



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Síntese e avaliação biológica de derivados oxidados da diosgenina como agentes anti tumorais

Ana Paula Jerónimo Martins

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

Orientador: Prof. Doutor Samuel Silvestre

Covilhã, Outubro de 2016

**“Agora não quero saber de mais nada, só quero
aperfeiçoar o que não sei”**

Manoel de Barros

Dedicatória

Ao meu irmão mais velho já falecido, por ti e para ti Eduardo...

Que todos façamos os possíveis e impossíveis para combater, de alguma forma, esta maldita doença.

“Tumors destroy man in a unique and appalling way, as flesh of his own flesh which has somehow been rendered proliferative, rampant, predatory and ungovernable. [Tumors] are the most concrete and formidable of human maladies, yet despite more than 70 years of experimental study they remain the least understood ... What can be the why for these happenings?”

PEYTON ROUS, Nobel lecture, 1966

Agradecimentos

O ser humano não se constrói sozinho, necessita da convivência com o outro, da reciprocidade de ajuda e diálogo para desenvolver as suas próprias virtudes e capacidades. A realização desta dissertação só se tornou possível com a colaboração de pessoas que me rodeiam e a quem quero agradecer.

Em primeiro lugar quero agradecer ao meu orientador, professor Samuel Silvestre, por todo o seu conhecimento transmitido, pelo apoio e motivação, pelo seu “acreditar” que tudo é possível, pela sua calma nos meus momentos mais críticos e por todas as críticas construtivas e opiniões que fizeram com que levasse a cabo esta dissertação.

À professora Adriana Santos pela sua total disponibilidade, pela ajuda prestada e pelos conhecimentos transmitidos.

A todos os docentes do curso de Ciências Biomédicas tanto da licenciatura como do mestrado que contribuíram para a minha formação académica.

Aos meus colegas de laboratório em especial, à Mafalda Catarro (um obrigada pela tua ajuda a todos os níveis), à Joana Figueiredo (a minha companheira e tornou-se uma grande amiga) e ao João Serrano, pelas ajudas e pelos momentos de descontração, à Cris, à Mariana, à Elisabete que mesmo longe sempre se disponibilizou para me ajudar, à Ângela por toda a sua disponibilidade, à Jéssica e Vanessa por todo o apoio.

Às minhas amigas que sempre estiveram ao meu lado ao longo desta etapa e que me acompanham desde a licenciatura: à Ana Silva foste realmente o meu pilar ao longo destes anos, à Rita Simões e Patrícia D´amil.

Aos meus pais, principalmente à minha mãe por todos os conselhos, sacrifícios e sabedoria dada ao longo de todos estes anos. É através de ti, olhando-te sempre nos olhos, que vejo e aprendo o que é realmente ter força para continuar mesmo quando o mundo outrora desabara. É através de ti que sei o que é o amor incondicional e o mais puro de todos e enquanto houver amor, há motivos para sorrir e seguir em frente, sem nunca desistir.

Aos meus irmãos, que me mimaram tanto na minha infância, e sobrinhos pela sua alegria e por contribuírem tanto para o meu crescimento.

Ao meu namorado Paulo Pereira, pela compreensão e paciência sobretudo nos dias menos bons, és deveras uma pessoa muito especial.

Obrigada.

Resumo

Atualmente, o cancro é considerado das doenças que causa um maior número de mortes a nível mundial e, apesar de todos os avanços científicos, a sua incidência continua a aumentar. As terapias convencionais, como a quimioterapia, continuam a ser os tratamentos mais usados para combater a doença. No entanto, com algumas destas terapias, além de ocorrerem efeitos secundários graves, com a quimioterapia é possível as células cancerígenas desenvolverem resistência a múltiplos fármacos, levando a um reaparecimento do cancro. Desta forma, torna-se urgente, o desenvolvimento de novos fármacos mais potentes e seletivos. Os produtos naturais podem representar o material de partida para a descoberta e síntese de novas moléculas. Neste âmbito, no grupo dos esteroides, que são um grupo de lipídios que incluem muitos compostos naturais, há muitas moléculas com várias atividades biológicas, designadamente ação anti-tumoral. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi a síntese e purificação de derivados oxidados do esteroide diosgenina, já conhecida pela sua vasta aplicação terapêutica nomeadamente no cancro e avaliação biológica *in vitro* da sua potencial ação antiproliferativa celular.

Os dez derivados oxidados obtidos foram avaliados biologicamente em diferentes tipos de células cancerígenas, da mama (MCF-7), da próstata responsivas a androgénios (LNCaP) e da próstata não responsivas a androgénios (PC-3), mediante o ensaio do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio. Entre estes compostos, o C8 ($IC_{50}=9,217\mu M$) e o C6 ($IC_{50}=0,933\mu M$) foram os compostos mais promissores nas células MCF-7, o C11a ($IC_{50}=4,205\mu M$) e o C12 ($IC_{50}=0,097\mu M$) nas LNCaP e o C6 ($IC_{50}=47,91\mu M$) e C11a ($IC_{50}=46,32\mu M$) os mais promissores nas PC-3. Nos ensaios de citometria de fluxo com marcação celular com iodeto de propídio, realizada em células MCF-7, verificou-se que o composto C2, levou a um pequeno aumento do número de células mortas em relação ao controlo negativo.

Palavras-chave

Cancro, diosgenina, derivados oxidados da diosgenina, ação anti-proliferativa, mama, próstata, citometria de fluxo

Abstract

Nowadays cancer is considered one of the disease that cause the large amount of death on a worldwide scale and, even with all the scientific advances, its incidence continues to increase. Conventional therapy like chemotherapy remain the most used to combat this disease. However, with some of this therapies apart from lead to some serious side effects, with chemotherapy it's possible that cancer cells develop multidrug resistance, leading to a cancer recurrence. This way, the development of new pharmaceuticals more potent and selective are extremely important. Natural products can represent the starting material for the discovery and synthesis of new molecules. In this scope, the steroid group, that are a group of lipids that includes lots of natural compounds there are many molecules with different biologic activities, including anti-tumor action. In this sense, the objective of this study was the synthesis and purification of oxidizes sapogenin steroid diosgenin derivate already known for its wide therapeutic application in particular cancer and biological evaluation *in vitro* of its potential anti proliferative cellular action.

The ten oxidized derivatives obtained were evaluated biologically on different cancer cell types, breast (MCF-7), prostate responsive to androgens (LNCaP) and prostate non responsive to androgens (PC-3), by testing 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide.

Between this compounds, the C8 ($IC_{50}=9,217\mu M$) and the C6 ($IC_{50}=0,933\mu M$) were the most promising compounds in cells MCF-7, the C11a ($IC_{50}=4,205\mu M$) and the C12 ($IC_{50}=0,097\mu M$) at the LNCaP and the C6 ($IC_{50}=47,91\mu M$) and C11a ($IC_{50}=46,32\mu M$) the most promising on PC-3.

On the flow cytometry assays, with cell labeling with propidium iodide realized on MCF-7 cells, the C2 compound, lead to a small increase in the number of death cells compared to the negative control.

Keywords

Cancer, diosgenin, oxidized diosgenin derivatives, anti-proliferative action, breast, prostate, flow cytometry

Índice

1.1 O cancro	1
1.1.1 Biologia geral do Cancro	2
1.1.2 Cancros hormono-dependentes	4
1.1.3 Prevenção e Tratamento.....	4
1.2 Os esteroides	5
1.2.1 Os esteroides e a sua aplicação no cancro	7
1.3 A diosgenina	7
1.3.1 As saponinas esteroides e a sapogenina diosgenina	8
1.3.2 Estrutura e características químicas gerais da diosgenina	8
1.3.3 Atividades farmacológicas da diosgenina	9
1.3.3.1 Atividade Anti-cancerígena - Mecanismos moleculares associados.....	9
1.3.3.2 Atividade anti-inflamatória.....	12
1.3.3.3 Atividade anti-microbiana.....	13
1.3.3.4 Atividade na diabetes e obesidade	13
1.3.3.5 Atividade anti-coagulante e anti-trombótica	14
1.3.4 Derivados da diosgenina e a sua ação anti-cancerígena.....	14
1.3.5 Recentes aplicações terapêuticas da diosgenina e de alguns derivados	15
Capítulo 2 - Justificação do tema e Objetivos	16
2.1 Objetivos gerais	17
2.2 Objetivos Específicos	17
Capítulo 3 - Materiais e Métodos	17
3.1 Síntese Química	17
3.1.1 Reagentes e solventes	17
3.1.2 Equipamentos	18
3.1.3 Procedimentos de cromatografia - visualização e purificação de produtos.....	19
3.1.4 Procedimentos experimentais da síntese química	19
3.1.4.1 (C1) Síntese do acetato de diosgenina - Reação de acetilação da diosgenina [108]....	19
3.1.4.2 (C2) Síntese da diosgenona - Reação de oxidação da diosgenina pelo reagente de Jones [110]	20
3.1.4.3 (C3) Síntese do 7-oxodiosgenina acetato - Reação de oxidação alílica do acetato de diosgenina [111-113].....	21
3.1.4.4 (C4) Síntese da 7-oxodiosgenina - Reação de hidrólise alcalina do acetato de 7-oxodiosgenina [111-113]	22
3.1.4.5 (C5) Síntese de 4 β -hidroxidiosgenina - Reação de 4-beta-hidroxilação da diosgenina [114]	23
IV (cm ⁻¹): 3571, 3442, 2948, 2908, 2865, 2828, 2160, 1738, 1666, 1447, 1430, 1386, 1373, 1310, 1258, 1241, 1224, 1199, 1178, 1169, 1153, 1134, 1097, 1073, 1046, 1014, 976, 961, 915, 893, 867, 836, 819, 797, 763, 748, 686, 673, 649.	24
3.1.4.6 (C6 e C7) Síntese do acetato de 4 β -hidroxiespirost-5-en-3 β -ilo (C6) e do acetato de 6 α -hidroxiespirost-4-en-3 β -ilo (C7) - Reação de oxidação do acetato de diosgenina com SeO ₂ [114]	25
3.1.4.7 (C8) Síntese de acetato de 5 β ,6 β -epoxidiosgenina- Reação de epoxidação do acetato de diosgenina com KMnO ₄ [115, 116]	27

3.1.4.8 (C9) Síntese da 5 β ,6 β -epoxidiosgenina (C9) - Hidrólise alcalina do acetato de 5 β ,6 β -epoxidiosgenina [116].....	28
3.1.4.9 (C10) Síntese do acetato de 5 α ,6 α -epoxidiosgenina - Reação de epoxidação do acetato de diosgenina com MMPP [117]	29
3.1.4.10 (C11a) Síntese de 5 α ,6 α -epoxidiosgenina - Reação de hidrólise do acetato de 5 α ,6 α -epoxidiosgenina [116].....	30
3.1.4.11 (C11a+C11b) Síntese de 5,6-epoxidiosgenina - Reação de epoxidação da diosgenina com MMPP [117]	31
3.1.4.12 (C12) Síntese de espirostan-3 β ,5 α ,6 β -triol - Reação de abertura do anel epóxido [118]	32
3.2 Avaliação Biológica.....	33
3.2.1 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade dos compostos derivados da diosgenina	33
3.2.2 Materiais e Reagentes.....	33
3.2.3 Equipamentos	33
3.2.4 Linhas celulares	33
3.2.4.1 LNCaP	34
3.2.4.2 MCF-7	34
3.2.4.3 PC-3	34
3.2.5 Técnicas de Cultura Celular.....	34
3.2.5.1 Preparação dos meios de cultura	34
3.2.5.2 Congelamento e Descongelamento de células.....	35
3.2.5.3 Tripsinização.....	35
3.2.5.4 Contagem e sementeira celular	36
3.2.6 Ensaio de viabilidade celular (ensaio MTT)	36
3.2.6.1 Preparação e incubação dos compostos	37
3.2.6.2 Ensaio de viabilidade celular propriamente dito (ensaio MTT)	38
3.2.7 Citometria de fluxo.....	39
3.2.8 Análise estatística	40
Capítulo 4 - Resultados e Discussão	41
4.1 Síntese Química.....	41
4.2 Avaliação Biológica.....	45
4.2.1 Determinação dos IC ₅₀ dos compostos sintetizados e comparação da sua ação nas diferentes linhas celulares	45
4.2.2 Apresentação das curvas dose-resposta - avaliação da viabilidade celular	48
4.3 Avaliação morfológica das células sob a ação dos compostos sintetizados.....	51
4.3.1 Avaliação morfológica de alguns compostos nas células MCF-7	52
4.3.2 Avaliação morfológica de alguns compostos nas células PC-3 (pré-citometria de fluxo) ...	53
4.4 Citometria de fluxo	54
Capítulo 6 - Conclusão e Perspetivas Futuras	58
Bibliografia	59
Capítulo 8 - Anexos.....	70
8.1 Espectros RMN e IV dos compostos avaliados biologicamente	70

8.1.1	Espetro ¹ H-RMN do acetato de diosgenina (C1)	70
8.1.2	Espectros ¹ H RMN e ¹³ C-RMN e IV da Diosgenona (C2)	71
8.1.3	Espectros ¹ H RMN e ¹³ C-RMN e IV do 7-oxodiosgenina (C4)	74
8.1.4	Espectros ¹ H RMN e ¹³ C-RMN e IV do 4β-hidroxdiosgenina (C5)	77
8.1.5	Espectros ¹ H RMN e ¹³ C-RMN e IV do 4β-hidroxiestero-5-en-3β-ilo (C6)	80
8.1.6	Espectros ¹ H RMN e ¹³ C-RMN e IV do 6α-hidroxiestero-4-en-3β-ilo (C7)	83
8.1.7	Espectros ¹ H RMN e ¹³ C-RMN e IV do acetato de 5β,6β-epoxidiosgenina (C8)	86
8.1.8	Espectros ¹ H RMN e ¹³ C-RMN e IV do 5β,6β-epoxidiosgenina (C9)	89
8.1.9	Espectros ¹ H RMN e ¹³ C-RMN e IV do acetato de 5α,6α-epoxidiosgenina (C10)	92
8.1.10	Espectros ¹ H RMN e ¹³ C-RMN e IV do 5α,6α-epoxidiosgenina (C11a)	95
8.1.11	Espectros ¹ H RMN e ¹³ C-RMN e IV do estero-3β-5α,6β-triol (C12).....	98

Lista de Figuras

Fig. 1 - Estimativa da incidência de novos casos de cancro para o ano de 2020 em Portugal.	2
Fig. 2 - Oncogenes e genes supressores tumorais.....	3
Fig. 3 - Estrutura base dos esteroides, representação dos 4 anéis e carbonos	6
Fig. 4 - Estrutura completa da diosgenina	9
Fig. 5 - Representação esquemática do mecanismo plausível das ações da diosgenina a nível celular como um agente terapêutico anti-cancerígeno. Diosgenina regula negativamente ou positivamente vários candidatos moleculares associados à proliferação celular e crescimento, apoptose, regulação da transcrição, metabolismo de ácidos gordos, via inflamatória e biossíntese eicosanóide levando à morte das células tumorais	12
Fig. 6 - Representação esquemática da síntese passo a passo de IONPs-D;	16
Fig. 7 - Síntese do C1.	19
Fig. 8 - Síntese do C2.....	20
Fig. 9 - Síntese do C3.	21
Fig. 10 - Síntese do C4 a partir do C3.	22
Fig. 11 - Síntese do C5.	23
Fig. 12 - Síntese do C6 e C7 a partir do C1.	25
Fig. 13 - Síntese do C8 a partir do C1.	27
Fig. 14 - Síntese do C9 a partir C8.....	28
Fig. 15 - Síntese do C10 a partir do C1.	29
Fig. 16 - Síntese do C11a a partir do C10.	30
Fig. 17 - Síntese do 11 a e 11b.	31
Fig. 18 - Síntese do C12 a parti do C11 a e b.	32
Fig. 19 - Esquema representativo das microplacas para o ensaio de curva dose-resposta, com uma gama de diferentes concentrações (μM). Foram realizados ensaios com $n=4$, para todas as concentrações.	39
Fig. 20 - Esquema geral da síntese química realizada.....	41
Fig. 21 - Avaliação morfológica das células MCF-7: A - Controlo negativo; B- expostas ao 5-FU; C - expostas à diosgenina; zoom:100x.....	52

Fig. 22 - Avaliação morfológica das células MCF-7: A - Controlo negativo; B- expostas ao composto C9; C - expostas ao composto C12; zoom:100x 52

Fig. 23 - Avaliação morfológica das células PC-3: A - Controlo negativo; B- expostas ao 5-FU; C - expostas à diosgenina; zoom:100x..... 53

Fig. 24 - Avaliação morfológica das células PC-3: A - Controlo negativo; B- expostas ao composto C2; C - expostas ao composto C9; zoom:100x 54

Fig. 25 -Histograma que representa a intensidade da fluorescência no canal FLA3-A vs count de eventos. 56

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Lista dos rendimentos obtidos dos compostos sintetizados..... 43

Tabela 2 - Valores de IC_{50} para os compostos sintetizados testados nas diferentes linhas celulares e os controlos 5-FU e Diosgenina. 47

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Proliferação celular relativa na linha celular MCF-7 incubadas com a diosgenina, numa gama de concentrações entre 0,01 μM e 100 μM por 48 horas. Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controlo, onde as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. *p <0,05 versus respetivo controlo (teste t-Student), n=4..48

Gráfico 2 - Proliferação celular relativa na linha celular MCF-7 incubadas com o composto C6, numa gama de concentrações entre 0,01 μM e 100 μM por 48 horas. Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controlo, onde as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. *p <0,05 versus respetivo controlo (teste t-Student), n=4..49

Gráfico 3 - Proliferação celular relativa na linha celular PC-3 incubadas com a diosgenina, numa gama de concentrações entre 0,01 μM e 100 μM por 48 horas. Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controlo, onde as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. *p <0,05 versus respetivo controlo (teste t-Student), n=4..... 49

Gráfico 4- Proliferação celular relativa na linha celular PC-3 incubadas com o composto C12, numa gama de concentrações entre 0,01 μM e 100 μM por 48 horas. Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controlo, onde as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. *p <0,05 versus respetivo controlo (teste t-Student), n=4..50

Gráfico 5 - Proliferação celular relativa na linha celular LNCaP, incubadas com a diosgenina, numa gama de concentrações entre 0,01 μM e 100 μM por 48 horas. Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controlo, onde as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. *p <0,05 versus respetivo controlo (teste t-Student), n=4..50

Gráfico 6 - Proliferação celular relativa na linha celular LNCaP, incubadas com o composto C12, numa gama de concentrações entre 0,01 μM e 100 μM por 48 horas. Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controlo, onde as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. *p <0,05 versus respetivo controlo (teste t-Student), n=4..51

Gráfico 7- representação estatística da viabilidade celular resultante de todos os “dot plots” de cada composto nas três regiões: R1- células/eventos sem IP; R2 - células/eventos marcadas com IP; R3 - região intermédia de eventos. 5-FU - 5 fluorouracilo; D0 - diosgenina 55

Lista de Acrónimos

5-FU	5-Fluorouracilo
Ab	Solução com 10.000unidades/ml de penicilina, 10mg/ml de estreptomicina e 25µg/ml de anfotericina-B
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
A431	Células do carcinoma escamoso
A549	Células do cancro do pulmão
Bax/Bcl-2/Bcl-X/Bak/Bit	Proteínas da família Bcl-2 apoptóticas
BGC -823	Células de cancro gástrico
CCF	Cromatografia de camada fina
COX-2	<i>Prostaglandin-endoperoxide-synthase-2</i>
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
ddd	Duplo duplo dupleto
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMEM	<i>Dullbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DR5	Recetor de morte celular
DU-145	Células do cancro da próstata
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
HC	Vírus da hepatite C
HCC	Células do cancro hepatocelular
HCPT	<i>Hidroxi camptothecin</i>
HCT-116	Células do cancro colon retal
HEL	Células do cancro eritroleucémico
Hep2	Células do carcinoma escamoso
HepG2	Células do cancro colon retal
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HT-29	Células do cancro hepatocelular
hTERT	Gene da telomerase transcritase reversa
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IKKB-IRS-1 de insulina	Cinase envolvida na propagação da resposta celular ligada ao substrato do recetor
IC ₅₀	Concentração de composto que inibe a proliferação celular em 50%
IV	Infravermelho

IP	Iodeto de propídio
LOX IMVI	Linha celular do cancro de um melanoma
m	Múltiplo
MCF-7	Células epiteliais do adenocarcinoma mamário metastático
MCPBA	Ácido 3-cloroperoxibenzóico
MDA - MB231	Células do cancro da mama
MMPP	Monoperoxifitalato de magnésio hexa-hidratado
MOLT-4	Linha celular do cancro leucémico
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
η	Rendimento
NF-kB	Fator de transcrição nuclear kB
PARP	(Poly(ADP-ribose))
PBS	Tampão fosfato alcalino
PC-3	Células de adenocarcinoma da próstata não sensíveis a androgénios
p53	Proteína pro-apoptótica
p38MAPK	Mitogénio ativado por proteínas cinases
RMN	Ressonância magnética nuclear
ROS	Espécies reativas de oxigénio
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RPMI 2650	Células do carcinoma escamoso
s	singleto
SFB	Soro fetal bovino
SNB-75	Linha celular do cancro do sistema nervoso central
SRB	Sulforrodamina B
sp	Solução com 10.000 unidades de penicilina e 10mg/ml de estreptomicina
STAT 3	Fator de transcrição e transdutor de sinal 3
SW-620	Linha celular do cancro colo-retal
t	Tripleto
TBHP	<i>Terc</i> -butil hidroperóxido
<i>t</i> -BuOH	<i>Terc</i> -butanol
THF	Tetrahidrofurano
TNF	Fator de necrose tumoral
TRAIL	Citocina produzida pelas células, ligando de recetores de morte celular
UV	Ultra-violeta
Vav2	Fator de troca do nucleótido guanina
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VSMC	Células do músculo vascular liso
¹ H-RMN	Ressonância Magnética nuclear de Hidrogénio
¹³ C-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13

Capítulo 1 - Introdução

1.1 O cancro

O cancro é considerado uma doença complexa e multifatorial caracterizada pelo crescimento e disseminação celular descontrolada de células anormais, que ocorre por acumulação de progressivas mutações genéticas e alterações epigenéticas que, não tratado, pode levar à morte [1, 2]. No âmbito desta definição geral é importante definir neoplasia como sendo um crescimento descontrolado de células de tecido novo, sendo o resultado final designado tumor. Por sua vez, os tumores podem ser benignos ou malignos. Estes últimos têm a capacidade de invadir tecidos vizinhos e atingir outros locais mais distantes através de um processo denominado metástase, ao contrário do que acontece nos tumores benignos, que são considerados locais [3].

Existem mais de 100 tipos de cancro classificados. Apesar de todos os esforços na investigação científica para o seu diagnóstico precoce e tratamento, esta doença continua a ter alta morbidade e mortalidade, e a sua incidência continua a aumentar [1]. Em 2008, essa incidência (número novos de casos) era perto de 13% mundialmente [4, 5]. Segundo a Organização Mundial de Saúde, estima-se que em 2012 tenham ocorrido 14 milhões de novos casos e houve 8,2 milhões de mortes por cancro na população mundial e prevê-se um aumento de cerca de 70% do número de novos casos, nos próximos vinte anos. No mesmo ano, 2012, os cancros diagnosticados com maior frequência no homem foram o cancro do pulmão, próstata, colo-retal, estômago e fígado enquanto que na mulher, foram o cancro da mama, colo-retal, pulmão, colo uterino e estômago. Estima-se ainda que aproximadamente 30% das mortes causadas por cancro são devidas a cinco fatores de risco comportamentais e alimentares como o elevado índice de massa corporal, a baixa ingestão de frutas e legumes, o consumo de tabaco e álcool e a não prática de atividade física, sendo o consumo excessivo de tabaco o responsável por cerca de 20% de mortes mundiais por cancro [6]. Segundo a direção geral de saúde, em Portugal, estima-se para 2020 a existência de aproximadamente 55.000 novos casos de cancro (fig.1) [7]. Esta patologia é uma patologia do presente mas será cada vez mais uma patologia do futuro. Com elevada morbidade e mortalidade associadas, o cancro é das doenças que acarreta um impacto socioeconómico cada vez maior, relacionado com o avanço clínico-terapêutico e tecnológico [8].

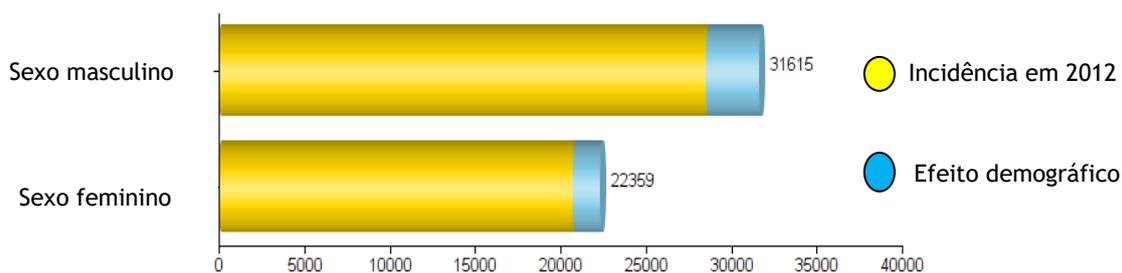


Fig. 1 - Estimativa da incidência de novos casos de cancro para o ano de 2020 em Portugal. (Adaptado de [7])

Os números falam por si e é necessário, portanto, entender a doença, até aos níveis das bases moleculares do cancro para se poder traduzir esse conhecimento em novas terapias eficazes. Esse conhecimento passa pelo entendimento da carcinogénese, a partir do momento em que uma célula dita normal se transforma numa célula cancerígena. Esta transformação envolve além de todos os compostos celulares e de todas as funções associadas, inúmeras vias moleculares responsáveis por esta transformação.

1.1.1 Biologia geral do Cancro

O processo pelo qual as células normais se transformam em células cancerígenas e crescem descontroladamente denomina-se carcinogénese, a qual envolve uma sucessão de alterações genéticas, mais propriamente mutações somáticas e complexas que levam a essa transformação [2, 9]. As mutações e anomalias genéticas acumuladas nas células neoplásicas podem passar pela aneuploidia cromossomal, amplificações, deleções e rearranjos de genes e, conseqüentemente, mutações que originam perda de função ou mutações de ganho de função [2].

A carcinogénese divide-se em três etapas: a iniciação, a promoção e a progressão. Na iniciação, as células sofrem o efeito causado pelos agentes cancerígenos (físicos, químicos ou biológicos), provocando acumulações de mutações em alguns genes. Na fase da promoção, etapa intermédia, o contacto contínuo com os agentes carcinogénicos faz com que as células sofram já com os genes modificados, os oncogenes (que antes de modificados se denominam por proto oncogenes), e caracteriza-se pela multiplicação alterada lenta e gradual das células. A progressão caracteriza-se por uma autonomia de replicação das células, ou seja, pela multiplicação descontrolada e pela capacidade de invasão das mesmas. Nesta última fase, as células apresentam um fenótipo maligno característico [10]. Para que a carcinogénese ocorra, existe uma série de propriedades das células cancerígenas essenciais, tais como: adquirir a capacidade para sinais de crescimento autónomo, evasão de sinais inibidores do crescimento, evasão e resistência aos sinais do sistema imunitário,

evasão de morte celular por apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogénese (formação de novos vasos sanguíneos), invasão e metastização [1].

Por outro lado, estudos recentes destacam também a importância das alterações epigenéticas de certos genes na carcinogénese, que podem estar na origem de alguns cancros, e que resultam numa inativação das funções genómicas, tais como a metilação do ADN, modificações na cromatina, e a modificação pós-tradução de histonas. Este tipo de mutações epigenéticas pode levar a um comportamento anormal comum a todas as células neoplásicas: crescimento desregulado, alta instabilidade genómica e propensão para a metástase [2, 9, 11, 12].

Os genes afetados por mutações na carcinogénese podem ser divididos em dois principais classes: os proto oncogenes, que codificam proteínas que promovem a divisão celular e que após mutações se transformam em genes que têm mutações de ganho de função (ativação) - os oncogenes, que promovem a proliferação excessiva; e os genes que possuem mutações em ambos os alelos, de perda de função (inativação), que são conhecidos como genes supressores tumorais que codificam proteínas que inibem a divisão celular e que, sujeitos a mutações podem levar a uma proliferação desregulada (fig.2). A análise mutacional de oncogenes e genes supressores de tumores pode fornecer evidência de uma associação específica entre estes genes e o tipo de tumor. Perto de 100 genes foram identificados como desempenhando um papel no desenvolvimento ou progressão de cancros humanos, alguns dos quais têm sido implicados num amplo espectro de cancros, enquanto outros são únicos para um tipo específico [1, 2].

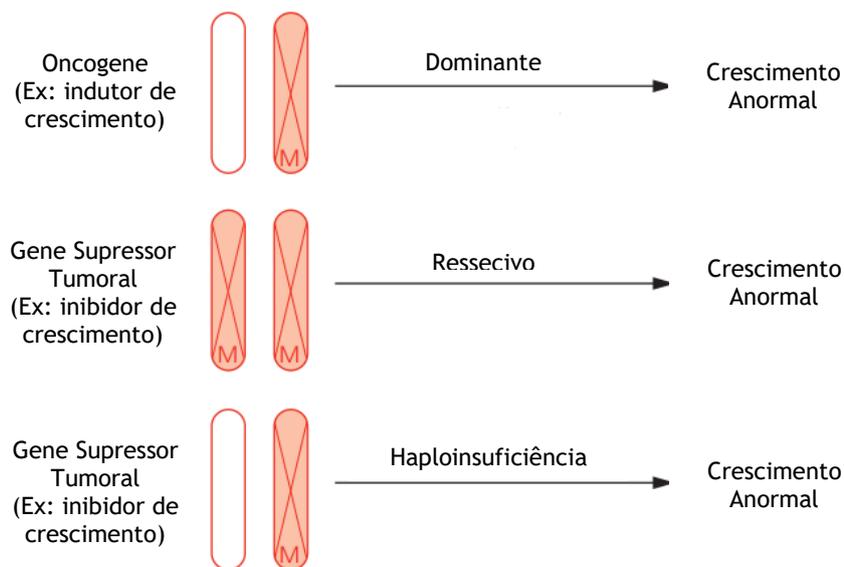


Fig. 2 - Oncogenes e genes supressores tumorais
(adaptado de [1])

As células neoplásicas, ao contrário das células normais, apresentam um potencial proliferativo ilimitado e promovem a angiogénese (no caso dos tumores sólidos), ou seja, a formação de novos vasos sanguíneos para o próprio aporte nutricional do tumor, que por sua vez, proporciona a dispersão neoplásica e conseqüentemente o aparecimento de possíveis metástases [13-15].

1.1.2 Cancros hormono-dependentes

Os cancros hormono-dependentes constituem um dos tipos de cancros mais frequentes no mundo, destacando-se entre eles o cancro da mama e da próstata [6, 16, 17], considerando-se a hipótese de que podem ter mecanismos de carcinogénese comuns. O metabolismo celular é maioritariamente controlado por hormonas da corrente sanguínea que chegam aos tecidos alvo. Quando existe uma desregulação hormonal, a homeostasia celular, fundamental no funcionamento de todos os tecidos, é afetada, podendo provocar alterações e até levar ao aparecimento do cancro. Neste tipo de cancros, são as próprias hormonas que se comportam como promotores da proliferação celular [17]. Neste tipo de patologia, como o próprio nome indica, as hormonas de suporte são de importância fundamental na manutenção da células cancerígenas e, sem a presença desta, a célula cancerígena morre [18]. Assim, para o tratamento mais específico dos cancros hormono-dependentes, os fármacos utilizados e que têm vindo a ser investigados para o seu tratamento, possuem frequentemente estrutura base esteroide [19].

1.1.3 Prevenção e Tratamento

O combate desta doença, que por vezes, cria resistência aos próprios tratamentos e ao próprio sistema imunitário, passa pela prevenção da mesma e pelos tratamentos adequados a cada tipo de cancro, as quais continuam a ser um grande desafio para a comunidade científica [20]. Na carcinogénese, existem diferenças nos mecanismos moleculares envolvidos em cada tipo de célula e no padrão de propagação de células a partir do sítio de origem tumoral. Assim, o tratamento deve ser aplicado de forma diferente, por exemplo, a remoção cirúrgica de um crescimento cancerígeno é mais favorável para cancros na pele do que nos pulmões [1]. Por outro lado, a prevenção passa pela adoção de estilos de vida saudáveis por cada pessoa, evitando a exposição a agentes cancerígenos, e pela preocupação em realizar periodicamente auto exames, como a apalpação de tecidos propícios a desenvolvimento tumoral [21]. A realização dos rastreios adequados, como métodos de diagnóstico precoce, para que este tipo de doença possa ser combatido antecipadamente, tendo em conta o historial clínico e hereditário do paciente, tem sido muito importante. Apesar do aumento significativo de incidência, a mortalidade do cancro da mama, por exemplo, tem-se mantido estável e isto deve-se aos programas de rastreio existentes [8].

As terapias convencionais existentes passam pela cirurgia, radioterapia e terapias sistémicas como a quimioterapia, imunoterapia e terapia hormonal [21]. A cirurgia permite a remoção de tumores sólidos, no entanto, se estes estiverem a pressionar tecidos vitais, o procedimento cirúrgico pode

ficar comprometido [20]. A radioterapia, utilização de radiação para provocar danos celulares a fim de eliminar células cancerígenas, pode ser utilizada como tratamento complementar à terapia a ser utilizada, pode ser indicada para pós operatório ou para pré operatório, bem como pode ser o único meio de tratamento. A terapia hormonal baseia-se na administração de fármacos que inibam a biossíntese e/ou as ações de hormonas específicas de alguns tipos de cancro. A imunoterapia consiste em estimular o sistema imunitário para o combate às células cancerígenas [21]. De entre as terapias sistémicas, a quimioterapia continua a ser a mais utilizada, eliminando as células cancerígenas para reduzir o crescimento tumoral. Os agentes quimioterápicos interagem de formas diferentes com o material genético e podem dividir-se em: agentes alquilantes, fármacos à base de platina, antimetabolitos, intercalantes, inibidores de topoisomerasas, inibidores mitóticos, entre outros mais específicos [1, 22, 23]. No entanto, nomeadamente devido à sua baixa seletividade, afetando também significativamente tecidos saudáveis, a quimioterapia clássica acarreta alguns efeitos indesejáveis ao paciente tais como: disfunções gastrointestinais, toxicidade neurológica, disfunção cognitiva e imunossupressão [24]. Por outro lado, os tumores ao serem tratados com esta terapia clássica podem adquirir resistências ao agente quimioterápico, o que pode, mais tarde, levar ao reaparecimento do cancro [23].

Posto isto e devido à taxa de sucesso limitada e às consequências não desejadas das terapias convencionais, a procura de novas alternativas terapêuticas, designadamente quimioterápicas, é primordial, envolvendo, por exemplo a investigação de novas moléculas potencialmente anti-cancerígenas mais seletivas e mais seguras. Esta investigação de novas moléculas pode basear-se na síntese química orgânica de análogos de moléculas já conhecidas e, como alternativa, o estudo de substâncias naturais que, nomeadamente, possam modular sinais de apoptose [25, 26].

1.2 Os esteroides

Os esteroides pertencem a uma grande família de lípidos que inclui designadamente hormonas reprodutoras, vitamina D, colesterol, ácidos biliares e fitoesteróis, esteroides provenientes de plantas. Este grupo de compostos, que tem sido estudado ao longo das últimas décadas, apresenta alta importância fisiológica, patológica e farmacológica. Assim, os esteroides continuam a ser estudados extensivamente ainda hoje, especialmente com o objetivo de desenvolver novos fármacos [27].

Quimicamente, os esteroides apresentam como estrutura base um conjunto total de 17 carbonos que formam um esqueleto com quatro anéis (A, B, C e D) (fig.3) denominado ciclopentanoperidrofenantreno. Todas as moléculas esteroides pertencentes a esta classe de compostos possuem este núcleo tetracíclico [27-29].

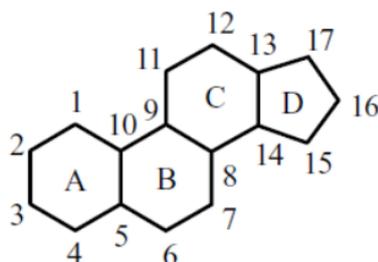


Fig. 3 - Estrutura base dos esteroides, representação dos 4 anéis e carbonos

Entre si, a nível estrutural, os esteroides diferem no grau de metilação nos carbonos 10 e 13 e na cadeia carbonada ligada ao C¹⁷, diferindo nos grupos funcionais, podendo estes ser cetonas, álcoois, ácidos carboxílicos, epóxidos, etc, podendo apresentar estereoquímica α ou β . As ligações α são representadas a tracejado e referem-se a grupos posicionados abaixo do plano dos anéis, e as β representam-se por linhas sólidas, e dizem respeito a grupos que estão acima do plano dos anéis. Quando se encontram no estado saturado, a conformação na junção dos anéis pode ser *cis* ou *trans*, no entanto, habitualmente é *trans*. [29-31]. Estas diferentes e possíveis modificações a nível estrutural promovem a alterações significativas nas suas propriedades, levando a diferentes atividades biológicas e farmacológicas [28].

Os esteroides agem sobre uma vasta gama de tecidos e influenciam vários aspetos biológicos, incluindo a diferenciação sexual, reprodução, regulação osmótica e metabolismo. Os principais locais de síntese e secreção de esteroides incluem os ovários, testículos, glândulas suprarrenais e a placenta. As hormonas esteroides desempenham um papel importante na coordenação rápida e sustentada assim como as respostas de célula-alvo, em organismos complexos, a alterações no ambiente interno e externo [32].

As moléculas com estruturas esteroide abrangem uma vasta gama de atividades farmacológicas. Além das ações hormonais bem características, por exemplo, esteroides sexuais, gluco e mineralocorticoides, muitos esteroides que são isolados a partir de plantas exercem uma vasta variedade de atividades farmacológicas tais como anti-oxidante, neuroprotetiva e também atividade anti-proliferativa. A última atividade mencionada é a mais investigada, especialmente em compostos

de origem natural, ou os seus análogos semi-sintéticos ou sintéticos: aproximadamente 80% dos anticancerígenos aprovados recentemente são de origem natural ou de análogos sintéticos [33].

1.2.1 Os esteroides e a sua aplicação no cancro

O desenvolvimento de terapias anti-cancerígenas utilizando esteroides tem sido uma estratégia importante, tendo surgido várias moléculas emergentes. Modificações semissintéticas ao nível da síntese de alguns destes compostos resultam, por vezes, num melhor análogo citotóxico [34].

Muitos esteroides exibem propriedades anti tumorais através da ligação a recetores esteroides, bem como podem atuar, nomeadamente, como agentes alquilantes. Alguns esteroides hormonais têm-se demonstrado ativos contra a neoplasia coloretal, da mama e noutros órgãos [35]. Alguns desses esteroides anticancerígenos são inibidores enzimáticos, nomeadamente inibidores da aromatase e de sulfatases, úteis no tratamento do cancro da mama [36].

A maioria dos fármacos com estrutura esteroide são preparados por semissíntese a partir de matérias-primas naturais, com núcleo esteroide, provenientes de plantas como por exemplo do género *Dioscorea* [37]. Destas plantas, extrai-se a saponina dioscina, da qual se obtém o esteroide espirostano diosgenina, que é usado como um importante precursor sintético industrial dos fármacos esteroides.

1.3 A diosgenina

A diosgenina é estruturalmente similar ao colesterol e outros esteroides. Desde a sua descoberta, a diosgenina é o precursor principal na produção de esteroides sintéticos na indústria farmacêutica, servindo de importante material de partida para a produção de corticosteroides, hormonas sexuais, contraceptivos orais, entre outros [38, 39].

Descoberta pela primeira vez por *Fujii e Matsukawa* em 1935, a diosgenina é uma sapogenina esteroide de ocorrência natural, predominantemente presente em diversas espécies vegetais dos géneros *Yams*, *Fenugreek*, *Smilax*, *Trigonella*, *Costus* e *Dioscorea* [40].

Uma característica muito importante da diosgenina é a sua vasta aplicação terapêutica em diversas doenças. Em alguns países, nomeadamente no Japão, alimentos naturais que contêm diosgenina foram divulgados como sendo eficazes, por exemplo, no tratamento de algumas doenças como a osteoporose e síndrome pré-menstrual nas mulheres [41].

1.3.1 As saponinas esteroides e a sapogenina diosgenina

As plantas constituem um extenso reservatório de produtos naturais constituindo uma base muito importante de medicamentos ao longo da história da civilização [40].

As saponinas demonstram ter um vasto leque de benefícios para a saúde e são um grupo de compostos glicosídeos, encontrados naturalmente em plantas comestíveis ou não comestíveis que são usadas como precursores de drogas na indústria farmacêutica [42]. São classificadas em glicósidos de esteroides e triterpenóides, dependendo do esqueleto carbonado. Estes tipos de compostos têm considerável importância devido às suas várias atividades biológicas, nomeadamente às suas propriedades anti-tumorais, as quais têm justificado intensas investigações [32, 33].

O nome saponina provém do latim “sapon” = sabão, sendo um grupo de gliconjugados que se dissolve em água. A estrutura das saponinas consiste numa parte oligossacarídea, formada por hidratos de carbono, como a D-glicose, D-galactose, entre outros, ligada a uma porção aglicona (não açúcar), com baixa solubilidade em água e chamada genericamente de sapogenina. Assim, a sapogenina é a porção não polar da saponina. Normalmente, a porção oligossacarídea está ligada na posição C-3 da sapogenina ou noutras posições. A porção do açúcar pode ser linear ou ramificada, contendo geralmente 2 a 5 resíduos monossacarídicos [42-44].

