UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Insumos Farmacêuticos

Síntese e estudo da atividade antitumoral de análogos
alcóxicicloalquílicos da miltefosina

Elys Juliane Cardoso Lima

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Carlota de Oliveira Rangel
Yagui

São Paulo
2014

ELYS JULIANE CARDOSO LIMA

Síntese e estudo da atividade antitumoral de análogos
alcóxícicloalquílicos da miltefosina

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Fármaco e Medicamentos.

Área de concentração: Insumos
Farmacêuticos

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Carlota de Oliveira Rangel
Yagui

São Paulo
2014

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

Lima, Elys Juliane Cardoso
L732s Síntese e estudo da atividade antitumoral de análogos
alcóxicicloalquílicos da miltefosina / Elys Juliane Cardoso
Lima. -- São Paulo, 2014.
100p.

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

1. Câncer : Quimioterapia 2. Síntese orgânica 3. Antineoplásicos
I. T. II. Yagui, Carlota de Oliveira Rangel, orientador.

616.994061 CDD

ELYS JULIANE CARDOSO LIMA

Síntese e estudo da atividade antitumoral de análogos
alcóxicicloalquílicos da miltefosina

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof^ª. Dr^ª. Carlota de Oliveira Rangel Yagui

Orientadora/ Presidente

1°. examinador

2°. examinador

São Paulo, _____ de _____.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente à Deus, que é a minha paz, felicidade, alegria, riqueza, escudo, minha maior fortaleza e minha mãe misericordiosa Nossa Senhora de Nazaré que sempre intercedeu por mim.

Aos meus pais e irmã, José Maria Silva Lima, Ercy Cardoso Lima e Ellen Juliana Cardoso Lima, por todo apoio, paciência e por estarem ao meu lado em todas minhas escolhas e conquistas.

Aos meus familiares em especial minha querida tia Iracy Carrêra Cardoso que sempre me inclui nas suas orações e que esteve ao meu lado em todos os momentos.

As minha amigas Drielle Gomes Vital e Rosania Yang e ao meu namorado Fernando de Moura Gatti. Obrigada por todos os ensinamentos, amizade e companheirismos.

A minha orientadora, Professora Doutora Carlota de Oliveira Rangel Yagui, por confiar no meu trabalho, por me passar suas experiências, ensinamentos e pela amizade e paciência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF/USP) pela oportunidade.

Às agências de fomentos, CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo apoio financeiro.

Aos meus amigos e parceiros de trabalho, Rosania Yang, Mariana Frojuello, Natanael Segretti, Thais Fernandes, Joyce Barbosa, Matheus Malta, Lorena Paes, Charles Brito, Maurício Tavares, Fernando de Moura Gatti, Marco Arribas, Juliana Magalhães, Juliana Pachione, Luciana de Moura. Obrigada por todos ensinamentos, amizade e companheirismo.

Aos professores da FCF/USP, em especial a Prof^a. Daniela Basséres e Tatiana Lobo pela realização dos ensaios de citotoxicidade.

*“Cada dia Deus nos dá uma tela nova,
quem escolhe as cores somos nós”*

Frei Elemente Kissumir

RESUMO

LIMA, E. J. C. Síntese e estudo da atividade antitumoral de análogos alcóxicicloalquílicos da miltefosina. 2014. Número de folhas f. 100. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O câncer é uma das principais causas de morte no Brasil e no mundo. É a segunda principal causa de morte, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares, tornando-se um grande desafio para as autoridades de saúde pública. No Brasil, foram estimados aproximadamente 580.000 novos casos para 2014. A capacidade que alguns tumores têm de alcançar outros órgãos faz do câncer uma doença ameaçadora, em que a metástase é responsável por 90% das mortes. A terapia antineoplásica atual baseia-se na quimioterapia, radioterapia ou remoção cirúrgica da massa tumoral. Embora eficazes em muitos casos, os fármacos antitumorais apresentam alta toxicidade, limitando seu amplo emprego. Além disso, as células tumorais podem adquirir resistência a esses compostos. Nesse cenário, as alquilfosfocolinas (APC) surgem como uma classe promissora de agentes antitumorais. O protótipo da classe das APC corresponde à miltefosina, fármaco aprovado clinicamente para o uso tópico de metástases cutâneas de câncer de mama. No entanto, este fármaco apresenta toxicidade gastrointestinal e ação hemolítica. Neste trabalho, realizamos o planejamento e a síntese de análogos alcóxicicloalquílicos da miltefosina, visando compostos com maior atividade citotóxica frente a células tumorais. A síntese foi realizada em quatro etapas, partindo-se de alcoóis previamente sintetizados a partir de dióis simétricos (10-cicloalquilmetoxi-1-decanol). Estes reagiram com oxicloreto de fósforo e, subsequentemente, com a N-metiletanolamina. Por fim, uma etapa de metilação com iodeto de metila resultou nos compostos planejados. Os compostos obtidos foram o 10-cicloexilmetoxi decilfosfocolina e o 10-ciclobutilmetoxi decilfosfocolina que resultaram em um rendimento global de 37% e 29%, respectivamente, e pureza cromatográfica de 98% e 96%, respectivamente. No ensaio de viabilidade celular os compostos obtidos demonstraram menor atividade citotóxica que a miltefosina nas concentrações de 40 μ M, 50 μ M e 60 μ M frente às linhagens celulares H358 e A549. Entretanto, em ensaio de colônia os compostos apresentaram aproximadamente 50% de inibição das células Hela, nas concentrações de 30 μ M, 60 μ M e 100 μ M. Assim é importante que a atividade dos compostos seja investigada frente a outras linhagens celulares tumorais, visto que apresentaram efeitos antiproliferativos, sendo potencialmente promissoras como quimioterápicos.

Palavras-chave: câncer, antineoplásicos, miltefosina, alquilfosfocolinas, síntese de fármacos.

ABSTRACT

LIMA, E. J. C. Synthesis and antitumor activity evaluation of alkoxy cycloalkyl analogues of miltefosine. 2014. Number of pages p. 100. Dissertation (Masters degree) – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2014.

Cancer is a leading cause of death worldwide. It configures alone second leading cause of death, displaced only by cardiovascular disease, a major challenge for public health authorities. In Brazil, around 580,000 new cases are estimated in 2014. The ability of some tumors to reach other organs makes cancer a threatening condition as metastasis is responsible for 90 % of deaths. The antineoplastic therapy is based on the current chemotherapy, radiation therapy or surgical removal of the tumor mass. While effective in many cases, antitumor drugs have high toxicity, what limits their widespread use. Furthermore, tumor cells may acquire resistance to these compounds. In this scenario, the alkylphosphocholine (APC) arise as a promising class of antitumor agents. The prototype of APC class is miltefosine, a clinically approved drug for topical cutaneous metastases of breast cancer. However, this drug shows gastrointestinal toxicity and hemolytic activity. In this work, design and synthesis of alkoxy cycloalkyl analogs of miltefosine, targeting compounds with increased cytotoxic activity against tumor cells. The synthesis was carried out in four stages, starting with alcohols previously synthesized from symmetrical diols (10-cycloalkylmethoxy-1-decanol). These reacted with phosphorus oxychloride and subsequently with N-methylethanolamine. Finally, a step methylation with methyl iodide resulted in the planned compounds. The analogous compounds that have been proposed are 10-cyclohexylmethoxy decylphosphocholine and 10-cyclobutylmethoxy decylphosphocholine, which were obtained with a overall yield of 37% and 29% and had a chromatographic purity of 98% and 96% respectively. Nevertheless, the compounds showed lower cytotoxicity than miltefosine at 40 mM, 50 mM and 60 mM, in the cell viability assay employing A549 and H358 cell lines. However, in the colony assay the compounds showed approximately 50% inhibition of Hela cells at concentrations of 30 μ M, 60 μ M and 100 μ M. Therefore, further biological tests should be performed in order to better investigate the potential of these compounds as novel chemotherapeutic agents.

Keywords: cancer, antineoplastics, miltefosine, alkylphosphocholines, synthesis of drugs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Número de fármacos aprovados pelo FDA em 2012.....	17
Figura 2. Cascata metastática.....	23
Figura 3. Exemplos de agentes citostáticos. (a) doxorrubicina, (b) paclitaxel, (c) fluoruracila, (d) vimblastina.....	27
Figura 4. Estruturas químicas de alquilfosfolipídios sintéticos clinicamente relevantes.....	32
Figura 5. Modelos tridimensionais em tubo da miltefosina, fosfatidilserina (PS) e do difosfato de 4,5-fosfatidilinositol (PIP ₂) (HyperChem 7.5). Os átomos de carbono estão apresentados na cor azul-ciano, os oxigênios em vermelho, os fósforos em amarelo, os hidrogênios em branco e o nitrogênio em azul escuro.....	34
Figura 6. Análogos alquilfosfolipídicos derivados da (a) perifosina e (b) miltefosina apresentando um grupo 4,4-dimetiloxafolidina-3-oxil (doxil) na cadeia alquílica.....	36
Figura 7. Mecanismo proposto para o <i>raft</i> lipídico. A- Conjunto de <i>raft</i> lipídico contendo domínios de diferentes ordens e composições (TM- <i>protein</i> : proteína transmembrana). B- O contato com os alquilfosfolipídios causam o rompimento dos <i>rafts</i> lipídicos, resultando no deslocamento de proteínas do sistema. Os alquilfosfolipídios induzem modificações na membrana plasmática, comprometendo a fluidez e a organização lateral podendo levar à morte celular.....	37
Figura 8. Translocador lipídico.....	38
Figura 9. Cromatograma, a 220nm, do 10-cicloexilmetoxi decilfosfocolina (IX).....	67
Figura 10. Cromatograma, a 220nm, do 10-ciclobutilmetoxi decilfosfocolina (XIII).....	69
Figura 11- Ensaios de citotoxicidade da miltefosina (controle), Composto IX e Composto XIII frente à linhagem de células H358.....	71
Figura 12- Ensaios de citotoxicidade da miltefosina (controle), Composto IX e Composto XIII frente à linhagem de células A549.....	71
Figura 13- Ensaio de inibição celular da miltefosina (controle), Composto IX e Composto XIII frente à cultura de células Hela.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Solventes e reagentes utilizados.....	41
Tabela II. Principais atribuições de RMN ^1H , para o 10-(cicloexilmetoxi)1-decanol (IIIa).....	53
Tabela III. Principais atribuições de RMN ^1H (DMSO, 300MHz) e RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz), para o 10-(benziloxi)1-decanol (I).....	55
Tabela IV. Principais atribuições de RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz), para éter 10-(benziloxi)decilcicloexilmetílico (II).....	57
Tabela V. Principais atribuições de RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz), para éter 10-(benziloxi)decilciclobutilmetílico (VI).....	58
Tabela VI. Principais atribuições de RMN ^1H (DMSO, 300MHz), do intermediário 10- (cicloexilmetoxi)1-decanol (IIIb).....	59
Tabela VII. Principais atribuições de RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz), do intermediário 10- (ciclobutilmetoxi)1-decanol (V).....	60
Tabela VIII. Principais atribuições de RMN ^1H (DMSO, 300MHz), para 10-cicloexilmetoxi decilfosfocolina (IX).....	66
Tabela IX. Principais atribuições de RMN ^1H (DMSO, 300MHz), para 10-ciclobutilmetoxi decilfosfocolina (XIII).....	68
Tabela X. Principais atribuições de RMN ^1H (DMSO, 300MHz), para 10-benziloxi decilfosfocolina (XVII).....	70

