

Emanuel Pinto de Sousa

SÍNTESE DE ESTEROIDES HEXACÍCLICOS QUIRAIS COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTICANCERÍGENA

Mestrado em Química Medicinal

Departamento de Química
FCTUC

Junho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Emanuel Pinto de Sousa

**SÍNTESE DE ESTEROIDES HEXACÍCLICOS QUIRAIS
COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTICANCERÍGENA**

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química Medicinal.

Professora Doutora Teresa Margarida de Vasconcelos Dias de Pinho e Melo

Junho 2015

Universidade de Coimbra

“Sometimes fate is like a small sandstorm that keeps changing directions. You change direction but the sandstorm chases you. You turn again, but the storm adjusts. Over and over you play this out, like some ominous dance with death just before dawn. Why? Because this storm isn’t something that blew in from far away, something that has nothing to do with you. This storm is you. Something inside of you. So all you can do is give in to it, step right inside the storm, closing your eyes and plugging up your ears so the sand doesn’t get in, and walk through it, step by step. There’s no sun there, no moon, no direction, no sense of time. Just fine white sand swirling up into the sky like pulverized bones. That’s the kind of sandstorm you need to imagine.

And you really will have to make it through that violent, metaphysical, symbolic storm. No matter how metaphysical or symbolic it might be, make no mistake about it: it will cut through flesh like a thousand razor blades. People will bleed there, and you will bleed too. Hot, red blood. You’ll catch that blood in your hands, your own blood and the blood of others.

And once the storm is over you won’t remember how you made it through, how you managed to survive. You won’t even be sure, in fact, whether the storm is really over. But one thing is certain. When you come out of the storm you won’t be the same person who walked in. That’s what this storm’s all about.”

— Haruki Murakami, *Kafka on the Shore*

AGRADECIMENTOS

Este espaço é dedicado a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para o meu percurso académico, em especial para a realização desta dissertação. A todos eles deixo aqui o meu sincero agradecimento.

À Professora Doutora Teresa Margarida Vasconcelos de Pinho e Melo, orientadora deste projeto, gostaria de manifestar o meu agradecimento pela disponibilidade, por todos os ensinamentos prestados e pela oportunidade de desenvolver o trabalho desta dissertação no seu grupo de investigação.

À Doutora Susana Margarida Martins Lopes, gostaria de deixar o meu agradecimento por toda a compreensão, dedicação e disponibilidade de horários.

A todos os elementos que integram ou integraram o grupo de Química Orgânica gostaria igualmente de deixar o meu agradecimento, em especial, à Doutora Ana Lúcia Cardoso, à Doutora Isabel Soares, à Fernanda Laia e à Dora Costa por todo o auxílio prestado no desenvolvimento deste projeto. Um especial agradecimento à D. Lurdes pela disponibilidade, compreensão e pela forma carinhosa como sempre me recebeu.

Gostaria também de deixar um agradecimento aos meus colegas, João Gabriel, Ana Rita Ferreira e Carmo Sousa pela companhia, compreensão e pelos grande momentos que também contribuíram para a realização deste percurso.

Por fim, gostaria de agradecer à minha família, em especial à minha mãe e ao meu pai, que sempre me apoiaram ao longo deste percurso e que sempre me proporcionaram todos os requisitos necessários para ter sucesso. Um profundo e sincero agradecimento à minha namorada por toda a compreensão, apoio e carinho que certamente facilitaram a realização desta dissertação.

RESUMO

Esta dissertação de mestrado surge como continuidade de um projeto prévio e teve como principal objectivo a síntese de novos esteroides contendo anéis heterocíclicos que apresentem potencial atividade anticancerígena.

Os esteróides encontram-se amplamente distribuídos pela natureza e apresentam uma vasta variedade de atividades biológicas. Para além da típica elevada actividade hormonal dos esteroides, estes, podem também exibir potente actividade antimicrobial, anti-inflamatória e anticancerígena. Contudo, a introdução de heteroátomos ou anéis heterocíclicos na estrutura base de um esteróide resulta usualmente na modificação das suas propriedades biológicas, podendo mesmo aumentar a citotoxicidade contra certas linhas celulares tumorais. Na realidade, uma das estratégias de design de inibidores do CYP17, que demonstram potencial no tratamento do cancro da próstata e da hiperplasia benigna da próstata, passa pela introdução de anéis heterocíclicos ligados ao anel D do esteroide.

Neste âmbito, explorou-se a reatividade de novos aniões metil 1,2-diazafulvénio na presença de diversos substratos esteroides. Neste projeto foram utilizados três esteróides que contêm uma ligação dupla ativada no anel D: o acetato de 16-desidropregnenolona, a 16-desidropregnenolona e a 16-desidroprogesterona. Estes substratos esteroides, que actuam como dipolarófilos, intercetaram os 1,7-dipolos numa reação de cicloadição $[8\pi+2\pi]$, dando origem a novos esteroides hexacíclicos quirais que contêm um heterociclo fundido ao anel D.

O projecto de mestrado apresentado nesta dissertação iniciou-se com a síntese dos 1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazole-6-carboxilato e 1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazole-7-carboxilato que, através da extrusão térmica de SO_2 , geraram novos aniões metil 1,2-diazafulvénio. Foram igualmente sintetizados novos 1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazoles contendo grupos hidroxilo ligados ao anel pirazolo, quer livres, quer protegidos, com o intuito de aumentar a hidroflicidade dos esteroides hexacíclicos formados. Contudo, partindo destas sulfonas contendo grupos hidroxilos, não foi possível observar a formação do cicloaduto resultante da cicloadição $[8\pi+2\pi]$ dos respectivos aniões metil diazafulvénio. Através da reação de diferentes aniões metil diazafulvénio com os subtratos esteroides anteriormente mencionados foram obtidos 12 novos esteroides hexacíclicos, derivados do núcleo pregnenolona e do núcleo progesterona. Foi igualmente efectuada a hidrólise e redução dos grupos ésteres presentes de alguns dos esteroides hexacíclicos preparados. Neste trabalho foi igualmente discutida a estereosseletividade dos esteroides hexacíclicos quirais, analisando os resultados dos cálculos quânticos realizados ao nível DFT. Os resulta-

dos indicam que a cicloadição *endo* da conformação mais estável do dipolo, cujo substituinte em C₁ aponta para fora, é significativamente mais favorável do que a alternativa *endo*.

Os esteroides contendo grupos C-20 oximas apresentam-se como potenciais inibidores duais da CYP17 e da 5 α -reductase, demonstrando também potencial no tratamento da hiperplasia benigna da próstata. Neste projecto de investigação foi planeada uma estratégia para a obtenção de derivados pregnenolona contendo um grupo C-20 oxima com um heterociclo em posição α , através da reação hetero Diels-Alder de nitrosoalquenos, originados *in situ* a partir de oximas α -halogenadas, com anéis heterociclicos. Todavia, não foi possível a síntese da oxima α -halogenada, não se obtendo os cicloadutos pretendidos. Partindo do composto C₂₁-halogenado foi contudo possível sintetizar um novo esteroide pentacíclico numa reação *one pot*.

ABSTRACT

This dissertation arises as a continuation of a previous project and aims the synthesis of new steroids with D ring fused heterocycles with potential anticancer activity.

Steroidal compounds are widely existent in natural world and display a variety of biological activities. Along with high hormonal activity typical of steroids, they usually exhibit potent antimicrobial, anti-inflammatory and anticancer activity. However, the introduction of heteroatoms or heterocycles in the structure of the maternal steroids often results in changes of its biological properties, for example, enhancing the cytotoxicity against some tumor cell lines. Indeed, the introduction of heteroatoms or heterocycles in the D ring is one of the strategies adopted for the design and development of CYP17 inhibitors, that show remarkable potential for the treatment of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer.

In this context, the reactivity of novel diazafulvenium methides in the presence of several steroidal scaffolds was explored. In this project three different steroidal scaffolds, with an activated double bond present in the D ring, were used: 16-dehydropregnenolone acetate, 16-dehydropregnenolone and 16-dehydroprogesterone. These steroid substrates, which act as dipolarophiles, intercepted the 1,7-dipoles, participating in a $[8\pi+2\pi]$ cycloaddition and originating novel hexacyclic chiral steroids containing a D-ring fused heterocycle.

This master thesis's project began with the synthesis of methyl 2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pyrazolo[1,5-*c*][1,3]thiazole-6-carboxylate and methyl 2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pyrazolo[1,5-*c*][1,3]thiazole-7-carboxylate, that generated the respective diazafulvenium methides by thermal extrusion of sulfur dioxide. Furthermore, novel 2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pyrazolo[1,5-*c*][1,3]thiazole containing hydroxyl substituents, either free or protected, were synthesized in order to increase the hydrophilicity of the synthesized steroids. Nevertheless, the diazafulvenium methides generated from these sulfones didn't undergo $[8\pi+2\pi]$ cycloaddition in the presence of 16-dehydropregnenolone acetate. By reacting different diazafulvenium methides with steroid scaffolds aforementioned, it was possible to obtain 12 hexacyclic steroids, derived from pregnenolone and progesterone nucleus. Similarly, the hydrolysis and reduction of the hexacyclic steroids' ester substituents was performed. The stereoselectivity of these novel hexacyclic chiral steroids was also discussed, by the analysis of quantum calculations at DFT level. The results indicate that *endo* cycloadditions of the more stable dipole conformation, having the 1-substituent pointing outward, are significantly more favorable than the alternative *exo* cycloaddition.

Steroids that contain a C-20 oxime group also show potential for the treatment of benign prostatic hyperplasia, as they can be seen as potential CYP17 and 5 α -reductase dual inhibitors. In this project, a strategy for the synthesis of C-20 oximes bearing an heterocycle in the alpha position, derived from pregnenolone nucleus, was planned. This strategy would involve the hetero Diels-Alder reaction of nitrosoalkenes, generated *in situ* from alpha-halogenated oximes, with heterocycles. However, the alpha-halogenated oxime synthesis was unsuccessful and the cycloadducts couldn't be obtained. Starting from C-21 halogenated steroid was however possible to synthesize a novel pentacyclic steroid in an one pot reaction.

INDICE

i	INTRODUÇÃO	1
1	ESTEROIDES: ESTRUTURA E PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS	3
1.1	Estrutura e biossíntese	3
1.2	Propriedades farmacológicas	5
2	ESTEROIDES COMO ANTICANCERÍGENOS	11
2.1	Cancro da mama	11
2.1.1	Aromatase	12
2.1.2	Esteróide Sulfatase	13
2.1.3	17 β -hidroxiesteroide desidrogenase	14
2.2	Cancro da próstata e BPH	14
2.2.1	5 α -redutase	16
2.2.2	CYP17	18
3	ESTEROIDES PENTACÍCLICOS	19
3.1	Esteroides fundidos a pirazoles e pirazolinias	20
3.2	Esteroides fundidos a imidazoles e triazoles	21
3.3	Esteroides fundidos a isoxazolinias e isoxazolidinas	22
3.4	Esteroides fundidos a anéis de seis membros	23
ii	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4	CICLO-ADIÇÃO [8 π +2 π]	27
4.1	Introdução	27
4.1.1	Aniões metil azafulvénio e 1,2-diazafulvénio	27
4.1.2	Ciclo-adição [8 π +2 π]	28
4.2	Resultados e discussão	32
4.2.1	Síntese de 2,2-dioxo-1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -pirazolo[1,5- <i>c</i>][1,3]tiazoles	32
4.2.2	Estudo da reatividade do 16-DPA com aniões metil 1,2-diazafulvénio via ciclo-adição [8 π +2 π]	34
4.2.3	Estudo da reatividade da 16-DHP com aniões metil 1,2-diazafulvénio via ciclo-adição [8 π +2 π]	38
4.2.4	Estudo da reatividade da 16-Desidroprogesterona com aniões metil 1,2-diazafulvénio via ciclo-adição [8 π +2 π]	44
5	SÍNTESE DE DERIVADOS C-20 OXIMAS	49
5.1	Introdução	49
5.2	Resultados e discussão	51
5.2.1	Bromação	51
5.2.2	Formação da oxima e do cicloaduto	55
iii	CONCLUSÃO	59
6	CONCLUSÃO	61

iv	PARTE EXPERIMENTAL	65
7	PARTE EXPERIMENTAL	67
7.1	Aparelhagem utilizada	67
7.2	Solventes e reagentes	68
7.3	Procedimentos experimentais	68
7.3.1	Síntese de Ácido 1,3-tiazolidina-4-carboxílicos:	68
7.3.2	Síntese de Ácido N-Nitroso-1,3-tiazolidina-4-carboxílicos:	69
7.3.3	Síntese de 4 <i>H</i> , 6 <i>H</i> -Tiazolo[3,4- <i>c</i>][1,2,3]oxadiazol-7- <i>io</i> -3-olatos:	69
7.3.4	Síntese de 1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -Pirazolo[1,5- <i>c</i>]tiazole-carboxilatos:	70
7.3.5	Síntese de 2,2-Dioxo-1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -pirazolo[1,5- <i>c</i>]tiazoles:	71
7.3.6	Síntese de substratos esteroides referente ao capítulo 4:	73
7.3.7	Síntese de novos derivados esteroides via reações de cicloadição [8 π +2 π] de aniões metil 1,2-diazafulvénio:	73
7.3.8	Hidrólise de novos derivados esteróides hexacíclicos:	80
7.3.9	Redução de novos derivados esteróides hexacíclicos:	81
7.3.10	Sínteses referentes ao capítulo 5:	81
v	BIBLIOGRAFIA	85
	BIBLIOGRAFIA	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura básica do esteroide e estrutura do colesterol e respetiva numeração.	3
Figura 2	Representação esquemática da esteroidogénese.	4
Figura 3	Representação esquemática de classes de esteroides que apresentam propriedades farmacológicas.	6
Figura 4	Representação da estrutura de corticosteroides.	7
Figura 5	Representação da estrutura de esteroides neuroativos.	7
Figura 6	Exemplo de esteroides que apresentam propriedades farmacológicas.	8
Figura 7	Representação da estrutura do letrozole 2.1 e do tamoxifeno 2.2.	12
Figura 8	Representação da estrutura de inibidores da aromatase.	13
Figura 9	Representação da estrutura de inibidores da esteroide sulfatase.	14
Figura 10	Representação da estrutura de inibidores da 17 β -HSD.	15
Figura 11	Representação da estrutura do acetato de abiraterona e do cetoconazole.	16
Figura 12	Representação da estrutura de inibidores da 5 α -redutase.	17
Figura 13	Representação da estrutura de inibidores do CYP17.	18
Figura 14	Representação da estrutura de esteroides pentacíclicos com propriedades farmacológicas.	19
Figura 15	Síntese de esteroides pentacíclicos contendo uma pirazolina fundida ao anel D.	20
Figura 16	Síntese de esteroides pentacíclicos contendo uma pirazolina fundida ao anel D.	20
Figura 17	Síntese de esteroides pentacíclicos contendo pirazoles fundidos ao anel D.	21
Figura 18	Síntese de esteroides pentacíclicos contendo imadazoles fundidos ao anel D.	21
Figura 19	Síntese de esteroides pentacíclicos contendo triazoles fundidos ao anel D.	22
Figura 20	Síntese de esteroides pentacíclicos contendo isoxazolininas fundidas ao anel D.	22
Figura 21	Síntese de esteroides contendo isoxalidinas fundidas ao anel D.	23
Figura 22	Reação de condensação do 16-DPA com 2,3-dimetilbutadienos.	23

- Figura 23 Reação Diels-Alder do 16-DPA com o dimetileno-ciclobuteno. 24
- Figura 24 Formação dos aniões metil 1-azafulvénio e 1,2-diazafulvénio. 27
- Figura 25 Síntese do N-vinilpirazole através de migração sigmatrópica [1,8]H. 28
- Figura 26 Reação do metil 1,2-diazafulvénio com dipolarófilos ricos em eletrões. 28
- Figura 27 Reação do metil 1,2-diazafulvénio com o (trimetilsilil)acetileno. 29
- Figura 28 Reação do anião metil 1,2-diazafulvénio com dipolarófilos deficientes em eletrões. 29
- Figura 29 Reação do metil 1-azafulvénio atuando como 1,3-dipolo. 30
- Figura 30 Síntese de clorinas e bacterioclorinas através da cicloadição $[8\pi+2\pi]$ de aniões metil diazafulvénios. 31
- Figura 31 Esteroides obtidos através da cicloadição $[8\pi+2\pi]$ de aniões metil diazafulvénio ao 16-DPA. 31
- Figura 32 Síntese de novos 2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazoles. 32
- Figura 33 Síntese de 2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazoles com substituintes hidroxilo. 33
- Figura 34 Espetro de RMN protónico do composto 4.36. 34
- Figura 35 Estrutura das sulfonas disponíveis previamente sintetizadas. 34
- Figura 36 Espetro de RMN protónico da mistura de regioisómeros 4.47a-b. 37
- Figura 37 Reação das sulfonas 4.39 e 4.40 com o 16-DPA. 37
- Figura 38 Reação de hidrólise do esteroide hexacíclico 4.25. 38
- Figura 39 Síntese da 16-desidropregnenolona. 38
- Figura 40 Reação do anião metil diazafulvénio 4.52 com a 16-DHP. 39
- Figura 41 Reação do anião metil diazafulvénio 4.43 com a 16-DHP. 39
- Figura 42 Reação do anião metil diazafulvénio 4.44 com a 16-DHP. 40
- Figura 43 Espetro de RMN protónico do esteroide hexacíclico 4.55. 40
- Figura 44 Reação do anião metil diazafulvénio 4.46 com a 16-DHP. 41
- Figura 45 Reação do anião metil diazafulvénio 4.57 com a 16-DHP. 41
- Figura 46 Cicloadição $[8\pi+2\pi]$ *exo* e *endo* do substrato esteroide com o anião metil diazafulvénio 1-substituído, considerando a aproximação do dipolo pela face α . 42

Figura 47	Reação dos aniões metil diazafulvénio 1-substituídos com a N-fenilmaleimida. 42
Figura 48	Redução do esteroide hexacíclico 4.55. 43
Figura 49	Síntese da 16-desidroprogesterona. 44
Figura 50	Reação do anião metil diazafulvénio 4.52 com a 16-desidroprogesterona. 44
Figura 51	Espectro de RMN protónico do esteroide hexacíclico 4.63. 45
Figura 52	Reação do anião metil diazafulvénio 4.57 com a 16-desidroprogesterona. 46
Figura 53	Reação dos aniões metil diazafulvénio 4.43 e 4.44 com a 16-desidroprogesterona. 46
Figura 54	Reação do anião metil diazafulvénio 4.46 com a 16-desidroprogesterona. 47
Figura 55	Representação da estrutura de C-20 oximas com propriedades farmacológicas. 49
Figura 56	Estratégia de síntese de oximas α -halogenadas. 50
Figura 57	Reação de hetero Diels-Alder de nitrosoalquenos com dienófilos. 50
Figura 58	Estratégia de síntese de C-20 oximas contendo heterociclos em posição α . 51
Figura 59	Tentativa de bromação do 16-DPA na posição C-21. 52
Figura 60	Estratégia de síntese de esteroides C-21 bromados. 52
Figura 61	Espectro de RMN protónico do esteroide 5.10. 54
Figura 62	Tentativa de bromação da 16-DHP na posição C-21. 54
Figura 63	Tentativa de síntese da C-20 oxima α -bromada 5.11. 55
Figura 64	Síntese da C-20 oxima 5.19 partindo do 16-DPA. 56
Figura 65	Reação <i>one pot</i> na tentativa de formação do cicloaduto 5.21. 56
Figura 66	Espectro de RMN protónico do esteroide pentacíclico 5.20. 57
Figura 67	Reações de cicloadição $[8\pi+2\pi]$ do 16-DPA com aniões metil 1,2-diazafulvénio 61
Figura 68	Reações de cicloadição $[8\pi+2\pi]$ do 16-DHP com aniões metil 1,2-diazafulvénio 62
Figura 69	Reações de cicloadição $[8\pi+2\pi]$ do 16-Desidroprogesterona com aniões metil 1,2-diazafulvénio 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Reação do anião metil diazafulvénio 4.43 com o 16-DPA. 35
Tabela 2	Reação do anião metil diazafulvénio 4.44 com o 16-DPA. 35
Tabela 3	Reação do anião metil diazafulvénio 4.46 com o 16-DPA. 36
Tabela 4	Síntese do acetato de 21-bromo-16-desidropregnenolona na presença de $CuBr_2$. 53

ABREVIATURAS

16-DHP	do inglês <i>16-Dehydropregnenolone</i>
16-DPA	do inglês <i>16-Dehydropregnenolone acetate</i>
17 β -HDSI	do inglês <i>17β-Hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor</i>
AI	do inglês <i>Aromatase inhibitor</i>
AR	do inglês <i>Androgen receptor</i>
BPH	do inglês <i>Benign prostatic hyperplasia</i>
BTMSA	do inglês <i>Bis(trimethylsilyl)acetylene</i>
cDNAs	do inglês <i>Complementary Deoxyribonucleic acid</i>
COX-2	do inglês <i>Cyclooxygenase 2</i>
CRPC	do inglês <i>Castration resistant prostate cancer</i>
CYP ₁₇	do inglês <i>Cytochrome P₄₅₀ 17α hydroxylase/17,20 lyase</i>
d	dubleto
dd	duplo dubleto
DFT	do inglês <i>Density functional theory</i>
DHEA	do inglês <i>Dehydroepiandrosterone</i>
DHT	do inglês <i>Dihydrotestosterone</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>
EMAR	Espectroscopia de massa de alta resolução
FDA	do inglês <i>Food and drug administration</i>
FVP	do inglês <i>Fast vacuum pyrolysis</i>
GABA	do inglês <i>Gamma-aminobutyric acid</i>
GI ₅₀	do inglês <i>half maximal growth inhibition concentration</i>
HOMO	do inglês <i>Highest occupied molecular orbital</i>
IC ₅₀	do inglês <i>half maximal inhibitory concentration</i>
iNOS	do inglês <i>Inducible nitric oxide synthase</i>
IUPAC	do inglês <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
IV	espectroscopia de infravermelho
LUMO	do inglês <i>Lowest unoccupied molecular orbital</i>
m	multiplete
M	ião molecular
MCPBA	do inglês <i>meta-Chloroperoxybenzoic acid</i>
MDR ₁	do inglês <i>Multi-drug resistance gene</i>
mRNA	do inglês <i>Messenger ribonucleic acid</i>
MW	do inglês <i>Microwaves</i>
NBS	do inglês <i>N-bromosuccinimide</i>
NMDA	do inglês <i>N-methyl-D-aspartate</i>
NPM	do inglês <i>N-phenylmaleimide</i>
pf	ponto de fusão
ppm	partes por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear

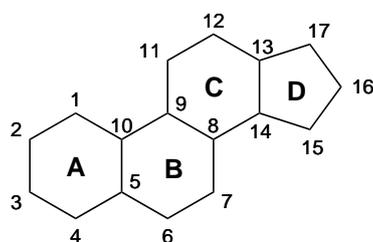
s	singleto
STSI	do inglês <i>Steroid sulfatase inhibitor</i>
t	tripleto
t.a.	temperatura ambiente
TCB	do inglês <i>1,2,4-Trichlorobenzene</i>
TFAA	do inglês <i>Trifluoroacetic anhydride</i>
THF	do inglês <i>Tetrahydrofuran</i>
TMSA	do inglês <i>Trimethylsilylacetylene</i>
TPP	do inglês <i>Tetraphenylporphyrin</i>

NOMENCLATURA

A nomenclatura utilizada nesta dissertação de mestrado segue as regras gerais da nomenclatura IUPAC.¹ Foi utilizado o sistema Hantzch-Widman para a nomenclatura de anéis fundidos.²

A nomenclatura dos aniões metil diazafulvénio foi adaptada do inglês *diazafulvenium methide*, considerando o catião diazafulvénio como um substituinte do anião metilo. A nomenclatura de heterociclos contendo nitrogénio, pirrole e imidazole foi igualmente adaptada do inglês *pyrrole* e *imidazole*.

Na nomenclatura dos esteroides seguiram-se as regras gerais da nomenclatura IUPAC de acordo com a numeração apresentada na seguinte figura:³



- 1 Fernandes, A. C., Herold B., Maia H. et al - Guia IUPAC para a Nomenclatura de Compostos Orgânicos (Tradução portuguesa nas variantes europeia e brasileira), Lidel: Lisboa, 2002.
- 2 McNaught A. D., Smith P. A. S. - Nomenclature of Heterocyclic Compounds. Em Comprehensive Heterocyclic Chemistry; Ed. Otto Meth-Cohn; Pergamon Press: Oxford, 1984; Vol I, pag. 7-45.
- 3 Campos, S. Luís; Mourato, Miguel - Nomenclatura dos Compostos Orgânicos. 2 Ed. Lisboa: Escolar Editora, 2002, ISBN 972-592-149-6

Parte I

INTRODUÇÃO

Neste capítulo é inicialmente abordada a estrutura dos esteroides e a estereoidogênese, analisando-se posteriormente as propriedades farmacológicas que esta classe apresenta. A propriedade anticancerígena dos esteroides é analisada em maior detalhe, apresentando uma visão global dos vários alvos enzimáticos. Para terminar este capítulo, é feita uma revisão do estado da arte das reacções que levam à formação de esteroides pentacíclicos com maior ênfase nos que contêm anéis heterocíclicos.

ESTEROIDES: ESTRUTURA E PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS

1.1 ESTRUTURA E BIOSÍNTESE

Os esteroides são um grupo de lípidos que compreende uma grande variedade de estruturas presentes na natureza, quer em estruturas animais quer em vegetais. Desempenham funções importantes, *in vivo*, tais como hormonas, provitaminas e regulam uma grande variedade de processos de desenvolvimento e fisiológicos desde a vida fetal até à fase adulta. As hormonas esteroides são todas sintetizadas a partir do colesterol **1.2** e apresentam estruturas semelhantes baseados na estrutura clássica de 4 anéis **1.1**, estrutura esta que foi determinada em meados dos anos 30. (Fig. 1) [1] Os anéis da estrutura do esteroide podem sofrer inversão na configuração, apresentando pelo menos um sistema de anéis fundidos, anéis A e B, na configuração *cis* (H-5 na posição β) ou na configuração *trans* (H-5 na posição α). A fusão dos anéis B e C e dos anéis C e D é usualmente *trans*.

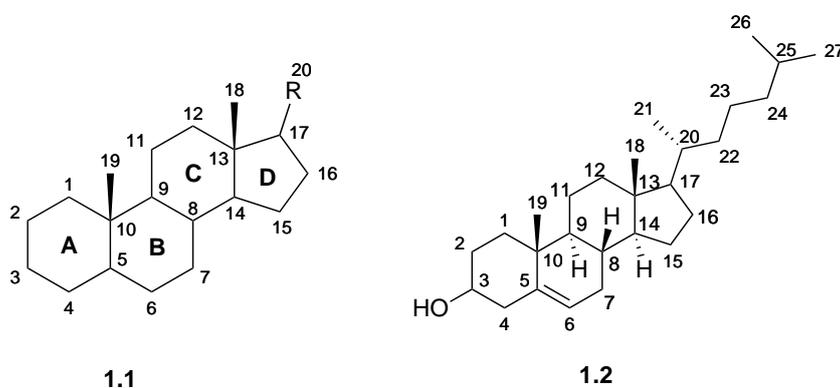


Figura 1: Estrutura básica do esteroide e estrutura do colesterol e respetiva numeração.

O processo pelo qual o colesterol é transformado em hormonas esteroides biologicamente ativas denomina-se esteroideogénese (Fig. 2). Estas hormonas lipídicas são sintetizadas nos testículos, ovários e cortex adrenal por sucessivas transformações enzimáticas do anel ciclo-pentanofenantreno do colesterol, o precursor metabólico de todos os esteroides.[2] Vários tipos de esteroides são sintetizados bioquimicamente pelo corpo humano envolvendo a conversão de colesterol (C₂₇) em progestinas (C₂₁), seguidos de androgéneos (C₁₉) e finalmente estrogéneos (C₁₈) envolvendo diversas enzimas.[3]

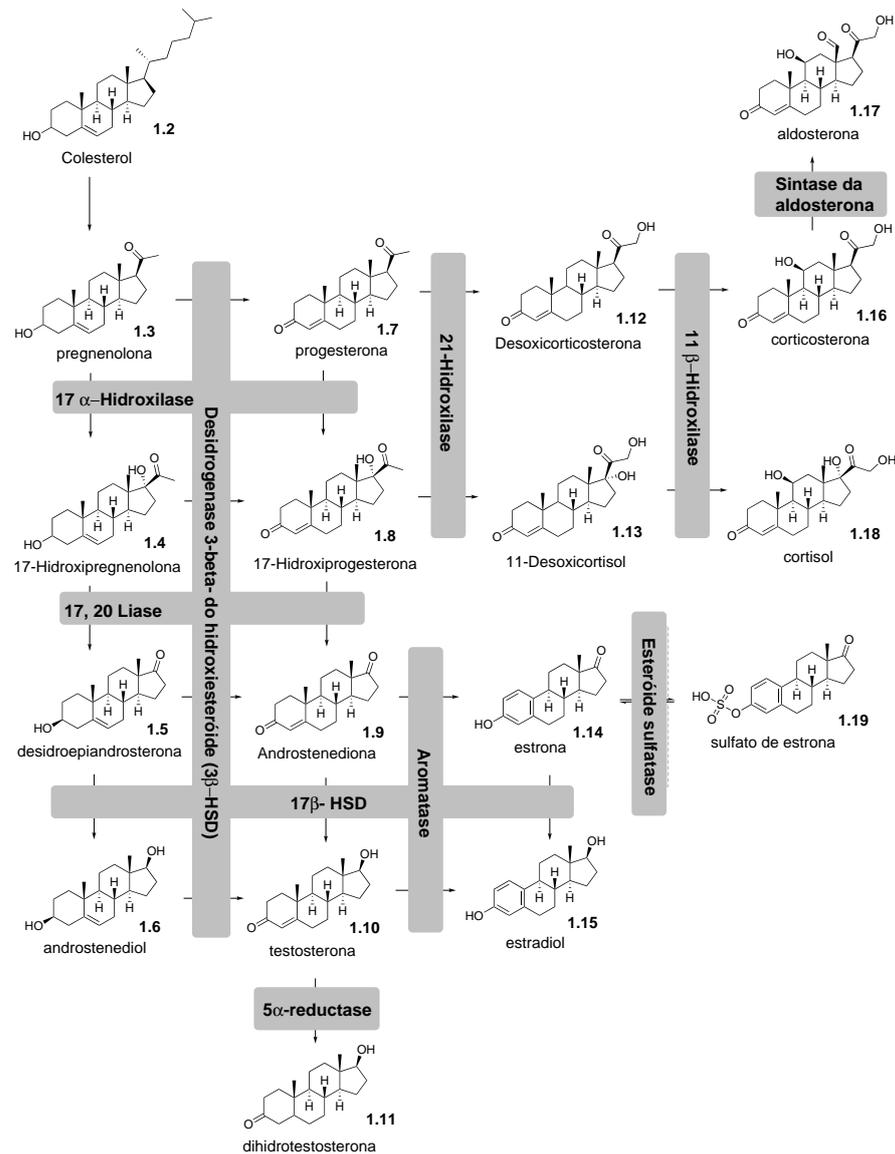


Figura 2: Representação esquemática da esteroidogênese.

As enzimas esteroidogênicas pertencem a dois grupos: enzimas do complexo citocromo P450 e hidroxisteroide desidrogenases. A elucidação do papel exato destas enzimas e cofatores foi facilitada pela identificação de bases genéticas de distúrbios raros na esteroidogênese. A compreensão da esteroidogênese é fundamental para perceber vários distúrbios na diferenciação sexual, reprodução, fertilidade, hipertensão e obesidade.[4]

O isolamento de algumas das enzimas chave das vias da esteroidogênese e a clonagem de muitos dos seus cDNAs e dos genes nos anos 80 mostrou que existe um menor número de enzimas comparando com o número de reações, uma vez que, na maioria dos casos, uma certa reação é catalisada pela mesma enzima em todos os tecidos. Isto permite que se analise a esteroidogênese como sendo um processo

simples repetido em cada glândula com apenas pequenas variações específicas do tipo de células em que ocorre.

1.2 PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS

Desde a sua identificação em 1935, os esteroides têm sido utilizados no tratamento de um largo espectro de doenças. Inicialmente, quando foram isolados nas glândulas adrenérgicas, pensou-se que apenas seriam úteis no tratamento de doentes que sofriam da doença de Adison.[5] Nos anos 40 resultados preliminares de estudos farmacológicos sugeriram que os esteroides poderiam ser potenciais fármacos em áreas tão distintas quanto contraceptivos orais e anti-inflamatórios.[1] Atualmente, o uso dos esteroides está particularmente relacionado com as suas propriedades anti-inflamatórias e de modelação do sistema imunitário.[6] Devido à sua importância e ao seu largo espectro de propriedades farmacológicas continuam a ser alvo de estudo para o desenvolvimento de novos fármacos, sendo que uma pequena alteração na estrutura do esteroide pode desencadear uma resposta biológica completamente distinta.[3] A maioria dos fármacos desenvolvidos são sintetizados partindo de outros núcleos esteroides, apesar de alguns esteroides poderem ser obtidos através da sua síntese total.

Os esteroides apresentam algumas propriedades muito particulares e úteis no desenvolvimento de novos fármacos. Usualmente o processo pelo qual a grande maioria das moléculas efectoras regula as várias funções do organismo começa com a ligação desses compostos aos recetores transmembranares presentes na superfície das células. Esta ligação aos recetores conduzirá à libertação de segundos mensageiros. Contrariando isto, os esteroides atuam inteiramente no núcleo celular. Os compostos atravessam as membranas celulares relativamente rápido, um processo atribuído ao seu carácter lipofílico. Quando no citoplasma, o esteroide pode sofrer algumas alterações químicas. Os esteroides ou os seus produtos transformados ligam-se posteriormente ao recetores nucleares presentes no flúido intracelular específicos da hormona esteroide. Algumas classes de esteroides, como os estrogénios, formam complexos com os recetores de estrogénio nucleares, entrando de seguida no núcleo celular. Naquele local, o complexo interage com a região celular do DNA específica daquela hormona em particular, ativando uma cadeia que resulta na síntese de uma nova proteína.[1]

São conhecidos diversos esteroides com aplicação farmacêutica como agentes anti-inflamatórios, antivirais, antitumorais, entre outros (Fig. 3).

