UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Departamento de Fármaco e medicamentos

Programa de Pós-Graduação em Química Farmacêutica
Área de Insumos Farmacêuticos

**Síntese e caracterização de análogos alquilfosfocolínicos e
N-metil alquilfosfoetanolamínicos do fármaco
antineoplásico miltefosina**

Aluna: Juliana de Almeida Pachioni
Orientador: Prof. Carlota de Oliveira Rangel Yagui

São Paulo – SP
Novembro/ 2013

T22277-F

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Departamento de Fármaco e medicamentos

Programa de Pós-Graduação em Química Farmacêutica
Área de Insumos Farmacêuticos

**Síntese e caracterização de análogos alquilfosfocolínicos e
N-metil alquilfosfoetanolamínicos do fármaco
antineoplásico miltefosina**

Dissertação apresentada à Faculdade de
ciências farmacêuticas da Universidade
de São Paulo – USP, para obtenção de
título de mestre.

Aluna: Juliana de Almeida Pachioni
Orientador: Prof. Carlota de Oliveira Rangel Yagui

São Paulo – SP
Novembro/ 2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

P116s Pachioni, Juliana de Almeida
Síntese e caracterização de análogos alquilfosfocolínicos e
N-metil alquilfosfoetanolamínicos do fármaco antineoplásico
miltefosina / Juliana de Almeida Pachioni. -- São Paulo, 2013.
90p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador : Yagui, Carlota de Oliveira Rangel

1. Fármaco : Síntese : Química farmacêutica 2. Agente
antineoplásico : Quimioterapia I. T. II Yagui, Carlota de Oliveira
Rangel, orientador.

615.19015 CDD

Juliana de Almeida Pachioni

**Síntese e caracterização de análogos alquilfosfocolínicos e
N-metil alquilfosfoetanolamínicos do fármaco
antineoplásico miltefosina**

Dissertação para obtenção de título de mestre

Comissão Julgadora

Prof^a. Dr^a. Carlota de Oliveira Rangel Yagui
Orientadora/Presidente

1º Examinador

2º Examinador

São Paulo – SP
Novembro/ 2013

Resumo

O câncer vem aumentando sua incidência em todo mundo tornando-se um grande desafio para as autoridades de Saúde Pública. Infelizmente, apesar dos progressos tanto na área diagnóstica quanto na área de tratamento, nem todos os pacientes tratados atingem a cura. Entre os vários fatores associados a esse problema, podemos citar a resistência aos fármacos disponíveis e a alta toxicidade apresentada por diversos fármacos, o que muitas vezes, representa fator limitante ao tratamento. Nesse sentido, a busca por novos agentes antitumorais mais ativos e menos tóxicos é de suma importância. Como resultado de uma mobilização das indústrias farmacêuticas na tentativa alcançarem esse objetivo, várias novas moléculas têm sido estudadas e desenvolvidas. Um exemplo disso são as alquilfosfocolinas que surgiram na década de 80, tendo como protótipo a miltefosina. Seu uso clínico, no entanto, é limitado devido à toxicidade gastrointestinal e ação hemolítica. Desta maneira, a síntese de novos compostos análogos à miltefosina que sejam mais potentes e menos tóxicos apresenta considerável interesse. Neste trabalho, a miltefosina (hexadecilfosfocolina) e nove análogos foram sintetizados, divididos em duas séries: derivados alquilfosfocolínicos e derivados *N*-metil alquilfosfoetanolamínicos. A confirmação estrutural das moléculas obtidas foi realizada por espectrometria de ressonância magnética nuclear e os análogos foram submetidos a ensaios de potencial hemolítico, na tentativa de se observar que características estruturais da classe contribuem para a diminuição do efeito hemolítico. Devido às dificuldades de purificação dos compostos alquilfosfocolínicos, somente os derivados *N*-metil alquilfosfoetanolamínicos, a miltefosina e os álcoois de partida empregados na síntese dos análogos foram avaliados quanto ao potencial hemolítico. Os resultados encontrados apontam para uma relação inversa entre o comprimento da cadeia alquílica e o potencial hemolítico. Além disso, os derivados *N*-metil alquilfosfoetanolamínicos se apresentaram bastante promissores, com valores de % de hemólise inferiores a 10% para 350 μ M, em comparação a 100% de hemólise para a miltefosina na mesma concentração. Para que se confirme o potencial destes derivados, entretanto, faz-se necessária a realização de ensaios de atividade antiproliferativa e, posteriormente, ensaios *in vivo* de atividade antineoplásica.

Abstract

Cancer incidence has increased worldwide becoming a major challenge for health authorities. Although many improvements can be observed both in the diagnostic field as in the treatment area, it is known that not all patients achieve cure. Among the various factors associated with this problem, we can name the emergence of drug-resistance against the drugs currently available and high toxicity presented by these drugs, which often are limiting factors to treatment. In this sense, the search for new antitumor agents presenting, lower toxicity, better spectrum of action and efficacy against tumors resistant to available drugs is of paramount importance. In an attempt of the pharmaceutical industry to achieve this goal, several new molecules have been studied and developed. An example is the alkylphosphocholine class that emerged in the 80s, with miltefosine as the prototype. Its clinical use, however, is limited due to gastrointestinal toxicity and hemolytic activity. Therefore, the synthesis of new miltefosine analogs less hemolytic and more potent is of considerable interest. In this work, miltefosine (hexadecylphosphocholine) and nine analogs were synthesized, according to two series: alkylphosphocholines and *N*-methyl alkylphosphoethanolamines. Structural confirmation was performed by nuclear magnetic resonance and the molecules were submitted to hemolytic potential assays, in an attempt to establish structural features that would contribute to lower the hemolysis effect. Owing to the difficulties in purifying the alkylphosphocholine derivatives, hemolytic potential values were obtained only for miltefosine, the *N*-methyl alkylphosphoethanolamines and the alcohols employed for the analogs synthesis. Results pointed to an inverse correlation between alkyl chain length and hemolytic potential. Moreover, the *N*-methyl alkylphosphoethanolamine series was found to be very promising with values of % hemolysis lower than 10% at 350 μ M, in comparison to 100% for miltefosine. However, in order to confirm their potential, *in vitro* anti-proliferative activity and, following, *in vivo* antineoplastic activity should be evaluated.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estágios da Carcinogênese.

Figura 2. Evolução das alquilfosfocolinas.

Figura 3. Influência da estrutura das moléculas na formação de micelas e lamelas.

Figura 4. Estrutura química geral das N-metil alquilfosfoetanolaminas (4a) e das alquilfosfocolinas (4b) sintetizadas.

Figura 5. Valores de potencial hemolítico (%) obtidos para os alcoóis *N*-alquílicos a 3,5 mM. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95%.

Figura 6. Potencial hemolítico da miltefosina em função da concentração de fármaco. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95%.

Figura 7. Valores de potencial hemolítico (%) obtidos para os compostos *N*-metil alquilfosfoetanolamínicos a 350 μ M em comparação à miltefosina. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95%.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto não melanoma (Extraído de: INCA, 2012).

Tabela 2. Solventes e reagentes empregados.

Tabela 3. Comparação entre os deslocamentos obtidos por espectrometria RMN ^1H para hexadecilfosfocolina sintetizada neste trabalho, hexadecilfosfocolina padrão e os deslocamentos previamente descritos na literatura.

Tabela 4. Valores estimados para os parâmetros estruturais da miltefosina e dos análogos N-metil alquilfosfoetanolamínicos.

Tabela 5. Valores de CMC estimados para compostos alquilfosfocolínicos e N-metil alquilfosfoetanolamínicos.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Rota sintética de obtenção dos análogos *N*-metil alquilfosfoetanolamínicos.

Esquema 2. Rota sintética de obtenção dos análogos alquilfosfocolínicos.

Esquema 3. Obtenção do dicloridrato de fosforohexadecila.

Esquema 4. Obtenção do 2-(hexadeciloxi)-3 metil-2-oxa-1,2,3-oxazofosfolano.

Esquema 5. Obtenção da *N*-metil hexadecilfosfoetanolamina.

Esquema 6. Obtenção da hexadecilfosfocolina.

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) - Dicloridrato de fosforohexadecila.

Anexo 2. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) - 2-(hexadeciloxi)-3-metil-2-oxa-1,2,3-oxazofosfolano.

Anexo 3. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) - *N*-metil hexadecilfosfoetanolamina.

Anexo 4. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) - Hexadecilfosfocolina.

Anexo 5. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) - Hexadecilfosfocolina.

Anexo 6. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) - Hexadecilfosfocolina padrão.

Anexo 7. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) - *N*-metil dodecilfosfoetanolamina.

Anexo 8. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) - *N*-metil dodecilfosfoetanolamina.

Anexo 9. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) - *N*-metil decilfosfoetanolamina.

Anexo 10. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) - *N*-metil decilfosfoetanolamina.

Anexo 11. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) - *N*-metil octilfosfoetanolamina.

Anexo 12. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) - *N*-metil octilfosfoetanolamina.

Anexo 13. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) - *N*-metil hexilfosfoetanolamina.

Anexo 14. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) - *N*-metil hexilfosfoetanolamina.

Anexo 15. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) - Dodecilfosfocolina.

Anexo 16. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) - Decilfosfocolina.

Anexo 17. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) - Octilfosfocolina.

SUMÁRIO

Resumo.....	I
Abstract.....	II
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABELAS	IV
LISTA DE ESQUEMAS	VI
LISTA DE ANEXOS.....	10
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1. O ciclo celular.....	18
2.2. Células tumorais benignas	20
2.3. Células tumorais malignas.....	21
2.3.1. Metástase	21
2.4. Tratamento do câncer	22
2.4.1. Retirada cirúrgica do tumor	23
2.4.2. Radioterapia.....	23
2.4.3. Quimioterapia.....	24
3. OBJETIVOS	38
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1. Material	39
4.1.1. Reagentes.....	39
4.1.2. Material para cromatografia.....	40
4.1.3. Equipamentos	40
4.2. Métodos	40
4.2.1. Síntese dos análogos <i>N</i> -metil alquilfosfoetanolamínicos (III a VII)	40
4.2.2. Síntese dos análogos Alquilfosfocolínicos (VIII a XII).....	43

4.2.3. Determinação do potencial hemolítico.....	44
4.2.4. Cálculo da Concentração micelar crítica (CMC)	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1. Síntese da <i>N</i> -metil hexadecilfosfoetanolamina e da hexadecilfosfocolina	46
5.1.1. Obtenção do dicloridrato de fosforohexadecila.....	49
5.1.2. Obtenção do 2-(hexadeciloxi)-3-metil-2-oxa-1,2,3-oxazofosfolano (II).....	50
5.1.3. Obtenção da <i>N</i> -metil hexadecilfosfoetanolamina (III)	51
5.1.4. Obtenção da hexadecilfosfocolina (VIII)	52
5.2. Síntese dos análogos	53
5.2.1. Síntese das <i>N</i> -metil alquilfosfoetanolaminas	54
5.2.2. Síntese das Alquilfosfocolinas	55
5.3. Ensaios de Potencial Hemolítico	57
5.4. Cálculo da CMC	61
6. CONCLUSÕES	63
7. REFERÊNCIAS	64
8. ANEXOS	71
8.1. Espectros relativos à síntese da <i>N</i> -metil hexadecilfosfocolina e hexadecilfosfocolina	71
8.2. Espectros relativos à série das <i>N</i> -metil alquilfosfoetanolaminas	77
8.3. Espectros relativos à série das Alquilfosfocolinas.....	85

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O câncer vem atraindo olhares das organizações de saúde do mundo todo, por apresentar um crescimento cada vez mais acentuado, configurando-se atualmente como um grande problema de Saúde Pública não só em países desenvolvidos, mas também nos países em desenvolvimento. De acordo com o INCA (Instituto Nacional de Câncer), as estatísticas mundiais mostram que no ano 2000 ocorreram 5,3 milhões de novos casos de câncer em homens e 4,7 milhões em mulheres, e que 6,2 milhões de pessoas morreram em decorrência da doença (3,5 milhões de homens e 2,7 milhões de mulheres), correspondendo a 12% do total de mortes por todas as causas (cerca de 56 milhões). Se a tendência atual não se modificar, prevê-se que em 20 anos a incidência de câncer aumentará em cerca de 50%. Dados do INCA revelam que maiores incidências são observadas em países como Estados Unidos, Itália, Austrália, Alemanha, Canadá e França o que reforça a ideia de que países desenvolvidos sejam mais atingidos pela doença em decorrência do estilo de vida cada vez mais sedentário e com péssimos hábitos alimentares.

Em seu relatório mais atual que projetou dados para o ano de 2012 e 2013, o mesmo instituto prevê que somente no Brasil, entre os dois anos citados, a incidência do câncer represente 518.510 novos casos, sendo que destes 257.870 atingirão o sexo masculino e 260.640 o sexo feminino. A tabela 1, extraída do relatório acima citado revela a estimativa de incidência dos principais tipos de câncer na população masculina e feminina do Brasil no ano de 2012.

Tabela 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto pele não melanoma (Extraído de: INCA, 2012).

Localização primária	casos novos	percentual	Homens	Mulheres	Localização primária	casos novos	percentual
Próstata	60.180	30,8%			Mama Feminina	52.680	27,9%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%			Colo do Útero	17.540	9,3%
Colo e Reto	14.180	7,3%			Colo e Reto	15.960	8,4%
Estômago	12.670	6,5%			Glândula Tireoide	10.590	5,6%
Cavidade Oral	9.990	5,1%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%
Esôfago	7.770	4,0%			Estômago	7.420	3,9%
Bexiga	6.210	3,2%			Ovário	6.190	3,3%
Laringe	6.110	3,1%			Corpo do Útero	4.520	2,4%
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%			Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

Esses dados estatísticos explicam porque o câncer tornou-se uma preocupação para as autoridades de Saúde Pública do mundo todo e justifica a necessidade do desenvolvimento de novas técnicas de detecção, que permitam o diagnóstico precoce, de novas estratégias de prevenção e de tratamento.

Por outro lado, esse dados alarmantes revelam-se como um estímulo para a busca por novos fármacos antineoplásicos que possam atuar de diferentes maneiras frente à doença. Felizmente, reflexos disso já podem ser observados. No ano de 2011, 40% dos fármacos aprovados pela agência de regulação norte-americana FDA (*Food and Drug Administration*) como novas entidades moleculares foram fármacos destinados ao tratamento do câncer (FDA, 2012). Pode-se dizer que o melhor entendimento do desenvolvimento da doença e a descoberta de novos alvos biológicos representam os principais motivos para os avanços. Como resultado desses avanços pode-se citar a introdução na terapêutica dos anticorpos monoclonais, dos inibidores de aromatase e dos inibidores de proteínas quinases, revelando uma nova tendência para o tratamento do câncer com a busca de

fármacos mais seletivos. Seguindo essa tendência, o objeto de estudo do presente trabalho foi a classe das alquilfosfocolinas.