As saponinas existem em pelo menos 400 espécies de plantas pertencentes a 60 famílias diferentes [43]. As saponinas esteroides encontram-se principalmente em espécies dos géneros *Agavaceae*, *Discoreaceae*, *Liliaceae*, *Solaceae*, *Scrophulariaceae*, *Amaryllidaceae*, *Legminosae*, e *Rhamnaceae* [40].

As sapogeninas esteroides são biossintetizadas a partir do colesterol presente nas plantas, através de uma série de transformações que incluem designadamente hidroxilações, sendo depois glicosiladas para formar saponinas esteroides. Ao estarem presentes em tantas plantas, desconhecem-se ainda todas as enzimas e genes envolvidos nesta biossíntese [45].

Presentemente, e como já referido, a dioscina é a saponina precursora da diosgenina, a qual é uma sapogenina esteroide que tem sido utilizada como precursor para a síntese de mais de 200 tipos de fármacos hormonais esteroides [30].

1.3.2 Estrutura e características químicas gerais da diosgenina

A molécula de diosgenina (fig.4) apresenta um grupo hidroxilo e uma dupla ligação nas posições C-3 e C-5 respetivamente. Além disto, apresenta seis anéis na sua constituição: A, B, C e D (sistema ciclopentanofenantreno, característico dos esteroides) e anéis E e F. Os anéis E (tetrahydrofurano) e F (tetrahidropurano) estão fundidos na posição C-22 formando uma estrutura espiro [46].

A diosgenina não é sintetizada ou metabolicamente convertida noutra esteroide no corpo humano e tem sido considerada segura. No entanto, alguns estudos têm indicado que este composto tem efeito estrogénico em seres humanos, embora não haja provas concretas dessa ação [42].

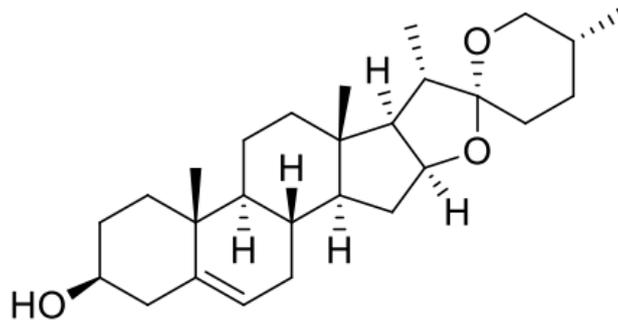


Fig. 4 - Estrutura completa da diosgenina

1.3.3 Atividades farmacológicas da diosgenina

A diosgenina é uma sapogenina esteroide conhecida há alguns anos pela sua bioatividade e, devido a isso, muitos estudos foram feitos para explorar o seu potencial interesse numa grande diversidade de condições médicas. De facto, este composto é conhecido por possuir, por exemplo, propriedades anti-inflamatórias e anti-oxidantes [47] e pode ainda ser usada nomeadamente em doenças cerebrais e sanguíneas, alergias, diabetes e obesidade [48], permite atenuar sintomas de menopausa e envelhecimento de pele, e pode ter um papel na proteção de doenças cardiovasculares (tais como trombozes e aterosclerose) [49-54] e, ainda mais importante, tem atividade anti-cancerígena [40, 55-58].

1.3.3.1 Atividade Anti-cancerígena - Mecanismos moleculares associados

O desenvolvimento de terapêuticas para o cancro a partir de compostos esteroides tem sido uma estratégia bastante explorada e diversas moléculas ativas têm emergido [34, 36]

Neste contexto, vários estudos pré-clínicos investigam os efeitos desta molécula esteroide como um agente químico preventivo/terapêutico anti-tumoral [39, 40]

Os mecanismos anti-cancerígenos de ação da diosgenina estão associados à modelação vários eventos envolvidos no crescimento celular, proliferação, diferenciação, transição epitelial-mesenquimal, migração e apoptose e angiogénese [39, 40, 59]

De facto, o efeito anti-cancerígeno da diosgenina tem sido estudado em varias linhas celulares tumorais e tem sido evidenciado que esta bioatividade depende do tipo de linha celular e da concentração do químico empregue, bem como do tempo de exposição ao mesmo. Como exemplos, a diosgenina apresenta atividade anti-proliferativa nomeadamente em células de cancro da próstata (células PC-3 e DU-145) [56], cancro do colo-retal (células HCT-116 e HT-29) [57, 60], eritroleucemia (células HEL) [61], carcinoma escamoso (células A431, Hep2 e RPMI 2650) [62], cancro hepatocelular (células HepG2 e HCC) [58, 63, 65], cancro gástrico (células BGC-823) [65], cancro do pulmão (células A549) [66], cancro da mama (MCF-7) [63, 67, 68] e na leucemia mielóide crónica humana (CML) (células K562) [58]. Mais especificamente, tem-se demonstrado que os efeitos anti-tumorais da diosgenina são mediados, nomeadamente, através da ativação de p53 (proteína supressora tumoral, mediadora de muitos sinais apoptóticos), modelação imunitária, paragem do ciclo celular, modelação das caspases-3, ativação das vias de sinalização da transcrição STAT3 (fator de transcrição), indução do TRAIL (citocinas que são produzidas e secretadas pela maioria dos tecidos normais e causam apoptose primaria em células tumorais) com os recetores de morte DR4 (conhecido como recetor do TRAIL 1) e DR5 (conhecido como recetor do TRAIL 2) [42, 58, 63, 67]

Ainda neste contexto, vários estudos importantes demonstram que a diosgenina inibe a proliferação de células do osteossarcoma, por indução da apoptose e paragem do ciclo celular na fase G1 [69] e inibe a proliferação de células do cancro da mama (células MCF-7) também através da indução da proteína de pro-apoptótica p53 e aumento dos níveis de caspase-3 [63, 70]. Também está descrito na literatura que a proliferação de células PC-3, células cancerígenas da próstata, é inibida pela diosgenina, dependendo da dose aplicada, reduzindo a migração celular e a invasão devido ao decréscimo da expressão de metaloproteínases da matriz. Este facto revela o potencial deste composto como agente anti-metástases [56].

A diosgenina também afeta o crescimento de células cancerígenas do pulmão (A549) pela capacidade de diminuir a expressão génica do gene hTERT (gene da telomerase transcriptase reversa, existe uma relação entre a elevada expressão deste gene com o aparecimento do cancro) nessas mesmas células dependendo do tempo de exposição. Portanto, esta sapogenina pode constituir uma abordagem interessante na terapia do cancro do pulmão [66, 71]. Além disso, a diosgenina induz a apoptose nas células HEL (eritroleucemia) a qual está relacionada com o aumento da expressão da COX-2 (*prostaglandin-endoperoxide synthase - 2*). Esta indução da apoptose é acompanhada pelo aumento do rácio de Bax/Bcl-2 (principais membros da família Bcl-2 que desempenham um papel fundamental na progressão do tumor ou a inibição do mesmo através da via apoptótica intrínseca), proteínas que aumentam a expressão da caspase-3, induzindo a apoptose, clivagem da PARP (Poly (ADP-ribose) (proteína envolvida numa série de processos celulares que envolvem principalmente a reparação do ADN e morte celular programada) e fragmentação do ADN [72, 73].

Nas células K562 (células da leucemia mieloide crónica), que apresentam um défice da COX-2, a diosgenina intervém na inibição da ligação nuclear do NF-KappaB (fator de transcrição) ao ADN, e consequente ativação da via p38 MAPK (proteína cinase ativada por mitogénio), envolvidos na mediação da sinalização em cascata para que haja indução da fragmentação do ADN [74]. As mitocôndrias desempenham papéis fundamentais que integram diversos estímulos apoptóticos através da via apoptótica nuclear intrínseca via do núcleo intrínseca. O controlo de apoptose é regulado pelas proteínas da família Bcl-2, que incluem as proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL e pró-apoptótica Bax e Bak. A apoptose induzida por estímulos extracelulares e internos, tais como danos no ADN ocorre principalmente através da via mitocondrial, com perturbação da membrana interna mitocondrial como um evento precoce. Assim, outros autores também demonstraram que este esteroide inibe a proliferação de linhas celulares leucémicas por via da paragem do ciclo celular em G2/M e induz a apoptose, com um aumento da caspase-3 e um declínio na concentração de Ca^{2+} intracelular que fez com que houvesse hiperpolarização e despolarização do potencial da membrana mitocondrial. Na progressão da apoptose houve produção de ROS (espécies reativas de oxigénio) e a proteína Bax, pró-apoptótica, foi regulada positivamente [75].

Nas células cancerígenas hepatocelulares (HCC) humanas, a diosgenina inibe a via de sinalização STAT3, levando à supressão da proliferação celular e à síntese de quimiocinas e, consequentemente, à paragem do ciclo celular na fase G1, induzindo assim a apoptose através da ativação das caspases-3 e clivagem da PARP [76]. Também já foi provado nas mesmas células que a diosgenina leva à paragem do ciclo celular na fase G2 [65]. Nas células hepáticas HepG2, este esteroide induz a apoptose através da família de proteínas Bcl-2 (Bcl 2, bax e bit), proteína pro-apoptóticas, mediada através da via mitocondrial apoptótica dependente da caspase-3. Além disto, a diosgenina também gera ROS e leva ao *stress* oxidativo, que pode induzir apoptose [58].

A diosgenina atua nas linhas celulares do adenocarcinoma do colon rectal (HT-29), levando à indução da apoptose através do aumento da expressão de TNF (fator de necrose tumoral) [57].

A nível da metastização, foi demonstrado que a diosgenina inibe a migração de células do cancro da mama (MDA-MB 231), pelo menos parcialmente, através da supressão da atividade da proteína Vav2 [77].

A angiogénese é um processo essencial no desenvolvimento tumoral, uma vez que com a formação de novos vasos sanguíneos há maior capacidade invasiva e consequente metastização de tumores sólidos. Esta é dependente da ação de fatores angiogénicos principalmente do VEGF (fator de crescimento endotelial vascular). Neste contexto, foi reportado que a expressão de VEGF nas células PC-3 é reduzida pela diosgenina, dependendo da concentração, sugerindo-se que este esteroide pode inibir o processo de angiogénese [77].

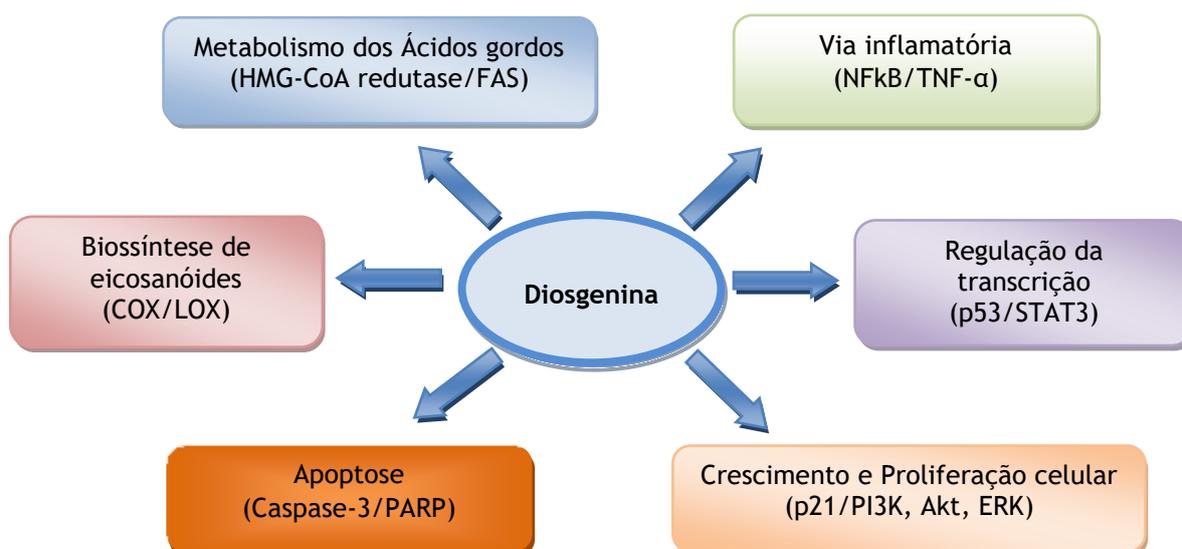


Fig. 5 - Representação esquemática do mecanismo plausível das ações da diosgenina a nível celular como um agente terapêutico anti-cancerígeno. Diosgenina regula negativamente ou positivamente vários candidatos moleculares associados à proliferação celular e crescimento, apoptose, regulação da transcrição, metabolismo de ácidos gordos, via inflamatória e biossíntese eicosanóide levando à morte das células tumorais, (Adaptado de [137]).

Todos estes resultados demonstram o potencial interesse deste composto como um novo agente terapêutico contra vários tipos de cancro. Assim, tem havido esforços consideráveis para continuar a estudar o papel da diosgenina e dos seus análogos, assim como de possíveis combinações entre a diosgenina e outros compostos bioativos, na modelação da proliferação de vários tipos de tumores humanos. Um exemplo relevante é a combinação da diosgenina com a timoquinona, promovendo efeitos anti-proliferativos e apoptóticos sinérgicos em células cancerígenas escamosas. Esta combinação poderia ser uma estratégia nova e alternativa para combater células cancerígenas escamosas [62, 62].

Apesar de todos estes resultados benéficos e potenciais, mais estudos em animais são necessários para poder passar a ensaios clínicos em humanos de forma a comprovar a segurança e eficácia da aplicação de diosgenina de como um agente preventivo e potencial quimioterápico na prática clínica.

1.3.3.2 Atividade anti-inflamatória

Os esteroides também são uma classe muito importante de agentes anti-inflamatórios. Entre outras ações, inibem a resposta imune através da inibição do NF- κ B (complexo proteico que desempenha funções como fator de transcrição) e da supressão de citocinas pró-inflamatórias. Estes compostos inibem também a produção de prostaglandinas e leucotrienos. [78].

A família dos fatores de transcrição NF- κ B é cada vez mais reconhecida por ter um papel crucial na resposta a estímulos de citocinas, radicais livres entre outros tendo um papel fundamental na regulação da resposta imunitária da inflamação e a sua regulação é incorreta está associada ao aparecimento do cancro. Recentemente, tem sido relatado que a diosgenina exibe atividade anti-inflamatória devido à regulação negativa da expressão de ICAM-1 (molécula de adesão intercelular 1) através da via de sinalização dos fatores de transcrição NF- κ B [78-80].

A diosgenina inibe a capacidade adesiva das VSMC (células do musculo vascular liso), através da inibição da atividade do TNF- α , mediada pela indução de ICAM-1 e VCAM-1 através da inibição da via de sinalização MAPK / Akt / NF- κ B e da produção de ROS, na aterosclerose dependente dessas moléculas. Este facto explica a capacidade deste composto para suprimir a inflamação na lesão aterosclerótica e modular a resposta imune. Além disso, o efeito de diosgenina na modulação da alergia alimentar foi investigado em ratinhos BALB / c., sendo que demonstrou um efeito supressivo na inflamação intestinal, através da supressão do ião produzido pelo anticorpo IgE, anticorpo envolvido no combate de reações alérgicas [81, 82].

1.3.3.3 Atividade anti-microbiana

A diosgenina também foi investigada como potencial agente anti-infeccioso, nomeadamente contra fungos, bactérias, protozoários e vírus. Em relação às leveduras patogénicas, *Candida albicans*, *C.glabrata* e *C.tropicalis* verificou-se que este esteroide apresenta baixa atividade antimicrobiana [83, 84]. Adicionalmente, a diosgenina também tem efeito fraco ou nulo no que diz respeito aos fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma harzianum* e *Fusarium oxysporum*. Por outro lado, esta sapogenina exibe uma ação significativa contra várias bactérias patogénicas gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cerus*, *Staphylococcus aureus* e *Staplylococcus epidermidis*) e gram-negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella typhi*) [85].

Além disso, a diosgenina revelou ser uma molécula de elevado interesse em algumas doenças virais. De facto, devido à sua atividade anti-oxidante, a diosgenina pode ser útil em pacientes portadores de HIV com demência [58]. Em adição, este esteroide exibe atividade antiviral contra o vírus da Hepatite C (HCV) em estudos *in vitro*. Uma vez que a diosgenina pode reduzir o colesterol plasmático e o HCV requer colesterol para uma replicação eficiente, este efeito pode ser associado à inibição de replicações virais [86].

1.3.3.4 Atividade na diabetes e obesidade

De acordo com vários estudos *in vitro*, foi demonstrado que este esteroide pode ser benéfico no que diz respeito à proteção contra doenças metabólicas, tais como a diabetes e a obesidade [48, 51, 87, 88], síndrome metabólico [89] e dislipidemia, incluindo hipercolesterolemia [42, 53, 90, 91].

De facto, a diosgenina pode ser útil em tratamentos de diabetes nomeadamente devido a promover a diferenciação de adipócitos e a inibição da inflamação em tecidos adiposos. Neste contexto, em modelos experimentais, foi observado que a diosgenina leva a redução de triglicéridos no plasma em ratos diabéticos obesos [63, 87, 92] [93]. Além disso, os mecanismos de ação associados à diosgenina na melhoria da diabetes, induzida experimentalmente, incluem a restauração da funcionalidade de células beta pancreáticas, regulação negativa de enzimas envolvidas na gluconeogénese hepática e exportação da glicose [94, 95].

Este composto também tem efeito positivo nas disfunções endoteliais associados à resistência de insulina através da ativação de IKK β /IRS-1 (substrato recetor da insulina) de uma maneira dependente portanto pode ser útil na prevenção ou tratamento de doenças cardiovasculares envolvidas na resistência à insulina e diabetes [51].

Noutro estudo, foi demonstrado que após administração de diosgenina em ratos diabéticos, a atividade da glucocinase diminuiu e a atividade de gluco-6-fosfatase e fructose-1,6-bifosfatase aumentou no fígado. Além disso, a diosgenina exibe um efeito protetor nos rins em ratos diabéticos, implicando que pode ser um potencial candidato ao tratamento de diabetes com complicações renais associadas [88].

1.3.3.5 Atividade anti-coagulante e anti-trombótica

Em modelos *in vitro* e *in vivo* foi demonstrado que a diosgenina leva à inibição da agregação de plaquetas, dependente da concentração. Este composto também prolonga o tempo de coagulação em ratos, mais uma vez de uma maneira dependendo da dose administrada [54, 82, 96]. Devido a este efeito anti-coagulante interessante da diosgenina, um pró-fármaco que consiste num derivado da diosgenina (teofilina diosgenina) foi desenvolvido para aumentar a solubilidade do fármaco e prolongar a sua circulação sistémica, causando não só uma melhor atividade anti-trombótica comparativamente à diosgenina mas também foi observada uma menor toxicidade [97].

1.3.4 Derivados da diosgenina e a sua ação anti-cancerígena

Análogos da diosgenina como a dioscina, protodioscina, e metil protodioscina mostraram, em estudos anteriores, citotoxicidade em células do glioma de rato (células C6) e em células K562 da leucemia mielóide humana. Nestas últimas células, estes análogos apresentaram IC₅₀ de 1,0 μ M (dioscina), 1,6 μ M (pro-dioscina) e 1,6 μ M (metil protodioscina), o que comprova a sua citotoxicidade relevante [42, 98]. De forma a avaliar o potencial anticancerígeno da protodioscina, esta foi testada *in vitro* em 60 linhas celulares cancerígenas diferentes no programa de um *screening* de fármacos anticancerígenos nos Estados Unidos. Este composto revelou ser citotóxico para a maioria das linhas celulares leucémicas e tumores sólidos, apresentando 50% de inibição do crescimento celular a \leq 2,0 μ M na linha celular leucémica MOLT-4, em duas linhas celulares do cancro coloretal (HCT-116 e

SW-620), numa linha celular do cancro do sistema nervoso central (SNB-75), numa linha celular de um melanoma (LOX IMVI) e numa linha celular renal (786-0) [42, 99]. Além disto, a metil protodioscina demonstrou efeitos citotóxicos importantes nas células MCF-7 [42, 100, 101].

O derivado oxidado diosgenona bem como os seus análogos 26-cianoselenopseudodiosgenona e 26-tioacetilpseudodiosgenona, entre outros, foram estudados anteriormente e avaliados os seus efeitos anticancerígenos em células do cancro colorectal, HCT 116. Neste estudo, observou-se que os pseudo derivados da diosgenona demonstraram ter melhores efeitos do que a própria diosgenona, com $IC_{50}=26\mu M$ e enquanto que a diosgenona obteve, nestas células um $IC_{50} > 100\mu M$ [102].

Além disto, alguns estudos têm demonstrado que a ação antitumoral da diosgenina pode estar relacionada com os anéis heterocíclicos E e F, bem como com a sua dupla ligação C5=C6. Além disso a conformação em C5 e em C25, também parecem importantes para a suas ações biológicas. No entanto, não há muitos estudos neste contexto, o que justifica que se continuem a preparar e avaliar análogos da diosgenina, o que constitui o tema central da presente dissertação.

1.3.5 Recentes aplicações terapêuticas da diosgenina e de alguns derivados

Como potencial aplicação terapêutica, existe uma novidade relativamente recente que é a integração da diosgenina em nano partículas, nomeadamente com o propósito de direcionar a molécula para o local alvo de ação e aumentar a sua biodisponibilidade farmacológica. A integração da diosgenina também pode ter um papel na constituição das próprias nanopartículas, e pode ser integrada em conjunto com outros fármacos para permitir efeitos sinérgicos no ataque ao tumor.

Assim, concretamente, a diosgenina já foi internalizada em nano partículas de óxido de ferro (fig. 6), em nano partículas de ferrite de manganês e melhora a funcionalização de nanopartículas de ouro e de prata [103-106]. Além disso, foram desenvolvidas nanopartículas contendo combinações de tamoxifeno e diosgenina [103], ou ácido cítrico com diosgenina [105] como possíveis terapias do cancro da mama. A encapsulação de diosgenina em IONPs (nanopartículas de óxido de ferro) melhorou o efeito anti-proliferativo contra linhas celulares do cancro da mama em comparação com a administração de diosgenina isolada [105].

Dai Lin *et al.*, produziu nanopartículas de polietilenoglicol contendo diosgenina e o fármaco anticancerígeno HCPT (*hydroxycamptothecin*) com sucesso no que consta à facilidade de preparação, formulação uniforme, tamanho apropriado, alta capacidade de carga de fármacos e boa estabilidade. Estas nanopartículas foram testadas experimentalmente em células do cancro do pulmão, observando-se efeitos sinérgicos relevantes [107]. Além disso, neste contexto, também Prashanth kumar *et al.*, prepararam, caracterizaram, e avaliaram nanopartículas de polietilenoglicol contendo a diosgenina combinada com tamoxifeno, como um promissor sistema de libertação de fármacos para a terapia de cancro, neste caso cancro da mama [103].

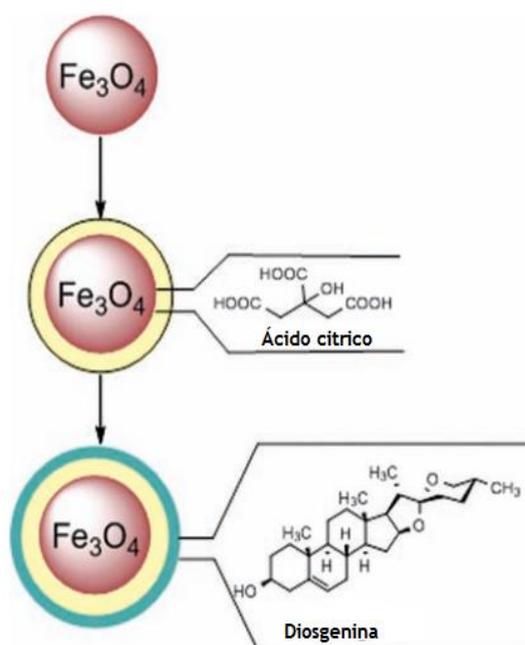


Fig. 6 - Representação esquemática da síntese passo a passo de IONPs-D; (Adaptado de [105])

Capítulo 2 - Justificação do tema e Objetivos

Pelo facto de o cancro ser das doenças com maior prevalência na nossa sociedade e por apresentar, em alguns tipos de cancro, uma crescente taxa de mortalidade, tem-se tornado cada vez mais relevante o descobrimento de novos agentes anticancerígenos promissores no que respeita à sua eficácia terapêutica e segurança.

Como já foi referido anteriormente, vários esteroides, mais propriamente a diosgenina e vários dos seus derivados têm sido estudados ao longo destas últimas décadas por apresentarem características anti-tumorais interessantes.

Assim, com este trabalho pretendeu-se desenvolver compostos oxidados da diosgenina, purificá-los com as técnicas adequadas e caracterizá-los corretamente para à posteriori observar a sua possível aplicabilidade como possíveis agentes anti tumorais em diferentes linhas de células cancerígenas.

2.1 Objetivos gerais

O principal objetivo desta dissertação consistiu em sintetizar e avaliar biologicamente compostos derivados oxidados da diosgenina em diferentes tipos de células a fim de se encontrar um ou mais possíveis agentes anti-cancerígenos.

2.2 Objetivos Específicos

Para atingir o principal objetivo, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Síntese química de derivados oxidados da diosgenina, purificação e caracterização estrutural parcial dos mesmos;
- Avaliação da ação anti-proliferativa em diferentes linhas celulares cancerígenas humanas, tais como do adenocarcinoma da próstata sensíveis a androgénios (LNCaP), células do adenocarcinoma da próstata não sensíveis a androgénios (PC-3) e células epiteliais do adenocarcinoma mamário metastático (MCF-7). Esta avaliação de viabilidade celular foi efetuada através do ensaio de brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT);
- Análise qualitativa do efeito dos compostos a nível da morfologia celular;
- Análise de viabilidade celular mediante citometria de fluxo.

Capítulo 3 - Materiais e Métodos

3.1 Síntese Química

3.1.1 Reagentes e solventes

Todos os solventes e reagentes utilizados que foram adquiridos comercialmente foram usados conforme recebidos.

Para a realização dos procedimentos de síntese química foram utilizados os seguintes reagentes: a diosgenina (*Sigma aldrich* e *Alpha aesar*), o sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) adquirido à *Panreac*, o anidrido acético (Ac_2O) adquirido a José Santos, o 4 (demetilamino) piridina (DMAP) (*Sigma aldrich*), o bicarbonato de sódio (NaHCO_3) (*Fischer scientific*), o ácido 3-cloroperoxibenzóico (MCPBA) (*Sigma aldrich*), o trióxido de crómio (CrO_3) (*Panreac*) e ácido sulfúrico (H_2SO_4)(VWR, *Prolabo*), o dióxido de selénio (SeO_2) (*Acros organics*), o *terc*-butanol (*t*-BuOH) (*Merck*), o sulfato de ferro (II) heptahidratado ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (*Sigma aldrich*), o permanganato de potássio (KMnO_4) (*Sigma aldrich*),

o *terc*-butil hidroperóxido (TBHP), 5,0-6,0M em *n*-decano (*Sigma aldrich*), o cloreto de bismuto (III) (BiCl₃) (*Fluka*), o hidróxido de sódio (NaOH) (*Vencilab*), o monoperóxido de magnésio hexahidratado (MMPP) (*Sigma aldrich*), o carbonato de sódio (Na₂CO₃) (*Panreac*), o ácido perclórico (HClO₄) (*Panreac*), o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) aquosa a 30% (*Sigma aldrich*), HCl 37% (*Carlo erbo*), e a celite (*VWR, Prolabo*).

Os solventes utilizados foram o tetrahidrofurano (THF) e 1,4-dioxano adquiridos à *Sigma aldrich*, assim como o clorofórmio deuterado (CDCl₃) e o DMSO-d₆ (dimetilsulfóxido deuterado) (utilizados para a análise RMN), o acetonitrilo à *Fluka chemika*, diclorometano, o éter dietílico, o éter de petróleo 40-60°C, o acetato de etilo, o metanol (MeOH), e a acetona, adquiridos à *Fischer Scientific*.

3.1.2 Equipamentos

As reações foram realizadas em balões de fundo redondo, em placas de aquecimento e de agitação Heidolph e a evaporação dos solventes foi efetuada com o auxílio de evaporadores rotativos da *Büchi*. Os compostos foram secos em atmosfera de vácuo na estufa *Raypa drying oven digit* e as reações foram seguidas por cromatografia em camada fina (CCF), utilizando placas de alumínio revestidas por sílica-gel (*Macherey-Nagel 60 G/UV₂₅₄*). Algumas placas foram visualizadas através da radiação UV, a um comprimento de onda de 245 nm, no leitor CN-15.LC. Sempre que necessário, para homogeneizar os compostos tanto para os analisar em RMN como para os dissolver melhor para procedimentos cromatográficos, utilizou-se o sonicador da *Branson*.

Os espectros de infravermelhos foram obtidos através de um espectrofotómetro Nicolet iS10: smart iTR, da *Thermo Scientific*, por ATR (*Attenuated Total Reflectance*) e *software* Omnic 8.2, com as seguintes definições: *background* com 64 *scans*; amostra com 32 *scans*; resolução de 4 cm⁻¹, entre 4000 e 600 cm⁻¹. Os dados obtidos deste espectro, na caracterização dos compostos, são indicados pela seguinte ordem: frequência máxima da banda de absorção ($\nu_{\text{máx}}$ em cm⁻¹) e atribuição a um grupo de átomos na molécula, no caso das bandas características.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN), de ¹H e ¹³C RMN, foram realizados no espectrómetro Bruker Avance III 400 MegaHertz (MHz) (400,13 para o espectro de protão e 100,62 para o espectro de carbono), sendo, posteriormente, processados e analisados no *software* Topspin 3.1. O solvente utilizado para dissolver os compostos para o RMN foi o clorofórmio deuterado (CDCl₃) e, em um dos casos utilizou-se DMSO-d₆ (dimetilsulfóxido deuterado). Na caracterização dos compostos, os dados obtidos nos espectros de RMN de ¹H- estão indicados pela seguinte ordem: desvio químico, δ (ppm), integração, multiplicidade do sinal [s (singleto), d (dupleto), dd (duplo dupleto), ddd (duplo duplo dupleto), t (tripleto), dt (duplo tripleto) ou m (multiplete)], constante de acoplamento [J em Hertz (Hz)], indicação do protão na molécula que originou o sinal. Os espectros de ¹³C-RMN foram realizados com desacoplamento de protão sendo apresentados os desvios químicos observados (δ , em ppm) e a indicação do carbono na molécula.

3.1.3 Procedimentos de cromatografia - visualização e purificação de produtos

Todas as reações foram monitorizadas e analisadas através da utilização de placas de cromatografia em camada fina (CCF). O/os eluentes usados nesta monitorização das reações são apresentados em cada reacção descrita, assim como as respetivas proporções (v:v), no caso de mistura de eluentes. Para visualizar algumas das placas cromatográficas, como já foi referido, utilizou-se um leitor UV a 254nm, que permitiu a observação do comportamento da reacção, quando estavam presentes compostos com absorção UV. Após a leitura UV, a placa cromatográfica foi imersa numa solução de revelação composta por uma mistura de etanol e ácido sulfúrico (95:5, v:v), seguindo-se aquecimento (cerca de 120°C) numa placa de aquecimento.

Em algumas das reações realizadas, por se obter mais que um produto principal ou porque a reacção era incompleta e o substrato permanecia, ou porque algum reagente não se consumiu totalmente, após o *workup* convencional, foi necessária a purificação através de cromatografia em coluna. Para isso, utilizou-se sílica gel (0.063-0.200 nm ou 0,035-0,070 dependendo da quantidade a purificar e da coluna a utilizar), da Merck, como fase estacionária. A proporção dos eluentes utilizados é indicada, segundo a proporção v:v, no procedimento experimental.

3.1.4 Procedimentos experimentais da síntese química

3.1.4.1 (C1) Síntese do acetato de diosgenina - Reacção de acetilação da diosgenina [108]

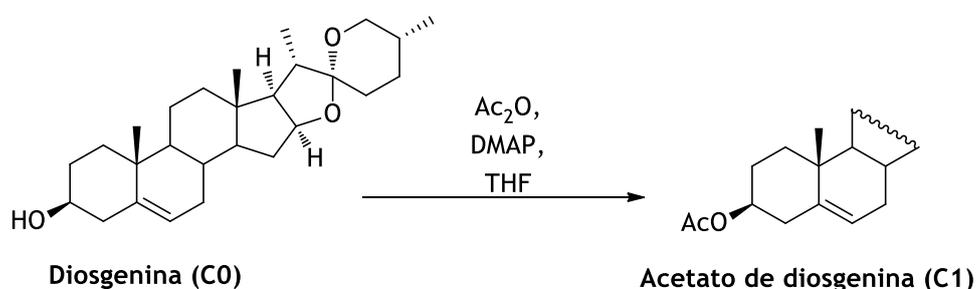


Fig. 7 - Síntese do C1.

Num balão de fundo redondo, dissolveu-se o substrato diosgenina (2mmol, 1eq., 829,26mg) em tetrahydrofurano (THF, 15,5ml), e foi depois adicionado anidrido acético (0,2ml, 1,1eq) e 4-(dimetilamino) piridina (DMAP, 0,03g). A mistura reacional foi colocada em agitação magnética (1000-1200rpm) à temperatura ambiente. Após 21h, e após a confirmação por CCF (elute: acetato de etilo/éter de petróleo 40-60°C; 1:1), que mostrou a presença de uma mancha com $R_f=0,8$,

correspondente ao produto final, e não mostrou presença de substrato, revelando que a reação estava completa, o solvente foi evaporado no evaporador rotativo.

O sólido branco resultante da evaporação do solvente foi dissolvido em CH₂Cl₂ (250ml) e procedeu-se à extração líquido-líquido. Para isso, lavou-se a fase orgânica com 30ml HCl (solução aquosa a 5%), 30 ml de solução aquosa NaHCO₃ à saturação e 30 ml de água. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro. Depois da filtração sob vácuo, o solvente orgânico foi evaporado, obtendo-se um produto final sólido, 0,9g, de cor branca com η = 97% que foi seco em estufa de vácuo.

Posteriormente, o produto foi analisado por espectroscopia de RMN [109].

¹H RMN (CDCl₃, 100 MHz) ppm: 5.31 (1H, d, J = 4.9 Hz, CH-6), 4.53 (1H, m CH-3), 4.34 (1H, m, CH-16), 3.40-3.30 (2H, m, CH₂-26), 1.96 (3H, s, CH₃COO), 0.97 (3H, s, CH₃-19), 0.90 (3H, d, J = 6.9 Hz, CH₃-21), 0.75 (6H, m, CH₃-18 e CH₃-27).

3.1.4.2 (C2) Síntese da diosgenona - Reação de oxidação da diosgenina pelo reagente de Jones [110]

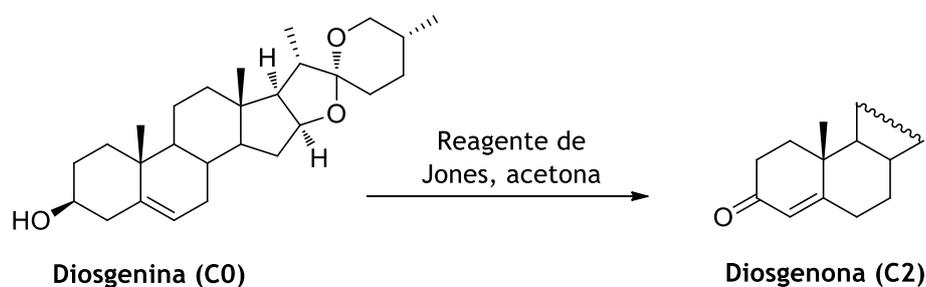


Fig. 8 - Síntese do C2.

Dissolveu-se, num balão de fundo redondo, o substrato diosgenina (0,5mmol, 207mg) em acetona (27,3ml) e colocou-se a solução em gelo, 0°C. De seguida, adicionou-se, com muito cuidado, gota a gota o reagente de Jones, até a mistura reacional ficar laranja e permaneceu em agitação (700/800 rpm), durante (1-2h) no gelo. Após a confirmação por observação de CCF (eluente: acetato de etilo/éter de petróleo 40-60°C; 1:1, v:v), que mostrou a presença de uma mancha com R_f=0,8, correspondente ao produto final, e não mostrou presença de substrato, revelando que a reação estava completa, adicionou-se depois à temperatura ambiente, 5 a 10 ml de metanol, tornan

do a mistura reacional verde escura. O metanol e acetona foram evaporados no evaporador rotativo. Ao produto foram adicionados 150ml de acetato de etilo, e a fase orgânica foi lavada com 20ml de solução aquosa saturada de cloreto de sódio (*Brine*) e seca com Na₂SO₄ anidro. Depois de filtrada a fase orgânica, o solvente orgânico foi evaporado, obtendo-se um produto sólido amarelo.

O reagente de Jones utilizado como oxidante nesta reação foi preparado da seguinte forma:

A 2,7g de CrO₃ (trióxido de crômio) adicionou-se 2,3ml de H₂SO₄ muito devagar e 10ml de água.

Posteriormente, o produto foi analisado por espectroscopia RMN. Uma vez que se detetaram algumas impurezas, houve necessidade de o purificar através de cromatografia em coluna de sílica, (eluente: acetato de etilo/éter de petróleo 40-60°C, 1:1, v:v) da qual se obteve 0,07g de produto final, η=57%. Após uma segunda análise RMN, concluímos que o produto final já se encontrava puro:

¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) ppm: 6.12(1H, s, CH-4), 4.43 - 4.30 (2H, m, CH-16), 3.41-3.31 (2H, m, CH₂-26), 2.68 - 2.56 (1H, m), 1.12 (3H, d, J = 4.8 Hz, CH₃-19), 0.92 (3H, t, J = 6.7 Hz, CH₃-21), 0.77 (3H, s, CH₃-18)

¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz) ppm: 202,29, 199,78, 126,11, 109,78, 80,74, 67,37, 62,35, 56,72, 51,32, 47,27, 42,13, 40,94, 40,22, 39,61, 35,96, 34,41, 34,13, 31,95, 31,78, 30,71, 29,20, 21,17, 18,05, 17,78, 16,81, 16,74, 14,94.

IV (cm⁻¹): 2925, 2870, 2854, 1688, 1614, 1455, 1375, 1340, 1263, 1219, 1175, 1157, 1119, 1093, 1079, 1050, 1006, 994, 979, 964, 916, 898, 866, 796, 759, 675.

3.1.4.3 (C3) Síntese do 7-oxodiosgenina acetato - Reação de oxidação alílica do acetato de diosgenina [111-113]

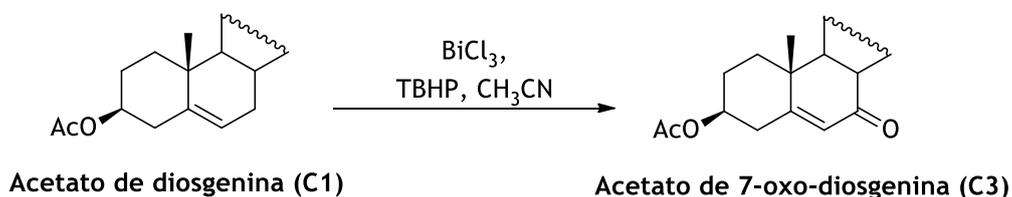


Fig. 9 - Síntese do C3.

Num balão de fundo redondo, dissolveu-se o substrato acetato de diosgenina, (0,5mmol, 228mg) em acetonitrilo (3ml). Depois adicionou-se 0,9ml de TBHP e 0,016g do catalisador BiCl₃. Este sistema reacional foi colocado em agitação (700 rpm), a 70°C.

Após a confirmação por observação de CCF (eluente: acetato de etilo/éter de petróleo 40-60°C; 1:2), que mostrou a presença de uma mancha com $R_f=0,7$, correspondente ao produto principal, e que também mostrou a presença de uma mancha com absorção UV correspondente a um co produto e a ausência de substrato, a reação considerou-se completa, depois de 24h desde o início. Depois de terminada, colocou-se a mistura reacional em contacto com uma solução aquosa de sulfito de sódio (Na_2SO_3) a 10%, durante duas horas. De seguida, procedeu-se à extração com éter dietílico (3x50ml) e lavou-se a fase orgânica com 30 ml de solução aquosa de NaHCO_3 à saturação e 30 ml de água. A fase orgânica foi seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e evaporada em evaporador rotativo, obtendo-se um sólido branco, 0,26g, que foi seco em estufa de vácuo.

Após análise por ^1H RMN, conseguimos observar os sinais corretos do produto principal, mas a caracterização do co produto obtido foi impossível. Decidiu-se usar este produto, mesmo estando impuro, na reacção descrita na secção 3.1.4.4.

3.1.4.4 (C4) Síntese da 7-oxodiosgenina - Reação de hidrólise alcalina do acetato de 7-oxodiosgenina [111-113]

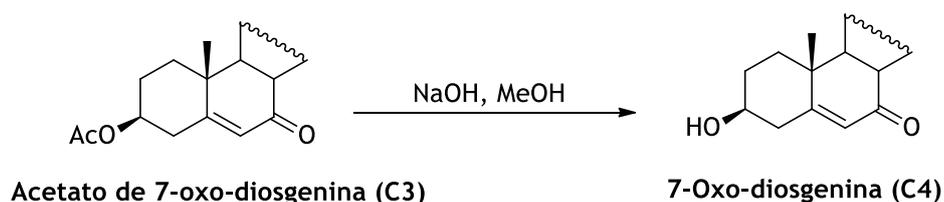


Fig. 10 - Síntese do C4 a partir do C3.

Dissolveu-se, num balão de fundo redondo, o acetato de 7-oxodiosgenina, (cerca de 0,25mmol, 117,9mg) em 2ml de metanol (MeOH), à temperatura ambiente, sob agitação magnética (500rpm). De seguida, adicionou-se 268µl de uma solução aquosa de NaOH.

