, 2008), sob uma atmosfera de árgon (Ar). O composto 9 (150mg) foi dissolvido em THF (5ml) e arrefecido à temperatura de -78°C. Seguidamente foi adicionado, lentamente, o *sec*-BuLi (0,4ml). A reação foi mantida em agitação durante 3h. Posteriormente foi adicionado, lentamente, o trimetóxido de boro (0,2ml), mantendo-se em agitação durante mais 15 min, à temperatura de -78°C. Depois, a mistura reacional foi aquecida até aos 0°C. A reação foi parada com NH₄Cl, e depois permitiu-se que reação atingisse a temperatura ambiente. Após 1h em agitação, foi adicionado, lentamente, o perborato de sódio (60mg). A mistura reacional ficou em agitação durante a noite. No dia seguinte, a mistura reacional foi concentrada em vácuo, e procedeu-se à extração com EtOAc (3x), lavado-se, de seguida, com água (3x) e solução de NaCl e seco com Na₂SO₄ anidro. O exsicante foi removido por filtração e a fase orgânica removida a pressão reduzida. Obtendo-se uma mistura com o produto e o substrato inicial posteriormente foi purificado através de cromatografia preparativa [tolueno/eter (10:1) (5:1)]; 45% de rendimento.



Dados analíticos:

Fórmula química: C₂₂H₃₂O₅

Massa molar: 376,49 g/mol

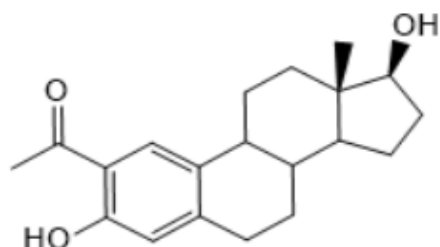
¹H RMN δ 6,89(s, 1H), 6,79(s, 1H), 5,74(s, 1H, OH), 5,16(s, 2H, OCH₂OCH₃), 4,66(s, 2H, OCH₂OCH₃), 3,51(s, 3H, OCH₂OCH₃), 3,37(s, 3H, OCH₂OCH₃), 0,80(s, 3H, H-18).

¹³C RMN δ 144,12. 142,38. 135,24. 128,40. 115,89. 112,36. 96,10. 96,03. 86,61. 56,36. 55,15. 50,05. 44,17. 42,99 38,48. 37,31. 29,09. 28,11. 27,36. 26,32. 23,08. 11,74.

FTIR-ATR (cm⁻¹) 3391,96. 2912,52. 1725,27. 1591,22. 1277,42. 1148,80. 1025,24

5.3.6 2-acetil-1,3,5(10)-estratrieno-3,17 β -diol (2-acetil- β -estradiol) (13)

O composto **13** foi preparado com algumas alterações à literatura (Edsall *et al.*, 2004). Num



balão, adicionaram-se cloreto de acetilo seco (0,05ml) e cloreto de alumínio (120mg) que foram aquecidos e colocado a pressão reduzida e numa atmosfera de argon (Ar) para que não existirem resíduos de água. Posteriormente, esta mistura foi arrefecida a 0°C. Noutro balão, foi adicionado estradiol (60mg) e

clorobenzeno (2ml). Esta mistura foi adicionada, lentamente, ao 1º balão em 4 porções durante 1 hora. Após agitação, durante 24h, foi adicionado HCL 3N (2ml) formando-se um óleo cor de laranja. A mistura foi extraída com EtOAc (3x), lavado com água (3x) e seco com Na₂SO₄ anidro. O exsiccante foi removido por filtração e a fase orgânica removida a pressão reduzida, obtendo-se assim uma mistura de 3 produtos. Esta mistura foi dissolvida em metanol (10ml) e, posteriormente, adicionou-se uma solução de hidróxido de potássio saturado em metanol (1ml), ficando a agitar durante 10h. Seguidamente, evaporou-se o solvente e dissolveu-se o produto em água gelada, seguindo-se de extração com EtOAc (3x), lavagem com água(3x) e solução de NaCl e secou-se com Na₂SO₄. O exsiccante foi removido por filtração e a fase orgânica removida a pressão reduzida, resultando num sólido amarelo torrado. Posteriormente foi purificado através de cromatografia preparativa [tolueno/eter (10:1) (5:1)]; 12% de rendimento

Dados analíticos:

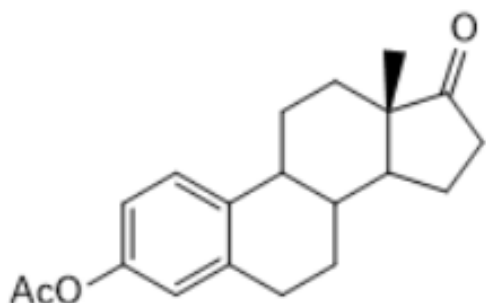
Fórmula química: C₂₀H₂₆O₃

Massa molar: 314,42 g/mol

¹H RMN δ 7,61(s, 1 H), 6,70(s, 1 H), 3,77(t, 1 H, J= 17,07 Hz), 2,50(s, 3H, COCH₃), 0,80 (s, 3 H)