As alquilfosfocolinas representam uma classe de fármacos antineoplásicos que não interagem diretamente com o DNA, seu mecanismo de ação parece estar ligado à inibição de proteínas quinases e à interação com os fosfolipídios de membrana. Apesar do mecanismo de ação ainda não ser totalmente elucidado, sabe-se que a atividade citotóxica e citostática das alquilfosfocolinas é notavelmente seletiva para células cancerosas embora o mecanismo responsável por esta seletividade ainda não seja conhecido (Mravljak et al., 2005). Ao surgimento da classe, muitas expectativas foram criadas sobre a miltefosina, protótipo da classe que se mostrou eficaz frente a diferentes linhagens celulares *in vitro* e em modelos experimentais animais. Seus dois efeitos adversos principais, gastrotoxicidade e potencial hemolítico, entretanto, representaram fatores limitantes à continuidade dos ensaios de fase II. Nesse sentido, evidencia-se a necessidade de estudos com essa nova classe de agentes antineoplásicos, na tentativa de obtenção de análogos que possuam a mesma atividade antitumoral ou até melhor, porém com menos efeitos adversos que as alquilfosfocolinas disponíveis.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Câncer ou neoplasia maligna corresponde a um grupo de mais de cem doenças caracterizadas por alteração do ácido desoxirribonucleico (DNA), que leva ao crescimento e desenvolvimento de células anormais. É causado por uma mutação ou ativação anormal de genes celulares que vão determinar o aparecimento de vários eventos indesejáveis. Esse processo de mutação pode ter origem genética ou ainda desenvolver-se em virtude da exposição das células a diferentes agentes iniciantes, representados por substâncias químicas, vírus ou ainda agentes radioativos (Merkle, 2007). Independentemente da exposição a carcinógenos, as células sofrem processos de mutação espontânea, que não alteram o desenvolvimento normal da população celular como um todo. Estes fenômenos incluem danos oxidativos, erros de ação das polimerases e das recombinases, redução e reordenamento cromossômico (INCA, 2002). Sabe-se, entretanto, que alguns fatores estão diretamente envolvidos no aumento da predisposição celular frente aos processos mutagênicos que podem resultar em câncer. São exemplos desses fatores o envelhecimento celular, o uso de fármacos citotóxicos e esteróides, o estresse extremo causado por infecções virais ou ainda a ocorrência de doenças imunossupressoras (Porth, 2010).

Em geral, o organismo está bastante preparado para reparar os danos celulares. O ciclo celular, por exemplo, apresenta inúmeros mecanismos de defesa que permitem o reparo dessa mutação, impedindo que a informação genética incorreta seja passada a outras células. Na execução dessa tarefa podemos observar alguns genes de maior relevância (proto-oncôgenes) como os genes p53 e gene Rb ou ainda de algumas proteínas como as ciclinas (Merkle, 2007).

Em indivíduos saudáveis, esse processo de controle é bastante eficiente. Em alguns casos, entretanto, esse processo pode falhar, permitindo que a mutação sofrida pela célula seja mantida. A célula mutada pode permanecer em latência durante muito tempo. O tempo para a carcinogênese se completar é indeterminável, podendo ser necessários muitos anos para que se verifique o aparecimento do tumor (INCA, 2002). Sob a ação de agentes promotores (hormônios, aditivos alimentares, drogas, entre outros) essas células podem passar a se dividir-se, apresentando perda do controle sobre o ciclo celular e falta de resposta aos sinais apoptóticos, fatores que juntos levarão ao desenvolvimento do câncer (Porth, 2010).

O termo carcinogênese, utilizado para descrever a cascata de eventos que transformam uma célula normal em câncer, pode ser representado por três estágios principais (Figura 1): iniciação, promoção e progressão. Na iniciação verifica-se a ocorrência das mutações nas células saudáveis devido à exposição a carcinógenos que alteram de modo irreversível a composição ou estrutura química do DNA iniciando assim o câncer (Pollock, 2006). A progressão, por sua vez, é caracterizada pela alteração da expressão de genes que levarão à proliferação das células que sofreram iniciação. Já a progressão pode ser caracterizada por alterações moleculares adicionais com aumento da massa tumoral primária e desprendimento de células dessa massa que passam a se deslocar em direção aos tecidos em um processo conhecido como metástase.

Figura 1. Estágios da Carcinogênese (Adaptada de: INCA, 2002)

2.1. O ciclo celular

O ciclo celular desempenha um papel fundamental na fisiopatologia do câncer. Isso porque, acredita-se que o que diferencia uma célula normal de uma célula cancerígena é a capacidade de controle do seu processo de diferenciação e proliferação (Hanahan, 2011). O ciclo celular pode ser dividido em quatro estágios: S, M e G (1 e 2). As fases S e M correspondem ao período em que ocorre a síntese do DNA e a replicação dos cromossomos, respectivamente. Já a fase G (divida em G1 e G2) compreendem um período necessário para o crescimento e duplicação da massa de proteínas e organelas. Durante essa fase, enzimas e outras proteínas necessárias para a divisão celular são sintetizadas e movidas para seus sítios apropriados (Porth, 2010). Entre uma fase e outra, mais especificamente entre as

fases G1 e S e entre as fases G2 e M, alguns mecanismos de regulação do ciclo podem ser observados.

Os mecanismos de regulação e a consequente progressão da célula no ciclo celular envolvem, principalmente, o equilíbrio de forças reguladoras positivas e negativas. As forças positivas são representadas pelos fatores de crescimento (que estimulam a entrada das células no ciclo) e por duas séries de proteínas conhecidas como ciclinas e quinases ciclina-dependentes ou cdks. As ciclinas são responsáveis por regular as cdks, que por sua vez, são responsáveis pelo controle de enzimas do ciclo celular (Porth, 2010). Para cada etapa do ciclo, um complexo ciclina/cdk pode ser observado e é este grau de especificidade que torna essas proteínas tão estudadas como possíveis alvos terapêuticos.

A ação de ciclinas/cdks, entretanto, é modulada por várias forças regulatórias negativas, ou seja, proteínas que se ligam às cdks e inibem sua ação. Essas proteínas, por sua vez, são induzidas por vários genes que constituem travas no ciclo celular, por exemplo, o gene p53 e o gene do retinoblastoma (Rb) (Porth, 2010). Esses dois genes, ao identificarem a presença da mutação no DNA, interrompem o ciclo celular no ponto de reparo 1 (primeiro ponto de reparo do ciclo celular, com ocorrência entre G1 e S) levando a célula à apoptose. Sabe-se que muitos tipos de câncer são correlacionados a mutações nos genes p53 e Rb, resultando na ativação ou inativação destes e, consequentemente, descontrole sobre o ciclo celular. Estatísticas recentes sugerem que 50% dos tumores diagnosticados apresentam mutações no gene p53, evidenciando a importância deste gene no processo de regulação do crescimento celular (Jemal et al., 2012). O processo oncogênico pode ainda alterar genes responsáveis pela produção de proteínas altamente específicas que auxiliam no processo de proliferação celular.

As proteínas RAS e B-RAF, são exemplos dessas proteínas, elas estão envolvidas em uma via de sinalização celular conhecida como MAP-K (Mitogen Activated Protein Kinase). Os oncogenes levam à superexpressão dessas proteínas, fazendo com que as células estejam constantemente em proliferação. Alguns tipos de tumores apresentam com mais frequência essas mutações que levam à superexpressão de RAS e B-RAF. Sabe-se, por exemplo, que 40% dos casos de melanomas diagnosticados apresentam mutações que levam a superexpressão de B-RAF (Hanahan, 2011), e que 20% de todos os tumores diagnosticados apresentam mutações que levam a ativação constitutiva de RAS (Jemal et al., 2012).

2.2. Células tumorais benignas

As células benignas são células diferenciadas que se assemelham às células dos tecidos de origem e se caracterizam por uma taxa de crescimento lento e progressivo que pode alcançar um platô ou regredir. Sabe-se que, por razões ainda desconhecidas, essas células perdem a capacidade de suprimir o programa genético de proliferação celular. Porém, retém o programa para diferenciação celular normal (Porth, 2010). Essas células, ao contrário das células tumorais malignas, não possuem a capacidade de infiltrar ou invadir tecidos. Crescem por expansão e, por apresentarem um crescimento lento, desenvolvem uma borda circundante de tecido conjuntivo comprimido denominado cápsula fibrosa.

A presença dessa cápsula diminui a gravidade da doença, já que permite uma separação entre o tumor e os tecidos adjacentes, facilitando sua remoção cirúrgica. Em função dessas características é comum afirmar que, em geral, os tumores

compostos por células benignas não provocam a morte, exceto em casos em que interfiram com funções vitais devido à sua localização (Porth, 2010).

2.3. Células tumorais malignas

As células tumorais malignas são muito mais agressivas do que as células tumorais benignas, pois além das alterações no perfil de proliferação celular, várias outras alterações podem ser observadas. Essas alterações vão proporcionar um aumento do dano provocado ao organismo, tendo em vista que são desenvolvidas pelas células cancerígenas a fim de aumentar suas chances de sobrevivência. Dentre essas alterações, podemos citar instabilidade genética, independência de ancoragem, capacidade de coesão e de aderência celular reduzidas, comprometimento da comunicação intercelular, alterações do ciclo de vida, produção de enzimas, hormônios e outras substâncias. Além de contribuírem para a sobrevivência no hospedeiro, as alterações desenvolvidas pelas células cancerígenas permitem o deslocamento destas através de vários órgãos e tecidos, configurando o processo de metástase (Porth, 2010).

2.3.1. Metástase

A metástase é um processo de vários passos, no qual as células tumorais provenientes do tumor primário são separadas e depositadas no desenvolvimento de uma lesão tumoral similar em um órgão secundário. As células separadas do local primário utilizam os vasos linfáticos e a circulação sanguínea para atingirem outros órgãos. Na cascata metastática, as células tumorais sofrem uma série de alterações

que resultam em pré ou pós-regulação de moléculas de superfície celular, proteases, fatores de motilidade, fatores de estimulação do crescimento e moléculas promotoras de angiogênese (Teicher, 2002). A propagação metastática de tumores sólidos é direta ou indiretamente responsável pelas mortes relacionadas ao câncer. (Kumar et al., 2005; Teicher, 2002; Silva et al., 2002). Aproximadamente 30% dos pacientes com câncer têm metástases clinicamente detectáveis na diagnose inicial e 30–40% tem metástases ocultas. Desde maneira, há uma necessidade iminente de prognosticar o potencial metastático do tumor característico, para identificar o foco metastático oculto, impedir a disseminação e a transformação de tumores em fenótipos mais invasivos. (Evans, 1991; Teicher, 2002). Nesse sentido, a detecção precoce se mostra mais uma vez de extrema importância para o tratamento adequado e para a sobrevivência do paciente portador de neoplasia.

2.4. Tratamento do câncer

O tratamento do câncer tem evoluído bastante nos últimos anos, não somente pelo desenvolvimento de novos fármacos, mas também pelo desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico que têm contribuído significativamente para o sucesso dos tratamentos realizados. De fato, a detecção precoce do câncer é um dos fatores que mais contribuem para o sucesso do tratamento, pois o diagnóstico precoce, antes que ocorra o processo de metástase, permite maiores chances de cura com a retirada cirúrgica do tumor e/ou tratamento farmacológico (INCA, 2012).

As modalidades de tratamento mais comumente aplicadas são a retirada cirúrgica do tumor, a radioterapia e a quimioterapia. Na grande maioria dos casos esses três processos são realizados em conjunto, aumentando as chances de cura.

A utilização desses três processos envolve o desenvolvimento de um programa cuidadosamente planejado com o auxílio de uma equipe interdisciplinar de especialistas, incluindo oncologistas clínicos, cirúrgicos e radiologistas, além de especialistas em enfermagem e farmácia (Porth, 2010).

2.4.1. Retirada cirúrgica do tumor

A retirada cirúrgica do tumor é a abordagem mais antiga usado para o tratamento do câncer e, até recentemente, a única capaz de curar pessoas (Porth, 2010). Hoje em dia, além de proporcionar a cura do paciente, a retirada do tumor pode ainda ser utilizada para diagnóstico do tipo de tumor (maligno ou benigno) ou estadiamento da doença. O tratamento cirúrgico é considerado curativo quando realizado nos casos iniciais da maioria dos tumores sólidos. É um tratamento radical, que compreende a remoção do tumor primário com margem de segurança e, se indicada, a retirada dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão-sede do tumor primário (INCA, 2011).

2.4.2. Radioterapia

A radioterapia é outra opção no tratamento contra o câncer. Neste caso, utilizam-se partículas de alta energia para destruir ou lesar as células tumorais.

O processo funciona com a formação de moléculas ionizadas ou ainda de radicais livres (que têm como principal alvo as moléculas de oxigênio) e que por sua vez vão destruir importantes estruturas das células, levando-as à morte. O tratamento com a radioterapia pode ocorrer de três maneiras: no primeiro caso, o

feixe de radiação é externo e incide sobre uma área previamente delimitada no corpo do paciente. É o processo mais amplamente utilizado e recebe o nome de teleterapia. Em outro processo, conhecido como braquiterapia, utiliza a inserção de fontes radioativas lacradas internas em locais muito próximos ao tumor. Por fim, tem-se a utilização de fontes de radiação internas não lacradas administradas via oral, por exemplo. É um processo bastante utilizado para o tratamento de câncer de tireóide, em que fontes de iodo radioativo são administradas ao paciente (Porth, 2010).

2.4.3. Quimioterapia

Embora o termo quimioterapia seja comumente empregado para designar o tratamento de neoplasias, o mesmo pode ser utilizado para se referir ao combate de qualquer organismo ou célula invasora patogênica. No caso das neoplasias, a quimioterapia recebe o nome de quimioterapia antineoplásica ou antitumoral. A quimioterapia antineoplásica é um processo longo, doloroso, com muitas reações adversas, passível de surgimento de resistência, mas que tem evoluído como uma das principais modalidades de tratamento sistêmico para o câncer. Em comparação com cirurgia e radiação, a quimioterapia possibilita que os fármacos alcancem o sítio do tumor e também outros sítios distantes (Porth, 2010).