Ao controlar a reação por CCF (eluente: acetato de etilo/éter de petróleo 40-60°C; 1:2, v:v), verificou-se que estava completa ao fim de 6h, tendo o substrato sido praticamente consumido, observando-se uma mancha com absorção no UV que ficou amarela após revelação com ácido sulfúrico, com R_f de 0,39.

Após ter sido parada, a mistura reacional foi concentrada no evaporador rotativo por evaporação do metanol. De seguida, num erlenmeyer, adicionou-se 10ml de diclorometano e 5ml de água e o produto e esta mistura ficou em agitação durante 2h. No final, extraiu-se a fase aquosa com 2x62,5ml

de acetato de etilo. A fase orgânica foi seca em Na_2SO_4 anidro, filtrada e evaporada, obtendo-se o composto que, depois de purificado por cromatografia em coluna com o eluente acetato de etilo/éter de petróleo 40-60°C; 1:2, originou 0,03g, $\eta=28\%$, do produto final, óleo, que foi seco em estufa de vácuo.

Após análise por RMN e IV, conseguimos observar os sinais corretos do produto principal:

^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) ppm: 5.70 (1H, s, CH -6), 4.48 (1H, m, CH -3), 3.67 (1H, m, CH -16), 3.49-3.44 (2H, m, CH_2 -26), 3.39 (1H, t), 2.87 (1H, t) 2.55-2.48 (1H, m), 2.45-2.36 (m, 2H), 1.22 (3H, s, CH_3 -19), 0.98 (3H, d, $J=7,0\text{Hz}$, CH_3 -21) 0.8 (6H, d, $J=4,7\text{Hz}$, CH_3 -18 e CH_3 -27)

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 100 MHz) ppm: 202,17, 165,82, 126,36, 109,67, 81,40, 70,90, 67,26, 61,54, 50,24, 49,94, 45,33, 42,31, 42,03, 41,41, 39,17, 38,87, 36,79, 34,17, 31,89, 31,60, 30,78, 29,25, 21,41, 17,79, 17,59, 16,90, 15,11.

IV (cm^{-1}): 3500, 3387, 3250, 2927, 2875, 2160, 1737, 1670, 1632, 1457, 1376, 1359, 1342, 1296, 1265, 1240, 1227, 1182, 1132, 1094, 1066, 1039, 1007, 994, 978, 954, 918, 899, 861, 841, 826, 788, 756, 667, 624.

3.1.4.5 (C5) Síntese de 4 β -hidroxidiosgenina - Reação de 4-beta-hidroxilação da diosgenina [114]

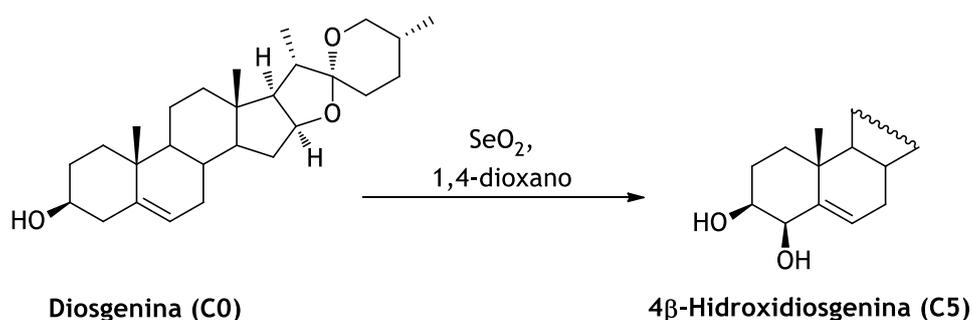


Fig. 11 - Síntese do C5.

Dissolveu-se, num balão de fundo redondo, o substrato diosgenina (0,5mmol, 207mg) em 3,12ml de 1,4-dioxano e adicionou-se 625 μl de H_2O , ou seja, numa proporção de 5:1 de 1,4-dioxano/ H_2O . De seguida, adicionou-se 0,195g de SeO_2 . Esta reação decorreu a 80°C, sob agitação magnética (600rpm).

Ao controlar a reação por CCF (eluente: acetato de etilo/éter de petróleo 40-60°C; 3:1), verificou-se que, após 18h, a reação estava completa, observando-se uma mancha principal, correspondente ao produto pretendido, com Rf de 0,6. Após o término da reação, adicionou-se um pouco de éter dietílico ao balão para se poder transferir a mistura reacional para um sistema em coluna de celite, fazendo-se seguidamente filtração sob vácuo e lavagem com mais 140ml de éter dietílico. Desta forma pretendeu-se reter o sólido formado na reação e outras impurezas na celite. A fase orgânica foi lavada com 2x40ml de solução saturada de cloreto de sódio (Brine) e seca com Na₂SO₄ anidro. Depois de filtrada, a fase orgânica foi evaporada em evaporador rotativo e obteve-se um óleo laranja o qual foi seco em estufa de vácuo.

Como por observação por CCF, se observou mais que um produto além do produto pretendido, houve necessidade de purificação deste composto (C5) através de cromatografia em coluna de sílica, eluente acetato de etilo/éter de petróleo 40-60°C; 1:2, obtendo-se 0,07g, η=33% de produto final, um sólido branco, pós coluna.

Após análise por RMN e IV, conseguimos observar os sinais corretos do produto principal:

¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) ppm: 5.66 (1H, dd, *J* = 5.0Hz, CH-6), 4.40 (1H, m, CH-16), 4.13 (1H, d, *J* = 3.7 Hz, CH-3), 3.54-3.46 (2H, m, CH₂-26), 3.36 (1H, t, *J* = 10.9 Hz), 1.19 (3H, s, CH₃-19), 0.96 (3H, d, *J* = 6.9 Hz, CH₃-21), 0.78 (6H, t, *J* = 3.2 Hz, CH₃-18 e CH₃-27).

¹³C-RMN (CDCl₃, 100 MHz) ppm: 142,85, 128,36, 109,32, 80,80, 77,22, 72,41, 66,86, 62,03, 56,65, 50,09, 41,61, 40,26, 39,70, 36,90, 36,16, 32,24, 31,82, 31,37, 30,29, 28,79, 25,37, 21,04, 20,34, 17,14, 16,30, 14,52.

IV (cm⁻¹): 3571, 3442, 2948, 2908, 2865, 2828, 2160, 1738, 1666, 1447, 1430, 1386, 1373, 1310, 1258, 1241, 1224, 1199, 1178, 1169, 1153, 1134, 1097, 1073, 1046, 1014, 976, 961, 915, 893, 867, 836, 819, 797, 763, 748, 686, 673, 649.

3.1.4.6 (C6 e C7) Síntese do acetato de 4 β -hidroxiespirost-5-en-3 β -ilo (C6) e do acetato de 6 α -hidroxiespirost-4-en-3 β -ilo (C7) - Reação de oxidação do acetato de diosgenina com SeO₂ [114]

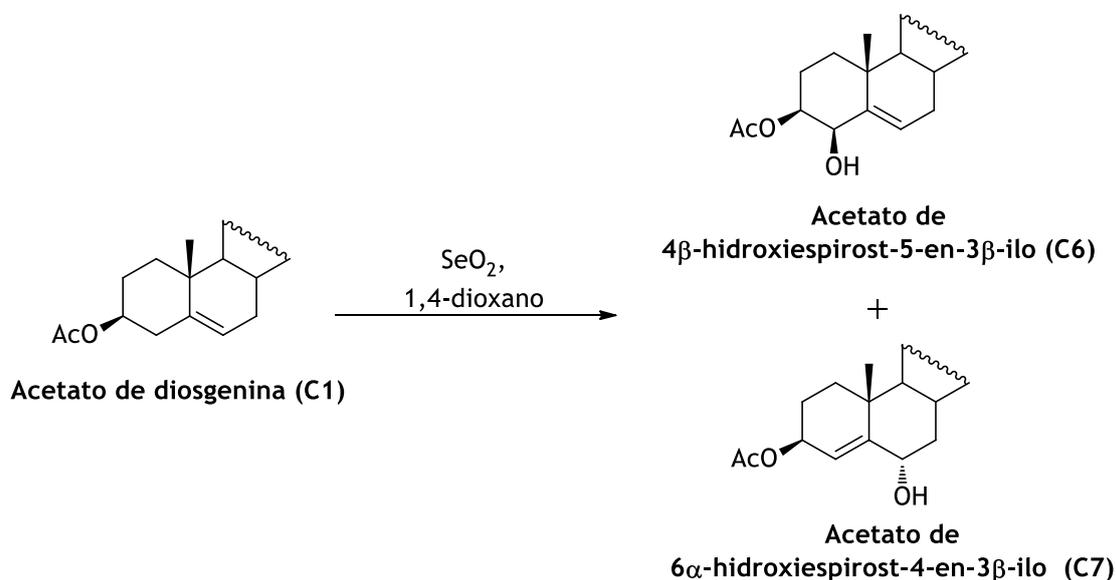


Fig. 12 - Síntese do C6 e C7 a partir do C1.

Dissolveu-se, num balão de fundo redondo, o substrato acetato de diosgenina (0,25mmol, 114mg) em 1,56ml de 1,4-dioxano e adicionou-se 312,5 μ l de H₂O, ou seja, numa proporção de 5:1 de 1,4-dioxano/ H₂O. De seguida, adicionou-se 0,097g de SeO₂. Esta reação decorreu a 80°C, sob agitação magnética (600rpm).

Ao controlar a reação por CCF (eluente: acetato de etilo/éter de petróleo 40-60°C; 3:1), verificou-se que, após aproximadamente 45h, a reação estava completa, observando-se duas manchas principais com Rf's de 0,54 e 0,39, correspondentes aos dois produtos principais, e ainda uma mancha de um co produto com absorção UV. Após o término da reação, adicionou-se um pouco de éter dietílico ao balão para se poder transferir a mistura reacional para um sistema em coluna de celite, fazendo-se seguidamente filtração sob vácuo e lavagem com mais 70ml de éter dietílico. A fase orgânica foi lavada com 2x20ml de solução saturada de cloreto de sódio (*Brine*) e seca com Na₂SO₄ anidro. Depois de filtrada, a fase orgânica foi evaporada em evaporador rotativo e obteve-se um produto, óleo alaranjado, o qual foi seco em estufa de vácuo. Para podermos separar e purificar os dois compostos principais obtidos (C6 e C7), foi feita uma cromatografia em coluna de sílica, eluente acetato de etilo/éter de petróleo 40-60°C; 3:1, obtendo-se cerca de 0,03g e 0,02g de cada composto, sendo o primeiro produto um sólido amarelo e o segundo um sólido branco, com η = 25% e η = 17%.

Após análise por RMN e IV, conseguimos observar os sinais corretos dos produtos principais:

C6:

^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) ppm: 5.69 (1H, dd, $J = 4.9\text{Hz}$, CH_6), 4.75 - 4.67 (1H, m, CH_3), 4.43 - 4.37 (1H, m, CH_{16}), 4.24 (1H, dd, $J = 3.3\text{Hz}$), 3.49 - 3.44 (2H, m, CH_2 -26), 3.37 (1H, t, $J = 10.9\text{ Hz}$), 2.09 (3H, s, CH_3COO), 1.23 (3H, s, CH_3 -19), 0.96 (3H, d, $J = 6.9\text{ Hz}$, CH_3 -21), 0.78 (6H, t, $J = 3.2\text{ Hz}$, CH_3 -18 e CH_3 -27)

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 100 MHz) ppm: 129,15, 109,30, 80,78, 75,58, 75,37, 66,86, 62,04, 56,57, 50,10, 41,62, 40,26, 39,64, 36,92, 36,32, 32,21, 31,81, 31,40, 31,32, 30,30, 28,80, 21,69, 21,36, 21,05, 20,29, 17,15, 16,29, 14,53.

IV (cm^{-1}): 3467, 2948, 2904, 2871, 1731, 1451, 1376, 1258, 1167, 1094, 1078, 1047, 1015, 980, 962, 919, 898, 864, 796, 668.

C7:

^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) ppm: 5.83 (1H, dd, $J = 5.0\text{Hz}$), 5.38 (1H, dd, $J = 3.6\text{Hz}$, CH_6), 4.40 (1H, ddd, $J = 8.6\text{Hz}$, CH_3), 3.63-3.46 (2H, m, CH_2 -26), 3.37 (1H, t, $J = 10.9\text{ Hz}$), 2.07 (3H, s, CH_3COO), 1.11 (3H, s, CH_3 -19), 0.97 (3H, d, $J = 6.9\text{ Hz}$, CH_3 -21), 0.79 (6H, d, $J = 5.8\text{ Hz}$, CH_3 -18 e CH_3 -27).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 100 MHz) ppm: 171,16, 138,81, 110,98, 109,31, 80,75, 79,23, 71,70, 62,03, 56,56, 50,09, 40,23, 39,65, 36,14, 32,21, 31,38, 31,18, 30,30, 28,80, 20,37, 17,14, 16,25, 14,53.

IV (cm^{-1}): 3460, 2951, 2941, 2926, 2910, 2888, 2875, 1733, 1703, 1667, 1453, 1426, 1372, 1341, 1259, 1239, 1174, 1157, 1133, 1088, 1069, 1047, 1019, 976, 963, 919, 894, 867, 839, 797, 763, 746, 674, 637, 618.

3.1.4.7 (C8) Síntese de acetato de 5 β ,6 β -epoxidiosgenina- Reação de epoxidação do acetato de diosgenina com KMnO₄ [115, 116]

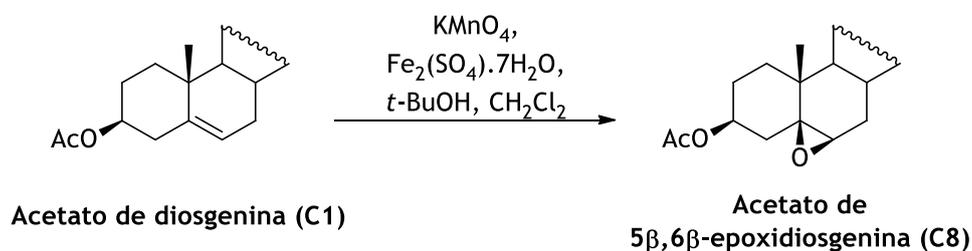


Fig. 13 - Síntese do C8 a partir do C1.

Num balão de fundo redondo, dissolveu-se o substrato acetato de diosgenina (0,25mmol, 114mg) em 3,23 ml de CH₂Cl₂. Por outro lado, misturou-se muito bem, num almofariz, os sais permanganato de potássio (KMnO₄) e (Fe₂(SO₄).7H₂O), 0,215g e 0,107g respetivamente. De seguida, adicionaram-se os sais misturados no balão da reação. Adicionou-se ainda 53,65 μ l de água e de seguida, 270 μ l de *tert*-butanol (catalisador de transferência de fase). Esta reação decorreu, à temperatura ambiente e sob agitação, observando-se alteração da cor do permanganato de potássio (roxo passa para acastanhado). Ao controlar a reação por CCF (eluente: acetato de etilo/éter de petróleo 40-60°C; 1:2), verificou-se que, após aproximadamente 24h, a reação estava completa, com a presença de uma mancha característica do epóxido, com R_f de 0,8. Após o término da reação, adicionou-se um pouco de éter dietílico ao balão e fez-se filtração, sob vácuo, por uma coluna de celite (\pm 3/4cm) de forma a reter a parte sólida (sais inorgânicos) e outras impurezas da reação, lavando-se a coluna com 2x10ml de éter dietílico. De seguida, adicionou-se 200ml de éter dietílico e a fase orgânica foi lavada com 40ml de solução aquosa de NaOH a 10%, 40ml de água, e seca com Na₂SO₄ anidro. Depois de filtrada, a fase orgânica foi evaporada em evaporador rotativo e obteve-se um produto, sólido branco (0,09g), η =64%, o qual foi seco em estufa de vácuo.

Esta reação foi posteriormente repetida, em maiores quantidades, para depois utilizar este composto (C8), como substrato para a reação descrita em 3.1.4.8.

O produto final foi analisado por espectroscopia de RMN e IV.

¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) ppm: 4.77 (1H, m, CH-3), 4.38 (1H, m, CH-16), 3.46-3.35 (2H, m, CH₂-26), 3.08 (1H, d, *J* = 2.5 Hz), 2.02 (3H, s, CH₃COO), 1.01 (3H, s, CH₃-19), 0.95 (3H, d, *J* = 7.1 Hz, CH₃-21), 0.78-0.73 (6H, m, CH₃-18 e CH₃-27).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 100 MHz) ppm: 170,56, 109,29, 80,66, 71,27, 66,86, 63,43, 62,51, 62,09, 55,89, 50,97, 41,61, 40,24, 39,79, 37,97, 36,63, 35,18, 32,59, 31,35, 30,29, 29,27, 28,78, 27,18, 21,68, 21,32, 17,13, 16,18, 14,50.

IV (cm^{-1}): 2905, 2869, 2838, 1659, 1551, 1447, 1365, 1240, 1171, 1157, 1074, 1047, 980, 962, 919, 899, 865, 812, 785.

3.1.4.8 (C9) Síntese da 5 β ,6 β -epoxidiosgenina (C9) - Hidrólise alcalina do acetato de 5 β ,6 β -epoxidiosgenina [116]

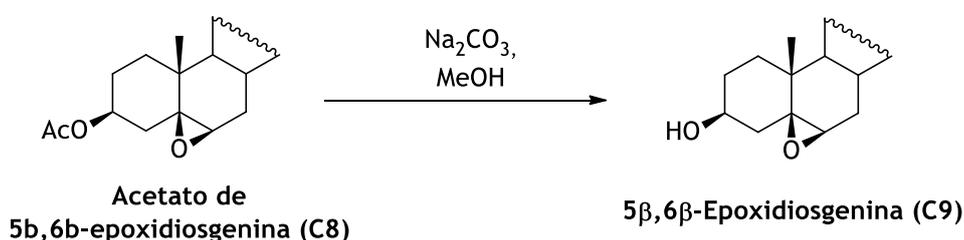


Fig. 14 - Síntese do C9 a partir C8.

Dissolveu-se, num balão de fundo redondo, o acetato de 5 β ,6 β -epoxidiosgenina (0,25mmol, 118mg) em 9,30 ml de metanol. Após 5 min em agitação (500rpm) e à temperatura ambiente, adicionou-se 0,026g de carbonato de sódio. Ao controlar a reação por CCF (eluente: acetato de etilo/éter de petróleo 40-60°C; 1:2), verificou-se que após aproximadamente 24h, a reação estava completa, com a presença de uma mancha característica do epóxido, com Rf de 0,45. Após o término da reação, procedeu-se à evaporação do solvente (metanol). De seguida, adicionou-se 100ml de acetato de etilo e a fase orgânica foi lavada com 40ml de solução saturada de NaCl, fez-se secagem com Na_2SO_4 anidro, filtração e evaporação em evaporador rotativo. O produto obtido, sólido branco, 0,11g, $\eta=73\%$, foi seco em estufa de vácuo.

Posteriormente, o produto final foi analisado por espectroscopia de RMN e IV.

^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) ppm: 4.36 (1H, m, CH -16), 3.66 (1H, m), 3.49 - 3.30 (2H, m, CH_2 -26), 3.09 - 2.84 (1H, m), 1.01 - 0.91 (3H, m, CH_3 -21), 0.80 - 0.69 (6H, m, CH_3 -18, CH_3 -27)

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 100 MHz) ppm: 107,92, 79,29, 67,97, 65,48, 62,17, 61,54, 60,70, 54,58, 49,94, 40,80, 40,22, 38,86, 38,48, 35,80, 33,63, 31,35, 30,34, 29,95, 29,62, 28,90, 27,92, 27,38, 20,38, 15,75, 14,80, 13,11.

IV (cm^{-1}): 3519, 3371, 3256, 2945, 2929, 2891, 2837, 2161, 1650, 1455, 1430, 1368, 1339, 1310, 1214, 1208, 1173, 1156, 1139, 1107, 1085, 1055, 1036, 1009, 994, 977, 960, 917, 898, 863, 819, 780, 755, 723, 700, 671.

3.1.4.9 (C10) Síntese do acetato de 5 α ,6 α -epoxidiosgenina - Reação de epoxidação do acetato de diosgenina com MMPP [117]

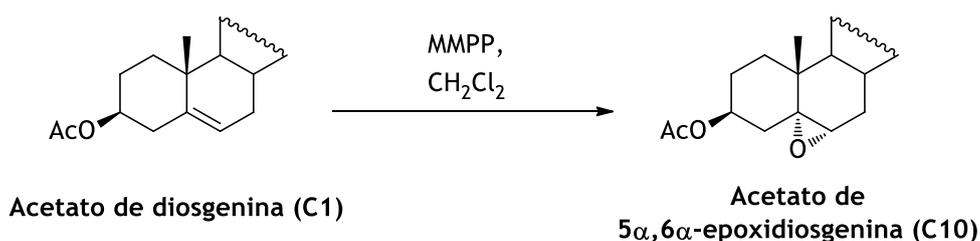


Fig. 15 - Síntese do C10 a partir do C1.

Num balão de fundo redondo, dissolveu-se o substrato diosgenina acetato (0,5mmol, 228mg) em 3,75 ml de CH_2Cl_2 . De seguida, adicionou-se 25 μl de água e 0,17g de MMPP, de uma só vez, como agente oxidante. Esta reação de epoxidação ocorreu à temperatura ambiente durante aproximadamente 24h. Por observação de CCF (eluente: acetato de etilo/éter de petróleo 40-60 $^\circ\text{C}$; 1:2), verificou-se que a reação estava completa. Observou-se uma mancha principal, correspondente ao produto epóxido pretendido, com R_f de 0,8. Após o término da reação, parou-se a mesma e arrefeceu-se, seguindo-se uma filtração e evaporação do solvente. Posteriormente, dissolveu-se o sólido branco obtido após evaporação, em éter dietílico (100ml) e lavou-se a fase orgânica com 25ml de solução aquosa de sulfito de sódio (Na_2SO_3) a 10%, 25 ml de uma solução de bicarbonato de sódio à saturação e 25ml de água. Depois de seca com Na_2SO_4 anidro e filtrada, a fase orgânica foi evaporada em evaporador rotativo e o produto final obtido (0,22g), $\eta=93\%$ sólido branco, foi seco em estufa de vácuo.

Mais tarde, houve necessidade de repetição desta reação de epoxidação, para se obter maiores quantidades de substrato para a reacção descrita em 3.1.4.10.

Posteriormente, o produto final foi analisado por espectroscopia de RMN e IV.

^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) ppm: 4.94 (1H, td, $J = 11.4\text{Hz}$, CH_3 -3), 4.37 (1H, q, $J = 7.4\text{ Hz}$, CH_2 -16), 3.51 - 3.42 (2H, m, CH_2 -26), 3.35 (1H, t, $J = 10.9\text{ Hz}$), 2.89 (1H, d, $J = 4.4\text{ Hz}$, CH_2 -6), 2.00 (3H, s, CH_3COO), 1.09 (3H, s, CH_3 -19), 0.94 (3H, d, $J = 6.9\text{ Hz}$, CH_3 -21), 0.78 (3H, d, $J = 6.2\text{ Hz}$, CH_3 -18).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 100 MHz) ppm: 170,22, 109,26, 80,62, 71,32, 66,84, 65,14, 61,86, 58,98, 56,57, 42,41, 41,59, 40,30, 36,10, 35,13, 31,64, 31,37, 30,30, 29,44, 28,95, 28,81, 27,21, 21,36, 20,42, 17,14, 16,29, 15,91, 14,50.

IV (cm^{-1}): 2950, 2936, 2869, 2159, 1726, 1455, 1367, 1240, 1167, 1155, 1139, 1094, 1073, 1047, 1033, 1009, 975, 894, 867, 796, 748, 718, 660, 614.

3.1.4.10 (C11a) Síntese de 5 α ,6 α -epoxidiosgenina - Reação de hidrólise do acetato de 5 α ,6 α -epoxidiosgenina [116]

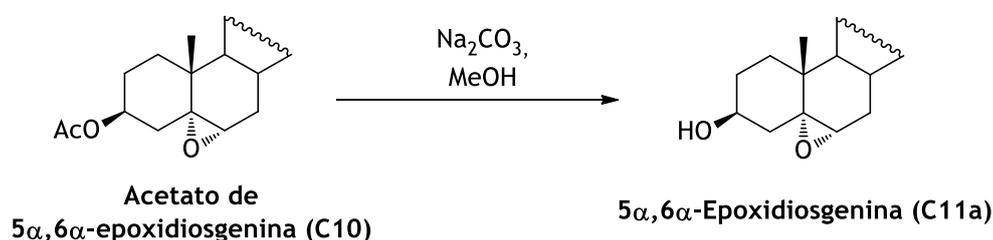


Fig. 16 - Síntese do C11a a partir do C10.

Dissolveu-se, num balão de fundo redondo, o acetato de 5 α ,6 α -epoxidiosgenina (0,25mmol, 118mg) em 9,30 ml de metanol. Após 5 min em agitação (700rpm) e à temperatura ambiente, adicionou-se 0,026g de carbonato de sódio. Ao controlar a reação por CCF (eluente: acetato de etilo/éter de petróleo 40-60°C; 1:2), verificou-se que, após aproximadamente 45h, a reação estava completa, com a presença de uma mancha característica do epóxido, com R_f de 0,45. Após o término da reação, procedeu-se à evaporação do solvente (metanol). Seguidamente, adicionou-se 100ml de acetato de etilo e a fase orgânica foi lavada com 40ml de solução saturada de cloreto de sódio, seca com Na₂SO₄ anidro, filtrou-se e fez-se a sua evaporação em evaporador rotativo. O produto obtido, 0,11g, η =73%, foi seco em estufa de vácuo.

Posteriormente, o produto final foi analisado por espectroscopia de RMN e IV.

^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) ppm: 4.38 (1H, m, CH -16), 3.90 (1H, t, $J = 10.8\text{Hz}$), 3.46-3.35 (2H, m, CH_2 -26), 3.35 (1H, t, $J = 10.9\text{ Hz}$), 2.90 (1H, d, $J = 4.3\text{ Hz}$, CH -6), 1.07 (3H, s, CH_3 -19), 0.94 (3H, d, $J = 6.8\text{ Hz}$, CH_3 -21), 0.78-0.71 (6H, m, CH_2 -18 e CH_2 -27).

^{13}C -RMN (CDCl_3 , 100 MHz) ppm: 109,26, 80,62, 68,65, 66,84, 65,66, 59,10, 56,63, 42,54, 41,57, 40,30, 39,83, 39,41, 34,98, 32,39, 31,64, 31,36, 31,07, 30,28, 29,45, 29,01, 28,80, 20,49, 17,14, 16,30, 15,99,14,49.

IV (cm^{-1}): 3400, 2927, 2872, 2159, 1659, 1449, 1377, 1241, 1174, 1154, 1095, 1049, 1007, 979, 967, 920, 898, 864, 796, 726, 615.

3.1.4.11 (C11a+C11b) Síntese de 5,6-epoxidiosgenina - Reação de epoxidação da diosgenina com MMPP [117]

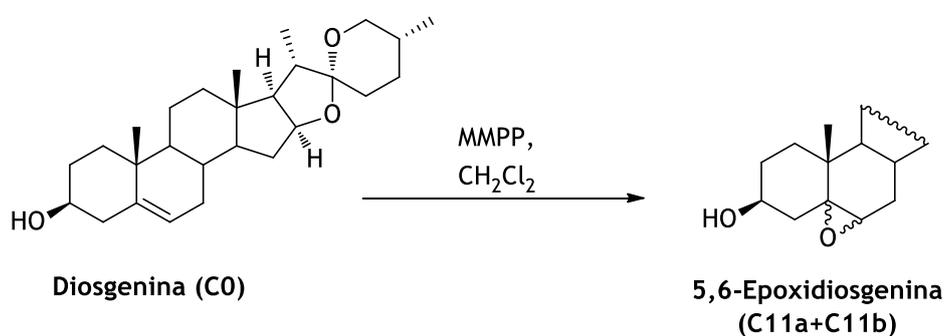


Fig. 17 - Síntese do 11 a e 11b.

Num balão de fundo redondo, dissolveu-se o substrato diosgenina (0,25mmol, 103mg) em 3,77 ml de CH_2Cl_2 . De seguida, adicionou-se 25 μl água e 0,17g de MMPP, de uma só vez. Esta reação de epoxidação ocorreu à temperatura ambiente durante aproximadamente 24h. Por observação de CCF (eluente: acetato de etilo/éter de petróleo 40-60°C; 1:2), verificou-se que a reação estava completa. Observou-se uma mancha principal, correspondente ao produto epóxido pretendido, com R_f de 0,4. Após o término da reação, parou-se a mesma e arrefeceu-se, seguindo-se uma filtração e evaporação do solvente. Posteriormente, dissolveu-se o sólido branco obtido após evaporação, em diclorometano (100ml) e lavou-se a fase orgânica com 25ml de solução aquosa de sulfito de sódio (Na_2SO_3) a 10%, 25 ml de uma solução de bicarbonato de sódio à saturação e 25ml de água. Depois de seca com Na_2SO_4 anidro e filtrada, a fase orgânica foi evaporada em evaporador rotativo e o produto final obtido (0,1g), $\eta=91\%$ sólido branco, foi seco em estufa de vácuo. A análise por RMN de próton mostrou a existência de mistura de isómeros, tal como descrito na literatura [117].

Mais tarde, o produto final desta reação de epoxidação, foi utilizado para a reação de abertura do anel epóxido (secção 3.1.4.12).

3.1.4.12 (C12) Síntese de espirostan-3 β ,5 α ,6 β -triol - Reação de abertura do anel epóxido [118]

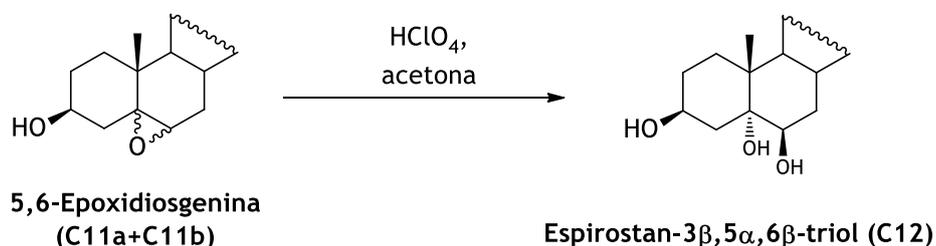


Fig. 18 - Síntese do C12 a partir do C11 a e b.

Dissolveu-se, num balão de fundo redondo, o substrato 5,6-epoxidiosgenina (0,23mmol, 90mg) em 5,21 ml de acetona. De seguida, adicionou-se 663,5 μ l de água e 94,8 μ l de ácido perclórico. Esta reação da abertura do anel epóxido ocorreu à temperatura ambiente, sob agitação (600rpm), durante aproximadamente 5h. Por observação de CCF (eluente: acetato de etilo/éter de petróleo 40-60°C; 1:2), verificou-se que a reação estava completa. Observou-se uma mancha principal, correspondente ao produto pretendido, com Rf de 0,25. Finalizada a reação, seguiu-se o *workup*, iniciando-se com a evaporação da acetona, seguida da adição de 60ml de acetato de etilo, e a fase orgânica foi lavada com 3x2,5ml de solução saturada de cloreto de sódio (Brine) e 3x2,5ml de bicarbonato de sódio. De seguida, a fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e evaporada em evaporador rotativo. O produto final, sólido branco, (0,07g), η =70%, foi seco em estufa de vácuo.

Posteriormente, o produto final foi analisado por espectroscopia de RMN e IV.

¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) ppm: 4.39 (1H, d, J = 7.3 Hz, CH-3), 4.10 (1H, m, J = 9.6, 8.4 Hz, CH-16), 3.61 - 3.43 (1H, m, CH-26), 3.37 (1H, t, J = 10.9 Hz, CH-26), 1.22 (3H, d, J = 24.3 Hz, CH₃-19), 0.96 (1H, d, J = 7.0 Hz, CH₃-21), 0.79 (3H,s, CH₃-18).

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆, 100 MHz) ppm: 108,58, 80,44, 74,47, 74,24, 66,09, 65,90, 62,09, 55,71, 44,84, 41,31, 41,08, 40,38, 38,10, 34,87, 32,22, 31,66, 31,30, 31,08, 30,03, 29,87, 28,69, 20,73, 17,30, 16,49, 16,47, 14,84.

IV (cm⁻¹): 3495, 3316, 2950, 2928, 2860, 2160, 1737, 1457, 1379, 1351, 1307, 1278, 1241, 1206, 1177, 1150, 1068 (C-O), 1057, 1043, 1027, 1008, 978, 963, 895, 865, 794, 756, 730.

Todos os espectros acima descritos nas reações realizadas encontram-se devidamente representados e analisados na secção 8.1, anexos.

3.2 Avaliação Biológica

3.2.1 Avaliação *in vitro* da atividade dos compostos derivados da diosgenina

Depois da síntese e purificação dos compostos foi avaliada a sua capacidade anti-proliferativa nas células. Os efeitos destes compostos foram comparados com os controlos positivos diosgenina e 5-fluorouracilo, nas linhas celulares do cancro da mama, cancro da próstata sensíveis (LNCaP) e não sensíveis (PC-3) a androgénios.

3.2.2 Materiais e Reagentes

Para a realização dos ensaios com células, foram utilizados o meio de cultura RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) e meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), adquiridos à Sigma Aldrich. O Soro Fetal Bovino (SFB) foi adquirido à *Biochrom AG*. Quanto aos antibióticos Ab (solução com 10,000 unidades/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomicina e 25 µg/ml de anfotericina-B) e SP (solução com 10,000 unidades de penicilina e 10mg/ml de estreptomicina), à tripsina (1 g de tripsina para 666 ml de PBS/EDTA), o brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT), o dimetilsulfóxido (DMSO) a L-Glutamina, o HEPES, o piruvato de sódio foram todos adquiridos à *Sigma Aldrich*. O corante azul de triptano (0,4%) foi adquirido à *Merck* e o bicarbonato de sódio (NaHCO₃) à *Panreac*. Para a realização dos ensaios MTT, semearam-se as células em placas de 96 wells da *Thermo Fisher Scientific*, e para a avaliação morfológica das células e citometria de fluxo utilizaram-se placas de 6 wells e 12 wells, respetivamente também da *Thermo Fisher Scientific*.

3.2.3 Equipamentos

Os equipamentos utilizados ao longo dos ensaios de avaliação biológica foram: a câmara de fluxo laminar vertical *NuAire*, de Classell, que permitiu trabalhar em condições de assepsia durante os ensaios; a incubadora *NuAire DHD* Autoflow CO₂ Air-Jacketed, permitiu manter as células a 37°C numa atmosfera humidificada, contendo 5% de CO₂; a centrífuga *Bioblock Scientific* (Sigma-3K18C), para separar as células do meio; o microscópio ótico *Olympus CKX 40/41* para observação das células; o banho de aquecimento *Fisher Scientific* para aquecimento dos meios de cultura e afins; o leitor espectrofotométrico de placas Bio-rad xmark *spectrophotometer* permitiu ler e quantificar a absorvância originada pelos cristais de formazano formados no ensaio de MTT. Para o ensaio de citometria de fluxo foi utilizado o citómetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, BD).

3.2.4 Linhas celulares

Neste estudo de avaliação biológica utilizaram-se três linhas celulares distintas, que incluíram células de adenocarcinoma da próstata sensíveis a androgénios (LNCaP), células de adenocarcinoma da próstata não sensíveis a androgénios (PC-3) e células epiteliais de adenocarcinoma mamário metastático sensíveis a estrogénios (MCF-7).

Estas células foram geralmente cultivadas em *T-flasks* de 75 cm² ou de 175 cm², incubadas sob as condições adequadas ao seu crescimento: 37°C, sob atmosfera humidificada com 5% de CO₂. A cada 2/3 dias era feita a substituição do meio de cultura e as células foram tripsinizadas e expandidas para novos *T-flasks*, quando a confluência das mesmas era alcançada.

3.2.4.1 LNCaP

As células LNCaP (*Lymph node carcinoma of the prostate*), são células epiteliais do adenocarcinoma da próstata, sensíveis a androgénios. Foram isoladas a partir de uma metástase num nódulo linfático supra clavicular esquerdo, em 1977, de um homem caucasiano de 50 anos. As células deste tipo são aderentes e podem crescer de forma isolada ou sob a forma de agregados [119-121]. Estas células foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico SP.

3.2.4.2 MCF-7

As células MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation-7*) são células epiteliais de um adenocarcinoma mamário metastático, obtidas a partir da efusão pleural de uma mulher de 69 anos, caucasiana. As MCF-7 são células aderentes, sensíveis a estrogénios e o seu crescimento é em monocamada [119, 122]. Estas células foram mantidas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico Ab.

3.2.4.3 PC-3

As células PC-3 (*human prostate cancer cell line*), são células epiteliais de um adenocarcinoma prostático de grau IV, isoladas a partir de uma metástase óssea, de um homem de 62 anos, caucasiano. São células aderentes, não responsáveis a androgénios, e o seu crescimento é em *clusters*. Este tipo celular exhibe baixa atividade de fosfatases ácidas e de testosterona-5 α -redutase [119]. Estas células foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico SP.

3.2.5 Técnicas de Cultura Celular

3.2.5.1 Preparação dos meios de cultura

Para que as células cresçam adequadamente, para cada tipo de célula é necessário um meio de cultura mais indicado, os quais estão referidos na secção 3.2.4 para cada linha celular usada no presente trabalho. Os meios de cultura foram preparados com água MiliQ, o pH foi medido através de um potenciómetro e ajustado através das soluções de 1M de HCl e NaOH. Para meio DMEM, o pH deve ser 7,4, e deve ser 7,2 para o meio de cultura RPMI. Na substituição dos meios nos *T-flaks*, na técnica de tripsinização e na adição de compostos utiliza-se meio completo enquanto que para o ensaio de viabilidade celular (ensaio MTT), utiliza-se meio incompleto. O meio de cultura completo é suplementado com SFB e os antibióticos adequados e o meio de cultura incompleto é meio sem a adição de SFB e sem adição de antibióticos.

Após a preparação de cada meio, estes foram filtrados de forma estéril, na câmara de fluxo laminar, com o auxílio do sistema de vácuo e, posteriormente foram identificados, datados e armazenados a uma temperatura de 4 a 8°C. Sempre que utilizados em ensaios ou em alguma técnica de cultura celular, os meios foram previamente aquecidos num banho de água a 37°C.

3.2.5.2 Congelamento e Descongelamento de células

As linhas celulares usadas na avaliação biológica deste trabalho estavam armazenadas em bancos de células em azoto líquido, em tubos de criopreservação e foram descongeladas à temperatura ambiente. De seguida, adicionou-se, ao falcon contendo as células, 3 ml de meio adequado completo, previamente aquecido, juntamente com o conteúdo da alíquota dos tubos de criopreservação. Depois procedeu-se à centrifugação a 1000 rpm, durante 8 minutos. O sobrenadante foi descartado com o objetivo de remover o meio com DMSO (usado na criopreservação) e o *pellet* foi ressuspensão em meio completo. Por fim, transferiu-se a suspensão celular para um *T-flask* de 75 cm², ou de 175 cm², e adicionou-se 15 ou 30 ml de meio de cultura completo e indicado para cada tipo celular. As células foram mantidas a 37°C em atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂.

Quando já não havia necessidade de utilização das linhas celulares para ensaios e era necessária a sua conservação e armazenamento, usou-se um reagente crio-protetor (como por ex: DMSO), e as células foram mantidas em azoto líquido (-180°C). Para procedermos ao congelamento, as células têm que apresentar confluência adequada para poderem ser tripsinizadas. Assim, depois de uma etapa de centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensão num volume adequado de meio de cultura completo contendo 10% de DMSO. A suspensão final foi dividida por tubos de criopreservação (1 ml por cada tubo), que foram colocados a -20°C durante 4 horas, transferidos para o -80°C cerca de 1 a 3 dias e, posteriormente, armazenados a -180°C em azoto líquido.

3.2.5.3 Tripsinização

A tripsinização é um processo que permite dissociar as células entre si e libertá-las ao mesmo tempo do suporte sólido (*T-flask*) através de uma enzima proteolítica, a tripsina, que degrada as proteínas associadas à adesão celular. Esta técnica só deve ser realizada quando as células atingem um crescimento exponencial, ou seja, cerca de 70% a 90% de confluência, dependendo, nomeadamente, do tipo de células [123].

Assim, quando as células atingiram a confluência pretendida, observada através do microscópio, utilizámos esta técnica de tripsinização.

O processo de tripsinização consistiu na aspiração do meio de cultura do *T-flask*, e lavou-se o mesmo com 10 ml de tampão fosfato salino (PBS) (90% água miliQ e 10% PBS 10x) quente, e após a aspiração deste, adicionou-se 3 ml de solução de tripsina. As células foram incubadas em contacto com a tripsina durante 3-5 minutos, para que as células aderidas se soltassem e dissociassem. Após este

tempo, observou-se as células ao microscópio para confirmação da formação da suspensão celular. No entanto, em algumas situações a dissociação das células foi difícil e recorremos muitas vezes a movimentos mecânicos para auxiliar essa dissociação. Depois deste passo, a neutralização da ação da tripsina é necessária e foi efetuada através da adição de meio de cultura completo, uma vez que este contém SFB, o qual permite esta inativação. O conteúdo foi transferido para um *falcon* para ser centrifugado a 1000 rpm durante 8 minutos. De seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado com meio de cultura completo correspondente (quantidade em ml ajustável consoante o *pellet*). A suspensão celular foi colocada em novos *T-flasks* (apenas uma alíquota, com volume e concentração celular ajustável ao tamanho do *T-flask*), ou utilizada para contagem, preparação posterior de suspensões celulares e sementeira para realização de um ensaio de viabilidade celular (ensaio MTT).