5.3.7 3-hidróxi-1,3,5(10)-estratrien-17-ona acetato (3-acetato-estrona) (4)

O composto 4 foi preparado de acordo com a literatura (Rao e Cessac, 2002). Dissolveu-se a estrona (300mg) em THF (5ml) à temperatura ambiente. Foi adicionado DMAP (15% da massa de estradiol) e anidrido acético seco (1,25ml). Após 2 horas, evaporou-se o solvente e extraiu-se com água, e EtOAc (3x), posteriormente lavou-se com solução aquosa de HCL 5%, solução aquosa de NaHCO₃ saturado, água e solução aquosa e NaCl, e por fim secou-se com Na₂SO₄ anidro. O exsicante foi removido por filtração e a fase orgânica removida a pressão reduzida, obtendo um sólido branco, que foi usado nas reações seguinte sem necessitar de purificação; 96% de rendimento.



Dados analíticos:

Fórmula química: C₂₀H₂₄O₃

Massa molar: 312,40 g/mol

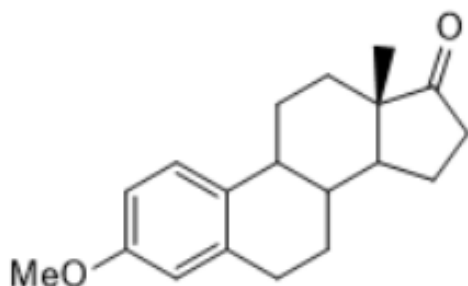
¹H RMN δ 7,28(d, 1H, J=8,4Hz, H-3), 6,85(dd, 1H, J=8,5, 2,5Hz), 6,81(d, 1H, J=2,4Hz), 2,28(s, 3H, CH₃CO), 0,91(s, 3H, H-18) ppm

¹³C RMN 220,75(C-17). 169,84(CH₃CO). 148,58. 138,03. 137,42. 126,42. 121,60. 118,77. 50,45. 47,95. 44,17. 38,01. 35,86. 31,57. 29,40. 26,35. 25,75. 21,60. 21,13. 13,84 (C-18).

FTIR-ATR (cm⁻¹) 2931,30. 2861,12. 1761,71. 1491,32. 1368,12. 1200,72. 1006,24

5.3.8 3-metóxi-1,3,5(10)-estratrien-17-ona (3-metil-estrona) (8)

O composto **8** foi preparado com algumas alterações à literatura (Brosa *et al.*, 1989). Sob uma



atmosfera de azoto N₂, dissolveu-se a estrona (150mg) em THF seco (5ml). Adicionou-se, de seguida, KOH (2 pastilhas pequenas; 0,16 g) e dimetilsulfato (0,1 ml). Foi aquecido a 70°C (refluxo), até ao dia seguinte. No dia seguinte, extraiu-se com água, e EtOAc (3x), posteriormente, lavou-se com

solução aquosa de HCL 5%, solução aquosa de NaHCO₃ saturado, água e solução aquosa e NaCl, e por fim secou-se com Na₂SO₄ anidro. O exsicante foi removido por filtração e a fase orgânica removida a pressão reduzida, obtendo-se um óleo amarelo pálido. A reação não foi completa, mas formou-se apenas um composto que foi purificado por coluna cromatografica [tolueno/eter (10:1) (5:1)]; 72% de rendimento.

Dados analíticos:

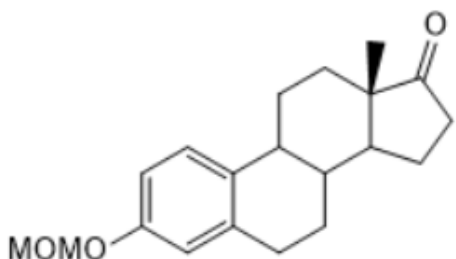
Fórmula química: C₁₉H₂₄O₂

Massa molar: 284,39 g/mol

¹H RMN δ 7,20(d, 1H, J= 8,7 Hz), 6,72(dd, 1H, J= 8,6. 2,8 Hz), 6,64(d, 1H, J= 2,8 Hz), 3,78(s, 3H, OCH₃), 0,91(s, 3H, H-18).

5.3.9 3,17 β -(metoximetoxi)-1,3,5(10)-estratrien-17-ona (3-metoximetoxi-estrona) (10)

O composto **10** foi preparado de acordo com a literatura (Rao *et al.*, 2008), sob uma atmosfera de Ar dissolveu-se a estrona **2** (300mg) em THF seco (5ml). Foi adicionado clorometil metil éter (0,4ml) e di-isopropilamina (1,2ml) e aqueceu-se a 65°C , durante a noite. A mistura reacional foi arrefecida à temperatura ambiente e tratada com NH_4Cl , e extraída com EtOac (3x). A fase orgânica foi lavada com água (3x), solução de NaCl e seca com Na_2SO_4 anidro. O exsiccante foi removido por filtração e a fase orgânica removida a pressão reduzida, obtendo-se um sólido branco que, posteriormente foi purificado através de cromatografia preparativa [tolueno/eter (10:1) (5:1)]; 93% de rendimento.