Os esteroides como anticancerígenos podem ser vistos como anti-hormonais e anti-proliferativos inibindo a biossíntese através de inibição enzimática, atuando como inibidores dos recetores ou como

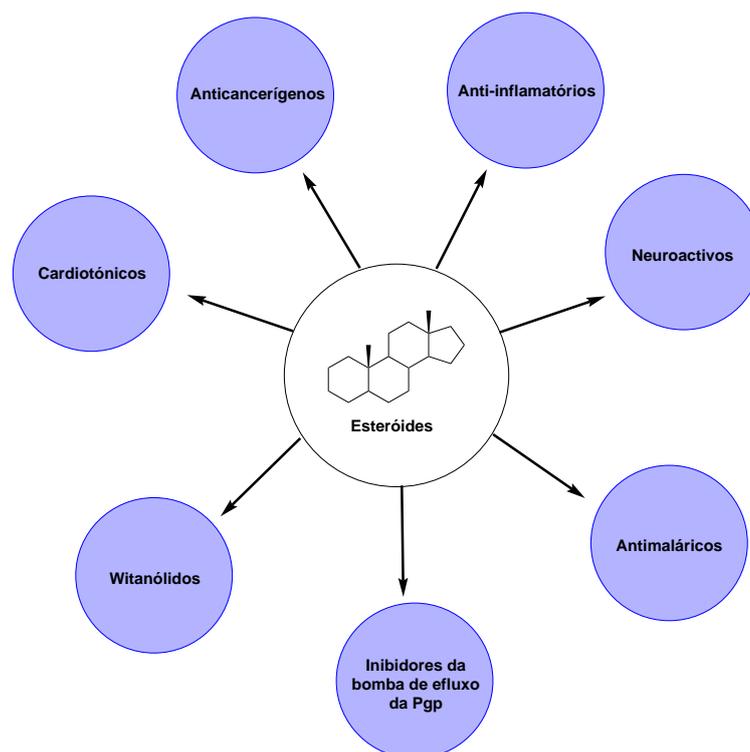


Figura 3: Representação esquemática de classes de esteróides que apresentam propriedades farmacológicas.

citotóxicos, apresentando citotoxicidade através de um alvo não hormonal. Os inibidores enzimáticos podem ser inibidores da esteroide sulfatase (STSI), inibidores da aromatase (AI) ou inibidores da hidroxisteroide dehidrogenase (17β -HSDI), que serão analisados em maior detalhe na próxima secção. Os inibidores de recetores podem ser antiestrogénicos ou antiandrogénicos.

Os glucocorticóides, outra classe importante de esteróides, são utilizados como agentes de primeira linha para o tratamento de várias doenças inflamatórias crónicas como a asma, artrite reumatóide e dermatites.[7] Os glucocorticóides inibem o processo inflamatório por vários mecanismos: redireccionando o tráfico de linfócitos, inibindo a expressão do gene citoquina e inibindo a expressão de moléculas de adesão. Estes aumentam também a síntese da anexina-1 e reprimem a atividade da forma indutível da sintase de óxido nítrico (iNOS).[8] Em Portugal existem vários corticosteróides aprovados pelo Infarmed nomeadamente os glucocorticóides dexametasona **1.20** e prednisolona **1.21** e o mineralocorticóide fludrocortisona **1.22** (Fig. 4).

Os esteróides endógenos podem também interagir com recetores transmembranares e recetores ionotrópicos (GABA e NMDA) alterando a excitabilidade neuronal, sendo conhecidos por esteróides neuroativos. A alopregnanolona **1.23** e a pregnanolona exercem ações inibitórias na neurotransmissão, aumentando a transmissão gabaérgica, enquanto que outros neuroesteróides como o sulfato de preg-

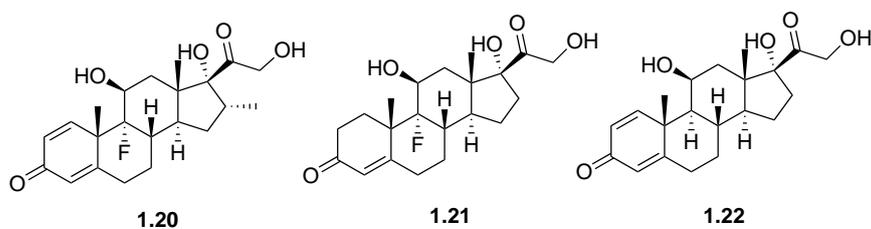


Figura 4: Representação da estrutura de corticosteroides.

nenolona exercem efeitos excitatórios na neurotransmissão, atuando como moduladores alostéricos negativos do receptor GABA (Fig. 5).[9, 10] Destes esteroides neuroativos vários têm aplicação na medicina, a Alfaxolona **1.24** é utilizada como anestésico geral em medicina veterinária e a Galaxona **1.25**, um derivado do esteroide endógeno alopregnanolona, encontra-se em ensaios clínicos de fase II para o tratamento de um tipo de epilepsia.[11, 12]

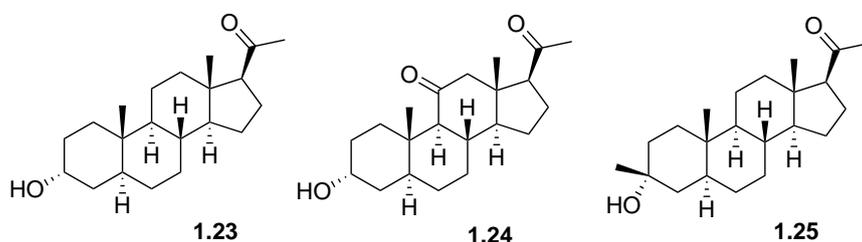


Figura 5: Representação da estrutura de esteroides neuroativos.

Alguns derivados de esteroides podem também apresentar atividade antimalárica, existindo vários estudos com derivados da diosgenina, como é exemplo o composto **1.26** (Fig. 6). A presença de uma ligação dupla entre o carbono 4 e o 5 e de um grupo carbonilo no carbono 3 parecem ser indispensáveis para a atividade antiplasmodial presente em alguns esteroides.[13] Singh e colaboradores reportaram 1,2,4-trioxanos baseados na estrutura dos pregnanos eficazes contra a malária multi-resistente, apresentando excelentes resultados em testes in vivo em murganços. [14]

Os witanólidos representam outro grupo interessante de esteroides, derivados do ergostano, oxidados em C-1 e contendo uma δ -lactona em C22,26.[15] Este grupo de esteroides encontrados na natureza, em plantas, animais e outros organismos, exibe diversas propriedades biológicas, como antimicrobial, anti-inflamatório, hepatoprotetora e anti-tumoral. Alguns witanólidos apresentam citotoxicidade e grande interesse como quimiopreventivos no cancro, sendo potenciais indutores na redutase da quinona e inibidores seletivos na enzima COX-2.[16] A witaferina A **1.28**, primeiro witanólido isolado da planta medicinal *Withania somnifera* em 1965, é um potente agente antiangiogênico e um inibidor da proteína vimentina, inibindo

a invasão e metástases de células do cancro da mama.[17] A witaferrina A induz também a geração de espécies de oxigénio reativas e disfunções mitocondriais em células cancerígenas, desencadeando eventos responsáveis pela promoção de várias vias de apoptose.[18]

Alguns esteroides, análogos da progesterona substituídos em C-7, foram identificados como potentes inibidores da bomba de efluxo da glicoproteína-P. O produto do gene MDR1 tem sido associado ao fenótipo expresso por vários tipos de cancros que apresentam resistência a múltiplos fármacos. Os compostos análogos da progesterona foram testados em células do cancro de mama com a transdução do gene MDR1, medindo a sua capacidade de influenciar a acumulação intracelular de vimblastina e doxorrubicina, conhecidos substratos da bomba de efluxo da glicoproteína-P. O composto **1.27** apresentou resultados superiores ao verapamil e equivalentes à ciclosporina A.[19]

Os esteroides cardiotónicos representam um grupo de compostos naturais com a capacidade de influenciar o ritmo cardíaco aumentando a força contráctil do miocárdio. O núcleo esteroide dos esteroides cardiotónicos é muito característico e diferente do sistema de anéis normal, uma vez que os anéis A/B e C/D apresentam-se fundidos em cis e o B/C em trans. A digoxina **1.29**, um dos esteroides cardiotónicos mais utilizados, é usado para várias patologias cardíacas. O seu principal mecanismo de ação envolve a inibição da Na^+/K^+ ATPase, que mantém as concentrações de K^+ elevadas e as de Na^+ baixas no citoplasma, maioritariamente no miocárdio.[20] Desta forma, aumentam a concentração intracelular de Na^+ , que por sua vez produz um aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} , levando ao aumento da contratilidade do miocárdio.

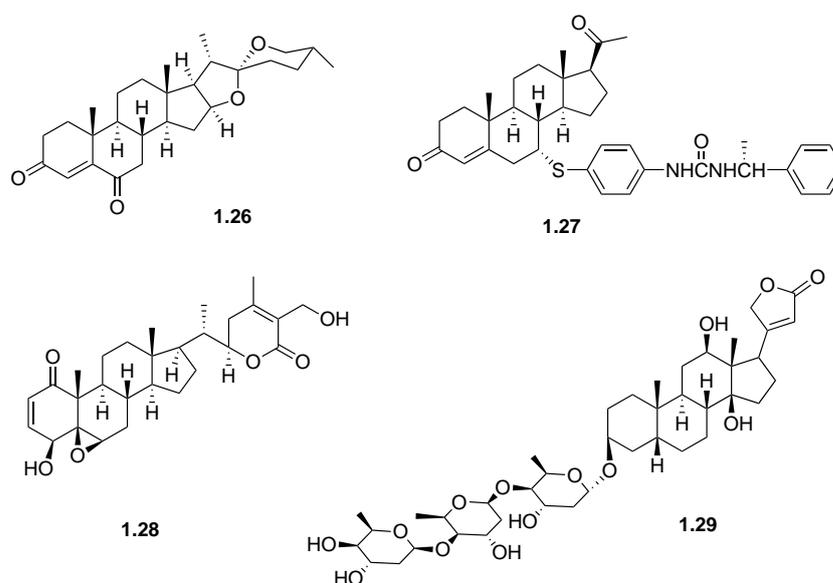


Figura 6: Exemplo de esteroides que apresentam propriedades farmacológicas.

Um estudo detalhado dos mecanismos da apoptose induzida pela digoxina e pela digitoxina revelou que estes compostos causam uma significativa downregulation da expressão de várias proteínas induzidas por interferões, juntamente com a sobre-expressão de membros da família aldo-ceto redutase, interferindo nas defesas anti-oxidantes das células. Alguns estudos apontam também para a diminuição da migração e invasão de vários tipos de células cancerígenas pela digoxina e os seus efeitos antiangiogénicos. Os esteroides cardiotónicos inibem também a secreção de fatores de crescimento dos fibroblastos em células cancerígenas que secretam níveis elevados desses fatores de crescimento responsáveis pela promoção da angiogénese.[15]

2.1 CANCRO DA MAMA

O cancro da mama é o cancro do tecido glandular mamário. De entre as mulheres europeias, o cancro da mama é a principal causa de morte por cancro, causando uma em cada seis das mortes que ocorrem por cancro.[21] Em Portugal, dados da Direção Geral da Saúde apontam para uma taxa bruta de incidência de 57,94, superior à taxa padrão europeia. O cancro da mama é a patologia com maior incidência na população feminina, apresentando uma taxa bruta de 110,12.[22] Os estrogénios são necessários para o crescimento e desenvolvimento do tecido normal mas são também responsáveis pela promoção de certos tipos de tumores tais como: hiperplasia da próstata, cancro da próstata, endometrial mas principalmente cancro da mama.[23, 24] Segundo a literatura, uma exposição aumentada ao estradiol (1.15) é um dos fatores de risco mais determinantes para a progressão e desenvolvimento de tumores mamários, sendo que entre 95-97% dos casos, na sua fase inicial, são sensíveis ao estradiol.[25] O cancro da mama tem maior incidência em mulheres pós-menopausa, uma vez que o funcionamento dos ovários é cessado bem como o controlo da hipófise sobre a produção de estrogénios. Nestes casos, a biossíntese de estrogénios ocorre maioritariamente nos tecidos periféricos como fígado, pele e tecido adiposo.[26] Apesar de, por essa razão, apresentarem baixos níveis de estrogénios no sangue, a concentração destas hormonas nos tecidos são surpreendentemente elevadas comparativamente com as concentrações encontradas nos tecidos normais.[27] A concentração de estradiol nos tecidos no carcinoma da mama é 5 vezes maior do que no plasma em mulheres pré-menopausa e 23 vezes maior em mulheres pós-menopausa.[28] Estes dados sugerem a existência de uma via biossintética nos tumores que leva à acumulação destas hormonas. Vários fatores podem estar implicados neste processo, quer o aumento do *uptake* de esteroides provenientes do plasma, quer a formação do potente estrogénio, estradiol, pelo tecido mamário cancerígeno. Este tecido contém todas as enzimas responsáveis pela biossíntese local de estradiol partindo dos seus precursores presentes no plasma. Existem duas vias principais implicadas na formação de estradiol nestes tecidos: a via da aromatase que transforma androgénios em estrogénios; e a via da sulfatase que converte sulfato de estrona (1.19) em estrona (1.14), convertida posteriormente em estradiol pela atividade redutiva da 17β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1.[28] Os inibidores destas

enzimas têm sido utilizados como anticancerígenos, apresentando excelentes resultados e eficácia no cancro da mama, especialmente os inibidores da aromatase como o letrozole **2.1**, apresentando resultados superiores ao tamoxifeno **2.2** (Fig. 7).[29]

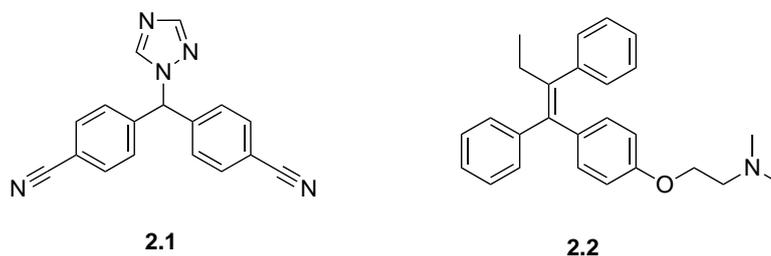


Figura 7: Representação da estrutura do letrozole **2.1** e do tamoxifeno **2.2**.

2.1.1 Aromatase

A aromatase é a enzima responsável pelo passo-chave, e limitante, na biossíntese de estrogénios, sendo um fator importante no desenvolvimento sexual das características femininas. É um membro da superfamília citocromo P₄₅₀, produto do gene CYP19, e é responsável pela aromatização de androgénios (C₁₉) em estrogénios (C₁₈) por sucessivas hidroxilações, eliminando o carbono 19 sob a forma de ácido fórmico.[30] Esta enzima é maioritariamente expressa nos ovários e na placenta, estando também presente em baixo nível noutros tecidos, incluindo cérebro, tecido mamário, vasos sanguíneos, ossos. Apesar do seu papel importante a aromatase encontra-se sobre-expressa em tecidos de cancro da mama. Os inibidores da aromatase (AIs) têm sido vistos como uma valiosa alternativa ao tamoxifeno. De facto, estudos recentes demonstraram que a 3^a geração de AIs pode ser usada como agente de primeira linha contra tumores sensíveis ao estrogénio em doentes do sexo feminino pós-menopausa com cancro da mama em estado avançado. Estes compostos poderão também ser usados para quimioprevenção, uma estratégia na qual o tamoxifeno já demonstrou reduzir a incidência de cancro da mama.[31] Os AIs podem-se dividir em inibidores tipo I ou tipo II. Os inibidores tipo I são análogos da androstenediona (**1.9**) ligando-se ao mesmo local da enzima (ex: exemestano **2.3**). A testolactona **2.4** é usada no tratamento de cancro da mama em estado avançado e o composto **2.5** apresenta resultados próximos dos do letrozole, apresentando um IC₅₀ de 11.8 nM (Fig. 8). Os inibidores do tipo II são não-esteroides e ligam-se reversivelmente ao grupo heme da enzima através de um átomo de azoto básico (ex: anastrozole e letrozole).

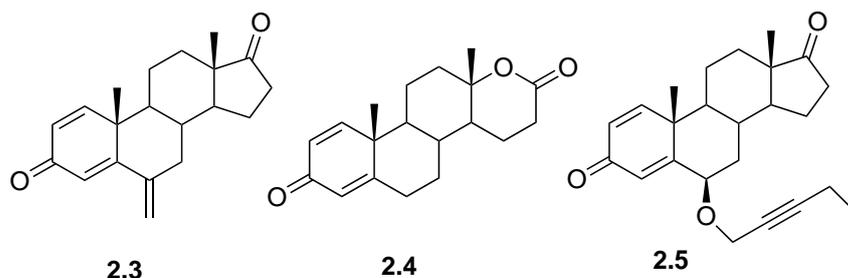


Figura 8: Representação da estrutura de inibidores da aromatase.

2.1.2 Esteróide Sulfatase

A esteroide sulfatase (STS) é uma enzima microsomal e é uma proteína integral de membrana do retículo endoplasmático. A STS é expressa em vários tecidos, incluindo a placenta e a pele. Pertence à superfamília sulfatase e catalisa a hidrólise reversível de vários sulfatos de esteroide como o sulfato de desidroepiandrosterona e o sulfato de estrona. O passo inverso é catalisado pela enzima sulfotransferase e, em condições normais, esta reação encontra-se em equilíbrio com a promovida pela sulfatase.[32] O sulfato de estrona é a principal fonte de esteroides activos nos tumores de cancro da mama dependente de hormonas, sendo produzida dez vezes mais estrona por esta via do que pela via da aromatase, e tem um tempo de vida significativamente maior do que a estrona.[33] Os sulfatos de esteroides são altamente polares e por isso não têm afinidade para o receptor de estrogénios. Estes sulfatos funcionam como um reservatório de estrogénios protegendo os tecidos periféricos de uma estimulação excessiva. A expressão de mRNA da STS é maior no tecido de carcinoma da mama e tem sido associada à progressão da doença. A sua atividade aumentada tem sido também detectada noutros tipos de cancro como o carcinoma endometrial, carcinoma dos ovários e da próstata.

Durante a última década foram desenvolvidos vários inibidores potentes da sulfatase, estruturalmente distintos, destacando aqueles que contêm um grupo sulfamato numa posição arílica ($Ar - OSO_2NH_2$), um farmacóforo para a inibição irreversível da esteroide sulfatase. A 3-O-sulfamato de estrona **2.6** é o protótipo deste tipo de inibidores, contendo um grupo sulfamato na posição 3 (Fig. 9). Apesar de apresentar uma potente e irreversível inibição da esteroide sulfatase, este composto exhibe fortes propriedades estrogénicas, limitando o seu potencial uso no tratamento do cancro da mama.[15] Os inibidores da STS de 1ª geração são puramente inibidores hormonais sendo citostáticos. Por sua vez os de 2ª geração, análogos do 2-metoxiestradiol, são inibidores com uma ação dual, inibindo igualmente a polimerização da tubulina, sendo por isso citotóxicos.[34] O composto **2.7**, análogo do 2-metoxiestradiol, apresenta um GI₅₀ de 0.07 μ M em

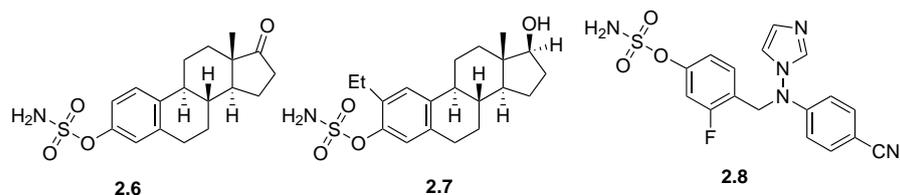


Figura 9: Representação da estrutura de inibidores da esteroide sulfatase.

células MCF-7, bem como atividade antiangiogénica e indução da apoptose.[35] Encontram-se em estudo inibidores da STS de 3^a geração que, para além de inibirem a STS, inibem a aromatase.[36] O composto **2.8** é o exemplo de um inibidor de 3^a geração, apresentando um IC₅₀ de 0.2 nM e 2.5 nM para a aromatase e STS, respectivamente. Este composto interage com a aromatase através da ligação do par de elétrons livres do átomo sp² de azoto do imidazole ao grupo heme da aromatase.

2.1.3 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase

As 17 β -HSD são um grupo de álcool oxidoredutases que catalisam a desidrogenação de 17-hidroxiesteroides na esteroidogénese. Como referido na secção anterior, o sulfato de estrona é a principal fonte de esteroides activos nos tumores de cancro da mama. O sulfato de estrona é convertido em estrona após a ação da esteroide sulfatase, que é posteriormente convertida em estradiol após a ação redutiva da enzima 17 β -HSD1. Por estas razões a enzima 17 β -HSD1 é também vista como um potencial alvo terapêutico que tem atraído a atenção da comunidade científica.[37] Esta enzima foi localizada no citoplasma de células epiteliais malignas no cancro da mama. Estudos *in vitro* e *in vivo*, após infusão de estrogénios marcados isotopicamente em doentes pós-menopausa com cancro da mama, mostraram que a ação redutiva da enzima está aumentada em relação à sua ação inversa oxidativa.[28] A desidroepiandrosterona (**1.5** DHEA) pode também ser reduzida por ação da 17 β -HSD em androstenediol (**1.6**) que, apesar de ser um androgénio, liga-se ao receptor de estrogénios e estimula o crescimento de tumores mamários induzidos *in vivo* em murganhos.[37, 38] Recentemente Allan e colaboradores reportaram a descoberta de inibidores seletivos da 17 β -HSD tipo I que demonstram potencial para o tratamento do cancro da mama, dos quais são exemplo os compostos **2.9-2.11** (Fig. 10).[37]

2.2 CANCRO DA PRÓSTATA E BPH

A próstata é uma glândula do sistema reprodutor masculino, localizada abaixo da bexiga e à volta da uretra, cujo papel principal é secretar um fluído ligeiramente ácido que constitui 50–75% do

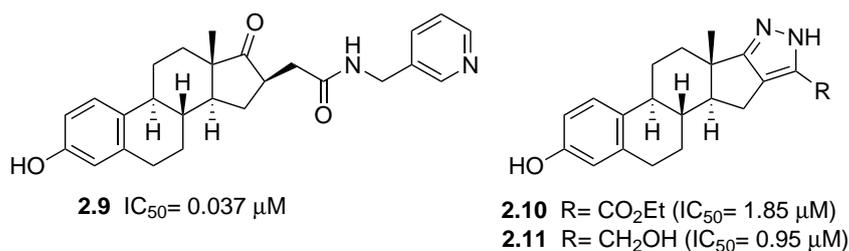


Figura 10: Representação da estrutura de inibidores da 17β -HSD.

volume do sêmen. Esta glândula é um órgão dependente de androgêneos e portanto, estes, são fundamentais para o seu crescimento e função. A próstata pode ser afetada por várias doenças, sendo as mais conhecidas o cancro da próstata e a hiperplasia benigna da próstata. Na Europa, o cancro da próstata apresenta-se como a segunda causa de morte mais comum por cancro em homens, afetando preferencialmente a população do sexo masculino acima dos 80 anos.[21] Dados da Direção-Geral da Saúde apontam para uma taxa bruta de incidência de 108,81, colocando-o como o tipo de cancro mais incidente em Portugal e 25 pontos acima da taxa padrão europeia.[22]

A Hiperplasia benigna da próstata (BPH), por sua vez, é caracterizada pelo aumento dos tecidos glandulares e fibromusculares, resultando na formação de nódulos na região periuretral da próstata. Esta formação de nódulos pode levar à obstrução total ou parcial da uretra levando ao aparecimento de vários sintomas como hesitância urinário, polaquiúria e retenção urinária.

Cerca de 90-95% dos androgêneos circulantes são produzidos nos testículos, sendo os restantes 5-10% sintetizados nas glândulas adrenais. Em 1944, Moore e colaboradores reportaram que a inexistência de atividade testicular em homens após os 40 anos prevenia o desenvolvimento da Hiperplasia Benigna da Próstata (BPH), bem como de cancro da próstata. Por essa razão, a abordagem clássica ao tratamento do cancro da próstata dependente de hormonas envolve a castração, quer cirúrgica ou química.[39, 40] Apesar dos bons resultados apresentados por esta estratégia, após a terapia de diminuição dos níveis de androgêneos alguns casos apresentam resistência ao tratamento, aumentando a sensibilidade a níveis muito baixos de androgêneos. O mecanismo proposto para esta resistência envolve o aumento da expressão do receptor de androgêneos e o aumento da produção local de androgêneos para compensar a diminuição de testosterona circulante. As células tumorais apresentam também uma hipersensibilidade aos efeitos dos fatores promotores de crescimento da 5-dihidrotestosterona (**1.11** DHT).[41] Estudos indicam que o cancro da próstata resistente à castração (CRPC) continua a ser impulsionado pela via de sinalização dos recetores de androgêneo (AR). Os ensaios clínicos de fase I do acetato de abiraterona **2.12**, inibidor do CYP17, mostraram isso mesmo, uma vez que resultou na

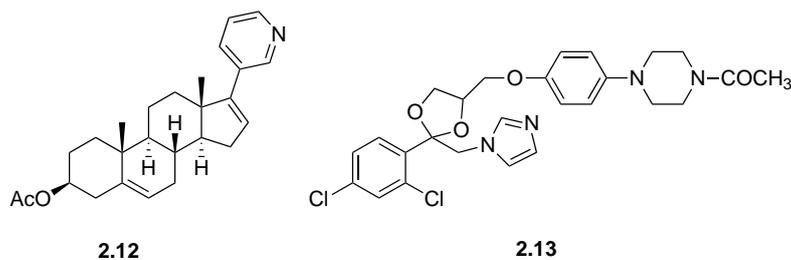


Figura 11: Representação da estrutura do acetato de abiraterona e do cetoconazole.

diminuição do antigénio específico da próstata (PSA).[42] Este fármaco foi aprovado pela FDA, em 2011, para o tratamento do CRPC.

O crescimento do cancro da próstata depende da relação entre as células em proliferação e as células em morte celular. Os androgéneos são os principais reguladores dessa relação, estimulando a proliferação celular e inibindo a apoptose. As hormonas androgénicas, em particular a testosterona e a DHT exercem os seus efeitos na próstata através da ligação aos AR, iniciando a transcrição que desencadeia a síntese de proteínas específicas e também proliferação celular. Por estas razões, uma das estratégias clínicas para o tratamento do cancro da próstata e da BPH envolve a redução do nível de androgéneos, inibindo as enzimas chave envolvidas na biossíntese de androgéneos, tais como a 5α -redutase e o CYP17.[43] O antimicótico cetoconazole **2.13**, que é também um inibidor do CYP17 foi usado com sucesso no tratamento de cancro da próstata (Fig. 11).[44]

A STS, referida anteriormente, catalisa também a conversão de DHEA em sulfato de DHEA, podendo também desempenhar um papel importante na produção intratumoral de androgéneos. Os estrogéneos são também considerados um fator importante associado à proliferação de células do carcinoma da próstata.[45]

2.2.1 5α -redutase

A 5α -redutase é uma enzima dependente do NADPH catalisa a conversão irreversível da dupla ligação C_{4,5} da testosterona (**1.10**) no correspondente 3-oxo- 5α -esteróide (**1.11**). O mecanismo desta conversão envolve a ligação do cofator e posteriormente do substrato formando um complexo terciário. Apesar da testosterona ser o principal substrato desta enzima, esta reação ocorre com outros esteróides endógenos. A família das 5α -redutases é composta por três isoenzimas, sendo a tipo I e tipo II as mais conhecidas. A isoforma I é a forma dominante, pode ser encontrada na pele, no fígado, rins, cérebro e pulmões. A atividade desta isoforma encontra-se aumentada principalmente no cancro da próstata tendo maior influência do que na BPH. A isoforma II, para a qual a testosterona tem maior afinidade,

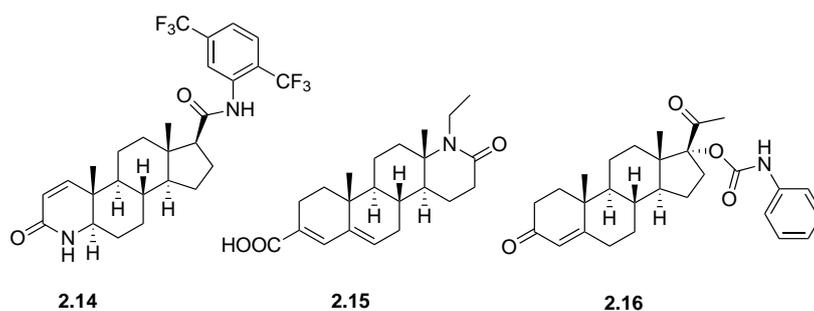


Figura 12: Representação da estrutura de inibidores da 5 α -redutase.

predomina na próstata e noutros tecidos genitais e desempenha um papel fundamental na BPH. [46].

A 5 α -redutase é uma enzima que se encontra ligada às membranas microsomais possuindo portanto um elevado número de aminoácidos hidrofóbicos distribuídos ao longo da sua estrutura, o que sugere que seja uma proteína intrínseca da membrana. Por esta razão, a proteína ainda não foi purificada devido à sua natureza instável e a sua estrutura cristalina permanece desconhecida. Como tal, o design de inibidores tem sido baseado maioritariamente no conhecimento atual da estrutura dos substratos, no mecanismo da enzima e em informações prévias sobre relações de estrutura-atividade.[47]

Um inibidor ideal da 5 α -redutase deveria ligar-se à enzima e ter baixa ou nenhuma afinidade para o receptor de androgéneos ou outros recetores esteroidais. A finasterida, que pertence ao grupo dos azaesteroides, foi o primeiro esteroide inibidor da 5 α -redutase aprovado pela FDA para o tratamento da BPH, e apresenta uma maior seletividade pela isoforma II (Fig. 12). Este composto contribuiu para o desenvolvimento de outros azaesteroides inibidores de ambas as isozimas como a dutasterida, **2.14**, que é cerca de sessenta vezes mais potente. A dutasterida é usada para o tratamento da BPH e diminui os sintomas do trato urinário inferior. Apesar do sucesso da finasterida e da dutasterida, estes fármacos aumentam a perda de músculo e osso e aumentam a impotência. O grupo dos derivados esteroides contendo um ácido carboxílico na posição três tem também despertado grande interesse como inibidores da 5 α -redutase. Alguns estudos deste grupo de esteroides, nomeadamente do composto **2.15**, mostrou que inibem potentemente a 5 α -redutase tipo II bem como reduzem significativamente o volume da próstata em murganhos.[48, 49]

Considerando que a progesterona (**1.7**) e o desoxicorticosterona (**1.12**) competem com a testosterona pela 5 α -redutase, os seus núcleos têm sido usados como ponto de partida para o desenvolvimento de novos inibidores da enzima.[50] Exemplo disso é o composto **2.16** que apresenta um IC₅₀ de 10 nM para a 5 α -redutase.

2.2.2 CYP17

A esteroide 17 α -hidroxilase, ou CYP17, é uma enzima do citocromo P450, fundamental na biossíntese de androgêneos. O CYP17 contém um grupo protético heme no seu local activo responsável pela atividade catalítica da enzima. Esta enzima catalisa a hidroxilação da progesterona em pregnenolona na posição 17R e cliva a ligação C17-C20 originando androstenediona (1.9) e DHEA. Estes esteroides são androgêneos relativamente fracos mas serão posteriormente convertidos por outras enzimas (5 α -redutase, 17 β -HSD) em androgêneos mais potentes como a testosterona e a DHT. O primeiro passo catalisado por esta enzima, o da hidroxilação, produz um intermediário da biossíntese dos corticoesteroides e por esta razão os inibidores do CYP17 apenas deverão inibir a sua atividade C17,20-liase.

A maioria dos inibidores da CYP17 apresentam heterociclos contendo azotos na posição 17 capazes de se coordenar com a molécula de ferro presente no grupo heme prostético da enzima.[51] A galeterona 2.17, fármaco oral em ensaios clínicos de fase II para o tratamento do CRPC, contém um grupo benzimidazole na posição 17 (Fig. 13). Este fármaco atua por três mecanismos distintos: inibe a CYP17, impedindo assim que as glândulas adrenais e as células tumorais produzirem androgêneos; antagoniza a ligação da testosterona ao AR; e degrada a proteína AR.[52] Como foi referido anteriormente, a abiraterona, usada no tratamento do CRPC, é um inibidor do CYP17 contendo uma piridina na posição 17. Contudo, os inibidores do CYP17 não levam ao bloqueio completo da formação de androgêneos pelo que seria vantajoso inibir adicionalmente a 5 α -redutase e não inibir a aromatase, essencial para o metabolismo da testosterona. Os esteroides contendo oximas na posição C-20 têm sido investigadas nesse sentido. [53, 48]

Recentemente, DeVore e colaboradores, apresentaram um importante progresso publicando a estrutura cristalina de raio-X do CYP17 na presença de potentes inibidores esteroides, podendo contribuir para a descoberta de novos inibidores potentes do CYP17.[54]

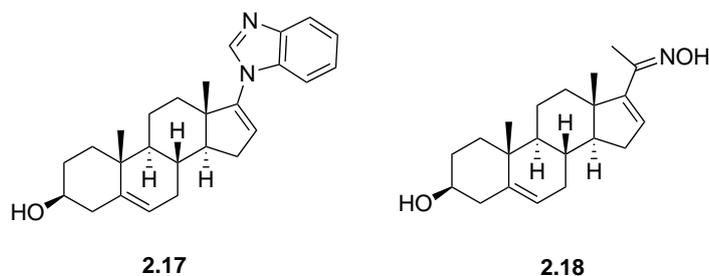


Figura 13: Representação da estrutura de inibidores do CYP17.

ESTEROIDES PENTACÍCLICOS

Os esteroides pentacíclicos começaram a ser investigados nos anos 60 e têm despertado grande interesse ao longo do tempo, quer ao nível da síntese, quer ao nível biológico. Mais especificamente, os esteroides pentacíclicos que contêm um heteroátomo ou heterociclo têm mostrado propriedades biológicas únicas, o que levou à procura de novas estratégias sintéticas para a obtenção de novos esteroides.[55] A introdução de um heteroátomo ou heterociclo na estrutura base do esteroide resulta habitualmente em alterações das suas propriedades biológicas, aumentando, por exemplo, a citotoxicidade contra uma certa linha celular tumoral.[56] Estes esteroides apresentam um largo espetro de propriedades biológicas: para além da sua atividade hormonal típica de esteroides apresentam normalmente potente atividade antimicrobial, em particular anti-tuberculosa, atuam como antioxidantes, promovem reações imunes e possuem atividade anticancerígena.[57, 58] Existem vários exemplos que comprovam a atividade anticancerígena destes esteroides pentacíclicos como é o caso dos compostos: **3.1** que apresenta atividade na linha celular de cancro da mama; **3.2** que apresenta atividade para o tratamento da leucemia promielocítica aguda; e **3.3** que apresenta atividade para o tratamento de cancro da próstata (Fig. 14).[59, 60, 61] A introdução de heterocíclicos em estruturas de esteroides é, na realidade, uma estratégia frequentemente utilizada no desenvolvimento de fármacos e no design de inibidores de algumas enzimas, como é o caso dos inibidores do CYP17. Seguidamente, serão apresentados alguns exemplos das reações que levam à síntese de esteroides pentacíclicos com um anel fundido ao anel D do esteroide.