3.2.5.4 Contagem e sementeira celular

A suspensão celular resultante do último passo da tripsinização permite semear as células para depois realizar ensaios.

Primeiramente é necessário proceder à contagem do número de células para que estas possam ser semeadas na densidade adequada. Assim, retiraram-se 10 µl de solução de azul de triptano (0,4%) para um tubo *ependorf* ao qual se adicionaram mais 10 µl da suspensão celular. O conteúdo resultante foi aplicado na lamela da câmara de *Neubauer*, procedendo-se à contabilização do número de células em cada quadrante. Para o cálculo do volume a retirar da suspensão celular em estudo foi necessário calcular a média de células existentes por quadrante e multiplicar-se o valor obtido por 2 (devido à diluição das células pela adição da solução de azul de triptano). Depois, aplicou-se a fórmula de *Neubauer* para saber a concentração inicial de células para de seguida fazer a diluição adequada.

Na presente avaliação biológica, as células foram semeadas em placas *multiwells* de 96 poços e preparou-se uma suspensão celular de 2×10^4 células/ml. Esta suspensão foi colocada em 60 poços da placa (100 µl), nos poços centrais, enquanto que nos poços circundantes foi adicionado apenas água esterilizada, funcionando como os “zeros”. As placas foram incubadas durante 48 horas, para favorecer a aderência e o crescimento celular antes de proceder à aplicação dos compostos.

3.2.6 Ensaio de viabilidade celular (ensaio MTT)

O ensaio de MTT tem sido bastante utilizado para testar compostos potencialmente anticancerígenos e baseia-se na clivagem redutiva celular (através da enzima mitocondrial succinato-desidrogenase em células viáveis), do MTT (sal solúvel em água, o brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) a cristais de formazano insolúveis (cor azul-arroxeados), impermeáveis às membranas celulares sendo que se considera que a quantidade produzida é proporcional à quantidade

de células viáveis onde se acumulam estes cristais [124, 125]. Este é um teste sensível, preciso, rápido e económico. Os cristais de formazano, depois de formados, e ao serem dissolvidos, vão absorver na região do visível o que permite a sua quantificação através de espectrofotometria. Assim, este ensaio depende do número de células presentes e da atividade mitocondrial, sendo a quantidade de formazano produzida considerada proporcional ao número de células viáveis [126].

Para proceder ao ensaio propriamente dito, é necessário, dias antes, semear as células nas placas o que implica a tripsinização das células, incubá-las durante um período de tempo com os compostos em estudo, neste caso, 48h, e só depois realizar o ensaio.

É de salientar que em todos os procedimentos das técnicas de cultura celular, as condições assépticas e de segurança foram seguidas cuidadosamente, e, principalmente neste ensaio de viabilidade celular uma vez que o MTT é fotossensível e, porque deve ser manuseado cuidadosamente desde a sua pesagem, à sua adição e remoção uma vez que é um agente carcinogénico.

3.2.6.1 Preparação e incubação dos compostos

Para realizar o estudo de viabilidade celular, foram preparadas soluções mãe (10 mM) dos compostos, C2, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11a e C12, e ainda da diosgenina e da solução controlo do 5-FU (5-fluorouracilo), dissolvidos em etanol absoluto (99%) e posteriormente armazenados a 4°C.

Foram então testados os seguintes compostos nas diferentes linhas celulares:

- Diosgenina, Sigma Aldrich (Portugal);
 - Solução de 5-FU (5-fluorouracilo);
 - C2;
 - C4;
 - C5;
 - C6;
 - C7;
 - C8;
 - C9;
 - C10;
 - C11a;
 - C12.
- } 10 Compostos sintetizados,
diosgenina comercial e solução de 5-FU

Os ensaios realizados neste estudo de viabilidade celular, foram desenhados para determinação do IC₅₀ (concentração de composto que inibe 50% do crescimento celular), ou seja, foram ensaios de curva concentração-resposta. Assim, a partir das soluções mãe preparadas anteriormente foram preparadas seis soluções diluídas no respetivo meio de cultura com as concentrações de 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM, 10 µM, 50 µM, e 100 µM (fig.19). Após a sementeira, aderência e crescimento celular,

durante 48 horas foram aplicadas estas soluções com os compostos às células. Seguidamente, a placa foi novamente incubada durante 48 horas. Posteriormente realizou-se o ensaio MTT para avaliar a viabilidade celular a estas seis diferentes concentrações de compostos.

A placa continha wells com apenas meio de cultura, sem células nem compostos, que correspondeu, no ensaio de MTT, à primeira coluna da placa, dos poços B a G, inclusive, como se pode observar na fig.19, dois controlos negativos (apenas células e meio de cultura, colunas indicadas com um C) e os compostos aplicados conforme as concentrações assinaladas igualmente na fig.19.

Posto isto, após a observação das células ao microscópio, o meio de cultura foi removido dos poços e adicionadas as soluções dos compostos (n=4), conforme as concentrações assinaladas na fig.19, e nas colunas onde está representado um “C” na mesma fig.19, abaixo, foi adicionado apenas meio de cultura, representando, depois, no ensaio MTT, os controlos negativos. As células foram incubadas com os compostos durante 48 horas e, posteriormente, realizou-se o ensaio MTT para avaliar a viabilidade celular.

3.2.6.2 Ensaio de viabilidade celular propriamente dito (ensaio MTT)

Terminado o tempo de incubação das células com os compostos a avaliar, procedeu-se à aspiração cuidadosa do sobrenadante (meio de cultura) de cada poço, e à água presente nos poços da primeira coluna (de B-G, assinalado na fig.19) que funcionaram como os “zeros”. De seguida, fez-se a lavagem com PBS, e, por fim, adicionou-se, na ausência de luz, 100µL da solução de MTT a cada poço (previamente dissolvido em PBS e no meio de cultura incompleto). As placas, já com a solução de MTT adicionado, permaneceram durante um período de 4 horas em contacto com as células, numa atmosfera de 37°C em 5% de CO₂. Após o tempo de incubação, aspirou-se cuidadosamente o sobrenadante existente nos poços das placas e adicionou-se 100µL de DMSO para solubilizar os cristais de formazano, de forma a serem quantificados, obtendo-se uma solução de cor arroxeadada. Seguidamente, quantificou-se a absorvância, a 570 nm, num leitor espectrofotométrico. A intensidade da cor é diretamente proporcional à quantidade de cristais de formazano formados, sendo que, como já foi referido anteriormente, a absorvância está relacionada com o número de células viáveis no final do ensaio. No fim do ensaio, as placas são descartadas no contentor dos resíduos químicos (contentor vermelho).

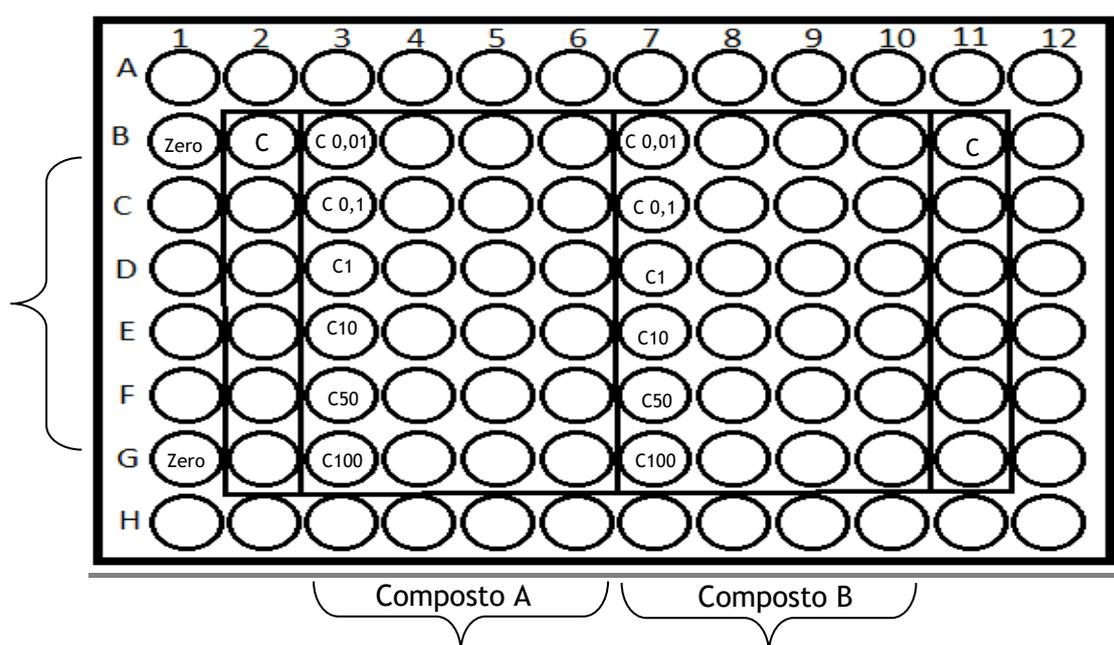


Fig. 19 - Esquema representativo das microplacas para o ensaio de curva dose-resposta, com uma gama de diferentes concentrações (μM). Foram realizados ensaios com $n=4$, para todas as concentrações.

3.2.7 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é um método que pode utilizado para avaliar a viabilidade celular. Neste estudo, o objetivo foi a análise da viabilidade celular por marcação com iodeto de propídio (IP). Para o ensaio de citometria de fluxo, utilizou-se a linha celular PC-3 e os compostos diosgenina e 5-FU, adquiridos comercialmente, e os C2 e C9, sintetizados, selecionados considerando os seus resultados em ensaios MTT. As células foram semeadas em caixas de 12 wells, numa densidade de 4×10^4 células/mL num volume de trabalho de 1mL, e incubaram-se durante 48horas. Após este tempo, foram adicionados os compostos nas concentrações de $50\mu\text{M}$ e fez-se incubação durante 24horas. Como controlo negativo utilizaram-se células não tratadas e como controlo positivo o composto 5-flourouracilo e diosgenina, também a $50\mu\text{M}$.

Após as 24 horas de incubação com os compostos, os sobrenadantes de cada poço foram recolhidos para diferentes falcons de 15mL, e de seguida lavou-se cada poço com $400\mu\text{L}$ de PBS, recolheu-se depois para os falcons com os sobrenadantes correspondente do poço e manteve-se em gelo. Entretanto, procedeu-se à tripsinização das células com $400\mu\text{l}$ de solução de tripsina e incubou-se por 5 minutos e, seguidamente, adicionou-se $400\mu\text{l}$ de meio completo frio. Por fim, obteve-se uma suspensão de células que foram colocadas nos respetivos falcons contendo já o sobrenadante anterior. De seguida, centrifugou-se durante 8 minutos a 1000 r.p.m., aspirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em $400\mu\text{l}$ de meio frio com uma solução de EDTA (agente quelante do cálcio) a 2mM. O EDTA foi adicionado de uma solução já preparada a 0,123M. Este passo foi inserido no processo de citometria de fluxo uma vez que o EDTA age como quelante, formando complexos muito

estáveis com diversos íons metálicos, essencialmente com o Ca^{2+} e Mg^{2+} , presentes nas células permitindo o desagregar das células entre si e mantendo-as em suspensão, através das suas propriedades proteolíticas sobre as proteínas intercelulares de adesão.

Da suspensão celular resultante transferiu-se 398 μl para tubos de citometria de fluxo (tubos FACS) de 5mL, seguindo-se da adição do marcador iodeto de propídeo (2 μl). Os tubos foram ligeiramente agitados, mantidos no escuro e em gelo. Posteriormente, realizou-se a aquisição de dados no citómetro de fluxo, até um total de 20.000 eventos e, para tal, utilizou-se *software* BD CellQuest Pro para a aquisição, e posterior análise de dados.

Para determinar a percentagem de células viáveis e mortas foi necessário, no *software*, determinar e definir inicialmente três regiões para excluir “debris”. Assim, a análise da marcação por iodeto de propídeo foi efetuada em *dot plots*, apresentando eventos contidos nas regiões R1, R2 e R3 definidas. Para cada composto foi realizada uma análise em triplicado, $n=3$.

3.2.8 Análise estatística

Para comparar os resultados obtidos, recorreu-se a uma análise estatística. Os resultados gráficos provenientes do ensaio de MTT foram expressos como valores médios \pm desvio padrão, e foram tratados no programa *Microsoft Excel*. A comparação entre os múltiplos grupos foi analisada pelo teste *t-Student* para determinar a existência de diferenças significativas entre as médias. Esta diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. Os valores de IC_{50} indicados foram calculados a partir da curva dose-resposta de regressão não linear, por cálculos de ajustamento sigmoide. No caso da citometria de fluxo, para comparar resultados obtidos também se recorreu a uma análise estatística, onde a comparação entre os múltiplos grupos foi analisada pelo teste ANOVA. A diferença entre as médias, foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$.

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

4.1 Síntese Química

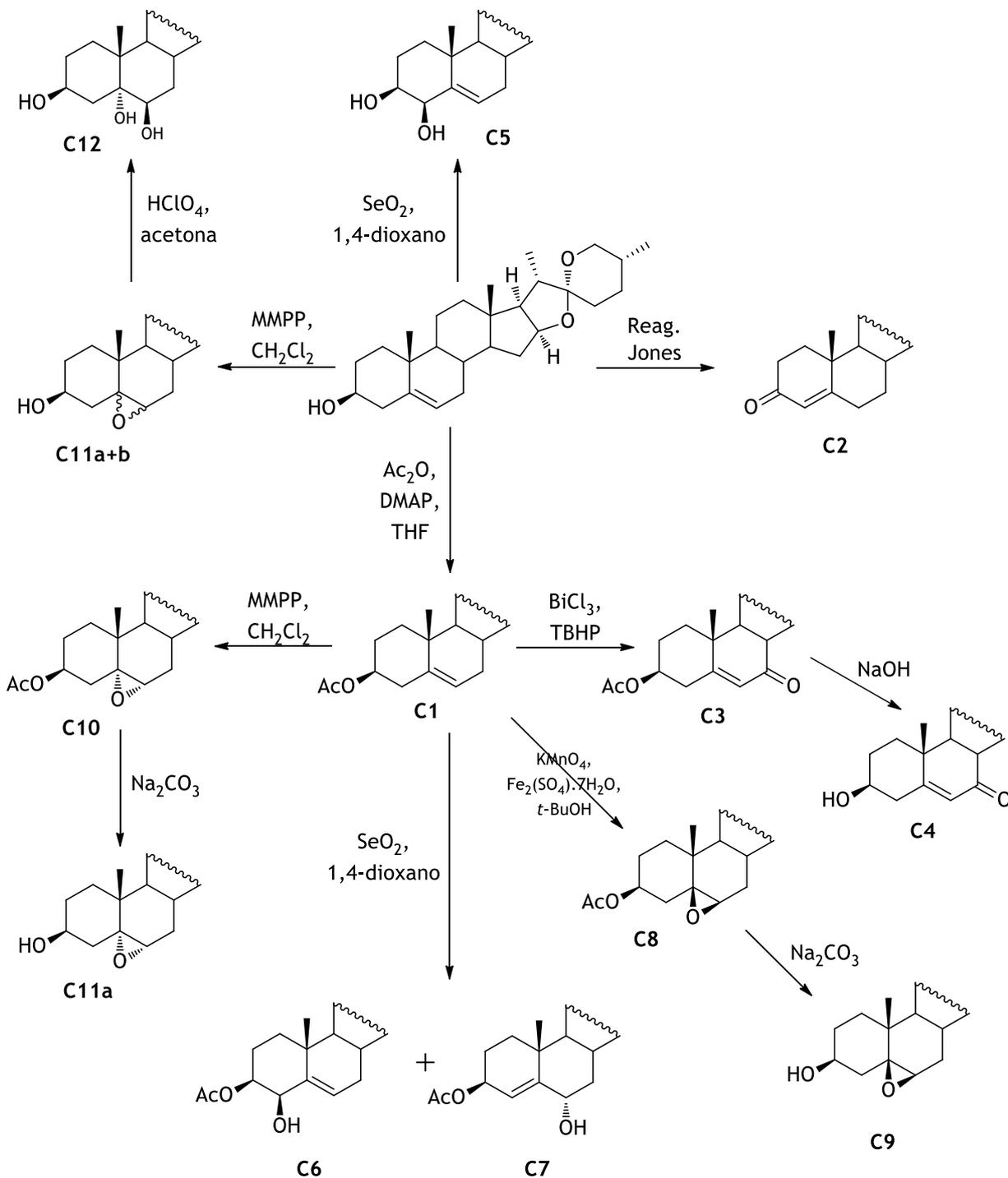


Fig. 20 - Esquema geral da síntese química realizada

O objetivo principal da síntese química apresentada neste trabalho teve como foco a preparação de vários derivados oxidados da diosgenina. Para tal objetivo se concretizar, foram realizadas várias reações de oxidação, incluindo epoxidações, e algumas hidrólises de alguns compostos oxidados. O esquema da fig.20 representa toda a síntese feita para obter os dez compostos finais. O primeiro passo foi síntese do intermediário, acetato de diosgenina, pretendendo-se proteger o grupo OH, uma vez que poderia reagir em condições reacionais usadas para efetuar outras oxidações.

A epoxidação da diosgenina e do acetato de diosgenina com MMPP, que originou o composto C10 (que mais tarde foi utilizado como substrato para a síntese do composto 11a) e C11a+C11b (usados para a síntese do composto C12), inicialmente foi realizada com MCPBA, um oxidante bastante utilizado na síntese orgânica [127]. No entanto, usando este oxidante, após análise ^1H RMN verificou-se que o composto obtido estava impuro, tendo sido detetada presença de resíduos do oxidante e do co-produto da reação (ácido *m*-clorobenzóico). Como mesmo após a realização de cromatografia em coluna, os referidos resíduos continuavam presentes, optou-se por outra via de epoxidação, utilizando outro oxidante com propriedades similares, mas mais hidrossolúvel, o MMPP. O MMPP é relativamente estável, pelo que o seu manuseio é menos perigoso, e devido à sua solubilidade em água, o *workup* reacional torna-se mais fácil. Por estas vantagens, este oxidante tem sido bastante utilizado como alternativa para epoxidar substratos menos polares, em solventes apropriados e, apesar da velocidade de ação ser mais lenta, a epoxidação de Δ^5 -esteroides é mais estereosseletiva [117, 128]. Deste modo, com este oxidante já foi possível obter os produtos pretendidos.

A epoxidação do acetato de diosgenina com KMnO_4 combinado com $\text{Fe}_2(\text{SO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ para se obter o composto C8 (que foi depois hidrolisado para originar o produto final C9) tentou-se inicialmente usando isopropanol e, mais tarde, com *n*-butanol, devido à indisponibilidade, nessa altura, do *tert*-butanol (catalisador de transferência de fase descrito na literatura para esta reação), sem sucesso. Só quando, posteriormente, se adquiriu o *tert*-butanol é que a reação ocorreu, o que significa que esta reação parece ser marcadamente dependente do tipo de álcool usado [115].

No caso da hidrólise destes epóxidos, usou-se Na_2CO_3 [116] em vez do habitual NaOH ou KOH para reduzir o risco de ocorrer abertura hidrolítica do anel oxirano, o que se verificou não ter ocorrido.

Por outro lado, a oxidação da diosgenina pelo reagente de Jones, que originou o composto C2, foi conseguida com sucesso, após purificação de cromatografia em coluna. Este resultado foi também um pouco surpreendente, uma vez que em condições similares a esta está referida a formação de Δ^4 -3,6-dicetonas esteroides [110, 129].

Quanto à reação de oxidação alílica do acetato de diosgenina, a fim de se obter o composto C3, que hidrolisado deu origem ao composto final C4, também decorreu como esperado [111], tendo apenas sido necessária a purificação de cromatografia em coluna.

As reações de beta-hidroxilação da diosgenina e do acetato de diosgenina, que originaram os compostos C5, C6 e C7, respetivamente, decorreram igualmente como esperado [114], sendo também efetuada a purificação destes três compostos por cromatografia em coluna para obter os produtos com elevado grau de pureza.

Um dos objetivos desta síntese era a obtenção da diosgenina com 5 α - e 6 β -hidroxilos, composto 12, uma vez que o oxiesterol correspondente da série colestano está descrito com sendo altamente citotóxico [36]. Assim, tentou-se, inicialmente, obter este compostos através da reação de dihidroxilação [130] direta do acetato de diosgenina com SeO₂ e H₂O₂ [118], mas a reação não ocorreu, pelo que se optou por hidrolisar os compostos C11a+C11b com HClO₄ [43], e obteve-se diretamente o triol, como pretendido [118].

A tabela 1 apresenta os rendimentos finais obtidos para cada composto. Os rendimentos mais baixos foram os dos compostos C4, C5, C6 e C7. Estes rendimentos devem-se ao facto dos compostos em questão terem sido purificados por coluna cromatográfica, onde pode ter havido algumas perdas de composto. O composto C2 também foi purificado por coluna cromatográfica mas apresenta um rendimento mais favorável que os compostos anteriores.

Tabela 1 - Lista dos rendimentos obtidos dos compostos sintetizados

Compostos Finais	Rendimentos Finais (%)
Acetato de diosgenina	97%
C2	58%
C4	28%
C5	33%
C6	25%
C7	17%
C8	64%
C9	73%
C10	93%
C11a	91%
C12	70%

No que respeita à caracterização dos compostos sintetizados realizada mediante espectros de IV, ^1H RMN e ^{13}C RMN), são apresentados alguns dados relevantes para algumas estruturas. No caso do composto 8, resultante da reação de epoxidação do acetato de diosgenina com KMnO_4 e sais metálicos, no espectro ^1H RMN, verificou-se a presença de um sinal a 3,08 ppm, correspondente ao próton $6\alpha\text{-H}$ e no espectro de ^{13}C RMN observou-se dois sinais característicos do epóxido C^5 (62,51 ppm) e C^6 (63,43 ppm). Quanto ao composto C10, o diastereoisómero do C8, originado pelo mesmo tipo de reação, mas usando MMPP, entre outros, os sinais que ajudaram na sua identificação foram, no ^1H RMN, o surgimento de um duplete a 2,89 correspondente ao próton $6\beta\text{-H}$ deste β -epóxido e, no ^{13}C RMN, identificaram-se dois sinais característicos, C^5 (65,14 ppm) e C^6 (61,86 ppm). Foi interessante observar a elevada pureza isomérica destes compostos, o que é concordante com o descrito na literatura.

O composto C11a, resultante da hidrólise do composto C10, possui sinais IV, ^1H RMN, ^{13}C RMN muito semelhantes ao composto C9. Pela análise dos espectros, o IV apresenta uma banda a 3400 cm^{-1} característica das vibrações do grupo OH, e perda da banda característica das vibrações CH_3COO , no espectro ^1H RMN, também a presença do sinal característico é notória a 2,90 ppm do próton $6\alpha\text{-H}$, no espectro ^{13}C RMN os sinais característicos do epóxido estavam presentes C^5 (65,66 ppm) e C^6 (66,84).

Em relação à abertura do anel epóxido C12, os sinais característicos para a identificação deste composto foram: ao nível do espectro IV, estão representadas duas bandas características das vibrações do grupo OH a 3495 cm^{-1} e a 3316 cm^{-1} (OH); no espectro ^1H RMN são de salientar os sinais dos hidrogénios ligados aos carbonos hidroxilados; no espectro ^{13}C RMN observaram-se, entre outros, os sinais dos carbonos C^6 (74,24 ppm), C^5 (74,47 ppm) e C^3 (66,09 ppm).

A hidrólise do composto obtido pela oxidação alílica do acetato de diosgenina originou C4. Em relação ao espectro de IV, este composto apresenta bandas características de vibrações do grupo (OH) a 3442 cm^{-1} e do grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$, do carbono C^7) a 1670 cm^{-1} . Em relação aos sinais do espectro ^1H RMN, um sinais que auxilia a identificação deste composto encontra-se a 5,70 ppm (H-6). Para auxiliar nesta caracterização, os carbonos característicos deste composto em ^{13}C RMN, são o C^7 ($\text{C}=\text{O}$) a 202,17 ppm, o C^5 a 165,82 ppm, o C^6 a 126,36 ppm e o C^3 a 70,90 ppm.

Por fim, o composto C2, sintetizado através da oxidação da diosgenina com o reagente de Jones, originou um sinal novo no espectro IV importante que permitiu a sua rápida identificação, a 1688 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$ conjugado). No espectro de ^1H RMN surgiu um sinal característico a 6,12 ppm, do próton H-4.

Depois de todas estas análises das caracterizações dos compostos sintetizados, pode-se afirmar que o conjunto da análise IV, ^1H RMN e ^{13}C RMN é essencial e imprescindível aquando da identificação dos compostos em questão.

4.2 Avaliação Biológica

Para demonstrar a potencialidade anti-cancerígena dos compostos derivados oxidados da diosgenina, foram realizados ensaios de viabilidade celular. Assim, os compostos C2, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11a e C12 (depois de sintetizados e purificados), e ainda a diosgenina e o controlo 5-FU foram testados em diferentes linhas celulares: MCF-7 (cancro da mama), LNCaP e PC-3 (ambas linhas celulares do cancro prostático). Para isso, realizaram-se de estudos para obter curvas concentração-resposta através do ensaio MTT. Os controlos positivos escolhidos, para efeitos de comparação, foram o 5-FU uma vez que este composto é utilizado comercialmente no tratamento do cancro, nomeadamente no cancro da mama [131, 132] e também a diosgenina, uma vez que é o substrato de toda a síntese química descrita e porque tem sido um esteroide, precursor de muitos outros esteroides, alvo de muitos estudos na área da oncologia, tendo sido testada em cancros da mama e próstata, entre outros [56, 77]. O tempo de incubação após sementeira das células e após adição dos compostos nestes ensaios foi de 48h.

4.2.1 Determinação dos IC₅₀ dos compostos sintetizados e comparação da sua ação nas diferentes linhas celulares

Mediante os ensaios MTT realizados, obtiveram-se as curvas de concentração-resposta. Através destas curvas, quando possível, foi efetuado o cálculo dos valores de IC₅₀ dos compostos.

Segundo dados da literatura, o IC₅₀ do 5-FU nas células MCF-7 é 0,71µM, usando o ensaio colorimétrico da sulforrodamina B (SRB) [131]. Mediante o ensaio MTT, na mesma linha celular e após 24h de incubação, o IC₅₀ calculado foi 12,03µM e após 48h de incubação foi 6,16µM. O mesmo composto já foi estudado também nas células PC-3 e LNCaP apresentando IC₅₀ de 19,5µM e 68,5µM, respetivamente, em ensaios com 48h de exposição [133]. No caso do presente estudo, os IC₅₀ determinados para o controlo positivo, 5-FU, nas MCF-7 foi 15,75µM, nas PC-3 foi 11,70µM e nas LNCaP foi 72,08µM, sendo valores bastantes próximos aos valores apresentados na literatura.

Quanto à diosgenina, o seu efeito anti-cancerígeno já foi bastante estudado nas células PC-3. De acordo com a literatura, abaixo da concentração 20µM, a uma incubação de 48h, este composto não afeta significativamente a viabilidade celular. Por outro lado, e apesar de não afetar a viabilidade celular a baixas concentrações, este composto inibe a migração das células PC-3 [56]. Este composto também foi testado em células do cancro da mama, nomeadamente em células MCF-7, em que a baixas concentrações também não afeta significativamente a viabilidade celular, apresentando um IC₅₀=11,03µM [63, 70]. Para além de testada nestes dois tipos celulares (MCF-7: IC₅₀=33,71µM e PC-3: IC₅₀=68,50µM), a diosgenina também foi testada nas LNCaP, células da próstata responsivas a androgénios, em que apresentou um IC₅₀ de 42,38µM.

Posto isto e através da análise comparativa dos dados de IC₅₀ determinados e apresentados na tabela 2, podemos inferir que os melhores compostos, a nível de IC₅₀, nas células LNCaP são o C2

($IC_{50}=69,78\mu M$), o C5 ($IC_{50}=55,93\mu M$), o C4 ($IC_{50}=51,72\mu M$), o C7 ($IC_{50}=49,53\mu M$), o C11a ($IC_{50}=4,205\mu M$) e o C12 ($IC_{50}=0,097\mu M$). Assim, podemos confirmar que os compostos que parecem ser mais potentes são o epóxido C11a (5 α ,6 α -epóxido com o 3 β -OH livre) e o composto derivado da abertura do anel epóxido, C12 (tríol). É interessante notar que o 5 α ,6 α -epóxido com o 3 β -OH acetilado (C10) é muito menos citotóxico que o análogo com o OH livre (C11a).

Quanto às células MCF-7, os valores de IC_{50} mais relevantes foram para os compostos C2 ($IC_{50}=67,46\mu M$), o C8 ($IC_{50}=9,217\mu M$) e o C6 ($IC_{50}=0,933\mu M$). Ou seja, neste caso, são os derivados da diosgenina acetilada com um 5 α ,6 α -epóxido ou com um 4 β -OH que parecem afetar mais a proliferação celular a baixas concentrações.

Nas células PC-3, o composto com IC_{50} mais relevante foi o C12 ($IC_{50}=36,80\mu M$), composto derivado da abertura do anel epóxido, seguido do epóxido C11a ($IC_{50}=46,32\mu M$) e do composto 4 β -hidroxilado-3 β -acetilado C6 ($IC_{50}=47,91\mu M$). Este derivado, C6, parece afetar mais as células MCF-7 e PC-3, ao contrário do que acontece nas LNCaP.

Assim, tendo em conta esta análise dos valores de IC_{50} dos diferentes compostos (derivados oxidados da diosgenina) testados nas diferentes linhas celulares, representados na tabela 2, podemos inferir que um mesmo composto em estudo pode apresentar IC_{50} diferentes nas diferentes linhas celulares. De facto, alguns destes compostos têm alguma seletividade para uma determinada linha celular e, consequentemente, para um determinado cancro. Neste âmbito, as células PC-3, parecem ser menos afetadas que as linhas celulares MCF-7 e LNCaP, o que está relacionado com o facto de estas células não serem responsivas a hormonas e com o facto destes compostos serem esteroides, havendo a possibilidade de interagirem em maior ou menor extensão com recetores hormonais.

Fazendo uma comparação com o IC_{50} da diosgenina nas diferentes linhas celulares, podemos verificar que há compostos com IC_{50} nas três linhas celulares inferiores aos calculados para a diosgenina, o que nos leva a deduzir que poderão ser mais potentes do que o próprio precursor como agentes anti-proliferativos. De facto, e por exemplo, o 5 α ,6 α -epóxido com o 3 β -OH livre (C11a) e o tríol (C12) parecem afetar muito mais as LNCaP do que as PC-3. Por outro lado, as células MCF-7 parecem ser muito mais afetadas que as células prostáticas pelos compostos C6 e C8. Adicionalmente, podemos afirmar que estes 4 compostos aparentam ser os mais promissores neste trabalho, no que respeita aos seus IC_{50} .

No entanto, mais estudos necessitam de ser efetuados para confirmar e complementar esta informação e permitir uma melhor compreensão destes resultados. Além disso, o estudo do efeito de todos estes compostos em linhas celulares normais (Ex: fibroblastos normais da derme humana), de forma a provar se existe toxicidade seletiva destes compostos também terá de ser efetuado futuramente.

Os compostos C10, C11 e C13, na tabela 2, nas células MCF-7 não apresentam valores de IC₅₀ calculados, isto porque depois dos vários ensaios realizados destes compostos nestas células, os gráficos das curvas de dose-resposta obtidos não foram satisfatórios para a determinação desse mesmo valor e, a realização de mais ensaios de viabilidade celular (MTT) é necessária.

Tabela 2 - Valores de IC₅₀ para os compostos sintetizados testados nas diferentes linhas celulares e os controlos 5-FU e Diosgenina.

Composto	Linha Celular	IC ₅₀	R ²
Diosgenina	LNCaP	42,38	0,89
	PC-3	68,50	0,81
	MCF-7	33,71	0,89
5-FU	LNCaP	72,08	0,78
	PC-3	11,70	0,89
	MCF-7	15,75	0,71
C2	LNCaP	69,78	0,66
	PC-3	95,45	0,96
	MCF-7	67,46	0,75
C4	LNCaP	51,72	0,62
	PC-3	>100	–
	MCF-7	>100	–
C5	LNCaP	55,93	0,73
	PC-3	>100	–
	MCF-7	>100	–
C6	LNCaP	86,99	0,77
	PC-3	47,91	0,84
	MCF-7	0,933	0,72
C7	LNCaP	49,53	0,89
	PC-3	>100	–
	MCF-7	>100	–
C8	LNCaP	97,24	0,76
	PC-3	>100	–
	MCF-7	9,217	0,81
C9	LNCaP	>100	–
	PC-3	>100	–
	MCF-7	>100	–
C10	LNCaP	>100	–
	PC-3	>100	–
	MCF-7	–	–

C11A	LNCaP	4,205	0,75
	PC-3	46,32	0,83
	MCF-7	–	–
C12	LNCaP	0,097	0,65
	PC-3	36,80	0,80
	MCF-7	–	–

4.2.2 Apresentação das curvas dose-resposta - avaliação da viabilidade celular

De seguida, apresentam-se os resultados obtidos nos ensaios de avaliação dos efeitos na proliferação celular da diosgenina e do composto com maior potencial para cada linha celular, MCF-7, LNCaP e PC-3.

MCF-7:

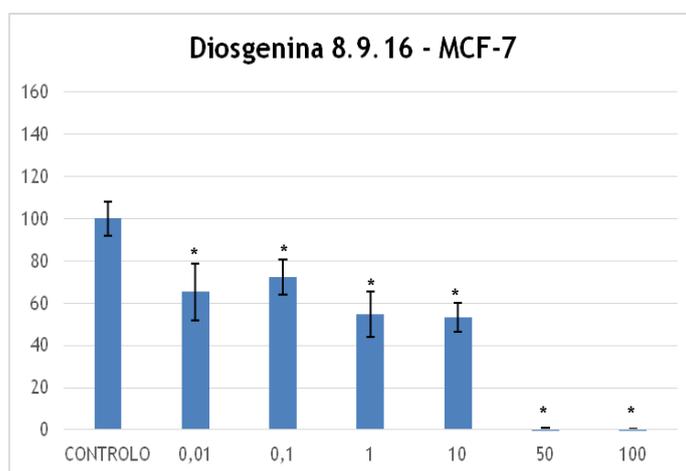


Gráfico 1 - Proliferação celular relativa na linha celular MCF-7 incubadas com a diosgenina, numa gama de concentrações entre 0,01 µM e 100 µM por 48 horas. Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controlo, onde as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. *p <0,05 versus respetivo controlo (teste *t-Student*), n=4. Passagem 26 das células.

Analisando o gráfico 1, verifica-se um decréscimo mais significativo da proliferação celular relativa a partir da concentração de 1µM de diosgenina. Para esta linha celular incubada com a diosgenina começa a verificar-se uma diminuição gradual da proliferação celular relativa nas concentrações mais baixas, sendo esta mais acentuada nas concentrações de 50µM e 100µM, como esperado [63, 70].

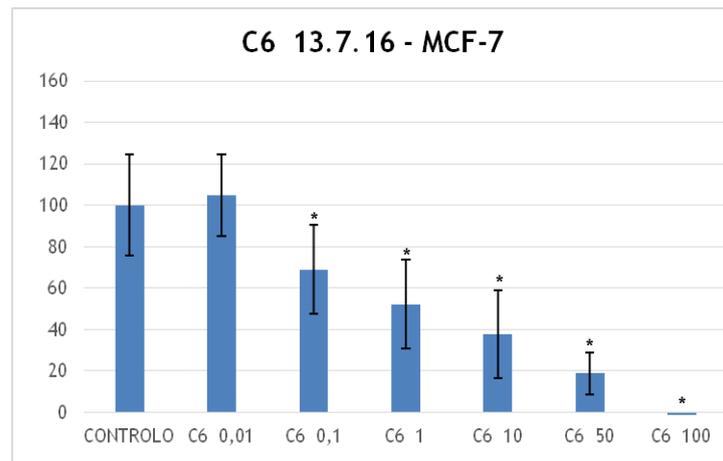


Gráfico 2 - Proliferação celular relativa na linha celular MCF-7 incubadas com o composto C6, numa gama de concentrações entre 0,01 µM e 100 µM por 48 horas. Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controlo, onde as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. *p <0,05 versus respetivo controlo (teste *t-Student*), n=4. Passagem 26 das células.

O gráfico 2 apresenta os resultados obtidos na avaliação da proliferação celular do composto C6 nas MCF-7. Pela sua observação, verifica-se um decréscimo significativo da proliferação celular relativa logo a partir da concentração de 0,1µM do composto. Para esta linha celular incubada com este composto C6 começa a verificar-se uma diminuição gradual da proliferação celular relativa a partir dessa concentração, sendo esta mais acentuada nas concentrações de 10µM, 50µM e 100µM. O IC₅₀ calculado para este composto foi bastante baixo, como já foi descrito anteriormente (IC₅₀=0,933µM).

PC-3:

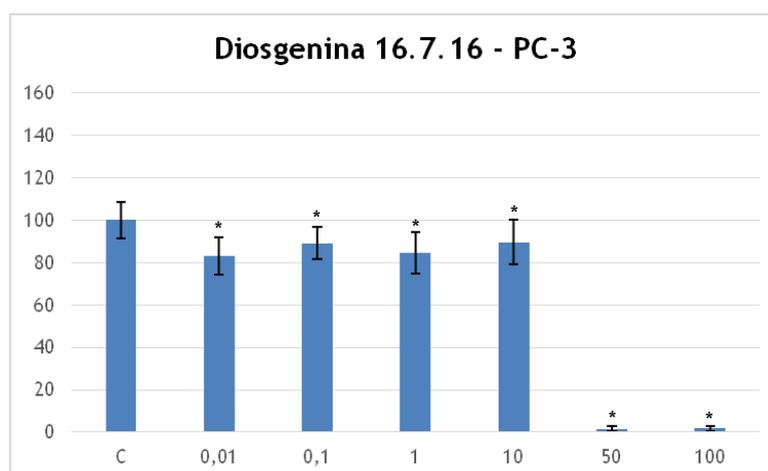


Gráfico 3 - Proliferação celular relativa na linha celular PC-3 incubadas com a diosgenina, numa gama de concentrações entre 0,01 µM e 100 µM por 48 horas. Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controlo, onde as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. *p <0,05 versus respetivo controlo (teste *t-Student*), n=4. Passagem 29 das células.

Analisando o gráfico 3, verifica-se que existe um decréscimo significativo da proliferação das células PC-3 apenas nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M de diosgenina. Este resultado está de acordo com o descrito anteriormente na secção (4.2.1) e segundo a literatura [56].

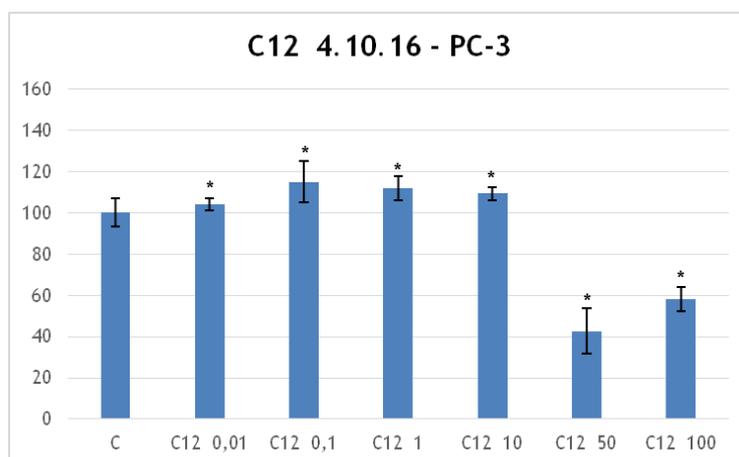


Gráfico 4- Proliferação celular relativa na linha celular PC-3 incubadas com o composto C12, numa gama de concentrações entre 0,01 μ M e 100 μ M por 48 horas. Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controlo, onde as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. * $p < 0,05$ versus respetivo controlo (teste *t-Student*), $n=4$. Passagem 36 das células.

Pela observação do gráfico 4, verifica-se um decréscimo acentuado e significativo da proliferação celular relativa nas concentrações mais elevadas, 50 μ M e 100 μ M, causado pelo composto C12 (5,6-diol-3 β -OH). O valor de IC_{50} deste composto é de 36,80 μ M, o melhor IC_{50} nestas células.

LNCaP:

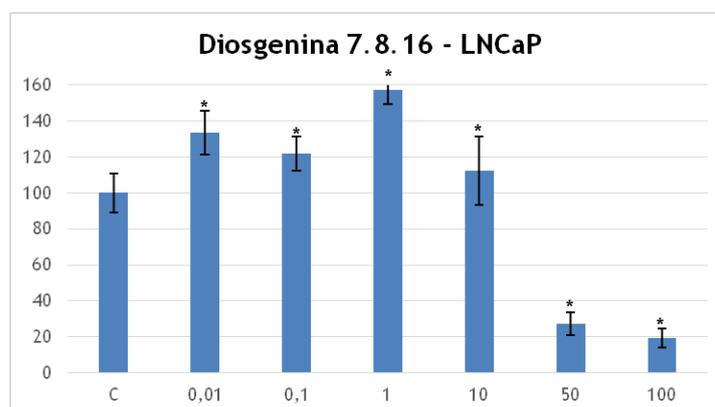


Gráfico 5 - Proliferação celular relativa na linha celular LNCaP, incubadas com a diosgenina, numa gama de concentrações entre 0,01 μ M e 100 μ M por 48 horas. Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controlo, onde as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. * $p < 0,05$ versus respetivo controlo (teste *t-Student*), $n=4$. Passagem 27 das células.

No gráfico 5, estão apresentados os resultados obtidos no estudo da proliferação celular relativa das células LNCaP quando incubadas com a diosgenina. Assim, pode observar-se que só nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M ocorreu um decréscimo significativo da proliferação celular relativa. O valor de IC₅₀ da diosgenina nestas células é 42,38 μ M.