Dados analíticos:

Fórmula química: $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_3$

Massa molar: 314,42 g/mol

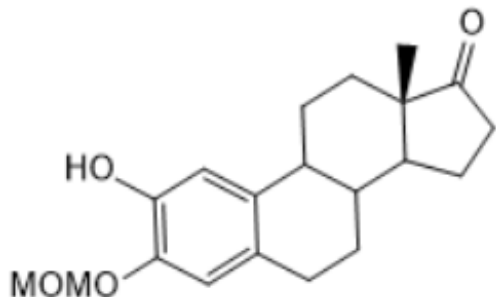
$^1\text{H RMN}$ δ 7,20(d, 1H, J = 8,5 Hz), 6,84(dd, 1H, J = 8,6. 2,6 Hz), 6,79(d, 1H J = 2,6 Hz), 5,15(s, 2H, OCH_2OCH_3), 3,47(s, 3H, OCH_2OCH_3), 0,91(s, 3H, H-18)

$^{13}\text{C RMN}$ δ 220,90 (C-18). 155,23 (C-3). 137,87. 133,34. 126,38. 116,30. 113,91. 94,49 (OCH_2OCH_3). 55,93. 50,45. 48,01. 44,05. 38,32. 35,88. 31,60. 29,63. 26,53. 25,89. 21,60 13,86 (C-18).

FTIR-ATR (cm^{-1}) 2916,36. 2864,00. 1737,34. 1497,47. 1228,25. 1151,35. 1001,50

5.3.10 2-hidróxi-3,17β-(metoximetoxi)-1,3,5(10)-estratrien-17-ona (2-hidroxi-3-metoximetoxi-estrona) (12)

O composto **12** foi preparado de acordo com a literatura (Rao *et al.*, 2008). Sob uma



atmosfera de árgon Ar, foi adicionado o composto **10** (150mg) dissolvido em THF seco (5ml) e arrefecido à temperatura de -78°C. Seguidamente, foi, lentamente, adicionado o sec-BuLi (0,4ml). A reação foi mantida sob agitação durante 3h. Posteriormente, foi, lentamente, adicionado o

trimetóxido de boro (0,2ml), e manteve-se a mistura reacional sob agitação durante mais 15 min, à temperatura de -78°C. A mistura foi, depois, aquecida até aos 0°C. A reação foi parada com NH₄Cl, e depois permitiu-se que reação atingisse a temperatura ambiente. Após 1h sob agitação, foi adicionado, lentamente, o perborato de sódio (60mg) e a reação ficou sob agitação durante a noite. No dia seguinte, a mistura reacional foi concentrada sob vácuo, e foi extraído com EtOAc (3x), lavada com água (3x) e solução de NaCl e seco com Na₂SO₄ anidro. O exsiccante foi removido por filtração e a fase orgânica removida a pressão reduzida, obtendo-se um óleo amarelo pálido que, posteriormente foi purificado através de cromatografia preparativa [tolueno/eter (10:1) (5:1)]; 42% de rendimento.

Dados analíticos:

Fórmula química: C₂₀H₂₆O₄

Massa molar: 330,42 g/mol

¹H RMN δ 6,78(s, 1H), 6,77(s, 1H), 5,14(s, 1H, OH), 4,86(s, 2H, OCH₂OCH₃), 3,49(s, 3H, OCH₂OCH₃), 0,93(s, 3H, H-18).

FTIR-ATR (cm⁻¹) 3545,84. 3250,18. 2924,04. 2871,72. 1718,27. 1505,84. 1281,23. 1000,88

6. Bibliografia

ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. - Green Chemistry: Theory and Practice. **Oxford University Press, New York, Oxford University.** (1998) 30.

ANSTEAD, G. M.; CARLSON, K. E.; KATZENELLENBOGEN, J. A. - The estradiol pharmacophore: ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. **Steroids.** . ISSN 0039-128X. 62:3 (1997) 268–303.

AREVALO, M.; AZCOITIA, I.; GARCIA-SEGURA, L. M. - The neuroprotective actions of oestradiol and oestrogen receptors. **Nature Reviews Neuroscience.** . ISSN 1471-003X. 16:1 (2015) 17–29. doi: 10.1038/nrn3856.

ARMAREGO, Wilfred L. E.; CHAI, C. L. - **PURIFICATION OF LABORATORY CHEMICALS**

ARNOLD, S.; ARAUJO, G. W. DE; BEYER, C. - Gender-specific regulation of mitochondrial fusion and fission gene transcription and viability of cortical astrocytes by steroid hormones. **Journal of Molecular Endocrinology.** . ISSN 0952-5041. 41:5 (2008) 289–300. doi: 10.1677/JME-08-0085.