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Esquema de obtenção dos análogos alcóxicicloalquílicos.....	40
Esquema 2. Esquema de obtenção direta do 10(cicloexilmetoxi)1-decanol (IIIa).....	44
Esquema 3. Esquema de obtenção indireta do 10(cicloexilmetoxi)1-decanol (IIIb).....	45
Esquema 4. Esquema de obtenção do 10(ciclobutilmetoxi)1-decanol (V).....	47
Esquema 5. Rota Sintética de obtenção do análogo alcóxicicloexilmetílico da miltefosina (IX).....	47
Esquema 6. Rota Sintética de obtenção do análogo alcóxiciclobutilmetílico da miltefosina (XIII).....	49
Esquema 7. Rota Sintética de obtenção do análogo alcóxibenzílico da miltefosina (XVII).....	50
Esquema 8. Esquema de obtenção do 10-(cicloexilmetoxi)1-decanol (IIIa).....	52
Esquema 9. Esquema de monoproteção do 1,10-decanodiol (I).....	54
Esquema 10. Esquema de obtenção dos intermediários éter 10-(benziloxi)decilcicloexilmetílico (II) e do éter 10-(benziloxi)decilciclobutilmetílico (IV).....	56
Esquema 11. Esquema de obtenção dos intermediários 10(cicloexilmetoxi)1-decanol (IIIb) e do 10(ciclobutilmetoxi)1-decanol (V).....	58
Esquema 12. Esquema de obtenção os intermediários VI, X e XIV.....	62
Esquema 13. Esquema de obtenção os intermediários VII, XI e XV.....	63
Esquema 14. Esquema de obtenção os intermediários VIII, XII e XVI.....	64
Esquema 15. Esquema de obtenção os intermediários IX, XIII e XVII.....	65

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1. Câncer.....	19
2.1.1. Desenvolvimento do câncer.....	20
2.1.2. Células tumorais malignas.....	22
2.1.2.1. <i>Metástase</i>	22
2.2. Tratamento do câncer.....	24
2.2.1. Mecanismos de resistência de antineoplásicos.....	27
2.3. Desenvolvimento de novos fármacos e perspectivas.....	29
2.4. Alquilfosfocolinas.....	30
2.4.1. Mecanismo de resistência das alquilfosfocolinas.....	36
3. OBJETIVOS.....	40
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1. Material.....	41
4.1.1. Reagentes e solventes.....	41
4.1.2. Equipamentos.....	42
4.2. Métodos.....	42
4.2.1. Métodos analíticos.....	42
4.2.1.1. <i>Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e Cromatografia de em Coluna (CC)</i>	42
4.2.1.2. <i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear</i>	42
4.2.1.3. <i>Faixa de Fusão</i>	43
4.2.1.4. <i>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE em inglês: High Performance/Pressure Liquid Chromatography- HPLC)</i>	43
4.2.1.5. <i>Espectrometria no Infra-vermelho</i>	43
4.2.2. Métodos sintéticos.....	43
4.2.2.1. <i>Síntese dos análogos alcóxícicloalquílicos</i>	43
4.2.2.1.1. <i>Obtenção do intermediário 10-(cicloexilmetoxi)1-decanol (IIIa e IIIb)</i>	44
4.2.2.1.2. <i>Obtenção do intermediário 10-(ciclobutilmetoxi)1-decanol (V)</i>	46
4.2.2.1.3. <i>Obtenção do análogo alcóxícicloexilmetílico da miltefosina</i>	47
4.2.2.1.4. <i>Obtenção do análogo alcóxíciclobutilmetílico da miltefosina</i>	49
4.2.2.1.5. <i>Obtenção do análogo alcóxibenzílico</i>	50
4.2.2.3. Métodos biológicos.....	50
4.2.2.3.1. <i>Ensaio Biológico de Viabilidade Celular</i>	50
4.2.2.3.2. <i>Ensaio Biológico de Inibição Celular em Colônia</i>	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1. Obtenção direta do 10-(cicloexilmetoxi)1-decanol (IIIa).....	52
5.2. Obtenção indireta do 10-(cicloexilmetoxi)1-decanol (IIIb) e do 10-(ciclobutilmetoxi)1-decanol (V).....	54
5.2.1. Obtenção do intermediário 10-(benziloxi)1-decanol (I) (Monoproteção do 1,10-decanodiol).....	54
5.2.2. Obtenção do éter 10-(benziloxi)decilcicloexilmetílico (II) e éter 10-(benziloxi)decilciclobutilmetílico (IV).....	56
5.2.3. Obtenção do 10-(cicloexilmetoxi)1-decanol (IIIb) e do 10-(ciclobutilmetoxi)1-decanol (V).....	58
5.3. Síntese dos Análogos Alcoxícicloexilmetílico, Alcoxíciclobutilmetílico e Alcoxibenzílico.....	61
5.3.1. Obtenção do dicloridrato de {[10-(cicloexilmetoxi)decil]oxi} de fosfonoila (VI), dicloridrato de {[10-(ciclobutilmetoxi)decil]oxi} de fosfonoila (X) e dicloridrato de {[10-(benziloxi)decil]oxi} de fosfonoila (XIV).....	62

5.3.2. Obtenção dos intermediários 2{[10-cicloexilmetoxi]decil]oxi}-metil-1,2,3 oxazafosfolidina-2ona (VII), 2{[10-ciclobutilmetoxi]decil]oxi}-metil-1,2,3 oxazafosfolidina-2ona (XI), 2{[10-benziloxi]decil]oxi}-metil-1,2,3 oxazafosfolidina-2ona (XV).....	63
5.3.3. Obtenção dos intermediários ácido {[10-(cicloexilmetoxi]decil]oxi}[2-(metilamino)etoxi] fosfínico (VIII), ácido {[10-(cicloexilmetoxi]decil]oxi}[2-(metilamino)etoxi] fosfínico (XII) e ácido {[10-(benziloxi]decil]oxi}[2-(metilamino)etoxi] fosfínico (XVI).....	63
5.3.4. Obtenção dos produtos finais 10-cicloexilmetoxi decilfosfocolina (IX), 10-ciclobutilmetoxi decilfosfocolina (XIII) e 10-benziloxi decilfosfocolina (XVII).....	64
6. CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS	74
ANEXOS	84

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O câncer é um importante problema de saúde pública no mundo todo. Embora as maiores taxas de incidência de câncer sejam encontradas em países desenvolvidos, dos 10 milhões de novos casos identificados a cada ano 5,5 milhões são diagnosticados em países de baixa e média renda devido aos processos de globalização e mudanças de hábitos de vida. Segundo o Ministério da saúde o câncer é a segunda principal causa de morte no Brasil e no mundo, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares. (ACHUTTI, AZAMBUJA, 2004; GUERRA et al., 2005; INCA, 2014).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou em 16 milhões o número de novos casos para o ano de 2020 e 27 milhões para 2030, significando quase o triplo da incidência observada atualmente no mundo. Anualmente, são constatados 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas com a doença. No Brasil, foram estimados, aproximadamente, 580.000 novos casos de câncer para 2014, onde os mais incidentes na população brasileira no próximo ano serão pele não melanoma (182 mil), próstata (69 mil); mama (57 mil); cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil) e estômago (20 mil). Já nos Estados Unidos, espera-se o total de 1,66 milhões de novos casos em 2014 e 585.720 mortes (1.600 por dia) causadas pela enfermidade (IARC, OMS, 2014).

Apesar dos dados apresentados, estudos mostram que as taxas de incidência global de câncer em homens mantiveram-se estáveis no período mais recente, após uma queda de 1,9% ao ano de 2001 a 2005; nas mulheres, as taxas de incidência têm diminuído em 0,6%, anualmente, desde 1998. As taxas de morte diminuíram em todos os grupos raciais/étnicos entre homens e mulheres desde 1998 a 2007. No entanto, este progresso não tem beneficiado todos os segmentos da população, sendo os de menor nível educacional duas vezes mais prejudicados. Neste sentido, a eliminação das disparidades educacionais e raciais poderia ter evitado 37% das mortes prematuras por câncer entre indivíduos de 25 a 64 anos somente em 2007(SIEGEL et al., 2011).

Em muitos países desenvolvidos, o câncer é a principal causa de morte com predominância dos cânceres de pulmão, mama, próstata e cólon. Em países de baixos e médios recursos, os cânceres predominantes são os de estômago,

fígado, cavidade oral, colo do útero e sarcoma de Kaposi, que podem estar associados aos altos índices de alcoolismo, tabagismo e infecções como, por exemplo, por papilomavírus (HPV), vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) ou *Helicobacter pylori* (BRAY et al., 2012; INCA, 2012). O câncer de mama feminino é o único tipo comum a todos os lugares do mundo, independentemente do índice de desenvolvimento humano (IDH). Assim, o controle global do câncer de mama através da detecção precoce e prevenção primária deve ser uma prioridade. O câncer de pulmão e outros cânceres associados ao tabaco, embora não colocados entre os de liderança em regiões de baixo IDH, se tornarão um grave problema se o tabagismo não for controlado. Este tipo de câncer é líder em causas de morte em homens em muitos países e é uma forma comum de morte por câncer em mulheres na América do Norte, partes da Europa e na China (BRAY et al., 2012).

Segundo Bray e colaboradores (2012), o aumento do número de casos de cânceres atualmente está relacionado a mudanças no padrão de reprodutividade, fatores nutricionais e hormonais. Intervenções específicas, como efetivas estratégias de prevenção e detecção primária, vacinas e programas de tratamento efetivos, que englobem o desenvolvimento e financiamento de pesquisas para descoberta de novos fármacos, podem levar à diminuição nos aumentos previstos do número de casos.