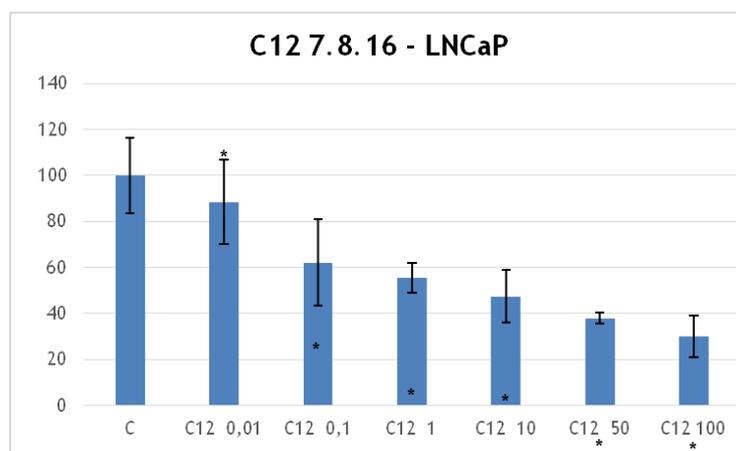


Gráfico 6 - Proliferação celular relativa na linha celular LNCaP, incubadas com o composto C12, numa gama de concentrações entre 0,01 μ M e 100 μ M por 48 horas. Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controlo, onde as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. *p <0,05 versus respetivo controlo (teste *t-Student*), n=4. Passagem 27 das células.

Analisando o gráfico 6, verifica-se que existe um decréscimo gradual, significativo, da proliferação celular relativa a partir da concentração de 0,1 μ M do composto C12 (tríol). Esse decréscimo, ao ser observado logo nas concentrações mais baixas, reflete-se no valor de IC₅₀ calculado para o composto: 0,097 μ M.

4.3 Avaliação morfológica das células sob a ação dos compostos sintetizados

A fim de se fazer uma avaliação posterior do efeito de alguns compostos nas células, foi efetuado um registo fotográfico, em duas das três linhas celulares em estudo, com controlos negativos (só células e meio), controlos positivos (neste caso, incubadas com o 5-FU e com a diosgenina) e com dois compostos previamente escolhidos consoante os seus resultados nos ensaios MTT.

Esta perceção qualitativa também é interessante comparada com a avaliação quantitativa uma vez que nos pôde dar uma pequena indicação dos resultados que pudemos obter nos ensaios de citometria de fluxo. Com a observação e registo fotográfico podemos observar em tempo real, ou seja, podemos ver a ação exercida dos compostos nas células no momento desta apreciação e as diferenças que eles

causaram ao longo do tempo de incubação. Essas diferenças passam pela observação da alteração da morfologia celular, o tamanho, e a presença ou não de detritos celulares.

4.3.1 Avaliação morfológica de alguns compostos nas células MCF-7

Após a sementeira das células em placas de 6 wells, n=2, estas foram incubadas com os compostos (5-FU, diosgenina, C9 e C12). Passadas 24h desta incubação, foi realizada a observação e registo fotográfico das alterações a nível morfológico destas células.

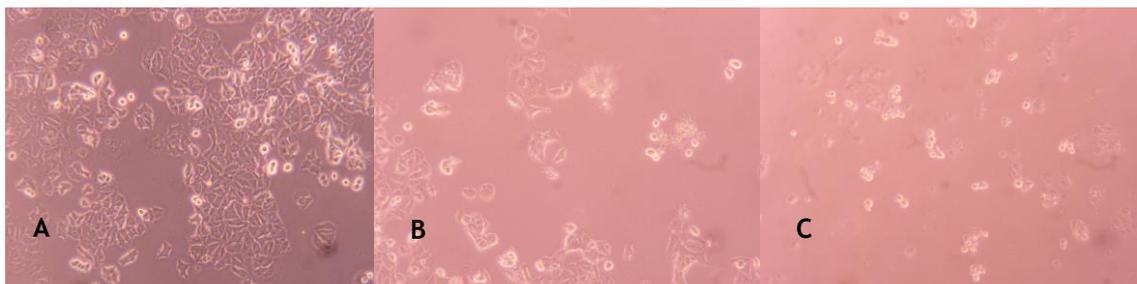


Fig. 21 - Avaliação morfológica das células MCF-7: A - Controlo negativo; B- expostas ao 5-FU; C - expostas à diosgenina; zoom:100x

Pela observação da fig. 21 primeiramente podemos afirmar que existem diferenças entre os controlos positivos (B e C) e o controlo negativo (A), ou seja, as células MCF-7 expostas ao 5-FU e diosgenina mostram diferenças a nível da morfologia, quantidade de células distribuídas e agregados.

Na imagem B, pode ver-se algumas diferenças na morfologia, e pode ver-se também a existência de alguns detritos celulares, que poderão ser provenientes da apoptose celular (detritos apoptóticos). Na imagem C (células expostas à diosgenina), as diferenças morfológicas são ainda mais significativas, sendo que a forma das células passou a ser mais arredondada e com tamanho menor.

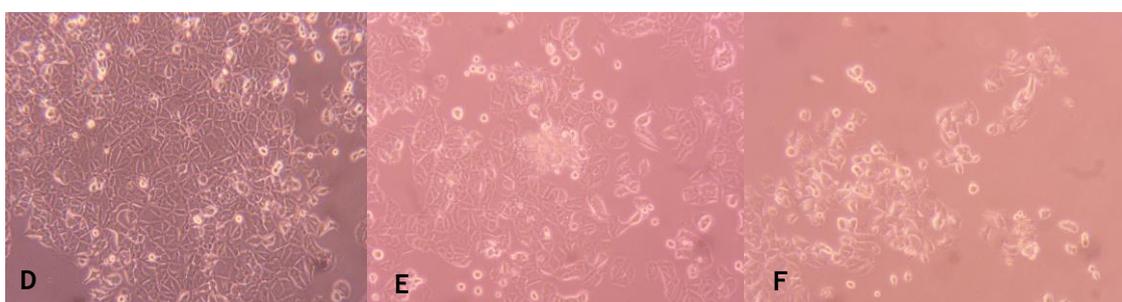


Fig. 22 - Avaliação morfológica das células MCF-7: A - Controlo negativo; B- expostas ao composto C9; C - expostas ao composto C12; zoom:100x

Na fig. 22, também se pode observar que existem diferenças entre as imagens E e F, células expostas ao composto C9 e células expostas ao composto C12, respetivamente, em relação ao controlo D. Na imagem E, células expostas ao composto C9, pode observar-se a presença de detritos e aglomerados

celulares que não estavam presentes no controlo D. Na imagem F, células expostas ao composto C12, as células aparentam estar mais pequenas e com uma morfologia irregular, diferente do controlo D, sendo mais notória a diferença do que em relação à imagem E.

4.3.2 Avaliação morfológica de alguns compostos nas células PC-3 (pré-citometria de fluxo)

Após a sementeira das células em placas de 12 wells, n=4, estas foram incubadas com os compostos (5-FU, diosgenina, C2 e C9). Passadas 24h, foi realizada a observação e registo fotográfico das alterações a nível morfológico destas células imediatamente antes da técnica de citometria de fluxo, descrita na secção seguinte (4.4).

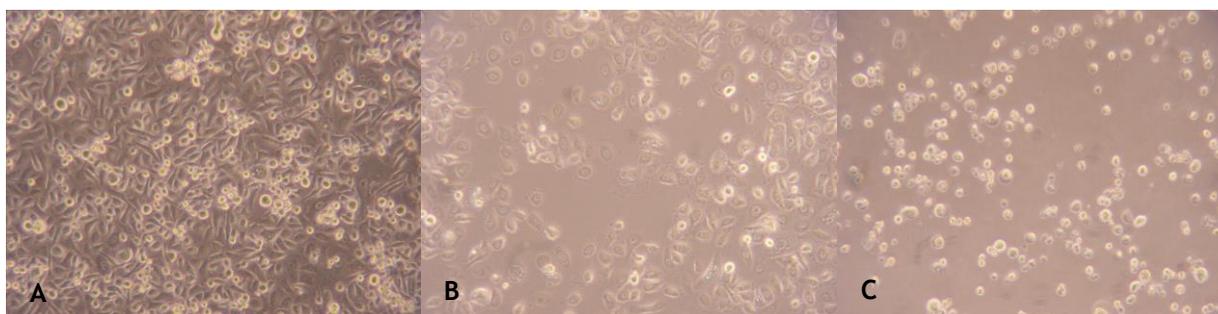


Fig. 23 - Avaliação morfológica das células PC-3: A - Controlo negativo; B- expostas ao 5-FU; C - expostas à diosgenina; zoom:100x

Pela observação da fig. 23, pode-se afirmar que existem diferenças entre os controlos positivos (B e C) e o controlo negativo (A), ou seja, as células PC-3 expostas ao 5-FU e diosgenina, respetivamente, mostram grandes diferenças a nível da morfologia, quantidade de células distribuídas e agregados. As células PC-3 têm grande poder proliferativo, como se pode observar pela imagem A e nas imagens B, C, expostas a agentes anti-cancerígenos como o 5-FU e diosgenina é notória uma menor quantidade de células.

Na imagem B, pode ver-se também algumas diferenças na morfologia, sendo que as células aparentam estar mais arredondadas. Na imagem C da fig. 22, com as células expostas à diosgenina, as diferenças morfológicas, tal como se observou nas células MCF-7, são mais significativas, sendo que a forma das células passou a ser mais arredondada e com tamanho menor, o que se pode traduzir num maior número de células mortas pela observação da imagem. Mais tarde, nos ensaios de citometria de fluxo, secção 4.4, confirmou-se esta observação em relação aos efeitos da diosgenina nas células PC-3.



Fig. 24 - Avaliação morfológica das células PC-3: A - Controlo negativo; B- expostas ao composto C2; C - expostas ao composto C9; zoom:100x

Na fig. 24, pode-se verificar que existem diferenças entre as imagens E e D, ou seja, entre as células expostas ao composto C2 e o controlo. O mesmo parece não acontecer entre a imagem F, células expostas ao composto C9, em relação ao controlo D. Na imagem E, células expostas ao composto C2, pode observar-se diferenças morfológicas das células uma vez aparentam ser mais pequenas e ao mesmo tempo mais irregulares. Quanto à imagem F, pode observar-se que parece ser bastante similar ao controlo, D. Estas observações também parecem concordantes com os resultados verificados no estudo por citometria de fluxo.

4.4 Citometria de fluxo

A fim de avaliar a morte celular e viabilidade das células PC-3 expostas ao tratamento por 24 horas com os compostos C2 e C9, foi realizada a técnica de citometria de fluxo, após marcação com iodeto de propídio (IP). O IP é uma sonda fluorescente que permite avaliar a integridade da membrana plasmática, ou seja, se as células integrarem o IP, poderemos concluir que houve perda dessa integridade da membrana ligando-se este ao seu ADN, sendo que as células normais são impermeáveis ao mesmo [134].

A técnica de citometria de fluxo permite discriminar célula a célula, evento a evento, subpopulações com base no seu estado fisiológico e metabólico. A análise da citometria de fluxo recorrendo à

marcação pelo IP é um método simples e rápido para diferenciar facilmente células viáveis de células mortas, criando-se assim duas subpopulações [135].

Os resultados obtidos por citometria de fluxo com IP nas células PC-3, expostas ao 5-FU, diosgenina, e composto C2 e C9, estão representados nas figuras 12 e 13, colocadas na secção dos anexos, 8.2, na fig. 25 e no gráfico 7. Definiram-se, inicialmente três regiões: a região R1 corresponde à zona de eventos no *plot* onde se situam as células vivas, a R2 a região corresponde à zona de eventos no *plot*, onde se situam as células mortas e uma região R3 intermédia, definida entre a R1 e R2. Os resultados obtidos sugerem que a diosgenina, a 50µM, durante 24h, é o composto que originou uma morte celular significativa em relação ao controlo. O composto C2, em condições similares, também origina alguma morte celular em relação ao controlo negativo, mas muito inferior à observada com a diosgenina. Em relação ao controlo positivo 5-FU, a 50µM, durante 24horas, o mesmo não se verifica, uma vez que este composto em relação ao controlo negativo não originou uma morte celular significativa. Em relação ao composto C9, os resultados foram próximos aos observados com o controlo negativo e com o 5-FU. Contudo, é importante aumentar o tempo de incubação dos compostos para se perceber com maior confiança como estes afetam as células ao longo do tempo.

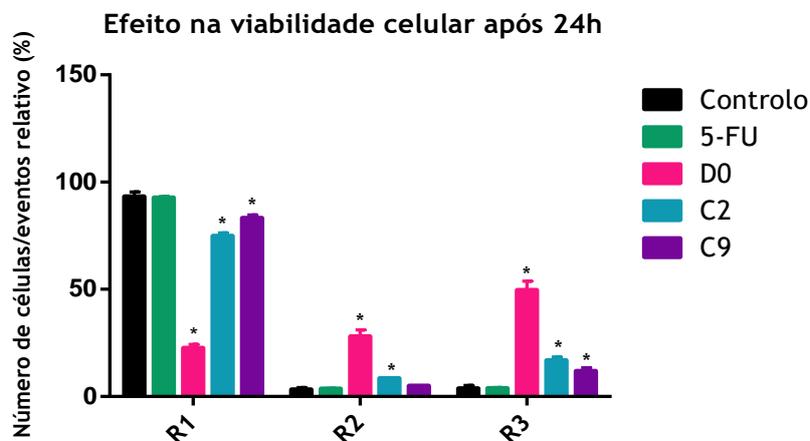


Gráfico 7- representação estatística da viabilidade celular resultante de todos os “dot plots” de cada composto nas três regiões: R1- células/eventos sem IP; R2 - células/eventos marcadas com IP; R3 - região intermédia de eventos. 5-Fu - 5 fluorouracilo; D0 - diosgenina

O gráfico 7 representa de forma estatística, indicando os resultados estatisticamente significativos, todos os resultados de todos os *dot plots*, realizados neste ensaio para o controlo e os quatro compostos testados, mostrando as três regiões representativas e o número relativo de eventos.

Assim, podemos concluir que a diosgenina foi o composto que originou significativamente, uma maior percentagem de células mortas, ou seja, na região R2. Seguido da diosgenina, o composto C2, ainda

conseguiu originar algumas células mortas. Para além destes resultados, existem eventos na região R3, na região intermédia. Esta região intermédia é um pouco indefinida, uma vez que contem os dois tipos de marcação e não podemos concluir se são e quais são as células mortas e, assim poder distingui-las das vivas. A R3, por ser uma região intermédia pode conter células vivas da região R1 e também células mortas ou detritos celulares da região R2.

Outro resultado interessante a assinalar é o facto de haver diferenças entre o primeiro *plot* do primeiro controlo a ser passado no citómetro e o *plot* do último controlo, onde podemos observar (fig. 12 e 13 da secção 8.2, anexos) que ao longo do tempo, o número de células mortas vai aumentado, de 2,2% para 4,6% mesmo tratando-se do controlo, uma vez que as células não se encontravam em ambiente apropriado (incubadas em atmosfera humificada, a 37°C e 5% de CO₂).

Ainda neste ensaio, obteve-se um resultado interessante mas inexplicável. Na imagem E, da fig. 13, na secção 8.2, anexos, no *plot* correspondente aos eventos com o composto C2, pode-se observar que os eventos da região R1 estão mais desviados para a direita comparados com os eventos desta mesma região no controlo (D) e com o *plot* dos eventos com o outro composto, C9. Posto isto, resolveu-se aquando da análise dos resultados, elaborar um histograma que representa a intensidade da fluorescência no canal em questão com o *count* de eventos nessa região e obteve-se o histograma apresentado na figura 25.

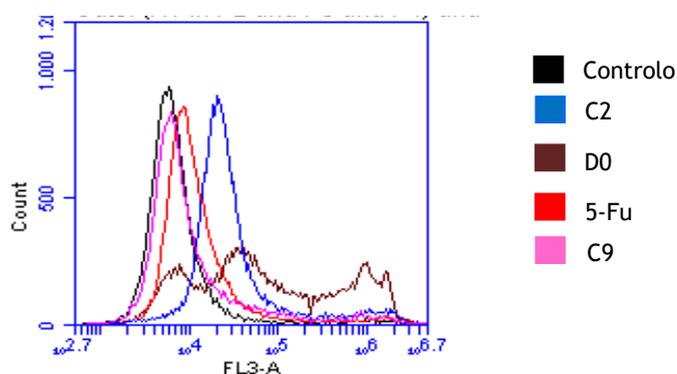


Fig. 25 -Histograma que representa a intensidade da fluorescência no canal FLA3-A vs *count* de eventos.

Através da observação do histograma, fig.25, podemos observar que a curva da intensidade de fluorescência, a azul representativa dos eventos/células incubadas com o composto C2 está mais desviada e mais à direita das outras. Este desvio poderá ser originado de uma possível auto fluorescência celular, uma vez que também se elaborou o mesmo histograma dos *plots* sem marcação com IP e resultou num histograma idêntico. Não se sabe o que causa essa possível auto fluorescência nas células PC-3, incubadas com o composto C2, mas é um resultado a investigar. Também no

histograma consegue-se visualizar perfeitamente a curva correspondente aos eventos/células incubadas com a diosgenina e perceber o seu efeito anti-proliferativo em relação aos outros compostos testados (curva mais baixa).

Capítulo 6 - Conclusão e Perspetivas Futuras

A diosgenina, uma saponina encontrada em algumas espécies de plantas, é relatada como uma biomolécula bioativa promissora tendo diversas e importantes propriedades medicinais, incluindo propriedades anti-oxidantes, anti-inflamatórias e atividades anti-proliferativas, entre outras. Por esta razão, a diosgenina é uma molécula potencial de interesse na prevenção / tratamento de várias doenças. O elevado potencial de alguns dos seus análogos, ou de combinações desta com outros compostos já está também comprovado. No entanto, é importante desenvolver novos compostos análogos da diosgenina para melhorar a sua eficácia e reduzir os potenciais efeitos colaterais.

Assim, o principal objetivo deste trabalho foi a síntese, purificação e caracterização parcial de derivados oxidados da diosgenina. Neste sentido, foram realizadas várias reações de oxidação, incluindo epoxidações, e algumas hidrólises de alguns compostos oxidados.

A ação anti-proliferativa dos compostos sintetizados foi avaliada em diversas linhas celulares cancerígenas humanas, tais como em células do cancro da próstata responsivas a androgénios (LNCaP), células do cancro da próstata não responsivas a androgénios (PC-3) e do cancro da mama (MCF-7). Assim, realizaram-se ensaios MTT para avaliação dos efeitos dos compostos na viabilidade celular. Para isso, realizaram-se estudos de concentração-resposta com diferentes concentrações dos compostos (0,01 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M) e, após esses ensaios, para os compostos que mostraram efeitos significativos, calculou-se o IC₅₀, em todas as linhas celulares estudadas. Tendo em conta toda a análise, ensaios MTT e valores dos IC₅₀ conclui-se que o C8 (IC₅₀=9,217 μ M) e C6 (IC₅₀=0,933 μ M) foram os compostos mais promissores nas MCF-7, o C11a (IC₅₀=4,205 μ M) e C12 (IC₅₀=0,097 μ M) para as LNCaP e o C6 (IC₅₀=47,91 μ M) e C11a (IC₅₀=46,32 μ M) os mais promissores nas PC-3. Também se pode concluir que o mesmo composto pode ser promissor em linhas celulares diferentes como o C11a nas PC-3 e LNCaP mas que mesmo assim parece ser mais potente nas células LNCaP, que poderá ser pelo facto desta linha celular ser responsiva a androgénios. O mesmo acontece com o composto C6 nas MCF-7 e PC-3.

Quanto aos estudos por citometria de fluxo após marcação com iodeto de propídio, foram testados os compostos C2 e C9 em células MCF-7, sendo que o composto C2 levou a um pequeno aumento da percentagem de células mortas e que o C9 não mostrou morte celular relevante, comportando-se de forma similar ao observado com o 5-fluorouracilo.

Assim, através deste estudo, foi possível observar o interesse biológico dos derivados oxidados da diosgenina sintetizados, embora mais ensaios e testes tenham de ser aplicados aos compostos mais promissores para aprofundamento dos seus efeitos e dos seus mecanismos de ação, bem como a sua

avaliação da sua não toxicidade em relação a células normais para a continuação da avaliação do seu potencial interesse como potenciais futuros compostos anticancerígenos.

Em relação às perspectivas futuras do trabalho descrito nesta dissertação, de forma a ficar um trabalho ainda mais completo, são de salientar os seguintes pontos:

- Em relação à síntese química, seria interessante a síntese de mais epóxidos e outros derivados oxidados da diosgenina, por exemplo a oxidação do composto C6 e a hidrólise do éster do C7, entre outras hipóteses.
- Quanto à avaliação biológica, seria importante testar os compostos sintetizados em células normais não cancerígenas, como por exemplo, em fibroblastos da derme humana. Por outro lado, seria interessante testar estes compostos noutro tipo de linhas celulares para além destas três linhas estudadas. Além disso, seria de considerar também a variação do tempo de exposição aos compostos e, uma vez que um tumor, não sendo uma massa homogênea de células, mas sim constituído por diferentes células, seria interessante realizar ensaios em co culturas e avaliar este efeito anti-cancerígeno como um todo [136]. Adicionalmente, também é importante a obtenção de dados que possam dar indicações sobre o possível mecanismo de atuação destes compostos. Depois de provada a toxicidade ou não toxicidade dos compostos sintetizados e de ter alguma informação sobre o seu mecanismo de ação, também seria interessante, para os mais promissores, começar a investigar formas de administração dos mesmos, de forma a melhorar a eficácia terapêutica e diminuir a toxicidade deste potenciais agentes anti-cancerígenos.
- Em relação ao estudo do efeito dos compostos sintetizados nas células, através ensaios de citometria de fluxo, deveriam ser realizadas um maior número de experiências, otimizá-las de forma a obter um valor estatístico mais fiável e, realizar as experiências em todas as linhas celulares estudadas.
- Além da citometria de fluxo, para estudar a viabilidade celular e o efeito dos compostos sintetizados nas células, deveria realizar-se outro tipo de técnicas complementares como a microscopia de fluorescência nas várias linhas celulares estudadas.

Bibliografia

1. Lauren, P.: *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, targets, and therapeutics*. (2012).
2. Boulwood, J., Fidler, C.: *Molecular Analysis of cancer*. (2002).
3. Block, J.H.: *Antimalarials*. (2011).

4. van Nagell, J.R., DePriest, P.D., Ueland, F.R., DeSimone, C.P., Cooper, A.L., McDonald, J.M., Pavlik, E.J., Kryscio, R.J., Twickler, D.M., Moschos, E., Karlan, B.Y., Platt, L.D., Fishman, D. a, Cohen, L., Blank, S. V, Shulman, L., Singh, D., Bozorgi, K., Tamura, R., Timor-Tritsch, I.I., Schwartz, P.E., Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A., Luis, J., Sassone, A., Meire, H., Farrant, P., Guha, T., Granberg, S., Norström, a, Wikland, M., Ferrazzi, E., Zanetta, G., Fleischer, A.C., Lyschik, A., Hirari, M., Moore, R.D., Abramson, R.G., Gallion, H.H.: Ultrasound and assessment of ovarian cancer risk. *Cancer*. 37, 408-14 (2013).
5. Siegel, R., Ward, E., Brawley, O., Jemal, A.: *Cancer Statistics , 2011 The Impact of Eliminating Socioeconomic and Racial Disparities on Premature Cancer Deaths*. *CA Cancer J Clin*. 61, 212-236 (2011).
6. OMS | Câncer, consultado a 29 de Setembro de 2016.
7. International Agency for Research on Cancer (IARC), consultado a 29 de Setembro de 2016.
8. Programa Nacional para as Doenças Oncológicas: Doenças Oncológicas em números . Ministério da Saúde - Direção-Geral Saúde. 11,41-48 (2014), consultado a 30 de Setembro de 2016.
9. Ducasse, M., Brown, M.A.: Epigenetic aberrations and cancer. *Mol. Cancer*. 5, 60 (2006).
10. Farber, E.: Cancer development and its natural history. A cancer prevention perspective. *Cancer*. 62, 1676-1679 (1988).
11. Semi, K., Matsuda, Y., Ohnishi, K., Yamada, Y.: Cellular reprogramming and cancer development. *Int. J. Cancer*. 132, 1240-1248 (2013).
12. Feinberg, A.P., Tycko, B.: The history of cancer epigenetics. *Nat. Rev. Cancer*. 4, 143-53 (2004).
13. Graça, B., Lunet, C., Coelho, A.S., Monteiro, G., Freire, P., Speidel, A., Carvalho, L.: Angiogénese e cancro: Da biopatologia à terapêutica. *Acta Med. Port*. 17, 76-93 (2004).
14. Hanahan, D., Weinberg, R.A.: Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 144, 646-674 (2011).
15. Pearson, P.L., Van Der Luijt, R.B.: The genetic analysis of cancer. *J. Intern. Med*. 243, 413-417 (1998).
16. Vehmanen, L., Elomaa, I., Blomqvist, C., Saarto, T.: Tamoxifen treatment after adjuvant chemotherapy has opposite effects on bone mineral density in premenopausal patients depending on menstrual status. *J. Clin. Oncol*. 24, 675-680 (2006).
17. Henderson, B.E., Feigelson, H.S.: Hormonal carcinogenesis the number of cell divisions and the opportunity for random. *Carcinogenesis*. 21, 427-433 (2000).
18. Huggins, C.B.: The Hormone-Dependent Cancer. *Bull. N. Y. Acad. Med*. 39, 752-757 (1963).
19. Krstić, N.M., Bjelaković, M.S., Žižak, Ž., Pavlović, M.D., Juranić, Z.D., Pavlović, V.D.: Synthesis of some steroidal oximes, lactams, thiolactams and their antitumor activities. *Steroids*. 72, 406-414 (2007).
20. Choi, Y.Y., Noh, S.H., Cheong, J.H.: Evolution of gastric cancer treatment: From the golden age of surgery to an era of precision medicine. *Yonsei Med. J*. 56, 1177-1185 (2015).

21. Métodos de Tratamento : Liga Portuguesa Contra o Cancro, consultado a 30 de Setembro de 2016.
22. Keulenaer, G. De, Leite-moreira, A.: Cardiotoxicity associated with cancer therapy: Pathophysiology and prevention. *Rev Port Cardiol.* 32, 395-409 (2013).
23. Cheung-Ong, K., Giaever, G., Nislow, C.: DNA-Damaging Agents in Cancer Chemotherapy: Serendipity and Chemical Biology. *Chem. Biol.* 20, 648-659 (2013).
24. Vichaya, E.G., Chiu, G.S., Krukowski, K., Lacourt, T.E., Kavelaars, A., Dantzer, R., Heijnen, C.J., Walker, A.K.: Mechanisms of chemotherapy-induced behavioral toxicities. *Front. Neurosci.* 9, 1-17 (2015).
25. Dumont, P., Ingrassia, L., Rouzeau, S., Ribaucour, F., Thomas, S., Roland, I., Darro, F., Lefranc, F., Kiss, R.: The Amaryllidaceae isocarbostryril narciclasine induces apoptosis by activation of the death receptor and/or mitochondrial pathways in cancer cells but not in normal fibroblasts. *Neoplasia.* 9, 766-776 (2007).
26. Nobili, S., Lippi, D., Witort, E., Donnini, M., Bausi, L., Mini, E., Capaccioli, S.: Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacol. Res.* 59, 365-378 (2009).
27. Kar, A.: Medicinal Chemistry. New Age International Publishers (2006).
28. Moss, G.P.: Nomenclature of steroids (Recommendations). *Pure Appl. Chem.* 61, 1783-1822 (1989).
29. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). The nomenclature of steroids. Recommendations . *Eur. J. Biochem.* 186, 429-58 (1989).
30. Dong, J., Lei, C., Lu, D., Wang, Y.: Direct Biotransformation of Dioscin into Diosgenin in Rhizome of *Dioscorea zingiberensis* by *Penicillium dioscin*. *Indian J. Microbiol.* 55, 200-206 (2015).
31. Thomas, G.: Fundamentals of medicinal chemistry. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 32, 211-211 (2004).
32. Melmed, S., Conn, P.M.: Endocrinology: Basic and Clinical Principles. Humana Press (2005).
33. Zupkó, I., Molnár, J., Réthy, B., Minorics, R., Frank, É., Wölfling, J., Molnár, J., Ocsovszki, I., Topcu, Z., Bitó, T., Puskás, L.: Anticancer and Multidrug Resistance-Reversal Effects of Solanidine Analogs Synthesized from Pregnadienolone Acetate. *Molecules.* 19, 2061-2076 (2014).
34. Hamid, A.A., Hasanain, M., Singh, A., Bhukya, B., Omprakash, Vasudev, P.G., Sarkar, J., Chanda, D., Khan, F., Aiyelaagbe, O.O., Negi, A.S.: Synthesis of novel anticancer agents through opening of spiroacetal ring of diosgenin. *Steroids.* 87, 108-118 (2014).
35. Shawakfeh, K.Q., Al-Said, N.H., Al-Zoubi, R.M.: Synthesis of bis-diosgenin pyrazine dimers: New cephalostatin analogs. *Steroids.* 73, 579-584 (2008).
36. Salvador, J.A.R., Carvalho, J.F.S., Neves, M.A.C., Silvestre, S.M., Leitão, A.J., Silva, M.M.C., Sá e Melo, M.L.: Anticancer steroids: linking natural and semi-synthetic compounds. *Nat. Prod. Rep.* 30, 324-374 (2013).
37. Avedaño, M. del C.: Introducción a la Química Farmacéutica. McGraw-Hill/Interamericana de

- Espana, S.A. (2001).
38. Liu, L., Dong, Y.-S., Qi, S.-S., Wang, H., Xiu, Z.-L.: Biotransformation of steroidal saponins in *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright to diosgenin by *Trichoderma harzianum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 933-940 (2010).
 39. Raju, J., Rao, C. V.: Diosgenin, a Steroid Saponin Constituent of Yams and Fenugreek: Emerging Evidence for Applications in Medicine. *Bioactive Compounds in Phytomedicine*. pp. 125-142. InTech (2012).
 40. Chen, Y., Tang, Y.-M., Yu, S.-L., Han, Y.-W., Kou, J.-P., Liu, B.-L., Yu, B.-Y.: Advances in the pharmacological activities and mechanisms of diosgenin. *Chin. J. Nat. Med.* 13, 578-587 (2015).
 41. Noguchi, E., Fujiwara, Y., Matsushita, S., Ikeda, T., Ono, M., Nohara, T.: Metabolism of tomato steroidal glycosides in humans. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 54, 1312-1314 (2006).
 42. Raju, J., Mehta, R.: Cancer chemopreventive and therapeutic effects of diosgenin, a food saponin. *Nutr. Cancer*. 61, 27-35 (2009).
 43. Güçlü-Ustündağ, O., Mazza, G.: Saponins: properties, applications and processing. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 47, 231-258 (2007).
 44. Williams, J.R., Gong, H.: Biological activities and syntheses of steroidal saponins: The shark-repelling pavoninins. *Lipids*. 42, 77-86 (2007).
 45. Kohara, A., Nakajima, C., Hashimoto, K., Ikenaga, T., Tanaka, H., Shoyama, Y., Yoshida, S., Muranaka, T.: A novel glucosyltransferase involved in steroid saponin biosynthesis in *Solanum aculeatissimum*. *Plant Mol. Biol.* 57, 225-239 (2005).
 46. Quan, H.-J., Koyanagi, J., Komada, F., Saito, S.: Preparations of vitamin D analogs, spirostanols and furostanols from diosgenin and their cytotoxic activities. *Eur. J. Med. Chem.* 40, 662-673 (2005).
 47. Balamurugan, E., Manivannan, J., Sivasubramanian, J., Arunagiri, P.: Diosgenin prevents hepatic oxidative stress, lipid peroxidation and molecular alterations in chronic renal failure rats. *Int. J. Nutr. Pharmacol. Neurol. Dis.* 3, 289 (2013).
 48. Roghani-Dehkordi, F., Roghani, M., Baluchnejadmojarad, T.: Diosgenin Mitigates Streptozotocin Diabetes-induced Vascular Dysfunction of the Rat Aorta: The Involved Mechanisms. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 66, 584-592 (2015).
 49. Choi, K., Park, H., Hye, D., Kim, T., Park, Y., Kim, B., Sohn, E., Moon, E., Hee, S., Rhee, D., Pyo, S.: Inhibition of TNF- α -induced adhesion molecule expression by diosgenin in mouse vascular smooth muscle cells via downregulation of the MAPK, Akt and NF- κ B signaling pathways. *Vascul. Pharmacol.* 53, 273-280 (2010).
 50. Esfandiarei, M., Lam, J.T.N., Yazdi, S.A., Kariminia, A., Dorado, J.N., Kuzeljevic, B., Syong, H.T., Hu, K., van Breemen, C.: Diosgenin modulates vascular smooth muscle cell function by regulating cell viability, migration, and calcium homeostasis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 336, 925-39 (2011).
 51. Liu, K., Zhao, W., Gao, X., Huang, F., Kou, J., Liu, B.: Diosgenin ameliorates palmitate-

- induced endothelial dysfunction and insulin resistance via blocking IKK β and IRS-1 pathways. *Atherosclerosis*. 223, 350-358 (2012).
52. Hao-peng, Y., Yue, L., Wen-wen, J., Qian, L., Jun-ping, K., Bo-yang, Y.: Diosgenin inhibits tumor necrosis factor-induced tissue factor activity and expression in THP-1 cells via down-regulation of the NF- κ B, Akt, and MAPK signaling pathways. *Chin. J. Nat. Med.* 11, 608-615 (2013).
 53. Kalailingam, P., Kannaian, B., Tamilmani, E., Kaliaperumal, R.: Efficacy of natural diosgenin on cardiovascular risk, insulin secretion, and beta cells in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. *Phytomedicine*. 21, 1154-1161 (2014).
 54. Gong, G., Qin, Y., Huang, W.: Anti-thrombosis effect of diosgenin extract from *Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright in vitro and in vivo. *Phytomedicine*. 18, 458-463 (2011).
 55. Huang, B., Du, D., Zhang, R., Wu, X., Xing, Z., He, Y., Huang, W.: Synthesis, characterization and biological studies of diosgenyl analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 7330-7334 (2012).
 56. Chen, P., Shih, Y., Huang, H., Cheng, H.: Diosgenin, a Steroidal Saponin, Inhibits Migration and Invasion of Human Prostate Cancer PC-3 Cells by Reducing Matrix Metalloproteinases Expression. *PLoS One*. 6, e20164 (2011).
 57. Lepage, C., Léger, D.Y., Bertrand, J., Martin, F., Beneytout, J.L., Liagre, B.: Diosgenin induces death receptor-5 through activation of p38 pathway and promotes TRAIL-induced apoptosis in colon cancer cells. *Cancer Lett.* 301, 193-202 (2011).
 58. Kim, D.S., Jeon, B.K., Lee, Y.E., Woo, W.H., Mun, Y.J.: Diosgenin Induces Apoptosis in HepG2 Cells through Generation of Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Pathway. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 2012, 981675 (2012).
 59. Tong, Q.-Y., He, Y., Zhao, Q.-B., Qing, Y., Huang, W., Wu, X.-H.: Cytotoxicity and apoptosis-inducing effect of steroidal saponins from *Dioscorea zingiberensis* Wright against cancer cells. *Steroids*. 77, 1219-1227 (2012).
 60. Quan, H.J., Koyanagi, J., Komada, F., Saito, S.: Preparations of vitamin D analogs, spirostanols and furostanols from diosgenin and their cytotoxic activities. *Eur. J. Med. Chem.* 40, 662-673 (2005).
 61. Léger, D.Y., Liagre, B., Jean, P., Cardot, P.J.P., Cardot, P., Beneytout, J.-L., Le, D.Y., Battu, S., Beneytout, J.: Diosgenin dose-dependent apoptosis and differentiation induction in human erythroleukemia cell line and sedimentation field-flow fractionation monitoring. *Anal. Biochem.* 335, 267-278 (2004).
 62. Das, S., Dey, K.K., Dey, G., Pal, I., Majumder, A., MaitiChoudhury, S., Kundu, S.C., Mandal, M.: Antineoplastic and Apoptotic Potential of Traditional Medicines Thymoquinone and Diosgenin in Squamous Cell Carcinoma. *PLoS One*. 7, e46641 (2012).
 63. Selim, S., Al Jaouni, S.: Anticancer and apoptotic effects on cell proliferation of diosgenin isolated from *Costus speciosus* (Koen.) Sm. *BMC Complement. Altern. Med.* 15, 301 (2015).
 64. Mao, Z., Tang, Q., Zhang, C., Qin, Z., Pang, B., Wei, P., Liu, B., Chou, Y.-N.: Anti-Proliferation and Anti-Invasion Effects of Diosgenin on Gastric Cancer BGC-823 Cells with HIF-

- 1 α shRNAs. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 6521-6533 (2012).
65. Mohammad, R.Y., Somayyeh, G., Gholamreza, H., Majid, M., Yousef, R.: Diosgenin inhibits hTERT gene expression in the A549 lung cancer cell line. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 14, 6945-8 (2013).
66. Sung, B., Prasad, S., Yadav, V.R., Aggarwal, B.B.: Cancer Cell Signaling Pathways Targeted by Spice-Derived Nutraceuticals. *Nutr. Cancer.* 64, 173-197 (2012).
67. Ghosh, S., More, P., Derle, A., Kitture, R., Kale, T., Gorain, M., Avasthi, A., Markad, P., Kundu, G.C., Kale, S., Dhavale, D.D., Bellare, J., Chopade, B.A.: Diosgenin Functionalized Iron Oxide Nanoparticles as Novel Nanomaterial Against Breast Cancer. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 15, 9464-9472 (2015).
68. Corbiere, C., Liagre, B., Bianchi, A., Bordji, K., Dauça, M., Netter, P., Beneytout, J.: Different contribution of apoptosis to the antiproliferative effects of diosgenin and other plant steroids, hecogenin and tigogenin, on human 1547 osteosarcoma cells. *Int. J. Oncol.* 22, 899-905 (2003).
69. Srinivasan, S., Koduru, S., Kumar, R., Venguswamy, G., Kyprianou, N., Damodaran, C.: Diosgenin targets Akt-mediated prosurvival signaling in human breast cancer cells. *Int. J. Cancer.* 125, 961-967 (2009).
70. Rahmati-Yamchi, M., Ghareghomi, S., Haddadchi, G., Milani, M., Aghazadeh, M., Daroushnejad, H.: Fenugreek extract diosgenin and pure diosgenin inhibit the hTERT gene expression in A549 lung cancer cell line. *Mol. Biol. Rep.* 41, 6247-6252 (2014).
71. Yadav, V.R., Prasad, S., Sung, B., Kannappan, R., Aggarwal, B.B.: Targeting Inflammatory Pathways by Triterpenoids for Prevention and Treatment of Cancer. *Toxins (Basel).* 2, 2428-2466 (2010).
72. Leger, D.Y., Liagre, B., Corbière, C., Cook-Moreau, J., Beneytout, J.: Diosgenin induces cell cycle arrest and apoptosis in HEL cells with increase in intracellular calcium level, activation of cPLA2 and COX-2 overexpression. *Int. J. Oncol.* 25, 555-62 (2004).
73. Liagre, B., Bertrand, J., Leger, D.Y., Beneytout, J.: Diosgenin, a plant steroid, induces apoptosis in COX-2 deficient K562 cells with activation of the p38 MAP kinase signalling and inhibition of NF-KB binding. *Int. J. Mol. Med.* 16, 1094-1101 (2005).
74. Liu, M.-J., Wang, Z., Ju, Y., Wong, R.N.-S., Wu, Q.-Y.: Furthermore, diosgenin inhibited extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation only in HEL cells. However, diosgenin activated p38 MAPK in both cell lines and activated c-jun NH2-terminal kinases (JNKs) only in HEL cells. Pre-treatment with a sel. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 55, 79-90 (2005).
75. Li, F., Fernandez, P.P., Rajendran, P., Hui, K.M., Sethi, G.: Diosgenin, a steroidal saponin, inhibits STAT3 signaling pathway leading to suppression of proliferation and chemosensitization of human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett.* 292, 197-207 (2010).
76. He, Z., Chen, H., Li, G., Zhu, H., Gao, Y., Zhang, L., Sun, J.: Diosgenin inhibits the migration of human breast cancer MDA-MB-231 cells by suppressing Vav2 activity. *Phytomedicine.* 21,