AVERY, Mitchell A. - Protective Groups in Organic Synthesis. Third Edition By Theodora W. Greene and Peter G. M. Wuts. John Wiley & Sons, New York. 1999. xxi + 779 pp. 16 × 24 cm. ISBN 0-471-16019-9. \$84.95. **Journal of Medicinal Chemistry.** . ISSN 0022-2623. 42:25 (1999) 5285–5285. doi: 10.1021/jm990518h.

AZCOITIA, I. *et al.* - Gonadal hormones affect neuronal vulnerability to excitotoxin-induced degeneration. **Journal of neurocytology.** . ISSN 0300-4864. 28:9 (1999) 699–710.

AZCOITIA, I. *et al.* - Brain aromatase is neuroprotective. **Journal of neurobiology.** . ISSN 0022-3034. 47:4 (2001) 318–29.

BARJA, G. - Free radicals and aging. **Trends in Neurosciences.** . ISSN 01662236. 27:10 (2004) 595–600. doi: 10.1016/j.tins.2004.07.005.

BERLINER, Martin A.; BELECKI, Katherine - Simple, Rapid Procedure for the Synthesis of Chloromethyl Methyl Ether and Other Chloro Alkyl Ethers I. **The Journal of Organic Chemistry.** . ISSN 0022-3263. 70:23 (2005) 9618–9621. doi: 10.1021/jo051344g.

- BIAN, C. *et al.* - Intriguing Roles of Hippocampus-Synthesized 17 β -Estradiol in the Modulation of Hippocampal Synaptic Plasticity. **Journal of Molecular Neuroscience**. . ISSN 0895-8696. 54:2 (2014) 271–281. doi: 10.1007/s12031-014-0285-8.
- BROSA, C. *et al.* - Synthesis of 3-methoxyestra-1,3,5(10),6-tetraen-17-one. **The Journal of Organic Chemistry**. . ISSN 0022-3263. 54:16 (1989) 3984–3985. doi: 10.1021/jo00277a045.
- CANTUTI-C, I. *et al.* - Somatic mitochondrial DNA mutations in single neurons and glia. **Neurobiology of Aging**. . ISSN 01974580. 26:10 (2005) 1343–1355. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2004.11.008.
- CHACE, C. *et al.* - Variants in CYP17 and CYP19 Cytochrome P450 Genes are Associated with Onset of Alzheimer’s Disease in Women with Down Syndrome. **Journal of Alzheimer’s Disease**. . ISSN 18758908. 28:3 (2012) 601–612. doi: 10.3233/JAD-2011-110860.
- CHAKRABARTI, M. *et al.* - Estrogen receptor agonists for attenuation of neuroinflammation and neurodegeneration. **Brain Research Bulletin**. . ISSN 03619230. 109:2014) 22–31. doi: 10.1016/j.brainresbull.2014.09.004.
- CHANG, M. - Dual roles of estrogen metabolism in mammary carcinogenesis. **BMB Reports**. . ISSN 1976-6696. 44:7 (2011) 423–434. doi: 10.5483/BMBRep.2011.44.7.423.
- CHAUHAN, Mukul - Permanganate Oxidation mechanisms of Alkylarenes. **IOSR Journal of Applied Chemistry**. . ISSN 22785736. 7:6 (2014) 16–27. doi: 10.9790/5736-07611627.
- CHEN, J. Q. *et al.* - Binding of MCF-7 cell mitochondrial proteins and recombinant human estrogen receptors α and β to human mitochondrial dna estrogen response elements. **Journal of Cellular Biochemistry**. . ISSN 0730-2312. 93:2 (2004) 358–373. doi: 10.1002/jcb.20178.
- COFFEY, C. E. *et al.* - Sex Differences in Brain Aging. **Archives of Neurology**. . ISSN 0003-9942. 55:2 (1998) 169. doi: 10.1001/archneur.55.2.169.
- CORNIL, C. A.; BALL, G. F.; BALTHAZART, J. - Rapid control of male typical behaviors by brain-derived estrogens. **Frontiers in Neuroendocrinology**. . ISSN 00913022. 33:4 (2012) 425–446. doi: 10.1016/j.yfrne.2012.08.003.

DING, F. *et al.* - Ovariectomy Induces a Shift in Fuel Availability and Metabolism in the Hippocampus of the Female Transgenic Model of Familial Alzheimer's. **PLoS ONE**. . ISSN 1932-6203. 8:3 (2013) e59825. doi: 10.1371/journal.pone.0059825.

EDSALL, Allison B. *et al.* - Effects of altering the electronics of 2-methoxyestradiol on cell proliferation, on cytotoxicity in human cancer cell cultures, and on tubulin polymerization. **Journal of Medicinal Chemistry**. . ISSN 00222623. 47:21 (2004) 5126–5139. doi: 10.1021/jm049647a.

ENGLER-CHIURAZZI, Elizabeth B.; COVEY, Douglas F.; SIMPKINS, James W. - A novel mechanism of non-feminizing estrogens in neuroprotection. **Experimental Gerontology**. . ISSN 05315565. 94:2017) 99–102. doi: 10.1016/j.exger.2016.10.013.