Os agentes quimioterápicos para o câncer exercem seus efeitos através de diversos mecanismos, sendo os mais comuns a inibição de enzimas essenciais para a replicação celular, inibição da síntese de DNA e RNA e prevenção da mitose celular (Porth, 2010). Dentre as principais classes de fármacos, podem-se citar os agentes alquilantes, cujo mecanismo principal é a alquilação do DNA; os

antimetabólitos, que interferem com o metabolismo do DNA impedindo sua replicação; os compostos antimitóticos, fármacos ciclo-específicos que inibem o processo de polimerização/despolimerização da tubulina bloqueando a formação do fuso mitótico; os análogos da camptotecina, responsáveis pela ligação e estabilização da topoisomerase-I com rompimento da dupla fita de DNA; os antibióticos, com variados mecanismos de ação; as enzimas; os agentes imunológicos (Chabner et al., 2006) e os inibidores de proteína quinase, capazes de bloquear proteínas responsáveis pela fosforilação e conseqüente modulação da atividade enzimática, processos geralmente alterados em células cancerígenas (Avila, 2010). Essa grande variedade de fármacos, entretanto, ainda não é suficiente para proporcionar a cura de todos os indivíduos acometidos pelo câncer.

Como já mencionado, um dos fatores mais relevantes para a quimioterapia é a detecção precoce da doença que, na maioria das vezes, proporciona o tratamento pré-metastático, aumentando as chances de cura. Mas, além disso, o tratamento farmacológico do câncer ainda apresenta outras duas grandes complicações que impedem o sucesso em todos os casos da doença, a alta toxicidade dos fármacos e o surgimento de resistência (Porth, 2010).

A alta toxicidade é um dos maiores problemas relacionados ao tratamento do câncer, colocando em risco órgãos não afetados pelo tumor (Meyers, 2008; Jacobson et al., 2009). É devida principalmente à falta de especificidade dos agentes antineoplásicos frente às células tumorais, resultando em ação frente a várias outras células do organismo, destacando-se as de crescimento acelerado. Por este motivo, esses fármacos acabam produzindo efeito negativo sobre a produção de células pela medula óssea (podendo levar à mielo supressão), cicatrização de

feridas, crescimento de células do tecido epitelial e, ainda, sobre a produção de células germinativas (podendo resultar em esterilidade).

A aquisição de resistência aos agentes quimioterápicos pelas células tumorais é outro desafio na eficácia da terapia antitumoral. Embora vários mecanismos de resistência tenham sido identificados e estudados, essa continua sendo uma das maiores causas de morte em pacientes com câncer (de Visser, 2009). Diversas pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de novos fármacos antitumorais têm como principal objetivo atuar exatamente sobre células resistentes. A elevada mutagenicidade das células tumorais, entretanto, dificulta o sucesso de novas terapias.

2.4.4. Desenvolvimento de novos fármacos e perspectivas

Em vista das limitações das opções terapêuticas apresentadas, é evidente a necessidade de novos agentes antitumorais que apresentem melhor espectro de ação, eficácia contra tumores resistentes aos fármacos disponíveis e, ainda, que melhorem a tolerabilidade ao tratamento. (Leighl, et al., 2008).

Neste sentido, várias terapias têm sido estudadas e já se podem observar novidades para o tratamento do câncer. Os anticorpos monoclonais são um exemplo bastante recente disso. O primeiro fármaco dessa classe, rituximabe, foi lançado em 1997 e levou ao desenvolvimento de vários sucessores menos imunogênicos, aumentando a expectativa sobre essa classe terapêutica que vem sendo bastante utilizada (National Cancer Institute, 2012).

Outra classe de fármacos que revolucionou a terapia do câncer corresponde aos inibidores de proteínas quinases. Essas proteínas estão envolvidas em várias

vias de sinalização que levam à proliferação celular, como a via JAK/STAT, ativada pela ação de citocinas, ou ainda a via RAS/RAF, ativada por fatores de crescimento. Como já anteriormente citado, sabe-se que alguns genes, os denominados oncogenes, podem levar à super expressão das proteínas constituintes dessas vias, o que por sua vez, resulta em aumento do número de células, devido ao fato das mesmas estarem em constante processo de ativação. Na tentativa de interromper esse ciclo, foram criados os inibidores de proteínas quinases. O primeiro fármaco aprovado em 2001 com esse mecanismo de ação foi o imatinibe, empregado principalmente para o tratamento da leucemia mieloíde crônica (LMC) (Dobbin, 2002). Devido ao sucesso observado com este fármaco (INCA, 2002), vários novos inibidores de proteínas quinases têm sido estudados. Como exemplo de fármacos já disponíveis podemos citar os inibidores de EGFR (erlotinibe, gefitinibe e lapatinibe), os inibidores VEGFR (sunitinibe, sorafenibe e pazopanibe), bem como o grupo dos alquilfosfolipídios sintéticos, que acredita-se que exerçam seu efeito farmacológico sobre proteínas quinases do tipo C, embora seu mecanismo de ação ainda não seja totalmente conhecido.

2.4.4.1. Alquilfosfocolinas

A utilização de análogos sintéticos da lisofosfatidilcolina (Lyso PC) como modificadores de resposta biológica é bastante antiga. A ideia baseia-se no fato da Lyso PC, molécula endógena componente da membrana celular e proveniente da quebra hidrolítica das fosfatidilcolinas pelas fosfolipase, apresentar-se como percursos e até mesmo como modulador de várias vias de sinalização. No final dos anos 1960, Hansjörg Eibl, sintetizou a edelfosina, primeira molécula dessa classe,

conhecida como ALPs (alquilfosfolípidios sintéticos, ou em inglês, Synthetic alkylphospholipids). Apesar dessa denominação comum, os ALPs são classificados em 2 grupos: alquil-lisofosfolípidos e alquilfosfolípidios (Blitterswijk, 2012).

A primeira geração de ALPs sintetizados, como a edelfosina e ilmosfosina (Figura 2), mantinham o grupo glicerol em suas estruturas, o que os tornavam estruturalmente semelhantes à lisofosfatidilcolina e lhes conferia pouca estabilidade, principalmente pela ação das fosfolipases. (Eibl, 1967; Munder, 1979).

Figura 2. Evolução das alquilfosfocolinas.

Apesar disso, estudos preliminares usando a edelfosina mostraram-se muito promissores porque revelaram que a molécula comportou-se como um potente modulador imunológico e inibidor de proliferação celular (Andreesen, 1978; Munder, 1979).

Após ensaios de citotoxicidade em uma grande variedade de células tumorais e células normais, observou-se que a edelfosina apresenta pouca seletividade para as células tumorais (Runge, 1980; Mollinedo, 1997; Mollinedo, 2010; Ruiters, 1999). Posteriormente, a molécula foi avaliada quanto à sua atividade anti-proliferativa *in vitro* e *in vivo* (com ratos e camundongos) e, em ambos os casos, mostrou-se eficaz (Mollinedo, 1997; Berdel, 1987; Tarnowski, 1978). No entanto, sua utilização clínica foi muito limitada, principalmente devido a problemas de estabilidade, elevada toxicidade gastrointestinal e potencial hemolítico, que impediam a utilização do fármaco em doses suficientes para se observar o efeito esperado. Atualmente, a aplicação clínica da edelfosina é restrita à pacientes com leucemia aguda submetidos a transplante de medula óssea. (Scherf, 1987; Berdel, 1987).

O seu sucessor direto ilmofosina, uma variação tio-éter da edelfosina, também apresentou instabilidade química e citotoxicidade semelhante, limitando a sua utilização.

Apenas nos anos 80 as alquilfosfocolinas passaram a apresentar importância clínica, com a descoberta de um novo análogo produzido a partir da remoção do grupo de glicerol, que lhe conferiu maior estabilidade. A miltefosina, primeiro fármaco sintetizado com esta alteração, foi quem abriu a porta para novas pesquisas. Entretanto, não resolveu todos os problemas associados à classe. O desenvolvimento de estudos utilizando miltefosina como agente antitumoral contra várias linhas de células *in vitro* mostrou que, apesar de ser mais estável que edelfosina e apresentar atividade antitumoral potente (Breiser, 1987; Unger, 1989), a miltefosina causa hemólise quando administrada por via parentérica e sua aplicação oral conduz à toxicidade gastrointestinal cumulativa, especialmente vômitos e diarreia (Verweij, 1993), devido à presença do fármaco na parte superior do trato

gastrointestinal. Em estudos realizados por Verweij et al (1993), procurou-se avaliar a atividade de miltefosina para o tratamento de pacientes com sarcoma de tecido mole avançado, cancro, metástase de colo retal e no carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço. O estudo, entretanto, foi finalizado durante os ensaios clínicos de fase II, pois a dose diária máxima tolerada (MTD = 200mg/dia) não permitiu a observação dos efeitos anteriormente observados *in vitro* (Blitterswijk, 2012).

Em 1992, a miltefosina foi aprovada na Alemanha para o uso tópico de metástases cutâneas de câncer de mama e atualmente é utilizada em diversos países com a mesma finalidade. Além disso, a miltefosina tem sido utilizada na Índia como único fármaco via oral para o tratamento da *Leishmania* desde 2000, quando foi aprovada com nome comercial Impavido (WHO, 2010).

Outra modificação estrutural nas APCs destinada a melhorar a potência terapêutica e diminuir os efeitos tóxicos foi obtida pela substituição da porção colínica da miltefosina por um anel piperidínico, obtendo-se a perifosina (Hilgard, 1997). A inserção deste heterociclo não foi capaz de diminuir os efeitos hemolíticos associados a miltefosina. Estudos preliminares demonstraram que a dose diária máxima permitida foi igual à observada para a miltefosina, entretanto, essa modificação aumentou o tempo de meia vida da molécula (cerca de 140h) por evitar sua metabolização pelas fosfolipases que atuam sobre a miltefosina originando colina, fosfocolina e 1,2-diacilfosfocolina, conferindo-lhe um curto tempo de meia-vida.

As duas últimas moléculas desenvolvidas foram a, Erucilfosfocolina (ErPC) e seu homólogo erufosina (ErPC3). Esses análogos apresentam a porção colina, assim como miltefosina, uma cadeia de 22 átomos de carbonos e a presença de

uma insaturação. Esta modificação resultou em diminuição da toxicidade hemolítica, permitindo assim administração sistêmica, que não era possível com os outros análogos desenvolvidos até então (Berger, 1998; Kaufmann-Kolle, 1996).

A redução do potencial hemolítico pode ser explicada pelo fato de que essas alterações estruturais conduzem à agregação preferencial do fármaco em estruturas lamelares (menos hemolítica), ao invés de micelas em solução aquosa (Blitterswijk, 2012). Isso acontece principalmente porque as moléculas como miltefosina e perifosina apresentam uma estrutura em formato de cone, permitindo assim, a formação de micelas, enquanto que a erucilfosfocolina e a erufosina, por apresentarem uma estrutura em formato de cone truncado, favorecem a formação de lamelas, menos hemolíticas que as micelas (Wnetrazak, 2013) (Figura 3).

Figura 3. Influência da estrutura das moléculas na formação de micelas e lamelas.

Outra característica muito interessante destes novos análogos é a sua capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica. Estudos de farmacocinética com erucilfosfocolina em ratos saudáveis e portadores de tumor, revelaram que ERPC atravessa a barreira hemato-encefálica e acumula-se no cérebro, atingindo concentrações suficientes para matar as linhagens de células cancerígenas sem graves efeitos secundários tóxicos observados (Jendrossek, 2002). Além disso, os estudos com eurofosina mostram que o composto tem baixa toxicidade para a medula óssea quando comparado com os demais compostos dessa classe (Blitterswijk, 2012). Na figura 2 observa-se a evolução das moléculas de alquilfosfocolinas ao longo dos anos, contemplando todas as modificações realizadas.

2.4.4.1.1. Mecanismos de ação das alquilfosfocolinas

Ao contrário dos quimioterápicos clássicos, as alquilfosfocolinas não atuam no DNA nem interferem diretamente na sua síntese. Acredita-se que o efeito citotóxico das alquilfosfocolinas seja resultado da ação nas membranas celulares. Até o momento, estudos têm mostrado que essa classe de fármacos induz apoptose em vários modelos de câncer (Fiegl et al, 2008; Ruiter et al, 2001; Vink et al, 2007; Wieder et al, 1999; Hung, et al, 2005).

Inicialmente, acreditava-se que a ação inibitória dos alquil-lisofosfolipídios no crescimento celular fosse indireta e mediada pela ativação de macrófagos. Estudos subsequentes, entretanto, mostraram que os alquil-lisofosfolipídios causam destruição direta das células tumorais e que este efeito está associado com a perturbação do metabolismo de fosfolipídios da membrana (Ruiter et al., 2001).

Rakotomanga e colaboradores (2004) estudaram o mecanismo de interação da miltefosina com a membrana celular e concluíram que o fármaco se insere na membrana fosfolipídica pela miscibilidade e pela interação com esteróis. Acredita-se que as alquilfosfocolinas interfiram primariamente na permeabilidade, fluidez e composição lipídica da membrana e, desse modo, acometam a proliferação celular, progressão do ciclo celular, diferenciação, invasão e angiogênese. A exemplo disso, uma hipótese bastante estudada para explicar o efeito citotóxicos das alquilfosfocolinas concentra-se na inibição da transdução de sinal das membranas celulares, incluindo a proteína quinase C (PKC) e a fosfolipase C. O mecanismo de inibição da PKC pela miltefosina é parecido ao modo de ação dos alquil-lisofosfolipídios, ou seja, competição com o ativador biológico fosfatidilserina. Isso é um fato interessante já que a miltefosina não apresenta a porção de diacilglicerol (Leonard et al., 2001; Ruiter et al., 2001; Überall et al., 1991).

Em células viáveis, a membrana fosfolipídica natural é submetida a processos de turnover rápidos e constantes, os quais são essenciais para o caminho de sinalização que permite que a célula sobreviva. As enzimas envolvidas nesses turnovers lipídicos incluem basicamente todas as fosfolipases conhecidas (tipos C, D e A), transacilases e outras enzimas biossintéticas. Algumas dessas enzimas, as catabólicas, são essenciais para a geração de segundos mensageiros lipídicos (por exemplo, diacilglicerol, ácido fosfatídico, ácido araquidônico e derivados), especialmente quando células são ativadas por fatores de crescimento. Assim, a sinalização associada ao turnover fosfolipídico de fosfatidilinositol (PI), fosfatidilcolina (PC) e esfingomielina ocorre em ciclos, por exemplo, hidrólise e ressíntese (Ruiter et al., 2001; Ruiter et al., 2003). Devido à sua única cadeia alquílica longa, alquil-lisofosfolipídios inserem-se facilmente no folheto externo da

membrana plasmática, sendo que suas ligações éteres ou ésteres os tornam relativamente resistentes à atividade de fosfolipases e, por isso, esses compostos acumulam persistentemente em membranas celulares. Como consequência, alquil-lisofosfolipídios causam perturbação em turnover rápidos e constantes e, portanto, na biossíntese de fosfolipídios naturais (Ruiter et al., 2001; Ruiter et al., 2003).