- 871-876 (2014).
77. Singh, M., Hamid, A.A., Maurya, A.K., Prakash, O., Khan, F., Kumar, A., Aiyelaagbe, O.O., Negi, A.S., Bawankule, D.U.: Synthesis of diosgenin analogues as potential anti-inflammatory agents. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 143, 323-33 (2014).
 78. Karin, M.: NF- B as a Critical Link Between Inflammation and Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a000141-a000141 (2009).
 79. Song, J.-X., Ma, L., Kou, J.-P., Yu, B.-Y.: Diosgenin reduces leukocytes adhesion and migration linked with inhibition of intercellular adhesion molecule-1 expression and NF- κ B p65 activation in endothelial cells. *Chin. J. Nat. Med.* 10, 142-149 (2012).
 80. Huang, C.-H., Ku, C.-Y., Jan, T.-R.: Diosgenin Attenuates Allergen-Induced Intestinal Inflammation and IgE Production in a Murine Model of Food Allergy. *Planta Med.* 75, 1300-1305 (2009).
 81. Patel, K., Gadewar, M., Tripathi, R.: A review on pharmacological and analytical aspects of diosgenin: a concise report. *Asian Pacific J. Trop. Dis.* 2, 414-416 (2012).
 82. Sautour, M., Miyamoto, T., Dongmo, A.: Antifungal Steroid Saponins from *Dioscorea cayenensis*. *Planta Med.* 70, 90-92 (2004).
 83. Yang, C.-R., Zhang, Y., Jacob, M.R., Khan, S.I., Zhang, Y.-J., Li, X.-C.: Antifungal Activity of C-27 Steroidal Saponins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 1710-1714 (2006).
 84. Haroon Khan, Muhammad Saeed, Abdur Rauf, M.A.K. & N.M.: Antimicrobial and inhibition on heat-induced protein denaturation of constituents isolated from *Polygonatum verticillatum* rhizomes. *Nat. Prod. Res.* (2015).
 85. Wang, Y., Pan, K., Hsieh, T., Chang, T., Lin, W., Hsu, J.T.-A.: Diosgenin, a Plant-Derived Sapogenin, Exhibits Antiviral Activity in Vitro against Hepatitis C Virus. *J. Nat. Prod.* 74, 580-584 (2011).
 86. Sangeetha, M.K., ShriShri Mal, N., Atmaja, K., Sali, V.K., Vasanthi, H.R.: PPAR's and Diosgenin a chemico biological insight in NIDDM. *Chem. Biol. Interact.* 206, 403-410 (2013).
 87. Divya, Q., Kanchan, M., Somani, G.S., Peshattiwari, V. V, Kaikini, A.A., Sathaye, S.: Pharmacological Reports Renoprotective effect of diosgenin in streptozotocin induced diabetic rats. *Pharmacol. Reports.* 1-8 (2015).
 88. Fuller, S., Stephens, J.M.: Diosgenin, 4-Hydroxyisoleucine, and Fiber from Fenugreek: Mechanisms of Actions and Potential Effects on Metabolic Syndrome. *Adv. Nutr. An Int. Rev. J.* 6, 189-197 (2015).
 89. Son, I.S., Kim, J.H., Sohn, H.Y., Son, K.H., Kim, J.-S., Kwon, C.-S.: Antioxidative and hypolipidemic effects of diosgenin, a steroidal saponin of yam (*Dioscorea* spp.), on high-cholesterol fed rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 3063-3071 (2007).
 90. Harijono, T.E., Ariestiningsih, A.D., Wardani, N.A.K.: The effect of crude diosgenin extract from purple and yellow greater yams (*Dioscorea alata*) on the lipid profile of dyslipidemia rats. *Emirates J. Food Agric.* 28, 506-512 (2016).
 91. Uemura, T., Hirai, S., Mizoguchi, N., Goto, T., Lee, J., Taketani, K., Nakano, Y., Shono, J.,

- Hoshino, S., Tsuge, N., Narukami, T., Takahashi, N., Kawada, T.: Diosgenin present in fenugreek improves glucose metabolism by promoting adipocyte differentiation and inhibiting inflammation in adipose tissues. *Mol. Nutr. Food Res.* 54, 1596-1608 (2010).
92. Uemura, T., Goto, T., Kang, M.-S., Mizoguchi, N., Hirai, S., Lee, J.-Y., Nakano, Y., Shono, J., Hoshino, S., Taketani, K., Tsuge, N., Narukami, T., Makishima, M., Takahashi, N., Kawada, T.: Diosgenin, the Main Aglycon of Fenugreek, Inhibits LXR Activity in HepG2 Cells and Decreases Plasma and Hepatic Triglycerides in Obese Diabetic Mice. *J. Nutr.* 141, 17-23 (2011).
93. Tharahaswari, M., Jayachandra Reddy, N., Kumar, R., Varshney, K.C., Kannan, M., Sudha Rani, S.: Trigonelline and diosgenin attenuate ER stress, oxidative stress-mediated damage in pancreas and enhance adipose tissue PPAR γ activity in type 2 diabetic rats. *Mol. Cell. Biochem.* 396, 161-174 (2014).
94. Kalailingam, P., Kannaian, B., Tamilmani, E., Kaliaperumal, R.: Efficacy of natural diosgenin on cardiovascular risk, insulin secretion, and beta cells in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. *Phytomedicine.* 21, 1154-61 (2014).
95. Zheng, H., Wei, Z., Xin, G., Ji, C., Wen, L., Xia, Q., Niu, H., Huang, W.: Preventive effect of a novel diosgenin derivative on arterial and venous thrombosis in vivo. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 26, 3364-3369 (2016).
96. Li, W., Wang, H., Wei, Z., Ning, J., Ma, L., Zheng, H., Niu, H., Huang, W.: Supramolecular prodrug micelles based on the complementary multiple hydrogen bonds as drug delivery platform for thrombosis therapy. *RSC Adv.* 6, 62478-62484 (2016).
97. Hu, K., Dong, A., Yao, X., Kobayashi, H., Iwasaki, S.: Antineoplastic Agents II. Four Furostanol Glycosides from Rhizomes of *Discorea collettii* var. *hypoglauca*. *Planta Med.* 63, 161-165 (1997).
98. K., H., X., Y.: Methyl protogracillin (NSC-698792): The spectrum of cytotoxicity against 60 human cancer cell lines in the National Cancer Institute's anticancer drug screen panel. *Anticancer. Drugs.* 12, 541-547 (2001).
99. Hu, K., Yao, X.: The cytotoxicity of methyl protodioscin against human cancer cell lines in vitro. *Cancer Invest.* 21, 389-393 (2003).
100. Li, J., Liu, X., Guo, M., Liu, Y., Liu, S., Yao, S.: Electrochemical study of breast cancer cells MCF-7 and its application in evaluating the effect of diosgenin. *Anal. Sci.* 21, 561-4 (2005).
101. Quan, H.J., Koyanagi, J., Ohmori, K., Uesato, S., Tsuchido, T., Saito, S.: Preparations of heterospirostanols and their pharmacological activities. *Eur. J. Med. Chem.* 37, 659-669 (2002).
102. Kumar, B.N.P., Puvvada, N., Rajput, S., Sarkar, S., Das, S.K., Emdad, L., Sarkar, D., Venkatesan, P., Pal, I., Dey, G., Konar, S., Brunt, K.R., Rao, R.R., Mazumdar, A., Kundu, S.C., Pathak, A., Fisher, P.B., Mandal, M.: Sequential release of drugs from hollow manganese ferrite nanocarriers for breast cancer therapy. *J. Mater. Chem. B.* 3, 90-101 (2015).
103. Ghosh, S., Patil, S., Ahire, M., Kitture, R., Kale, S., Pardesi, K., Cameotra, S.S., Bellare, J., Dhavale, D.D., Jabgunde, A., Chopade, B.A.: Synthesis of silver nanoparticles using *Dioscorea*

- bulbifera tuber extract and evaluation of its synergistic potential in combination with antimicrobial agents. *Int. J. Nanomedicine*. 7, 483-96 (2012).
104. Ghosh, S., More, P., Derle, A., Kitture, R., Kale, T., Gorain, M., Avasthi, A., Markad, P., Kundu, G.C., Kale, S., Dhavale, D.D., Bellare, J., Chopade, B.A.: Diosgenin Functionalized Iron Oxide Nanoparticles as Novel Nanomaterial Against Breast Cancer. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 15, 9464-9472 (2015).
 105. Ghosh, S., Jagtap, S., More, P., Shete, U.J., Maheshwari, N.O., Rao, S.J., Kitture, R., Kale, S., Bellare, J., Patil, S., Pal, J.K., Chopade, B.A.: *Dioscorea bulbifera* Mediated Synthesis of Novel Au core Ag shell Nanoparticles with Potent Antibiofilm and Antileishmanial Activity. *J. Nanomater.* 2015, 1-12 (2015).
 106. Dai, L., Liu, K.-F., Si, C.-L., He, J., Lei, J.-D., Guo, L.-Q.: Self-assembled nanoparticles based on poly(ethylene glycol)-diosgenin prodrugs for co-delivery of anticancer drugs. *J. Mater. Chem. B*. 3, 6605-6617 (2015).
 107. Moreira, V.M.A.: *Novos Esteróides Inibidores Da Biossíntese De Androgénios*. 278 (2008).
 108. Rosado-Abon, A., Esturau-Escofet, N., Flores-Álamo, M., Moreno-Esparza, R., Iglesias-Arteaga, M.A.: The crystal structure of diosgenin acetate and its 23-oxygenated derivatives. *J. Chem. Crystallogr.* 43, 187-196 (2013).
 109. Hunter, A.C., Priest, S.: An efficient one-pot synthesis generating 4-ene-3,6-dione functionalised steroids from steroidal 5-en-3 β -ols using a modified Jones oxidation methodology. *Steroids*. 71, 30-33 (2006).
 110. Salvador, J.A.R., Silvestre, S.M.: Bismuth-catalyzed allylic oxidation using t-butyl hydroperoxide. *Tetrahedron Lett.* 46, 2581-2584 (2005).
 111. Salvador, J.A.R., Silvestre, S.M., Moreira, V.M.: Catalytic oxidative processes in steroid chemistry: Allylic oxidation, β -Selective epoxidation, alcohol oxidation and remote functionalization reactions. *Curr. Org. Chem.* 10, 2227-2257 (2006).
 112. Salvador, J.A.R., Silvestre, S.M., Pinto, R.M.A.: Bismuth(III) Reagents in Steroid and Terpene Chemistry. *Molecules*. 16, 2884-2913 (2011).
 113. Ghosh, P., Das, J., Sarkar, A., Ng, S.W., Tiekink, E.R.T.: Oxidation with selenium dioxide: the first report of solvent-selective steroidal aromatization, efficient access to 4 β ,7 α -dihydroxy steroids, and syntheses of natural diaromatic ergosterols. *Tetrahedron*. 68, 6485-6491 (2012).
 114. Salvador, J.A.R., Sá E Melo, M.L., Campos Neves, A.S.: Oxidations with potassium permanganate - Metal sulphates and nitrates. β -selective epoxidation of Δ^5 -unsaturated steroids. *Tetrahedron Lett.* 37, 687-690 (1996).
 115. Foley, D.A., O'Callaghan, Y., O'Brien, N.M., McCarthy, F.O., Maguire, A.R.: Synthesis and Characterization of Stigmasterol Oxidation Products. *J. Agric. Food Chem.* 58, 1165-1173 (2010).
 116. Carvalho, J.F.S., Silva, M.M.C., Sá e Melo, M.L.: Highly efficient epoxidation of unsaturated steroids using magnesium bis(monoperoxyphthalate) hexahydrate. *Tetrahedron*. 65, 2773-2781 (2009).

117. Bernardo-Otero, Y., Alonso-Becerra, E., Guerra-Martínez, F., Martínez-Massanet, G., Pérez-Martínez, C., Coll-Manchado, F.: Synthesis and biological activity of epoxy analogues of 3-dehydrotestosterone. *J. Chem. Res.* 268-271 (2007).
118. ATCC - American Type Culture Collection, consultado a 28 de Setembro de 2016.
119. Horoszewicz, J.S., Leong, S.S., Kawinski, E., Karr, J.P., Rosenthal, H., Chu, T.M., Mirand, E.A., Murphy, G.P.: LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res.* 43, 1809-18 (1983).
120. Russell, P.J., Kingsley, E.A.: Human Prostate Cancer Cell Lines. In: Russell, P.J., Jackson, P., and Kingsley, E.A. (eds.) *Prostate Cancer Methods and Protocols*. pp. 21-39. Springer New York (2003).
121. Levenson, A.S., Jordan, V.C.: MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Res.* 57, 3071-8 (1997).
122. Huang, H., Hsing, H., Lai, T.-C., Chen, Y., Lee, T., Chan, H.-T., Lyu, P.-C., Wu, C., Lu, Y., Lin, S.-T., Lin, C., Lai, C., Chang, H., Chou, H.-C., Chan, H.: Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. *J. Biomed. Sci.* 17, 36 (2010).
123. Wan, H., Williams, R., Doherty, P., Williams, D.F.: A study of the reproducibility of the MTT test. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 5, 154-159 (1994).
124. Fotakis, G., Timbrell, J.A.: In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol. Lett.* 160, 171-177 (2006).
125. Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65, 55-63 (1983).
126. Djurendić, E., Daljev, J., Sakač, M., Čanadi, J., Šanta, S.J., Andrić, S., Klisurić, O., Kojić, V., Bogdanović, G., Djurendić-Brenesel, M., Novaković, S., Gaši, K.P.: Synthesis of some epoxy and/or N-oxy 17-picolyl and 17-picolinylidene-androst-5-ene derivatives and evaluation of their biological activity. *Steroids.* 73, 129-138 (2008).
127. Lee, K., Im, J.M.: A practical procedure for the selective oxidation of phosphorus keto ylides to vicinal tricarbonyls using moist magnesium monoperoxyphthalate (MMPP) in dichloromethane at ambient temperature. *Tetrahedron Lett.* 42, 1539-1542 (2001).
128. Dong, J., Chen, W., Wang, S., Zhang, J., Li, H., Guo, H., Man, Y., Chen, B.: Jones oxidation and high performance liquid chromatographic analysis of cholesterol in biological samples. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 858, 239-246 (2007).
129. Młochowski, J., Wójtowicz-Młochowska, H.: Developments in Synthetic Application of Selenium(IV) Oxide and Organoselenium Compounds as Oxygen Donors and Oxygen-Transfer Agents. *Molecules.* 20, 10205-10243 (2015).
130. García, M.A., Carrasco, E., Aguilera, M., Alvarez, P., Rivas, C., Campos, J.M., Prados, J.C., Calleja, M.A., Esteban, M., Marchal, J.A., Aránega, A.: The Chemotherapeutic Drug 5-Fluorouracil Promotes PKR-Mediated Apoptosis in a p53- Independent Manner in Colon and Breast Cancer Cells. *PLoS One.* 6, e23887 (2011).

131. Li, X., Kong, X., Kong, X., Wang, Y., Yan, S., Yang, Q.: 53BP1 Sensitizes Breast Cancer Cells to 5-Fluorouracil. *PLoS One*. 8, e74928 (2013).
132. Hasegawa, M., Miyajima, A., Kosaka, T., Yasumizu, Y., Tanaka, N., Maeda, T., Shirotake, S., Ide, H., Kikuchi, E., Oya, M.: Low-dose docetaxel enhances the sensitivity of S-1 in a xenograft model of human castration resistant prostate cancer. *Int. J. Cancer*. 130, 431-442 (2012).
133. Silva, T.L., Reis, A., Hewitt, C., Roseiro, J.C.: Citometria de fluxo: funcionalidade celular on-line em bioprocessos. *Bol. Biotecnol.* 77, 32-40 (2004).
134. Riccardi, C., Nicoletti, I.: Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat. Protoc.* 1, 1458-61 (2006).
135. Chottanapund, S., Van Duursen, M.B.M., Navasumrit, P., Hunsonti, P., Timtavorn, S., Ruchirawat, M., Van Den Berg, M.: Effect of androgens on different breast cancer cells co-cultured with or without breast adipose fibroblasts. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 138, 54-62 (2013).
136. Raju, J., Rao, C. V: Diosgenin , a steroid saponin constituent of yams and fenugreek: Emerging evidence for applications in medicine. *Bioact. Compd. Phytomedicine*. 125-142 (2012).