GARCIA-SEGURA, L. M. *et al.* - Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. **Neuroscience**. . ISSN 0306-4522. 89:2 (1999) 567–78.

GARCIA-SEGURA, Luis M. *et al.* - Estradiol upregulates Bcl-2 expression in adult brain neurons. **NeuroReport**. . ISSN 0959-4965. 9:4 (1998) 593–597. doi: 10.1097/00001756-199803090-00006.

GILLIES, G. E. *et al.* - Sex differences in Parkinson's disease. **Frontiers in Neuroendocrinology**. . ISSN 00913022. 35:3 (2014) 370–384. doi: 10.1016/j.yfrne.2014.02.002.

GONÇALVES, Bruno M. F. *et al.* - Synthesis and anticancer activity of novel fluorinated asiatic acid derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**. . ISSN 02235234. 114:2016) 101–117. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.02.057.

GREEN, P. S.; BISHOP, J.; SIMPKINS, J. W. - 17 alpha-estradiol exerts neuroprotective effects on SK-N-SH cells. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**. . ISSN 0270-6474. 17:2 (1997) 511–5.

HARA, Y. *et al.* - Estrogen Effects on Cognitive and Synaptic Health Over the Lifecourse. **Physiological Reviews**. . ISSN 0031-9333. 95:3 (2015) 785–807. doi: 10.1152/physrev.00036.2014.

HIRSCHBERG, A. L. - Sex hormones, appetite and eating behaviour in women. **Maturitas**. .

ISSN 03785122. 71:3 (2012) 248–256. doi: 10.1016/j.maturitas.2011.12.016.

HU, Q.; YIN, L.; HARTMANN, Rolf W. - Selective Dual Inhibitors of CYP19 and CYP11B2: Targeting Cardiovascular Diseases Hiding in the Shadow of Breast Cancer. **Journal of Medicinal Chemistry**. . ISSN 0022-2623. 55:16 (2012) 7080–7089. doi: 10.1021/jm3004637.

HUANG, R. - CYP19 haplotypes increase risk for Alzheimer's disease. **Journal of Medical Genetics**. . ISSN 1468-6244. 43:8 (2006) e42–e42. doi: 10.1136/jmg.2005.039461.

IIVONEN, S. *et al.* - Polymorphisms in the CYP19 gene confer increased risk for Alzheimer disease. **Neurology**. . ISSN 0028-3878. 62:7 (2004) 1170–1176. doi: 10.1212/01.WNL.0000118208.16939.60.

JACK, C. R. *et al.* - Age, Sex, and APOE ϵ 4 Effects on Memory, Brain Structure, and β -Amyloid Across the Adult Life Span. **JAMA Neurology**. . ISSN 2168-6149. 72:5 (2015) 511. doi: 10.1001/jamaneurol.2014.4821.

JEFCOATE, C. - High-flux mitochondrial cholesterol trafficking, a specialized function of the adrenal cortex. **Journal of Clinical Investigation**. . ISSN 0021-9738. 110:7 (2002) 881–890. doi: 10.1172/JCI16771.

KAMEL, R. M. - The onset of human parturition. **Archives of Gynecology and Obstetrics**. . ISSN 0932-0067. 281:6 (2010) 975–982. doi: 10.1007/s00404-010-1365-9.

KANG, Dongchon; KIM, Sang Ho; HAMASAKI, Naotaka - Mitochondrial transcription factor A (TFAM): Roles in maintenance of mtDNA and cellular functions. **Mitochondrion**. . ISSN 15677249. 7:1–2 (2007) 39–44. doi: 10.1016/j.mito.2006.11.017.

KELLY, M. J.; LEVIN, E. R. - Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**. . ISSN 1043-2760. 12:4 (2001) 152–6.

KEMPER, M. F. *et al.* - Genomic and non-genomic regulation of PGC1 isoforms by estrogen to increase cerebral vascular mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species protection. **European Journal of Pharmacology**. . ISSN 00142999. 723:2014) 322–329. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.11.009.

KLINGE, M. - Estrogens regulate life and death in mitochondria. **Journal of Bioenergetics**

and Biomembranes. . ISSN 0145-479X. 49:4 (2017) 307–324. doi: 10.1007/s10863-017-9704-1.

KUHL, H. - Pharmacology of estrogens and progestogens: influence of different routes of administration. **Climacteric**. . ISSN 1369-7137. 8:supl (2005) 3–63. doi: 10.1080/13697130500148875.

KUJOTH, G. C. *et al.* - The Role of Mitochondrial DNA Mutations in Mammalian Aging. **PLoS Genetics**. . ISSN 1553-7390. 3:2 (2007) e24. doi: 10.1371/journal.pgen.0030024.

LI, R.; SINGH, M. - Sex differences in cognitive impairment and Alzheimer's disease. **Frontiers in Neuroendocrinology**. . ISSN 00913022. 35:3 (2014) 385–403. doi: 10.1016/j.yfrne.2014.01.002.