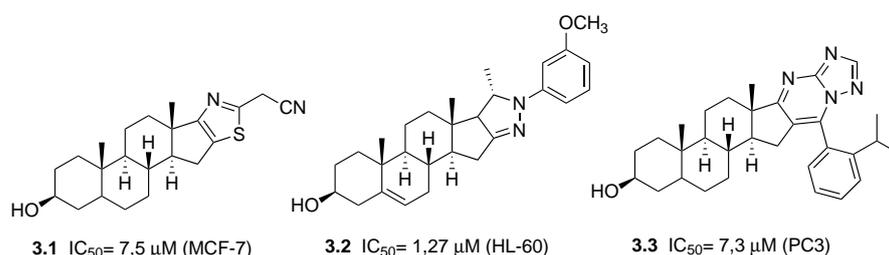


Figura 14: Representação da estrutura de esteroides penta- e hexacíclicos com propriedades farmacológicas.

3.1 ESTEROIDES FUNDIDOS A PIRAZOLES E PIRAZOLINAS

De todos os esteroides fundidos a heterociclos de cinco membros, os derivados contendo pirazóis e pirazolinas são os mais estudados devido à sua fácil síntese. esteroides como o acetato de 16- desidropregnenolona (16-DPA) podem ser usados para a síntese destes compostos (Fig. 15). A reação do 16-DPA **3.4** com hidrazinas resulta na formação da hidrazona **3.5** com configuração Z. Após reação com ácido acético em etanol as hidrazonas formam a pirazolina correspondente **3.6** através de uma reação de ciclização.[62]

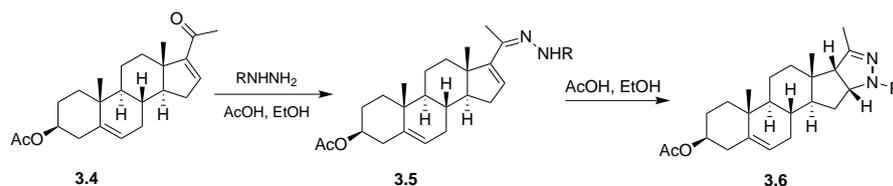


Figura 15: Síntese de esteroides pentacíclicos contendo uma pirazolina fundida ao anel D.

Abdalla e colaboradores reportaram a síntese de esteroides fundidos a pirazolinas através da reação de esteroides contendo (E)-arilmetilenos com hidrazina e ácido acético (Fig. 16). O isômero E favorece a condensação da hidrazina após a formação da hidrazona, formando a pirazolina após ataque do grupo NH_2 à ligação dupla pela face α tornando assim a reação estereosseletiva.[63] Este esteroide **3.8** e derivados apresentam atividade inibitória da aromatase humana ($\text{IC}_{50} = 6,83 \mu\text{M}$), apresentando potencial atividade anticancerígena.[64]

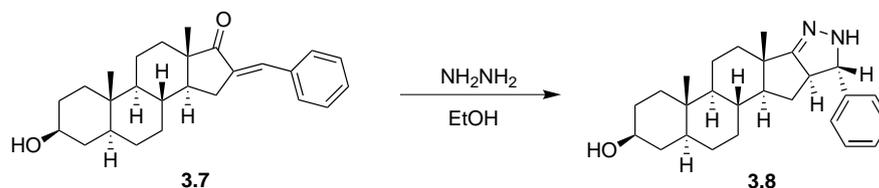


Figura 16: Síntese de esteroides pentacíclicos contendo uma pirazolina fundida ao anel D.

Foram também reportadas algumas reações que levaram à síntese de esteroides fundidos a pirazoles (Fig. 17). Estes esteroides foram facilmente obtidos através da condensação na posição 16 do esteroide **3.9** com dietil oxalato, seguido da reação com hidrato de hidrazina. A hidrólise do grupo éster seguido de acoplamento da amida originou os esteroides **3.12** e **3.13**.[65] Este compostos apresentam potencial como anticancerígenos uma vez que possuem valores de IC_{50} na ordem dos μM para a 17β -hidroxiesteroide desidrogenase, uma das enzimas-chave referidas nas secções anteriores.[37]

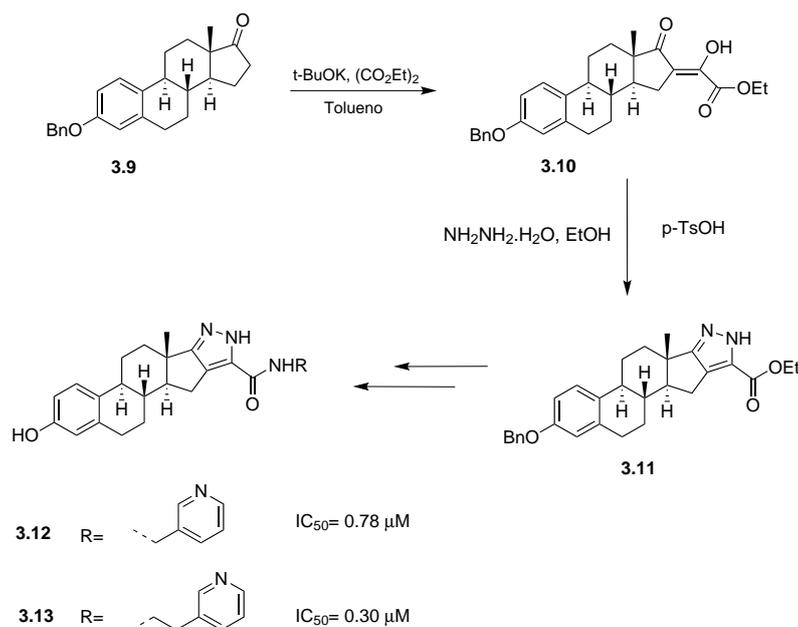


Figura 17: Síntese de esteroides pentacíclicos contendo pirazoles fundidos ao anel D.

Os esteroides contendo pirazoles e pirazolinas representam uma das classes mais estudadas na química dos esteroides contendo heterocíclicos. Os 5-androstanodihidropirazoles exibem atividade antimicrobial semelhante ao do conhecido fármaco isoniazida, utilizado habitualmente no tratamento da tuberculose. Estes derivados exibem também citotoxicidade *in vitro* para várias linhas celulares, nomeadamente HeLa, MCF-7 e A431 e potente atividade anti-inflamatória.[66, 67]

3.2 ESTEROIDES FUNDIDOS A IMIDAZOLES E TRIAZOLES

Os esteroides contendo imidazóis fundidos à posição 16 e 17 do anel D podem ser obtidos via reação de Weidenhagen, onde uma alfa-dicetona **3.14** reage com um aldeído alifático na presença de acetato de cobre (I) (Fig. 18). O primeiro passo envolve a formação de um sal de cobre **3.15** que após neutralização com sulfeto de hidrogênio originando o respectivo imidazole **3.16**. [56]

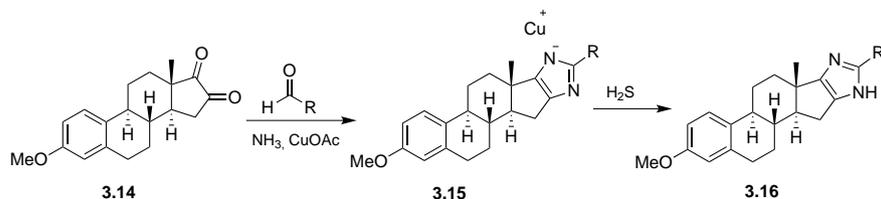


Figura 18: Síntese de esteroides pentacíclicos contendo imadazoles fundidos ao anel D.

A α -hidroxiimino cetona **3.17** pode ser obtida via nitroação do 17-cetoesteroide correspondente e após refluxo com fenilidrazina em etanol leva à formação da fenilhidrazona **3.18**, em grande quantidade. A fenilhidrazona, quando refluxado em ácido acético na presença de anidrido acético cicliza originando o 1,2,3-triazoles **3.19** (Fig. 19).[56]

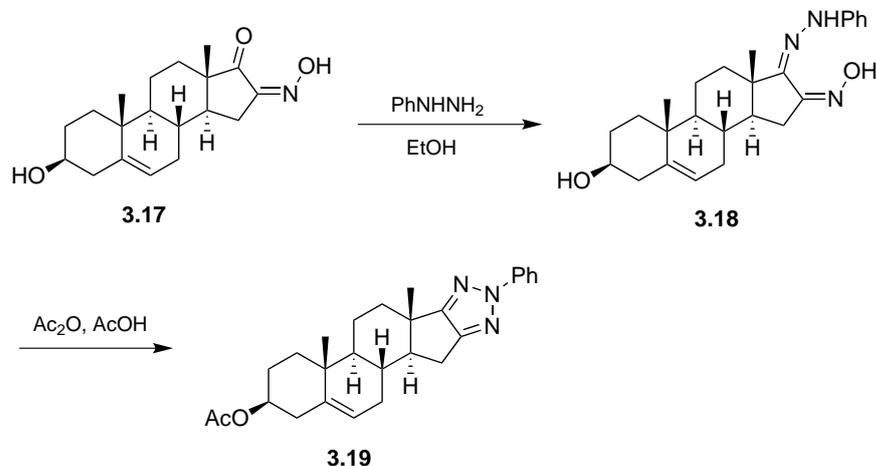


Figura 19: Síntese de esteroides pentacíclicos contendo triazoles fundidos ao anel D.

3.3 ESTEROIDES FUNDIDOS A ISOXAZOLINAS E ISOXAZOLIDINAS

Foi investigada a cicloadição 1,3-dipolar de 16-desidro-20-oxopregnanos, como o 16-DPA e derivados 21-clorados, com aldoximas que geram o óxido de nitrilo in situ através da ação da cloramina T (Fig. 20). A reação ocorreu regioseletivamente na ligação dupla insaturada nas posições 16 e 17 originando apenas as [16,17-d]-isoxazolininas e com rendimentos variando entre os 60-75%.[68]

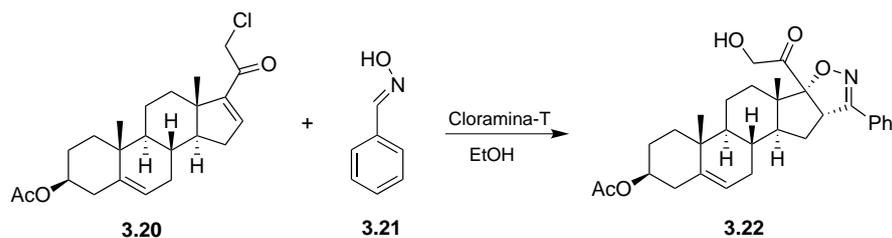


Figura 20: Síntese de esteroides pentacíclicos contendo isoxazolininas fundidas ao anel D.

Green e colaboradores sintetizaram novos esteroides fundidos a [16 α , 17 α -d] isoxalidinas através da cicloadição 1,3-dipolar de nitronas com a dupla ligação 16,17 presentes nas 16-pregnan-20-onas (Fig. 21). A reação do N-óxido de pirrolina **3.24** com o esteroide **3.23** gerou apenas o aducto **3.25**, formando três centros quirais contíguos. Após simulações dos estados de transição endo e exo, percebeu-se que o es-

tado endo envolvia uma grande interação estérica entre o hidrogênio 14α do composto **3.23** e o hidrogênio 4 do composto **3.24**, o que abrandaria qualquer cicloadição, como mostra a estrutura **3.26**. Como tal, apenas se obtém o produto correspondente ao estado de transição exo. Estes esteroides têm potencial interesse como anti-inflamatório tópicos, obtendo melhores resultados do que a betametasona em testes, *in vivo*, em murganhos.[66]

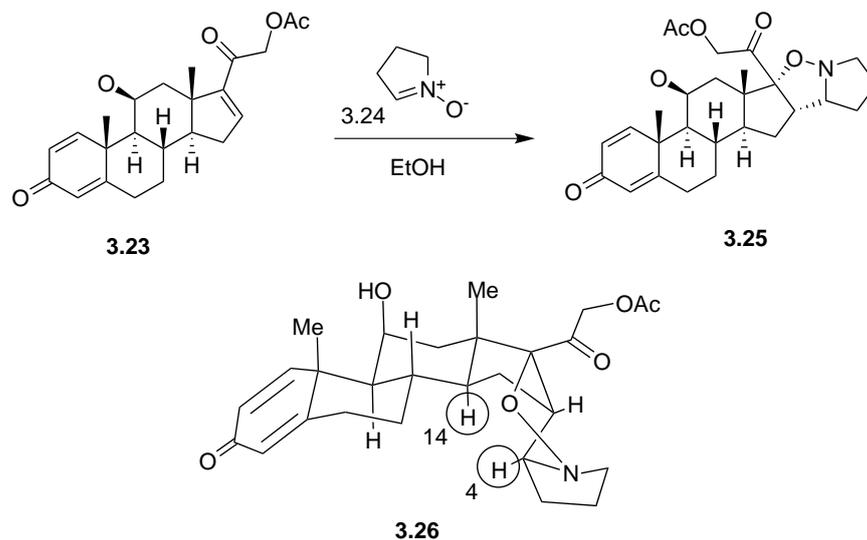


Figura 21: Síntese de esteroides contendo isoxalidinas fundidas ao anel D.

3.4 ESTEROIDES FUNDIDOS A ANÉIS DE SEIS MEMBROS

Em 1972, Akhrem e colaboradores descreveram a síntese de análogos pentacíclicos da pregnenolona através da reação de Diels-Alder entre o 16-DPA e dienos acrílicos. A condensação do 16-DPA com 2,3-dimetil-butadienos **3.27** na presença de um ácido de Lewis, como o AlCl_3 , sob condições térmicas gerou o ciclo-aducto **3.28**, com um rendimento de 83% (Fig. 22). A reação foi ainda expandida a outros dienos como o 1,3-pentadieno e o isopreno.[69]

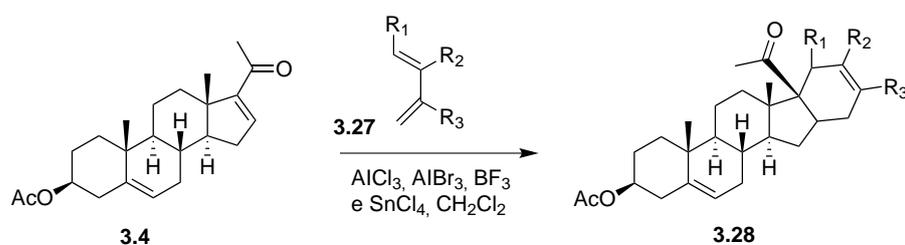


Figura 22: Reação de condensação do 16-DPA com 2,3-dimetil-butadienos.

Dando seguimento ao estudo das reações Diels-Alder, Kamernitskii, em 1985, fez reagir o 16-DPA, atuando como dienófilo, com um dieno, o dimetilenociclobuteno **3.29** (Fig. 23) Esta reação, na presença de um ácido de Lewis origina o aducto **3.30**, com um rendimento de 75%.^[70]

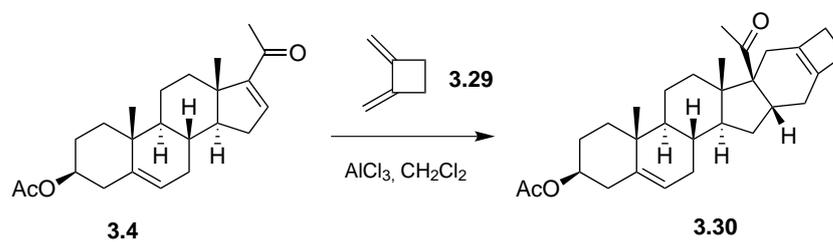


Figura 23: Reação Diels-Alder do 16-DPA com o dimetilenociclobuteno.

Parte II

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, os resultados obtidos ao longo do projeto de investigação são apresentados e discutidos. Este projeto focou-se em dois temas principais: a síntese de novos esteroides hexacíclicos através da cicloadição $[8\pi+2\pi]$ de aniões metil 1,2-diazafulvénio a diversos substratos esteroide e a síntese de esteroides contendo um grupo oxima na posição C-20 e um heterociclo em posição α em relação a este.

CICLO-ADIÇÃO [8 Π +2 Π]

4.1 INTRODUÇÃO

4.1.1 Aniões metil azafulvénio e 1,2-diazafulvénio

Storr e colaboradores exploraram a reatividade de pirrolo[1,2-*c*]tiazol-2,2-dióxidos **4.1a** e pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazol-2,2-dióxidos **4.1b** e provaram que estes são precursores dos aniões metil aza- e diazafulvénio (**4.2**).[71] Os aniões metil 1-azafulvénio e 1,2-diazafulvénio são dipolos que possuem um sistema conjugado de oito elétrons π . Estes sistemas dipolares conjugados podem ser considerados iletos azometinos conjugados e iminas azometinas conjugadas, respetivamente. Estes compostos podem reagir como 4π 1,3-dipolos ou 8π 1,7-dipolos, dando origem aos cicloadutos **4.4** e **4.3**, respetivamente (Fig. 24).[72]

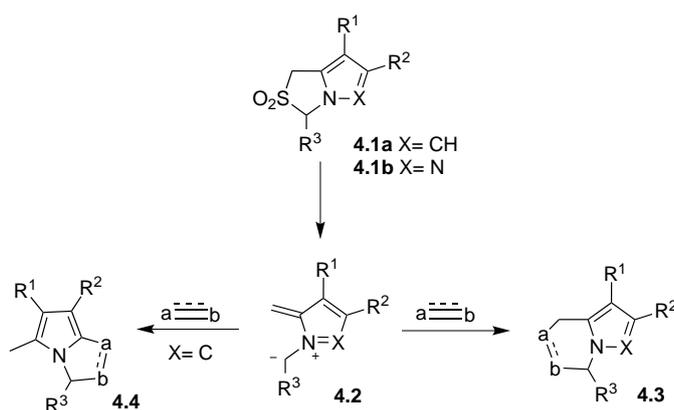


Figura 24: Formação dos aniões metil 1-azafulvénio e 1,2-diazafulvénio.

A geração destes aniões metil 1-azafulvénio sob extrusão térmica de dióxido de enxofre partindo de pirrolo[1,2-*c*]tiazol-2,2-dióxidos pode ser alcançada através de pirólise de vácuo rápida (FVP). Os sistemas dipolares conjugados que possuem substituintes metilo ou benzilo em C-1 podem sofrer migrações sigmatrópicas [1,8]H originando vinilpirroles (Fig. 25). Foi também reportado que a extrusão de dióxido de enxofre ocorre com maior facilidade na sulfona contendo o pirazole **4.5b** do que no análogo pirrole **4.5a**. O nitrogénio extra do pirazole aparenta exercer o mesmo efeito do que um grupo atrator de elétrons como o grupo acilo ligado ao sistema pirrólico.

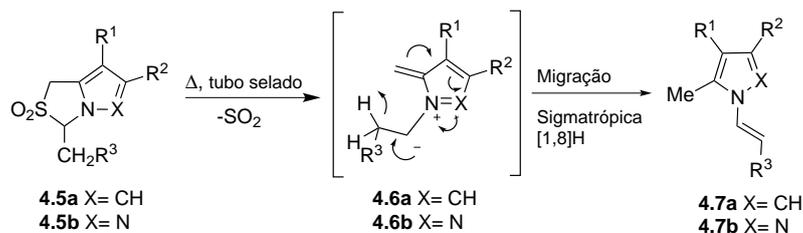


Figura 25: Síntese do N-vinilpirazole através de migração sigmatrópica [1,8]H.

4.1.2 Ciclo-adição [$8\pi+2\pi$]

A Ciclo-adição [$8\pi+2\pi$] representa uma das reacções mais importantes dentro das reacções de ciclo-adição de elevado grau dada a sua importância na síntese de compostos contendo heterociclos de seis membros.

A ciclo-adição de aniões metil diazafulvénio foi inicialmente explorada por Storr e colaboradores através do aquecimento da sulfona **4.8** em refluxo em 1,2,4-triclorobenzeno (ou tolueno num tubo selado a 300 °C) na presença de N-fenilmaleimida ou dimetil acetilenedicarboxilato, tendo verificado que não se formaram adutos. Contudo, na presença de bis(trimetilsilil) acetileno, um dipolarófilo rico em eletrões que participa em reacções Diels-Alder inversas, originou o aduto **4.10** com um rendimento de 34% após aquecimento durante três horas. Esta foi a primeira prova da formação destes sistema dipolares através da intersecção de aniões metil diazafulvénio. O prolongamento do aquecimento, em condições semelhantes, durante mais três horas leva à formação do aduto aromatizado **4.11** com um rendimento de 24% (Fig. 26).[73]

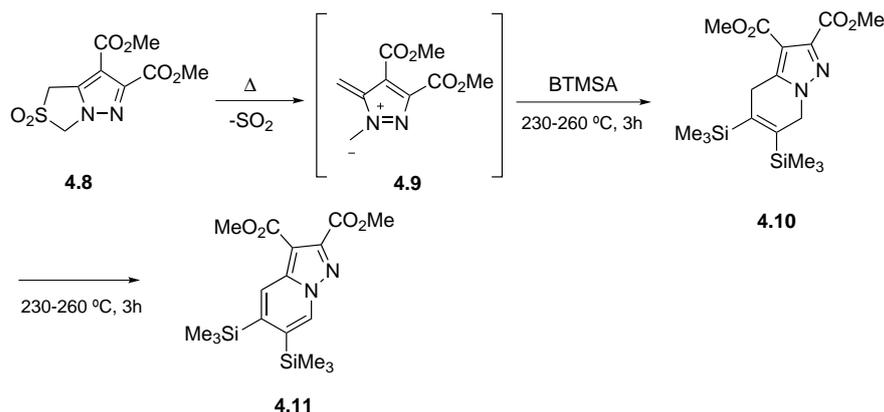


Figura 26: Reacção do metil 1,2-diazafulvénio com dipolarófilos ricos em eletrões.

A pirólise da sulfona **4.8** na presença de um dipolarófilo assimétrico (trimetilsilil)acetileno originou a mistura de regioisômeros aromatizados **4.12** e **4.13** (Fig. 27). O sistema dipolar **4.9** apenas sofre cicloadições com dipolarófilos ricos em elétrons e apenas nas posições 1,7, não ocorrendo cicloadição nas posições 1,3. A adição do (trimetilsilil)acetileno não é regioespecífica, o que pode ser explicado pelo tamanho relativos dos coeficientes da interação orbital dominante entre os reagentes. Storr e colaboradores calcularam, a nível semiempírico, os coeficientes HOMO e LUMO do (trimetilsilil)acetileno e do composto **4.9**, respetivamente. O coeficiente em C-1 e C-7 nas LUMO do composto **4.9** era de 0.53 e 0.44 e de 0.38 e 0.43 para as HOMO do (trimetilsilil)acetileno. Esta pequena diferença de coeficientes entre o dipolo e o dipolarófilo explica a falta de regioselectividade observada na adição do anião metil diazafulvénio **4.9** ao (trimetilsilil)acetileno.[73]

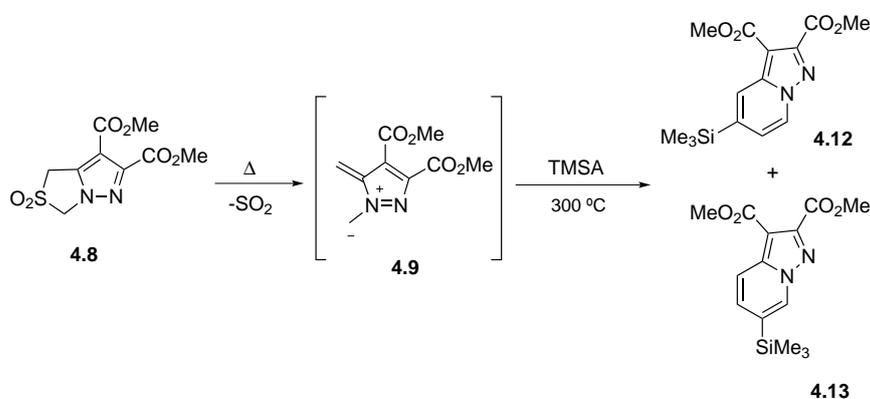


Figura 27: Reação do metil 1,2-diazafulvénio com o (trimetilsilil)acetileno.

A cicloadição 1,7-dipolar de aniões metil 1,2-diazafulvénio **4.14** com a N-fenilmaleimida, dipolarófilo deficiente em elétrons, originou dois diastereoisômeros, os cicloadutos **4.16** e **4.17**, resultantes da cicliadição endo envolvendo duas possíveis configurações do aniões metil diazafulvénio (Fig. 28).

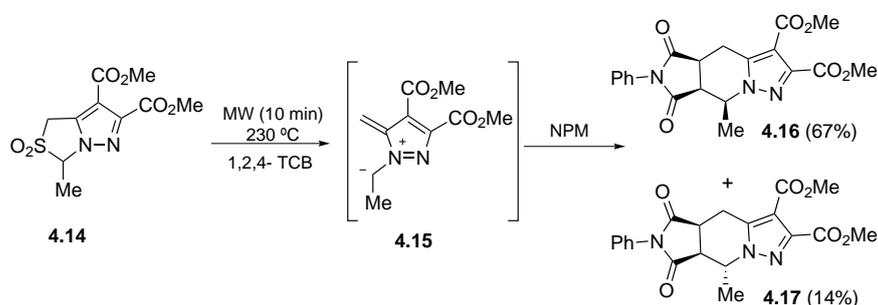


Figura 28: Reação do anião metil 1,2-diazafulvénio com dipolarófilos deficientes em elétrons.

O aduto **4.17** foi originado partindo da configuração de menor estabilidade do anião metil diazafulvénio que contém o grupo metilo na posição interior, o que explica o seu menor rendimento.[74]

A irradiação em microondas de 2,2-dioxo-7-trifluorometil-1*H*,3*H* pirrolo[1,2-*c*]tiazoles **4.18** levou à geração do intermediário anião trifluorometil metil azafulvénio **4.19** que foi intercetado por vários dipolarófilos. Estas reacções constituem a primeira evidência de aniões metil azafulvénios atuando como 1,3-dipolos e originando os correspondentes cicloaductos. O anião metil azafulvénio ao reagir com a *N*-fenilmaleimida e com o dicarboxilato de dimetilacetileno apenas originou os adutos resultantes da adição nas posições 1,3. Contudo, ao reagir com o etil-3-fenilpropiolato actuou como 1,3-dipolo e 1,7-dipolo originando a mistura de cicloadutos **4.20** e **4.21** numa proporção de 82 para 18 (Fig. 29).[75]

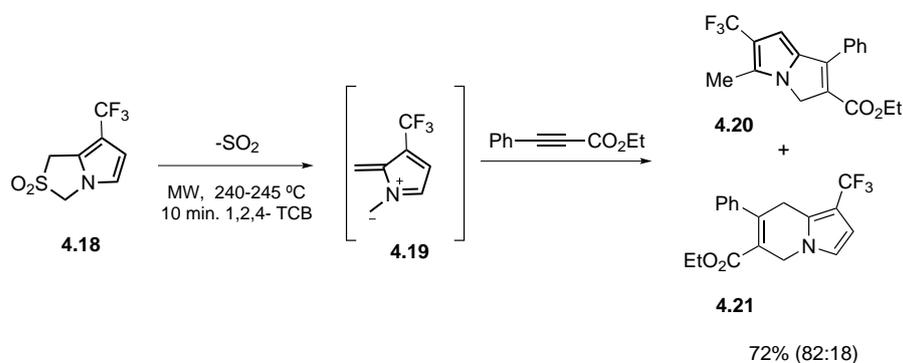


Figura 29: Reação do metil 1-azafulvénio atuando como 1,3-dipolo.

A química dos aniões metil diazafulvénio foi também aplicada a moléculas com potencial interesse biológico. Em 2010, foram descritos os primeiros resultados utilizando reacções de cicloadição [$8\pi+2\pi$] para a obtenção de novas clorinas e bacterioclorinas.[76, 77] O aquecimento de 2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazoles sob radiação microondas a 250 °C durante 20 min. gerou o respectivo anião metil diazafulvénio que foi intercetado pela tetrafenilporfirina, levando à formação de derivados de clorina fundidos com 4,5,6,7-tetrahidropirazolo[1,5-*a*]piridina (**4.22**) (Fig. 30). O aquecimento destas clorinas em refluxo de TCB na presença de sulfona **4.8** durante quatro horas leva à formação da respetiva bacterioclorina (**4.23**).[76]

Para além da síntese de novas clorinas e bacterioclorinas, esta nova estratégia foi também utilizada na obtenção de novos esteroides hexacíclicos. Os aniões metil 1,2-diazafulvénio foram gerados quer por termólise convencional em refluxo de 1,2,4- triclorobenzeno, quer por irradiação microondas a 250° C na presença do substrato esteroide 16-DPA, o dipolarófilo. O 1,7-dipolo reagiu com a ligação dupla $\Delta 16$ do dipolarófilo, originando um derivado esteroide hexacíclico com um sistema de dois anéis fundido ao anel D do 16-DPA. Aplicando esta

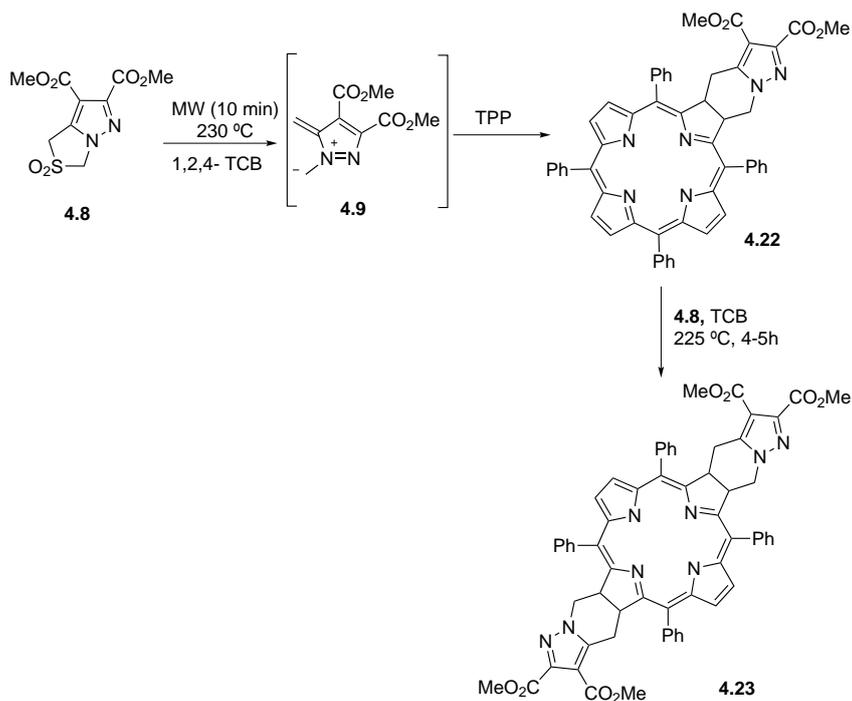


Figura 30: Síntese de clorinas e bacterioclorinas através da cicloadição $[8\pi+2\pi]$ de aniões metil diazafulvénios.

estratégia foram sintetizados diversos esteroides hexacíclios, **4.24a-d**, partindo de 2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazoles substituídos em C-1 na presença de 16-DPA (Fig. 31). No geral, estas reacções apresentaram rendimentos superiores quando a reação foi realizada durante 10 minutos sob irradiação microondas a 250 °C na presença de 2.5 a 3 equivalentes de sulfona.

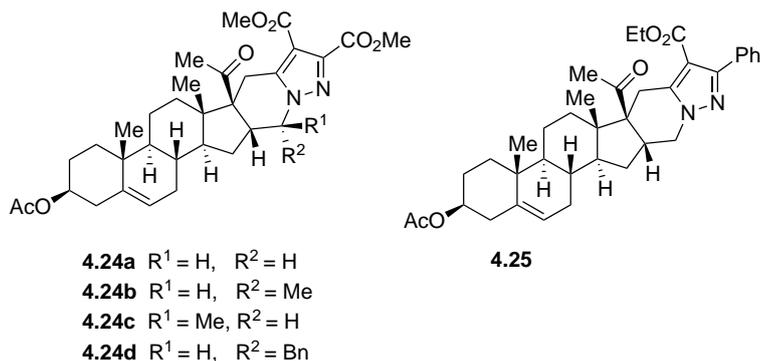


Figura 31: Esteroides obtidos através da cicloadição $[8\pi+2\pi]$ de aniões metil diazafulvénio ao 16-DPA.

Este trabalho de investigação teve como objetivo dar continuidade à síntese de novos esteroides hexacíclicos, aplicando a estratégia anterior a novos substratos esteroide. Para além dos novos substratos es-

terioide foram também sintetizados novos 2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazoles que geraram os respetivos aniões metil 1,2-diazafulvénio por eliminação queletrópica de dióxido de enxofre. Estes 1,7-dipolos na presença de diversos substratos esteroide, como por exemplo o 16-DPA e a 16-desidropregnenolona (16-DHP), originaram novos esteroides hexacíclicos estereosseletivamente. Procedeu-se posteriormente à modificação de alguns grupos destes esteroides hexacíclicos.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Síntese de 2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazoles

Este trabalho de investigação foi iniciado com a síntese de novos 2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazoles precursores dos aniões metil 1,2-diazafulvénio com o intuito de originar novos derivados esteroides provenientes da reação [$8\pi+2\pi$] com estes compostos.

A síntese dos 2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazoles **4.33** e **4.34** está descrita na figura 32. A reação da *L*-cisteína (**4.26**) com o formaldeído (**4.27**) permitiu a obtenção da tiazolidina **4.28** com um rendimento de 99%. O Sydnone **4.30** foi preparado partindo da tiazolidina **4.28** após *N*-nitrosação usando nitrito de sódio em meio ácido seguido de tratamento com anidrido trifluoroacético. Esta espécie mesoiónica **4.30** é uma espécie muito reactiva e pode atuar como uma imina azometina em cicloadições 1,3-dipolares. Deste modo, ao adicionar o dipolarófilo metil propiolato foram obtidos dois regioisómeros, o 1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazole-7-carboxilato **4.32** como produto maioritário e o 1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazole-6-carboxilato **4.31** com um rendimento de 53% e 21%, respetivamente. A oxidação dos pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazoles **4.31** e **4.32** com MCPBA originou as sulfonas alvo **4.33** e **4.34**, respetivamente.

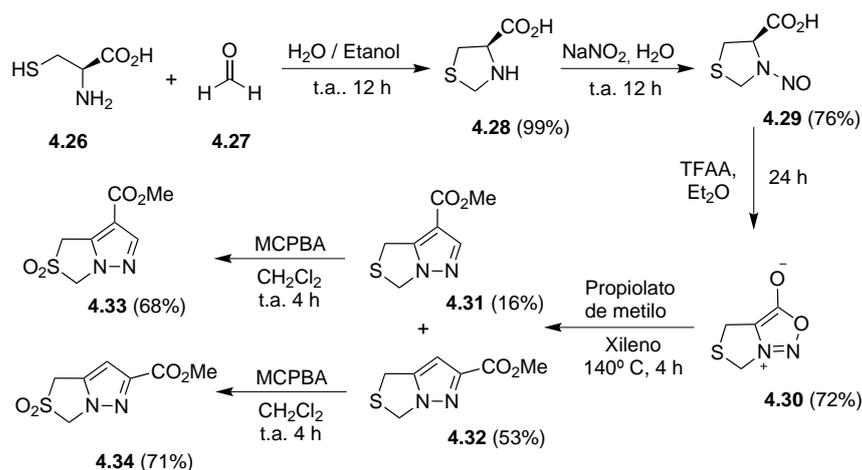


Figura 32: Síntese de novos 2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazoles.