8.1.2 Espectros ^1H -RMN e ^{13}C -RMN e IV da Diosgenona (C2)

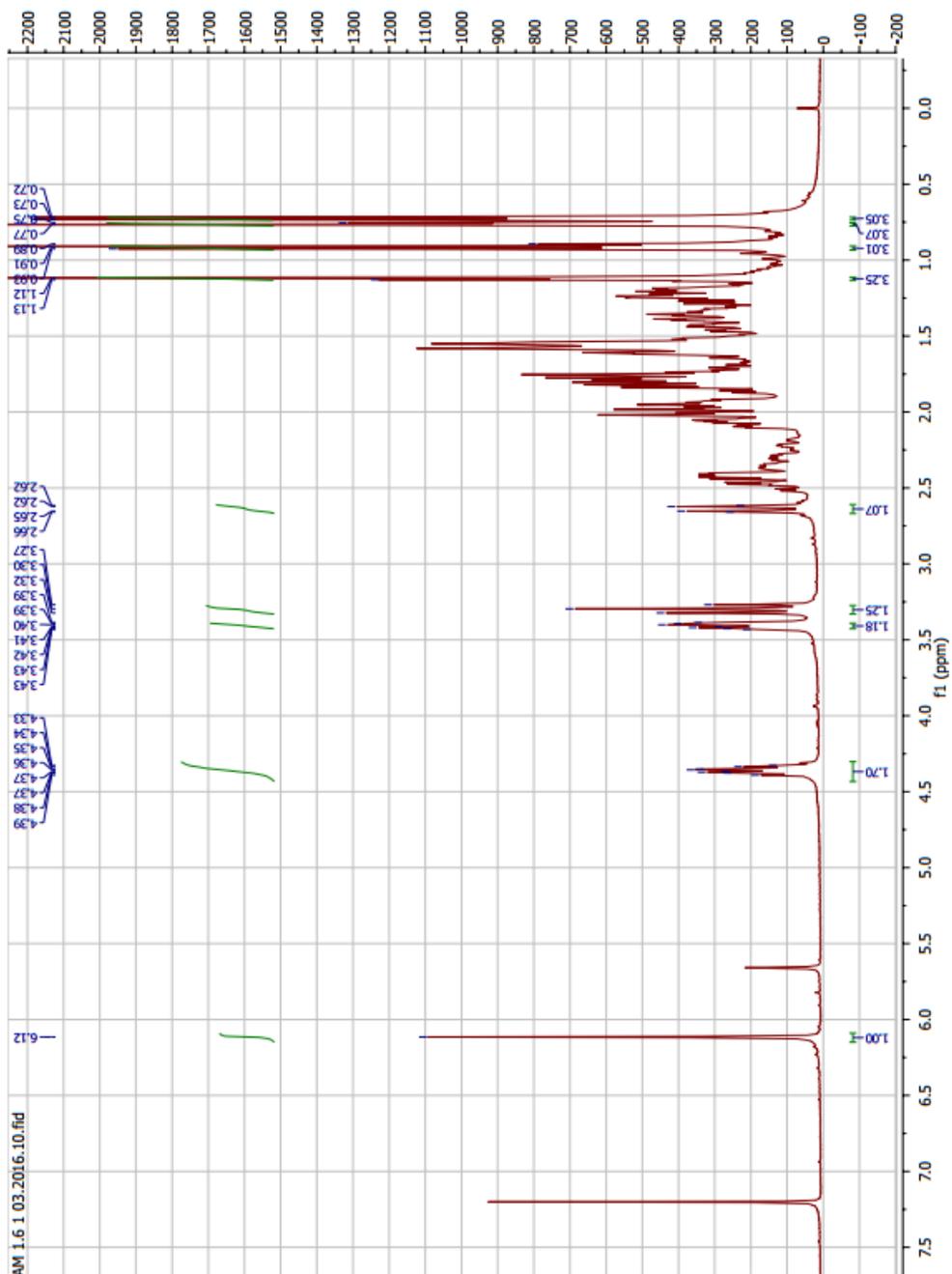


Fig.2 - Espectro ^1H -RMN do C2

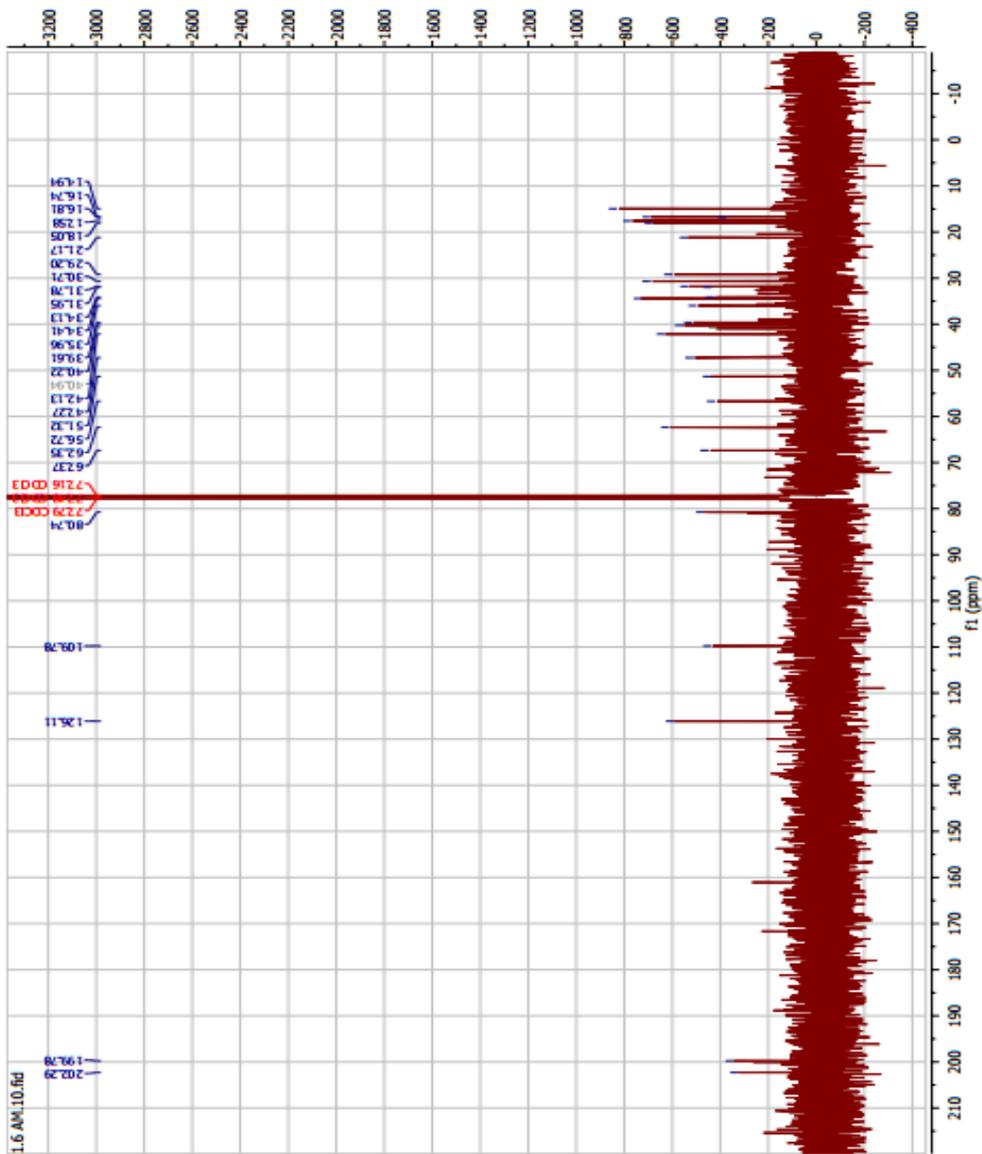


Fig.2.1 - Espetro ¹³C-RMN do C2

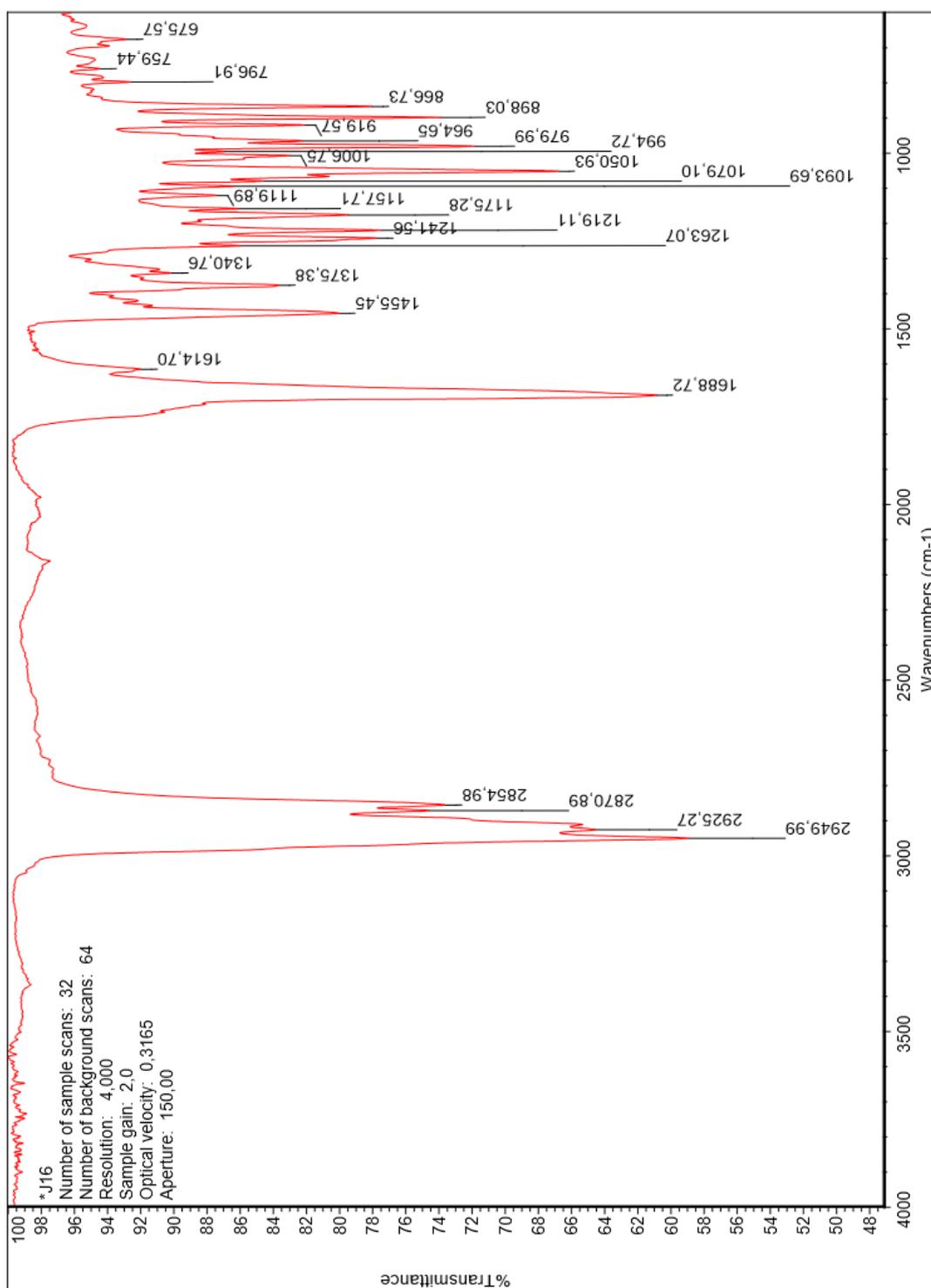


Fig.2.2 - Espetro IV do C2

8.1.3 Espectros ^1H RMN e ^{13}C -RMN e IV do 7-oxodiosgenina (C4)

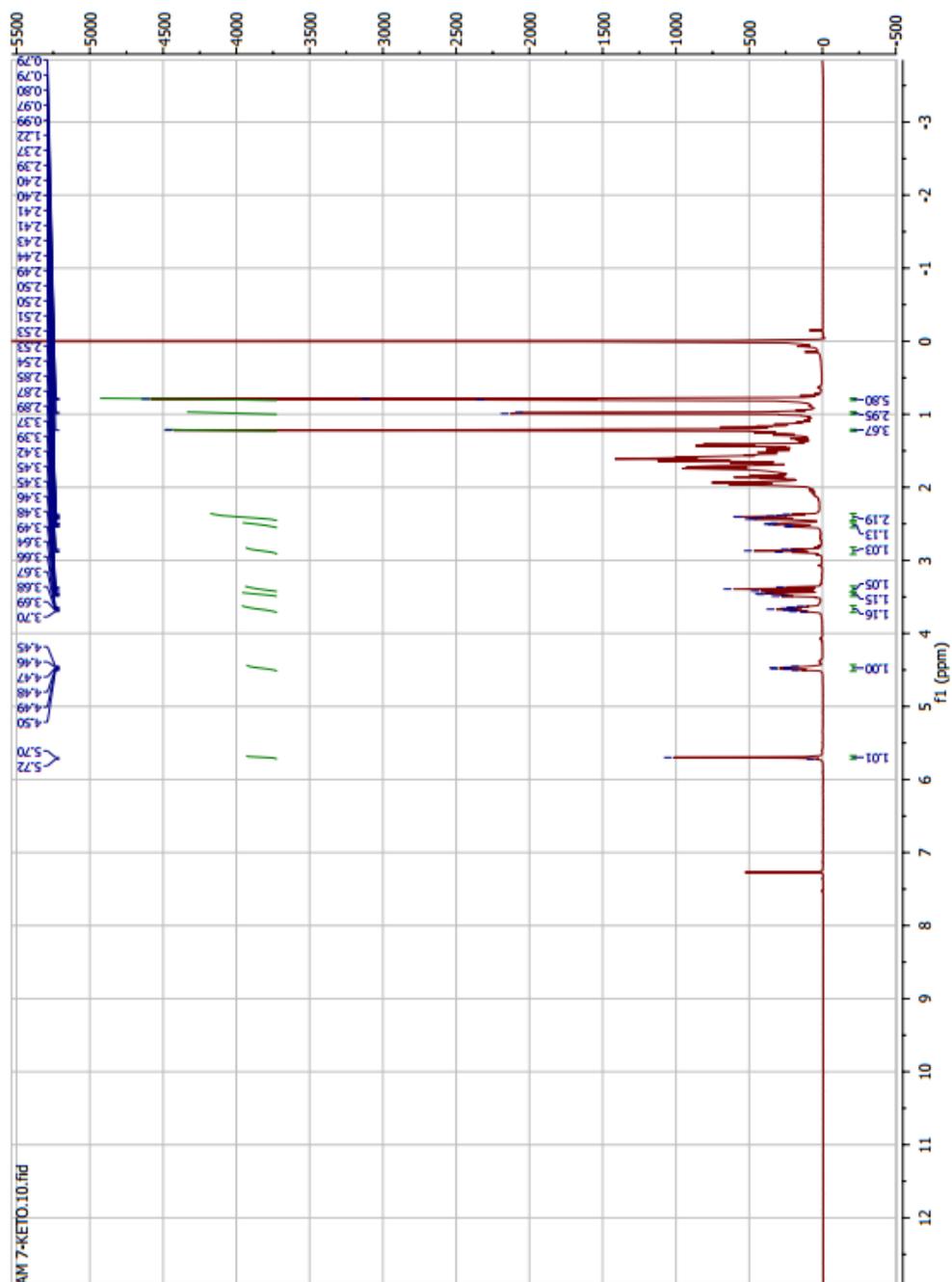


Fig.3 - Espectro ^1H -RMN do C4

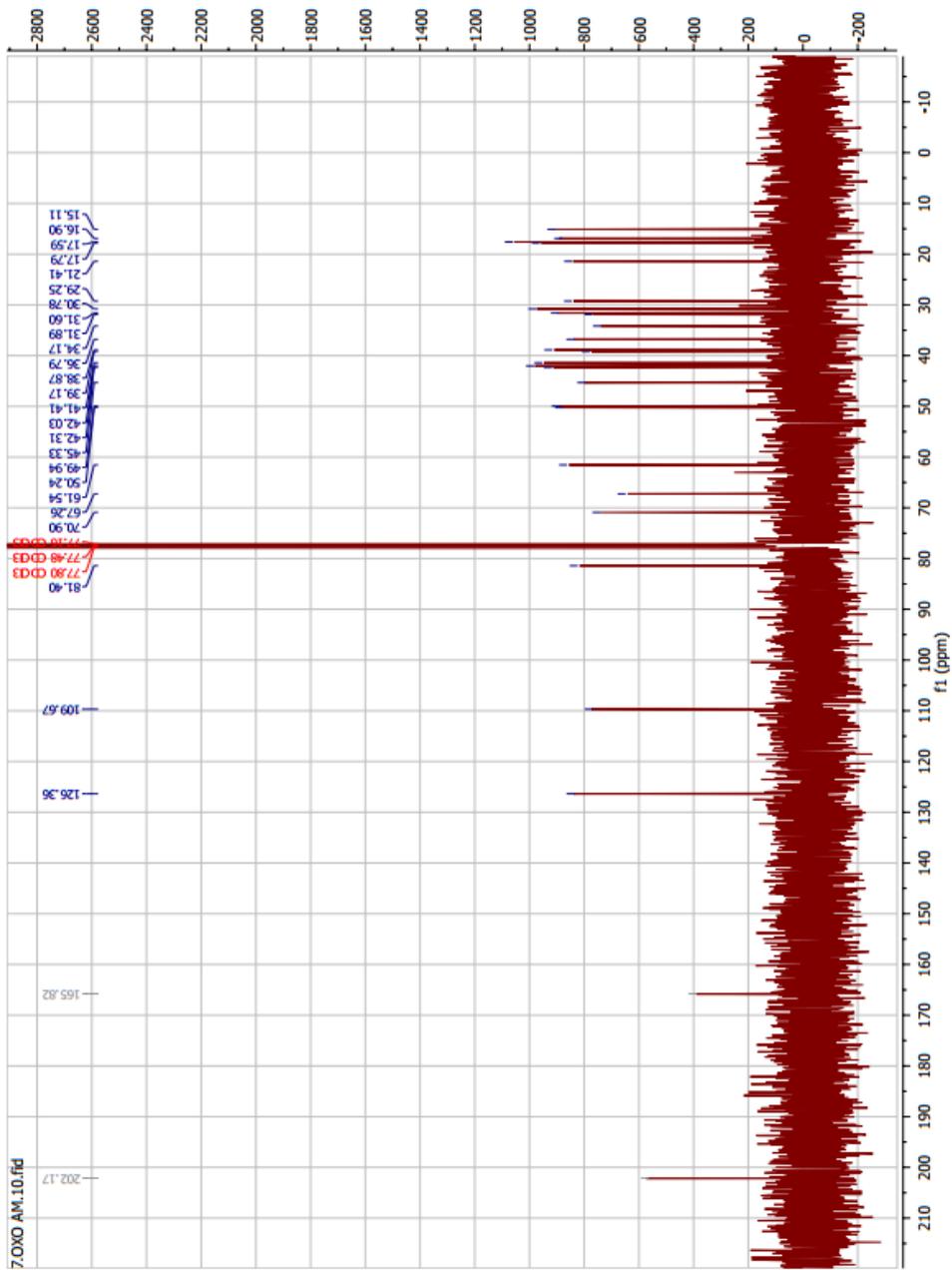


Fig.3.1 - Espetro ^{13}C -RMN do C4

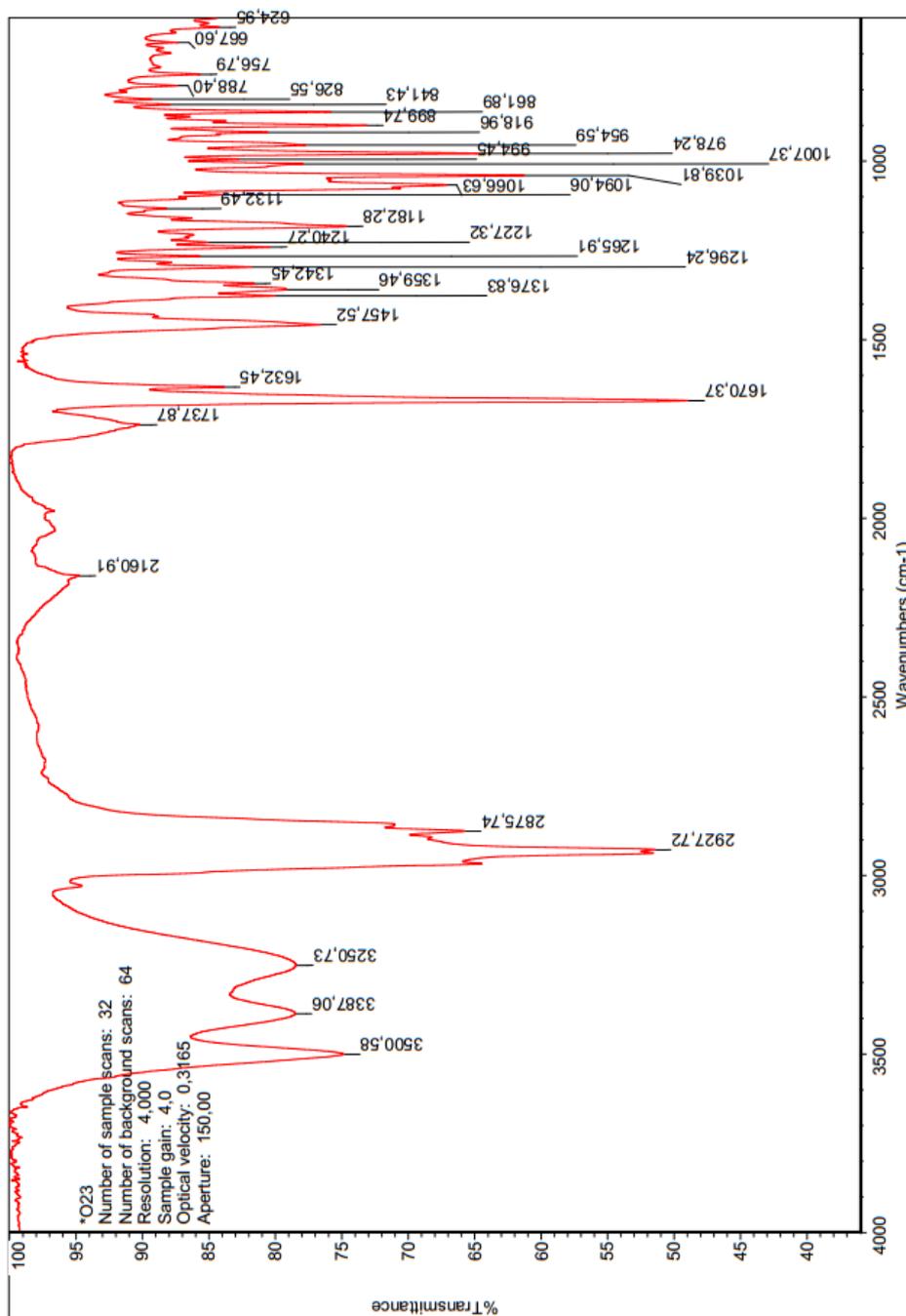


Fig. 3.2 - Espectro IV do C4

8.1.4 Espectros ¹H RMN e ¹³C-RMN e IV do 4β-hidroxi-diosgenina (C5)

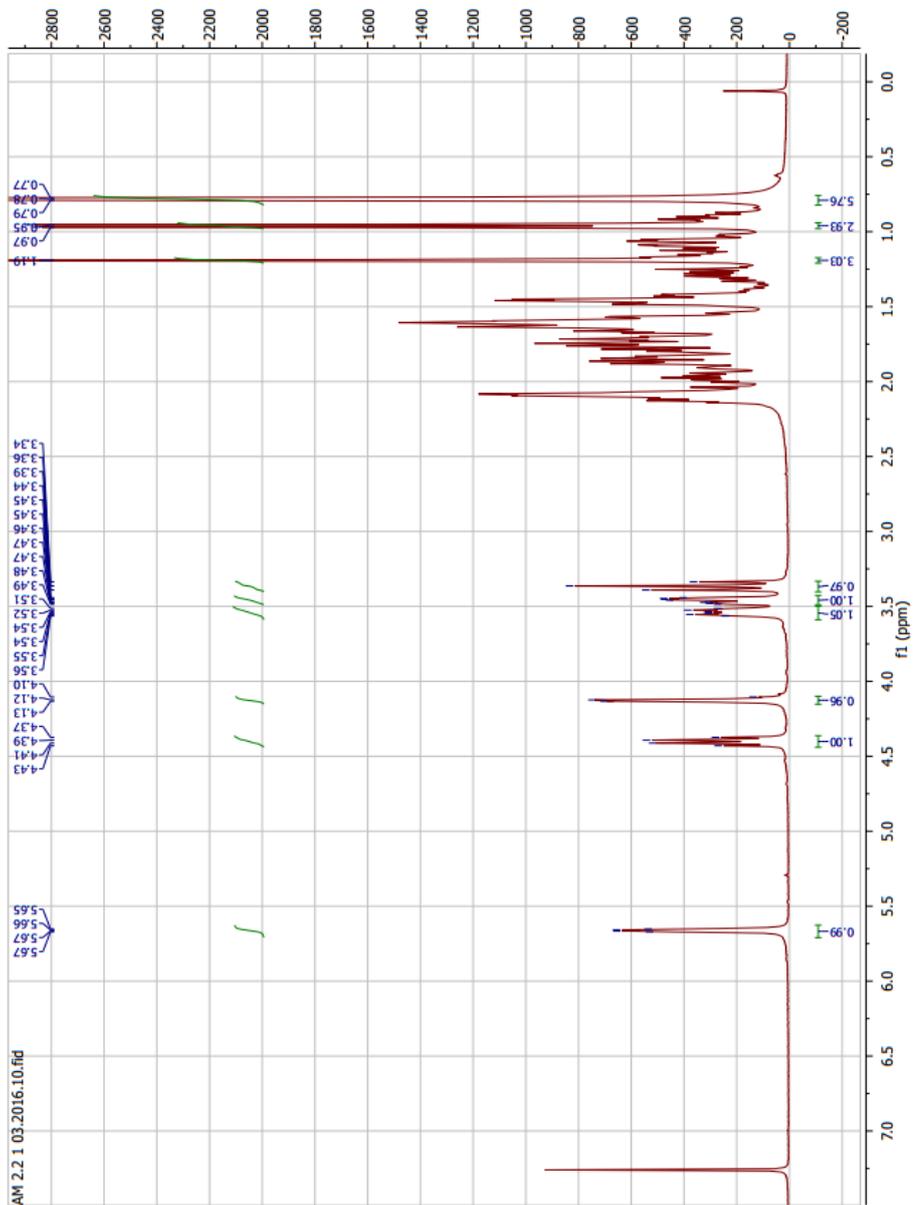


Fig.4 - Espectro ¹H-RMN do C5

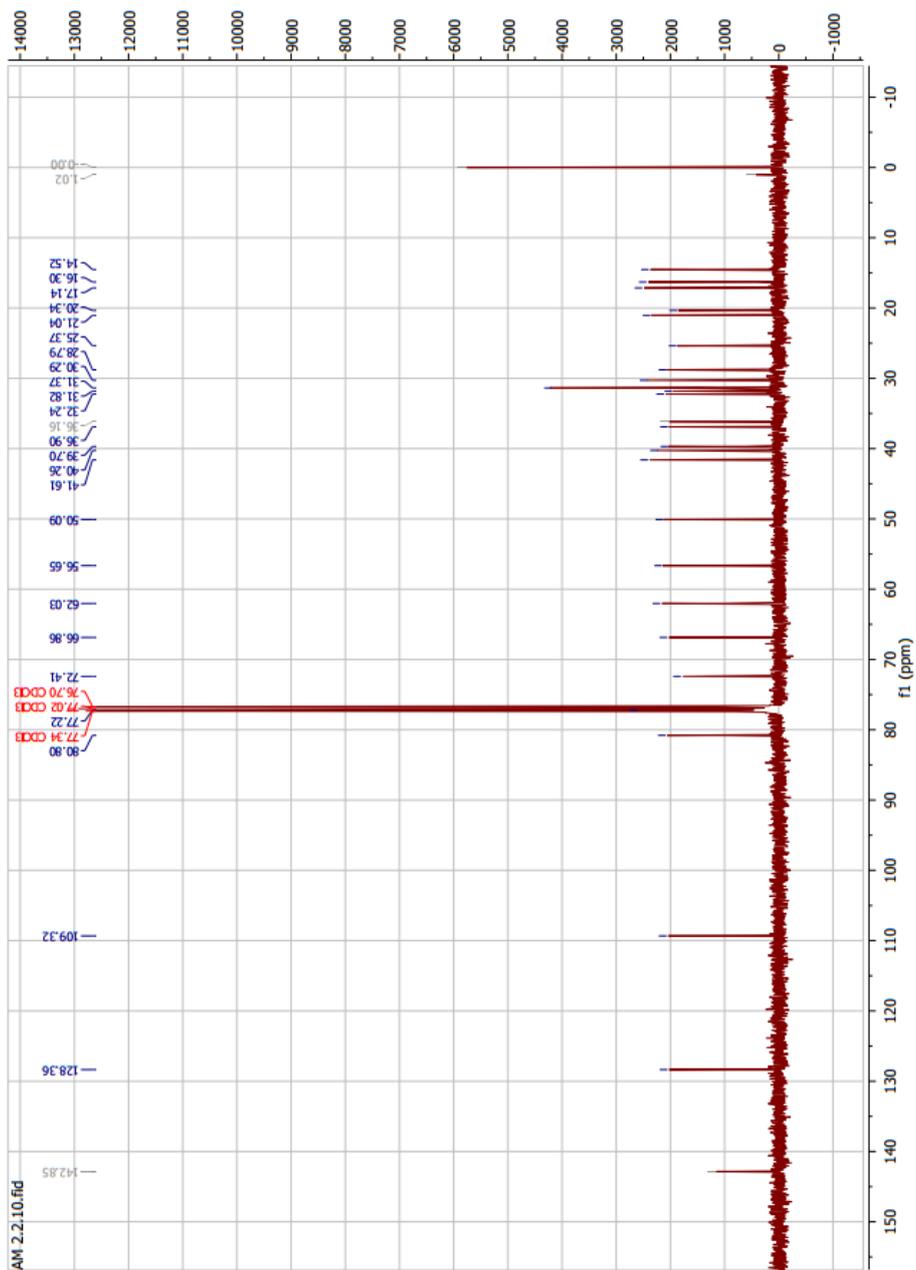


Fig.4.1 - Espetro ¹³C-RMN do C5

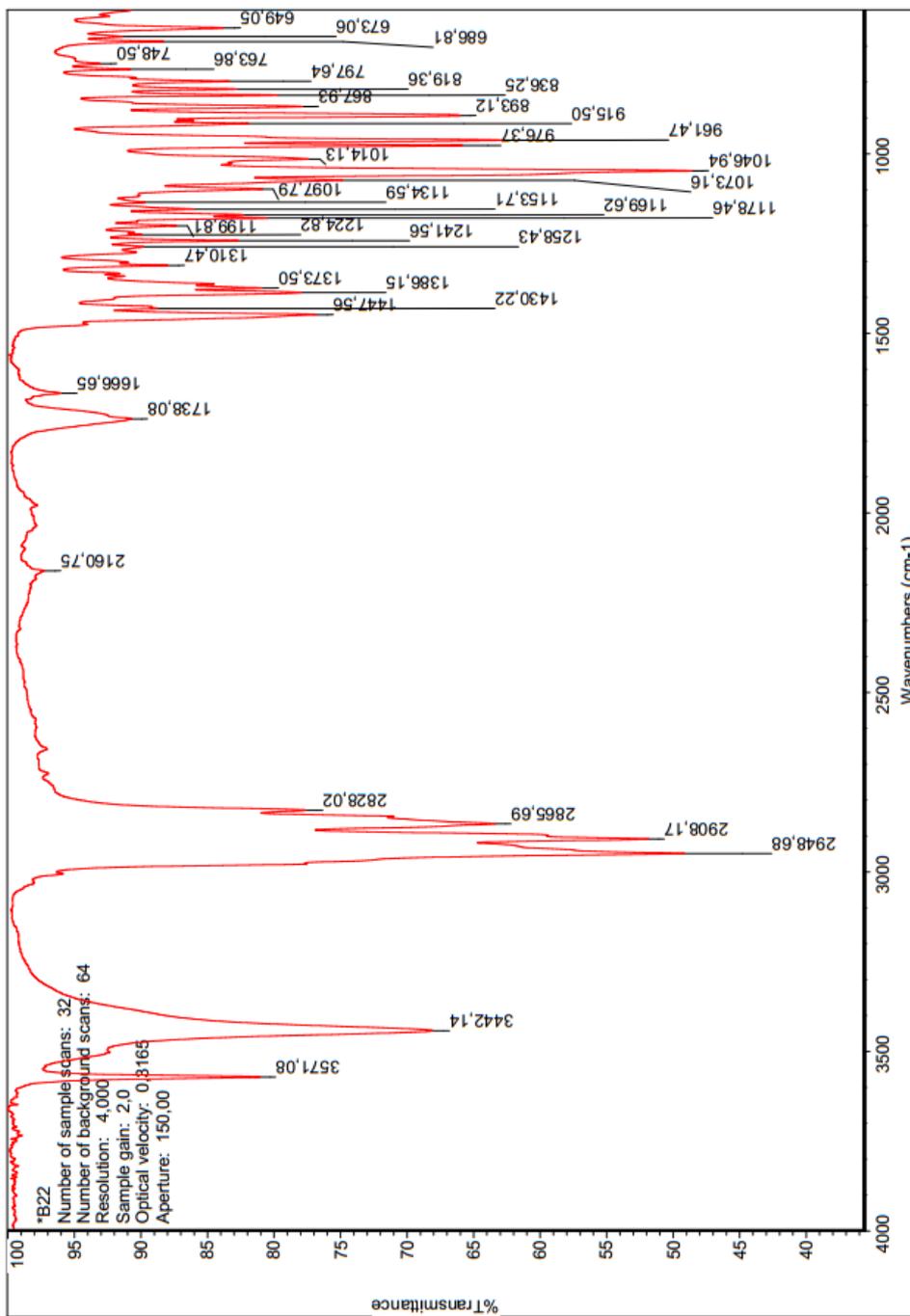


Fig. 4.2 - Espectro IV do C5

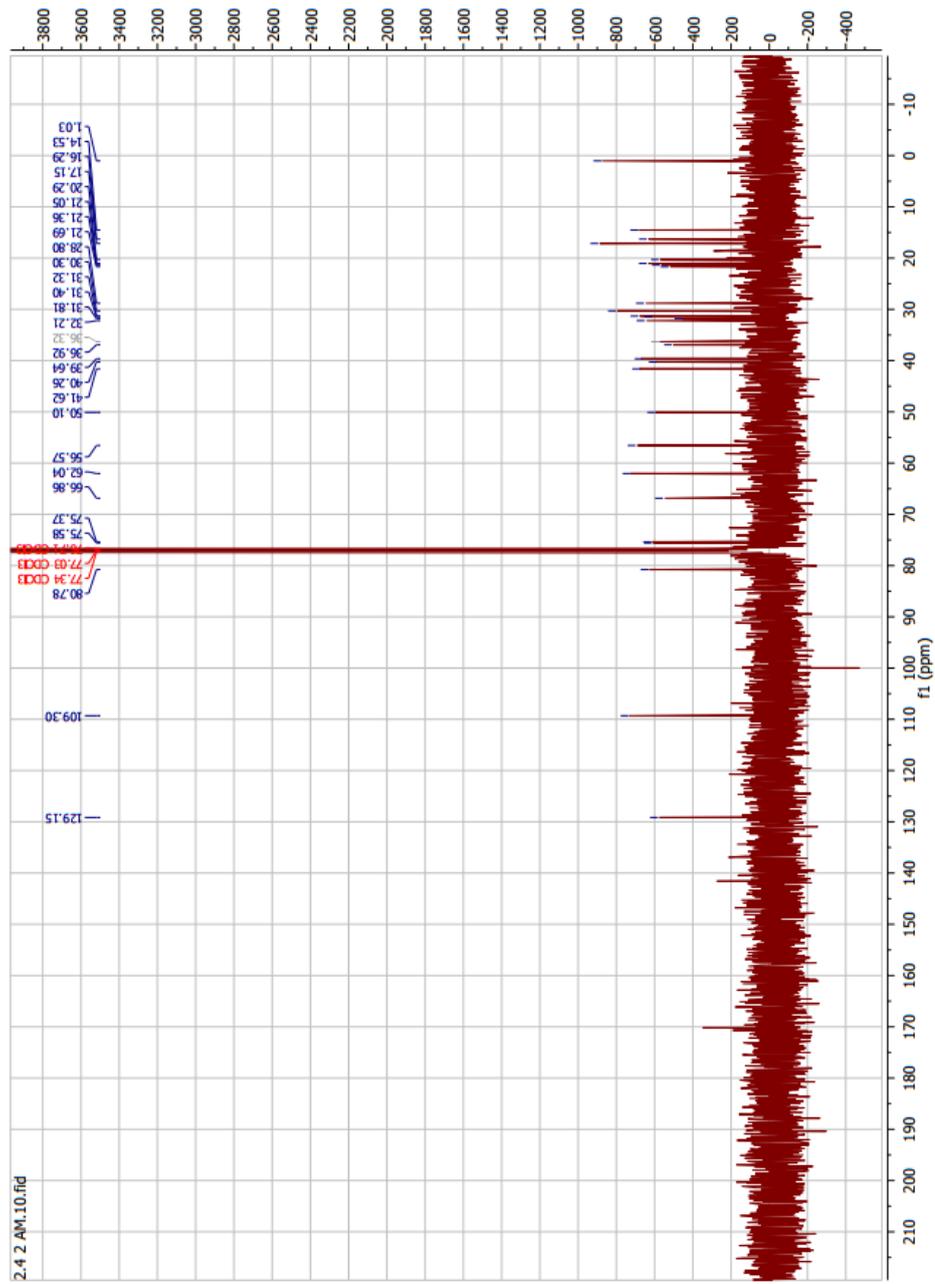


Fig. 5.1 - Espetro ¹³C-RMN do C6

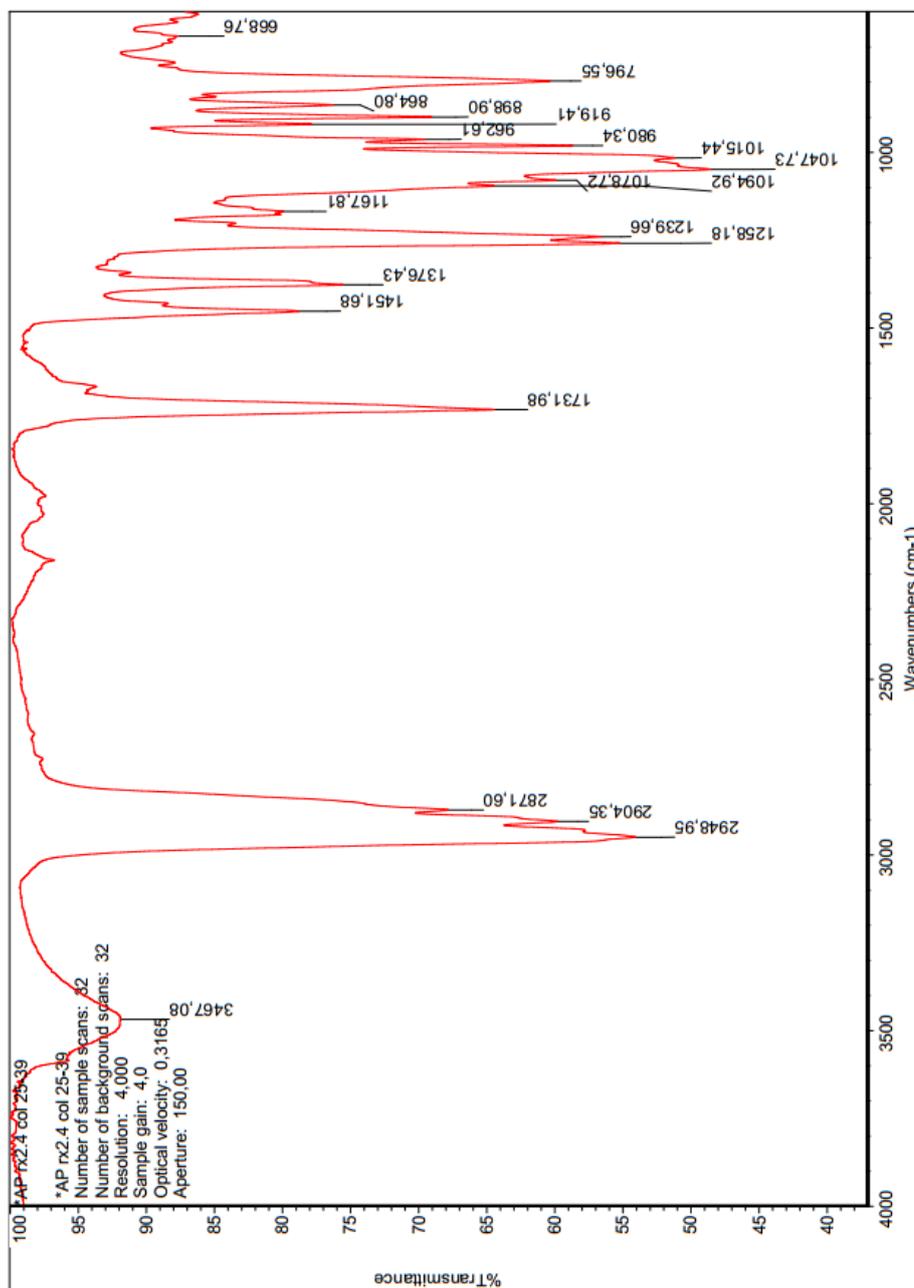


Fig. 5.2 - Espetro IV do C6

8.1.6 Espectros ^1H -RMN e ^{13}C -RMN e IV do 6 α -hidroxiespirost-4-en-3 β -ilo (C7)

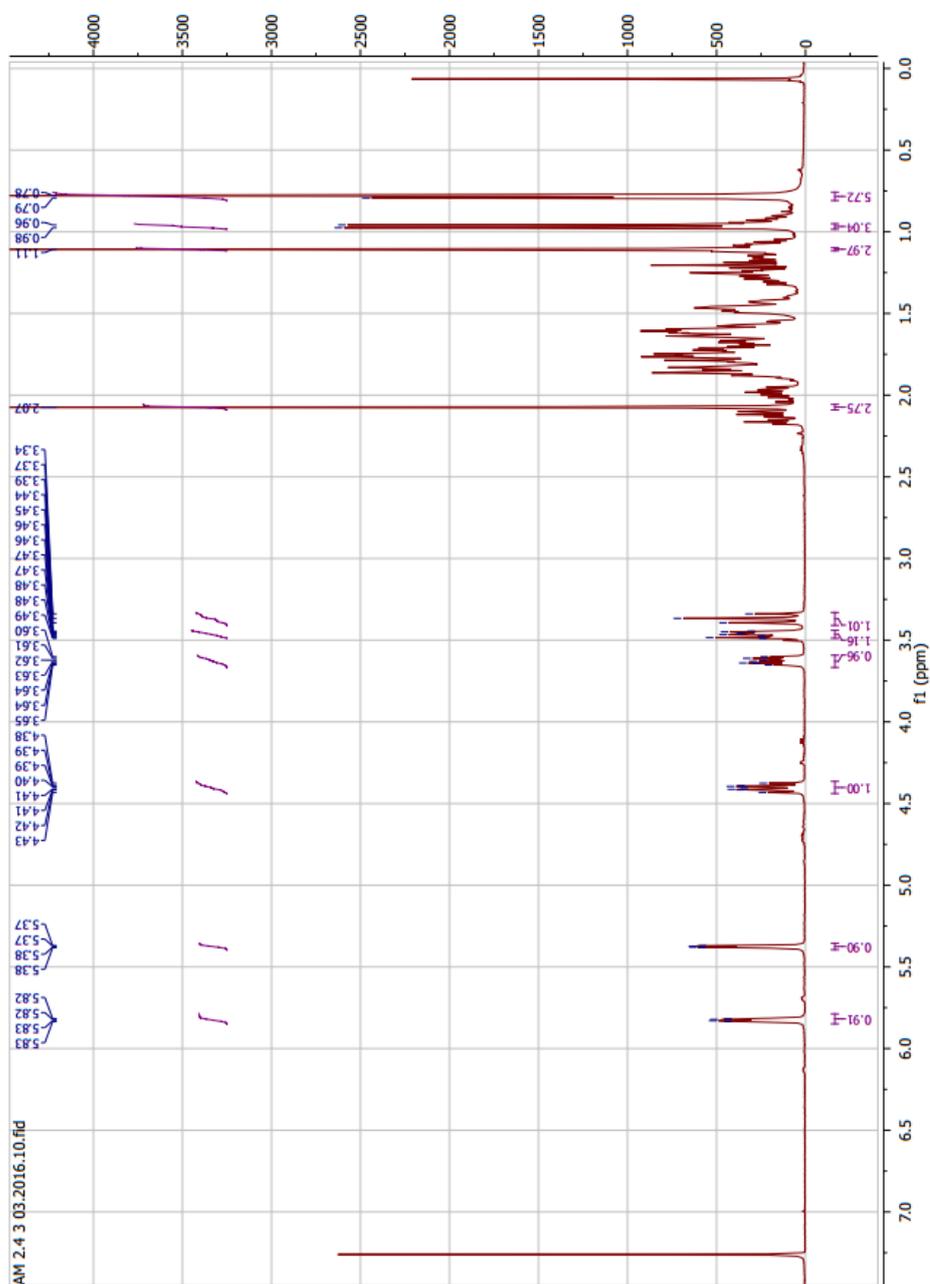


Fig.6 - Espectro ^1H -RMN do C7

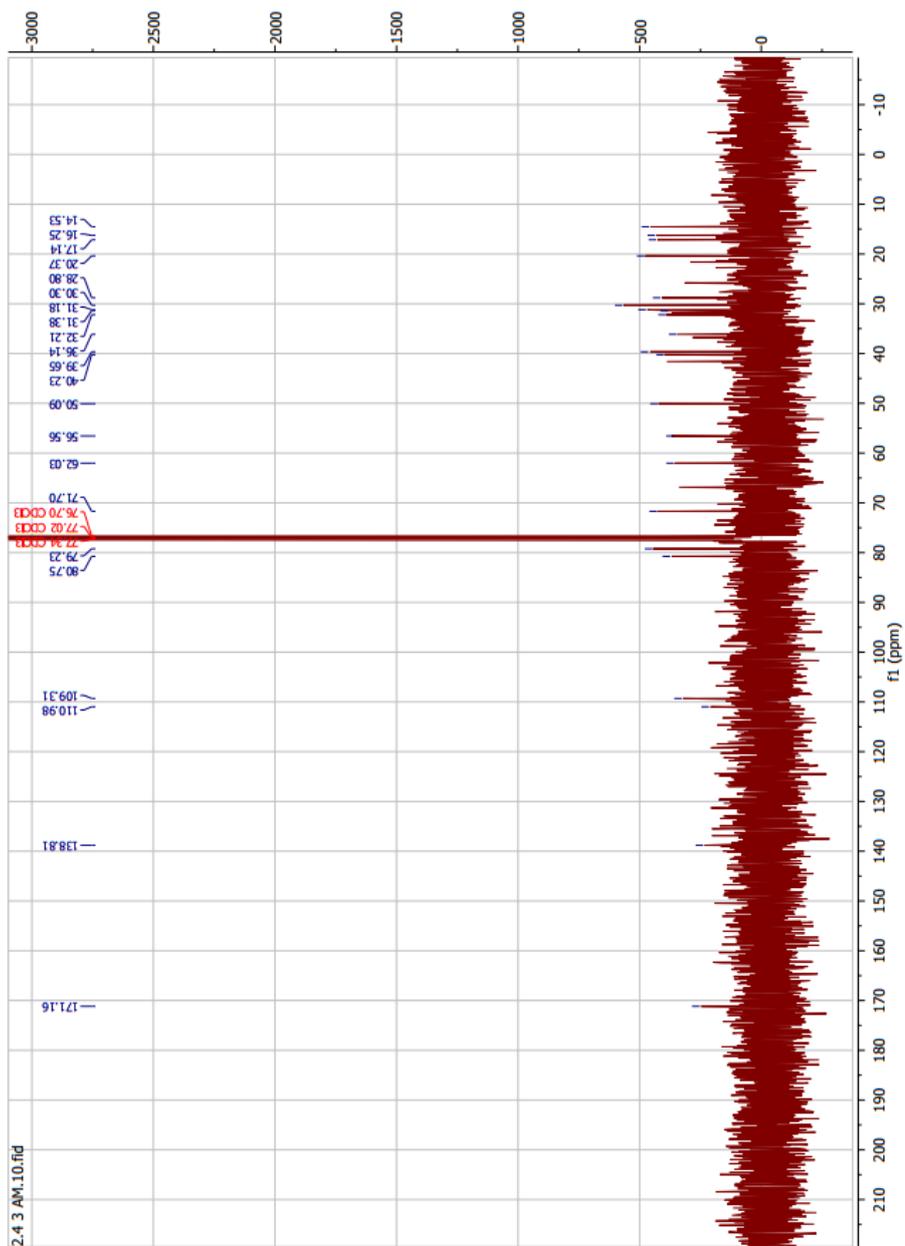


Fig. 6.1 - Espectro ¹³C-RMN do C7

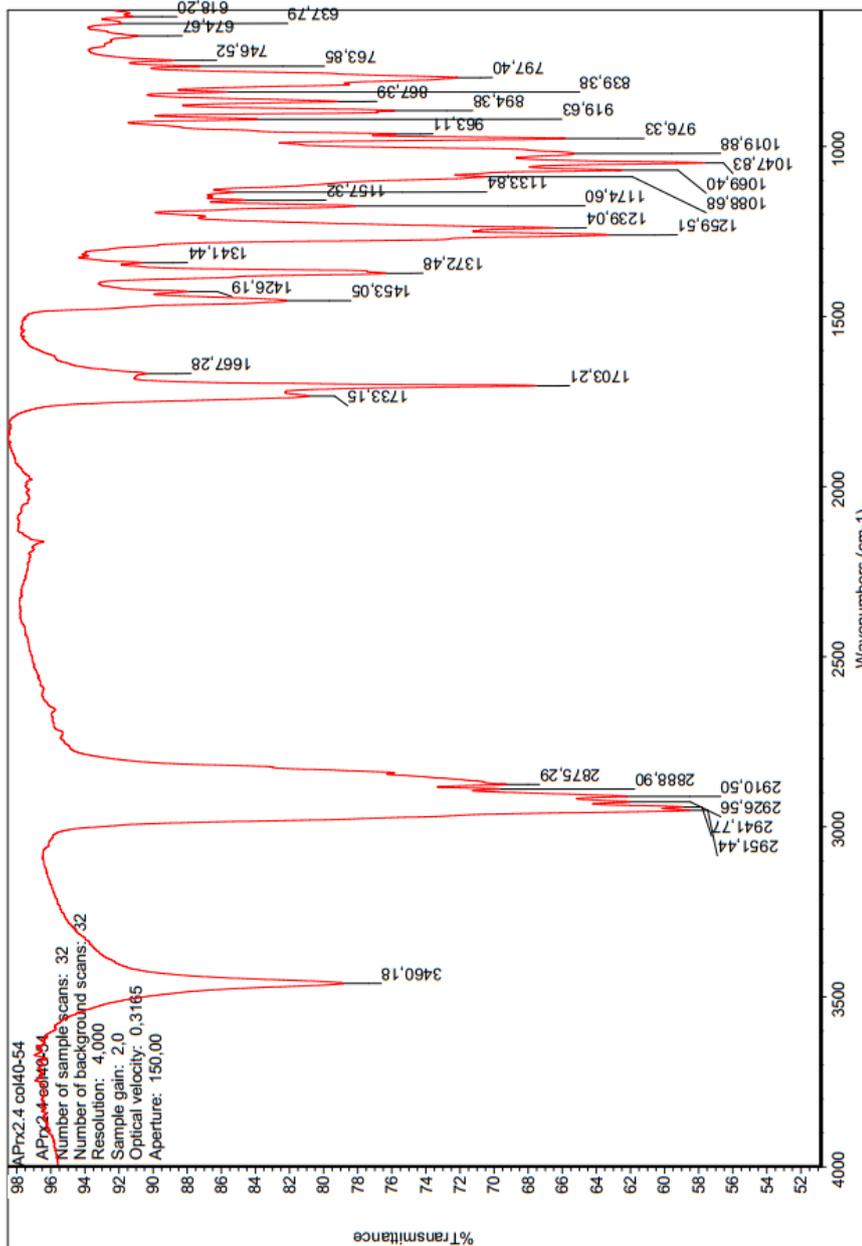


Fig. 6.2 - Espectro IV do C7

8.1.7 Espectros ^1H RMN e ^{13}C -RMN e IV do acetato de $5\beta,6\beta$ -epoxidiosgenina (C8)

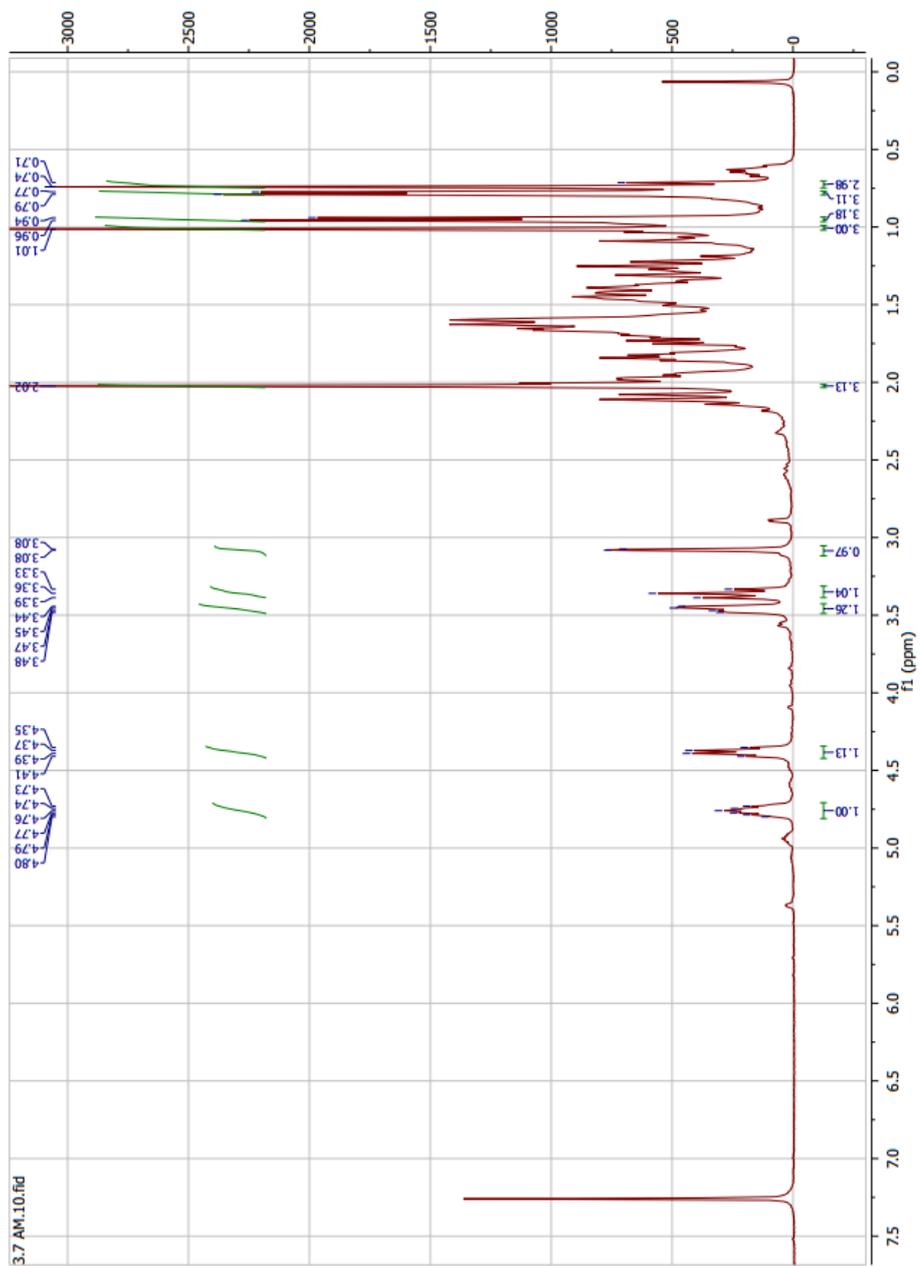


Fig.7 - Espetro ^1H -RMN do C8

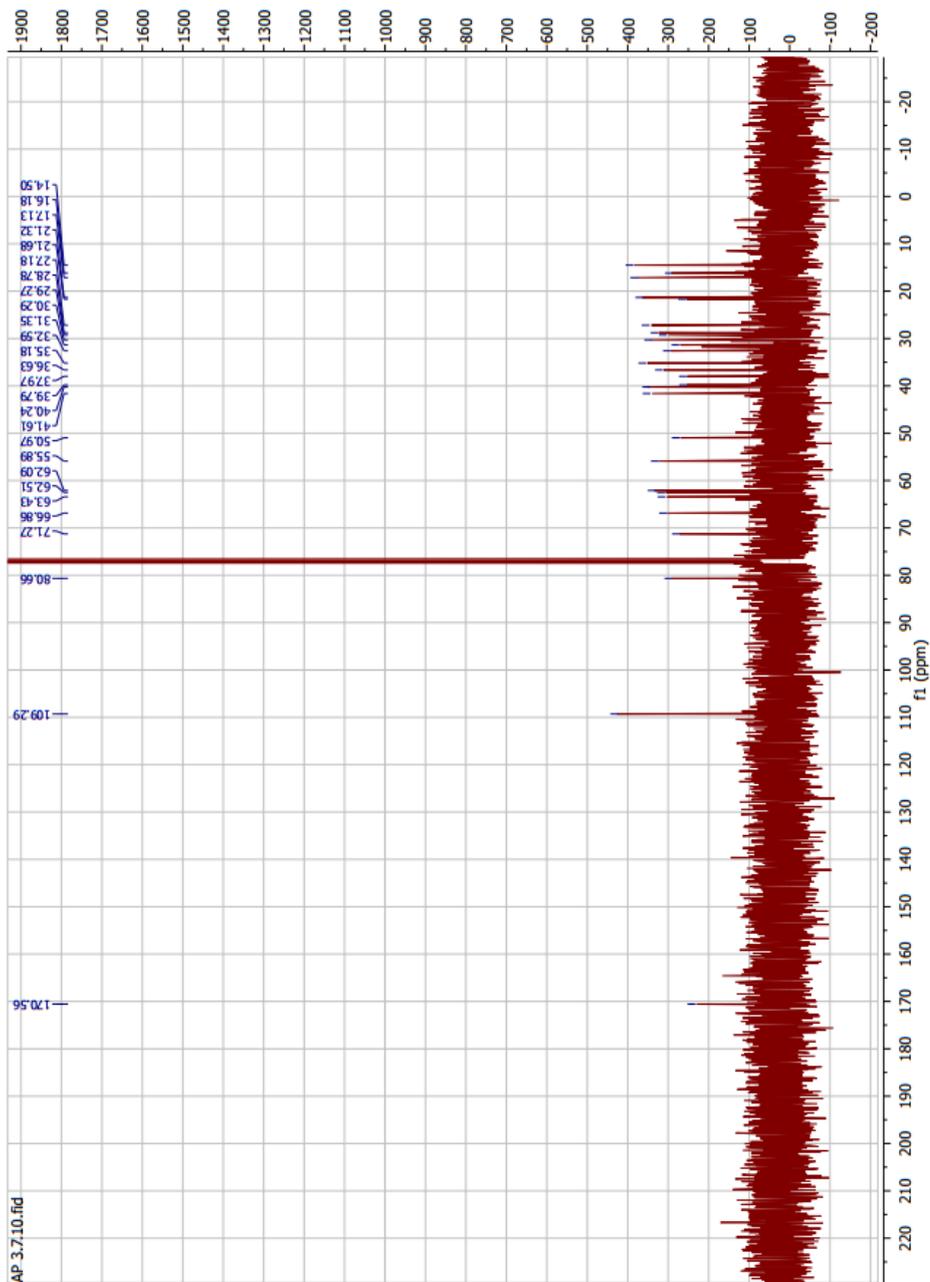


Fig.7.1 - Espetro ¹³C-RMN do C8

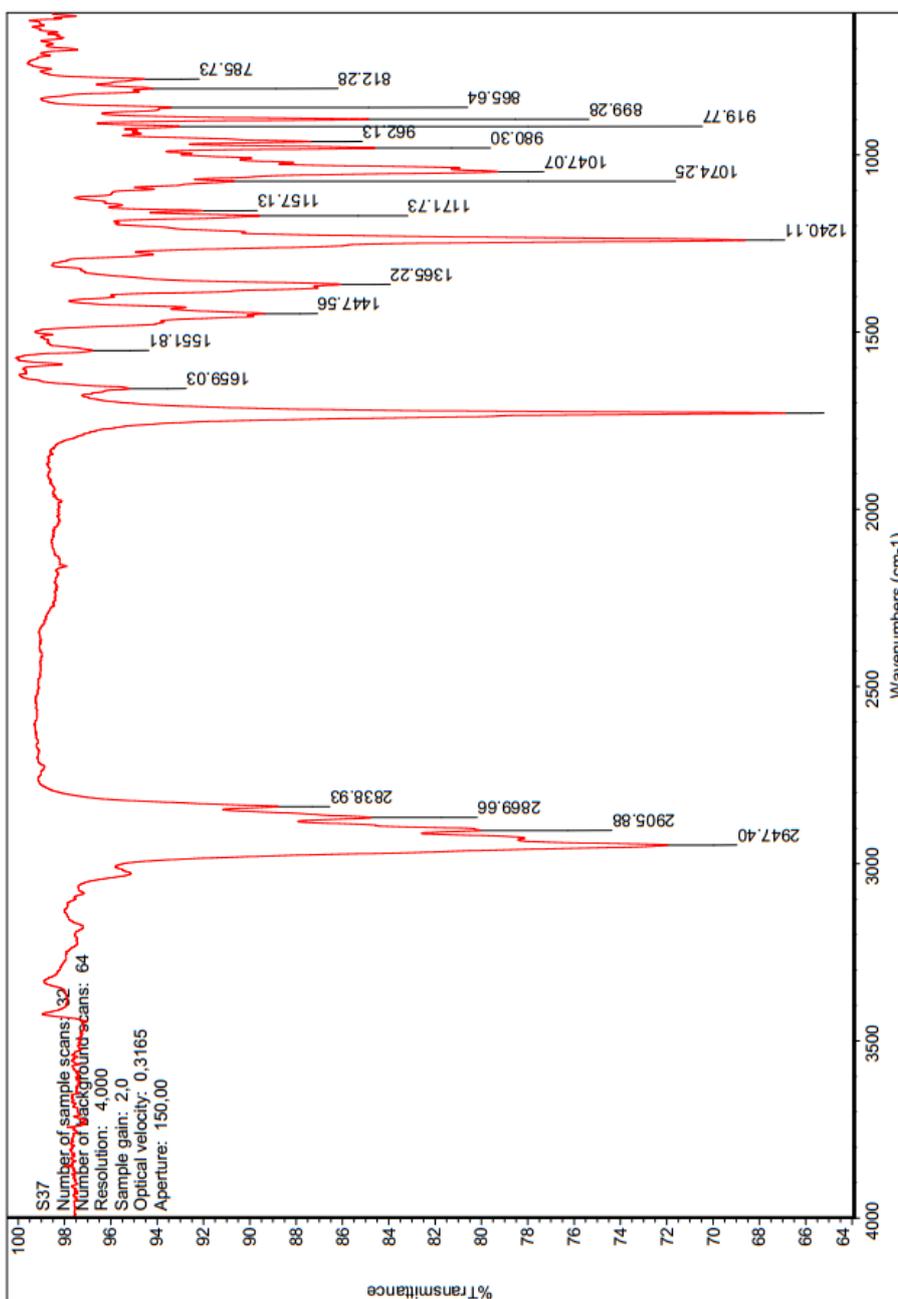


Fig.7.2 - Espetro IV do C8

8.1.8 Espectros ^1H RMN e ^{13}C -RMN e IV do 5 β ,6 β -epoxidiosgenina (C9)

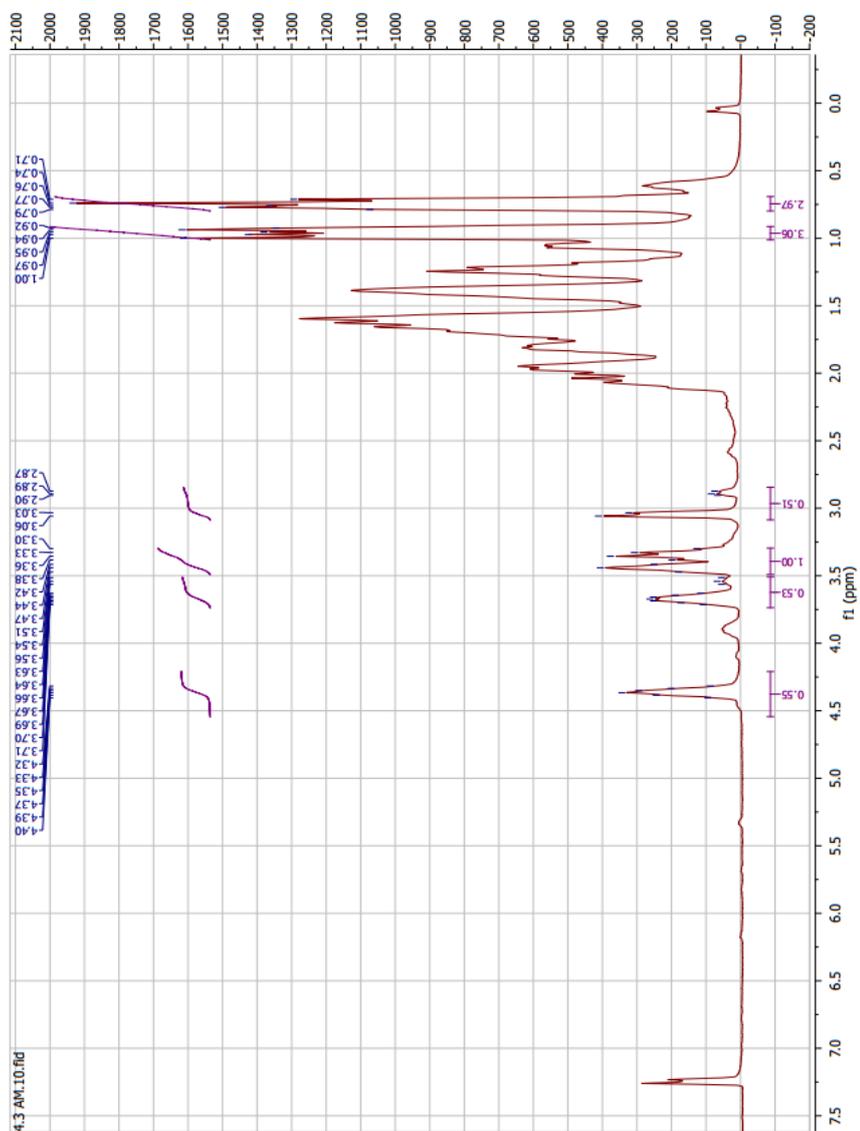


Fig.8 - Espectro ^1H -RMN do C9

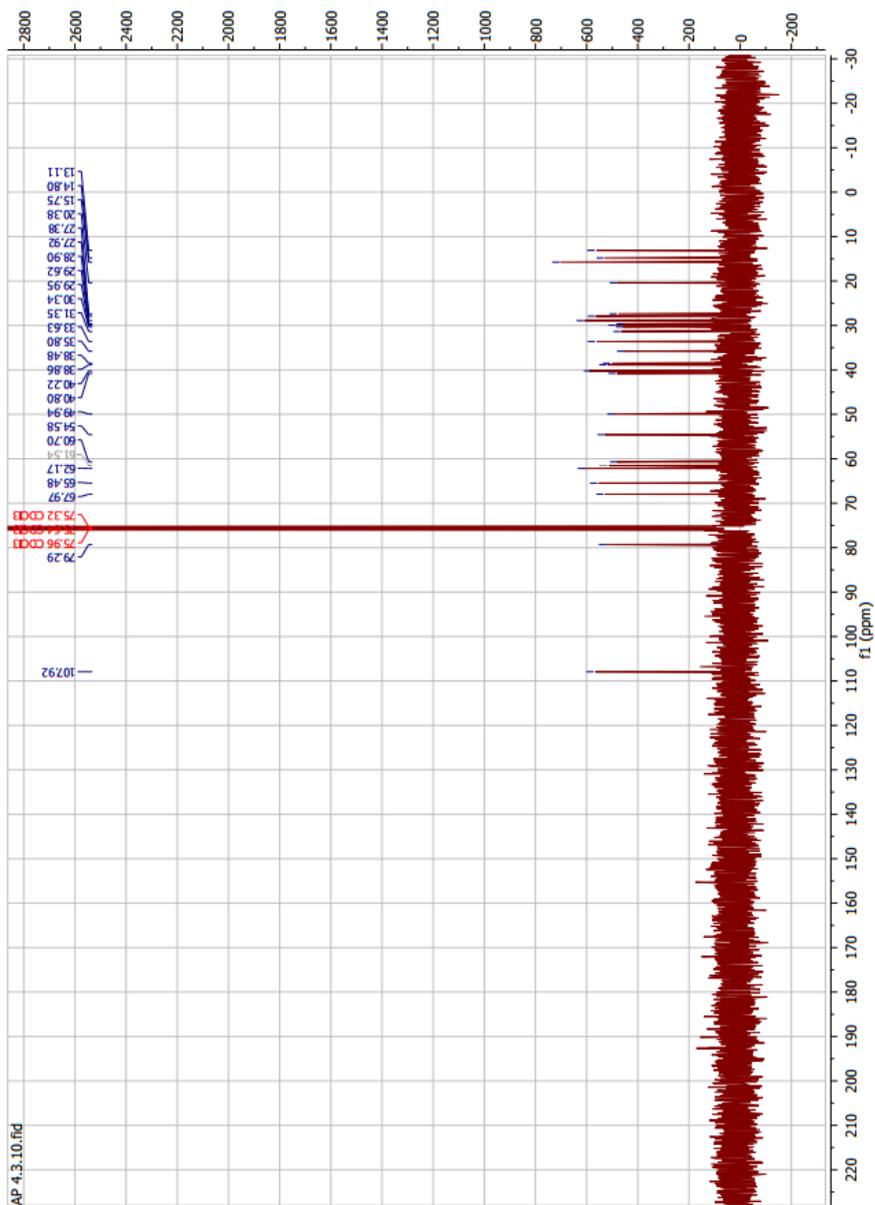


Fig.8.1 - Espetro ¹³C-RMN do C9

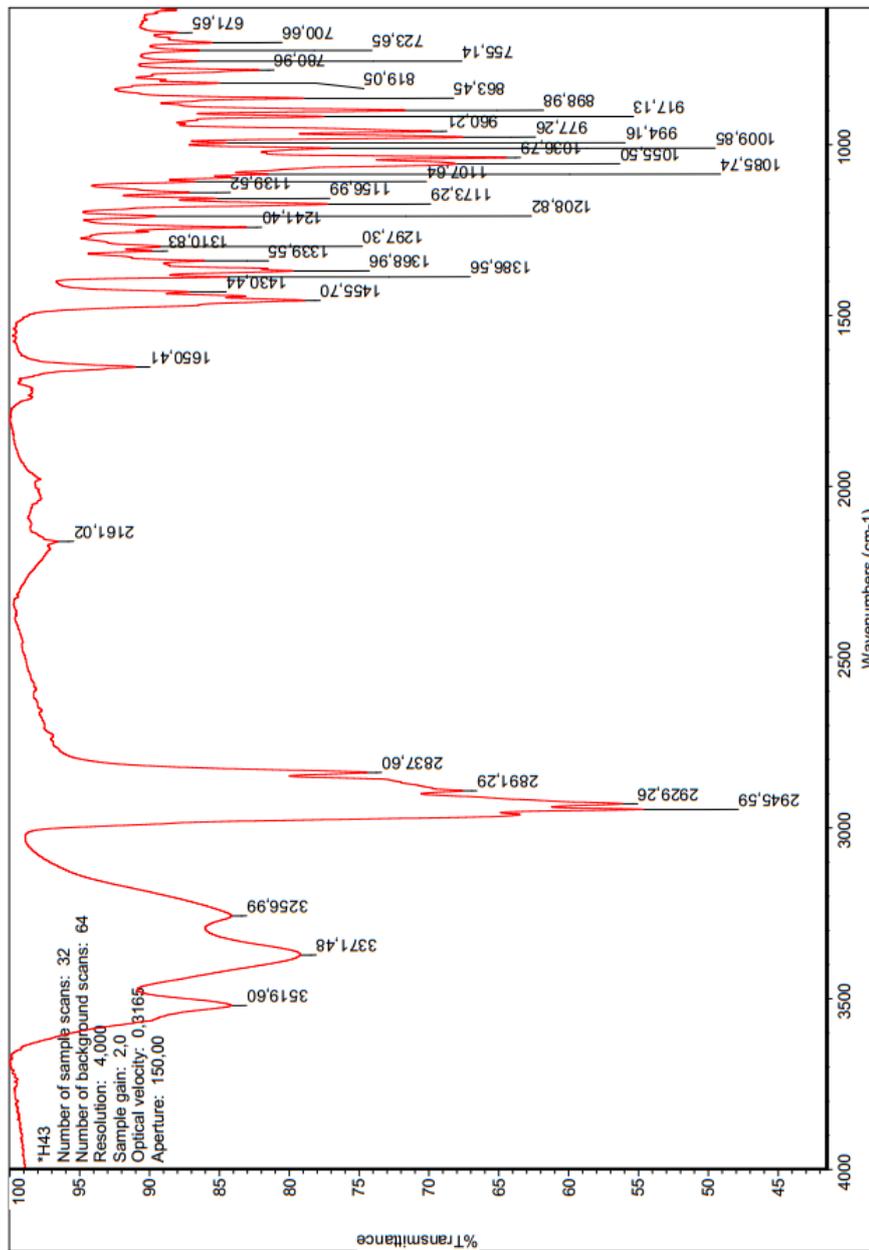