O reflexo da busca de antineoplásicos mais eficazes pode ser observado em dados publicados pelo FDA (*Food and Drug Administration*). Entre outubro de 2011 e outubro de 2012 foram aprovados sete novos fármacos antineoplásicos e ampliou-se a utilização de cinco já existentes ao tratamento de outros tumores. Dados apontam que 35% dos fármacos aprovados em 2011- 2012 foram destinados ao tratamento do câncer (FDA, 2012) (Figura 1).

Figura 1. Número de fármacos aprovados pelo FDA em 2012.

Fonte: *Food and Drug Administration*, 2012

Muitos agentes citostáticos usados na terapia antineoplásica atuam no DNA, no citoesqueleto ou no fuso mitótico, inibindo diretamente o desenvolvimento do ciclo celular e, conseqüentemente, acarretando diversos efeitos adversos (CHABNER et al., 2006). Em pesquisas, tornou-se evidente que a membrana plasmática é um compartimento celular envolvido na transdução de sinal e o rompimento dos caminhos de sinalização pelos ativadores de membrana foi descrito como nova alternativa para a quimioterapia. Neste contexto, surge a classe das alquilfosfocolinas, análogos sintéticos de fosfolipídios com elevada estabilidade metabólica que são rapidamente incorporados à membrana celular devido à similaridade com os fosfolipídios naturais representando, assim, candidatos promissores a novos fármacos antineoplásicos (CLIVE et al., 1999; WIEDER et al., 1999).

O grupo das alquilfosfocolinas tem como protótipo a miltefosina ou hexadecilfosfocolina. Este fármaco tem potente atividade citotóxica e citostática frente a diferentes tipos de tumores devido à ação antiproliferativa e à indução de apoptose, observadas para diversos tipos de células tumorais humanas *in vitro* e *in vivo* (EISSA et al., 2012; LEONARD et al., 2001). Além disto, apresenta como diferencial em relação a outros fármacos antitumorais a ausência de ligação ao DNA, o que em geral resulta em toxicidade acentuada (OBERLE et al., 2005). No entanto, o tratamento antitumoral por via oral com miltefosina é dificultado pela toxicidade gastrointestinal, assim como a administração intravenosa leva à ação hemolítica, o que limita seu uso (LINDNER et al., 2008; FIEGL et al., 2007; SEIFERT

et al., 2007; AGRESTA et al., 2003; LEONARD et al., 2001). Considerando-se o potencial da classe dos alquilfosfolipídios como agentes antitumorais e as limitações existentes na farmacoterapia antitumoral, a busca por novos análogos da miltefosina mais potentes e menos tóxicos é de grande interesse.

Papazafiri e colaboradores (2005) demonstraram que a presença de cicloalcanos na porção lipídica da miltefosina pode resultar em aumento de atividade antitumoral e redução do efeito hemolítico. Além disto, a ciclização de estruturas abertas ou a criação de um sistema anelar adicional em uma estrutura estabelecida representa uma alternativa interessante na pesquisa por conformações biologicamente ativas (WERMUTH, 2008). Portanto, neste trabalho investigou-se a síntese e atividade antiproliferativa de análogos alcóxicicloalquílicos da miltefosina potencialmente interessantes para o tratamento de câncer.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Câncer

O câncer é mais bem entendido como um microambiente, em que as interações entre os elementos celulares e moleculares que o compõem são determinantes na progressão tumoral. Como resultado, a compreensão do evento neoplásico ganha complexidade crescente. A dinâmica das células tumorais passa a ser avaliada como parte de um verdadeiro tecido tumoral, sujeita a condições de vascularização, oxigenação, pressão intersticial e de necrose tecidual, que influenciam na cinética tumoral. (ONUCHIC, CHAMMAS, 2010). A etiologia ainda é desconhecida, no entanto acredita-se que existam fatores de risco importantes para o desencadeamento da doença, como fatores genéticos, desequilíbrios hormonais, influências ambientais, idade e estilo de vida (KASAPOVIC et al., 2008; MITCHELL et al., 2006).

Normalmente, as células sofrem processos de mutação espontânea, que não alteram o desenvolvimento normal da população celular. Estes fenômenos incluem danos oxidativos, erros de ação das polimerases e das recombinases e redução e reordenamento cromossômico (INCA, 2002). Células cancerosas são formadas quando as células normais perdem o mecanismo de regulação, que controla o crescimento e a multiplicação. Estas células se tornam nocivas e, geralmente, perdem as características especializadas que distinguem um tipo de célula de outro (por exemplo, uma célula hepática de uma célula sanguínea), processo conhecido como “perda de diferenciação” (PATRICK, 2009). 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 esteroides, o estresse extremo causado por infecções virais ou, ainda, a ocorrência de doenças imunossupressoras (PORTH, MATFIN, 2010).

O organismo humano apresenta-se preparado para reparar os danos celulares. O ciclo celular, por exemplo, apresenta vários mecanismos de defesa que permitem o reparo dessa mutação, bloqueando a propagação da informação genética incorreta a outras células (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, 2012). Sob a ação de agentes promotores, essas células podem passar a se dividir, apresentando perda do controle sobre o ciclo celular e falta de resposta aos sinais apoptóticos, fatores que juntos levarão ao desenvolvimento do câncer (PORTH E MATFIN, 2010).

Muitos tipos de câncer são correlacionados a mutações nos genes p53 e Rb, resultando na ativação ou inativação destes e, conseqüentemente, no descontrole sobre o ciclo celular. Estatísticas recentes sugerem que 50% dos tumores diagnosticados apresentam mutações no gene p53, evidenciando sua importância no processo de regulação do crescimento celular (SIEGEL et al., 2012).

O processo oncogênico pode, ainda, alterar genes responsáveis pela produção de proteínas altamente específicas, que auxiliam no processo de proliferação celular. Exemplos destas são as proteínas RAS e B-RAF, as quais estão envolvidas em uma via de sinalização celular conhecida como MAP-K (*Mitogen Activated Protein Kinase*). Oncogenes levam à superexpressão dessas proteínas, fazendo com que as células estejam constantemente em proliferação. Alguns tipos de tumores, como o melanoma, apresentam com mais frequência essas mutações, que levam à superexpressão de RAS e B-RAF. No entanto, 20% de todos os tumores diagnosticados apresentam mutações que levam à ativação constitutiva de RAS (SIEGEL et al., 2012).

2.1.1. Desenvolvimento do câncer

O processo de desenvolvimento do câncer é denominado carcinogênese e ocorre de forma bastante lenta, pois antes da formação do tumor, o desenvolvimento de uma célula cancerosa passa por muitas etapas, podendo levar vários anos para originar um tumor detectável (ALMEIDA et al., 2005).

Possivelmente, até 30% dos cânceres são causados pelo fumo, enquanto outros 30% estão relacionados à dieta do indivíduo. Substâncias químicas carcinogênicas no cigarro, nos alimentos e no meio ambiente podem causar câncer

pela indução de mutação genética ou interferindo na diferenciação de células normais. O câncer pode ser originado por eventos químicos, normalmente mutagênicos, mas para que o câncer se desenvolva, a exposição a agentes promotores é geralmente requerida (PATRICK, 2009).

Teorias sobre carcinogênese envolvem três etapas: iniciação, promoção e progressão. Na etapa de iniciação, primeiro estágio da carcinogênese, as células sofrem um efeito, direto ou indireto, dos agentes cancerígenos (oncoiniciadores), quando são expostas a essas substâncias durante a replicação do DNA, provocando algumas modificações genéticas precoces. Nesta fase, as células se apresentam geneticamente alteradas não sendo possível, ainda, detectar clinicamente um tumor (MERKLE, 2007).

No segundo estágio da carcinogênese, a promoção, as células geneticamente modificadas são expostas a um segundo grupo de agentes cancerígenos, denominados oncopromotores, que aumentam o seu crescimento. Para que a célula iniciada seja transformada em célula maligna, é necessário um contato longo e contínuo com o agente oncopromotor (por exemplo, hormônios), sendo que a interrupção deste contato, tanto por fatores relacionados ao hospedeiro quanto por fatores relacionados com o tumor, muitas vezes pode cessar o processo neste estágio. Esta fase também é conhecida como o período latente, pois geralmente leva muitos anos para ocorrer. Os oncopromotores podem alterar a função dos genes que controlam o crescimento celular e a duplicação, podem também alterar a comunicação celular e inibir a resposta celular relacionada ao estímulo de crescimento (MITCHELL et al., 2006).

Na progressão, último estágio da carcinogênese, as células alteradas estão em contínua e irreversível proliferação descontrolada, devido à ação de agentes oncoaceleradores. Neste estágio o câncer está instalado, apresentando-se como uma extensa massa tumoral, que evolui até o aparecimento das primeiras manifestações clínicas. No final desta fase pode ocorrer a invasão de tecidos adjacentes e a presença de metástases em regiões distantes do sítio tumoral. (MERKLE, 2007).

2.1.2. Células tumorais malignas

As células tumorais malignas apresentam duas peculiaridades: invasão de tecidos circunvizinhos e comprometimento à distância (metástase), ao passo que tumores benignos se mantêm localizados. Estas são muito mais agressivas do que as células tumorais benignas e, além de apresentarem alterações no perfil de proliferação celular, várias outras alterações podem ser observadas. Essas alterações proporcionam 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 reduzida, comprometimento da comunicação intercelular, alterações do ciclo de vida, produção de enzimas, hormônios e outras substâncias (PORTH, MATFIN, 2010).

Além de contribuírem para a sobrevivência no hospedeiro, as alterações desenvolvidas pelas células cancerígenas são responsáveis por permitirem o deslocamento destas através de vários órgãos e tecidos, configurando o processo de metástase (PORTH, MATFIN, 2010).

O grau de diferenciação do tecido específico tem sido tradicionalmente usado para prever o potencial maligno. A falta de características diferenciadas em uma célula cancerosa é denominada anaplasia, sendo que quanto o maior o seu grau, mais agressivo é o tumor. Anaplasia é indicada pela variação do tamanho e forma das células, mitoses anormais e o surgimento de células gigantes de aparência irregular. Independentemente do aspecto histológico, invasão de tecido local ou evidência de metástases para locais distantes confirmam o diagnóstico de tumor maligno (STRICKER et al., 2007).

2.1.2.1. *Metástase*

A metástase é um processo com múltiplas etapas biológicas distintas que permitem que as células tumorais primárias invadam o tecido circulante e atinjam o sistema linfático ou circulação sistêmica. Essas células adquirem mutações para sobreviver às mudanças nos diferentes ambientes, extravasam da circulação

sanguínea ou linfática para o novo tecido e se proliferam desenvolvendo um novo sistema vascular que suporte o seu crescimento (GIACCIA, ERLER, 2008).