Nos trabalhos de investigação prévios demonstrou-se um grande interesse na introdução de grupos hidroxilo como substituintes no anel fundido ao esteroide hexacíclico, de forma a aumentar a hidrofiliidade destes compostos. Contudo, a redução dos grupos éster do 4,5,6,7-tetrahidropirazolo[1,5-*a*]piridina-2,3-dicarboxilato dimetilo fundido ao acetato de 16-desidropregnenolona **4.24a** nunca foi possível. Por esta razão, optou-se por sintetizar os 2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazoles **4.39** e **4.40** descritos na figura 33, que permitiriam originar novos esteroides hexacíclicos contendo grupos hidroxilo sem afectar o resto do núcleo esteroide. A síntese destes compostos iniciou-se com a redução dos grupos éster do pirazolo-tiazole **4.35** utilizando hidreto de lítio alumínio. Após esta redução tentou-se a oxidação do pirazolo-tiazole **4.36** com o intuito de originar a sulfona alvo **4.40**. Contudo, não foi possível obter a sulfona **4.40** por esta via, uma vez que o composto se degradou com as condições de reação.

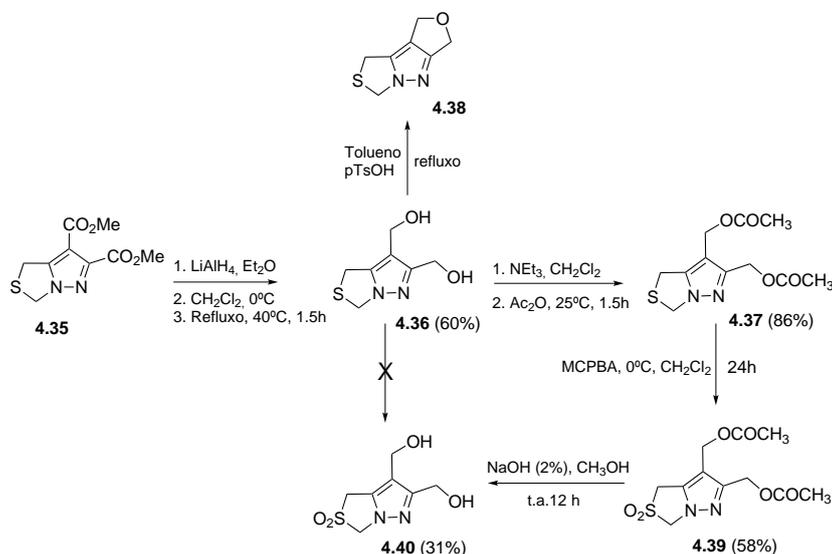


Figura 33: Síntese de 2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazoles com substituintes hidroxilo.

Como via alternativa optou-se por proteger dos grupos hidroxilo, via acetilação, originando o pirazolo-tiazole **4.35**, seguido de oxidação utilizando MCPBA. Após a síntese da sulfona **4.37** procedeu-se à desproteção dos grupos hidroxilo utilizando uma solução aquosa de hidróxido de sódio (2%) obtendo-se a sulfona alvo **4.38**. Procedeu-se também à síntese do composto **4.36** através de ciclização dos grupos hidroxilos com eliminação de uma molécula de água em tolueno, catalisado pelo ácido *p*-toluenosulfónico, como forma alternativa de proteção destes. A estrutura do pirazolo-tiazole **4.36** foi confirmado por RMN protónico, contudo existe alguma ressalva em relação à estrutura devido à solubilidade apresentada pelo composto (Fig. 34).

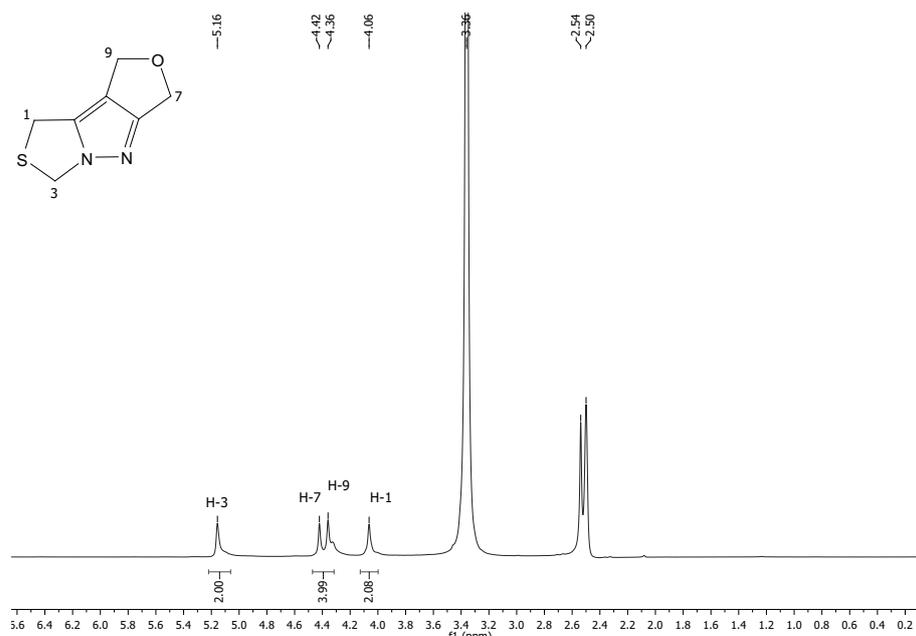


Figura 34: Espectro de RMN protónico do composto **4.36**.

Para o estudo da cicloadição $[8\pi+2\pi]$ com os vários substratos esteroides, foram utilizadas as sulfonas descritas anteriormente como precursores dos respetivos aniões metil 1,2-diazafulvénio, assim como, as sulfonas **4.8**, **4.41** e **4.42** cuja síntese foi descrita previamente em diversos artigos e teses de mestrado (Fig. 35).[78, 79, 80]

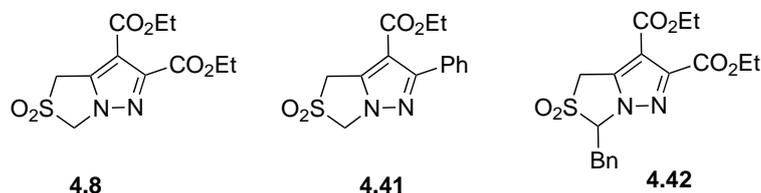
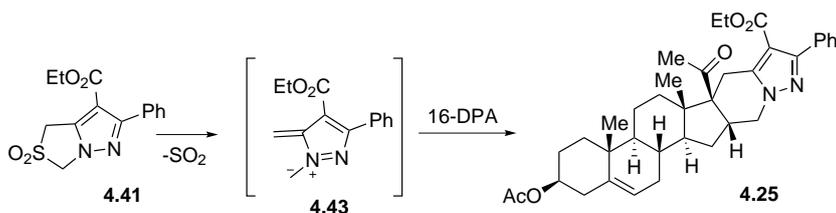


Figura 35: Estrutura das sulfonas disponíveis previamente sintetizadas.

4.2.2 Estudo da reatividade do 16-DPA com aniões metil 1,2-diazafulvénio via ciclo-adição $[8\pi+2\pi]$

Neste projeto de investigação deu-se continuidade ao trabalho efectuado em teses de mestrado anteriores. A reacção do acetato de 16-desidropregnenolona com o anião metil diazafulvénio **4.43**, descrita nos projetos de investigação prévios, foi optimizada (Tab. 1). O ensaio efectuado usando 3 equivalentes de sulfona **4.41**, sob irradiação microondas durante 10 minutos levou à obtenção do produto pretendido com um rendimento de 60%, inferior ao obtido usando 2.5 equivalentes de sulfona. Por esta razão, sob termólise convencional,

Tabela 1: Reação do anião metil diazafulvênio 4.43 com o 16-DPA.

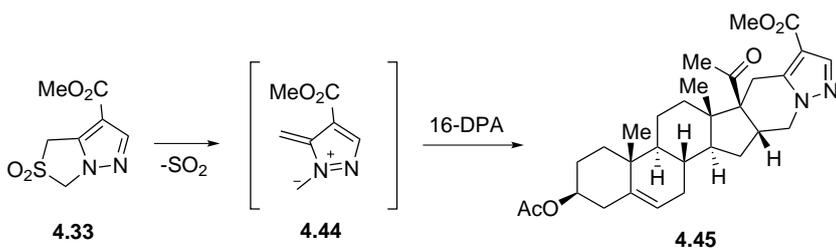


Reação	Condições da Reação	Rendimento
1	2.5 equiv. sulfona 4.41, MW, 250 °C, 10 min.	70%[79]
2	3 equiv. sulfona 4.41, MW, 250 °C, 10 min.	60%
3	2.5 equiv. sulfona 4.41, refluxo, 4 h.	36%

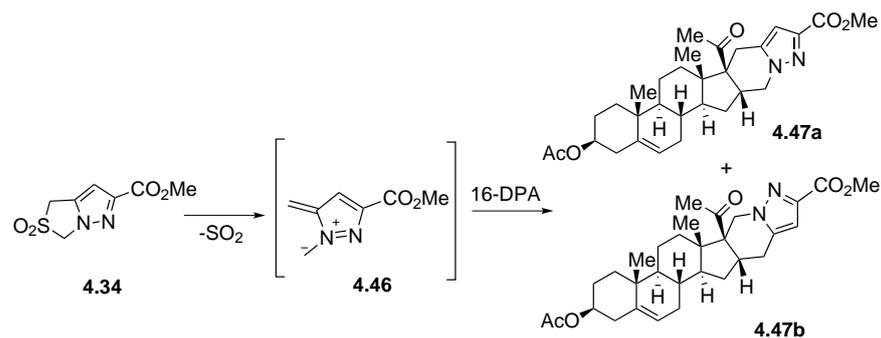
foram utilizados 2.5 equivalentes de sulfona na reação com o 16-DPA em refluxo em TCB, o que levou à formação do derivado esteroide **4.25** de forma regio- e estereosseletiva com um rendimento de 36%.

A reatividade do acetato de 16-desidropregnenolona com o anião metil diazafulvênio **4.44** foi também explorada (Tab. 2) Este 1,7-dipolo foi gerado, *in situ*, através da irradiação microondas do 2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazole **4.33** ou refluxando-o em 1,2,4-triclorobenzeno, levando à formação do esteroide hexacíclico **4.45**. Quando esta reação ocorre sob irradiação microondas a 250 °C durante 10 minutos e utilizando excesso de sulfona, 2, 2.5 e 3 equivalentes, obteve-se o composto **4.45** com rendimentos de 53%, 53% e 69%, respectivamente.

Tabela 2: Reação do anião metil diazafulvênio 4.44 com o 16-DPA.



Reação	Condições da Reação	Rendimento
1	2 equiv. sulfona 4.33, MW, 250 °C, 10 min.	53%
2	2.5 equiv. sulfona 4.33, MW, 250 °C, 10 min.	53%
3	3 equiv. sulfona 4.33, MW, 250 °C, 10 min.	69%
4	3 equiv. sulfona 4.33, refluxo, 4 h.	54%

Tabela 3: Reação do anião metil diazafulvénio **4.46** com o 16-DPA.

Reação	Condições da Reação	Rendimento (a:b)
1	2 equiv. sulfona 4.34 , MW, 250 °C, 10 min.	33% (78:22)
2	2.5 equiv. sulfona 4.34 , MW, 250 °C, 10 min.	46% (76:24)
3	3 equiv. sulfona 4.34 , MW, 250 °C, 10 min.	49% (85:15)
4	3 equiv. sulfona 4.34 , refluxo, 4 h.	37% (85:15)

A ciclo-adição [$8\pi+2\pi$] do 16-DPA com o anião metil diazafulvénio **4.44** foi também efectuada sob termólise convencional, refluxando em TCB durante 4 horas, originando o aduto **4.45** de forma regio- e estereosselectiva com um rendimento de 54%. Este rendimento foi inferior ao obtido, com o mesmo número de equivalentes, sob irradiação microondas.

Do mesmo modo, a sulfona **4.34**, regioisómero da sulfona **4.33**, foi igualmente submetida à extrusão de dióxido de enxofre para gerar o anião metil diazafulvénio. A termólise desta sulfona na presença do 16-DPA levou à formação de dois regioisómeros, sob a forma de mistura inseparável, obtendo-se o composto **4.47a** como produto maioritário (Tab. 3). O primeiro ensaio foi efectuada com 2 equivalentes da sulfona **4.34** e 16-DPA, sob irradiação microondas a 250 °C durante 10 minutos levando à obtenção da mistura regioisomérica com um rendimento de 33% numa proporção de 78:22 dos esteroides hexacíclicos **4.47a** e **4.47b**, respetivamente. Aumentando o número de equivalente da sulfona **4.34** para 3 conseguiu-se obter a mistura regioisomérica com um rendimento superior, de 49%, e com uma razão de 85:15. Os compostos **4.47a** e **4.47b** foram obtidos na mesma proporção quando se usou o mesmo número de equivalentes de sulfona sob condições de termólise convencional, com um rendimento de 37%.

Com base no espectro de RMN protónico do 16-DPA, identificaram-se os sinais mais característicos de determinados prótons da estrutura base do esteroide. Analisando o espectro protónico da mistura regioisomérica é possível identificar sinais distintos dos regioisómeros, permitindo assim calcular a proporção em que encontram na mistura

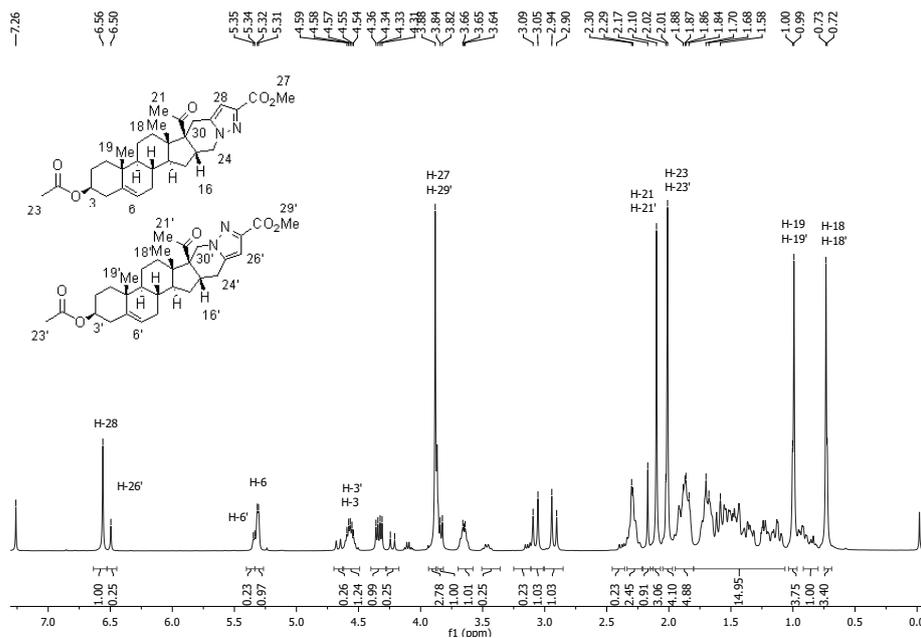


Figura 36: Espectro de RMN protónico da mistura de regioisómeros **4.47a-b**.

(Fig. 36). É possível identificar os desvios dos prótons dos grupos metilo H-18 e H-19 (0.73 e 0.99 ppm para o composto maioritário e 0.72 e 1.00 ppm para o minoritário), os do grupo cetona H-21 (2.10 ppm para o maioritário e 2.07 ppm para o minoritário) e do grupo metil do acetato H-23 (2.01 ppm para o maioritário e 2.02 ppm para o minoritário). Os prótons característicos H-6 e H-3 são também identificáveis sob a forma de dubleto a 5.31 ppm e 5.34 ppm e multipletto entre 4.55-4.59 ppm e 4.54-4.58 ppm, respetivamente. Para além destes, é possível identificar os prótons do grupo metil do éster H-27 e H-29' (3.88 ppm e 3.87 ppm, respetivamente) e da pirazolina H-28 e H-26' cujos sinais aparecem sob a forma de singletto com um desvio químico de 6.56 ppm e 6.49 ppm, respetivamente.

As sulfonas **4.39** e **4.40**, cuja síntese foi descrita na secção anterior, foram também submetidas a irradiação microondas a 250 °C durante 10 minutos na presença do 16-DPA (Fig. 37).

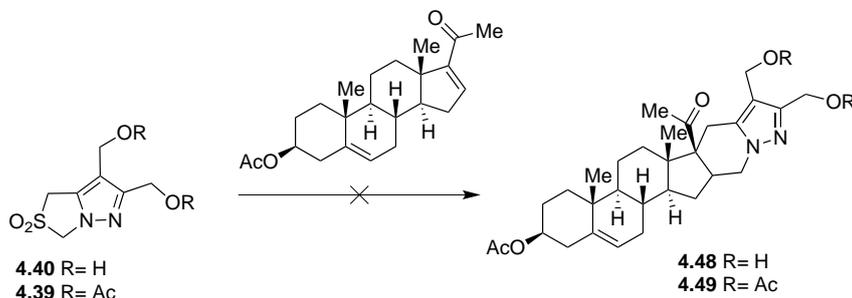


Figura 37: Reação das sulfonas **4.39** e **4.40** com o 16-DPA.

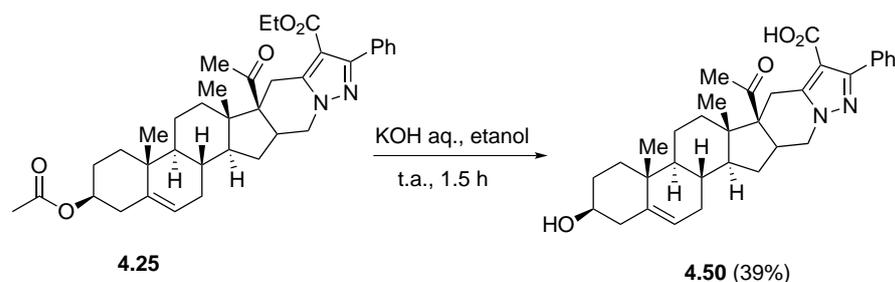


Figura 38: Reação de hidrólise do esteroide hexacíclico **4.25**.

Contudo, os cicloadutos **4.48** e **4.49** não foram obtidos, recuperando-se grande parte do reagente de partida, 16-DPA. A ausência do cicloaducto e a grande quantidade de 16-DPA presente podem ser explicadas pela possível degradação dos aniões metil diazafulvênio gerados após eliminação queletrópica de dióxido de enxofre das sulfonas **4.39** e **4.40**.

Procedeu-se também à hidrólise dos grupos ésteres do composto **4.25** através da adição de uma solução aquosa de hidróxido de potássio (Fig. 38). Desta forma, obteve-se o composto **4.50**, com um rendimento de 39%. Para além da hidrólise dos grupos éster a ácidos, ocorreu também a desproteção do grupo hidroxilo presente em C₃.

4.2.3 Estudo da reatividade da 16-DHP com aniões metil 1,2-diazafulvênio via ciclo-adição [$8\pi+2\pi$]

O estudo da reatividade de aniões metil 1,2-diazafulvênio foi estendida a outro substrato esteroide, a 16-desidropregnenolona (16-DHP). Os esteroides derivados do 16-DHP apresentam uma maior hidrofiliçidade e, usualmente, os derivados 3-hidroxilados apresentam maior atividade anticancerígena quando comparados com os derivados 3-acetato. Um exemplo disso é o acetato de abiraterona, um pró-fármaco, que origina o respetivo derivado 3-hidroxilado, ativo *in vivo*. A 16-DHP foi sintetizado através da clivagem do grupo 3-acetato do acetato de 16-desidropregnenolona utilizando uma solução aquosa de hidróxido de sódio, desprotegendo assim o grupo hidroxilo presente em C₃, com um rendimento de 99% (Fig.39).[81]

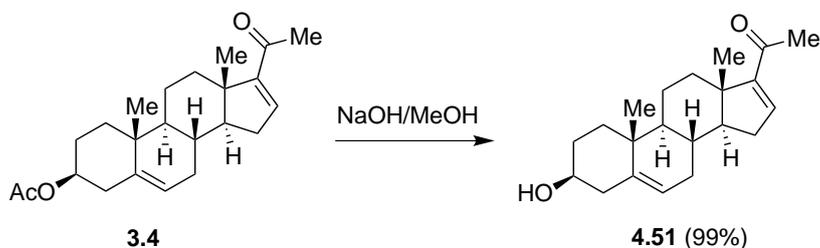


Figura 39: Síntese da 16-desidropregnenolona.

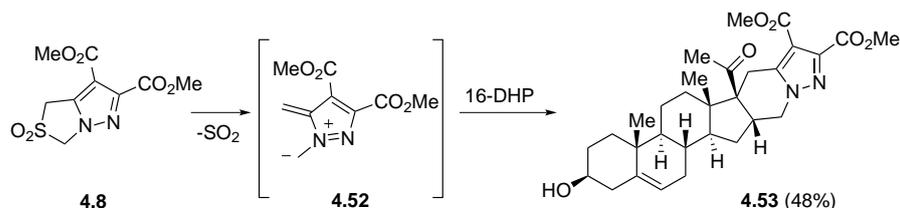


Figura 40: Reação do anião metil diazafulvênio **4.52** com a 16-DHP.

A reatividade da 16-desidropregnenolona em relação ao anião metil diazafulvênio **4.52**, gerado a partir do 2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazole **4.8**, foi a primeira a ser explorada. Este 1,7-dipolo foi gerado, *in situ*, sob termólise convencional durante 4 horas em triclorobenzeno a 250 °C, utilizando 2.5 equivalentes da sulfona **4.8** (Fig. 40). O anião metil diazafulvênio foi intercetado pela 16-DHP levando à formação do esteroide hexacíclico **4.53**, como único produto, com um rendimento de 48%. Contudo, este rendimento é bastante inferior ao obtido em condições semelhantes utilizando o acetato de 16-desidropregnenolona como substrato esteroide, rendimento este de 76%.

O 2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazole **4.41** foi também submetido a termólise convencional em refluxo de triclorobenzeno durante 4 horas na presença da 16-desidropregnenolona (Fig. 41). Esta sulfona gerou o 1,7-dipolo **4.43** que levou à formação do esteroide **4.54** num rendimento de 20%, inferior ao obtido em condições semelhantes com o 16-DPA (36%).

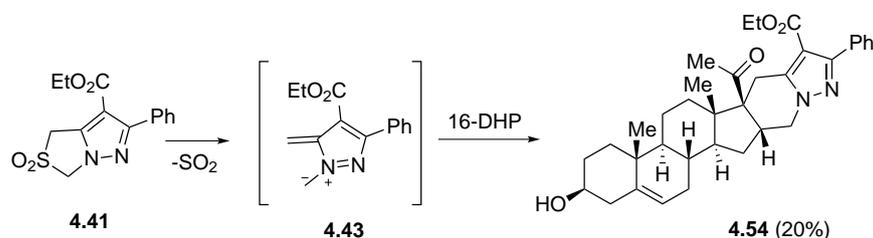


Figura 41: Reação do anião metil diazafulvênio **4.43** com a 16-DHP.

O esteroide hexacíclico **4.55**, análogo do esteroide **4.45**, foi sintetizado após adição da sulfona **4.33** ao substrato 16-DHP em refluxo de triclorobenzeno a 250 °C durante 4 horas (Fig. 42). Este esteroide foi obtido como único produto, regio- e estereosseletivo, com um rendimento de 43%. Este rendimento é também inferior ao rendimento de 54% obtido em condições semelhantes para o análogo **4.45** partindo do 16-DPA.

Pelo espectro de RMN protónico, é possível identificar os desvios característicos do núcleo esteroide que apresentam desvios químicos semelhantes aos do análogo **4.45**. Contudo, o sinal do próton ligado a C3 aparece como multiplete com um desvio químico de 3.78 ppm,

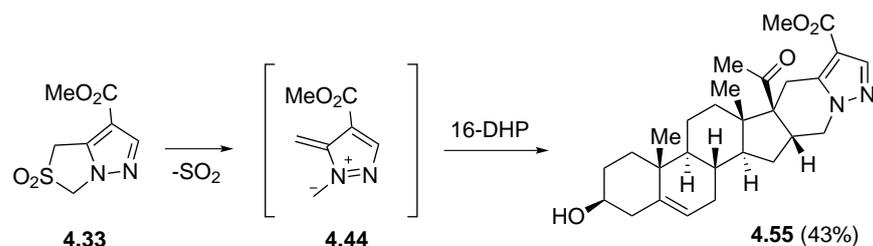


Figura 42: Reação do anião metil diazafulvênio **4.44** com a 16-DHP.

enquanto que o do análogo originado a partir do 16-DPA tem um desvio químico de 4.54-4.61 ppm (Fig. 43).

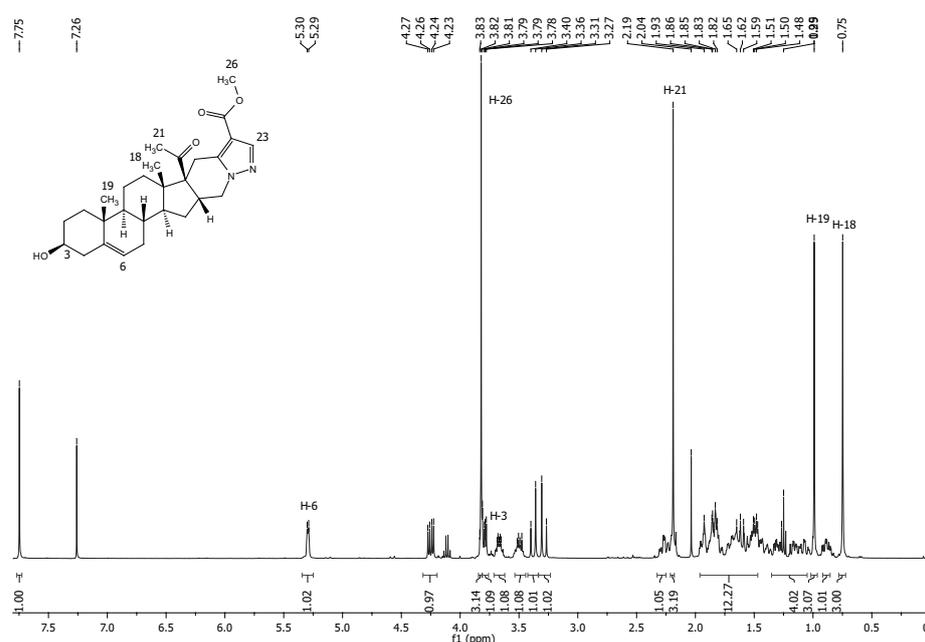


Figura 43: Espetro de RMN protônico do esteroide hexacíclico **4.55**.

A reatividade da 16-desidropregnenolona foi também explorada na presença do 2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazole **4.34**. Tal como na reação com o 16-DPA, nesta reação foi obtida uma mistura racêmica de regioisômeros, **4.56a** e **4.56b** (Fig. 44). Na presença de 2.5 equivalentes de sulfona **4.34** em refluxo de TCB a 250 °C durante 4 horas foi obtido a mistura de regioisômeros numa proporção de 88:12 com um rendimento de 24%, inferior aos 37% obtidos com o 16-DPA.

Finalmente, foi explorada a reatividade térmica do 3-benzil-2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazole **4.42** na presença da 16-DHP (Fig. 45). Neste caso, para além do esteroide resultante da reação de cicloadição [8 π +2 π] é expectável que se obtenha a síntese competitiva do respectivo N-vinilpirazole. O esteroide hexacíclico **4.58** foi obtido após interceção do anião metil diazafulvênio **4.57a**, em refluxo em TCB durante 4 horas na presença de 2.5 equivalentes da sulfona **4.42**.

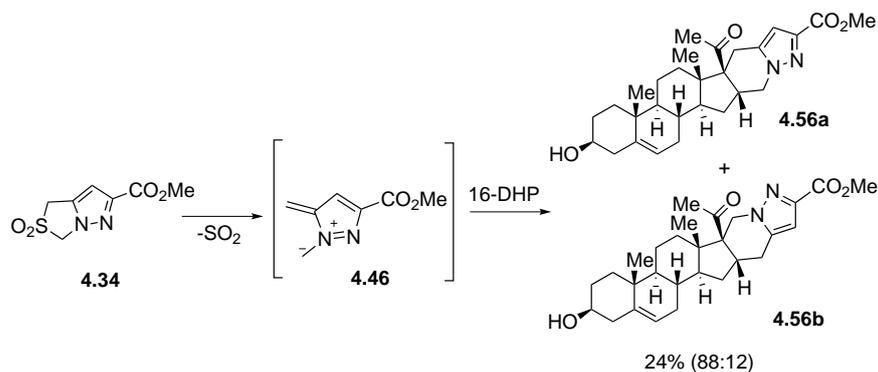


Figura 44: Reação do anião metil diazafulvênio **4.46** com a 16-DHP.

Este cicloaduto **4.58** foi obtido juntamente com o N-vinilpirazole **4.59** com um rendimento de 24% e 21%, respetivamente. O rendimento do esteroide hexacíclico é um pouco inferior ao obtido em condições semelhantes com o 16-DPA (34%), por sua vez o rendimento do N-vinilpirazole é ligeiramente superior (18%). O N-vinilpirazole **4.59** já tinha sido obtido previamente através de um rearranjo sigmatrópico [1,8]H quando o 3-benzil-2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazole foi submetido a termólise induzida por microondas na ausência de substrato esteroide. Apesar do 1,7-dipolo existir em equilíbrio de, pelo menos, dois conforméromos, apenas o conforméromos **4.57a** apresenta um hidrogénio na posição adequada para sofrer a reação pericíclica.

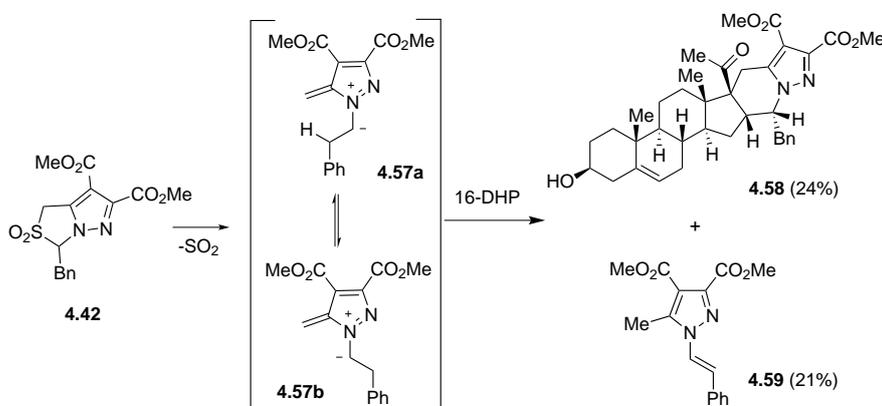


Figura 45: Reação do anião metil diazafulvênio **4.57** com a 16-DHP.

O esteroide hexacíclico **4.58** foi obtido, nesta reação, como produto regio- e estereosseletivo, ao contrário do que aconteceu em reações com o derivado 3-metil-2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazole. Com o objetivo de racionalizar esta estereosseletividade observada nas cicloadições $[8\pi+2\pi]$ destes substratos esteroides em relação ao aniões metil diazafulvénios substituídos em C1, foram realizados cálculos ao nível DFT.⁴ Os cicloadutos obtidos como produto maioritário

⁴ Trabalho desenvolvido em colaboração com o grupo de investigação do Doutor Alberto Canelas Pais

podem resultar de uma cicloadição endo do conformero II ou alternativamente de uma cicloadição exo do conformero I, considerando a aproximação do dipolo pela face α , a menos impedida do esteroide (Fig. 46).

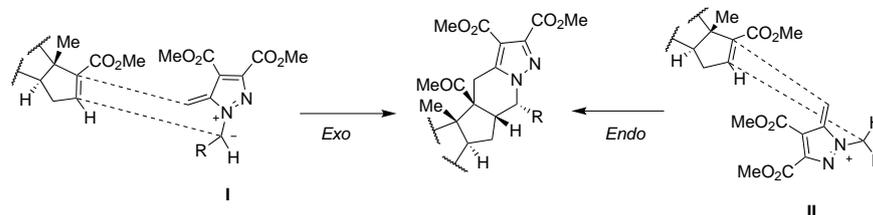


Figura 46: Cicloadição $[8\pi+2\pi]$ *exo* e *endo* do substrato esteroide com o anião metil diazafulvênio 1-substituído, considerando a aproximação do dipolo pela face α .

As cicloadições dos aniões metil diazafulvênio, gerados a partir das sulfonas **4.14** e **4.42**, com a N-fenilmaleimida foram selecionadas como modelo de reação (Fig. 47). Estas cicloadições são ideais para o estudo teórico destas reações, uma vez que apresentam a mesma estereosseletiva observada nas reações destes 1,7-dipolos com o 16-DPA e têm um menor peso molecular. A reação da NPM com o anião 1-metil metil diazafulvênio **4.15**, anteriormente reportada, originou a mistura racêmica de dois diastereoisômeros, o composto **4.16** como produto maioritário e o composto **4.17**.

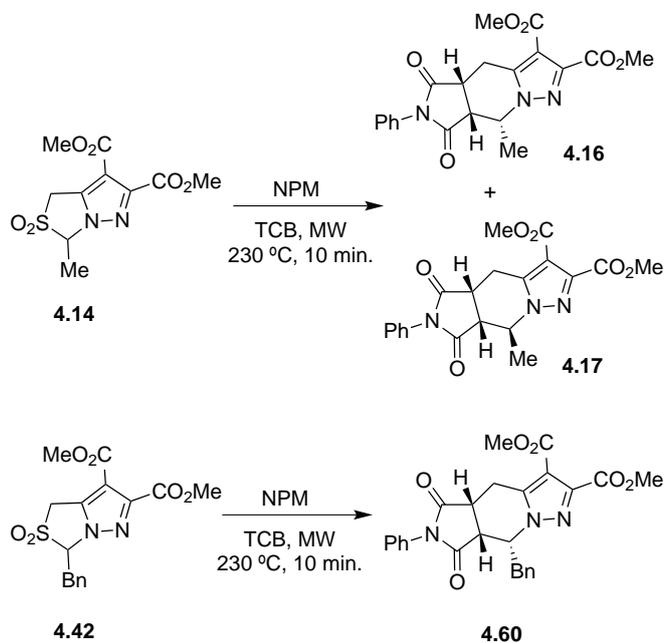


Figura 47: Reação dos aniões metil diazafulvênio 1-substituídos com a N-fenilmaleimida.