LI, S. *et al.* - Detecting the presence of hippocampus membrane androgen receptors in male SAMP8 mice and their induced synaptic plasticity. **Molecular and Cellular Endocrinology**. . ISSN 03037207. 414:2015) 82–90. doi: 10.1016/j.mce.2015.07.005.

LINN, S.; MURTAUGH, B.; CASEY, E. - Role of Sex Hormones in the Development of Osteoarthritis. **PM&R**. . ISSN 19341482. 4:5 (2012) S169–S173. doi: 10.1016/j.pmrj.2012.01.013.

LU, H. *et al.* - 17 β -estradiol rescues damages following traumatic brain injury from molecule to behavior in mice. **Journal of Cellular Physiology**. . ISSN 00219541. 233:2 (2018) 1712–1722. doi: 10.1002/jcp.26083.

LUGEMWA, Fulgentius; SHAIKH, Koonj; HOCHSTEDT, Edwin - Facile and Efficient Acetylation of Primary Alcohols and Phenols with Acetic Anhydride Catalyzed by Dried Sodium Bicarbonate. **Catalysts**. . ISSN 2073-4344. 3:4 (2013) 954–965. doi: 10.3390/catal3040954.

MCDEVITT, M. A. *et al.* - New insights into the classical and non-classical actions of estrogen: Evidence from estrogen receptor knock-out and knock-in mice. **Molecular and Cellular Endocrinology**. . ISSN 03037207. 290:1–2 (2008) 24–30. doi: 10.1016/j.mce.2008.04.003.

MEDWAY, Christopher *et al.* - The sex-specific associations of the aromatase gene with Alzheimer's disease and its interaction with IL10 in the Epistasis Project. **European Journal**

of **Human Genetics**. . ISSN 1018-4813. 22:2 (2014) 216–220. doi: 10.1038/ejhg.2013.116.

MESMIN, B.; MAXFIELD, F. R. - Intracellular sterol dynamics. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**. . ISSN 13881981. 1791:7 (2009) 636–645. doi: 10.1016/j.bbalip.2009.03.002.

MIDZAK, A. *et al.* - Mitochondrial protein import and the genesis of steroidogenic mitochondria. **Molecular and Cellular Endocrinology**. . ISSN 03037207. 336:1–2 (2011) 70–79. doi: 10.1016/j.mce.2010.12.007.

MILLER, V. M.; HARMAN, S. M. - An update on hormone therapy in postmenopausal women: mini-review for the basic scientist. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**. . ISSN 0363-6135. 313:5 (2017) H1013–H1021. doi: 10.1152/ajpheart.00383.2017.

MILLER, W. L.; AUCHUS, R. J. - The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders. **Endocrine Reviews**. . ISSN 0163-769X. 32:1 (2011) 81–151. doi: 10.1210/er.2010-0013.

MO, M. S. *et al.* - PI3K/Akt and NF- κ B activation following intravitreal administration of 17 β -estradiol: Neuroprotection of the rat retina from light-induced apoptosis. **Neuroscience**. . ISSN 03064522. 228:2013) 1–12. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.10.002.

MONS, S.; LEBRAU, L.; MIOSKOWSKI, C. .. - Steroids U 0300. **Lab. Synth. Bio-Org. Synth. Com:2** (1998) 213–218.

NILSEN, J.; BRINTON, R. D. - Mechanism of estrogen-mediated neuroprotection: Regulation of mitochondrial calcium and Bcl-2 expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. . ISSN 0027-8424. 100:5 (2003) 2842–2847. doi: 10.1073/pnas.0438041100.

NUZZO, M. T.; MARINO, M. - Estrogen/Huntingtin: a novel pathway involved in neuroprotection. **Neural Regeneration Research**. . ISSN 1673-5374. 11:3 (2016) 402. doi: 10.4103/1673-5374.179045.

OOSTHUYSE, T.; BOSCH, A. N. - Oestrogen's regulation of fat metabolism during exercise and gender specific effects. **Current Opinion in Pharmacology**. . ISSN 14714892. 12:3 (2012) 363–371. doi: 10.1016/j.coph.2012.02.008.