Na cascata metastática, as células tumorais sofrem uma série de alterações, que resultam em pré ou pós-regulação das moléculas de superfície celular, proteases, inibidores de proteases, fatores de motilidade, fatores de estimulação do crescimento e moléculas promotoras de angiogênese. Assim, o desenvolvimento de micro-colônias de células tumorais em um órgão secundário é facilitado pelos fatores de crescimento e os fatores angiogênicos são essenciais para o desenvolvimento de metástases. Metástase é a principal diferença entre tumores malignos e benignos. O mecanismo de invasão e metástase ocorre em etapas sequenciais (Figura 2), podendo ser interrompido a qualquer tempo ou estágio tanto por fatores relacionados ao hospedeiro, quanto por fatores relacionados ao tumor (MITCHELL et al., 2006; MENON, TEICHER, 2002).

Figura 2. Cascata metastática

Fonte: MITCHELL et al., 2006

As células tumorais possuem moléculas de adesão, incluindo a família das glicoproteínas denominadas caderinas, que permitem que as células permaneçam aderidas umas às outras. Essas caderinas podem sofrer uma série de alterações, acarretando em redução da coesão das células tumorais, fazendo com que estas se desprendam uma das outras, se fixando à matriz celular através de receptores de superfície celular. Após a fixação, as células tumorais criam passagens para a sua migração, secretando enzimas proteolíticas para a degradação da matriz extracelular e, assim, atingindo a circulação. Quando atingem a circulação, formam êmbolos pela aglomeração com leucócitos circulante. Esses êmbolos se alojam em um local distante do foco inicial, produzindo crescimento secundário, ou seja, tumor metastático (MERKLE, 2007; MITCHELL et al., 2006).

2.2. Tratamento do câncer

O tratamento do câncer tem evoluído bastante nos últimos anos, não somente pelo desenvolvimento de novos fármacos quimioterápicos, 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).

A Sociedade Americana de Câncer publicou, em 2003, sete sinais de alerta do câncer, como forma de incentivar o público a procurar avaliação precoce, estes são: 1-mudança nos hábitos intestinais ou da bexiga, 2-ferimento que não cicatriza, 3-hemorragias, 4-espessamento ou nódulo na mama ou em outro lugar, 5-indigestão ou dificuldade de engolir, 6-alteração evidente de sinais na pele, 7-tosse persistente ou rouquidão (ACS, 2003)

Atualmente os tratamentos utilizados contra o câncer são: cirurgia, radioterapia, terapia farmacológica, imunoterapia, terapia gênica e molecular e transplante de células tronco. Porém, os pilares do tratamento do câncer ainda se resumem em cirurgia, radioterapia e terapia farmacológica. Estes tratamentos, entretanto, não se ajustam a todos os pacientes, sendo necessária a terapia

associada, na qual a escolha é determinada por diversos fatores como idade do paciente, tipo de câncer e estágio da doença. Qualquer terapia ou todas elas podem ser utilizadas separadamente ou, frequentemente, associadas (em diferentes combinações) com o objetivo de erradicar o câncer (FRASCI et al., 2010; ALMEIDA et al., 2005).

A detecção precoce do câncer está associada a melhor prognóstico para a cura. A cura implica na erradicação de todas as células do câncer no corpo, sendo que a invasão generalizada de múltiplos tecidos e órgãos estão associados a um pior prognóstico e a terapêutica deve ser destinada à diminuição ou palição dos sintomas e não à cura. Em alguns tumores sensíveis a hormônios (por ex. mama e próstata), fármacos bloqueadores hormonais podem ser utilizados (COPSTEAD, BANASIK, 2009). A utilização desses processos envolve o desenvolvimento de um programa cuidadosamente planejado com o auxílio de uma equipe interdisciplinar de especialistas (PORTH, MATFIN, 2010).

O processo cirúrgico tem um papel central no tratamento do câncer, pois muitas vezes é a opção mais eficaz para alcançar a cura. Avanços nas técnicas cirúrgicas e maior compreensão do tumor vêm habilitando cirurgiões para realizar cirurgias de sucesso. Esses avanços também resultaram em um papel mais importante para a cirurgia no tratamento de tumores metastáticos (KING E PRIMROSE, 2003).

A radioterapia é comumente utilizada no tratamento do câncer, sendo um componente do tratamento de mais de 50% dos pacientes acometidos. A intenção primária pode ser radical (ressecção) ou paliativa (controle de sintomas). Diferentes tipos de tumor apresentam, inerentemente, diferentes sensibilidades de radiação que determinam se a radioterapia tem um papel importante no tratamento e qual a dose necessária. Exemplos de tumores sensíveis incluem seminoma (câncer testicular) e linfoma; tumores moderadamente sensíveis: pulmão, mama e carcinomas de células escamosas e tumores muito sensíveis incluem osteossarcoma e melanoma (GWYNNE, STAFFURTH, 2012).

A quimioterapia no tratamento para o câncer é conhecida como quimioterapia antineoplásica e consiste em uma das principais modalidades de tratamento sistêmico para o câncer. Em comparação à cirurgia e radiação, a quimioterapia possibilita que os fármacos alcancem o sítio do tumor e também outros sítios distantes. No entanto, é um tratamento extremamente agressivo e com muitas

reações adversas, sendo passível do surgimento de resistência (COPSTEAD, BANASIK, 2009).

A terapia antineoplásica está em processo de modificações, uma vez que novas estratégias de tratamento têm sido identificadas com o passar dos tempos. Novos fármacos foram introduzidos no mercado para doenças até então intratáveis ou amenizadas apenas com irradiação ou remoção cirúrgica. Atualmente, a quimioterapia convencional e adjuvante é amplamente empregada em conjunto com tratamentos locais para cânceres como o de mama, colo-retal e de pulmão. O arsenal quimioterápico tem se mostrado eficaz para diversos outros tumores e em diversos estágios do seu desenvolvimento, como os cânceres de cabeça e pescoço, sarcomas de tecidos moles, tumores sólidos pediátricos, câncer esofágico, dentre outros (CHABNER et al., 2006).

Os agentes quimioterápicos atualmente adotados na prática clínica incluem fármacos que alteram o ciclo celular em diversos pontos, modificando as funções de crescimento descontrolado característico dessas células. Dentre eles, podem-se citar os agentes alquilantes, cujo mecanismo principal é a alquilação do DNA (ácido desoxirribonucleico); os antimetabólitos, que interferem com o metabolismo do DNA, impedindo sua replicação; os compostos antimitóticos, que se ligam às cadeias de β -tubulina prejudicando a formação do fuso mitótico; os análogos da camptotecina, responsáveis pela ligação e estabilização da topoisomerase-I, inibindo a religação do DNA à enzima e acúmulo de fitas simples de DNA; os antibióticos, com variados mecanismos de ação; as enzimas e os agentes imunológicos (CHABNER et al., 2006).

Muitos tratamentos para o câncer, embora eficazes, estão associados à alta toxicidade devido à sua inespecificidade, colocando órgãos não afetados pelo tumor em risco. A toxicidade limita o emprego dos agentes quimioterápicos e, não raro, reduz as chances de sucesso dos tratamentos (JACOBSON et al., 2009; MEYERS, 2008). Além disso, a aquisição de resistência pelas células tumorais aos agentes quimioterápicos é um dos grandes impedimentos na eficácia da terapia antitumoral. Embora vários mecanismos de resistência tenham sido identificados, a resistência à quimioterapia continua sendo uma das maiores causas de morte em pacientes com câncer (DE VISSER, JONKERS, 2009).

A maioria dos agentes citostáticos usados na terapia antineoplásica atuam intercalando no DNA (ex: doxorrubicina), na organização do fuso mitótico (ex:

vimblastina e taxanos) ou inibindo diretamente o desenvolvimento do ciclo celular (fluoruracila) e a isso se deve a alta toxicidade (WIEDER et al., 1999) (Figura 3).

Figura 3. Exemplos de agentes citostáticos. (a) doxorrubicina, (b) paclitaxel, (c) fluoruracila, (d) vimblastina.

2.2.1. Mecanismos de resistência a antineoplásicos

Um dos maiores obstáculos para o sucesso da quimioterapia no tratamento de alguns tipos de neoplasias é o desenvolvimento, por parte das células tumorais, do fenômeno de resistência aos fármacos utilizados, não havendo resposta ao tratamento em cerca de 90% dos casos de câncer metastático (LONGLEY, JOHNSTON, 2005). São reconhecidos dois tipos de resistência: a intrínseca, quando não há resposta mesmo no primeiro ciclo do tratamento, e a adquirida,

quando surge a partir do segundo ciclo (pós-terapia) (MISTSCHER et. al., 1999; HILL, 1996).

A resistência a múltiplos fármacos (MDR, do inglês *Multi-Drug Resistance*) é um caso de resistência adquirida, observada em células tumorais, *in vivo* e *in vitro*, que consiste na ausência de resposta aos quimioterápicos, tanto àquele que foi utilizado inicialmente, quanto a outros empregados como alternativa. Uma das características mais intrigantes da MDR é que os quimioterápicos envolvidos não têm analogia estrutural nem farmacológica como, por exemplo, a vimblastina, um alcaloide bisindólico, e a doxorubicina, uma antraciclina (Figura 3), (DEWICH, 2009). Este fenômeno de resistência a múltiplos fármacos pode estar relacionado a diversos fatores, que não são plenamente compreendidos. Os principais fatores envolvidos são o transporte do fármaco através da membrana plasmática, alteração nas enzimas-alvo, alteração no metabolismo do fármaco, aumento na capacidade de reparo do DNA e incapacidade para sofrer apoptose. Dentre esses, o primeiro é a principal forma de resistência e está relacionado com a presença de, no mínimo, três bombas que transportam ativamente o quimioterápico para fora da célula (bombas de efluxo) (SZAKACS, et al., 2006).