O aparecimento destes dois produtos foi atribuída ao envolvimento de duas possíveis conformações do anião metil 1-metil diazafulvênio na cicloadição endo. A reação do anião metil diazafulvênio **4.55** com a NPM levou à formação do produto esperado **4.60**, que apresenta a mesma estereosseletividade do produto obtido na presença do 16-DPA.

Como referido anteriormente, os produtos maioritários podem resultar da cicloadição endo do conformero II ou da cicloadição exo do conformero I. A estabilidade destas conformações foi explorada, otimizando-se estas estruturas ao nível DFT utilizando o funcional híbrido B3LYP e a base 6-31G(d). Para o composto **4.15** o conformero II apresentava uma energia 14.6 kJ/mol inferior ao do conformero I, sendo por isso mais estável. Os resultados para o composto **4.57** foram similares uma vez que o conformero II é 16.3 kJ/mol mais estável do que o conformero I.

Neste estudo, os estados de transição resultantes das cicloadições exo e endo do NPM foram também otimizados ao nível DFT. Os resultados indicam que as barreiras associadas às reações envolvendo a aproximação, para ambos os compostos, é desfavorável em mais de 20 kJ/mol, quando comparado com a aproximação endo. Relativamente aos compostos **4.16** e **4.17**, que resultam de aproximações endo de diferentes conformações do anião metil 1-metil diazafulvênio, a aproximação que leva à obtenção de composto minoritário é desfavorável em 2.6 kJ/mol.

Como foi mencionado anteriormente, a redução dos grupos éster dos esteroides hexacíclicos sintetizados via ciclo-adição $[8\pi+2\pi]$ sempre despertou grande interesse. Contudo, a redução do composto **4.24a** utilizando hidreto de lítio alumínio não surtiu efeito, não se obtendo qualquer produto. A termólise das sulfonas **4.39** e **4.40** sob irradiação microondas na presença de 16-DPA também não levou à formação do cicloaduto esperado, não se conseguindo assim sintetizar qualquer esteroide hexacíclico contendo grupos hidroxilo nas posições 27 e 30.

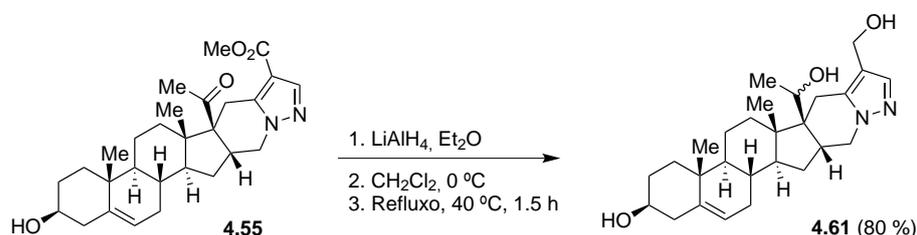


Figura 48: Redução do esteroide hexacíclico **4.55**.

Por sua vez, foi possível reduzir o grupo éster presente nos esteroides hexacíclicos resultantes da interceção de aniões metil diazafulvênio pela 16-desidropregnenolona. A adição de hidreto de lítio

alumínio ao composto **4.55** em diclorometano levou à formação do esteroide **4.61**, com um rendimento de 80% (Fig. 48). Para além da redução do grupo éster, verificou-se também a redução do grupo cetona presente em C-20.

4.2.4 Estudo da reatividade da 16-Desidroprogesterona com aniões metil 1,2-diazafulvénio via ciclo-adição [$8\pi+2\pi$]

Para além do 16-DPA e do 16-DHP foi também usada a 16-desidroprogesterona **4.62** como substrato esteroide para a síntese de novos esteroides hexacíclicos quirais. O núcleo da progesterona tem sido usado como ponto de partida para o desenvolvimento de novos inibidores da enzima 5α -reductase, despertando por isso grande interesse a síntese de esteroides hexacíclicos derivados da progesterona. A 16-desidroprogesterona foi sintetizada a partir do 16-DHP na presença de isopropóxido de alumínio em N-metilpiperidona (Fig. 49).[53]

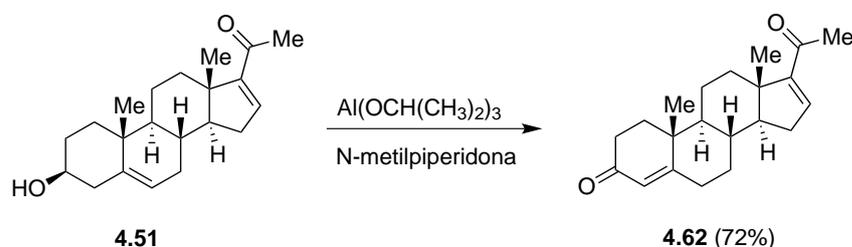


Figura 49: Síntese da 16-desidroprogesterona.

Este composto foi obtido através de uma oxidação de Oppenauer com migração da ligação dupla com um rendimento de 72%, após separação por coluna cromatográfica.

A reatividade da 16-desidroprogesterona foi inicialmente explorada na presença do 2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazole **4.8**. Após irradiação por microondas a 250 °C durante 10 minutos o 1,7-dipolo **4.52** foi gerado e intercetado pela 16-desidroprogesterona que gerou de forma regio- e estereosselectiva o esteroide hexacíclico quiral **4.63** (Fig. 50).

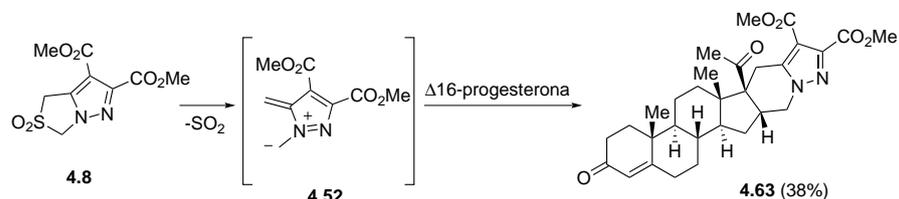


Figura 50: Reação do anião metil diazafulvénio **4.52** com a 16-desidroprogesterona.

Esta reação foi menos eficiente do que as anteriores, apresentando menor reatividade para com o anião metil 1,2-diazafulvênio, apresentando um rendimento de apenas 38%.

Analisando o espectro de RMN protônico podemos observar as principais diferenças entre o núcleo esteroide deste esteroide hexacíclico derivado da progesterona e os anteriores derivados da pregnenolona (Fig. 51). O próton H-4 aparece como um singlete com um desvio químico de 5.72 ppm enquanto que os prótons H-18, H-19 e H-21 aparecem com desvios químicos semelhantes aos apresentados nos esteroides derivados do núcleo pregnenolona. Os prótons do grupo éster 27 e 30 aparecem, por sua vez, com um desvio químico de 3.92 e 3.85 ppm, respectivamente.

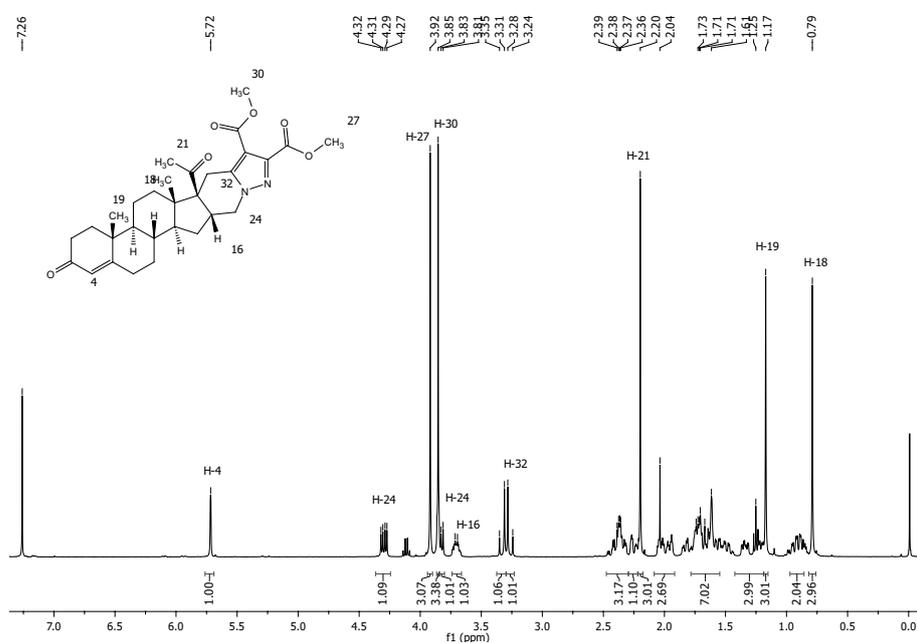


Figura 51: Espectro de RMN protônico do esteroide hexacíclico **4.63**.

Foi igualmente explorada a reatividade deste derivado da progesterona com o 3-benzil-2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazole **4.42**. Tal como nas reações descritas anteriormente foram obtidos dois produtos, o esteroide hexacíclico **4.64** que foi originado como produto regio- e estereosseletivo, não se detectando a presença de um possível diastereoisômero e o *N*-vinilpirazole **4.59** (Fig. 52). Contudo, dada a menor reatividade deste substrato esteroide, o *N*-vinilpirazole foi obtido com um rendimento de 51%, bastante superior ao obtido anteriormente nas mesmas condições na presença de outros substratos. Por seu lado, o rendimento do esteroide **4.64** foi significativamente inferior, com uma diferença de cerca de 15%, em relação ao alcançado na presença de 16-DPA.

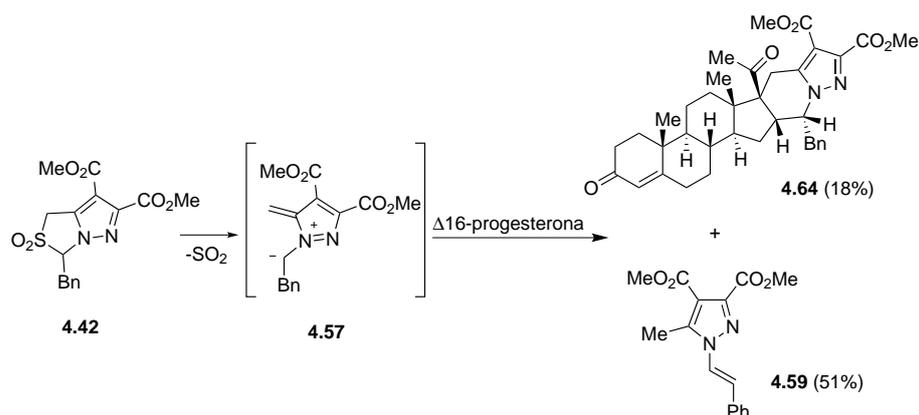


Figura 52: Reação do anião metil diazafulvénio **4.57** com a 16-desidroprogesterona.

As sulfonas **4.41** e **4.33**, na presença de 16-desidroprogesterona, quando irradiadas por microondas a $250\text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 minutos, originaram os esteroides hexacíclicos **4.65** e **4.66**, respetivamente (Fig. 53). Ao contrário do que foi verificado nas reações anteriores, a reatividade da 16-desidroprogesterona com o anião metil diazafulvénio **4.43** foi semelhante à do 16-DPA. O esteroide hexacíclico **4.65** foi obtido com um rendimento de 65%, apenas 5% inferior ao alcançado na presença de 16-DPA. Contudo, o esteroide **4.66** foi obtido com um rendimento de 39%, significativamente inferior ao obtido nas mesmas condições na presença dos outros substratos.

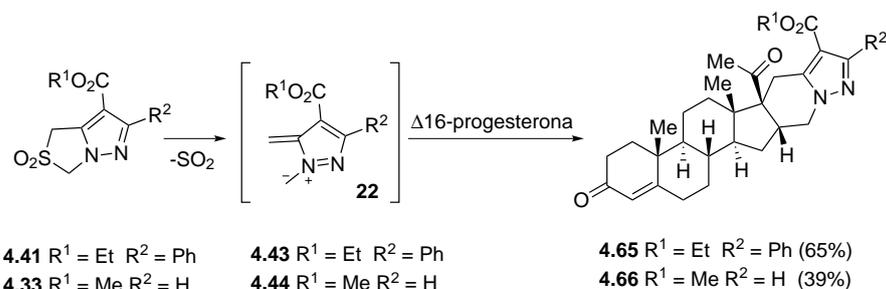


Figura 53: Reação dos aniões metil diazafulvénio **4.43** e **4.44** com a 16-desidroprogesterona.

Por fim, a 16-desidroprogesterona ao intercalar o anião metil diazafulvénio **4.46** gerado a partir da extrusão térmica da sulfona **4.34**, originou uma mistura de regioisómeros, tal como seria esperado.

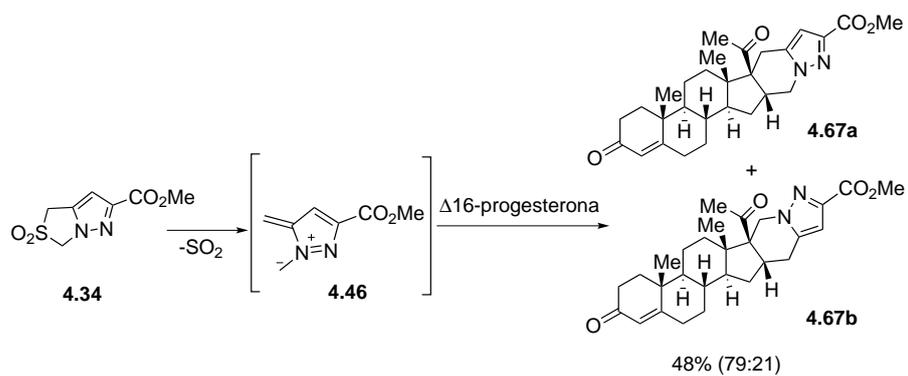


Figura 54: Reação do anião metil diazafulvênio **4.46** com a 16-desidroprogesterona.

Esta mistura foi obtida na proporção de 79:21, apresentando maior quantidade de regioisômero minoritário **4.67b** do que a obtida para o 16-DPA (Fig. 54).

SÍNTESE DE DERIVADOS C-20 OXIMAS

5.1 INTRODUÇÃO

Os derivados de esteroides contendo oximas têm demonstrado propriedades anticancerígenas. Estes derivados que apresentam um grupo oxima ligado directamente ou através de um espaçador ao anel D têm revelado capacidade de formar uma ligação coordenada com o grupo heme da 5α -reductase, como foi referido no capítulo anterior. No geral, os compostos que possuem o grupo oxima nas posições C-20 e C-21 e que contêm insaturações no anel D do esteroide demonstraram maior atividade.[46] Alguns estudos envolvendo 4-azaesteroides com grupos oxima na posição 20 demonstraram também atividades inibitórias interessantes para a 5α -reductase (Fig. 55). Contudo, alguns esteroides contendo oximas noutras posições apresentaram também atividade antineoplástica.[82]

Recentemente foram sintetizados derivados de esteroides com um grupo éster-oxima em C-20, 5.1.[83] Estes compostos apresentaram atividade citotóxica em várias linhas celulares, nomeadamente na NB4 e PC-3. Hartmann e colaboradores sintetizaram vários derivados esteroides contendo oximas ligadas ao anel D, como é exemplo o esteroide 5.2. Alguns destes compostos apresentaram grande capacidade inibitória quer da 5α -reductase, quer do CYP17, revelando potencial interesse no tratamento de doenças da próstata.[53] Os esteroides contendo grupos oxima na posição C-20 e C-21 são portanto derivados com grande interesse no tratamento do cancro da próstata e da BHP e que não se encontram totalmente explorados.

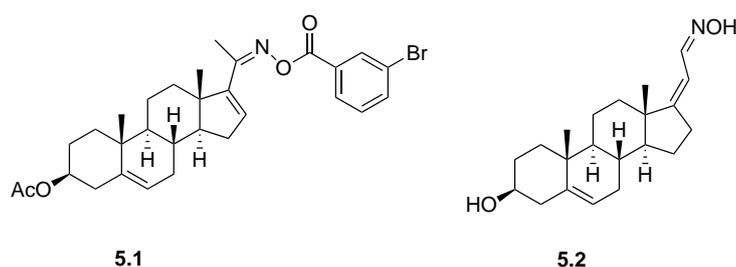


Figura 55: Representação da estrutura de C-20 oximas com propriedades farmacológicas.

Tal como foi referido no capítulo anterior muitos dos inibidores do CYP17 contêm heterociclos ligados ao anel D, indirectamente ou através de um espaçador. No grupo de investigação onde a presente dissertação de mestrado foi desenvolvida, foi criada uma estratégia

que permite ligar anéis heterociclos à posição alfa das oximas através de uma reação hetero Diels-Alder (Fig. 56).[84]

A reação de Diels-Alder inversa de nitrosoalquenos conjugados com heterociclos ricos em elétrons ou olefinas nucleofílicas tem sido uma estratégia bastante utilizada para originar 1,2-oxazinas e oximas de cadeia aberta. A geração destes nitrosoalquenos requer inicialmente a preparação de oximas halogenadas como 5.5. O composto α -halogenado 5.4 foi obtido através do tratamento de 5.3 com bromo molecular em dioxano e éter etílico. A oxima alvo, 5.5, foi então gerada após a reação do composto halogenado com hidrocloreto de hidroxilamina.

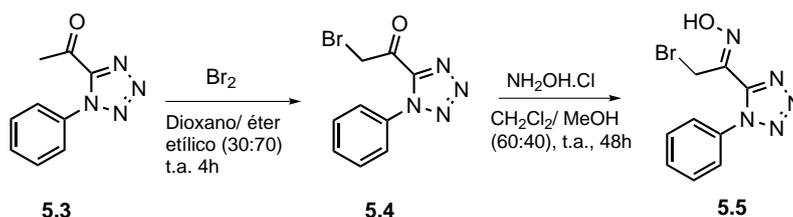


Figura 56: Estratégia de síntese de oximas α -halogenadas.

Após o tratamento da oxima halogenada com carbonato de sódio em diclorometano, esta foi convertida no nitrosoalqueno 5.6 que foi intercetado, *in situ*, pelo etil vinil éter e por vários heterociclos (Fig. 57). No caso da reação com o etil vinil éter, os cicloadutos foram isolados como resultados da cicloadição [4+2], 5.8. Na reação com os heterociclos, que possuem maior carácter aromático como o pirrole e o indole, foram isolados os compostos com a oxima de cadeia aberta, 5.7 e 5.9. Estes compostos de cadeia aberta surgem da rearomatização do cicloaduto formado após a cicloadição [4+2].[84]

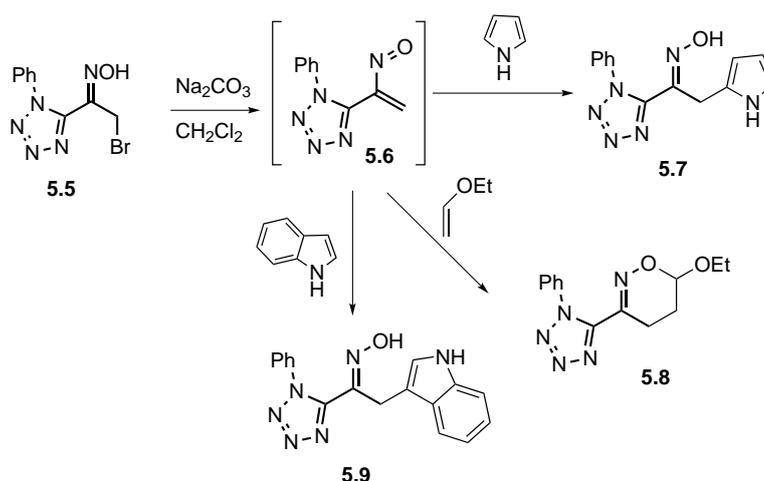


Figura 57: Reação de hetero Diels-Alder de nitrosoalquenos com dienófilos.

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste projeto de investigação pretendia-se sintetizar esteroides contendo um grupo oxima em C-20 com um heterociclo na posição alfa desta oxima. Para tal, adoptou-se a estratégia descrita acima, iniciada pela bromação selectiva do 16-DPA na posição C-21 (Fig. 58). O passo seguinte passava pela formação da oxima em C-20 através da reação do esteroide 21-bromado, **5.10**, com hidrocloreto de hidroxilamina. Na presença de base, o composto **5.11** deveria originar o intermediário nitrosoalqueno **5.12** que, na presença de heterociclos como o indole e o pirazole, levaria à formação de derivados esteroide contendo um grupo C-20 oxima e um heterociclo na posição α , como é exemplo o esteroide **5.13**. A formação da oxima de cadeia aberta resultaria da expectável rearomatização do cicloaduto após a hetero diels-alder.

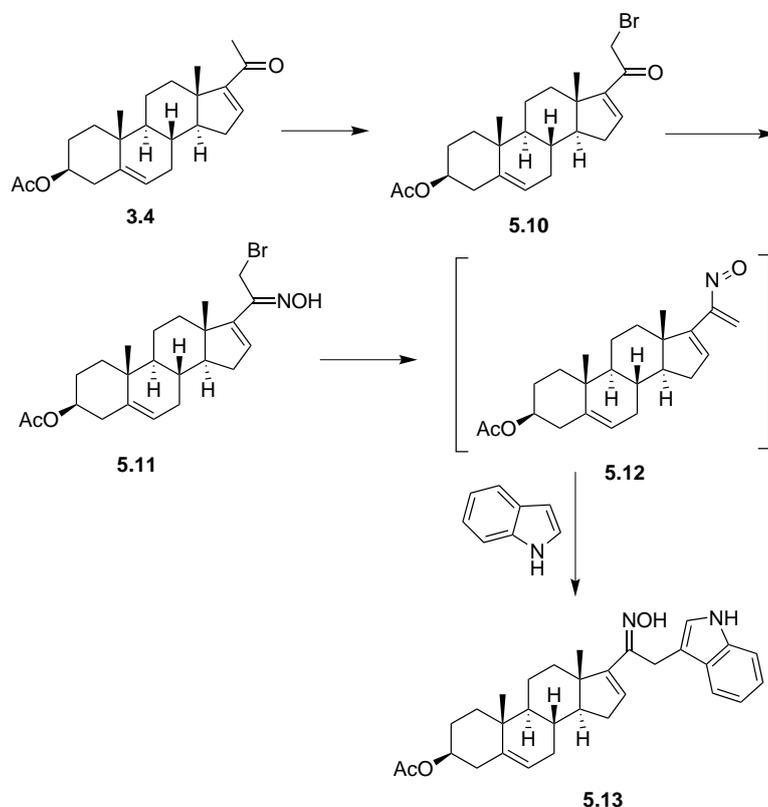


Figura 58: Estratégia de síntese de C-20 oximas contendo heterociclos em posição α .

5.2.1 Bromação

Inicialmente, optou-se por tentar a bromação selectiva na posição alfa do grupo carbonilo C20 aplicando o procedimento descrito anteriormente. No primeiro ensaio, adicionaram-se 1.1 equivalentes de bromo em dioxano e éter etílico numa proporção de 30:70 durante 4

horas (Fig. 59). Após a mistura resultante da reação ter sido analisada por RMN protônico, verificou-se que nenhum dos produtos obtidos correspondia ao composto pretendido **5.10**. Os picos dos prótons H-16 e H-6 que aparecem caracteristicamente com um desvio químico de, aproximadamente, 6.70 e 5.38 ppm sofreram um desvio para valores inferiores. Esta evidência sugere o desaparecimento das ligações duplas $\Delta 6$ e $\Delta 16$ e a possível bromação nessas posições.

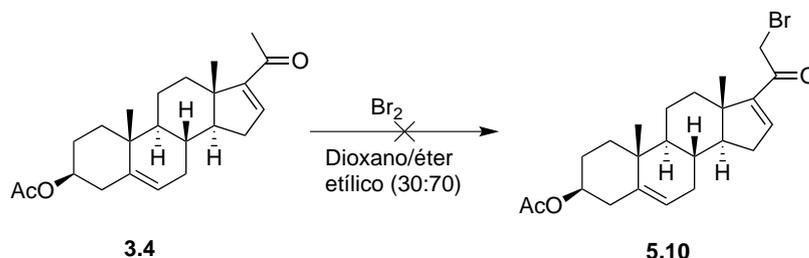


Figura 59: Tentativa de bromação do 16-DPA na posição C-21.

Após esta tentativa falhada de bromação optou-se por outra via para a bromação do 16-DPA (Fig. 60). Esta via, mais complexa, começava com a hidrólise do grupo acetato através da adição de uma solução aquosa de hidróxido de sódio (2%) em metanol, originando o 16-DHP com um rendimento de 99%.^[85] O grupo 3-hidroxilo do 16-DHP foi seguidamente protegido utilizando ácido fórmico, originando o composto **5.14** com 72% de rendimento.

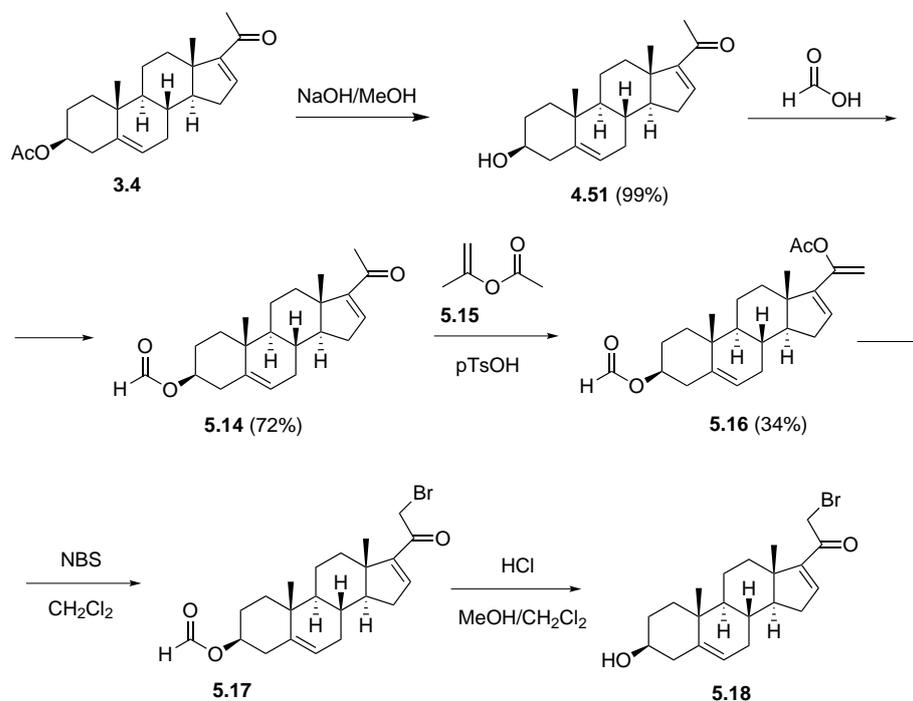
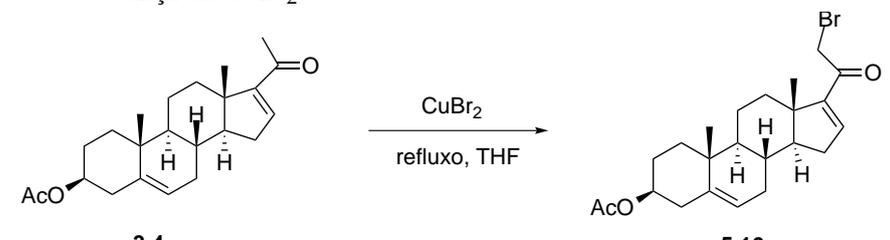


Figura 60: Estratégia de síntese de esteroides C-21 bromados.

Com o objetivo de facilitar a bromação na posição C21 do esteroide, a cetona **5.15** e o ácido p-toluenosulfônico foram refluxados em acetato de isopropenil, originando o composto **5.16** com um rendimento de 34%. A bromação do composto **5.16** foi efectuada utilizando N-bromosuccinimida. Após 20 horas de reação, a análise da mistura por RMN protónico exibiu os desvios químicos característicos do composto **5.16**, apesar da amostra ainda se encontrar contaminada com o composto de partida. Tendo em conta que o rendimento global desta via para obter o derivado bromado partindo do 16-DPA é muito baixo, optou-se por desistir desta via e procurar uma alternativa com uma eficiência superior.

A bromação na posição 21 foi finalmente obtida refluxando 16-DPA na presença de brometo de cobre (II) em THF (Tab. 4).[86] Inicialmente com 2 horas de reação e utilizando 2 equivalentes de brometo de cobre (II) o rendimento foi apenas de 6%, após isolamento por coluna cromatográfica. Nesta reação foi também possível recuperar grande parte do reagente de partida. Por esta razão, aumentou-se o tempo e o número de equivalentes de brometo de cobre (II) nas reacções posteriores. Quando usados 5 equivalentes de brometo de cobre (II) em THF durante 24h o rendimento foi de 41%, um valor muito superior ao do rendimento global da via apresentada anteriormente. Todavia, não foi possível observar a formação do esteroide halogenado **5.10** quando se utilizou metanol como alternativa ao THF como solvente da reação.

Tabela 4: Síntese do acetato de 21-bromo-16-desidropregnenolona na presença de $CuBr_2$.



<i>Nº equiv de $CuBr_2$</i>	<i>Solvente</i>	<i>Tempo</i>	<i>Rendimento</i>
2	THF	2h	6%
2	THF	24h	24%
3	THF	24h	25%
4	THF	24h	35%
5	THF	24h	41%
3	Metanol	24h	-

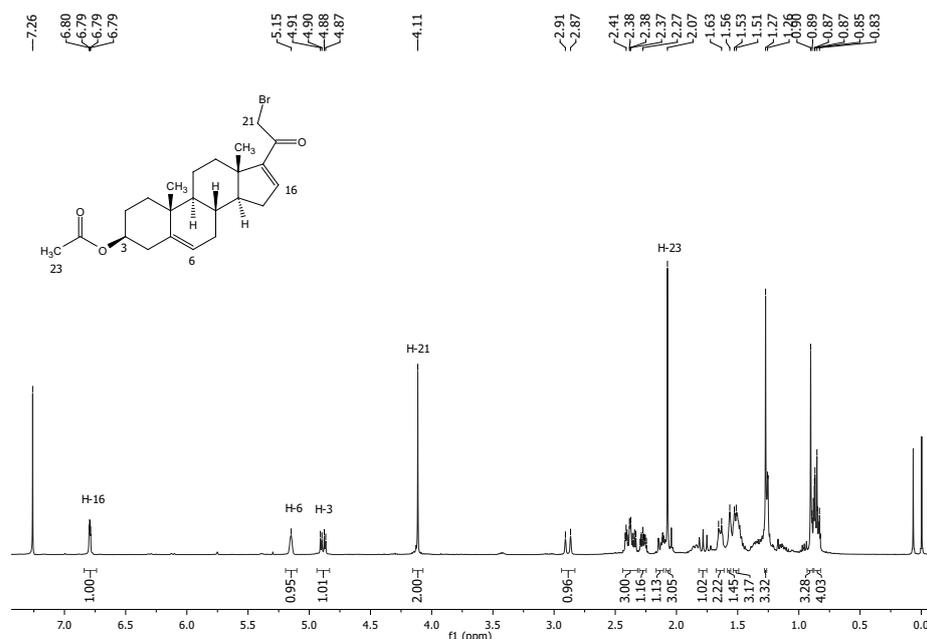


Figura 61: Espectro de RMN protónico do esteroide **5.10**.

Analisando o espectro de RMN protónico do composto **5.10** é possível observar o pico correspondente aos prótons do grupo CH_2Br como singlete com um desvio químico de 4.11 ppm (Fig. 61). É também possível observar que a bromação foi selectiva em C-21, mantendo as ligações duplas Δ_6 e Δ_{16} intactas.

Porém, ao aplicar a mesma estratégia utilizando brometo de cobre na tentativa de bromação selectiva do substrato esteroide 16-DHP, não se obteve o composto **4.83** (Fig. 62). Ao analisar o RMN protónico da mistura obtida verificou-se que a bromação não ocorreu na posição C-21, alfa ao carbonilo, uma vez que os prótons desse grupo se encontravam com o mesmo desvio químico dos prótons do grupo metil C-21 do 16-DHP.

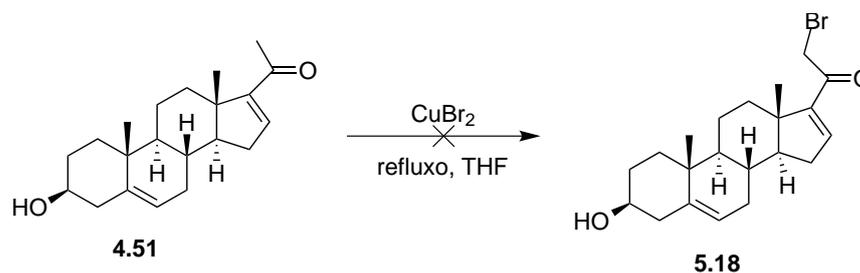


Figura 62: Tentativa de bromação da 16-DHP na posição C-21.

5.2.2 Formação da oxima e do cicloaduto

Após a síntese do acetato de 16,17-desidro-21-bromo-pregnenolona **5.10** partiu-se para a tentativa de introdução de um grupo oxima em C-20. Para tal, fez-se reagir o derivado 21-bromado **5.10** com hidrocloreto de hidroxilamina (Fig. 63). A hidroxilamina foi dissolvida em água e adicionada a uma solução de esteroide bromado em etanol e deixou-se reagir durante 12 horas. Contudo, esta reação não originou o composto esperado **5.11**. Ao analisar o RMN protónico, verificou-se que a oxima se tinha formado mas o pico correspondente ao grupo CH_2Br não estava presente. Isto pode ser explicado por uma possível substituição do bromo por um grupo hidroxilo e, por essa razão, tentou-se novamente a adição do hidrocloreto de hidroxilamina utilizando diferentes solventes.

Utilizando uma mistura de etanol e diclorometano não se obteve indícios da formação da oxima e observou-se o desaparecimento do pico correspondente ao grupo CH_2Br . Como não se observou a formação da oxima, optou-se por utilizar base para neutralizar o hidrocloreto de hidroxilamina de modo a facilitar a formação da oxima. Dissolveu-se o hidrocloreto de hidroxilamina e o acetato de sódio em água e, após adição do esteroide bromado **5.10**, a mistura ficou em agitação durante 20 minutos, sendo colocada posteriormente no congelador durante 12 horas. Porém, esta reação foi infrutífera, apenas se obtendo o reagente de partida **5.10** como único produto.

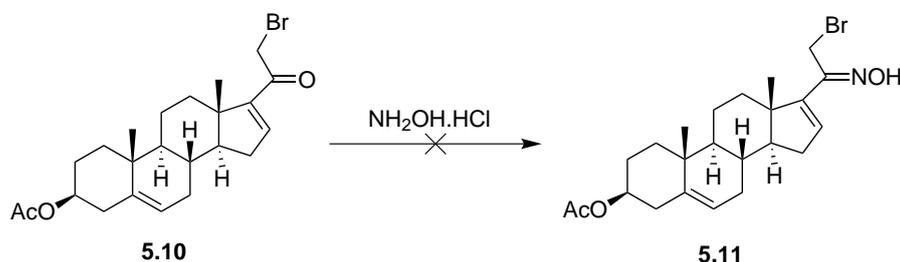


Figura 63: Tentativa de síntese da C-20 oxima α -bromada **5.11**.