Acredita-se que os derivados de fosfolipídios, como a miltefosina, penetrem nas membranas por meio de translocação para o interior (mecanismo de flip-flop), um processo dependente de energia mediado por proteínas. Neste sentido, o transportador protéico foi recentemente identificado e o gene responsável pela sua ativação, clonado. Este gene codifica uma ATPase do tipo P, denominada transportador de miltefosina em *L. donovani* (LdMT), pertencente à subfamília das translocases de aminofosfolipídios (APT) e expressa na membrana plasmática, onde controla a translocação de fosfolipídios. Para a ligação do fármaco à membrana, a composição fosfolipídica da membrana celular parece ser relevante.

Segundo Van der Luit e colaboradores (2007), a miltefosina e a edelfosina induzem apoptose através da inibição da fosfocolina citidiltransferase (CTP), enzima chave na biossíntese de fosfatidilcolina, possivelmente pela indução de translocação da forma ativa da enzima ligada à membrana para o citosol. A fosfatidilcolina é uma das representantes de moléculas anfífilas zwitteriônicas amplamente presentes em membranas celulares (Bittman et al., 1998; Kang et al., 2005). A inibição da biossíntese da fosfatidilcolina está bem correlacionada com o efeito antiproliferativo de determinados lipídios e depende do comprimento da cadeia alquílica e da natureza do grupo polar (Wieder et al., 1999). Para que este efeito ocorra, é necessário um acúmulo intracelular do fármaco. Neste sentido, linhagens celulares resistentes demonstram acumular menos fármaco, sendo que esse acúmulo ocorre

em três etapas que parecem comuns às células eucarióticas: o fármaco se liga à membrana plasmática da célula, penetra na mesma e atinge o seu alvo (Heczková et al., 2006; Lindner et al., 2008; Van der Luit et al., 2007; Wright et al., 2004).

Apesar das hipóteses descritas acima, o mecanismo de ação das alquilfosfolinas não é totalmente elucidado, o que implica na necessidade de novos estudos. Sabe-se que a atividade citotóxica e citostática dos alquilfosfolipídios é seletiva para células cancerosas, entretanto, ainda não se conhece o mecanismo responsável por esta seletividade (Markoulides et al., 2001; Mravljak et al., 2005). Uma explicação plausível baseia-se na habilidade que estas moléculas apresentam de acumular preferencialmente em altas concentrações na membrana de células cancerosas, acarretando na destruição destas células. Essa acumulação seletiva pode, por sua vez, ser devido às diferenças na organização ou composição da membrana entre células normais e células cancerosas (Koufaki et al., 1996), pois estas últimas parecem não ter a enzima alquilglicero mono-oxidase, encontrada em tecidos normais (Berkovic, 1998; Heesbeen et al., 1994; Koufaki et al., 1996).

2.4.4.2. Planejamento de novas alquilfosfolinas

A procura por novos composto que mantenham o perfil farmacodinâmico da miltefosina (protótipo) e apresentem melhor perfil de efeitos adversos e toxicidade é crescente (Mravljak et al, 2005). Desde a aprovação da miltefosina para uso tópico em metástases cutâneas de câncer de mama, multiplicaram-se o número de análogos na tentativa de diminuir o aparecimento de efeitos colaterais, o que permitiria o uso dessa classe para o tratamento de outros tipos de câncer, uma vez que *in vitro*, o fármaco tem se mostrado eficiente no tratamento de uma grande

variedade de neoplasias (Papazafiri et al., 2005). Além das modificações mostradas anteriormente de maneira específica, sabe-se que muitos grupos trabalham buscando superar a toxicidade gastrointestinal e obter aumento da potência, com modificações tanto na porção polar quanto na cadeia alquílica (Mravljak et al., 2005; Unger et al., 2010). Inicialmente, a maioria das tentativas foi voltada para o aumento da potência através de mudanças na porção fosfocolina e na estrutura do glicerol (Fos et al., 1995). A porção lipofílica, por sua vez, vem sendo estudada mais recentemente. Avlonitis e colaboradores (2003) propuseram estudar a influência de anéis cicloalquílicos na atividade anti-leishmaniose e observaram que alguns compostos com anéis cicloalquílicos na porção apolar apresentaram-se mais potentes e menos tóxicos do que a miltefosina.

Com relação ao potencial hemolítico, segundo Papazafiri e colaboradores (2005) a presença de cicloalcanos na porção lipídica de análogos de alquilfosfocolinas reduz efeitos hemolíticos quando comparados à miltefosina, sendo que a maioria dos análogos estudados por estes autores apresentou melhora na atividade antineoplásica. Mais recentemente, esta mesma correlação também foi observada para atividade antileishmania (Calogeropoulou et al., 2008).

Além disto, estudos realizados com ácidos biliares anfifílicos indicam que quanto menor a concentração micelar crítica (CMC) da molécula anfifílica, maior o potencial hemolítico (Posa et al., 2010). Considerando que a miltefosina é uma molécula anfifílica formada por uma porção hidrofílica fosfocolina e uma porção hidrofóbica que consiste na cadeia alquílica, apresentando capacidade de formar micelas em meio aquoso a uma CMC de 2-10 μ M (Castro et al., 2001), podemos inferir que alquilfosfocolinas que apresentem valores de CMC maiores que o da miltefosina possam apresentar menor potencial hemolítico.

Em um estudo recente, Wnetrazak (2013) e colaboradores demonstram a influência da estrutura espacial da molécula com seu potencial hemolítico, relacionando a estrutura de cones com a formação de micelas e a estrutura de cone truncado com a formação de lamelas. Considerando que as micelas são mais hemolíticas que as lamelas, isso explicaria, por exemplo, a diminuição do potencial hemolítico da erucilfosfocolina, que forma lamelas em meio aquoso, quando comparada a miltefosina, que forma micelas em meio aquoso. As prováveis conformações dessas moléculas em meio aquoso foram apresentadas na figura 3.

3. OBJETIVOS

Com o intuito de obter moléculas menos hemolíticas que a miltefosina, foi proposto como objetivo deste trabalho a síntese e caracterização de 9 compostos análogos à miltefosina. Os compostos foram divididos em 2 grupos: alquilfosfocolinas e *N*-metil alquilfosfoetanolaminas sendo que, para os dois grupos, os análogos apresentaram variações no tamanho da cadeia alquílica como pode-se observar nas figuras 4 e 5. O presente trabalho também apresentou como objetivo relacionar as características estruturais e concentração micelar crítica (CMC) dos compostos sintetizados com os valores de potencial hemolítico apresentados pelos mesmos.

Figura 4. Estrutura química geral das *N*-metil alquilfosfoetanolaminas (4a) e das alquilfosfocolinas (4b) sintetizadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Reagentes

Tabela 2. Solventes e reagentes empregados.

Solvente	Fórmula molecular	Fabricante
Acetato de etila	C ₄ H ₈ O ₂	Synth
Acetona	C ₃ H ₆ O	Synth
Ácido Acético glacial	C ₂ H ₄ O ₂	Merck
Cloreto de Sódio	NaCl	Synth
Clorofórmio	CHCl ₃	Synth
Diclorometano	CH ₂ Cl ₂	Synth
Etanol	C ₂ H ₆ O	Synth
Éter de petróleo	C ₅ H ₁₂ O	Synth
Éter dietílico	C ₄ H ₁₀ O	Synth
Fosfato de sódio dibásico	Na ₂ HPO ₄	Synth
Hexano	C ₆ H ₁₄	Synth
Hidróxido de amônio	NH ₄ OH	Synth
Hidróxido de sódio	NH ₅ O	Synth
Iodeto de metila (Iodometano)	CH ₃ I	Aldrich
Metanol	CH ₃ OH	Synth
<i>N</i> -Metiletanolamina	C ₂ H ₇ NO	Aldrich
<i>n</i> -Butanol	C ₄ H ₁₀ O	Synth
<i>n</i> -Decanol	C ₁₀ H ₂₂ O	Synth
<i>n</i> -Dodecanol	C ₁₂ H ₂₆ O	Synth
<i>n</i> -Hexadecanol	C ₁₆ H ₃₄ O	Cromoline Química Fina
<i>n</i> -Hexanol	C ₆ H ₁₄ O	Synth
<i>n</i> -Octanol	C ₈ H ₁₈ O	Synth
Oxicloreto de fósforo	POCl ₃	Aldrich
Sangue de Carneiro desfibrinado	-	NewProv
Tricloroetileno	C ₂ HCl ₃	Synth
Trietanolamina	C ₆ H ₁₅ N	Synth

4.1.2. Material para cromatografia

Para as análises de cromatografia em camada delgada (CCD) foram empregadas cromatoplasas de sílica (Silica gel 60 F254 – Merck).

Para os processos de purificação por coluna cromatográfica empregou-se sílica-gel (60-230 mesh, Merck) e, opcionalmente, a resina de troca iônica mista Amberlite Mixed Bed-Exchanger (wet mesh 16-50, SIGMA).

4.1.3. Equipamentos

- Agitadores magnéticos (FISATOM e IKA)
- Mantas com agitação (FISATOM)
- Centrífuga modelo BRA4i (JOUAN)
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear 300 MHz modelo Advance DPX300 (BRUKER)
- Evaporador rotatório modelo R-215 (BUCHI Switzerland)
- Bomba à vácuo modelo 1-C48 (EDWARDS)
- Espectrofotômetro de absorção UV/Vis de feixe duplo, Hitachi, modelo U-1900

4.2. Métodos

4.2.1. Síntese dos análogos *N*-metil alquilfosfoetanolamínicos (III a VII)

A rota sintética utilizada (Esquema 1) para síntese dos análogos *N*-metil alquilfosfoetanolamínicos foi adaptada de MacDonald e colaboradores, (1991) e

realizada em três etapas, sendo que para cada uma delas, algumas modificações pontuais foram realizadas. Na primeira etapa de síntese é obtido o dicloridrato de fosforoalquila (I), na segunda o 2-(alquiloxi)-3-metil-oxa-1,3,2-oxazofosfolano (II) e na terceira a *N*-metil alquilfosfocolina (III) como mostra o esquema 1.

Esquema 1. Rota sintética de obtenção dos análogos *N*-metil alquilfosfoetanolamínicos.

4.2.2.1. Obtenção do dicloridrato de fosforoalquila (I)

Em um balão de três bocas, sendo uma delas utilizada para o condensador com a inserção do gás inerte, uma delas para o funil de adição e a outra devidamente lacrada, foram adicionados 4,6 g (0,03 mol) de oxicloreto de fósforo em 10 mL de hexano, sob agitação, em banho de gelo. Subsequentemente, 3,0 g (0,03 mol) de trietilamina em 20 mL de tricloroetileno foram adicionados ao balão através do funil de adição, mantendo-se agitação e resfriamento. Uma solução de 0,02 mol do álcool de partida (hexadecanol, dodecanol, decanol, octanol ou hexanol) em 80 mL de tricloroetileno foi então gotejada lentamente na mistura reacional. A reação foi mantida por 2 horas. A formação do dicloridrato de fosforoalquila resulta em

precipitação do cloridrato de trietilamina. A formação do produto desejado foi confirmada pelo desaparecimento da banda do álcool de partida em cromatografia em camada delgada em sílica-gel (CCD), utilizando-se mistura de solventes clorofórmio/metanol 1:1(v/v). Após o término dessa etapa, o produto foi filtrado com papel de filtro comum para a completa remoção do cloridrato de trietilamina e procedeu-se à etapa seguinte.

4.2.2.2. Obtenção do 2-(alquiloxi)-3-metil-2-oxa-1,3,2-oxazofosfolano (II)

O produto (I) obtido da etapa anterior ainda na presença do solvente foi transferido para um novo balão de três bocas e adicionou-se, uma mistura contendo 10 mL de tricloetileno, 1750 μ L (0,022 mol) de *N*-metiletanolamina e 12 mL (0,08 mol) de trietilamina, sob agitação e resfriamento em banho de gelo. A reação foi mantida por 2h e monitorada por CCD.

Após o término da reação, o produto foi filtrado, através de filtração simples, para remoção do cloridrato de trietilamina e, em seguida, removeu-se o solvente sob pressão reduzida, dando origem ao intermediário II, 2-(alquiloxi)-3-metil-2-oxa-1,3,2-oxazofosfolano, um produto oleoso transparente.

4.2.2.3. Obtenção da *N*-metil alquilfosfoetanolamina (III a VII)

Ao intermediário II (aproximadamente 0,018 mol), foi adicionada uma mistura de 200 mL de acetona e 10 mL de água em um balão de boca única. Conectou-se ao balão um tubo secante e a reação foi mantida por 3 h à temperatura ambiente e sob agitação branda. Para o derivado *N*-metil hexadecilfosfocolina (III), um sólido branco, o produto obtido nesta etapa sintética foi centrifugado a 1788 x g por 10

minutos e, em seguida, o sobrenadante foi descartado e 30 mL de acetona foram adicionados. O sistema foi submetido ao vórtex para promover a homogeneização e então levado à centrífuga novamente. Este procedimento foi realizado 10 vezes, resultando em cristais brancos. Já para os outros análogos obtidos (IV a VII), correspondentes a óleos, o procedimento de purificação foi diferente. Após a completa evaporação da acetona, esses compostos foram submetidos a uma extração em duas fases empregando-se clorofórmio e água. A fase orgânica foi recolhida e submetida à evaporação sob pressão reduzida originando compostos oleosos e transparentes.

4.2.2. Síntese dos análogos Alquilfosfocolínicos (VIII a XII)

Os análogos alquilfosfocolínicos foram obtidos a partir de uma reação de alquilação dos compostos *N*-metil alquilfosfoetanolamínicos correspondentes, conforme MacDonald et al. (1991) com adaptações. Mais especificamente, realizou-se a metilação do nitrogênio empregando-se iodeto de metila, originando então os análogos alquilfosfocolínicos como descrito no esquema 2.