Linhagens celulares com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos apresentam baixa concentração intracelular do fármaco. Este fato está relacionado à amplificação gênica e/ou ao aumento da expressão de algumas proteínas pertencentes à superfamília ABC (*ATP-binding cassette*), cujo mecanismo de transporte é ATP-dependente. Em células humanas, os genes denominados *mdr1* e *mdr2* foram caracterizados, mas apenas o *mdr1* está envolvido com o fenômeno de resistência a múltiplos fármacos. O resultado da expressão do gene *mdr1* em mamíferos é um tipo de glicoproteína, a glicoproteína-P (P-gp), que utilizando a energia proveniente da hidrólise do ATP, promove o efluxo do quimioterápico. O *mdr2* está envolvido no transporte de fosfatidilcolina (RUETZ, GROS, 1994). Outra proteína transportadora associada ao fenômeno de resistência múltipla é a MRP1. O genoma humano codifica somente duas P-gps, mas contém muitos genes relacionados à MRP1 (BORST et al., 2000). Esta proteína está localizada predominantemente na membrana plasmática de células. Atualmente, várias outras proteínas relacionadas à MRP1, incluindo nove humanas, foram descobertas em eucariotos (LITMAN et al., 2001; HIPFNER et al., 1999). Apesar dos estudos apontarem várias proteínas relacionadas ao fenômeno de MDR, a MRP1, ou

simplesmente MRP, e a glicoproteína-P são as mais importantes e conhecidas proteínas promotoras do efluxo de quimioterápicos (DEELEY, COLE, 1997).

Grandes esforços não foram dispensados para se descobrir fármacos efetivos e capazes de modular a resistência. Estes são chamados de reversores, moduladores da MDR ou, ainda, quimiossensibilizadores. As principais pesquisas estão concentradas na exploração direta do segundo uso de fármacos. Atualmente, moduladores da MDR, baseados na inibição da P-gp estão em fase avançada de estudo. No entanto, existe grande variedade estrutural dos moduladores, assim como os substratos da P-gp, o que torna um desafio o estabelecimento das relações entre a estrutura química e a atividade moduladora. As perguntas tornam-se ainda mais complicadas quando é considerado o fato de que alguns moduladores (verapamil, ciclosporina A, diltiazem, entre outros) se ligam a esta proteína e por ela são transportados, enquanto outros (por exemplo, progesterona), mesmo se ligando a esta proteína e bloqueando o transporte, não conseguem ser transportados por ela (HUBER et al., 2010).

Assim, várias áreas de estudo precisam ser exploradas, destacando-se o conhecimento do alvo, no caso a bomba de efluxo, seu(s) sítio(s) ligante(s); o mecanismo de efluxo e, também, as propriedades físico-químicas e requisitos estruturais importantes para a ação moduladora (HUBER et al., 2010).

2.3. 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).

Várias novas terapias têm sido estudadas e grandes avanços já são observados para o tratamento do câncer. Tem-se como exemplo os anticorpos monoclonais, que são imunoproteínas capazes de reconhecer e ligar-se a antígenos tumorais específicos (alvos), desencadeando respostas imunológicas. Desta forma, poupam as células normais e provocam efeitos menos tóxicos que a quimioterapia. Seu uso na oncologia é relativamente recente, sendo o primeiro (rituximabe) aprovado em 1997 (DEL DEBBIO et al., 2007).

Estudos também se concentram na descoberta de fármacos moduladores da resistência, como já anteriormente citado. As principais pesquisas estão concentradas nos moduladores da MDR, ou seja, fármacos que são utilizados em função de uma atividade farmacológica principal, mas que têm como propriedade secundária a capacidade de reverter o fenômeno MDR. Quando estes fármacos não são empregados diretamente, eles ainda desempenham um papel extremamente importante como protótipos para o desenvolvimento de outros moduladores. Temos como exemplo o verapamil, nimodipino e amiodarona, utilizados como antiarrítmicos; trifluoperazina, como neuroléptico; quinina como antimalárico e a ciclosporina A, um imunossupressor, todos classificados como moduladores de primeira geração. Atualmente, dois moduladores baseados na inibição da P-gp estão em estudo: o elacridar (fase I) e o tariquidar (fase III) (HUBER et al., 2010).

Outra classe de fármacos que revolucionou a terapia do câncer corresponde aos inibidores de proteínas quinases. Essas proteínas estão envolvidas com 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 e a via IRS/PI3K/Akt, ativada por fatores de crescimento (LEMKE, 2012, ZAYTSEVA et al., 2012). O primeiro fármaco aprovado em 2001 com esse mecanismo de ação foi o imatinibe, empregado principalmente para o tratamento da leucemia mieloide crônica (LMC) (Dobbin, 2002). Como exemplo de fármacos já disponíveis, destacam-se os inibidores de EGFR (erlotinibe, gefitinibe e lapatinibe), os inibidores VEGFR (sunitinibe, sorafenibe e pazopanibe), bem como o grupo dos alquilfosfolípidios sintéticos, que se acredita que exerça seu efeito farmacológico sobre proteínas quinases, como a PKC, embora seu mecanismo de ação ainda não esteja totalmente elucidado (VINK et al., 2005).

2.4. Alquilfosfocolinas

Análogos sintéticos da lisofosfatidilcolina (LysoPC) eram amplamente estudados como modificadores da resposta biológica. No final do ano 1960, Hansjörg Eibl substituiu quimicamente o glicerol ligado no C1 (ligação éster) na lysoPC por uma ligação éter e adicionou outro éter, ligando um grupo metil na

posição C2, dando origem ao 1-O-octadecil-2-O-metil-rac-glicero-3-fosfocolina (edelfosina, ET-18-OCH₃) (Figura 4), que foi utilizado, como potente imunomodulador e inibidor eficaz na proliferação celular de tumores (MUNDER et al., 1979; ANDRESEN et al., 1978; EIBL et al., 1967).

O efeito citotóxico da edelfosina foi avaliado frente a uma grande variedade de tumores (leucêmicos e sólidos) e tipos de células normais, e observou-se elevado grau de seletividade em relação às células tumorais (RUITER et al., 1999; RUNGE et al., 1980). Em adição a esta potente atividade antitumoral *in vitro*, edelfosina mostrou-se eficaz *in vivo* em modelos de tumores de ratos (MOLLINEDO et al., 2010). No entanto, a utilização clínica da edelfosina permaneceu limitada (BERDEL et al., 1980), sendo seus dados clínicos relevantes apenas ao tratamento de leucemia aguda (VOGLER et al., 1996).

Um análogo isostérico, a variante tio-éter da edelfosina, 1-hexadeciltio-2-metoxi-metil-rac-glicero-3-fosfocolina (ilmofosina-BM 41.440) mostrou tanto atividade *in vitro* quanto *in vivo* frente a grande variedade de tumores, mas não apresentou atividade clínica em pacientes, devido à toxicidade gastrointestinal elevada, semelhantemente à edelfosina (GIANTONIO et al., 2004; WOOLLEY et al., 1996; GIRGERT et al., 1995; HERMANN et al., 1990).

Em 1980, Eibl e Unger identificaram a hexadecilfosfocolina (miltefosina-HePC) com a ausência do glicerol e definiram como exigência mínima estrutural dos alquifosfolipídios (APL) (EIBL E UNGER, 1990). A miltefosina é a única dos APL que sofre metabolização pelas fosfolipases (UNGER et al., 1989; BREISER et al., 1987). No entanto, exibe potente atividade antitumoral *in vitro* e em alguns modelos tumorais (WANG, 1997; UNGER et al., 1989). A miltefosina tornou-se, então, o protótipo das alquifosfocolinas (APC), derivadas dos APL (VINK et al., 2007).

Figura 4. Estruturas químicas de alquilfosfolipídios sintéticos clinicamente relevantes.

Fonte: VAN BLITTERSWIJK, VERHEIJ, 2012.

É importante ressaltar que devido ao seu efeito hemolítico, a miltefosina não pode ser administrada por via intravenosa, mas sim por via oral ou tópica (KOTTING et al., 1992). Infelizmente, a toxicidade gastrointestinal e a falta de atividade da miltefosina em pacientes com sarcoma avançado de tecido mole, câncer colorretal metastático e carcinoma de células escamosas da cabeça e do pescoço impediram o seu desenvolvimento como um agente anticancerígeno via oral (PLANTING et al., 1993; VERWEIJ et al., 1993).

Quando aplicada topicamente, no entanto, a miltefosina foi eficaz no tratamento de metástases cutâneas de câncer da mama (UNGER et al., 1990). Ensaios clínicos de fase II posteriores confirmaram essas observações e relataram respostas objetivas ao tratamento tópico da miltefosina em pacientes com linfoma cutâneo e metástases de mama e câncer cutâneo (LEONARD et al., 2001;

DUMMER et al., 1993). Além de sua aplicação como agente anticancerígeno, a miltefosina é utilizada por via oral no tratamento contra a leishmaniose visceral (BERMAN, 2006; JHA et al., 1999).

O mecanismo de ação dos APLs ainda não está totalmente elucidado. O efeito citostático da miltefosina foi demonstrado em uma variedade de tumores, por meio de estudos bioquímicos que revelaram uma quantidade considerável de efeitos em enzimas celulares associadas à renovação dos fosfolipídios e à transdução de sinal das membranas celulares, incluindo a inibição da proteína quinase C (PKC, *protein kinase Ca²⁺ dependent*), fosfolipase C e fosfoinositida. As PKCs são serina/treonina quinases envolvidas em vias de transdução celular por meio da fosforilação de diferentes substratos. O subtipo α da PKC está ubiquamente distribuído pelos tecidos de mamíferos. Além do Ca^{2+} e diacilglicerol (DAG), essa isoforma pode ser ativada por diversos outros lipídios como fosfatidilserina, ácidos graxos livres e lisofosfatidilcolina (NELSON, COX, 2004).

O domínio C2 da PCK α está associado, de forma reversível, à bicamada lipídica da membrana celular (GUERRERO-VALERO et al., 2009). Esta porção tem como funções: (a) fosforilação de proteínas de membrana, (b) produção e degradação de segundos mensageiros derivados de lipídios, (c) fusão de vesículas e membranas, (d) sinalização da proteína G pela superfamília de proteínas Ras e (e) constituinte ubíquo da membrana (KOHOUT et al., 2003). A presença de íons Ca^{2+} no citoplasma ativa o domínio C2, que se liga especificamente ao folheto interno da membrana plasmática onde reconhece alvos lipídicos, como fosfatidilserina (PS, *phosphatidyl serine*) e difosfato de 4,5-fosfatidilinositol (PIP₂, *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate*) (LANDGRAF et al., 2008). A cascata de fosforilação imposta pela ativação da PKC tem importante papel na transdução de sinal de fatores de crescimento e proliferação celular (ÜBERALL et al., 1991), portanto, sua modulação é relevante foco de estudos como alvo celular para terapia antineoplásica (GONELLI et al., 2009; JASINSKI et al., 2009; VINK et al., 2007; LIOU et al., 2004).