Como não foi possível sintetizar o composto **5.11** através da reação de bromação e da introdução do grupo oxima, tentou-se inverter a ordem das reações, introduzindo primeiro o grupo oxima e de seguida partir-se para a bromação na posição C-21. A oxima **5.19** foi sintetizada através da reação do 16-DPA, **3.4**, na presença de hidrocloreto de hidroxilamina e piridina (Fig. 64). Contudo, ao utilizar o procedimento de bromação com $CuBr_2$ (II), descrito anteriormente, para a bromação da oxima **5.19** não se obteve o produto esperado. Ao analisar o espectro de RMN protónico foi possível verificar que o sinal do grupo oxima tinha desaparecido, sugerindo uma possível degradação deste.

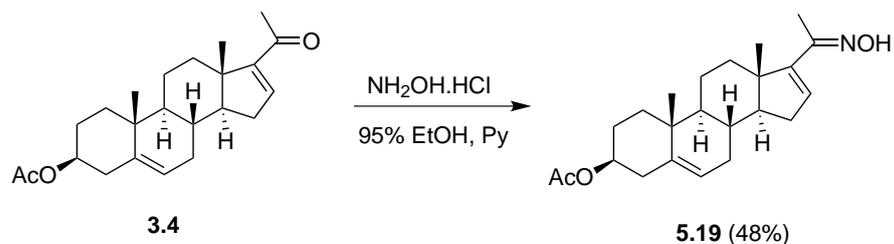


Figura 64: Síntese da C-20 oxima **5.19** partindo do 16-DPA.

Ao verificar que a bromação da oxima **5.19** não originava o produto esperado e que não era possível introduzir o grupo oxima no esteroide **5.10**, nas condições apresentadas anteriormente, optou-se por uma reação *one pot* na presença de base. O hidrocloreto de hidroxilamina foi colocado em agitação na presença de carbonato de sódio em diclorometano e, após 30 minutos, foram adicionadas uma solução do esteroide bromado **5.10** em diclorometano e pirrole (Fig. 65). Ao contrário do esperado, esta reação não originou o composto **5.21** mas, através de separação por coluna cromatográfica, foi possível isolar um produto com estrutura desconhecida, em quantidade diminuta.

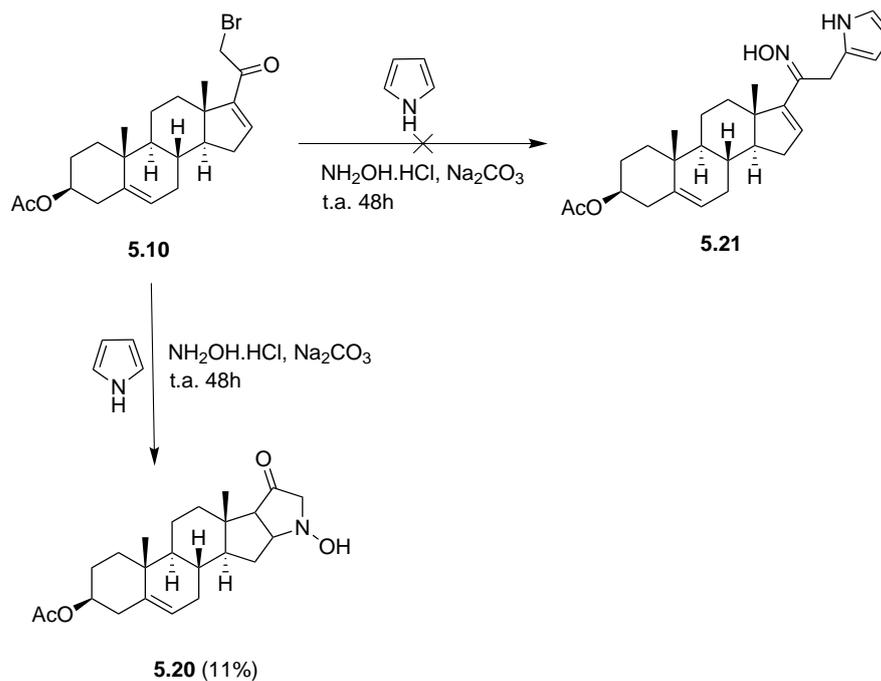


Figura 65: Reação *one pot* na tentativa de formação do cicloaduto **5.21**.

Após análise do RMN protónico deste composto foi proposta a estrutura **5.20**, cujos prótons apresentam ambientes químicos condizentes com os desvios químicos apresentados no RMN protónico (Fig. 66). O esteroide pentacíclico **5.20** resultaria da adição conjugada da hidroxilamina, seguido de ciclização, levando à formação de um anel de cinco membros, ao invés de um anel de seis membros. Devido à pe-

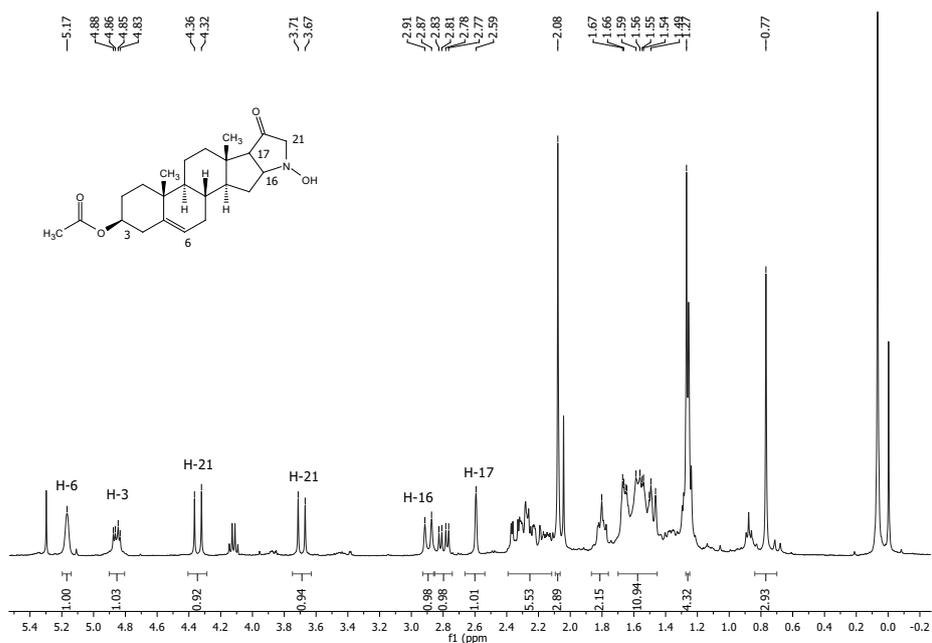


Figura 66: Espectro de RMN protônico do esteroide pentacíclico 5.20.

quena quantidade de composto disponível apenas foi possível confirmar a estrutura deste composto por espectroscopia de infravermelho, detetando-se a presença de um grupo hidroxilo, o que aponta para a formação do anel de cinco membros. A estrutura do composto obtido será posteriormente elucidada recorrendo a outros métodos de caracterização.

Parte III

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Neste trabalho pretendeu-se explorar a reatividade de vários derivados esteroides com aniões metil 1,2-diazafulvénio, via reação de cicloadição $[8\pi+2\pi]$, para a preparação de novos esteroides hexacíclicos quirais. Demonstrou-se que a eliminação térmica de dióxido de enxofre de novos 2,2-dioxo-1*H*-3*H*-pirazolo[1,5-*c*]tiazoles contendo um grupo carboxilato na posição 6 ou 7 gera os respetivos aniões metil 1,2-diazafulvénio que participam em reações de cicloadição com os vários derivados esteroides.

Foram sintetizados dois novos esteroides hexacíclicos através da cicloadição $[8\pi+2\pi]$ do 16-DPA com os aniões metil diazafulvénio gerados a partir do 2,2-dioxo-1*H*-3*H*-pirazolo[1,5-*c*]tiazole-7-carboxilato de metilo e 2,2-dioxo-1*H*-3*H*-pirazolo[1,5-*c*]tiazole-6-carboxilato de metilo (Fig. 67). A reação do 16-DPA com o derivado 6-carboxilato de metilo levou à formação de uma mistura de regioisómeros, enquanto que a reação com o derivado 7-carboxilato de metilo foi estereo- e regioselectiva. Foi também otimizada a cicloadição $[8\pi+2\pi]$ do 16-DPA com o anião metil diazafulvénio gerado a partir do 6-fenil-2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*]tiazole-7-carboxilato de etilo. Concluiu-se igualmente que, na generalidade, quando a reação ocorre sob irradiação microondas o rendimento é superior ao da termólise convencional.

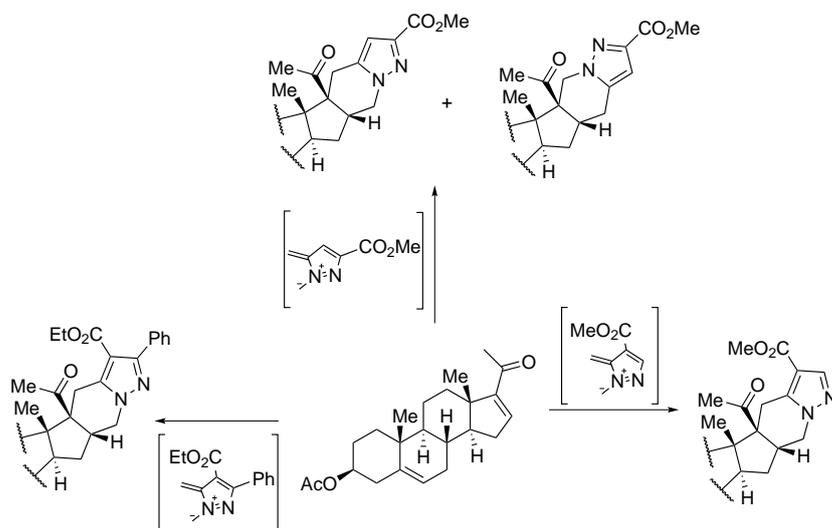


Figura 67: Reações de cicloadição $[8\pi+2\pi]$ do 16-DPA com aniões metil 1,2-diazafulvénio

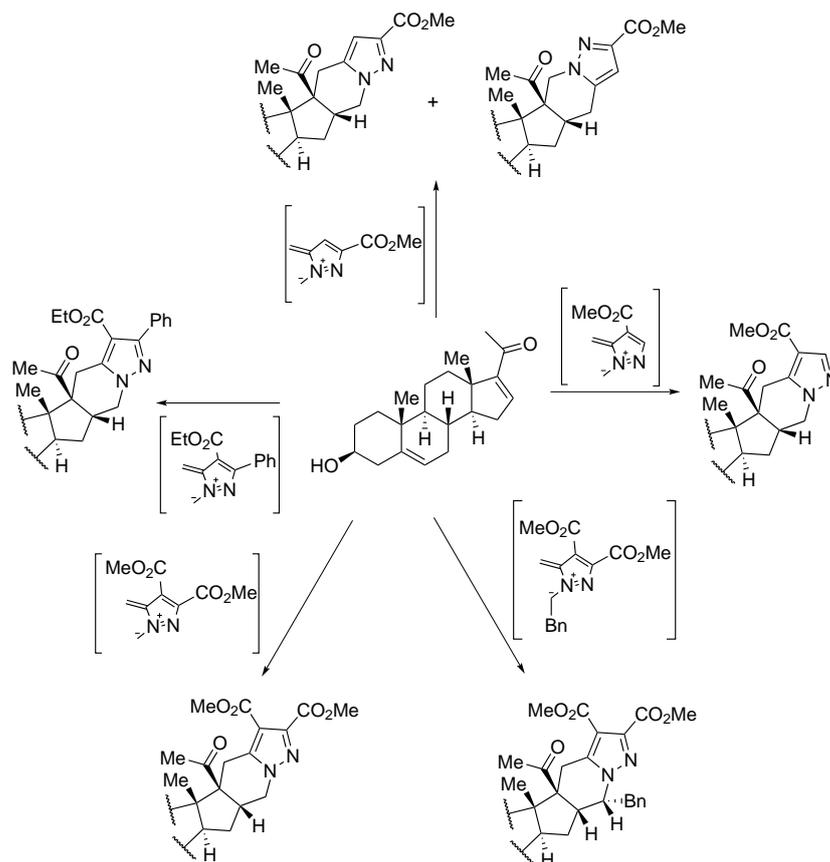


Figura 68: Reações de cicloadição $[8\pi+2\pi]$ do 16-DHP com aniões metil 1,2-diazafulvênio

Foi igualmente explorada a reatividade do 16-DHP na presença de diversos aniões metil diazafulvênio (Fig. 68). A reação do 16-DHP com o 2,2-dioxo-1*H*-3*H*-pirazolo[1,5-*c*]tiazole-6-carboxilato de metilo originou igualmente uma mistura de regioisômeros. Por outro lado, a reação do 16-DHP com o 3-Benzil-2,2-dioxo-1*H*-3*H*-pirazolo[1,5-*c*]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo foi regio- e estereosseletiva. Através de cálculos computacionais ao nível DFT, utilizando a *N*-fenilmaleimida como modelo reacional, demonstrou-se que a estereosseletividade do esteroide hexacíclico obtido resulta da cicloadição endo da conformação mais estável do dipolo, com o 1-substituinte para fora, pela face α menos impedida do esteroide. As reações do 16-DHP com os diversos aniões metil diazafulvênio originaram os respetivos esteroides hexacíclicos com menor rendimento do que os originados partindo do 16-DPA nas mesmas condições.

A termólise de 2,2-dioxo-1*H*-3*H*-pirazolo[1,5-*c*]tiazoles na presença da 16-desidroprogesterona gerou os aniões metil 1,2-diazafulvênio, dando origem aos respetivos esteroides hexacíclicos (Fig 69). Esta estratégia levou à síntese de seis novos esteroides hexacíclicos, quirais, derivados do núcleo progesterona. A formação destes cicloadutos ocorreu com um menor rendimento quando comparado com a for-

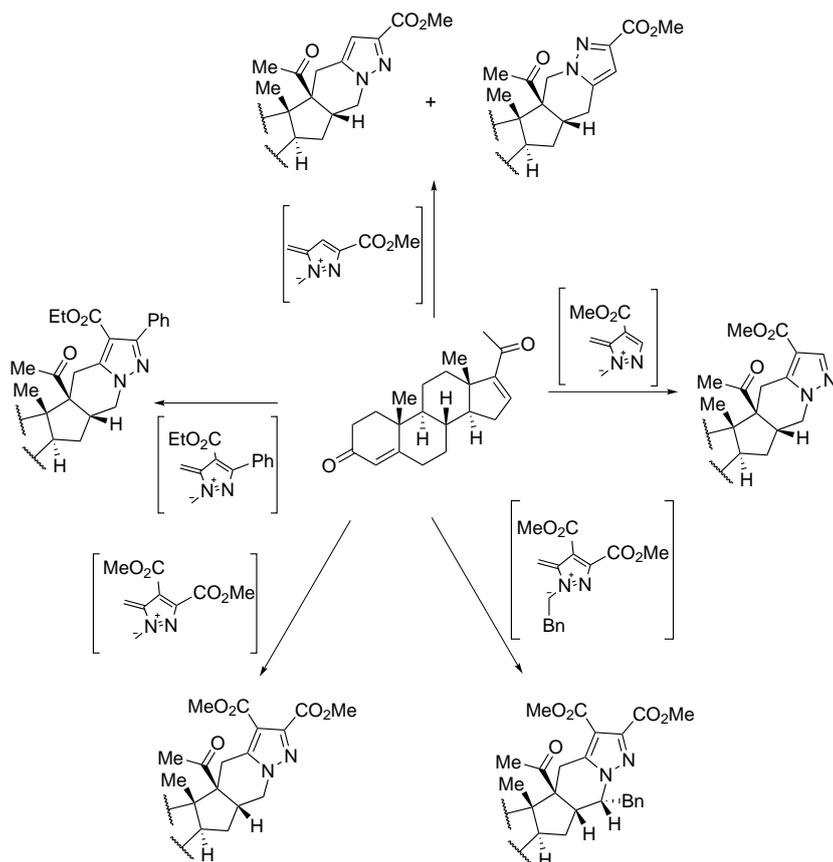
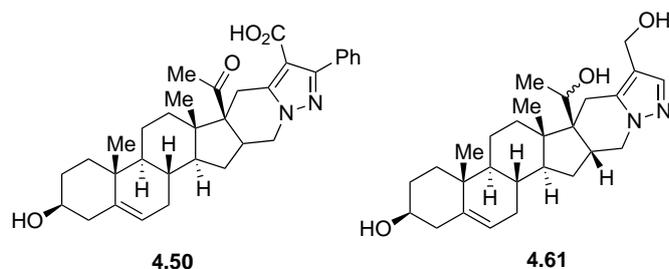


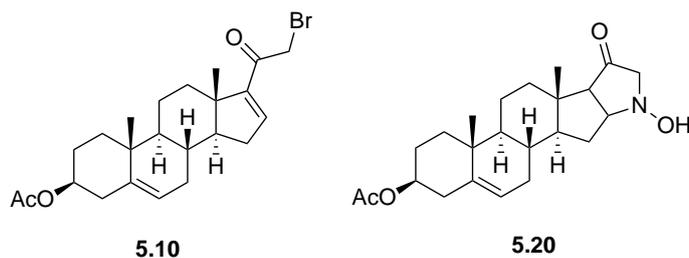
Figura 69: Reações de cicloadição $[8\pi+2\pi]$ do 16-Desidropregesterona com aniões metil 1,2-diazafulvênio

mação destes, na presença de 16-DPA, nas mesmas condições de irradiação microondas, demonstrando a menor reatividade da 16-desidropregesterona. Contudo, a reação do 6-fenil-2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*]tiazole-7-carboxilato de etilo com a 16-desidropregesterona sob irradiação microondas originou o respectivo cicloaduto com um rendimento semelhante ao da reação com o 16-DPA.

A estrutura de alguns destes esteroides hexacíclicos sintetizados foi posteriormente modificada, levando à síntese de dois novos esteroides hexacíclicos. Procedeu-se à hidrólise e redução destes compostos, obtendo-se esteroides derivados do núcleo pregnenolona com substituintes carboxilo e hidroxilo no anel pirazolo, respetivamente.



Neste trabalho pretendeu-se igualmente sintetizar esteroides contendo C-20 oximas com heterociclos em posição α . Esta estratégia passava pela síntese do esteróide C-21 bromado **5.10**, seguido da formação da oxima bromada em posição α que, na presença de base, formaria o nitrosoalqueno *in situ*, levando à formação dos cicloadutos alvo na presença de um heterociclo. Após várias tentativas por diferentes vias sintéticas, a bromação do 16-DPA foi alcançada na presença de CuBr (II) em THF. Apesar das tentativas de formação do grupo oxima em C-20 não terem originado o composto pretendido, foi possível isolar um esteroide novo. Este esteroide foi identificado como um esteroide pentacíclico com a estrutura **5.20**.



Como foi referido, este projeto de investigação teve dois objetivos principais: a síntese de novos esteroides quirais hexacíclicos, através da cicloadição $[8\pi+2\pi]$ de aniões metil diazafulvénio a substratos esteroide, estratégia pela qual se sintetizaram 12 novos esteroides; e a síntese de C-20 oximas contendo um heterociclo em posição α , da qual, apesar de não se ter obtido nenhum cicloaduto pretendido, se obteve um novo esteroide pentacíclico.

Parte IV

PARTE EXPERIMENTAL

PARTE EXPERIMENTAL

7.1 APARELHAGEM UTILIZADA

Pontos de fusão

Os pontos de fusão foram determinados num microscópio de placa aquecida Falc Melting Point com o número de série R132467, pelo método de capilar aberto e os seus valores não são corrigidos.

Espectroscopia de Infravermelho

Os espectros de infravermelho foram obtidos num espectrómetro Nicolet 6700 FTIR. Utilizaram-se pastilhas de KBr para os sólidos e os óleos foram analisados utilizando pastilhas de KBr como suporte.

Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN ^1H e RMN ^{13}C) foram obtidos nos espectrómetros Bruker Avance III, operando a 400 MHz (^1H) e 100 MHz (^{13}C). Utilizou-se como solvente clorofórmio deuterado (CDCl_3), exceto nos casos indicados; os valores dos desvios químicos são apresentados em ppm relativamente ao padrão interno tetrametilsilano (TMS) e os valores das constantes de acoplamento (J) são expressos em Hz.

Espectroscopia de Massa

Os espectros de massa foram obtidos num espectrómetro de massa Bruker FTMS APEXIII com ionização por electrospray (ESI) ou HP 6890 Plus com ionização por impacto eletrónico (IE).

Microondas

As reações realizadas com irradiação por microondas foram efetuadas num aparelho da marca Discover S-Class da CEM Focused Synthesis System usando tubos microondas de 10 mL.

Cromatografia

Nas reações cuja evolução foi acompanhada por cromatografia em camada fina, utilizaram-se placas de sílicas 60 F254 em suporte de alumínio fornecidas pela Merck. A maioria dos compostos foram purificados por cromatografia em coluna de sílica, usando gel de sílica 60 (0.040-0.063 mm) fornecida pela Merck, Macherey-Nagel ou Fluka.

7.2 SOLVENTES E REAGENTES

Acetato de Etilo

Foi refluxado durante 3 horas na presença de carbonato de potássio de seguida destilado.

Acetona

Foi refluxada durante 3 horas na presença de carbonato de potássio, destilada e armazenada sobre peneiro moleculares de 3 Å.

Diclorometano e Clorofórmio

Foram refluxados na presença de cloreto de cálcio durante 3 horas, destilados e guardados sobre peneiro moleculares de 4 Å.

Etanol e Metanol

Foram aquecidos a refluxo durante 2 horas com magnésio (5 g/L) na presença de palhetas de iodo (0.5 g/L), destilados a partir do al-cóxido de sódio, e guardados sobre peneiros moleculares 3 Å.

Éter etílico, Hexano e Tolueno

Foram refluxados na presença de fios de sódio, utilizando ben-zofenona como indicador, destilados, e guardados sobre peneiros moleculares de 4 Å.

Todos os outros solventes e reagentes foram fornecidos pela Aldrich, Merck ou Flucka e utilizados directamente, sem qualquer tipo de purificação adicional.

7.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

7.3.1 Síntese de Ácido 1,3-tiazolidina-4-carboxílicos:

Ácido 1,3-tiazolidina-4-carboxílico (4.28)

A síntese deste compostos foi efetuada com base num procedimento da literatura, com pequenas alterações[87]. A uma solução de L-cisteína (4.8g, 40mmol) em água (40 mL) adicionou-se uma solução de formaldeído (40 mmol) em etanol (30 mL). A mistura ficou em agitação reacional durante a noite à temperatura ambiente. Filtrou-se o sólido obtido e lavou-se com éter etílico.

O produto foi obtido como um sólido branco (99%).

^1H RMN (CD_3OD) 2.99-3.02 (m, 2H), 3.72-3.75 (m, 1H), 4.22 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz), 4.38 (d, 1H, $J = 9.6$ Hz).

7.3.2 Síntese de Ácido *N*-Nitroso-1,3-tiazolidina-4-carboxílicos:

Ácido *N*-nitroso-1,3-tiazolidina-4-carboxílico (4.29)

Adicionou-se lentamente uma solução de ácido clorídrico concentrado a uma suspensão de ácido 3-tiazolidina-4-carboxílico **4.28** (123.7 mmol) em água (126 mL) até à dissolução completa da suspensão. Manteve-se a mistura reacional em agitação vigorosa e adicionou-se, lentamente, utilizando um funil de adição, uma solução de nitrito de sódio (17.0 g, 2eq., 247.4mmol) em água (63 mL). Imediatamente após a adição da solução, observa-se a libertação vigorosa de N_2O_4 e a diminuição da intensidade da cor vermelha da solução inicial. A mistura reacional é agitada durante 12 h à temperatura ambiente. Após a reação estar completa, extraiu-se com acetato de etilo (3 x 80 mL), juntam-se os extratos orgânicos e lava-se com água (80 mL) e com solução saturada de cloreto de sódio (80 mL). Secou-se a fase orgânica com sulfato de magnésio anidro e evaporou-se.

O produto foi purificado por cristalização com éter de petróleo e obtido como um sólido amarelo (76%). O espectro de 1H RMN mostra a presença de dois isómeros rotacionais (razão 53:47): 1H RMN (isómero maioritário) 3.30-3.48 (m, 2H), 4.49 (d, 1H, $J = 11.7$ Hz), 4.88 (d, 1H, $J = 11.7$ Hz), 4.95 (t, 1H, $J = 7.1$ Hz); 1H RMN (isómero minoritário) 3.30-3.48 (m, 2H), 5.28 (d, 1H, $J = 10.4$ Hz), 5.67 (d, 1H, $J = 10.4$ Hz), 5.85 (t, 1H, $J = 4.4$ Hz).

7.3.3 Síntese de 4*H*, 6*H*-Tiazolo[3,4-*c*][1,2,3]oxadiazol-7-*io*-3-olatos:

4*H*,6*H*-Tiazolo[3,4-*c*][1,2,3]oxadiazol-7-*io*-3-olatos (4.30)

A uma suspensão de ácido *N*-nitroso-1,3-tiazolidina-4-carboxílico **4.29** (21.65 mmol) em éter etílico (230 mL) a 0° C adicionou-se lentamente anidrido trifluoroacético (3.1 mL, 21.65 mmol). Agitou-se a mistura reacional durante 6 h a 0° C. Aqueceu-se até à temperatura ambiente e deixou-se em agitação durante 24 h. Evaporou-se o solvente e adicionou-se água (20 mL) e uma solução de hidrogenocarbonato de sódio ($NaHCO_3$) até neutralizar a solução. Extraiu-se a fase orgânica com acetato de etilo, secou-se com sulfato de magnésio anidro e evaporou-se o solvente.

O produto precipitou no meio reacional e foi filtrado e lavado com éter etílico frio. O produto foi obtido como um sólido amarelado (72%). 1H RMN 4.03 (t, 2H, $J = 2.0$ Hz), 5.04 (t, 2H, $J = 2$ Hz).

7.3.4 Síntese de 1H,3H-Pirazolo[1,5-c]tiazole-carboxilatos:

1H,3H-Pirazolo[1,5-c]tiazole-7-carboxilato de metilo (4.31) e 1H,3H-Pirazolo[1,5-c]tiazole-6-carboxilato de metilo (4.32)

Preparou-se uma solução do 4H, 6H-Tiazolo[3,4-c][1,2,3]oxadiazol-7-io-3-olatos **4.30** (1 g, 6.94 mmol) e metil propiolato (0.99 mL, 11.1 mmol) em Xileno (7.5 mL). Refluxou-se sob atmosfera inerte de azoto durante 4 h. A reação foi arrefecida até à temperatura ambiente e evaporou-se o solvente. A purificação dos produtos foi feita por coluna cromatográfica (acetato de etilo/ hexano, 1:2) obtendo-se, por ordem de eluição, o produto **4.31** como um sólido branco (16%) e o produto **4.32** como um sólido branco (53%).

Composto **4.31**: pf 111.2-112.0 °C (a partir de acetato etilo/ hexano). IV (KBr) 1115, 1269, 1277, 1358, 1439, 1570 e 1697 cm^{-1} . 1H RMN: 3.81 (s, 3H), 4.26 (br s, 2H), 5.19 (br s, 2H), 7.95 (s, 1H). ^{13}C RMN: 28.1, 50.2, 51.6, 108.5, 146.3, 147.7, 163.2. EMAR (EI-TOF) m/z: calculado para $C_7H_8N_2O_2S$ [M]⁺ 184.0306, encontrada 184.0313.

Composto **4.32**: pf 100.1-100.7 °C (a partir de acetato de etilo/ hexano). IV (KBr) 1205, 1234, 1248, 1471, 1485 e 1712 cm^{-1} . 1H RMN: 3.89 (s, 3H), 4.09 (br s, 2H), 5.20 (br s, 2H), 6.57 (br s, 1H). ^{13}C RMN: 26.9, 49.9, 52.2, 102.8, 144.6, 148.7, 162.6. EMAR (EI-TOF) m/z calculado para $C_7H_8N_2O_2S$ [M]⁺ 184.0306, encontrado 184.0301.

1H,3H-Pirazolo[1,5-c]tiazole-6,7-dimetanol (4.36)

Preparou-se uma solução de $LiAlH_4$ (1.04 g, 3.3 eq., 27.3 mmol) em éter etílico seco (56 mL) e arrefeceu-se a 0 °C. Adicionou-se lentamente uma solução de 1H,3H-Pirazolo[1,5-c]tiazole-6,7-dicarboxilato de dimetilo **4.35** (8.26 mmol) em diclorometano seco (80 mL). Após o término da adição, colocou-se a mistura reacional a refluxo (40 °C) durante 1.5 h. A reação foi arrefecida até à temperatura ambiente e adicionou-se, gota a gota, utilizando um funil de adição, acetato de etilo até a reação deixar de borbulhar, seguido de H_2O (1 mL), NaOH (15%, 1 mL) e H_2O (3 mL). A mistura ficou em agitação durante 30 minutos. Filtrou-se a mistura sobre celite e lavou-se com acetato de etilo quente, seguido de diclorometano frio. Secou-se com sulfato sulfato de sódio anidro e evaporou-se o solvente.

O produto foi obtido como um sólido branco (60%). 1H RMN (DMSO-d₆): 4.08 (s, 2H), 4.38 (t, 4H, $J = 5.1$ Hz), 4.75 (t, 1H, $J = 5.4$ Hz), 4.91 (t, 1H, $J = 5.6$ Hz), 5.1 (s, 2H). ^{13}C RMN: 26.09, 48.57, 53.47, 56.46, 113.38, 142.36, 155.18.

1H,3H-Pirazolo[1,5-c]tiazole-6,7-diacetato de metileno (4.37)

Preparou-se uma solução do 1H,3H-Pirazolo[1,5-c]tiazole-6,7-dimetanol **4.36** (2.91 mmol) em diclorometano seco (7.9 mL) e adicionou-se trietilamina (2 mL, 4.9 eq., 14.3 mmol), 4-(dimetilamina)-piridina (4mg) e anidrido acético (0.69 mL, 2.5 eq., 7.27 mmol). Colocou-se a mistura reacional em agitação a 25 °C durante 1.5 h. Adicionou-se diclorometano (60 mL) e lavou-se a fase orgânica com água (3x 40 mL). Secou-se a fase orgânica e evaporou-se o solvente.

O produto foi obtido como um sólido branco (86%). ¹H RMN: 2.01 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 4.10 (t, 2H, *J* = 1.6 Hz), 4.96 (s, 2H), 5.10 (s, 2H), 5.14 (t, 2H, *J* = 1.7 Hz). ¹³C RMN: 20.88, 20.90, 26.74, 49.84, 55.86, 58.83, 109.19, 144.67, 151.91, 170.58, 170.79.

1,3,6,8-Tetrahidrofuro[3',4':3,4]pirazolo[1,5-c]tiazole (4.38)

Preparou-se uma solução do 1H,3H-Pirazolo[1,5-c]tiazole-6,7-dimetanol **4.36** (1.07 mmol) e ácido p-toluenosulfônico (4.7 mg, 0.025 mmol) em 30 mL de tolueno seco e refluxou-se com uma armadilha de Dean-Stark durante 18 h. Lavou-se a mistura reacional com bicarbonato de sódio (5%), extraiu-se a fase orgânica, e lavou-se com H₂O. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro e evaporou-se. Precipitou-se o produto com acetona e filtrou-se.

O produto foi obtido como um sólido branco (40%). ¹H RMN: 4.06 (s, 2H), 4.36 (s, 2H), 4.42 (s, 2H), 5.16 (s, 2H);

7.3.5 Síntese de 2,2-Dioxo-1H,3H-pirazolo[1,5-c]tiazoles:**Procedimento geral para a síntese de 2,2-Dioxo-1H,3H-pirazolo[1,5-c]tiazoles:**

A uma solução de 1H,3H-Pirazolo[1,5-c]tiazole-carboxilato (1.23 mmol) em diclorometano (8.6 mL), sob atmosfera inerte e à temperatura de 0 °C, adicionou-se lentamente ácido 3-cloroperoxibenzóico (3eq., 3.60 mmol). Retirou-se o banho de gelo e deixou-se em agitação, à temperatura ambiente, durante o tempo indicado em cada caso. Após a reação estar completa, lavou-se a mistura reacional duas vezes com uma solução aquosa de bissulfito de sódio (10% m/v, 2 x 80 mL) e duas vezes com uma solução aquosa de bicarbonato de sódio (10% m/v, 2 x 80 mL). Secou-se a fração orgânica com sulfato de sódio anidro e evaporou-se o solvente.

2,2-Dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*]tiazole-7-carboxilato de metilo (4.33)

Obtido a partir do 1*H*,3*H*-Pirazolo[1,5-*c*]tiazole-7-carboxilato de metilo **4.31** como descrito no procedimento geral (tempo de reação: 4 h). O produto foi obtido como um sólido branco que foi recristalizado com éter etílico (68%). pf 160.2-160.5 °C (a partir do éter etílico). IV (KBr) 1034, 1107, 1138, 1215, 1255, 1334, 1381, 1483, 1572 e 1724 cm^{-1} . 1H RMN: 3.85 (s, 3H), 4.66 (s, 2H), 5.21 (s, 2H), 8.07 (s, 1H). ^{13}C RMN: 52.1, 53.3, 67.5, 112.2, 137.8, 143.8, 162.2. EMAR (ESI-TOF) *m/z* calculada para $C_7H_9N_2O_4S$ [M+H]⁺ 217.02775, encontrada 217.02736.

2,2-Dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*]tiazole-6-carboxilato de metilo (4.34)

Obtido a partir do 1*H*,3*H*-Pirazolo[1,5-*c*]tiazole-6-carboxilato de metilo **4.32** como descrito no procedimento geral (tempo de reação: 4 h). O produto foi obtido como um sólido branco e foi recristalizado com éter etílico (71%). pf 200.9-201.7 °C (a partir do éter etílico). IV (KBr) 1144, 1198, 1248, 1350, 1450, 1481 e 1726 cm^{-1} . 1H RMN: 3.95 (s, 3H), 4.51 (s, 2H), 5.25 (s, 2H), 6.86 (s, 1H). ^{13}C RMN: 52.4, 52.6, 67.4, 106.3, 135.2, 146.8, 161.8. EMAR (ESI-TOF) *m/z* calculado para $C_7H_9N_2O_4S$ [M+H]⁺ 217.02775, encontrada 217.02767.