Esquema 2. Rota sintética de obtenção dos análogos alquilfosfocolínicos

Para cada análogo *N*-metil alquilfosfoetanolamínico (III a VII, aproximadamente 0,018 mol), foram adicionados 100 mL de metanol contendo 0,8g

(0,020 mol) de NaOH e 28,4 g (0,20 mol) de iodeto de metila. A reação foi mantida por 24h no escuro, à temperatura ambiente, utilizando-se um balão de boca única conectado a um tubo secante. Ao término da reação, o excesso de solvente foi removido sob pressão reduzida e o produto submetido à cromatografia em coluna de sílica gel utilizando-se como fase móvel clorofórmio/metanol em diferentes proporções.

4.2.3. Determinação do potencial hemolítico

Os ensaios foram realizados em triplicata, preparando-se sistemas em solução fisiológica de fosfato de sódio (PBS), contendo 5% (v/v) de sangue de carneiro desfibrinado (NewProv) e os compostos sintetizados a uma concentração de 15 a 350 μ M. Em sequência, as suspensões foram centrifugadas por 5 minutos a 1788xg e a porcentagem de hemólise determinada por meio de leitura de absorbância (A) do sobrenadante em $\lambda = 540$ nm. A porcentagem de hemólise foi determinada como sendo a razão entre a absorbância lida na amostra e a absorbância encontrada para o sangue em água destilada, que corresponde a 100% de hemólise, conforme a equação (I). Como branco dos ensaios, empregou-se PBS (Rangel-Yagui et al., 2007).

$$\%hemólise = \frac{A_{amostra}}{A_{água}} \quad (\text{Eq. I})$$

Determinações de potencial hemolítico dos alcoóis de partida, bem como outros alcoóis *n*-alquílicos também foram realizadas, visando a comparação com os

análogos correspondentes. Para os alcoóis, a concentração utilizada nos ensaios foi de 3,5 mM.

4.2.4. Cálculo da Concentração micelar crítica (CMC)

A concentração micelar crítica (água, a 25°C) das moléculas sintetizadas foi calculada utilizando-se o programa computacional PREDICT (Blankschtein, 1986 e Carale, 1992), com a colaboração do aluno de doutorado Matheus Malta de Sá. Para a série das alquilfosfocolinas, foi considerada uma área transversal da cabeça polar (a_h) de 71,7 Å² e a distância de separação entre a carga positiva e a carga negativa (d_{sep}) foi de 2,5 Å. Já Para o grupo das *N*-metil alquilfosfoetanolaminas, as aproximações consideraram uma área transversal da cabeça polar (a_h) de 51,9 Å² e uma distância de separação entre a carga positiva e a carga negativa (d_{sep}) de 2,5 Å. Para a porção apolar foi considerado, em ambos os casos, uma distância de 1,65 Å entre as ligações carbono-carbono, 1,5 Å de raio para as metilas (CH₃), um volume de 27,4 Å³ para as metilas e um volume de 26,9 Å³ para os metilenos (CH₂).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Síntese da *N*-metil hexadecilfosfoetanolamina e da hexadecilfosfocolina

Para a síntese da hexadecilfosfocolina (VIII), bem como da *N*-metil hexadecilfosfoetanolamina (III), utilizou-se a rota sintética descrita por MacDonald e colaboradores (1991). No entanto, durante as tentativas de síntese realizadas, algumas adaptações foram propostas, visando a efetiva formação do produto e aumento do rendimento e da pureza dos compostos obtidos. Nesse sentido, foram realizadas 32 tentativas de síntese da hexadecilfosfocolina. Entre as adaptações realizadas, as quais foram posteriormente empregadas na síntese dos outros análogos, podemos citar:

- Alteração do tempo de reação e das fases móveis utilizadas para CCD - As fases móveis utilizadas na CCD para acompanhamento e controle das etapas reacionais foram alteradas, com exceção da primeira etapa de síntese em que a mistura clorofórmio/metanol (1:1) mostrou-se bastante eficiente para evidenciar a conversão do hexadecanol em dicloridrato de fosforohexadecila. Nas outras etapas, no entanto, passou-se a utilizar uma mistura de diclorometano/metanol/NH₄OH 25% (75:22:3) (Zaffalon et.al, 2011), que permitiu a identificação dos produtos formados e reagentes consumidos. Através do acompanhamento das reações, pudemos observar que em nenhuma das etapas o tempo de reação descrito por MacDonald e colaboradores (1991) era suficiente para permitir a completa conversão dos reagentes em produto final, o que pode justificar os rendimentos tão baixos nas primeiras tentativas de síntese. Por esse motivo optou-se pelo aumento no tempo das reações em todas as etapas sintéticas.

- Investigação da temperatura a ser utilizada nas etapas de síntese e evaporação de solvente - Após a realização de algumas tentativas de síntese, observou-se que temperaturas mais amenas, tanto nas etapas reacionais quanto nos procedimentos de remoção de solvente, resultavam em menor degradação dos intermediários e produtos obtidos sem comprometimento do rendimento. Deste modo, optou-se pela realização de todas as etapas sintéticas em banho de gelo e as evaporações de solvente sob pressão reduzida foram realizadas a 30°C.

- Alteração dos procedimentos de purificação dos compostos - Um dos grandes problemas relacionado à síntese das alquilfosfocolinas refere-se à purificação dos intermediários sintéticos e produto final. Como em geral as moléculas obtidas são higroscópicas e instáveis, ou seja, degradam-se facilmente na presença de solventes ou expostas ao ar, o processo de purificação torna-se bastante complexo. Face ao exposto, optou-se por não purificar os intermediários I e II. Como pode ser observado nos anexos 1 e 2, poucos são os contaminantes desses intermediários, o que permitiu a continuação da rota sem grandes prejuízos. Para os produtos finais (alquilfosfoetanolaminas) a purificação deve ser realizada. A presença de uma carga real na estrutura (nitrogênio quaternário), entretanto, dificulta a purificação e demanda um grande tempo de coluna, podendo levar à degradação do produto. A primeira tentativa de purificação foi realizada utilizando-se uma coluna de leito misto (Exchanger Amberlite MB-150) e eluição por gradiente de tampão. Porém, o método não foi eficiente pois, ao final do processo, ainda tínhamos o produto impuro e observávamos a presença da *N*-metil alquilfosfoetanolamina, reagente de partida para esta etapa.

Passamos então a realizar a purificação conforme descrito por Zaffalon et al. (2011), ou seja, empregando-se coluna de sílica gel com fase móvel diclorometano/clorofórmio/ NH_4OH 25% (75:22:3). Este método apresentou melhor resultado, entretanto, ainda incapaz de separar os compostos monometilados, *N*-metil alquilfosfoetanolaminas (III a VII) dos trimetilados, alquilfosfocolínicos (VIII a XII). Acredita-se que tanto os compostos monometilados quanto os trimetilados tenham interagido de maneira intensa com a sílica, dificultando a purificação. A eluição foi possível somente com o emprego de metanol puro, o que resultou no arraste de contaminantes polares aderidos à sílica. Outras tentativas foram realizadas empregando-se coluna de sílica gel menores, de apenas 1 cm de diâmetro e 25 cm de altura. Essa alteração permitiu a realização da separação de maneira muito mais rápida, resultando nos compostos monometilados puros, mas ainda assim não levou à purificação dos compostos trimetilados em quantidade suficiente para realização de ensaios biológicos.

- Retirada do ácido acético da rota sintética - Após a realização de diversas tentativas de síntese, observamos que todos os produtos finais apresentavam um contaminante comum que acreditávamos ser o ácido acético. Mesmo após a realização de vários procedimentos de purificação, o contaminante persistia em grandes quantidades. Desta maneira, passamos a realizar a etapa de abertura do anel oxazofosfolano em ausência de ácido acético, somente empregando água e agitação branda. Infelizmente, continuamos obtendo produtos contaminados em algumas das sínteses. Como consequência, observa-se um sinal nos espectros de RMN de ^1H do análogo alquilfosfocolínico dodecilmfosfocolina em

aproximadamente 1,91ppm, indicando que a contaminação não se deve à presença do ácido acético.

A seguir, cada etapa sintética de obtenção da *N*-metil hexadecilfosfoetanolamina e da hexadecilfosfocolina é discutida em detalhes.

5.1.1. Obtenção do dicloridrato de fosforohexadecila

Esquema 3. Obtenção do dicloridrato de fosforohexadecila.

Na primeira etapa sintética, partiu-se do POCl_3 e do hexadecanol, sendo que uma substituição nucleofílica no átomo de fósforo resultou na formação do produto desejado, o dicloridrato de fosforohexadecila (intermediário I). A reação ocorreu sob agitação, banho de gelo e em atmosfera inerte de argônio. Uma CCD referência foi feita a partir da solução de hexadecanol inicialmente gotejada e o desaparecimento da mancha foi confirmado ao final da reação, sugerindo a conversão completa do hexadecanol no produto desejado. O R_f encontrado para a mancha de hexadecanol foi de 0,82, valor semelhante ao descrito na literatura, $R_f = 0,85$ (MacDonald et al., 1991). Para o intermediário obtido nesta etapa a única metodologia de purificação aplicada foi uma filtração simples para remoção do cloridrato de trietilamina formado. O produto obtido nessa etapa foi caracterizado por RMN ^1H . Dicloridrato de fosforohexadecila: $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{O}_2\text{Cl}_2\text{P}$, MM 359. Anexo 1: RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 4,33 ppm; δ 1,80 ppm; δ 1,26 ppm (s, 26H); δ 0,88 ppm (t, 3H).

5.1.2. Obtenção do 2-(hexadeciloxi)-3-metil-2-oxa-1,2,3-oxazofosfolano (II)

Esquema 4. Obtenção do 2-(hexadeciloxi)-3-metil-2-oxa-1,2,3-oxazofosfolano.

A síntese do intermediário 2-(hexadeciloxi)-3-metil-2-oxa-1,2,3-oxazofosfolano (II) foi realizada em atmosfera inerte de argônio, sob agitação e com resfriamento. O mecanismo de reação pode ser descrito como um ataque nucleofílico ao átomo de fósforo pelo grupo hidroxila, seguido de ataque pela amina secundária, com formação da fosfoamida cíclica. A reação foi monitorada por CCD, empregando-se vanilina como revelador. O valor de R_f (0,16) encontrado, utilizando-se a fase móvel clorofórmio/metanol (1:1), para o intermediário (II) foi próximo do valor descrito na literatura, R_f = 0,2 (MacDonald et al., 1991).

MacDonald et al. (1991) descreveram a realização de uma recristalização para a purificação dessa etapa sintética que foi reproduzida em nosso laboratório. Realizou-se a adição de hexano à quente e, após resfriamento em banho de gelo, procedeu-se com a filtração do composto recristalizado. Porém, observamos que o composto obtido apresentava-se bastante solúvel em hexano à temperatura ambiente, o que dificultou o procedimento de recristalização e resultou em rendimentos muito baixos.

Após tentativas frustradas de recristalização com hexano devido à ressolubilização do precipitado, observamos que reações em que a purificação do intermediário II não era realizada resultavam em produtos relativamente puros e

rendimentos maiores em etapas subsequentes. Portanto, optamos por eliminar a etapa de purificação do intermediário II. O produto obtido nessa etapa foi caracterizado por RMN ^1H . 2(hexadeciloxi)-3-metil-2-oxa-1,3,2-oxazofosfolano: $\text{C}_{19}\text{H}_{40}\text{O}_3\text{NP}$, MM 330. Anexo 2: RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 4,01 ppm; δ 3,84 ppm; δ 3,13 ppm (m, 2H); δ 2,71 ppm (s, 3H); δ 1,67 ppm (m, 2H); δ 1,38 (t, 3H); δ 1,26 ppm(s, 24H); δ 0,88 ppm (t, 3H).

5.1.3. Obtenção da N-metil hexadecilfosfoetanolamina (III)

Esquema 5. Obtenção da *N*-metil hexadecilfosfoetanolamina.

Na terceira etapa, o intermediário (II) foi solubilizado em acetona e adicionou-se 10 mL de água. A reação foi mantida sob agitação branda e à temperatura ambiente, visando à abertura do anel por hidrólise da ligação fosfoamida. O produto obtido foi centrifugado e, em seguida, lavagens sucessivas com acetona foram realizadas, sendo que entre cada lavagem o produto precipitado foi coletado por meio de centrifugação. O produto obtido nessa etapa, correspondente à *N*-metil hexadecilfosfoetanolamina, foi caracterizado por RMN ^1H . *N*-metil hexadecilfosfoetanolamina: $\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{O}_3\text{NP}$, MM 379. Anexo 3: RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 4,20 ppm; δ 3,87 ppm; δ 3,12 ppm (m, 2H); δ 2,68 ppm (s, 3H); δ 1,62 ppm (m, 2H); δ 1,26 ppm (s, 26H); δ 0,88 ppm (t, 3H).

5.1.4. Obtenção da hexadecilfosfocolina (VIII)

Esquema 6. Obtenção da hexadecilfosfocolina.

Na última etapa da rota sintética, a metilação da *N*-metil hexadecilfosfocolina foi realizada por meio de reação de alquilação com CH_3I em presença de NaOH e sob proteção da luz, mantendo-se a agitação durante 24 horas. Verificou-se um rendimento de 82% nesta última etapa.

Como já discutido, a purificação da hexadecilfosfocolina consistiu em grande desafio devido às propriedades físico-químicas da molécula, como a presença de uma carga real que dificultava a eluição da molécula pela forte interação com a sílica, além da instabilidade química. Além disso, devido ao fato da reação de metilação não apresentar rendimento 100%, obtemos uma mistura de análogos *N*-metil hexadecilfosfoetanolamina (III), *N,N*-dimetil hexadecilfosfoetanolamina e hexadecilfosfocolina (VIII). A semelhança química entre estes compostos dificulta a purificação de VIII.

O produto obtido foi caracterizado por RMN ^1H e ^{13}C . Hexadecilfosfocolina: $\text{C}_{21}\text{H}_{46}\text{NO}_4\text{P}$, MM 407. Anexo 4: RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 4,41 ppm (s, 2H); δ 4,25 ppm (s, 2H); δ 3,77 ppm (q, 2H); δ 3,34 ppm (s, 9H); δ 2,66 ppm (s, 3H); δ 1,66 ppm (2H); δ 1,26 ppm (s, 26H); δ 0,87 ppm (t, 3H). Anexo 5: RMN ^{13}C (CDCl_3 , 300

MHz) δ 66,23 ppm; δ 65,67 ppm; δ 59,21 ppm; δ 54,30 ppm; δ 31,92 ppm; δ 31,01 ppm; δ 29,60 ppm; δ 25,95 ppm; δ 22,67 ppm; δ 14,08 ppm.