As alquilfosfocolinas apresentam semelhança estrutural com os substratos endógenos do domínio C2 da PKC α : PS e PIP₂, esta similaridade pode ser observada no modelo tridimensional na Figura 5, onde observa-se a presença da cadeia hidrofóbica representada pelas cores branco e azul-ciano dos átomos de hidrogênio e carbono respectivamente e a parte polar da molécula referente ao

grupo fosfato, representado pelos átomos de oxigênio em vermelho e fósforo em amarelo e o grupo colina tendo o nitrogênio em azul escuro.

Estudos sugerem que a miltefosina interage com a PKC por inibição competitiva com a PS e não-competitiva com Ca^{2+} e este efeito estaria relacionado, pelo menos parcialmente, com os efeitos antineoplásicos da miltefosina e análogos (SHOJI et al., 1991; ÜBERALL et al., 1991). Várias hipóteses foram apresentadas para explicar a atividade antineoplásica da miltefosina e os possíveis modos de ação propostos incluem modulação da permeabilidade de membrana e composição lipídica de membrana, regulação do metabolismo fosfolipídico (p. ex.: inibição da fosfolipase D, inibição da síntese de fosfocolina e esfingomielina, inibição do transporte de colesterol para o retículo endoplasmático), alteração dos caminhos de transdução de sinal referentes à proliferação celular (incluindo interação com PKC, receptores da família Fas, etc), indução de acoplamento da Fas/CD95 em *rafts* lipídicos e indução de apoptose (VAN BLITTERSWIJK E VERHEIJ, 2012; CALOGEROPOULOU et al., 2008; HUANG et al., 2005; LUCAS et al., 2001).

Figura 5. Modelos tridimensionais em tubo da miltefosina, fosfatidilserina (PS) e do difosfato de 4,5-fosfatidilinositol (PIP_2) (HyperChem 7.5). Os átomos de carbono estão apresentados na cor azul-ciano, os oxigênios em vermelho, os fósforos em amarelo, os hidrogênios em branco e o nitrogênio em azul escuro.

A miltefosina é uma molécula anfifílica, ou seja, é constituída por uma porção hidrofílica (grupo fosfocolina) e uma porção hidrofóbica (cadeia alquílica), apresentando capacidade de formar micelas em meio aquoso a uma concentração micelar crítica (CMC) de 2-10 μM (CASTRO et al., 2001). Medidas de espalhamento

de luz realizadas em soluções aquosas deste fármaco anfótero mostraram população homogênea de micelas predominantemente esféricas compostas por cerca de 155 unidades monoméricas (ARAUJO et al., 1979).

Na tentativa de superar a toxicidade gastrointestinal da miltefosina, compostos com modificações, tanto na porção polar quanto na cadeia alquílica, foram sintetizados e avaliados. O octadecil-(*N,N*-dimetil-piperidino-4-il)-fosfato, (perifosina- KRX-0401) (Figura 4), foi obtida pela substituição da porção colina da miltefosina por uma piperidina (HILGARD et al., 1997). Este fármaco foi selecionado para desenvolvimento clínico devido à melhora significativa da tolerância gastrointestinal em ensaios pré-clínicos, principalmente em preparações lipossômicas. Recentemente, iniciaram-se estudos clínicos de fase III com este composto (Aeterna ZENTARIS, 2012). *In vitro*, a perifosina apresentou efeitos antineoplásicos semelhantes ou mais potentes que a miltefosina contra melanoma, câncer do sistema nervoso, pulmão, próstata, colo e mama.

Outra modificação estrutural das APC, visando à melhoria na potência e estabilidade metabólica, foi realizada através da erucilfosfo-*N,N,N*-trimetiletilamônio (erucilfosfoilsfocolina-ErPC) e seu análogo erucilfosfo-*N,N,N*-trimetilpropilamônio (erufosina-ErPC3) (Figura 4), membros mais recentes desta classe (RUBEL et al., 2006). Com uma cadeia de carbono mais longa (22 átomos de carbono) e uma insaturação, atribui-se a essas moléculas menor potencial hemolítico e mielotoxicidade, devido à formação de lamelas ao invés de micelas. Isto resultou em significativas remissões tumorais em gliomas experimentais de ratos e carcinomas de mama, em doses relativamente baixas e com toxicidade gastrointestinal reduzida (DINEVA et al., 2012; ERDLENBRUCH et al., 1996). Além disso, a ErPC3 e ErPC são superiores às outras APC na capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e se acumular no tecido cerebral (HENKE et al., 2009; ERDLENBRUCH et al., 1999).

Mravljak e colaboradores (2005) sintetizaram novos derivados alquilfosfolipídicos com marcadores de spin e compararam as propriedades anfifílicas, hemolíticas e citotóxicas com os respectivos compostos-líderes. Esses novos derivados apresentaram um grupo 4,4-dimetiloxafolidina-3-oxil (doxil) em diferentes posições da cadeia alquílica, diferentemente de outros derivados com marcadores de spin. Segundo os estudos realizados por estes autores, os novos derivados, análogos da perifosina, apresentaram atividade citotóxica, porém esta

atividade variou conforme a linhagem celular e a posição do grupo doxil. Compostos, os quais possuem o grupo doxil no meio da cadeia alquílica apresentaram menor atividade. Quanto mais próximo da cabeça polar, maior a atividade, entretanto, a atividade citotóxica continua baixa quando comparado à perifosina. Por outro lado, o composto com o grupo doxil mais distante da cabeça polar apresentou-se ligeiramente mais potente que a perifosina frente a várias linhagens de células e praticamente isento de atividade hemolítica (MRAVLJAK et al., 2005) (Figura 6).

Figura 6. Análogos alquilfosfolipídicos derivados da (a) perifosina e (b) miltefosina apresentando um grupo 4,4-dimetiloxafolidina-3-oxil (doxil) na cadeia alquílica.

Fonte: MRAVLJAK et al., 2005.

Ainda, 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).

2.4.1. Mecanismo de resistência das alquilfosfocolinas

Independentemente da ação das alquilfosfocolinas (APC) e a via molecular que leva à apoptose, estas devem ser internalizadas pela célula. Essencialmente dois modos de internalização são possíveis: o primeiro é por movimento de trans-bicamada do exterior para o interior do folheto da bicamada lipídica da membrana plasmática, espontaneamente, ou com o auxílio de uma *flippase*, que é uma enzima

transmembrânica, responsável por movimentar fosfolípidos de membrana em condições fisiológicas (dependente de ATP-adenosina trifosfato) (Figura 8). Opcionalmente, as APC podem ser internalizadas por endocitose. Não se tem conhecimento de qual das duas vias é mais importante, no entanto, parece depender do tipo de células. Células linfóides parecem utilizar o mecanismo de *rafts* lipídicos, que são regiões específicas da membrana chamadas de microdomínios de membrana, onde concentram-se além do colesterol, proteínas sinalizadoras e esfingolípídeos. Estes microdomínios estão relacionados com adesão e migração celular (Figura 7), enquanto que em carcinomas o mecanismo principal sugerido é por meio de translocador lipídico (*flippase*) (VAN BLITTERSWIJK, VERHEIJ, 2012).

Figura 7. Mecanismo proposto para o *raft* lipídico. **A-** Conjunto de *raft* lipídico contendo domínios de diferentes ordens e composições (TM-*protein*: proteína transmembrana). **B-** O contato com os alquilfosfolípidios causam o rompimento dos *rafts* lipídicos, resultando no deslocamento de proteínas do sistema. Os alquilfosfolípidios induzem modificações na membrana plasmática, comprometendo a fluidez e a organização lateral podendo levar à morte celular.

Fonte: GOMIDE et al, 2013.

O grau de apoptose induzida por APC, correlaciona-se com o grau de absorção da célula que, por sua vez, está relacionado ao grau de atividade proliferativa e metabólica (ZERP et al., 2008).

Células tumorais e células normais são sensíveis à APC. Esta sensibilidade varia amplamente e pode ser atribuída às diferentes contribuições de mediadores antiapoptóticos, tais como: CDC50a contendo *flippase*, PLC- β 1 e Fas/CD95 (na membrana plasmática), Bcl-2 (em mitocôndrias), caspase 3 e espécies reativas de oxigênio (ROS) (na mitocôndria) (MOLLINEDO et al., 2011; GAJATE et al., 2004; RYBCZYNSKA et al., 2001; VRABLIC et al., 2001). Resistência induzida em carcinoma epidermóide (KB) e em células RAW 264.7 está relacionada com defeitos de alquifosfolípidios (APL) transmembranar dependente de ATP, atividade translocadora (*flippase*) ou um aumento da expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 (CHEN et al., 2011; FU et al., 1999).

Figura 8. Tanslocador lípidico

Fonte: Clark, 2011.

Segundo estudos recentes, células de linfoma de rato S49 resistentes a edelfosina e células S49^{AR}, também resistentes a outros alquifosfolípidios, apresentam danos no DNA e ligação com Fas/CD95. Estas células possuem internalização de APL anulada, diminuição da expressão Fas/CD95 e aumento da

sinalização de ERK/Akt (ALDERLIESTEN et al., 2011; VAN BLITTERSWIJK et al., 2010; VAN DER LUIT et al., 2007). Curiosamente, células S49^{AR} apresentam deficiência de biossíntese de esfingomielina, um dos principais constituintes da camada lipídica, devido à diminuição da expressão de esfingomielina sintase (SMS1). Para explicar como a deficiência de SMS1 bloquearia a internalização APL e tornaria as células resistentes, argumentou-se que a síntese de esfingomielina por SMS1 no Complexo de Golgi é essencial para a formação de novos lípidios e para o tráfego vesicular da membrana plasmática. Desta maneira, os APLs não se acumulariam em *rafts* lipídicos e não seriam internalizados através de endocitose, pois este processo encontra-se bloqueado nas células S49^{AR} resistentes (VAN BLITTERSWIJK et al., 2010).

3. OBJETIVOS

Face ao exposto o objetivo deste trabalho consiste em sintetizar análogos alcóxicicloalquílicos inéditos, derivados do ciclo-butano e cicloexano, e estudar o potencial citotóxico destes análogos em comparação à miltefosina (Esquema 1). Para isso, as seguintes metas específicas são propostas:

- (1) Síntese e caracterização de álcoois *n*-alquilalcóxicicloalquílicos;
- (2) Utilização desses na rota sintética de formação dos compostos análogos à miltefosina;
- (3) Realização de ensaios biológicos *in vitro* para avaliação da ação citotóxica dos compostos sintetizados frente a diferentes linhagens de células tumorais humanas.

Esquema 1- Esquema de obtenção dos análogos alcóxicicloalquílicos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Reagentes e solventes:

Todos os solventes utilizados foram de pureza analítica (P.A.) e devidamente tratados.

Tabela I. Solventes e reagentes utilizados.