2,2-Dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*]tiazole-6,7-diacetato de metileno (4.39)

Obtido a partir do 1*H*,3*H*-Pirazolo[1,5-*c*]tiazole-6,7-diacetato de metileno **4.37** como descrito no procedimento geral (tempo de reação: 24 h). O produto foi obtido como um sólido branco e foi recristalizado com éter etílico (58%). 1H RMN: 2.02 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 4.54 (s, 2H), 4.99 (s, 2H), 5.16 (s, 2H), 5.17 (s, 2H). ^{13}C RMN: 20.81, 20.83, 52.38, 55.34, 57.96, 67.48, 112.83, 135.33, 150.14, 170.47, 170.88.

2,2-Dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*]tiazole-6,7-dimetanol (4.40)

A uma solução de 2,2-Dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*]tiazole-6,7-diacetato de metileno **4.39** (0.71 mmol) em metanol (15 mL) adicionou-se uma solução aquosa de hidróxido de sódio (2% *m/v*, 3.6 eq., 5.09 mL). Agitou-se a mistura reacional à temperatura ambiente durante 12 h. Adicionou-se água (100 mL) à mistura resultante e extraiu-se com acetato de etilo (3 x 30 mL). Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro e evaporou-se o solvente.

O produto foi obtido sob a forma de um sólido branco (31%). 1H RMN (DMSO-*d*₆): 4.50 (d, 4H, *J* = 5.6 Hz), 4.72 (s, 2H), 4.98 (t, 1H, *J* = 5.4 Hz), 5.10 (t, 1H, *J* = 5.6 Hz), 5.45 (s, 2H). ^{13}C RMN (DMSO-*d*₆): 51.39, 53.35, 55.95, 66.11, 116.73, 133.50, 152.38.

7.3.6 Síntese de substratos esteroides referente ao capítulo 4:

16-Desidropregnenolona (4.51)

Este composto foi preparado por adaptação de um procedimento da literatura.[81] A uma solução do acetato de 16-desidropregnenolona 3.4 (5.61 mmol) em metanol (300 mL) adicionou-se uma solução aquosa de hidróxido de sódio (2% m/v, 2 eq., 20 mL). Agitou-se a mistura reacional à temperatura ambiente durante 30 h. Evaporou-se o metanol, adicionou-se água (100 mL) à mistura resultante e extraiu-se com acetato de etilo (3 x 60 mL). Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro e evaporou-se o solvente. O produto foi obtido sob a forma de um sólido branco (99%). 1H RMN: 0.92 (s, 3H), 0.97-1.02 (m, 1H), 1.05 (s, 3H), 1.29-1.65 (m, 11H), 1.85 (dd, 2H, $J = 13.5$ e 3.1 Hz), 1.98-2.01 (m, 1H), 2.03-2.06 (m, 1H), 2.26 (s, 3H), 2.29 (dd, 1H, $J = 6.4$ e 3.6 Hz), 2.33 (dd, 1H, $J = 3.3$ e 1.9 Hz), 2.41 (dt, 1H, $J = 12.7$ e 3.7), 5.36 (br d, 1H, $J = 5.2$ Hz), 6.71 (dd, 1H, $J = 3.3$ e 1.9 Hz).

16-Desidroprogesterona (4.62)

Este composto foi preparado por adaptação de um procedimento da literatura.[53] Adicionou-se *N*-metilpiperidona (29 mmol, 3.38 mL) a uma solução de 16-desidropregnenolona (0.31 mmol, 0.097 g) em tolueno seco (10 mL). Aqueceu-se a mistura sob refluxo com uma armadilha de Dean-Stark até serem recolhidos 1-2 mL de tolueno. Adicionou-se isopropóxido de alumínio (0.56 mmol, 0.112 g) e refluxou-se a mistura durante 4 h. Adicionou-se novamente isopropóxido de alumínio (0.32 mmol, 44.7 mg) e refluxou-se durante 2 h. Arrefeceu-se a mistura até à temperatura ambiente e diluiu-se com éter etílico (20 mL). Lavou-se a mistura reacional com H_2O (2 x 20 mL) e uma solução aquosa de *NaCl* (30 mL). Secou-se com sulfato de sódio anidro e evaporou-se o solvente. O crude foi separado por coluna cromatográfica [acetato de etilo/ hexano (1:1)] obtendo-se o produto sob a forma de um sólido branco (72%). 1H RMN: 0.94 (s, 3H), 0.98-1.06 (m, 1H), 1.12 (dd, 1H, $J = 13.4$ e 3.8 Hz), 1.21 (s, 3H), 1.26-1.50 (m, 4H), 1.65-1.80 (m, 2H), 1.87 (br d, 1H, $J = 12.8$ Hz), 1.98-2.12 (m, 2H), 2.26 (s, 3H), 2.30-2.50 (m, 6H), 5.73 (s, 1H), 6.70 (dd, 1H, $J = 3.3$ e 1.9 Hz).

7.3.7 Síntese de novos derivados esteroides via reações de cicloadição [$8\pi+2\pi$] de aniões metil 1,2- diazafulvénio:**Procedimento geral:**

Método A: Uma suspensão do esteroide indicado em cada caso (0.28 mmol) e da sulfona apropriada (2-3 eq.) em 1,2,4-triclorobenzeno foi irradiada num reactor microondas a 250 °C, durante 10 minutos.

Após arrefecimento até à temperatura ambiente, a mistura reacional foi purificada por cromatografia em coluna eluindo com hexano (para remover o 1,2,4-triclorobenzeno) seguido de acetato etilo/hexano nas proporções indicadas para cada caso.

Método B: Uma suspensão do esteroide indicado em cada caso (0.28 mmol) e da sulfona apropriada (2-3 eq.) em 1,2,4-triclorobenzeno foi aquecida em refluxo sob atmosfera inerte, durante o tempo indicado em cada caso. Após arrefecimento até à temperatura ambiente, a mistura reacional foi purificada por cromatografia em coluna eluindo com hexano (para remover o 1,2,4-triclorobenzeno) seguido de acetato etilo/hexano nas proporções indicadas para cada caso.

2-fenil-4,5,6,7-tetrahidropirazolo[1,5-*a*] piridina-3-carboxilato de etilo fundido ao acetato de 16-desidropregnenolona (4.25)

Obtido a partir da reação do 6-fenil-2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*][1,3]tiazole-7-carboxilato de etilo **4.41** com o 16-DPA. A purificação do crude foi feita por cromatografia em coluna [hexano, acetato de etilo/ hexano (1:4)], originando o composto **4.25** como um sólido branco. (Método A: 70%; Método B: 36%): pf 110.1-111.9 °C (a partir de acetato de etilo/hexano). IV (KBr) 1032, 1130, 1248, 1452, 1701, 1716 e 1729 cm^{-1} . 1H RMN: 0.78 (s, 3H), 0.92-0.98 (m, 1H), 1.02 (s, 3H), 1.12-1.15 (m, 1H), 1.21 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz), 1.26-1.54 (m, 6H), 1.62-1.79 (m, 2H), 1.86-1.94 (m, 5H), 2.03 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 2.29-2.32 (m, 2H), 3.38 (d, 1H, $J = 16.4$ Hz), 3.44 (d, 1H, $J = 16.8$ Hz), 3.70-3.72 (m, 1H), 3.84 (dd, 1H, $J = 13.2$ e 6.4 Hz), 4.22 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz), 4.30 (dd, 1H, $J = 13.2$ e 6.4 Hz), 4.58-4.62 (m, 1H), 5.34 (d, 1H, $J = 3.2$ Hz), 7.35-7.37 (m, 3H), 7.59 (br d, 2H, $J = 6.8$ Hz). ^{13}C RMN: 14.1, 16.6, 19.3, 20.7, 21.4, 25.3, 27.7, 27.8, 31.2, 31.8, 31.9, 33.0, 36.3, 36.5, 36.9, 38.0, 46.2, 49.4, 51.0, 52.3, 59.9, 66.3, 73.7, 107.5, 122.0, 127.6, 128.1, 129.5, 133.1, 139.7, 143.7, 152.6, 163.9, 170.5, 208.2. EMAR (ESI-TOF) m/z calculado para $C_{37}H_{47}N_2O_5$ [M+H]⁺ 599.34795, encontrado 599.34715.

4,5,6,7-tetrahidropirazolo[1,5-*a*] piridina-3-carboxilato de metilo fundido ao acetato de 16-desidropregnenolona (4.45)

Obtido a partir da reação do 2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*]tiazole-7-carboxilato de metilo **4.33** com o 16-DPA. A purificação do crude foi feita por cromatografia em coluna [hexano, acetato de etilo/ hexano (1:2)], originando o composto **4.45** como um sólido branco. (Método A: 69%; Método B: 54%): pf 219.5-220.3 °C (a partir de acetato de etilo/ hexano). IV (KBr) 1032, 1201, 1248, 1383, 1493, 1697, 1712 e 1728 cm^{-1} . 1H RMN: 0.74 (s, 3H), 0.84-0.94 (m, 1H), 0.99 (s, 3H), 1.09-1.64 (m, 7H), 1.68-1.95 (m, 7H), 2.01 (s, 3H), 2.18 (s, 3H), 2.27-2.34 (m, 2H), 3.33 (s, 2H), 3.63-3.68 (m, 1H), 3.75-3.78 (m, 1H), 3.81 (s, 3H), 4.26 (dd, 1H, J

= 13.2 e 6.4 Hz), 4.54-4.61 (m, 1H), 5.31 (br d, 1H, $J = 3.6$ Hz), 7.74 (s, 1H). ^{13}C RMN: 16.6, 19.3, 20.7, 21.4, 24.7, 27.6, 27.7, 31.2, 31.8, 31.8, 33.0, 36.4, 36.5, 36.9, 38.0, 46.1, 49.3, 51.0, 51.1, 52.3, 66.6, 73.7, 109.8, 121.9, 139.7, 140.2, 142.2, 164.0, 170.5, 208.1. EMAR (ESI-TOF) m/z calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 509.30100, encontrada 509.30069.

4,5,6,7-tetrahidropirazolo[1,5-*a*] piridina-2-carboxilato de metilo fundido ao acetato de 16-desidropregnenolona (4.47a-b)

Obtido a partir da reação do 2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*]tiazole-6-carboxilato de metilo **4.34** com o 16-DPA. A purificação do crude foi feita por cromatografia em coluna [hexano, acetato de etilo/ hexano (1:2)], originando os compostos **4.47a-b** como uma mistura de regioisômeros [Método A: 49% (85:15); Método B 37% (85:15)]:

Componente maioritário (**4.47a**): IV (KBr) 1032, 1115, 1268, 1358, 1439, 1570 e 1697 cm^{-1} . ^1H RMN: 0.73 (s, 3H), 0.86-0.96 (m, 1H), 0.99 (s, 3H), 1.09-1.73 (m, 11H), 1.84-1.95 (m, 3H), 2.01 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.24-2.34 (m, 2H), 2.92 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz), 3.07 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz), 3.62-3.68 (m, 1H), 3.82-3.84 (m, 1H), 3.88 (s, 3H), 4.33 (dd, 1H, $J = 13.2$ e 6.4 Hz), 4.50-4.61 (m, 1H), 5.31 (d, 1H, $J = 4.0$ Hz), 6.56 (s, 1H). ^{13}C RMN: 16.6, 19.2, 20.6, 21.4, 25.5, 27.6, 27.9, 31.2, 31.78, 31.81, 33.0, 36.5, 36.7, 36.9, 37.9, 46.2, 49.3, 51.4, 51.9, 52.2, 66.7 73.7, 105.4, 121.9, 139.0, 139.6, 142.1, 162.9, 170.5, 208.0. EMAR (ESI-TOF) m/z calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 509.30100, encontrada 509.30026.

Componente minoritário (**4.47b**): ^1H RMN: 0.72 (s, 3H), 0.86-0.96 (m, 1H), 1.00 (s, 3H), 1.09-1.73 (m, 11H), 1.84-1.95 (m, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.17 (s, 3H), 2.24-2.34 (m, 2H), 2.36-2.40 (m, 1H), 3.12-3.16 (m, 1H), 3.43-3.50 (m, 1H), 3.87 (s, 3H), 4.23 (d, 1H, $J = 14.0$ Hz), 4.66 (d, 1H, $J = 14.0$ Hz), 5.34 (d, 1H, $J = 4.4$ Hz), 6.49 (s, 1H). ^{13}C RMN: 16.5, 19.2, 20.5, 21.4, 28.2, 28.3, 31.7, 31.8, 32.7, 33.8, 34.4, 36.6, 38.0, 45.7, 49.7, 51.8, 52.2, 69.3, 121.9, 139.7, 140.5, 142.4, 162.9, 207.4.

4,5,6,7-tetrahidropirazolo[1,5-*a*]piridina-2,3-dicarboxilato dimetilo fundido à 16-desidropregnenolona (4.53)

Obtido a partir da reação da sulfona **4.8** com a 16-DHP. A purificação do crude foi feita por cromatografia em coluna [hexano, acetato de etilo/ hexano (1:1) e (2:1)] originando o composto **4.53** como um sólido branco (Método B: 48%). pf 204.2-205.1 °C, IV (KBr) 1085, 1218, 1456, 1493, 1699, 1736, 2942 e 3379 cm^{-1} . ^1H RMN: 0.76 (s, 3H), 0.88-0.95 (m, 1H), 1.00 (s, 3H), 1.11-1.57 (m, 9H), 1.61 (s, 2H), 1.63-1.97 (m, 5H), 2.21 (s, 3H), 2.21-2.32 (m, 1H), 3.27 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz), 3.34 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz), 3.52 (s, 1H), 3.68-3.72 (m, 1H), 3.83 (dd, 1H, $J = 13.2$ e 5.6 Hz), 3.87 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 4.29 (dd, 1H, $J = 13.4$ e 6.3 Hz), 5.30 (m, 1H). ^{13}C RMN: 16.56, 19.35, 20.76, 24.70, 27.67, 31.11, 31.51, 31.79, 31.85, 33.01, 36.15, 36.42, 37.14, 42.12, 46.23, 49.36, 51.47, 51.78,

52.45, 52.48, 66.26, 71.54, 110.43, 120.97, 140.72, 142.38, 143.50, 162.29, 163.15, 207.62. EMAR (ESI) m/z calculado para $C_{30}H_{41}N_2O_6[M+H]^+$ 525.29557, encontrada 525.29591.

2-fenil-4,5,6,7-tetrahidropirazolo[1,5-*a*] piridina-3-carboxilato de etilo fundido à 16-desidropregnenolona (4.54)

Obtido a partir da reação da sulfona 4.41 com a 16-DHP. A purificação do crude foi feita por cromatografia em coluna [hexano, acetato de etilo/ hexano (1:2)] originando o composto 4.54 como um sólido amarelo (Método B: 20%). pf 132.5-133.3 °C, IV (KBr) 1132, 1174, 1296, 1385, 1452, 1701, 2937 e 3419 cm^{-1} . 1H RMN: 0.67 (s, 3H), 0.80-0.91 (m, 1H), 0.94 (s, 3H), 1.18 (t, 1H, $J = 7.1$ Hz), 1.26-1.54 (m, 6H), 1.62-1.79 (m, 5H), 1.86-1.94 (m, 5H), 2.16 (s, 3H), 3.21-3.31 (m, 3H), 3.36 (d, 1H, $J = 18.2$ Hz), 3.48 (d, 1H, $J = 15.7$ Hz), 3.52-3.59 (m, 1H), 3.80 (dd, 1H, $J = 13.2$ e 7.7 Hz), 4.22 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz), 4.29 (dd, 1H, $J = 13.2$ e 6.7 Hz), 4.61 (br s, 1H), 5.24 (d, 1H, $J = 4.2$ Hz), 7.35-7.37 (m, 3H), 7.57 (dd, 2H, $J = 7.7$ e 1.6 Hz). ^{13}C RMN: 14.12, 16.61, 19.36, 20.80, 25.29, 27.83, 27.92, 28.37, 31.23, 31.50, 31.87, 33.01, 36.31, 36.45, 37.15, 42.11, 46.26, 49.44, 50.99, 52.37, 59.92, 66.30, 71.56, 107.43, 121.05, 127.62, 128.16, 129.51, 129.58, 133.10, 140.74, 143.70, 152.62, 163.83, 208.20.

4,5,6,7-tetrahidropirazolo[1,5-*a*] piridina-3-carboxilato de metilo fundido à 16-desidropregnenolona (4.55)

Obtido a partir da reação da sulfona 4.33 com a 16-DHP. A purificação do crude foi feita por cromatografia em coluna [hexano, acetato de etilo/ hexano (1:1) e (2:1)] originando o composto 4.55 como um sólido branco (Método B: 43%). pf 231.9-232.6 °C, IV (KBr) 1053, 1068, 1186, 1207, 1238, 1562, 1695, 1722, 2942 e 3512 cm^{-1} . 1H RMN: 0.75 (s, 3H), 0.84-0.92 (m, 1H), 0.99 (s, 3H), 1.09-1.64 (m, 9H), 1.68-1.96 (m, 6H), 2.19 (s, 3H), 2.27-2.34 (m, 2H), 3.29 (d, 1H, $J = 16.1$ Hz), 3.38 (d, 1H, $J = 16.1$ Hz), 3.46-3.53 (m, 1H), 3.63-3.72 (m, 1H), 3.79 (dd, 1H, $J = 8.0$ e 5.5 Hz), 3.82 (s, 3H), 4.25 (dd, 1H, $J = 13.3$ e 6.3 Hz), 5.29 (br d, 1H, $J = 1.6$ Hz), 7.75 (s, 1H). ^{13}C RMN: 16.58, 19.35, 20.78, 24.64, 27.72, 31.21, 31.53, 31.80, 31.85, 33.07, 36.42, 36.44, 37.16, 42.13, 46.14, 49.40, 51.11, 52.42, 66.50, 71.57, 109.80, 121.00, 140.23, 140.80, 142.28, 164.05, 209.09. EMAR (ESI) m/z calculado para $C_{28}H_{39}N_2O_4 [M+H]^+$ 467.28974, encontrada 467.29043.

4,5,6,7-tetrahidropirazolo[1,5-*a*] piridina-2-carboxilato de metilo fundido à 16-desidropregnenolona (4.56a-b)

Obtido a partir da reação do 2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*]tiazole-6-carboxilato de metilo 4.34 com a 16-DHP. A purificação do crude foi feita por cromatografia em coluna [hexano, acetato de etilo/ hexa-

no (1:1)], originando os compostos **4.56a-b** como uma mistura de regioisômeros [Método B: 24% (88:12)]:

Componente maioritário (**4.56a**): IV (KBr) 1225, 1456, 1701, 1722, 2937 e 3421 cm^{-1} . 1H RMN: 0.75 (s, 3H), 0.86-0.96 (m, 1H), 0.99 (s, 3H), 1.09-1.73 (m, 12H), 1.84-1.95 (m, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.18-2.34 (m, 2H), 2.90 (d, 1H, $J = 15.7$ Hz), 3.12 (d, 1H, $J = 15.7$ Hz), 3.47-3.56 (m, 1H), 3.62-3.68 (m, 1H), 3.85-3.88 (m, 1H), 3.90 (s, 3H), 4.32 (dd, 1H, $J = 13.4$ e 6.2 Hz), 5.30 (d, 1H, $J = 4.0$ Hz), 6.58 (s, 1H). ^{13}C RMN: 13.18, 15.65, 18.33, 19.70, 24.46, 26.85, 30.23, 30.45, 30.81, 32.05, 35.05, 35.72, 36.13, 45.24, 48.36, 50.45, 50.93, 51.36, 59.41, 65.58, 70.56, 104.36, 120.02, 138.15, 139.65, 141.01, 161.98, 207.05.

Componente minoritário (**4.56b**): 1H RMN: 0.73 (s, 3H), 0.86-0.96 (m, 1H), 1.02 (s, 3H), 1.09-1.73 (m, 12H), 1.84-1.95 (m, 3H), 2.18 (s, 3H), 2.18-2.34 (m, 2H), 2.40-2.49 (m, 1H), 3.12-3.16 (m, 1H), 3.43-3.50 (m, 1H), 3.73-3.78 (m, 1H), 3.87 (s, 3H), 4.25 (d, 1H, $J = 14.3$ Hz), 4.65 (d, 1H, $J = 14.3$ Hz), 5.23 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz), 6.52 (s, 1H). ^{13}C RMN: 13.18, 15.65, 18.33, 19.70, 24.46, 26.85, 31.23, 31.45, 31.81, 32.05, 35.05, 35.72, 36.13, 45.24, 48.36, 50.45, 50.93, 51.36, 59.41, 65.58, 70.56, 104.36, 120.02, 138.15, 139.65, 141.01, 161.98, 207.05.

1-Estiril-1H-pirazole-3,4-dicarboxilato de dimetilo (4.59) e (S)-7-Benzil-4,5,6,7-tetrahidropirazolo[1,5-a]piridina-2,3-dicarboxilato dimetilo fundido à 16-desidropregnenolona (4.58)

Obtido a partir da reação da sulfona **4.42** com a 16-DHP. A purificação do crude foi feita por cromatografia em coluna [hexano, acetato de etilo/ hexano (1:2) e (2:1)], originando, por ordem de eluição, o composto **4.59** como um sólido branco (Método B: 21%) e o esteroide **4.58** como um sólido branco (Método B: 24%).

Composto **4.59**: pf 126.0-127.9 °C, IV (KBr) 1217, 1392, 1556, 1718 e 1739 cm^{-1} . 1H RMN: 2.63 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.97 (s, 3H), 7.27-7.47 (m, 7H). ^{13}C RMN: 10.6, 51.9, 52.7, 112.9, 121.2, 123.1, 126.7, 128.5, 128.9, 134.2, 143.0, 144.5, 162.8, 163.1.

Composto **4.58**: pf 96.2-96.9 °C, IV (KBr) 1047, 1178, 1215, 1309, 1454, 1705, 1738, 2935 e 3462 cm^{-1} . 1H RMN: 0.65 (s, 3H), 0.70-0.87 (m, 1H), 0.95 (s, 3H), 1.08-1.36 (m, 7H), 1.43-1.55 (m, 2H), 1.80-1.90 (m, 6H), 2.14 (s, 3H), 2.18-2.30 (m, 2H), 2.37 (d, 1H, $J = 17.0$ Hz), 3.04 (dd, 1H, $J = 14.2$ e 10.3 Hz), 3.35 (br d, 1H, $J = 9.6$ Hz), 3.45-3.55 (m, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 4.01 (br d, 1H, $J = 4.0$ Hz), 4.12 (d, 1H, $J = 16.8$ Hz), 4.22 (br d, 1H, $J = 10.2$ Hz), 5.25 (br s, 1H), 7.28 (br d, 3H, $J = 7.2$ Hz), 7.32-7.40 (m, 2H). ^{13}C RMN: 16.66, 19.33, 20.75, 23.35, 25.23, 27.45, 31.45, 31.66, 32.05, 32.76, 35.41, 36.32, 37.06, 40.69, 42.06, 46.62, 49.20, 51.81, 52.56, 60.72, 65.48, 71.57, 109.96, 121.14, 126.91, 128.20, 128.71, 129.09, 129.78, 133.47, 136.85, 140.53, 142.58, 144.31, 162.95, 163.35, 207.66. EMAR (ESI) m/z calculado para $C_{37}H_{47}N_2O_6$ [M+ +H]

615.34269, encontrada 615.34286.

4,5,6,7-tetrahidropirazolo[1,5-*a*]piridina-2,3-dicarboxilato dimetilo fundido à 16-desidroprogesterona (4.63)

Obtido a partir da reação da sulfona 4.8 com a 16-desidroprogesterona. A purificação do crude foi feita por cromatografia em coluna [hexano, acetato de etilo/ hexano (1:1) e (2:1)] originando o composto 4.63 como um sólido branco (Método A: 38%): pf 229.7-230.3 °C IV (KBr) 1088, 1180, 1217, 1493, 1672, 1697 e 1738 cm^{-1} . 1H RMN: 0.79 (s, 3H), 0.86-0.94 (m, 2H), 1.17 (s, 3H), 1.31-1.37 (m, 1H), 1.45-1.82 (m, 9H), 1.93-2.06 (m, 2H), 2.20 (s, 3H), 2.33-2.42 (m, 3H), 3.26 (d, 1H, $J = 16.2$ Hz), 3.33 (d, 1H, $J = 16.2$ Hz), 3.70 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz), 3.86 (d, 1H, $J = 6.3$ Hz), 3.85 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 4.30 (dd, 1H, $J = 13.4$ e 6.3 Hz), 5.72 (s, 1H). ^{13}C RMN: 16.56, 19.35, 20.76, 24.70, 27.67, 31.11, 31.51, 31.79, 31.85, 33.01, 36.15, 36.42, 37.14, 42.12, 46.23, 49.36, 51.47, 51.78, 52.45, 52.48, 66.26, 71.54, 110.43, 120.97, 140.72, 142.38, 143.50, 162.29, 163.15, 207.62. EMAR (ESI) m/z calculado para $C_{30}H_{39}N_2O_6$ [M+ +H] 523.28000, encontrada 523.28026.

1-Estiril-1*H*-pirazole-3,4-dicarboxilato de dimetilo (4.59) e (S)-7-Benzil-4,5,6,7-tetrahidropirazolo[1,5-*a*]piridina-2,3-dicarboxilato dimetilo fundido à 16-desidroprogesterona (4.64)

Obtido a partir da reação da sulfona 4.42 com a 16-desidroprogesterona. A purificação do crude foi feita por cromatografia em coluna [hexano, acetato de etilo/ hexano (1:2) e (2:1)], originando, por ordem de eluição, o composto 4.59 como um sólido branco (Método A: 51%) e o esteroide 4.64 como um sólido branco (Método A: 18%).

Composto 4.59: pf 126.0-127.9 °C, IV (KBr) 1217, 1392, 1556, 1718 e 1739 cm^{-1} . 1H RMN: 2.63 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.97 (s, 3H), 7.27-7.47 (m, 7H). ^{13}C RMN: 10.6, 51.9, 52.7, 112.9, 121.2, 123.1, 126.7, 128.5, 128.9, 134.2, 143.0, 144.5, 162.8, 163.1.

Composto 4.64: pf 118.3-119.6 °C, IV (KBr) 1176, 1215, 1452, 1668, 1707 e 1741 cm^{-1} . 1H RMN: 0.68 (s, 3H), 0.70-0.80 (m, 2H), 1.13 (s, 3H), 1.19-1.49 (m, 5H), 1.61-1.76 (m, 3H), 1.82-1.91 (m, 2H), 1.95-2.02 (m, 1H), 2.13 (s, 3H), 2.18-2.30 (m, 2H), 2.33-2.42 (m, 3H), 3.01 (dd, 1H, $J = 14.0$ e 10.4 Hz), 3.34 (br d, 1H, $J = 9.6$ Hz), 3.87 (s, 3H), 3.95 (s, 3H), 4.01 (br d, 1H, $J = 4.0$ Hz), 4.12 (d, 1H, $J = 17.2$ Hz), 4.24 (br d, 1H, $J = 10.4$ Hz), 5.67 (s, 1H), 7.29 (br d, 3H, $J = 7.5$ Hz), 7.34-7.40 (m, 2H). ^{13}C RMN: 16.77, 17.29, 20.68, 23.20, 25.08, 27.41, 31.50, 32.44, 32.62, 33.84, 35.41, 35.56, 35.62, 38.35, 40.59, 46.59, 51.55, 51.72, 51.86, 52.50, 52.60, 52.70, 60.56, 65.21, 110.01, 124.18, 126.96, 128.74, 129.06, 136.75, 142.62, 144.13, 162.94, 163.39, 170.17, 199.28, 207.41.

2-fenil-4,5,6,7-tetrahidropirazolo[1,5-*a*] piridina-3-carboxilato de etilo fundido à 16-desidroprogesterona (4.65)

Obtido a partir da reação da sulfona **4.41** com a 16-desidroprogesterona. A purificação do crude foi feita por cromatografia em coluna [hexano, acetato de etilo/ hexano (1:2)] originando o composto **4.65** como um sólido amarelo (Método A: 65%): pf 133.4-134.7 °C IV (KBr) 1053, 1128, 1176, 1294, 1450, 1672 e 1701 cm^{-1} . 1H RMN: 0.80 (s, 3H), 0.85-0.98 (m, 2H), 1.18 (s, 3H), 1.21 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz), 1.35-1.42 (m, 1H), 1.46-1.59 (m, 2H), 1.60-1.78 (m, 5H), 1.83-2.08 (m, 4H), 2.23 (s, 3H), 2.31-2.46 (m, 3H), 3.37 (d, 1H, $J = 16.4$ Hz), 3.45 (d, 1H, $J = 16.8$ Hz), 3.68-3.73 (m, 1H), 3.85 (dd, 1H, $J = 13.4$ e 6.4 Hz), 4.22 (q, 2H, $J = 7.6$ Hz), 4.28 (dd, 1H, $J = 11.2$ e 5.6 Hz), 5.72 (s, 1H), 7.35-7.37 (m, 3H), 7.59 (br d, 2H, $J = 6.5$ Hz). ^{13}C RMN: 14.09, 16.73, 17.36, 20.75, 25.15, 27.79, 31.05, 31.82, 32.54, 32.91, 33.89, 35.49, 35.67, 36.26, 38.46, 46.26, 50.88, 51.48, 53.06, 59.95, 65.85, 66.03, 107.48, 124.16, 127.61, 128.18, 129.43, 129.47, 133.06, 143.55, 152.61, 163.84, 170.12, 199.23, 207.94.

4,5,6,7-tetrahidropirazolo[1,5-*a*] piridina-3-carboxilato de metilo fundido à 16-desidroprogesterona (4.66)

Obtido a partir da reação da sulfona **4.33** com a 16-desidroprogesterona. A purificação do crude foi feita por cromatografia em coluna [hexano, acetato de etilo/ hexano (1:1) e (2:1)] originando o composto **4.66** como um sólido branco (Método A: 39%)_ pf 206.1-207.4 °C, IV (KBr) 1203, 1238, 1437, 1496, 1676, 1695 e 1712 cm^{-1} . 1H RMN: 0.78 (s, 3H), 0.82-0.98 (m, 2H), 1.16 (s, 3H), 1.27-1.38 (m, 1H), 1.43-1.87 (m, 9H), 1.92-2.07 (m, 2H), 2.19 (s, 3H), 2.25-2.45 (m, 4H), 3.29 (d, 1H, $J = 16.2$ Hz), 3.36 (d, 1H, $J = 16.2$ Hz), 3.62-3.72 (m, 1H), 3.81 (s, 3H), 4.27 (dd, 1H, $J = 13.2$ e 6.3 Hz), 5.68 (br s, 1H), 7.75 (s, 1H). ^{13}C RMN: 16.70, 17.34, 20.72, 24.54, 27.69, 31.03, 31.74, 32.52, 32.97, 33.87, 35.45, 35.65, 36.36, 38.44, 46.12, 50.98, 51.14, 51.51, 53.01, 66.26, 109.86, 124.14, 140.26, 142.12, 164.01, 170.10, 199.21, 207.86.

4,5,6,7-tetrahidropirazolo[1,5-*a*] piridina-2-carboxilato de metilo fundido à 16-desidroprogesterona (4.67a-b)

Obtido a partir da reação do 2,2-dioxo-1*H*,3*H*-pirazolo[1,5-*c*]tiazole-6-carboxilato de metilo **4.34** com a 16-desidroprogesterona. A purificação do crude foi feita por cromatografia em coluna [hexano, acetato de etilo/ hexano (1:1)], originando os compostos **4.67a-b** como uma mistura de regioisômeros [Método A: 48% (79:21)]:

Componente maioritário (**4.67a**): IV (KBr) 1226, 1454, 1666, 1701 e 1720 cm^{-1} . 1H RMN: 0.78 (s, 3H), 0.82-0.96 (m, 2H), 1.16 (s, 3H), 1.30-1.39 (m, 1H), 1.40-1.55 (m, 2H), 1.60-1.76 (m, 6H), 1.93 (dd, 1H, $J = 10.0$ e 3.2 Hz), 2.11 (s, 3H), 2.18-2.34 (m, 6H), 2.91 (d, 1H, $J = 15.8$ Hz),

3.08 (d, 1H, $J = 15.8$ Hz), 3.64-3.71 (m, 1H), 3.88 (s, 3H), 4.32 (dd, 1H, $J = 13.4$ e 6.3 Hz), 5.71 (s, 1H), 6.56 (s, 1H). ^{13}C RMN: 16.78, 17.32, 20.65, 25.40, 27.86, 31.07, 31.77, 32.51, 32.95, 33.85, 35.45, 35.62, 36.69, 38.44, 46.24, 51.34, 51.45, 51.96, 52.94, 66.34, 105.41, 124.13, 138.92, 142.15, 162.89, 170.14, 199.24, 207.80.

Componente minoritário (**4.67b**): ^1H RMN: 0.77 (s, 3H), 0.82-0.96 (m, 2H), 1.18 (s, 3H), 1.30-1.39 (m, 1H), 1.40-1.55 (m, 2H), 1.60-1.76 (m, 6H), 1.93 (dd, 1H, $J = 10.0$ e 3.2 Hz), 2.11 (s, 3H), 2.18-2.34 (m, 6H), 3.15 (dd, 1H, $J = 14.5$ e 6.8 Hz), 3.49 (dd, 1H, $J = 17.2$ e 7.6 Hz), 3.87 (s, 3H), 4.23 (d, 1H, $J = 13.8$ Hz), 4.64 (d, 1H, $J = 13.8$ Hz), 5.72 (s, 1H), 6.51 (s, 1H). ^{13}C RMN: 16.78, 17.32, 20.65, 25.40, 28.20, 31.07, 31.77, 32.51, 32.95, 33.85, 35.45, 35.62, 36.69, 38.44, 45.78, 51.34, 51.45, 51.96, 60.40, 66.34, 105.41, 124.13, 138.92, 142.15, 162.89, 170.14, 199.24, 207.80.

7.3.8 Hidrólise de novos derivados esteróides hexacíclicos:

Ácido 2-fenil-4,5,6,7-tetrahidropirazolo[1,5-*a*] piridina-3-carboxílico fundido à 16-desidropregnenolona (**4.50**)

Preparou-se uma solução do esteroide hexacíclico **4.25** (0.176 mmol) em etanol (5 mL). Adicionou-se lentamente uma solução saturada de hidróxido de potássio, deixou-se agitar a mistura reacional durante 4 h e controlou-se por TLC. Acidificou-se a mistura resultante com uma solução de ácido clorídrico (1 M) e extraiu-se com acetato de etilo. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro e evaporou-se o solvente. A mistura foi lavada com éter etílico e o produto obtido foi purificado por coluna cromatográfica [acetato de etilo/ hexano (5:1)]. O produto foi obtido como um sólido branco (39%). $\text{pf} > 250$, alteração da cor a 236 °C. IV (KBr) 696, 767, 1059, 1117, 1454, 1504, 1699, 1730, 2931 e 3442 cm^{-1} . ^1H RMN (DMSO- d_6): 0.67 (s, 3H), 0.80-0.91 (m, 1H), 0.94 (s, 3H), 1.18 (t, 1H, $J = 7.1$ Hz), 1.26-1.54 (m, 6H), 1.62-1.79 (m, 5H), 1.86-1.94 (m, 2H), 2.16 (s, 3H), 3.21-3.31 (m, 3H), 3.36 (d, 1H, $J = 18.2$ Hz), 3.48 (d, 1H, $J = 15.7$ Hz), 3.52-3.59 (m, 1H), 3.80 (dd, 1H, $J = 13.2$ e 7.7 Hz), 4.29 (dd, 1H, $J = 13.2$ e 6.7 Hz), 4.61 (br s, 1H), 5.24 (d, 1H, $J = 4.2$ Hz), 7.35-7.37 (m, 3H), 7.57 (dd, 2H, $J = 7.7$ e 1.6 Hz), 12.36 (s, 1H). ^{13}C RMN (DMSO- d_6): 19.31, 21.35, 24.31, 25.61, 25.98, 30.30, 32.93, 36.09, 36.52, 36.56, 41.25, 42.13, 47.36, 50.70, 54.28, 55.61, 56.39, 64.97, 70.13, 71.76, 74.33, 75.15, 112.49, 125.28, 132.75, 132.96, 134.30, 138.48, 146.53, 149.17, 156.20, 169.66, 213.41. EMAR (ESI) m/z calculado para $\text{C}_{33}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_4$ [$\text{M}^+ + \text{H}$] 529.30565, encontrada 529.30608.