- OVERK, C. R. *et al.* - Effects of aromatase inhibition versus gonadectomy on hippocampal complex amyloid pathology in triple transgenic mice. **Neurobiology of Disease**. . ISSN 09699961. 45:1 (2012) 479–487. doi: 10.1016/j.nbd.2011.08.035.
- PAGANONI, S.; SCHWARZSCHILD, M. A. - Urate as a Marker of Risk and Progression of Neurodegenerative Disease. **Neurotherapeutics**. . ISSN 1933-7213. 14:1 (2017) 148–153. doi: 10.1007/s13311-016-0497-4.
- PATERNI, I. *et al.* - Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): Subtype-selective ligands and clinical potential. **Steroids**. . ISSN 0039128X. 90:2014) 13–29. doi: 10.1016/j.steroids.2014.06.012.
- PEPE, G. J.; ALBRECHT, E. D. - Actions of Placental and Fetal Adrenal Steroid Hormones in Primate Pregnancy*. **Endocrine Reviews**. . ISSN 0163-769X. 16:5 (1995) 608–648. doi: 10.1210/edrv-16-5-608.
- PEREZ, Evelyn *et al.* - Neuroprotective effects of estratriene analogs: structure-activity relationships and molecular optimization. **Drug Development Research**. . ISSN 0272-4391. 66:2 (2005) 78–92. doi: 10.1002/ddr.20047.
- PETERSON, R. S. *et al.* - Radial glia express aromatase in the injured zebra finch brain. **The Journal of Comparative Neurology**. . ISSN 0021-9967. 475:2 (2004) 261–269. doi: 10.1002/cne.20157.
- PRANGE-KIEL, J. *et al.* - Gonadotropin-releasing hormone regulates spine density via its regulatory role in hippocampal estrogen synthesis. **The Journal of Cell Biology**. . ISSN 0021-9525. 180:2 (2008) 417–426. doi: 10.1083/jcb.200707043.
- PROKAI-TATRAI, K. *et al.* - Mechanistic investigations on the antioxidant action of a neuroprotective estrogen derivative. **Steroids**. . ISSN 0039128X. 73:3 (2008) 280–288. doi: 10.1016/j.steroids.2007.10.011.
- PROKAI, Laszlo; SIMPKINS, James W. - Structure-nongenomic neuroprotection relationship of estrogens and estrogen-derived compounds. **Pharmacology and Therapeutics**. . ISSN 01637258. 114:1 (2007) 1–12. doi: 10.1016/j.pharmthera.2007.01.006.
- PROKAI, Laszlo; SIMPKINS, James W. - Structure–nongenomic neuroprotection relationship of estrogens and estrogen-derived compounds. **Pharmacology & Therapeutics**. . ISSN

01637258. 114:1 (2007) 1–12. doi: 10.1016/j.pharmthera.2007.01.006.

PROMISLOW, D. E. L. - SENESCENCE IN NATURAL POPULATIONS OF MAMMALS: A COMPARATIVE STUDY. **Evolution**. . ISSN 00143820. 45:8 (1991) 1869–1887. doi: 10.1111/j.1558-5646.1991.tb02693.x.

PSARRA, Anna-Maria G.; SEKERIS, Constantine E. - Steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria. **IUBMB Life**. . ISSN 15216543. 60:4 (2008) 210–223. doi: 10.1002/iub.37.

RAO, Pemmaraju N. *et al.* - Synthesis and antimitotic activity of novel 2-methoxyestradiol analogs. Part III. **Steroids**. . ISSN 0039128X. 73:2 (2008) 171–183. doi: 10.1016/j.steroids.2007.10.016.

RAO, Pemmaraju N.; CESSAC, James W. - A new, practical synthesis of 2-methoxyestradiols. **Steroids**. . ISSN 0039128X. 67:13–14 (2002) 1065–1070. doi: 10.1016/S0039-128X(02)00065-X.

REGO, J. L. DO *et al.* - Neurosteroid biosynthesis: Enzymatic pathways and neuroendocrine regulation by neurotransmitters and neuropeptides. **Frontiers in Neuroendocrinology**. . ISSN 00913022. 30:3 (2009) 259–301. doi: 10.1016/j.yfrne.2009.05.006.

REMAGE-HEALEY, L.; SALDANHA, C. J.; SCHLINGER, B. A. - Estradiol Synthesis and Action at the Synapse: Evidence for ?Synaptocrine? Signaling. **Frontiers in Endocrinology**. . ISSN 1664-2392. 2:2011). doi: 10.3389/fendo.2011.00028.

RETTBERG, J. R.; YAO, J.; BRINTON, R. D. - Estrogen: A master regulator of bioenergetic systems in the brain and body. **Frontiers in Neuroendocrinology**. . ISSN 00913022. 35:1 (2014) 8–30. doi: 10.1016/j.yfrne.2013.08.001.

SARTORI, Giovanni *et al.* - Protection (and Deprotection) of Functional Groups in Organic Synthesis by Heterogeneous Catalysis. **Chemical Reviews**. . ISSN 0009-2665. 104:1 (2004) 199–250. doi: 10.1021/cr0200769.

SHAABANI, A. *et al.* - Green oxidations. The use of potassium permanganate supported on manganese dioxide. **Tetrahedron**. . ISSN 00404020. 60:50 (2004) 11415–11420. doi: 10.1016/j.tet.2004.09.087.

SHADYAB, A. H. *et al.* - Ages at menarche and menopause and reproductive lifespan as

predictors of exceptional longevity in women. **Menopause**. . ISSN 1072-3714. 24:1 (2017) 35–44. doi: 10.1097/GME.0000000000000710.

SHERWIN, B. B. - Estrogen and cognitive aging in women. **Neuroscience**. . ISSN 03064522. 138:3 (2006) 1021–1026. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.07.051.

SILBERSTEIN, S. D.; MERRIAM, G. R. - Physiology of the Menstrual Cycle. **Cephalalgia**. . ISSN 0333-1024. 20:3 (2000) 148–154. doi: 10.1046/j.1468-2982.2000.00034.x.