Fig.8.2 - Espectro IV do C9

8.1.9 Espectros ^1H RMN e ^{13}C -RMN e IV do acetato de $5\alpha,6\alpha$ -epoxidiosgenina (C10)

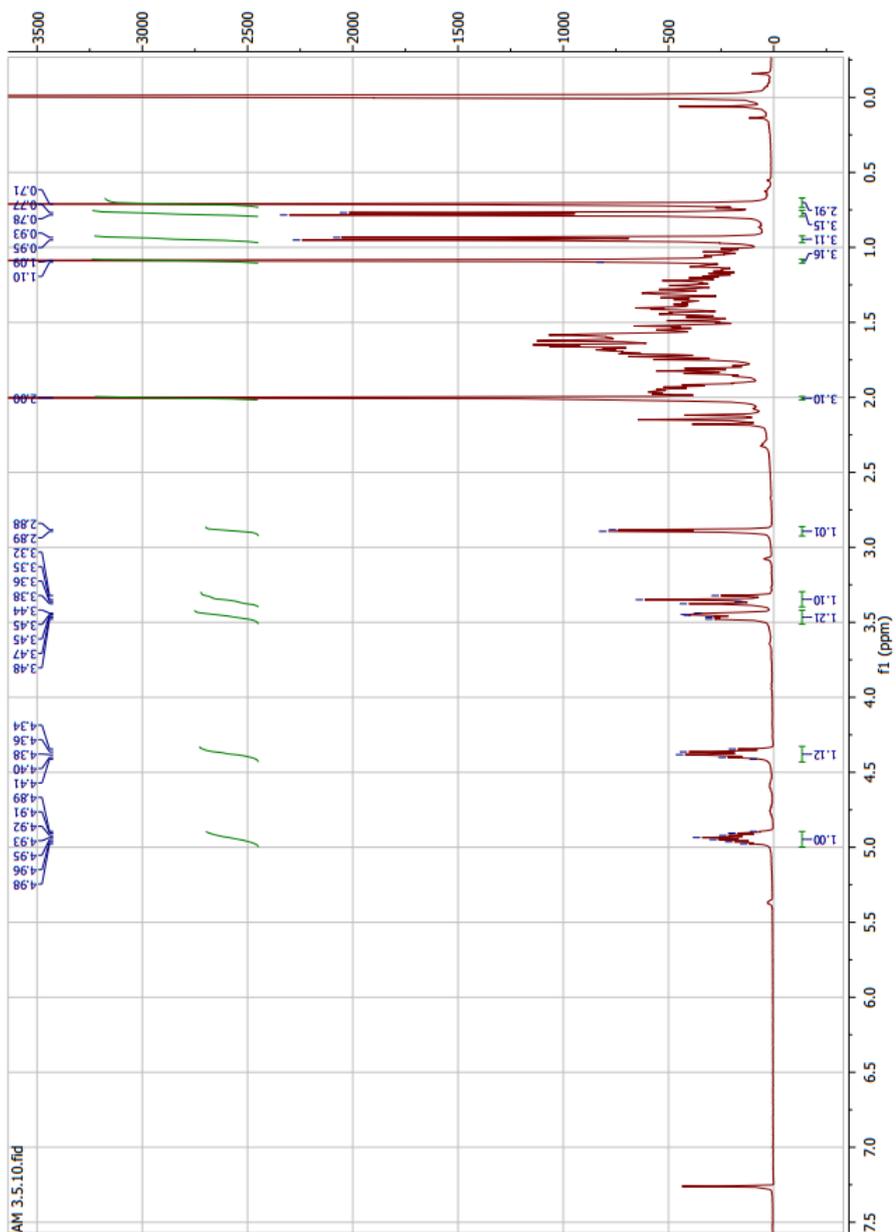


Fig.9 - Espectro ^1H -RMN do C10

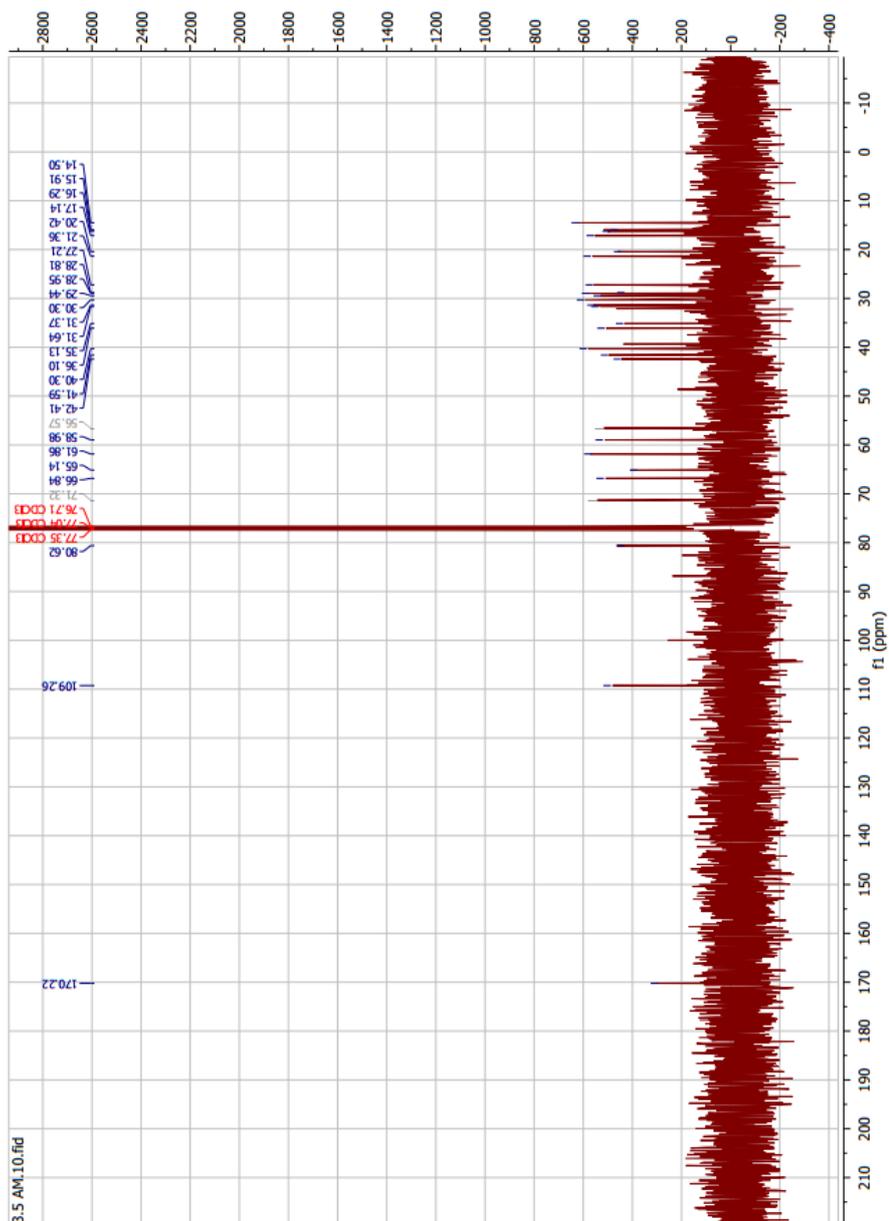


Fig.9.1 - Espetro ¹³C-RMN do C10

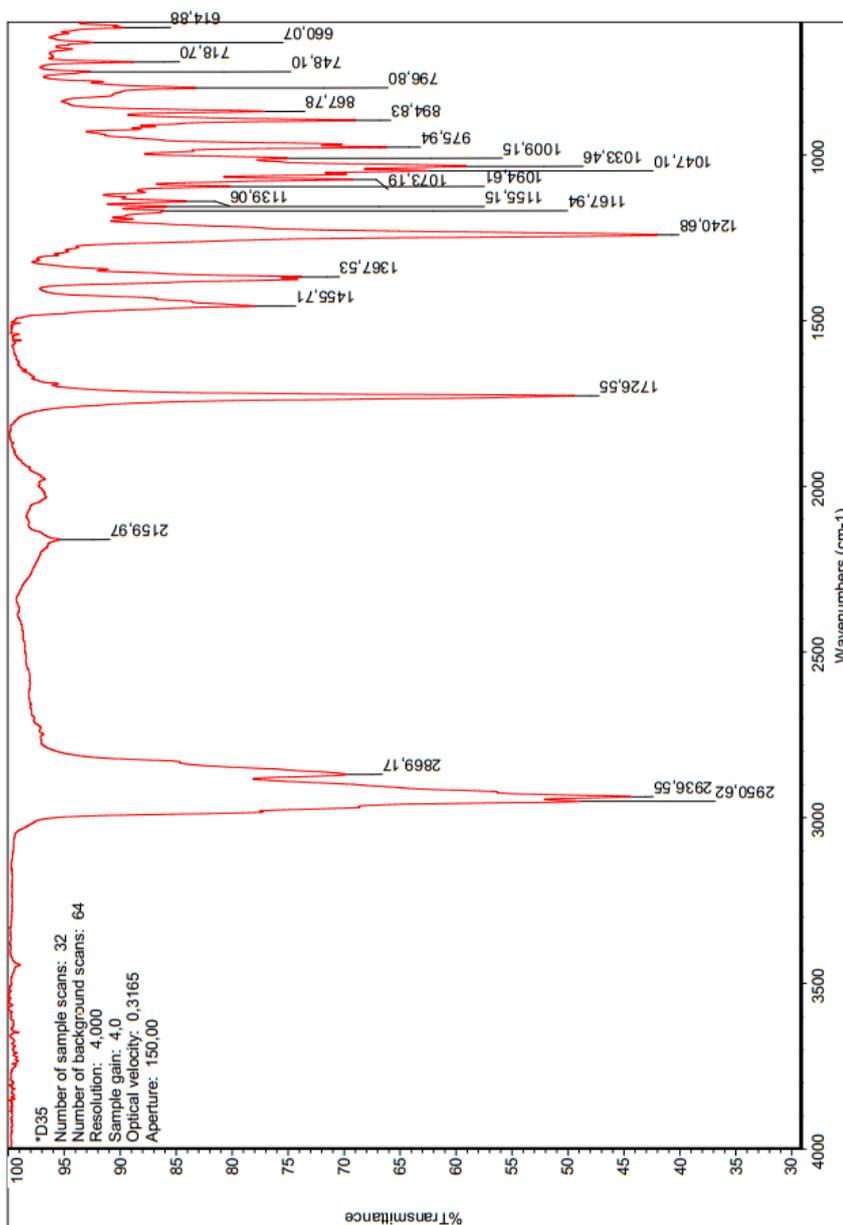


Fig.9.2 - Espetro IV do C10

8.1.10 Espectros ^1H RMN e ^{13}C -RMN e IV do 5 α ,6 α -epoxidiosgenina (C11a)

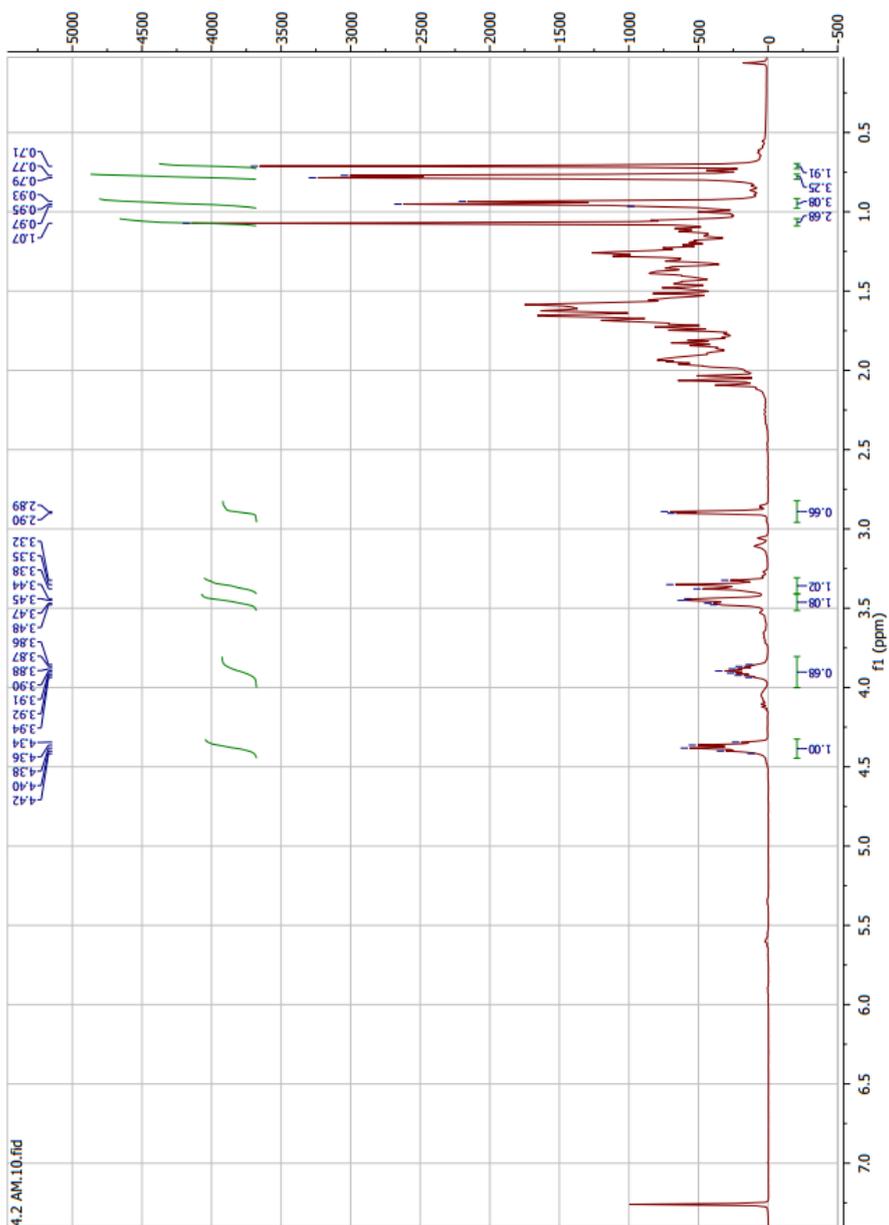
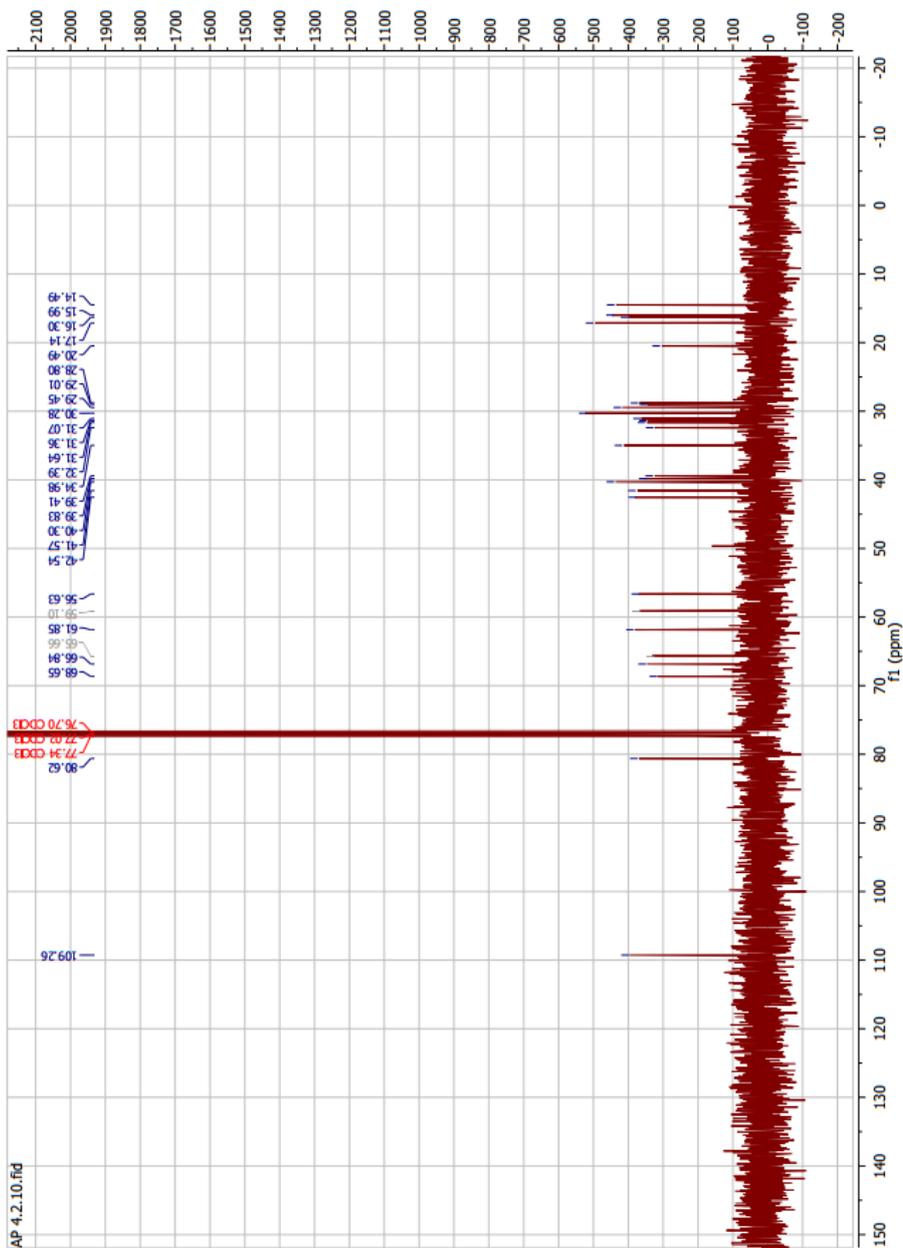


Fig. 10 - Espectro ^1H -RMN do C11a



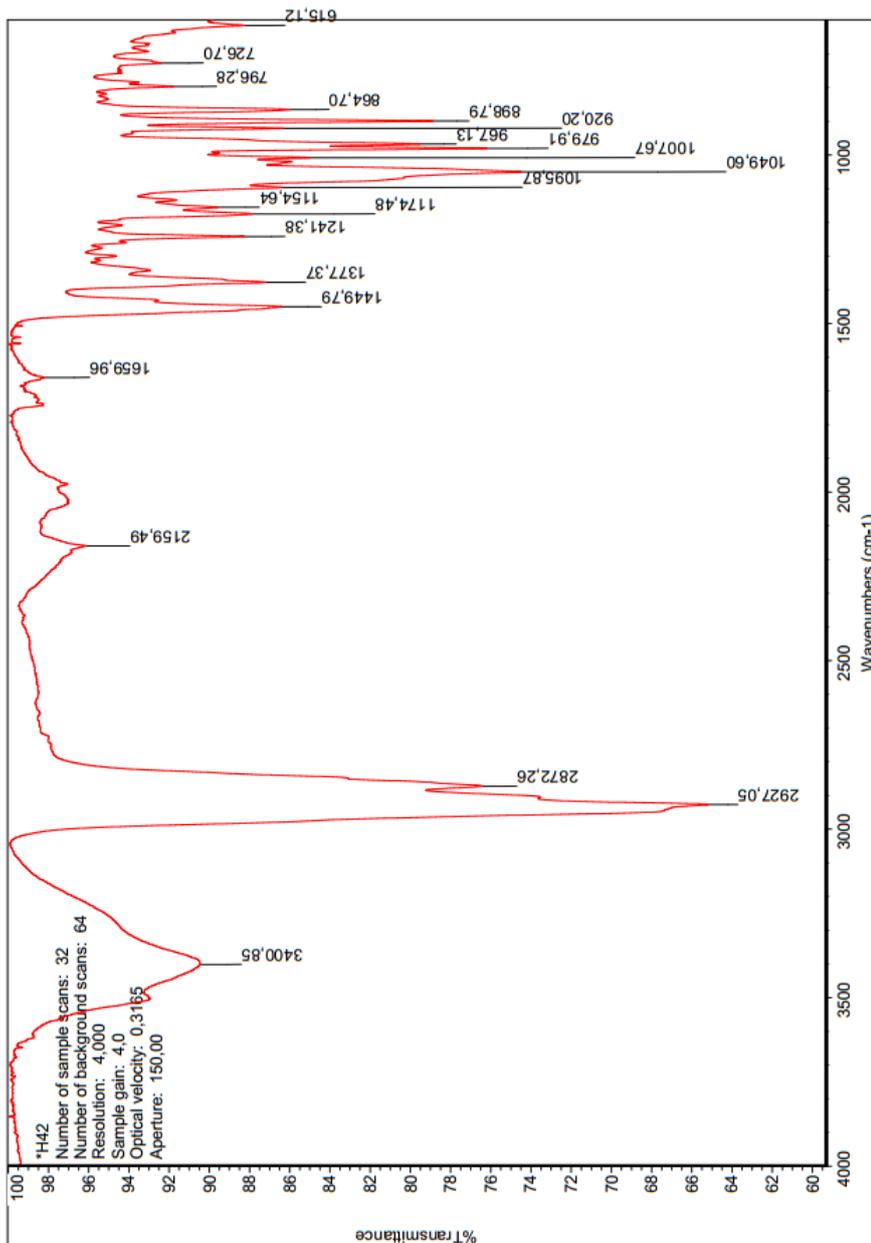


Fig. 10.2 - Espetro IV do C11a

8.1.11 Espectros ^1H RMN e ^{13}C -RMN e IV do espirostano-3 β -5 α ,6 β -triol (C12)

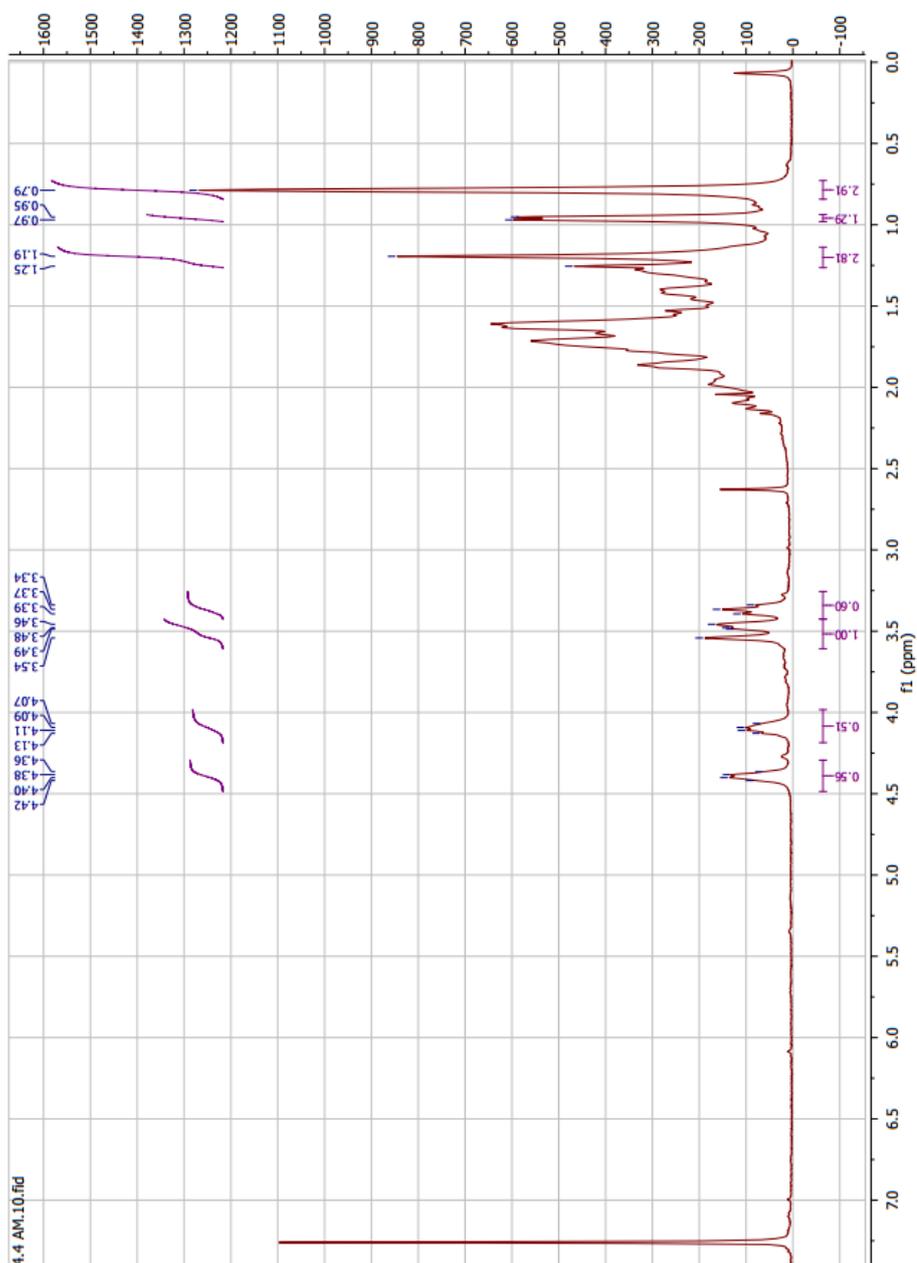


Fig. 11 - Espectro ^1H -RMN do C12

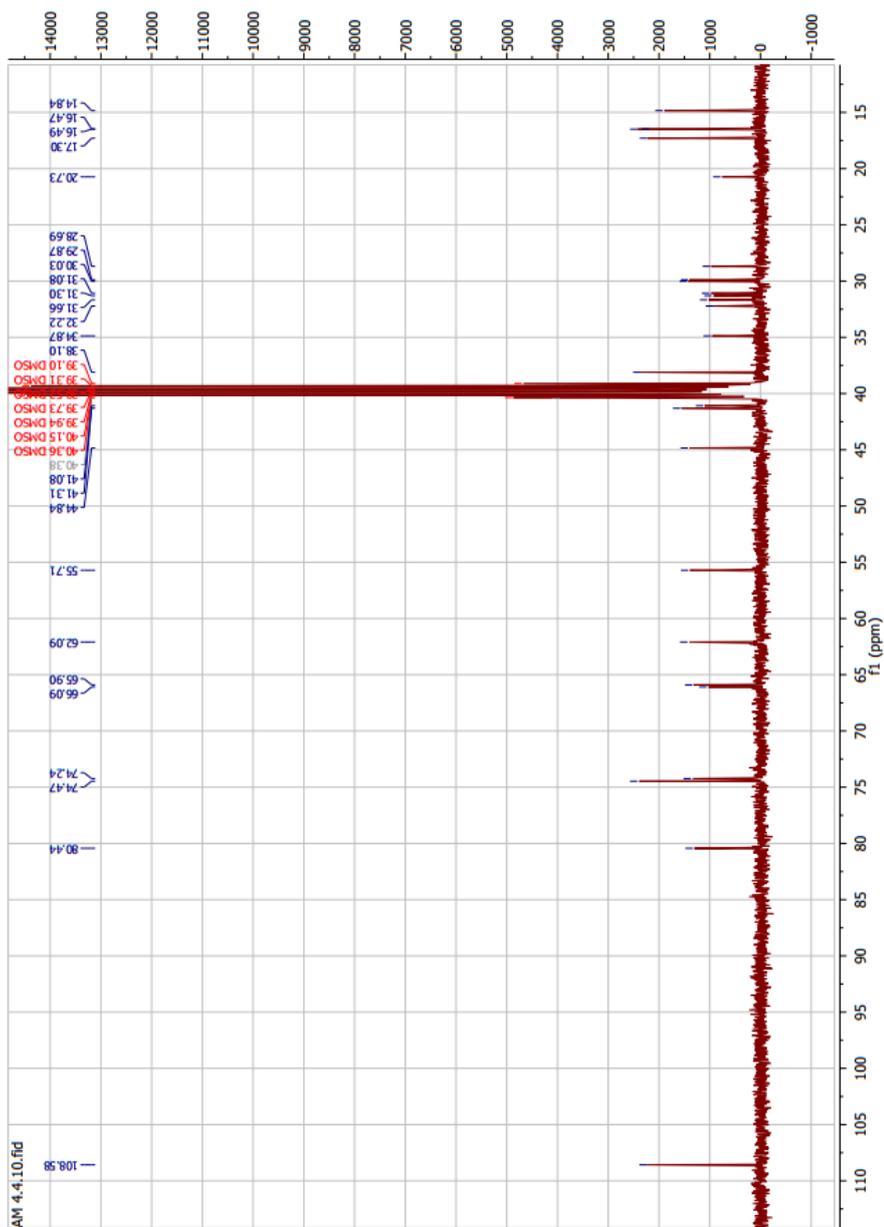


Fig. 11.1 - Espetro ¹³C-RMN do C12

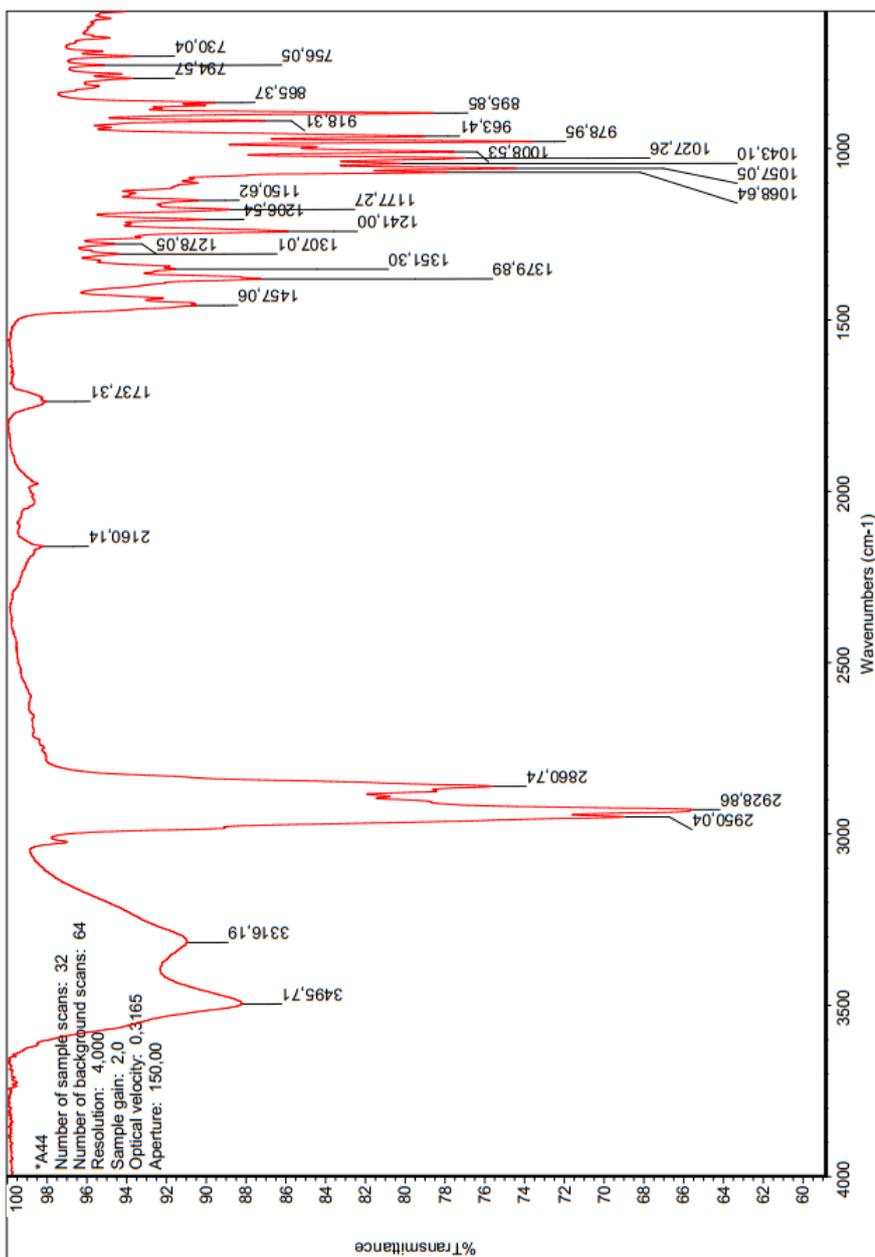


Fig.11.2 - Espetro IV do C12.

8.2 Citometria de fluxo

8.2.1 “Dot plots” da citometria de fluxo

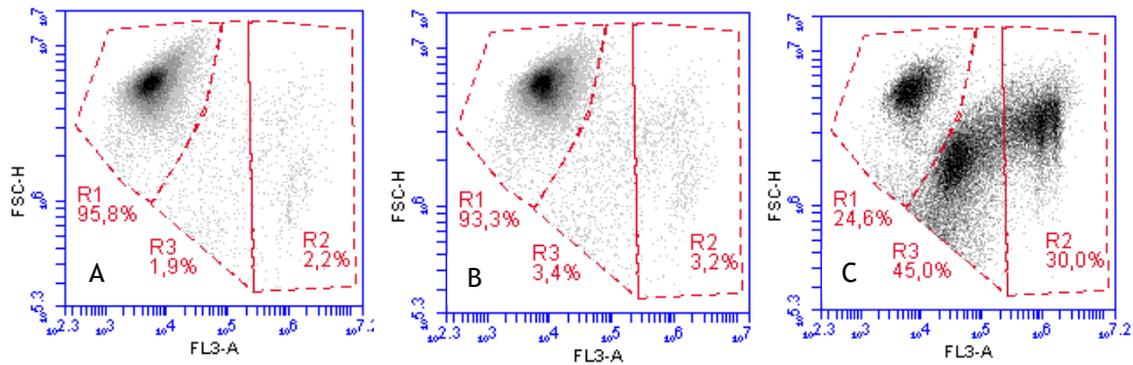


Fig. 12 - “Dot plots” da análise com a marcação com iodeto de propídeo em células PC-3. A- controlo negativo; B - tratadas com controlo positivo, 5-Flu; C- tratadas com diosgenina. Plot dividido em três regiões representativas: R1- células/eventos sem IP; R2 - células/eventos marcadas com IP; R3 - região intermédia de eventos. FL3-A - canal do citómetro que marca a vermelho, canal do IP.

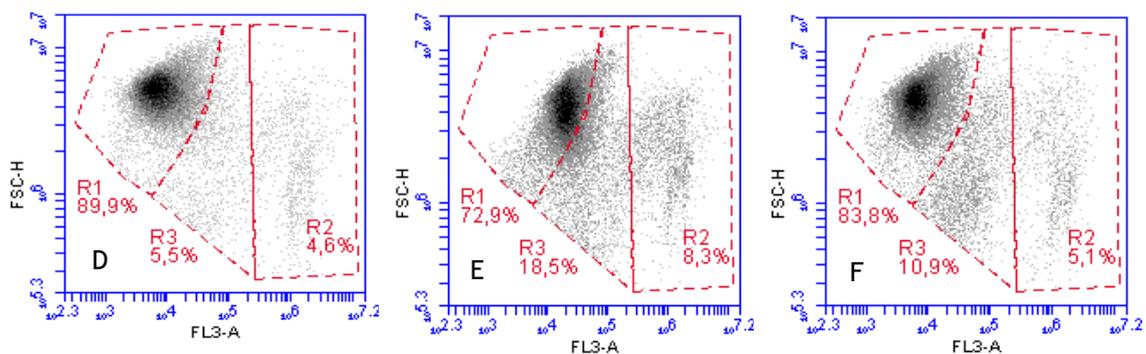


Fig.13 - “Dot plots” da análise com a marcação com iodeto de propídeo em células PC-3. D- controlo negativo; E - células tratadas com o composto C2, F - células tratadas com o composto C9. Plot dividido em três regiões representativas: R1- células/eventos sem IP; R2 - células/eventos marcadas com IP; R3 - região intermédia de eventos. FL3-A - canal do citómetro que marca a vermelho, canal do IP.