7.3.9 *Redução de novos derivados esteróides hexacíclicos:***Esteróide resultante da redução do composto 4.55 (4.61)**

Preparou-se uma solução de $LiAlH_4$ (0.86 mmol, 5 eq., 0.033 g) em éter etílico (6 mL) e colocou-se a 0 °C. Adicionou-se lentamente uma solução do esteróide hexacíclico **4.55** (0.17 mmol) em diclorometano seco (10 mL). Após o término da adição, colocou-se a mistura reacional a refluxo (40 °C) durante 1.5 h. A reação foi arrefecida até à temperatura ambiente e adicionou-se, gota a gota, utilizando um funil de adição, acetato de etilo até a reação deixar de borbulhar, seguido de H_2O (1 mL), $NaOH$ (15%, 1 mL) e H_2O (3 mL). A mistura ficou em agitação durante 30 minutos. Filtrou-se a mistura sobre celite e lavou-se com acetato de etilo quente, seguido de diclorometano frio. Secou-se com sulfato de sódio anidro e evaporou-se o solvente. O produto foi obtido como um sólido branco (80%). pf 167.8-168.4 °C, IV (KBr) 1003, 1055, 1423, 1460, 2937 e 3365 cm^{-1} . 1H RMN (DMSO-d₆): 0.75 (s, 3H), 0.84-0.92 (m, 1H), 0.99 (s, 3H), 1.09-1.64 (m, 9H), 1.68-1.96 (m, 6H), 2.19 (s, 3H), 2.27-2.34 (m, 2H), 3.29 (d, 1H, $J = 16.1$ Hz), 3.38 (d, 1H, $J = 16.1$ Hz), 3.46-3.53 (m, 1H), 3.63-3.72 (m, 1H), 3.79 (dd, 1H, $J = 8.0$ e 5.5 Hz), 3.82 (s, 3H), 4.25 (dd, 1H, $J = 13.3$ e 6.3 Hz), 5.29 (br d, 1H, $J = 1.6$ Hz), 7.75 (s, 1H). ^{13}C RMN (DMSO-d₆): 15.38, 19.07, 20.33, 20.43, 31.35, 31.52, 31.61, 33.21, 33.57, 35.97, 36.84, 38.55, 42.13, 48.01, 49.17, 50.51, 50.99, 52.85, 53.62, 63.75, 68.15, 69.92, 70.18, 70.41, 120.20, 137.16, 141.21. EMAR (ESI) m/z calculado para $C_{27}H_{41}N_2O_3$ [M+ +H] 441.31075, encontrada 441.31117.

7.3.10 *Sínteses referentes ao capítulo 5:***Formato de 20-oxo-pregna-5,16-dien-3 β -il (5.14)**

Este composto foi preparado por adaptação de um procedimento da literatura.[85] Preparou-se uma solução de ácido fórmico (50 mL) e 16-desidropregnenolona **4.51** e agitou-se em refluxo durante 30 minutos. Deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente, lavou-se com H_2O , e extraiu-se com éter etílico (2 x 100 mL). O produto foi obtido como um sólido branco, após cristalização com acetona e éter etílico (72%). 1H RMN: 0.61 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 1.10-1.25 (m, 3H), 1.40-1.75 (m, 5H), 1.82-2.05 (m, 4H), 2.10 (s, 3H), 2.10-2.23 (m, 3H), 2.32-2.40 (m, 2H), 2.52 (t, 1H, $J = 9$ Hz), 4.65-4.77 (m, 1H), 5.37 (m, 1H), 8.02 (s, 1H).

3-Formato, 20-acetato de Pregna-5,16,20-trieno-3 β ,20-diil (5.16)

Este composto foi preparado por adaptação de um procedimento da literatura.[85] Refluxou-se a cetona **5.15** (1.22 g, 3.56 mmol) e o ácido p-toluenosulfônico (0.15 g, 0.2 eq., 0.8 mmol) em acetato de isopropenil (50 mL) durante 20 h enquanto se removia a água com o auxílio de uma armadilha de Dean-Stark. Arrefeceu-se a mistura reacional até à temperatura ambiente e diluiu-se com éter etílico (100 mL). Lavou-se a solução com $NaHCO_3$ (solução saturada, 2 x 50 mL) e com uma solução de $NaCl$ (2 x 25 mL) e secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro. Evaporou-se o solvente e lavou-se o sólido formado após evaporação com metanol frio. Formou-se um sólido branco (34%). 1H RMN: 0.98 (s, 3H), 1.07 (s, 3H), 1.13-1.19 (m, 1H), 1.47-1.70 (m, 8H), 1.86-1.95 (m, 3H), 1.99-2.04 (m, 1H), 2.10-2.15 (m, 1H), 2.18 (s, 3H), 2.36-2.39 (m, 2H), 4.65-4.78 (m, 1H), 4.78 (s, 1H), 5.06 (s, 1H), 5.40 (m, 1H), 5.82 (m, 1H), 8.04 (s, 1H).

Formato de 21-bromo-20-oxo-pregna-5,16-dien-3 β -il (5.17)

Preparou-se uma solução do esteroide **5.16** (135 mg, 0.35 mmol) e N-bromosucinimida (0.062 g, 0.35 mmol, 1 eq.) em diclorometano (10 mL) e refluxou-se durante 30 h. 1H RMN: 0.98 (s, 3H), 1.07 (s, 3H), 1.14 (t, 1H, $J = 12$ Hz), 1.23-1.27 (m, 1H), 1.52-1.73 (m, 8H), 1.80-1.92 (m, 2H), 1.96-2.15 (m, 3H), 2.39 (d, 2H, $J = 7.9$ Hz), 2.79 (s, 2H), 4.70-4.75 (m, 1H), 5.41 (d, 1H, $J = 5.0$ Hz), 6.82 (s, 1H), 8.04 (s, 1H).

Acetato de 21-bromo-16-desidropregnenolona (5.10)

Este composto foi preparado por adaptação de um procedimento da literatura.[86] Preparou-se uma solução de acetato de 16-desidropregnenolona **3.4** (0.100 g, 0.28 mmol) e brometo de cobre (0.312 g, 1.40 mmol, 5 eq.) em tetrahidrofurano (10 mL). Refluxou-se durante 24 h e deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente. Adicionou-se água (50 mL) à mistura reacional e extraiu-se com clorofórmio (3 x 40 mL). Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro e evaporou-se o solvente. O crude foi purificado por coluna cromatográfica [acetato de etilo/ hexano (1:4)] obtendo-se um sólido amarelo (41%). 1H RMN: 0.83-0.87 (m, 4H), 0.90 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.47-1.52 (m, 3H), 1.56 (br s, 1H), 1.64 (br d, 2H, $J = 9.8$ Hz), 1.74-1.82 (m, 1H), 2.07 (s, 3H), 2.10-2.17 (m, 1H), 2.23-2.30 (m, 1H), 2.35-2.45 (m, 3H), 2.89 (d, 1H, $J = 16.8$ Hz), 4.11 (s, 2H), 4.89 (dd, 1H, $J = 12.4$ e 5.0 Hz), 5.15 (s, 1H), 6.79 (dd, 1H, $J = 3.3$ e 1.8 Hz).

3 β -acetoxi-5,16-pregnadien-20-oxima (5.19)

Este composto foi preparado por adaptação de um procedimento da literatura.[88] Preparou-se uma solução de acetato de 16-desidropregnenolona **3.4** (0.100 g, 0.28 mmol) e piridina (0.12 mL, 1.40 mmol, 5eq.) em 95% etanol e colocou-se em agitação à temperatura ambiente. Adicionou-se hidrocloreto de hidroxilamina (0.098 g, 1.40 mmol, 5 eq.), colocou-se em refluxo durante 30 minutos e controlou-se o progresso da reação por TLC [acetona/ éter de petróleo (3:7)]. Arrefeceu-se a mistura reacional em gelo durante 1 h e filtrou-se o precipitado. Lavou-se o precipitados com água quente (3 x 50 mL) e secou-se o produto num forno de vácuo. O produto foi obtido sob a forma de um sólido branco (48%). ¹H RMN (DMSO-d₆): 0.81-0.87 (m, 1H), 0.90 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 1.04-1.07 (m, 1H), 1.25-1.40 (m, 3H), 1.48-1.67 (m, 5H), 1.75-1.81 (m, 2H), 1.86 (s, 3H), 1.90-1.94 (m, 1H), 1.98 (s, 3H), 2.17 (ddd, 1H, J = 15.9, 6.4 e 3.3 Hz), 2.28 (d, 2H, J = 7.7 Hz), 2.44 (d, 1H, J = 12.3 Hz), 4.40-4.49 (m, 1H), 5.36 (d, 1H, J = 4.4 Hz), 6.03 (d, 1H, J = 1.0 Hz), 10.71 (s, 1H).

1-hidroxipirrolidin-3-ona fundida ao acetato de 16-desidropregnenolona (5.20)

Colocou-se em agitação uma solução de hidrocloreto de hidroxilamina (16 mg, 0.23 mmol, 2eq.) e carbonato de sódio (61mg, 0.58 mmol, 5eq.) em diclorometano seco e destilado (10 mL) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após esse período adicionou-se uma solução do esteroide bromado **5.10** (50 mg, 0.115 mmol) em diclorometano (5 mL) e pirrole (0.08 mL, 1.15 mmol, 10 eq.). Agitou-se a mistura reacional durante 48 horas e de seguida lavou-se com H₂O e extraiu-se com acetato de etilo. Secou-se a fase orgânica com sulfato sódio anidro e evaporou-se o solvente. A mistura reacional foi purificada por coluna cromatográfica [acetato de etilo/hexano (1:2)], obtendo-se o produto **5.20** sob a forma de um sólido esverdeado (11%). IV (KBr) 1028, 1092, 1242, 1383, 1454, 1730, 2949 e 3415 cm⁻¹, ¹H RMN: 0.77 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.46-1.69 (m, 11H), 1.76-1.82 (m, 2H), 2.08 (s, 3H), 2.12-2.34 (m, 5H), 2.59 (s, 1H), 2.80 (dd, 1H, J = 17.2 e 7.3 Hz), 2.89 (d, 1H, J = 16.7 Hz), 3.69 (d, 1H, J = 17.6 Hz), 4.34 (d, 1H, J = 17.6 Hz), 4.85 (dd, 1H, J = 12.2 e 4.8 Hz), 5.17 (s, 1H).

Parte V

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- [1] Daniel Lednicer. *Steroid Chemistry at a Glance*. 2011.
- [2] Andrew Midzak, Georges Rammouz, e Vassilios Papadopoulos. Structure-activity relationship (SAR) analysis of a family of steroids acutely controlling steroidogenesis. *Steroids*, 77(13):1327–1334, 2012.
- [3] Atul Gupta, B Sathish Kumar, e Arvind S Negi. Current status on development of steroids as anticancer agents. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 137:242–70, 2013.
- [4] Walter L. Miller e Richard J. Auchus. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr. Rev.*, 32:81–151, 2011.
- [5] E C Kendall. The development of cortisone as a therapeutic agent. *Indian Med. J.*, 45:239–241, 1951.
- [6] William Ericson-Neilsen e Alan David Kaye. Steroids: pharmacology, complications, and practice delivery issues. *Ochsner J.*, 14(2):203–7, 2014.
- [7] Michael W. Whitehouse. Anti-inflammatory glucocorticoid drugs: Reflections after 60 years. *Inflammopharmacology*, 19:1–19, 2011.
- [8] A C Cato e Erik Wade. Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of glucocorticoids. *Bioessays*, 18:371–378, 1996.
- [9] S M Paul e R H Purdy. Neuroactive steroids. *FASEB J.*, 6:2311–22, 1992.
- [10] Monique Vallée. Structure-activity relationship studies on neuroactive steroids in memory, alcohol and stress-related functions: a crucial benefit from endogenous level analysis. *Psychopharmacology (Berl.)*, 2014.
- [11] A. M. Paul, W. G. Branton, J. G. Walsh, M. J. Polyak, J. Q. Lu, G. B. Baker, e C. Power. GABA transport and neuroinflammation are coupled in multiple sclerosis: Regulation of the GABA transporter-2 by ganaxolone. *Neuroscience*, 273:24–38, 2014.
- [12] Agnieszka I. Czlonkowska, Pawel Krzcik, e Sienkiewicz-Jarosz. The effects of neurosteroids on picrotoxin, bicuculline and NMDA induced seizures, and a hypnotic effect of ethanol. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 67:345–353, 2000.

- [13] Adriana Pabón, Gustavo Escobar, Esteban Vargas, Víctor Cruz, Rafael Notario, Silvia Blair, e Fernando Echeverri. Diosgenone synthesis, anti-malarial activity and QSAR of analogues of this natural product. *Molecules*, 18:3356–3378, 2013.
- [14] Chandan Singh, Upasana Sharma, Gunjan Saxena, e Sunil K. Puri. Orally active antimalarials: Synthesis and bioevaluation of a new series of steroid-based 1,2,4-trioxanes against multi-drug resistant malaria in mice. *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 17(15):4097–4101, 2007.
- [15] Jorge A R Salvador, João F S Carvalho, Marco A C Neves, Samuel M Silvestre, Alcino J Leitão, M Manuel C Silva, e M Luisa Sá e Melo. *Anticancer steroids: linking natural and semi-synthetic compounds.*, volume 30. 2013.
- [16] Li-Xia Chen, Hao He, e Feng Qiu. Natural withanolides: an overview. *Nat. Prod. Rep.*, 28(4):705–740, 2011.
- [17] Paola Bargagna-Mohan, Adel Hamza, Yang eon Kim, Yik Khuan (Abby) Ho, Nirit Mor-Vaknin, Nicole Wendschlag, Junjun Liu, Robert M. Evans, David M. Markovitz, Chang Guo Zhan, Kyung Bo Kim, e Royce Mohan. The Tumor Inhibitor and Antiangiogenic Agent Withaferin A Targets the Intermediate Filament Protein Vimentin. *Chem. Biol.*, 14(6):623–634, 2007.
- [18] R D Budhiraja, Pawan Krishan, e S Sudhir. Biological Activity of Withanolides. *Journal of Cientific and Industrial Research*, 59(Novembro):904–911, 2000.
- [19] Fabio Leonessa, Ji Hyun Kim, Alem Ghiorghis, Robert J. Kulawiec, Charles Hammer, Abdelhossein Talebian, e Robert Clarke. C-7 analogues of progesterone as potent inhibitors of the P-glycoprotein efflux pump. *J. Med. Chem.*, 45:390–398, 2002.
- [20] Reza Beheshti Zavareh, Ken S. Lau, Rose Hurren, Alessandro Datti, David J. Ashline, Marcela Gronda, Pam Cheung, Craig D. Simpson, Wei Liu, Amanda R. Wasylshen, Paul C. Boutros, Hui Shi, Amudha Vengopal, Igor Jurisica, Linda Z. Penn, Vern N. Reinhold, Shereen Ezzat, Jeff Wrana, David R. Rose, Harry Schachter, James W. Dennis, e Aaron D. Schimmer. Inhibition of the sodium/potassium ATPase impairs N-glycan expression and function. *Cancer Res.*, 68(16):6688–6697, 2008.
- [21] Eurostat. *Health statistics - Atlas on mortality in the European Union*. 2009.
- [22] Direção-Geral da Saúde. Portugal: Doenças Oncológicas em números - 2014: Programa Nacional para as Doenças Oncológicas. 2014.

- [23] George G. Chen, Qiang Zeng, e Gary M K Tse. Estrogen and its receptors in cancer. *Med. Res. Rev.*, 28(6):954–974, 2008.
- [24] W. R. Miller. Biological rationale for endocrine therapy in breast cancer. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 18(1):1–32, 2004.
- [25] A. Segaloff. Hormones and mammary carcinogenesis. In W.L McGuire (Ed.), *Adv. Res. Treat. Breast Cancer*, vol. 2, Plenum, New York, pages 1–22. 1978.
- [26] M M Cepa, E J Tavares da Silva, G Correia-da Silva, F M Roleira, e N A Teixeira. Structure-activity relationships of new A,D-ring modified steroids as aromatase inhibitors: design, synthesis, and biological activity evaluation. *J Med Chem*, 48:6379–6385, 2005.
- [27] J. R. Pasqualini, G. Chetrite, C. Blacker, M. C. Feinstein, L. Delalonde, M Talbi, e C Maloche. Concentrations of estrone, estradiol, and estrone sulfate and evaluation of sulfatase and aromatase activities in pre- and postmenopausal breast cancer patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 81(4):1460–1464, 1996.
- [28] Jorge R. Pasqualini. The selective estrogen enzyme modulators in breast cancer: A review. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*, 1654:123–143, 2004.
- [29] W R Miller e J Jackson. The therapeutic potential of aromatase inhibitors. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 12:337–351, 2003.
- [30] Evan R Simpson, Mala S. Mahendroo, Gary D Means, Michael W. Kilgore, Margaret M. Hinshelwood, Sandra Graham-Lorence, Bilal Amarneh, Yuji Ito, Carolyn R Fisher, M. Dodson Michael, Carole R Mendelson, e Serdar E Bulun. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis, *Endocrine Reviews*, 15(3):342-355, 1994.
- [31] B Fisher, J P Costantino, D L Wickerham, C K Redmond, M Kavanah, W M Cronin, V Vogel, A Robidoux, N Dimitrov, J Atkins, M Daly, S Wieand, E Tan-Chiu, L Ford, e N Wolmark. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. Technical Report 18, 1998.
- [32] Takashi Suzuki, Yasuhiro Miki, Yasuhiro Nakamura, Kiyoshi Ito, e Hironobu Sasano. Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human carcinomas, *Molecular and cellular endocrinology*, 340(2):148-153, 2011.
- [33] L W Lawrence Woo, Delphine S Fischer, Christopher M Sharland, Melanie Trusselle, Paul a Foster, Surinder K Chander, Anna Di Fiore, Claudiu T Supuran, Giuseppina De Simone, Atul Purohit, Michael J Reed, e Barry V L Potter. Anticancer steroid

- sulfatase inhibitors: synthesis of a potent fluorinated second-generation agent, in vitro and in vivo activities, molecular modeling, and protein crystallography. *Mol. Cancer Ther.*, 7:2435–2444, 2008.
- [34] Liviu C. Ciobanu, Van Luu-The, Céline Martel, Fernand Labrie, e Donald Poirier. Inhibition of estrone sulfate-induced uterine growth by potent nonestrogenic steroidal inhibitors of steroid sulfatase. *Cancer Res.*, 63(19):6442–6446, 2003.
- [35] Mathew P. Leese, Hatem A M Hejaz, Mary F. Mahon, Simon P. Newman, Atul Purohit, Michael J. Reed, e Barry V L Potter. A-ring-substituted estrogen-3-O-sulfamates: Potent multitargeted anticancer agents. *J. Med. Chem.*, 48(16):5243–5256, 2005.
- [36] L. W Lawrence Woo, Paul M. Wood, Christian Bubert, Mark P. Thomas, Atul Purohit, e Barry V L Potter. Synthesis and Structure-Activity Relationship Studies of Derivatives of the Dual Aromatase-Sulfatase Inhibitor 4-[[4-(4-Cyanophenyl)(4H-1,2,4-triazol-4-yl)amino]methyl]phenyl sulfamate. *ChemMed-Chem*, 8:779–799, 2013.
- [37] Gillian M Allan, Harshani R Lawrence, Josephine Cornet, Christian Bubert, Delphine S Fischer, Nigel Vicker, Andrew Smith, Helena J Tutill, Atul Purohit, Joanna M Day, Mary F Mahon, Michael J Reed, e Barry V L Potter. Modification of estrone at the 6, 16, and 17 positions: novel potent inhibitors of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *J. Med. Chem.*, 49(4):1325–1345, 2006.
- [38] Delphine S Fischer, Gillian M Allan, Christian Bubert, Nigel Vicker, Andrew Smith, Helena J Tutill, Atul Purohit, Lynn Wood, Graham Packham, Mary F Mahon, Michael J Reed, e Barry V L Potter. E-ring modified steroids as novel potent inhibitors of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *J. Med. Chem.*, 48(18):5749–5770, 2005.
- [39] L J Denis e K Griffiths. Endocrine treatment in prostate cancer. *Semin. Surg. Oncol.*, 18(1):52–74, 2000.
- [40] B Kenny, S Ballard, J Blagg, e D Fox. Pharmacological options in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *J. Med. Chem.*, 40(9):1293–1315, 1997.
- [41] B J Feldman e David Feldman. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 1(1):34–45, 2001.
- [42] Gerhardt Attard, Alison H M Reid, Timothy A. Yap, Florence Raynaud, Mitch Dowsett, Sarah Settatree, Mary Barrett, Christopher Parker, Vanessa Martins, Elizabeth Folklerd, Jeremy Clark,

- Colin S. Cooper, Stan B. Kaye, David Dearnaley, Gloria Lee, e Johann S. de Bono. Phase I clinical trial of a selective inhibitor of CYP17, abiraterone acetate, confirms that castration-resistant prostate cancer commonly remains hormone driven. *J. Clin. Oncol.*, 26(28):4563–4571, 2008.
- [43] Teuvo L J Tammela. Endocrine prevention and treatment of prostate cancer, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 360(2): 59-67 2012.
- [44] J Trachtenberg, N Halpern, e A Pont. Ketoconazole: a novel and rapid treatment for advanced prostatic cancer, *The Journal of Urology*, 130(1): 152-153, 1983.
- [45] Pirkko L. Härkönen e Sari I. Mäkelä. Role of estrogens in development of prostate cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 92(4):297–305, 2004.
- [46] Saurabh Aggarwal, Suresh Thareja, Abhilasha Verma, Tilak Raj Bhardwaj, e Manoj Kumar. An overview on 5 α -reductase inhibitors. *Steroids*, 75(2):109–153, 2010.
- [47] Saurabh Aggarwal, Suresh Thareja, Tilak Raj Bhardwaj, e Manoj Kumar. Self-organizing molecular field analysis on pregnane derivatives as human steroidal 5 α -reductase inhibitors. *Steroids*, 75(6):411–418, 2010.
- [48] Jorge A R Salvador, Rui M A Pinto, e Samuel M Silvestre. Steroidal 5 α -reductase and 17 α -hydroxylase/17,20-lyase (CYP17) inhibitors useful in the treatment of prostatic diseases. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 137:199–222, 2013.
- [49] Saurabh Aggarwal, Suresh Thareja, T. R. Bhardwaj, Jörg Hauptenthal, R. W. Hartmann, e Manoj Kumar. Synthesis and biological evaluation of novel unsaturated carboxysteroids as human 5 α -reductase inhibitors: A legitimate approach. *Eur. J. Med. Chem.*, 54:728–739, 2012.
- [50] Cristina Amaral, Carla Varela, Georgina Correia-Da-Silva, Elisiário Tavares Da Silva, Rui a. Carvalho, Saul C P Costa, Sara C. Cunha, José O. Fernandes, Natércia Teixeira, e Fernanda M F Roleira. New steroidal 17 β -carboxy derivatives present anti-5 α -reductase activity and anti-proliferative effects in a human androgen-responsive prostate cancer cell line. *Biochimie*, 95(11):2097–2106, 2013.
- [51] R.Veith. Synthesis and evaluation of 17-aliphatic heterocycle-substituted steroidal inhibitors of 17 α -hydroxylase/C17-20-lyase (P450 17). *J. Med. Chem.*, 43(P450 17):4437–4445, 2000.

- [52] Robert B. Montgomery, Mario A. Eisenberger, Matthew Rettig, Franklin Chu, Roberto Pili, Joe Stephenson, Nicholas J. Vogelzang, Jodie Morrison, e Mary-ellen Taplin. Phase I clinical trial of galeterone (TOK-001), a multifunctional antiandrogen and CYP17 inhibitor in castration resistant prostate cancer (CRPC). *J. Clin. Oncol.*, (30s):Abstr 4665, 2012.
- [53] R W Hartmann, M Hector, S Haidar, P B Ehmer, W Reichert, e J Jose. Synthesis and evaluation of novel steroidal oxime inhibitors of P450 17 (17 alpha-hydroxylase/C17-20-lyase) and 5 alpha-reductase types 1 and 2. *J. Med. Chem.*, 43(22):4266-4277, 2000.
- [54] Natasha M. DeVore e Emily E. Scott. Structures of cytochrome P450 17A1 with prostate cancer drugs abiraterone and TOK-001, *Nature*, 482(7383):116-119, 2012.
- [55] Malika Ibrahim-Ouali. Synthesis of pentacyclic steroids. *Steroids*, 73(8):775-797, 2008.
- [56] Igor V Zavarzin, V V Chertkova, Inna S Levina, e E I Chernoburova. Steroids fused to heterocycles at positions 16, 17 of the D-ring. *Russ. Chem. Rev.*, 80:661-682, 2011.
- [57] Bao-Le Zhang, En Zhang, Lu-Ping Pang, Li-Xing Song, Ya-Fei Li, Bin Yu, e Hong-Min Liu. Design and synthesis of novel D-ring fused steroidal heterocycles. *Steroids*, 78(12-13):1200-1208, 2013.
- [58] M. I. Merlani, E. P. Kemertelidze, K. Papadopoulos, e N. I. Men'shova. Some derivatives of 5 α -ketosteroid hydrazones: Synthesis from tigogenin and antituberculosis activity. *Russ. J. Bioorganic Chem.*, 30(5):497-501, 2004.
- [59] Gamal A. Elmegeed, Wagdy K B Khalil, Rafat M. Mohareb, Hanaa H. Ahmed, Mervat M. Abd-Elhalim, e Ghada H. Elsayed. Cytotoxicity and gene expression profiles of novel synthesized steroid derivatives as chemotherapeutic anti-breast cancer agents. In *Bioorganic Med. Chem.*, volume 19, pages 6860-6872, 2011.
- [60] Renáta Minorics, Thomas Szekeres, Georg Krupitza, Philipp Saiko, Benedikt Giessrigl, János Wölfling, Éva Frank, e István Zupkó. Antiproliferative effects of some novel synthetic solanidine analogs on HL-60 human leukemia cells in vitro. *Steroids*, 76(1-2):156-162, 2011.
- [61] Li-Hua Huang, Yong-Fei Zheng, Yong-Zheng Lu, Chuan-Jun Song, Yan-Guang Wang, Bin Yu, e Hong-Min Liu. Synthesis and biological evaluation of novel steroidal[17,16-d][1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidines, *Steroids*, 77(6):710-715, 2012.

- [62] a. V. Kamernitskii, E. I. Chernoburova, V. V. Chertkova, V. N. Yarovenko, I. V. Zavarzin, e M. M. Krayushkin. Effect of gama-substituents in the hydrazones of conjugated pregnane 20-ketosteroids on their ability to cyclize to pyrazolines. *Russ. Chem. Bull.*, 55(11):2117–2118, 2006.
- [63] a. E G E Amr, Nehad a. Abdel-Latif, e Mohamed M. Abdalla. Synthesis and antiandrogenic activity of some new 3-substituted androstano[17,16-c]-5-aryl-pyrazoline and their derivatives. *Bioorganic Med. Chem.*, 14(2):373–384, 2006.
- [64] Mohamed M. Abdalla, Mohamed A. Al-Omar, Mashooq A. Bhat, Abdel Galil E Amr, e Abdullah M. Al-Mohizea. Steroidal pyrazolines evaluated as aromatase and quinone reductase-2 in-hibitors for chemoprevention of cancer. *Int. J. Biol. Macromol.*, 50(4):1127–1132, 2012.
- [65] Gillian M. Allan, Christian Bubert, Nigel Vicker, Andrew Smith, Helena J. Tutill, Atul Purohit, Michael J. Reed, e Barry V L Potter. Novel, potent inhibitors of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 248(1-2):204–207, 2006.
- [66] M J Green, R L Tiberi, R Friary, B N Lutsky, J Berkenkoph, X Fernandez, e M Monahan. Synthesis and topical anti-inflammatory activity of some steroidal [16 alpha, 17 alpha-d]isoxazolidines. *J. Med. Chem.*, 25(12):1492–1495, 1982.
- [67] T. Kwon, A. S. Heiman, E. T. Oriaku, K. Yoon, e H. J. Lee. New steroidal antiinflammatory antedugs: Steroidal [16,17-d]-3'- carbethoxyisoxazolines. *J. Med. Chem.*, 38(6):1048–1051, 1995.
- [68] Pritish Chowdhury, Archana Moni Das, e Papor Goswami. Synthesis of some new steroidal [16, 17-d] -isoxazolines. *Steroids*, 70(September 2004):494–498, 2005.
- [69] A. A. Akhrem, L. E. Kulikova, I. S. Levina, e Yu. A. Titov. Transformed steroids: Communication 43 synthesis of pentacyclic analogs of progesterone with an additional ring in the 16,17 positions. *N. D. Zelinskii Inst. Org. Chem. Acad. Sci. USSR*, pages 1358–1363, 1972.
- [70] A. V. Kamernitskii, V. N. Ignatov, I. S. Levina, V. S. Bogdanov, e E. G. Cherepanov. Diels-Alder reaction of 16-dehydropregnenolone acetate with 1,2-dimethylenecyclobutane. *Bull. Acad. Sci. USSR Div. Chem. Sci.*, 34(10):2221–2222, 1985.
- [71] Oliver B Sutcliffe, Richard C Storr, Thomas L Gilchrist, e Paul Rafferty. Cycloadditions to Pyrrolo [1 , 2-c] thiazoles and Pyrazolo [1 , 5-c] thiazoles. *Tetrahedron*, 56:144–151, 2000.

- [72] Teresa M V D Pinho E Melo, Maria I L Soares, e António M D a Rocha Gonsalves. New chemistry of diazafulvenium methides: One way to pyrazoles. *Tetrahedron Lett.*, 47:791–794, 2006.
- [73] O.B. Sutcliffe, R.C. Storr, T.L. Gilchrist, e P. Rafferty. Azafulvenium methides: new extended dipolar systems. pages 1795–1806, 2001.
- [74] M. I L Soares e T. M V D Pinho e Melo. Microwave-assisted generation and reactivity of aza- and diazafulvenium methides: heterocycles via pericyclic reactions. *Tetrahedron Lett.*, 49:4889–4893, 2008.
- [75] Cláudio M. Nunes, Manuela Ramos Silva, Ana Matos Beja, Rui Fausto, e Teresa M V D Pinho e Melo. Cycloaddition of trifluoromethyl azafulvenium methides: synthesis of new trifluoromethylpyrrole-annulated derivatives. *Tetrahedron Lett.*, 51(2):411–414, 2010.
- [76] Nelson A M Pereira, Arménio C. Serra, e Teresa M V D Pinho e Melo. Novel approach to chlorins and bacteriochlorins: $[8\pi+2\pi]$ cycloaddition of diazafulvenium methides with porphyrins. *European J. Org. Chem.*, (34):6539–6543, 2010.
- [77] Nelson A M Pereira, Sofia M. Fonseca, Arménio C. Serra, Teresa M V D Pinho E Melo, e Hugh D. Burrows. $[8\pi+2\pi]$ Cycloaddition of meso-tetra- and 5,15-diarylporphyrins: Synthesis and photophysical characterization of stable chlorins and bacteriochlorins. *European J. Org. Chem.*, (20-21):3970–3979, 2011.
- [78] I Catela. *Preparação de novos derivados esteroides via reações de cicloadições dipolares*. Tese de mestrado, 2013.
- [79] Cátia F O Correia. *Synthesis of new hexacyclic steroids via $[8\pi+2\pi]$ cycloaddition of diazafulvenium methides*. Tese de mestrado, 2014.
- [80] Teresa M. V. D. Pinho E Melo. Exploiting azafulvenium methides chemistry. *Arkivoc*, 2006(7):89–104, 2006.
- [81] Hongqi Li, Jueshu Fang, Juan Li, Yulong Wang, Xiujuan Tian, e Yuanhui Xiang. Synthesis and characterization of new phenyl esters derived from 16-dehydropregnenolone acetate (16-DPA). *Res. Chem. Intermed.*, 39(8):3887–3893, 2013.
- [82] Dharam Paul Jindal, Raja Chattopadhaya, Sheetal Guleria, e Ranju Gupta. Synthesis and antineoplastic activity of 2-alkylaminoethyl derivatives of various steroidal oximes. *Eur. J. Med. Chem.*, 38:1025–1034, 2003.
- [83] Jiang-jiang Tang, Gang Li, e Jin-ming Gao. Synthesis and cytotoxicity of novel steroidal C-20 oxime ester derivatives from 16-DPA. *Arab. J. Chem. (Article Press.)*, 2015.

- [84] Susana M M Lopes, Américo Lemos, e Teresa M V D Pinho e Melo. A hetero-Diels-Alder approach to functionalized 1H-tetrazoles: Synthesis of tetrazolyl-1,2-oxazines, -oximes and 5-(1-aminoalkyl)-1H-tetrazoles. *Tetrahedron Lett.*, 51(51):6756–6759, 2010.
- [85] Francis K. Yoshimoto, Melissa C. Desilets, e Richard J. Auchus. Synthesis of halogenated pregnanes, mechanistic probes of steroid hydroxylases CYP17A1 and CYP21A2. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 128(1-2):38–50, 2012.
- [86] ER Glazier. Bromination with Cupric Bromide. II. Bromination in the presence of an Olefinic acid. *J. Org. Chem.*, 4180(12):26–28, 1962.
- [87] Maria I L Soares, Ana Filipa Brito, Mafalda Laranjo, José A. Paixão, M. Filomena Botelho, e Teresa M V D Pinho e Melo. Chiral 6,7-bis(hydroxymethyl)-1H,3H-pyrrolo[1,2-c]thiazoles with anti-breast cancer properties. *Eur. J. Med. Chem.*, 60:254–262, 2013.
- [88] Heping Li, Hong Min Liu, Wenzhong Ge, Lihua Huang, e Li-hong Shan. Synthesis of 7 α -hydroxy-dehydroepiandrosterone and 7 β -hydroxy-dehydroepiandrosterone. *Steroids*, 70:970–973, 2005.