Solventes e reagentes
Acetato de etila ($C_4H_8O_2$)
Ácido clorídrico (HCl)
Bromometilcicloexano ($C_7H_{13}Br$)
Bromometilciclo-butano (C_5H_9Br)
Cloreto de benzila (C_7H_7Cl)
Clorofórmio ($CHCl_3$)
Diclorometano (CH_2Cl_2)
<i>N,N</i> -Dimetilformamida (DMF) (C_3H_7NO)
Etanol (C_2H_6O)
Éter de petróleo ($C_5H_{12}O$)
Éter dietílico ($C_4H_{10}O$)
1,10-Decanodiol ($C_{10}H_{20}O_2$)
Hexano (C_6H_{14})
Hidróxido de sódio (NaOH)
Hidreto de sódio (NaH)
Hidróxido de amônio (NH_4OH)
Iodeto de metila (CH_3I)
Metanol (CH_4O)
<i>N</i> -metiletanolamina (C_3H_9NO)
Oxicloreto de fósforo ($POCl_3$)
Paládio/Carbono 5 % (Pd/C)
Sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4)
Tetrahidrofurano (THF) (C_4H_8O)
Tricoloetileno (C_2HCl_3)
Trietilamina ($C_6H_{15}N$)

4.1.2. Equipamentos

- ✓ Agitadores magnéticos (FISATOM e IKA);
- ✓ Mantas com agitação (FISATOM);
- ✓ Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) modelo Advance, DPX300 (BRUKER);
- ✓ Evaporador rotatório modelo R-215 (BÜCCHI);
- ✓ Bomba de vácuo modelo 1-C48 (EDWARDS);
- ✓ Equipamento para ponto de fusão (BÜCCHI), modelo M-565;
- ✓ Modelo de HPLC (*High Performance/Pressure Liquid Chromatography*)- Merck Hitachi Lachrom; operado pelo software *LC Solution*;
- ✓ Espectrofotômetro de ultravioleta- Shimadzu-UV-1800;
- ✓ Infravermelho modelo Bruker Alpha.

4.2. Métodos

4.2.1. Métodos analíticos

4.2.1.1. *Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e Comatografia em coluna (CC)*

Para as análises de cromatografia em camada delgada (CCD) foram empregadas cromatoplasas de sílica (Silica-gel 60 F254-Merck) e a revelação realizada com vanilina.

Para os processos de purificação por coluna cromatográfica empregou-se sílica-gel (60-230 mesh, Merck).

4.2.1.2. *Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear*

As análises de espectroscopia de ^1H e ^{13}C foram realizadas em espectrômetro de 300 MHz modelo Advance, DPX300, operando em 300 MHz (^1H) e 75 MHz (^{13}C), disponível no Departamento de Farmácia da FCF- USP.

4.2.1.3. Faixa de Fusão

A faixa de fusão foi determinada em triplicata, em aparelho para fusão capilar, modelo M565, disponível no Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos da FCF- USP para verificação do grau de pureza e caracterização dos compostos.

4.2.1.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE em inglês: High Performance/Pressure Liquid Chromatography- HPLC)

Os cromatogramas foram obtidos empregando-se coluna analítica Gemini C18, 150 mm x 2.0 mm I.D., tamanho das partículas 5 µm; Phenomenex. A fase móvel **A** consistiu em 10 µM de NH₄OH em água e a fase móvel **B** em 10 µM de NH₄OH em metanol na proporção de **A:B**= 5:95 (v/v). O fluxo foi de 3 mL por minuto, volume de injeção 10 µL e o comprimento de onda 220nm (DORLO et al. 2008). A análise foi realizada na Central Analítica do Departamento de Farmácia da FCF- USP.

4.2.1.5. Espectrometria no Infra-vermelho

A técnica utilizada foi ATR-FTIR (*Attenuated total reflectance Fourier transform infrared*), com comprimento de onda de 600- 4000 cm⁻¹.

4.2.2. Métodos sintéticos

4.2.2.1. Síntese dos análogos alcóxicicloalquílicos

A rota sintética de obtenção destes compostos foi realizada através da obtenção inicial do 10-(cicloexilmetoxi)1-decanol, 10-(ciclobutilmetoxi)1-decanol e 10-(benziloxi)1-decanol sendo estes posteriormente utilizados na rota sintética descrita para a miltefosina (MacDonald et al., 1991), em substituição ao hexadecanol.

4.2.2.1.1. Obtenção do intermediário 10-(cicloexilmetoxi)1-decanol (IIIa e IIIb)

O intermediário 10-(cicloexilmetoxi)1-decanol foi obtido por dois métodos: via síntese direta (IIIa), a partir do 1,10-decanodiol ou via síntese indireta (IIIb), através da monoproteção do álcool e posterior adição do grupo cicloalquílico.

A síntese direta do intermediário IIIa foi realizada conforme descrito por Papanastasiou *et al.*, (2010) (Esquema 2).

Esquema 2- Esquema de obtenção direta do 10-(cicloexilmetoxi)1-decanol (IIIa).

a) Obtenção direta do 10-(cicloexilmetoxi)1-decanol (IIIa): Suspendeu-se 1,1 mmol de NaH em 5 mL de DMF e adicionou-se 1 mmol de 1,10-decanodiol permanecendo sob agitação por 2 h. Em seguida adicionou-se à mistura reacional 1 mmol de bromometilcicloexano (0,14 mL) em 5 mL de DMF, gota a gota, permanecendo sob agitação por 6 dias. Após acidificação do meio com solução de HCl 5% procedeu-se à extração líquido-líquido através da adição de hexano/acetato de etila (3:1) e em seguida, nova extração com água. O extrato obtido foi seco com Na₂SO₄ anidro e, após remoção deste por filtração, evaporou-se o excesso de solvente sob pressão reduzida. O produto obtido foi purificado por meio de cromatografia em sílica-gel (coluna cromatográfica de 20 x 2,3 cm), utilizando-se como fase móvel hexano/acetato de etila (3:1).

A síntese indireta do intermediário IIIb, via monoproteção do 1,10-decanodiol, foi realizada de acordo com Agresta *et al.* (2003) e encontra-se descrita a seguir:

Esquema 3- Esquema de obtenção indireta do 10-(cicloexilmetoxi)1-decanol (IIIb).

a) Obtenção do 10-(benziloxi)1-decanol (I): Suspenderam-se 2,2 mmol de NaH em 35 mL de DMF e gotejaram-se 2 mmol de 1,10-decanodiol solubilizado em 10 mL de DMF. Após agitação a 50 °C, por 2 h, resfriou-se a mistura à temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se, gota a gota, 1 mmol de cloreto de benzila (0,12 mL) e deixou-se a mistura reacional sob agitação por 24 h à temperatura ambiente. Após acidificação do meio com solução de HCl 5%, procedeu-se à extração líquido-líquido através da adição da mistura de hexano/acetato de etila (3:1) e, em seguida, nova extração com água. O extrato obtido foi seco com Na₂SO₄ anidro e, após remoção deste por filtração, evaporou-se o excesso de solvente sob pressão reduzida. O composto obtido foi purificado por meio de cromatografia em sílica-gel (coluna cromatográfica de 20 x 2,3 cm), utilizando-se como fase móvel hexano/acetato de etila (3:1).

b) Obtenção do éter 10-(benziloxi)decilcicloexilmetílico (II): Suspenderam-se 2,2 mmol de NaH em 25 mL de THF e gotejaram-se 2 mmol (0,528 g) do 10-(benziloxi)1-decanol (I) solubilizado em 5 mL de THF. Após agitação a 50 °C por 2 h resfriou-se a mistura à temperatura ambiente. Em seguida adicionaram-se, gota a gota, 4 mmol de bromometilcicloexano (V=0,56 mL) e deixou-se a mistura reacional sob agitação por 24 h à temperatura ambiente. Após acidificação do meio com solução de HCl 5%,

procedeu-se à extração líquido-líquido através da adição da mistura de hexano/acetato de etila (4:1) e, em seguida, nova extração com água e a mesma fase orgânica empregada anteriormente. O extrato obtido foi seco com Na_2SO_4 anidro e, após remoção deste por filtração, evaporou-se o excesso de solvente sob pressão reduzida. O composto obtido foi purificado por meio de cromatografia em sílica-gel (coluna cromatográfica de 20 x 2,3 cm), utilizando-se como fase móvel hexano/acetato de etila (4:1).

c) Obtenção do 10-(cicloexilmetoxi)1-decanol (IIIb): Esta etapa foi realizada sob atmosfera inerte. Em um balão de duas bocas totalmente fechado, adicionou-se gás nitrogênio tratado com H_2SO_4 . O sistema foi aquecido durante 20 minutos. Em seguida, transferiu-se 1 mmol de 10-(benziloxi)decilcicloexilmetílico (II) (0,36g) em 5 mL de etanol para o balão de duas bocas, o qual permaneceu em repouso sob atmosfera inerte por 1 h para secagem da amostra. Após este período, o gás hidrogênio foi adicionado ao meio reacional e em seguida o catalisador Pd/C 5%. A reação de hidrogenação foi mantida por 3 horas à temperatura ambiente e em atmosfera de H_2 . Ao fim, a mistura reacional foi filtrada sob pressão reduzida empregando-se celite 545 (Sigma-Aldrich), lavou-se com acetato de etila e evaporou-se o solvente sob pressão reduzida. O produto foi purificado por meio de cromatografia em sílica-gel (coluna cromatográfica de 20 x 2,3 cm), utilizando-se como fase móvel hexano/acetato de etila (3:1). O composto (IIIb) obtido foi então utilizado como material de partida para a síntese do análogo alcóxicicloalquílico da miltefosina.

4.2.2.1.2. Obtenção do intermediário 10-(ciclobutilmetoxi)1-decanol (V)

O intermediário 10-(ciclobutilmetoxi)1-decanol foi também obtido pela metodologia descrita por Agresta et al. (2003) e encontra-se descrito no item 4.2.2.1.1 em substituição ao bromometilcicloexano, onde utilizou-se 4 mmol de bromometilciclo-butano (0,45 mL) e na etapa seguinte 1 mmol do éter 10-(benziloxi)decilciclobutilmetílico (IV) (0,33 mL). O esquema reacional encontra-se abaixo:

Esquema 4- Esquema de obtenção do 10-(ciclobutilmetoxi)1-decanol (V).