Como se pode observar na tabela 4, o espectro obtido apresenta deslocamentos correspondentes aos descritos na literatura para a miltefosina. Além disso, apresenta-se bastante semelhante ao espectro para o padrão adquirido da Cayman Chemical Company. O Anexo 6 mostra os deslocamentos químicos correspondentes ao fármaco comercial. Hexadecilfosfocolina padrão: $C_{21}H_{46}NO_4P$; MM 407. Anexo 6: RMN 1H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 4,25 ppm (s, 2H); δ 4,02 ppm (s, 2H); δ 3,78 ppm (m, 2H); δ 3,35 ppm (s, 2H); δ 1,56 ppm (s, 2H); δ 1,26 ppm (s, 26H); δ 0,88 ppm (t, 3H).

Tabela 3. Comparação entre deslocamentos obtidos por espectrometria de RMN 1H ($CDCl_3$, 300 MHz) para a hexadecilfosfocolina (miltefosina) sintetizada neste trabalho, hexadecilfosfocolina padrão (Cayman Chemical Company) e os deslocamentos previamente descritos na literatura.

Hidrogênio	Padrão	MacDonald <i>et al</i> (1991)	Zaffallon <i>et al.</i> (2001)	Kang <i>et al.</i> (2005)	miltefosina sintetizada
A	δ 0,88	δ 0,88	δ 0,87	δ 0,88	δ 0,88
B	δ 1,26	δ 1,25	δ 1,25	δ 1,25	δ 1,26
C	δ 1,56	δ 1,56	δ 1,66/1,48	δ 1,57	δ 1,56
D	δ 4,02	δ 3,80	δ 3,86	δ 3,81	δ 4,41
E	δ 4,25	δ 4,26	δ 4,27	δ 4,29	δ 4,25
F	δ 3,78	δ 3,77	δ 3,78	δ 3,81	δ 3,77
G	δ 3,35	δ 3,38	δ 3,41	δ 3,41	δ 3,34

5.2. Síntese dos análogos

Para a síntese dos análogos, todas as alterações realizadas para a rota foram mantidas, levando a formação dos produtos desejados. Os compostos dos dois grupos, *N*-metil alquilfosfoetanolaminas e alquilfosfocolinas, foram submetidos à purificação em coluna de sílica Gel, entretanto, como já discutido anteriormente,

somente os compostos do grupo das *N*-metil alquilfosfoetanolaminas foram obtidos de maneira pura.

5.2.1. Síntese das *N*-metil alquilfosfoetanolaminas

As seguir são apresentados os dados de espectroscopia dos análogos *N*- metil alquilfosfoetanolamínicos obtidos, correspondentes aos anexos de 7 a 14.

N-metil dodecilfosfoetanolamina: $C_{15}H_{34}O_4NP$; MM 323. Anexo 7: RMN 1H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 4,18 ppm (m, 2H); δ 3,93 ppm (m, 2H); δ 3,24 ppm (m, 2H); δ 2,62 ppm (d, 3H); δ 1,60 ppm (m, 2H); δ 1,18 ppm (s, 18H); δ 0,80 ppm (t, 3H). Anexo 8: RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 67,89 ppm; δ 63,79 ppm; δ 49,23 ppm; δ 49,22 ppm; δ 31,88 ppm; δ 31,40 ppm; δ 29,59 ppm; δ 29,30 ppm; δ 25,50 ppm; δ 22,64 ppm; δ 14,00 ppm.

N-metil decilfosfoetanolamina: $C_{13}H_{30}O_4NP$; MM 295. Anexo 9: RMN 1H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 4,18 ppm (s, 2H); δ 3,91 ppm (m, 2H); δ 3,24 ppm (s, 2H); δ 2,61 ppm (s, 9H); δ 1,59 ppm (s, 2H); δ 1,2 ppm (s, 14H); δ 0,80 ppm (t, 3H). Anexo 10: RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 67,72 ppm; δ 63,79 ppm; δ 49,33 ppm; δ 49,12 ppm; δ 31,20 ppm; δ 30,43 ppm; δ 30,34 ppm; δ 29,38 ppm; δ 25,37 ppm; δ 22,53 ppm; δ 13,95 ppm.

N-metil octilfosfoetanolamina: $C_{11}H_{26}NO_4P$; MM 267. Anexo 11: RMN 1H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 4,16 ppm (s, 2H); δ 3,93 ppm (s, 2H); δ 3,24 ppm (m, 2H); δ 2,61 ppm (s, 3H); δ 1,59 ppm (s, 2H); δ 1,20 ppm (s, 10H); δ 0,80 ppm (t, 3H). Anexo

12: RMN ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz) δ 67,63 ppm; δ 63,77 ppm; δ 49,33 ppm; δ 31,75 ppm; δ 31,20 ppm; δ 29,53 ppm; δ 25,48 ppm; δ 22,53 ppm; δ 13,55 ppm.

N-metil hexilfosfoetanolamina: $\text{C}_9\text{H}_{22}\text{NO}_4\text{P}$; MM 239. Anexo 13: RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 4,20 ppm (s, 2H); δ 3,94 ppm (s, 2H); δ 3,25 ppm (m, 2H); δ 2,61 ppm (s, 2H); δ 1,59 ppm (s, 2H); δ 1,23 ppm (s, 6H); δ 0,88 ppm (t, 3H). Anexo 14: RMN ^{13}C (CDCl_3 , 300 MHz) δ 67,74 ppm; δ 63,83 ppm; δ 49,33 ppm; δ 49,12 ppm; δ 31,22 ppm; δ 30,35 ppm; δ 25,00 ppm; δ 22,39 ppm; δ 13,84 ppm.

As análises de ^1H RMN realizadas com os análogos *N*-alquilícos revelam um pico em aproximadamente 2,60 que representa os hidrogênios ligados ao carbono que encontra-se diretamente ligado ao nitrogênio evidenciando a conversão de 2-(alquiloxi)-3-metil-2-oxa-1,2,3-oxazofosfolano em *N*-metil aquilfosfoetanolamina. Para os compostos cíclicos (2-(alquiloxi)-3-metil-2-oxa-1,2,3-oxazofosfolanos) observamos que esses hidrogênios encontram em aproximadamente 2,70.

5.2.2. Síntese das Alquilfosfocolinas

A seguir são apresentados os dados de espectroscopia dos análogos alquilfosfocolínicos obtidos, correspondentes aos anexos 15, 16 e 17.

Dodecilfosfocolina: $\text{C}_{17}\text{H}_{38}\text{NO}_4\text{P}$; MM 351. Anexo 15: RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 4,25 ppm (s, 2H); δ 3,74 ppm (s, 2H); δ 3,28 ppm (m, 9H); δ 1,56 ppm (s, 2H); δ 1,26 ppm (s, 18H); δ 0,88 ppm (t, 3H).

Decilfosfocolina: $C_{15}H_{34}NO_4P$; MM 351. Anexo 16: RMN 1H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 4,25 ppm (s, 2H); δ 3,74 ppm (s, 2H); δ 3,28 ppm (m, 9H); δ 1,56 ppm (s, 2H); δ 1,26 ppm (s, 18H); δ 0,88 ppm (t, 3H).

Octilfosfocolina: fórmula $C_{13}H_{30}NO_4P$; MM 295. Anexo 17: RMN 1H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 4,25 ppm (s, 2H); δ 3,77 ppm (s, 2H); δ 3,34 ppm (m, 7H); δ 1,56 ppm (s, 2H); δ 1,26 ppm (s, 10H); δ 0,88 ppm (t, 3H).

Dentre todos os compostos trimetilados propostos somente o análogo com seis carbonos na cadeia alquílica (hexilfosfocolina – composto XII) não foi obtido em quantidades suficientes para caracterização. Entre os motivos para o baixo rendimento da síntese podemos citar a dificuldade de obtenção do análogo *N*-metil hexilfosfoetanolamina, seu antecessor, em quantidades suficientes para a realização da próxima etapa sintética. Com a diminuição do tamanho da cadeia alquílica as moléculas foram adquirindo características mais polares, dificultando assim o processo de purificação das *N*-metil alquilfosfoetanolaminas, já que o processo empregado consiste em uma extração fase orgânica/fase aquosa empregando-se clorofórmio e que o aumento da polaridade leva à diminuição da quantidade de produto recolhido na fase orgânica, influenciando diretamente na próxima etapa sintética.

Os espectros de hidrogênio revelam que, embora os compostos estejam impuros, a formação dos produtos aconteceu, principalmente quando comparamos os espectros com o espectro da miltefosina comercial. Além disso, a comparação dos espectros dos compostos *N*-metil alquilfosfoetanolamínicos com os espectros dos compostos alquilfosfocolínicos permite observar de maneira clara a conversão

do primeiro grupo no segundo. Isso porque os compostos *N*-metil alquilfosfoetanolamínicos apresentam um pico em aproximadamente 2,60 integrando para 3, correspondente aos hidrogênios da *N*-metila. Este pico não é observado nos espectros dos compostos alquilfosfocolínicos (a não ser que ambas espécies estejam presentes), nos quais observa-se em substituição ao pico de 2,60 um pico em aproximadamente 3,30 integrando para nove, correspondente aos hidrogênios do grupamento *N*-trimetil e indicando a conversão dos compostos monometilados em compostos trimetilados.

5.3. Ensaio de Potencial Hemolítico

Inicialmente, o potencial hemolítico de diversos álcoois *n*-alquílicos, incluindo aqueles a serem empregados para obtenção dos análogos, foi determinado e os resultados encontram-se apresentados na figura 5. Como pode ser observado, o potencial hemolítico aumentou com o aumento do tamanho da cadeia alquílica. Para as cadeias mais curtas (1 a 3 átomos de carbono), entretanto, não foram observadas diferenças significativas no potencial hemolítico. Cabe ainda ressaltar que o decanol, na concentração empregada nos ensaios, apresentou 100% de hemólise. Desta maneira, concentrações inferiores deste álcool necessitariam ser investigadas para que se determinasse a concentração efetiva em que se observa hemólise total.

Figura 5. Valores de potencial hemolítico (%) obtidos para os álcoois *n*-alquílicos a 3,5 mM. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95%.

Em seguida, o potencial hemolítico da miltefosina foi avaliado em diferentes concentrações para determinação de seu perfil hemolítico, apresentado na figura 6. Considerando que os análogos sintetizados deveriam ser menos hemolíticos que a miltefosina, utilizamos a concentração em que o potencial hemolítico foi de 100% para a miltefosina como sendo a concentração a ser testada nos ensaios dos análogos.

Figura 6. Potencial hemolítico da miltefosina em função da concentração de fármaco. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95%.

Os análogos *N*-metil alquilfosfoetanolamínicos, devidamente purificados e caracterizados, foram submetidos à avaliação do potencial hemolítico. Como podemos observar na figura 7, ao contrário do que esperávamos, a variação na cadeia alquílica contribuiu muito pouco para o potencial hemolítico dos compostos sintetizados. Observa-se que para os quatro compostos, com cadeias alquílicas variando de 12 a 6 carbonos, o potencial hemolítico encontrado é praticamente o mesmo. Considerando os resultados obtidos para os álcoois *n*-alquílicos, pode-se inferir que ensaios com concentrações maiores destes análogos seriam necessários para que o efeito do comprimento da cadeia alquílica fosse observado. Já em comparação com a miltefosina, os compostos sintetizados se apresentaram significativamente menos hemolíticos, o que pode ser considerado extremamente vantajoso.

Figura 7. Valores de potencial hemolítico (%) obtidos para os compostos *N*-metil alquilfosfoetanolamínicos a 350 μM , em comparação à miltefosina. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95%.

Um dos fatores que pode justificar o potencial hemolítico menor para os análogos *N*-metil aquifosfoetanolamínicos quando comparados à miltefosina está na estrutura das moléculas, como demonstrado por Wnetrazak (2013). Sabe-se que moléculas que apresentam estrutura cônica (como é o caso da miltefosina) apresentam maior facilidade de formar micelas e, portanto são mais hemolíticas do que moléculas que adotam estrutura de cone truncado, como é o caso das *N*-metil alquilfosfoetanolaminas estudadas, que formam lamelas ao invés de micelas. Para prever a estrutura espacial das moléculas foi empregada a relação demonstrada na equação 2 (Wnetrazak, 2013).

$$s = \frac{V}{a_h \cdot l_c} \quad (\text{Eq. II})$$

Em que *s* corresponde ao *critical packing parameter*, *V* é o volume ocupado pela cauda apolar (27,4 Å³ para os grupos CH₃ e 26,9 Å³ para os grupos CH₂), *a_h* corresponde à área da seção transversal da cabeça polar e *l_c* = 1,265 Å é a distância entre a ligação carbono-carbono. Valores de “*s*” menores do 0,33 resultam em estrutura espacial cônica, enquanto que valores entre 0,33 e 0,50 determinam a predominância da estrutura espacial de cone truncado, conforme apresentado na tabela 4 (Israelachvili, 1991).

Tabela 4. Valores estimados para os parâmetros estruturais da miltefosina e dos análogos *N*-metil alquilfosfoetanolamínicos.

Compostos	a_h (Å ²)	l_c (Å)	V (Å ³)	s	Estrutura
Miltefosina	71,7	20,47	430,9	0,29	Cone
<i>N</i> -metil dodecilmiltefosina	51,9	15,18	328,3	0,41	Cone truncado
<i>N</i> -metil decilmiltefosina	51,9	12,65	273,5	0,41	Cone truncado
<i>N</i> -metil octilmiltefosina	51,9	10,12	217,3	0,41	Cone truncado
<i>N</i> -metil hexilmiltefosina	51,9	7,59	163,9	0,41	Cone truncado

5.4. Cálculo da CMC

Os valores de CMC encontrados para os compostos do grupo das alquilfosfocolinas e das *N*-metil alquilfosfoetanolaminas estão apresentados na tabela 5. Como pode ser observado, os valores de CMC foram sempre superiores no caso das alquilfosfocolinas, considerando-se constante o tamanho da cadeia alquílica. Isto se deve ao fato de os análogos *N*-metil alquilfosfoetanolamínicos não apresentarem carga efetiva. As porções fosfoetanolaminicas (cabeças polares) são capazes de interagir por ligações de hidrogênio, favorecendo a agregação destes compostos em micelas. No caso dos compostos alquilfosfocolínicos, a repulsão eletrostática e a área da seção transversal da porção polar, relativamente maiores, dificultam, em termos de energia livre, a agregação das moléculas em micelas. Consequentemente, valores de CMC maiores são observados. Com relação ao comprimento da cadeia alquílica, para ambas as séries observa-se que quanto maior o comprimento, menor a CMC, conforme esperado (Rosen, 2012).

Tabela 5. Valores de CMC estimados para compostos alquilfosfocolínicos e *N*-metil alquilfosfoetanolamínicos.