SILVESTRE, Samuel M.; SALVADOR, Jorge A. R. - Allylic and benzylic oxidation reactions with sodium chlorite. **Tetrahedron**. . ISSN 00404020. 63:11 (2007) 2439–2445. doi: 10.1016/j.tet.2007.01.012.

SIMPSON, E. R. *et al.* - Aromatase Cytochrome P450, The Enzyme Responsible for Estrogen Biosynthesis*. **Endocrine Reviews**. . ISSN 0163-769X. 15:3 (1994) 342–355. doi: 10.1210/edrv-15-3-342.

SINGH, N.; LEE, D. G. - Permanganate: A Green and Versatile Industrial Oxidant. **Organic Process Research & Development**. . ISSN 1083-6160. 5:6 (2001) 599–603. doi: 10.1021/op010015x.

STACEY, Winfred; BHAVE, Shreyas; UHT, Rosalie M. - Mechanisms by Which 17 β -Estradiol (E2) Suppress Neuronal cox-2 Gene Expression. **PLOS ONE**. . ISSN 1932-6203. 11:9 (2016) e0161430. doi: 10.1371/journal.pone.0161430.

STEFANICK, M. L. - Estrogens and progestins: background and history, trends in use, and guidelines and regimens approved by the US Food and Drug Administration. **The American Journal of Medicine**. . ISSN 00029343. 118:12 (2005) 64–73. doi: 10.1016/j.amjmed.2005.09.059.

TARABORRELLI, S. - Physiology, production and action of progesterone. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**. . ISSN 00016349. 94:2015) 8–16. doi: 10.1111/aogs.12771.

THOMAS, M. P.; POTTER, B. V. L. - The structural biology of oestrogen metabolism. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. . ISSN 09600760. 137:2013) 27–49. doi: 10.1016/j.jsbmb.2012.12.014.

THOMAS, Mark P.; POTTER, Barry V. L. - The structural biology of oestrogen metabolism. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. . ISSN 09600760. 137:2013) 27–49. doi: 10.1016/j.jsbmb.2012.12.014.

TURGEON, J. L. - Hormone Therapy: Physiological Complexity Belies Therapeutic Simplicity. **Science**. . ISSN 0036-8075. 304:5675 (2004) 1269–1273. doi: 10.1126/science.1096725.

VARADARAJAN, S. *et al.* - Review: Alzheimer's Amyloid β -Peptide-Associated Free Radical Oxidative Stress and Neurotoxicity. **Journal of Structural Biology**. . ISSN 10478477. 130:2–3 (2000) 184–208. doi: 10.1006/jsbi.2000.4274.

VIERK, R. *et al.* - Aromatase Inhibition Abolishes LTP Generation in Female But Not in Male Mice. **Journal of Neuroscience**. . ISSN 0270-6474. 32:24 (2012) 8116–8126. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5319-11.2012.

VILLA, Alessandro *et al.* - Estrogens, Neuroinflammation, and Neurodegeneration. **Endocrine Reviews**. . ISSN 0163-769X. 37:4 (2016) 372–402. doi: 10.1210/er.2016-1007.

VIRBASIOUS, J. V.; SCARPULLA, R. C. - Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. . ISSN 0027-8424. 91:4 (1994) 1309–1313. doi: 10.1073/pnas.91.4.1309.

VOLLHARDT, P.; SCHORE, N. - **Organic chemistry structure and functions**

WEIDMANN, Verena; MAISON, Wolfgang - Allylic Oxidations of Olefins to Enones. **Synthesis**. . ISSN 0039-7881. 45:16 (2013) 2201–2221. doi: 10.1055/s-0033-1338491.

WIETELMANN, Ulrich; BAUER, Richard J. - Lithium and Lithium Compounds. Em **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry** [Em linha]. Weinheim, Germany : Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2000 Disponível em WWW:<URL:http://doi.wiley.com/10.1002/14356007.a15_393>.

YUE, X. *et al.* - Brain estrogen deficiency accelerates A plaque formation in an Alzheimer's disease animal model. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. . ISSN 0027-8424. 102:52 (2005) 19198–19203. doi: 10.1073/pnas.0505203102.

ZAGNI, E.; SIMONI, L.; COLOMBO, D. - Sex and Gender Differences in Central Nervous System-Related Disorders. **Neuroscience Journal**. . ISSN 2314-4262. 2016:2016) 1–13. doi: 10.1155/2016/2827090.

ŽAKELJ-MAVRIČ, M. *et al.* - Steroid hormone signalling system and fungi. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**. . ISSN 10964959. 112:4 (1995) 637–642. doi: 10.1016/0305-0491(95)00113-1.

ZULOAGA, K. L. *et al.* - Role of aromatase in sex-specific cerebrovascular endothelial function in mice. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**. . ISSN 0363-6135. 306:7 (2014) H929–H937. doi: 10.1152/ajpheart.00698.2013.