Número de carbonos na cadeia alquílica	Derivados alquilfosfocolínicos	Derivados <i>N</i> -metil alquilfosfoetanolamínicos
6	20270 mM	4438 mM
8	1242 mM	276,2 mM
10	77,96 mM	16,71 mM
12	4359 mM	0,988 mM

Dados publicados em estudos anteriores, como os de Rangel-Yagui (2005), mostram que, para uma série homóloga de tensoativos, a CMC é inversamente correlacionada ao potencial hemolítico. Nossos resultados, entretanto, não nos permitiram esta observação. Os análogos alquilfosfocolínicos (com exceção da miltefosina) não foram ensaiados com relação ao potencial hemolítico, pois não conseguimos até o momento uma metodologia de purificação adequada. Para os análogos *N*-metil alquilfosfoetanolamínicos, a concentração máxima ensaiada resultou em valores de potencial hemolítico baixos e, desta maneira, não foi possível estabelecer uma relação entre CMC e efeito hemolítico. Não obstante, os resultados obtidos apontam para o potencial dos compostos *N*-metil alquilfosfoetanolamínicos, uma vez que estes mostram-se consideravelmente menos hemolíticos. Além disso, considerando o pKa destas moléculas (em torno de 9,3), o que garante que a maioria das moléculas encontre-se protonada em pH fisiológico e destacadamente em ambientes tumorais (pH ~ 5,0), acreditamos que sejam capazes de interagir com os mesmos alvos biológicos das alquilfoscolinas de maneira semelhante.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, foram sintetizados com sucesso a miltefosina e mais quatro análogos alquilfosfocolínicos homólogos ($n = 6, 8, 10$ e 12). Os análogos correspondentes *N*-metil alquilfosfoetanolamínicos também foram sintetizados. Porém, devido à facilidade de obtenção e purificação dos compostos *N*-metil alquilfosfoetanolamínicos em relação aos compostos alquilfosfocolínicos, somente os primeiros foram obtidos com pureza suficiente para realização de ensaios de potencial hemolítico, além da miltefosina (hexadecilfosfocolina). De acordo com os resultados, na concentração em que a miltefosina apresentou 100% de hemólise os compostos *N*-metil alquilfosfoetanolamínicos apresentaram potencial hemolítico significativamente mais baixo (inferior a 10%).

Portanto, considerando as características estruturais destas moléculas que as confere menor poder hemolítico e a manutenção de grupamentos químicos importantes para a interação com os alvos biológicos, consideramos as *N*-metil alquilfosfoetanolaminas moléculas promissoras. Cabe ressaltar que para essa série, o tamanho da cadeia alquímica não alterou de maneira significativa o potencial hemolítico das moléculas, o que nos permite concluir que, nesse caso, a molécula com 16 carbonos na cadeia alquímica seria a mais promissora, já que diversos estudos demonstram a relação entre cadeias alquílicas mais longas e moléculas mais ativas.

Como perspectivas, consideramos que estudos *in vitro* de atividade anti-proliferativa frente a diferentes linhagens de células tumorais devem ser realizados para que se confirme o potencial das *N*-metil alquilfosfoetanolaminas.

7. REFERÊNCIAS

- AETERNA ZENTARIS. *Products in development*. Disponível em: <http://www.aezsinc.com/en/page.php?p=23>. Acesso em jan. 2012.
- AGRESTA M *et al.* Synthesis and antiproliferative activity of alkylphosphocholines. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 126, n. 2, p. 201-210, 2003.
- ALBERTS, B. *et al.* *Biologia molecular da célula*. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- ANDREESEN R *et al.* Selective destruction of human leukemic cells by alkyllysophospholipids. *Cancer Res*, 1978; 38: 3894-3899.
- ARTHUR G, BITTMAN R. The inhibition of cell signaling pathways by antitumor ether lipids. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1390, n. 1, p. 85-102, 1998.
- AVLONITIS N *et al.* Antileishmanial ring-substituted ether phospholipids. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, n.5, p.55-767, 2003.
- AVILA C M, ROMEIRO N C. Proteínas tirosinas quinases: desafios para o desenvolvimento de fármacos para a terapia do Câncer. *Rev Virtual Química*, 2012, 2 (1) 58-82
- BÄUMER W, WLAZ P, JENNINGS G, RUNDFELDT C. The putative lipid raft modulator miltefosine displays immunomodulatory action in T-cell dependent dermal inflammation models. *European Journal of Pharmacology*, v. 628, n. 1-3, p. 226-232, 2010.
- BAKALTCHEVA I B, ODEYALE C O, SPARGO B J. Effects of alkanols, alkanediols and glycerol on red blood cell shape and hemolysis. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1280, p. 73-80, 1996.
- BERKOVIC D. Cytotoxic etherphospholipid analogues. *General Pharmacology*, v. 31, n. 4, p. 511-517, 1998.
- BLANKSCHTEIN D, THURSTON G, BENEDEK G. Phenomenological Theory of Equilibrium Thermodynamic Properties and Phase Separation of Micellar Solution. *J. Chem. Phys*, 85(12), 7268-7288, 1986.
- BROHEM C A *et al.* Apoptosis induction by 4-nerolidylcatechol in melanoma cell lines. *Toxicology in vitro*, n.23, p.111-119, 2009.
- CASTRO B, GAMEIRO P, LIMA J L F C, MATOS C, REIS S. Interaction of drugs with hexadecylphosphocholine micelles. Derivative spectroscopy, acid-base and solubility studies. *Material Science and Engineering*, n. 18, p. 71-78, 2001.
- CALOGEROPOULOU T, ANGELOU P, DETSI A, FRAGIADAKI I, SCOULICA E. Design and synthesis of potent antileishmanial cycloalkylidene-substituted ether phospholipid derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, n.51, p. 897-908, 2008.

- CARALE T R, BLANKSCHTEIN D. Theoretical and Experimental Determinations of the Crossover from Dilute to Semidilute Regimes of Micellar Solutions. *J. Phys. Chem*, 96(1), 459-467, 1992
- CHABNER B A *et al.* Chemotherapy of Neoplastic Diseases. In: BRUNTON L L, LAZO J S, PARKER K L. eds. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11.ed. Nova Iorque: McGraw-Hill, 2006.
- CUGH P *et al.* Akt inhibitors as an HIV-1 infected macrophage specific anti-viral therapy. *Retrovirology*, v.5, 2008.
- CROFT S L, SEIFERT K, DUCHÊNE M. 2003. Antiprotozoal activities of phospholipid analogues. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 126, 165–172, 2003.
- DOBBIN A J DE, GADELHA P I M. Mesilato de Imatinibe para Tratamento da Leucemia Mielóide Crônica. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 8, p. 429-438, 2002.
- EIBL H, ARNOLD D, WELTZIEN H U, WESTPHAL O. On the synthesis of alpha beta lecithins and their analogs. *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 704, 226-230, 1967.
- EVANS C. W. *The Metastatic Cell: Behaviour and biochemistry*. 1 ed. London: Chapman and Hall, 1991.
- FERRARI C K B, TORRES E A F S. Perspectivas da pesquisa em biologia molecular aplicada à nutrição. *Interciência*, v. 27, n. 11, 2002.
- FIEGL M, LINDNER L H, JUERGENS M, EIBL H, HIDDEMANN W, BRAESS J. Erufosine, a novel alkylphosphocholine, in acute myeloid leukemia: Single activity and combination with other antileukemic drugs. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2008.
- FOS E *et al* Synthesis of alkyl chain-modified ether lipids and evaluation of their in vitro cytotoxicity. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.38, n.7, p.1216-1228, 1995.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *For Health Professionals*. Disponível em: <http://www.fda.gov/>. Acesso em: 10 de Outubro de 2013
- HANAHAN D, WEINBERG A R. Hallmarks of cancer: the next generations. *Cell*, 144, 2011.
- HECZKOVA B, SLOTTE J P. Effect of anti-tumor ether lipids on ordered domains in model membranes. *Febs Letter*, v. 580, n. 10, p. 2471-2476, 2006.
- HEESBEEEN E C, VERDONCK L F, STAAL G E J, RIJKSEN G. Protein kinase C is not involved in the cytotoxic action of 1-octadecyl-2-O-methyl-sn-glycerol-3-phosphocholine in HL-60 and K562 cells. *Biochemical Pharmacology*, v.47, n.9, p.1481-1488, 1994.

- HILGARD P *et al.* D-21266, a new heterocyclic alkylphospholipid with antitumour activity. *Eur J Cancer*, 1997; 33(3): 442-446.
- HIRT R, BRECHTOLD R. Zur Synthese der Phosphatide. 2. Eine neue Synthese der Lecithine. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, v.33, 349–356, 1958.
- HUBIEKI M P, GANDOUR R D, ASHENDEL C L. Synthesis of optically pure cyclic lipoidal ammonium salts and evaluation of inhibition of protein kinase C. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 61, n. 26, p. 9379-9384, 1996.
- HUANG F, QU F, PENG Q, XIA Y, PENG L. Synthesis and characterization of photolabeling probes of miltefosine. *Journal of Fluorine Chemistry*, n. 126, p. 739-743, 2005.
- HORNILLOS V *et al.* Synthesis of 16 mercaptohexadecylphosphocoline, a miltefosine analog with leishmanicidal activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, n.16, p. 5190-5193, 2006.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). *Estimativa 2010*. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em: 30 Abril, 2010.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). *Estimativa 2012/2013*. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em: 05 Abril, 2012.
- JACOBSON J O *et al.* American Society of Clinical Oncology/Oncology Nursing Society Chemotherapy Administration Safety Standards. *Journal Clinical Oncology*, n. 99, p. 1-7, 2009.
- JEMAL A, NAISHADHAM D, SIEGEL R. Cancer Statistics. *Cancer journal of clinicians*, 2012.
- JENDROSSEK V *et al.* Structure-activity relationships of alkylphosphocholine derivatives: antineoplastic action on brain tumor cell lines in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2002; 50(1): 71-79.
- JUNQUEIRA C L. *Biologia celular e molecular*. 8ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
- KANG E, KATAOKA S, KATO K. Synthesis and properties of alkyl phosphorylcholine amphiphiles with a linear and an asymmetrically branched alkyl chain. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, v.78, n.8, p.1558-1564, 2005.
- KUMAR V, ABBAS A K. *Pathologic Basis of Disease*. 7 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, p. 270, 2005.
- KONDAPAKA S B, SINGH S S, DASMAHAPATRA G P, SAUSVILLE E A, ROY K K. Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation. *Molecular Cancer Therapeutics*, v.2, n.11, p. 1093-1103, 2003.

- KAUFMANN – KOLE P *et al.* Systemic administration of alkylphosphocholines. Erucylphosphocholine and liposomal hexadecylphosphocholine. *Adv Exp Med Biol*, 1996; 416: 165-168.
- LEONARD R *et al.* Randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial of 6% miltefosine solution, a topical chemotherapy in cutaneous metastases from breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, v. 19, n.21, p.4150-4159, 2001.
- LEIGHL N B *et al.* Phase 2 study of perifosine in advanced or metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, n. 108, p. 87-92, 2008.
- LI X, LUWOR R, LU Y, LIANG K, FAN Z. Enhancement of antitumor activity of the anti-EGF receptor monoclonal antibody cetuximab/c225 by perifosine in PTEN-deficient cancer cells. *Oncogene*, v.25, n.4, p.525-535, 2006.
- LINDNER L H *et al.* Dual role of hexadecylphosphocholine (miltefosine) in thermosensitive liposomes: Active ingredient and mediator of drug release. *Journal of Controlled Release*, v.125, n.2, p.112-120, 2008.
- LLULL D, RIVAS L, GARCÍA E. *In vitro* bactericidal activity of the antiprotozoal drug miltefosine against *Streptococcus pneumoniae* and other pathogenic streptococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.51, 1844–1848, 2007
- LOPES A A *et al.* Principais genes que participam da formação de tumores. *Revista de Biologia e ciências da terra*, 2002.
- MACDONALD P M, RYDALL J R, KUEBLER S C. Synthesis and characterization of a homologous series of zwitterionic surfactants based on phosphocholine. *Langmuir*, n.11, p. 2602-2606, 1991.
- MUNDER P G, MODELELL M, ANDRESEN R. Lysophosphatidylcholine (lysolecithin) and its synthetic analogues. Immunomodulating and other biologic effects. *Immunopathology*, v. 2, 187-203, 1979.
- MERKLE J, CARRIE R N. *Manual de fisiopatologia*. 2 ed. São Paulo: Roca, 2007.
- MEYERS C A. How chemotherapy damages the central nervous system. *Journal of Biology*, n.7, p. 1-3, 2008.
- ROSEN M J, KUNJAPP J T. *Surfactantes and interfacial phenomena*. New Jersey: kunjappu, 4 ed, 2012.
- MOLINEDO F *et al.* Selective induction of apoptosis in cancer cells by the ether lipid ET-18-OCH₃ (Edelfosine): Molecular structure requirements, cellular uptake, and protection by Bcl-2 and Bcl-X(L). *Cancer Res*, 1997; 57(7): 1320-1328.
- MOLINEDO F *et al.* Lipid raft-targeted therapy in multiple myeloma. *Oncogene*, 2010; 29(26): 3748–3757.

- MRAVLJAK J, ZEISIG R, PECAR S. Synthesis and biological evaluation of spin-labeled alkylphospholip analogs. *Journal of medicinal chemistry*, v. 48, n.20, p. 6393-6399, 2005.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE. *Rituximab*. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/rituximab>. Acesso em: 05 Junho, 2012.
- NELSON D L, COX M, LENINGER. *Princípios de bioquímica*. 3 ed. São Paulo: Salvier, 2002.
- OBANDO D, WIDMER F, WRIGHT L. C, SORRELL T C, JOLLIFFE K. A. Synthesis, antifungal and antimicrobial activity of alkylphospholipids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 15, p.5158-5163, 2007.
- PAPAZAFIRI P *et al.* Structure-activity relationships of antineoplastic ring-substituted ether phospholipid derivates. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, v. 56, n. 3, p. 261-270, 2005.
- POLLOOCK R E. *Manual de oncologia clínica*. 8 ed. São Paulo: Fundação quimiocentro de São Paulo, 2006.
- PORTH C M. *Fisiopatologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- POSA M, KUHAJDA K. Hydrophobicity and haemolytic potential of oxo derivatives of cholic, deoxycholic and chenodeoxycholic acid. *Steroids*, v. 75, p. 424-431, 2010.
- RANGEL-YAGUI C O, HSU H W L, BARBOSA L R S, CAETANO W, PESSOA-JUNIOR A, TAVARES LC, ITRI R. Novel potential drug against *T. cruzi* and its interaction with surfactant micelles. *Pharmaceutical Development and Technology*, v. 12(2), p. 183 – 92, 2007.
- RAKOTOMANGA M, BLANC S, GAUDIN K, CHAMINADE P, LOISEAU P M. Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.51, n.4, p.1425-1430, 2004
- RUITER G A *et al.* Alkyl-lysophospholipids activate the SAPK/JNK pathway and enhance radiation-induced apoptosis. *Cancer Res*, 1999; 59(10): 2457-2463.
- RUITER G A, VERHEIJ M, ZERP S F, VAN BLITTERSWIJK, W J. Alkyl-lysophospholipids as anticancer agents and enhancers of radiation-induced apoptosis. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, v.49, n.2, p.415-419, 2001.
- RUITER G A, ZERP S F, BARTELINK H, VAN BLITTERSWIJK W J, VERHEIJ M. Anti-cancer alkyl-lysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase–Akt/PKB survival pathway. *Anti-cancer Drugs*, v. 14, n. 2, p. 167-173, 2003.

- RUNGE M H, ANDREESEN R, PFLEIDERER A, MUNDER P G. Destruction of human solid tumor by alkyl lysophospholipids. *Journal Natl. Cancer Inst.* 64, 1301-1306, 1980.
- SARAIVA V B *et al.* Proinflammatory and cytotoxic effects of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against drug-resistant strains of *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 46, n.11, p.3472-3477, 2002.
- SCHERF H R *et al.* Therapeutic activity of ET-18-OCH₃ and hexadecylphosphocholine against mammary tumors in BD-VI rats. *Lipids*, 1987; 22(11): 927-929.
- SILVA A S *et al.* Ocorrência de câncer de mama no Brasil e no estado de Santa Catarina. *News/ab*, v. 52, p. 98-110, 2002.
- SEIFERT K, LEMKE A, CROFT S L, KAYSER O. Antileishmanial Structure-activity relationships of synthetic phospholipids: In vitro and in vivo activities of selected derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.51, n.12, p.4525-4528, 2007.
- SUNDAR S, OLLIARO P L. Miltefosine in treatment of leishmaniasis: clinical evidence for informed clinical risk management. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, v.3, n.5, p.733-740, 2007.
- TARNOWSKI G S *et al.* Effect of lysolecithin and analogs on mouse ascites tumors. *Cancer Res*, 1978; 38(2): 339-344.
- TEICHER B A. *Tumor models in cancer research*. Totowa: Human Press Inc, p. 277-278, 2002.
- TERWOT J M M, MANDJES I A M, SINDERMAN H, BEIJNEN J H. Phase II trial of topically applied miltefosine solution on patients with skin-metastasized breast cancer. *British Journal of Cancer*, v. 79, 1158-1161, 1999.
- UBERALL F *et al.* Hexadecylphosphocholine inhibits inositol phosphate formation and protein kinase C activity. *Cancer Res*, 1991; 51(3): 807-812.
- UNGER C *et al.* Hexadecylphosphocholine, a new ether lipid analogue. Studies on the antineoplastic activity in vitro e in vivo. *Acta Oncol*, 1989; 28(2): 213-217.
- UNGER C, BERDEL W, HANAUSKE A, SINDERMAN H, ENGEL J, MROSS K. First-time-in-man and pharmacokinetic study of weekly oral perifosine in patients with solid tumors. *European Journal of Cancer*, v. 46, n.5, p.920-925, 2010.
- VAM BLITTERSWIJK W J, VERHEIJ M. Anticancer mechanisms and clinical application of alkylphospholipids. *Biochim Biophys Acta*, 2012; 1831(8): 663- 674.

- VAN DER LAAN *et al.* A new class of anticancer alkylphospholipids uses lipid rafts as membrane gateways to induce apoptosis in lymphoma cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, v.6, n.8, p.2337-2345, 2007.
- VAN GRIENSVEN J, BALASEGARAM M, MEHEUS F, ALVAR J, DE LYNEN L, BOELAERT M. Combination therapy for visceral leishmaniasis. *Lancet Infectious Diseases*, v.10, 184–194, 2010.
- VERWEIJ J *et al.* Phase II study of miltefosine (hexadecylphosphocholine) in advanced soft tissue sarcomas of the adult – an EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group Study. *Eur J Cancer*, 1993; 29A(2): 208-209.
- VINK R S, SCHHELLENS J H M, BLITTERSWIJK W J V, VERHEIJ M. tumor and normal tissue pharmacokinetics of miltefosine, an oral anti-cancer alkylphospholipid. *Investigational New Drugs*, v. 23, p. 279-283, 2005.
- VINK S R, VAN DER LUIT A H, KLARENBECK J B, VERHEIJ M, VAN BLITTERSWIJK W J. Lipid rafts and metabolic energy differentially determine uptake of anti-cancer alkylphospholipids in lymphoma versus carcinoma cells. *Biochemical Pharmacology*, v. 74, p. 1456-1465, 2007.
- VISSER K, JONKERS J. Towards understanding the role of cancer associated inflammation in chemoresistance. *Current Pharmaceutical design*, v. 15, p. 1844-1853, 2009.
- WIDMER F *et al.* Hexadecylphosphocholine (miltefosine) has broad-spectrum fungicidal activity and is efficacious in a mouse model of cryptococcosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.50, 414–421, 2006.
- WIEDER T, REUTTER W, ORFANOS C E, GEILEN C C. Mechanisms of action of phospholipid analogs as anticancer compounds. *Progress in Lipid Research*, v. 38, p. 249-259, 1999.
- WNETRZAK A, LATKA K, DYNAROWIEZ-LATKA P. Interaction of alkylphosphocholines with model membranes – The Langmuir monolayer study. *Journal of Membrane Biology*, 2013.
- ZAFFALON L P, ZUMBUEHL A. BODP – A versatile reagent for Phospholipid Synthesis. *Synthesis*, v. 5, p. 778-782, 201.

8. ANEXOS

8.1. Espectros relativos à síntese da *N*-metil hexadecilfosfocolina e hexadecilfosfocolina

Anexo 1. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) - Dicloridrato de fosforohexadecila

Dicloridrato de fosforohexadecila: $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{O}_2\text{Cl}_2\text{P}$, MM 359. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 4,33 ppm; δ 1,80 ppm; δ 1,26 ppm (s, 26H); δ 0,88 ppm (t, 3H).

Anexo 2. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) - 2-(hexadeciloxi)-3-metil-2-oxa-1,3,2-oxazofosfolano

2-(hexadeciloxi)-3-metil-2-oxa-1,3,2-oxazofosfolano: $\text{C}_{19}\text{H}_{40}\text{O}_3\text{NP}$, MM 330. RMN

^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 4,01 ppm; δ 3,84 ppm; δ 3,13 ppm (m, 2H); δ 2,71 ppm (s, 3H); δ 1,67 ppm (m, 2H); δ 1,38 (t, 3H); δ 1,26 ppm (s, 24H); δ 0,88 ppm (t, 3H).

Anexo 3. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) – *N*-metil hexadecilfosfoetanolamina

***N*-metil hexadecilfosfoetanolamina:** $\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{O}_3\text{NP}$, MM 379. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 4,20 ppm; δ 3,87 ppm; δ 3,12 ppm (m, 2H); δ 2,68 ppm (s, 3H); δ 1,62 ppm (m, 2H); δ 1,26 ppm (s, 26H); δ 0,88 ppm (t, 3H).

Anexo 4. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) – Hexadecilfosfocolina

Hexadecilfosfocolina: $\text{C}_{21}\text{H}_{46}\text{NO}_4\text{P}$, MM 407. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 4,41 ppm (s, 2H); δ 4,25 ppm (s, 2H); δ 3,77 ppm (q, 2H); δ 3,34 ppm (s, 9H); δ 2,66 ppm (s, 3H); δ 1,66 ppm (2H); δ 1,26 ppm (s, 26H); δ 0,87 ppm (t, 3H).

Anexo 5. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) – Hexadecilfosfocolina

Hexadecilfosfocolina: $\text{C}_{21}\text{H}_{46}\text{NO}_4\text{P}$; MM 407,57. RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz) δ 66,23 ppm; δ 65,67 ppm; δ 59,21 ppm; δ 54,30 ppm; δ 31,92 ppm; δ 31,01 ppm; δ 29,60 ppm; δ 25,95 ppm; δ 22,67 ppm; δ 14,08 ppm.

Anexo 6. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) – Hexadecilfosfocolina Padrão

Hexadecilfosfocolina: $\text{C}_{21}\text{H}_{46}\text{NO}_4\text{P}$; MM 407,57. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 4,25 ppm (s, 2H); δ 4,02 ppm (s, 2H); δ 3,78 ppm (m, 2H); δ 3,35 ppm (s, 2H); δ 1,56 ppm (s, 2H); δ 1,26 ppm (s, 26H); δ 0,88 ppm (t, 3H).

8.2. Espectros relativos à série das *N*-metil alquilfosfoetanolaminas

Anexo 7. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) –*N*-metil dodecilmfosfoetanolamina

***N*-metil dodecilmfosfoetanolamina:** $\text{C}_{15}\text{H}_{34}\text{O}_4\text{NP}$; MM 323. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 4,18 ppm (m, 2H); δ 3,93 ppm (m, 2H); δ 3,24 ppm (m, 2H); δ 2,62 ppm (d, 3H); δ 1,60 ppm (m, 2H); δ 1,18 ppm (s, 18H); δ 0,80 ppm (t, 3H).

Anexo 9. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) –*N*-metil decilfosfoetanolamina

***N*-metil decilfosfoetanolamina:** $\text{C}_{13}\text{H}_{30}\text{O}_4\text{NP}$; MM 295. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 4,18 ppm (s, 2H); δ 3,91 ppm (m, 2H); δ 3,24 ppm (s, 2H); δ 3,61 ppm (s, 9H); δ 1,59 ppm (s, 2H); δ 1,2 ppm (s, 14H); δ 0,80 ppm (t, 3H).

Caracterização estrutural

Diagram illustrating the structural characterization of a phospholipid molecule, showing the hydrophobic tail (fatty acid chain) and the hydrophilic head (phosphate group and choline derivative).

The molecule is labeled with letters A through M, indicating specific carbon atoms and functional groups:

- A: Methyl group (CH₃) at the end of the hydrophobic tail.
- B, C, D, E, F, G, H, I: Methylene groups (CH₂) in the hydrophobic tail.
- J: Oxygen atom of the ester linkage.
- L: Methylene group (CH₂) adjacent to the phosphate group.
- M: Methyl group (CH₃) attached to the nitrogen atom of the hydrophilic head.

N-metil decilfosfoetanolamina: $C_{13}H_{30}NO_4P$; MM 295. **RMN ^{13}C** ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 67,72 ppm; δ 63,79 ppm; δ 49,33 ppm; δ 49,12 ppm; δ 31,20 ppm; δ 30,43 ppm; δ 30,34 ppm; δ 29,38 ppm; δ 25,37 ppm; δ 22,53 ppm; δ 13,95 ppm.

Anexo 11. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) – *N*-metil octilfosfoetanolamina

***N*-metil octilfosfoetanolamina:** $\text{C}_{11}\text{H}_{26}\text{NO}_4\text{P}$; MM 267. **RMN ^1H** (CDCl_3 , 300 MHz) δ 4,16 ppm (s, 2H); δ 3,93 ppm (s, 2H); δ 3,24 ppm (m, 2H); δ 2,61 ppm (s, 3H); δ 1,59 ppm (s, 2H); δ 1,20 ppm (s, 10H); δ 0,80 ppm (t, 3H).

Anexo 12. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) – *N*-metil octilfosfoetanolamina

***N*-metil octilfosfoetanolamina:** $\text{C}_{11}\text{H}_{26}\text{NO}_4\text{P}$; MM 267. **RMN ^{13}C** (CDCl_3 , 75 MHz) δ 67,63 ppm; δ 63,77 ppm; δ 49,33 ppm; δ 31,75 ppm; δ 31,20 ppm; δ 29,53 ppm; δ 25,48 ppm; δ 22,53 ppm; δ 13,55 ppm.

Anexo 13. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) – *N*-metil hexilfosfoetanolamina

***N*-metil hexilfosfoetanolamina:** $\text{C}_9\text{H}_{22}\text{NO}_4\text{P}$; MM 239. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 4,20 ppm (s, 2H); δ 3,94 ppm (s, 2H); δ 3,25 ppm (m, 2H); δ 2,61 ppm (s, 2H); δ 1,59 ppm (s, 2H); δ 1,23 ppm (s, 6H); δ 0,88 ppm (t, 3H).

Anexo 14. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) – *N*-metil hexilfosfoetanolamina

***N*-metil hexilfosfoetanolamina:** $\text{C}_9\text{H}_{22}\text{NO}_4\text{P}$; MM 239. **RMN ^{13}C** (CDCl_3 , 75 MHz) δ 67,74 ppm; δ 63,83 ppm; δ 49,33 ppm; δ 49,12 ppm; δ 31,22 ppm; δ 30,35 ppm; δ 25,00 ppm; δ 22,39 ppm; δ 13,84ppm.

8.3. Espectros relativos à série das Alquilfosfocolinas

Anexo 15. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) – Dodecilfosfocolina

Dodecilfosfocolina: $\text{C}_{17}\text{H}_{38}\text{NO}_4\text{P}$; MM 351. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 4,25 ppm (s, 2H); δ 3,74 ppm (s, 2H); δ 3,28 ppm (m, 9H); δ 1,56 ppm (s, 2H); δ 1,26 ppm (s, 18H); δ 0,88 ppm (t, 3H).

Anexo 16. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) – Decilfosfocolina

Decilfosfocolina: $\text{C}_{15}\text{H}_{34}\text{NO}_4\text{P}$; MM 323. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 4,25 ppm (s, 2H); δ 4,02 ppm (s, 2H); δ 3,78 ppm (m, 2H); δ 3,35 ppm (s, 2H); δ 1,56 ppm (s, 2H); δ 1,26 ppm (s, 26H); δ 0,88 ppm (t, 3H).

Anexo 17. Espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) – Octilfosfocolina

Octilfosfocolina: $\text{C}_{13}\text{H}_{30}\text{NO}_4\text{P}$; MM 295. RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 4,25 ppm (s, 2H); δ 3,77 ppm (s, 2H); δ 3,34 ppm (m, 7H); δ 1,56 ppm (s, 2H); δ 1,26 ppm (s, 10H); δ 0,88 ppm (t, 3H).