4.2.2.1.3. Obtenção do análogo alcóxicicloexilmetílico da miltefosina

Para obtenção do análogo planejado, foi utilizada a rota sintética descrita na literatura para a síntese da miltefosina (MacDonald et al., 1991), empregando-se o intermediário IIIb como reagente de partida. O procedimento experimental foi realizado de acordo com o esquema 5 descrito a seguir:

Esquema 5: Rota sintética de obtenção do análogo alcóxicicloexilmetílico da miltefosina (IX).

a) Obtenção do dicloridrato {[10-(cicloexilmetoxi)decil]oxi} de fosfonoila (VI): Foi dissolvido 0,92 g (6 mmol) de oxicloreto de fósforo em 5 mL de hexano sob agitação, em banho de gelo. Adicionou-se lentamente 0,61 g (6 mmol) de trietilamina dissolvida em 10 mL de tricloroetileno, mantendo-se a agitação e resfriamento. Em seguida, gotejou-se no meio reacional uma solução do 10-(cicloexilmetoxi)1-decanol (IIIb) (4 mmol em 30 mL de tricloroetileno), permanecendo por 30 minutos. A formação do intermediário VI resultou na precipitação do cloridrato de trietilamina, e a conversão completa foi confirmada pelo desaparecimento da mancha do intermediário IIIb na cromatografia em camada delgada empregando-se como fase móvel a mistura de solventes éter de petróleo/éter dietílico/metanol 70:20:10 (v/v/v). Procedeu-se à filtração da mistura reacional para remoção do cloridrato de trietilamina precipitado e, em seguida, partiu-se com o produto ainda em solvente para a próxima etapa.

b) Obtenção do 2{[10(cicloexilmetoxi)decil]oxi}-metil-1,2,3-oxazafosfolidina-2-ona (VII): Preparou-se uma solução contendo 0,33 g (4,4 mmol) de *N*-metiletanolamina e 1,47 g (14,5 mmol) de trietilamina em 10 mL de tricloroetileno. Gotejou-se esta solução naquela proveniente da primeira etapa contendo o intermediário VI, sob agitação, resfriamento em banho de gelo permanecendo 30 minutos. A reação foi monitorada por cromatografia em camada delgada empregando-se como fase móvel a mistura de solventes éter de petróleo/éter dietílico/metanol 70:20:10 (v/v/v). Procedeu-se com a filtração da mistura reacional para remoção do cloridrato de trietilamina precipitado e, em seguida, remoção do excesso de solvente por evaporação sob pressão reduzida.

c) Obtenção do ácido{[10-(cicloexilmetoxi)decil]oxi}[2-(metilamino)etoxi]fosfínico (VIII): Ao produto da etapa anterior (composto VII) adicionou-se uma solução de 30 mL de acetona e 3 mL de água à temperatura ambiente, mantendo-se a mistura em agitação. Após 2 horas, interrompeu-se a reação e removeu-se o excesso de solvente sob pressão reduzida. Em seguida, adicionou-se clorofórmio gelado para extração da fase orgânica e remoção da água. O excesso de solvente foi removido sob pressão reduzida, obtendo-se assim o intermediário VIII.

d) Obtenção do produto final 10-cicloexilmetoxi decilfosfocolina (IX): À solução do intermediário VIII, em 30 mL de metanol contendo 0,2 g de NaOH (5 mmol), adicionaram-se 2,28 g (16 mmol) de iodeto de metila. A reação se completou após 24 h sob agitação, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Essa etapa foi monitorada pela fase móvel composta de diclorometano/metanol/ NH_4OH 25% (75:22:3) (Zaffalon et. al, 2011). O excesso de solventes e reagentes foram removidos sob pressão reduzida. Em seguida foi realizada purificação sólido-líquido, onde foram feitas 5 solubilizações com metanol para precipitação das possíveis impurezas, sendo filtrado e evaporado entre cada solubilização. Por fim o produto foi submetido às análises para caracterização das moléculas.

4.2.2.1.4. Obtenção do análogo alcóxiciclobutilmetílico da miltefosina

Para obtenção deste análogo, foi utilizada a rota sintética proposta por MacDonald et al. (1991), empregando-se o 10-(ciclobutilmetoxi)1-decanol (V) como reagente de partida. O procedimento experimental foi realizado de acordo com o descrito no item 4.2.2.1.3 e encontra-se no esquema a seguir:

Esquema 6: Rota sintética de obtenção do análogo alcóxiciclobutilmetílico da miltefosina (XIII).

4.2.2.1.5. Obtenção do análogo alcóxicibenzílico

Na busca por novos análogos alquilfosfocolínicos, o intermediário I da rota de obtenção do 10-(cicloexilmetoxi)1-decanol (IIIb), correspondente ao 10-(benziloxi)1-decanol (I), também foi empregado como reagente de partida na rota sintética da miltefosina, conforme representado abaixo. O procedimento experimental foi semelhante ao descrito no item 4.2.2.1.1.

Esquema 7: Rota sintética de obtenção do análogo alcóxibenzílico da miltefosina (XVII).

4.2.3. Métodos biológicos

Os ensaios biológicos foram realizados em colaboração com a Profa. Daniela Sanchez Bassères, do Instituto de Química da USP.

4.2.3.1. Ensaio Biológico de Viabilidade Celular

O ensaio biológico foi determinado pelo método de Mosmann (1983)

a) Linhagens celulares:

- A549: Adenocarcinoma pulmonar (LIEBER et al., 1976).
- H358: Carcinoma bronquioalveolar pulmonar humano (GAZDAR et al., 1990).

b) Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares:

As células A549 ($5,0 \times 10^3$ células/mL) e H358 ($1,0 \times 10^4$ células/mL) foram cultivadas em placas de 96 poços, em meio RPMI (*Instituto Roswell Park Memorial*), suplementado com 10% de soro fetal bovino, bicarbonato de sódio (0,2 g/L), pH 7,2. A atividade citotóxica foi investigada pela adição de diferentes concentrações de miltefosina, análogo alcóxiciclobutilmetílico e análogo alcóxicicloexilmetílico (5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M, 50 μ M e 60 μ M). Ao final do tratamento (72 horas), foram adicionados 25 μ L de uma solução de MTT (Brometo de 3,4,5-dimetilazol-2,5-difeniltetrazolium) 5 mg/mL em RPMI por 2 horas a 37°C com uma atmosfera de 5% de CO₂. Ao final dessa incubação, o meio de cultura foi retirado cuidadosamente para não danificar a monocamada e 100 μ L de DMSO foi adicionado em cada poço. A leitura foi realizada em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 490 nm. Foram realizadas quaduplicadas de cada concentração dos diferentes compostos analisados.

4.2.3.2. Ensaio Biológico de Inibição Celular em Colônia

a) Linhagem celular:

- Hela: Carcinoma epidermóide de colo do útero

As células foram plaqueadas em placa de 60 mm à confluência de 500 células por placa. Utilizou-se atmosfera de 95% de O₂ e 5% CO₂, à temperatura de 37°C, em meio de cultura apropriado, na ausência e na presença de miltefosina, Composto A e Composto B nas concentrações de 30 μ M, 60 μ M e 100 μ M. O meio foi trocado periodicamente e a cultura foi mantida até o aparecimento de colônias macroscópicas. Essas colônias foram fixadas com metanol e coradas com solução cristal violeta. As placas foram fotografadas e a quantificação do número de colônias formadas feita manualmente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção direta do 10-(cicloexilmetoxi)1-decanol (IIIa)

Esquema 8- Esquema de obtenção do 10-(cicloexilmetoxi)1-decanol (IIIa).

A princípio, iniciamos pela síntese do intermediário III, 10-(cicloexilmetoxi)1-decanol, pela tentativa de reação direta entre o 1,10-decanodiol e o bromometilcicloexano (Papanastasiou et al., 2010). A segunda metodologia utilizada foi proposta por Agresta e colaboradores (2003) e envolve a monoproteção do 1,10-decanodiol com cloreto de benzila, para posterior adição do grupamento cicloalquilmetílico. Entretanto, o cloreto de benzila apresenta toxicidade considerável, o que também justifica a tentativa da síntese direta. Os reagentes de partida utilizados nessa reação foram caracterizados por RMN de ^1H para auxiliarem na análise dos compostos obtidos (Anexos 1, 2 e 3).

A reação direta foi realizada conforme a metodologia descrita por Papanastasiou et al. (2010). Inicialmente, o 1,10-decanodiol atua como um ácido fraco e reage com o hidreto de sódio (NaH) formando um alcóxido. Em seguida, adicionou-se o bromometilcicloexano para formação do éter. A formação do produto foi evidenciada por CCD com Rf 0,5, empregando-se hexano/acetato de etila (3:1) como fase móvel e revelação em vanilina, observando-se também a formação de subproduto referente à dissustituição no 1-10 decanodiol com Rf 0,9. O produto foi purificado por meio de cromatografia em sílica-gel empregando-se hexano: acetato de etila (3:1) como fase móvel e caracterizado por espectrometria de RMN de ^1H . **10(cicloexilmetoxi)1-decanol (IIIa):** RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz): δ 3,64 ppm (t, 2H, $J=6,3\text{Hz}$), 3,37 ppm (t, 2H, $J=6,7\text{ Hz}$), 3,19 ppm (d, 2H, $J=6,6\text{ Hz}$), 1,73 ppm (t, 4H, $J=13,2\text{ Hz}$), 1,55 ppm (t, 4H, $J=13,7\text{ Hz}$), 1,29-1,18 ppm (m, 19H) (Anexo 4).

A formação do composto desejado foi evidenciada pelo deslocamento do hidrogênio em 3,64 ppm que apresentou integral para 2H (Anexo 4), diferente do

deslocamento do hidrogênio em 3,63 ppm do 1,10-decanodiol que apresenta no uma integral para 4H, os sinais em 3,37 ppm e 3,19 ppm que foram gerados pelo deslocamento de hidrogênios na formação do éter e não estão presentes na análise espectrométrica do 1,10-decanodiol e a faixa do deslocamento em 1,29-1,18 ppm correspondem aos acoplamentos dos hidrogênios da cadeia carbônica com o cicloexano, gerando um multipletto correspondente a 19 H (Anexo3 e 4).

A seguir são evidenciadas as principais atribuições de RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz), para o 10-(cicloexilmetoxi)1-decanol (IIIa), (Tabela II).

Tabela II. Principais atribuições de RMN ^1H , para o 10-(cicloexilmetoxi)1-decanol (IIIa):

	H	Multiplicidade / J	Δ
Ha	2H	tripletto/ 6,3 Hz	3,64 ppm
Hb	2H	tripletto/ 6,7 Hz	3,37 ppm
Hc	2H	dupletto/ 6,6 Hz	3,19 ppm
Hd	19H	multipletto	1,29-1,18 ppm

O produto obtido foi um líquido de aspecto oleoso e amarelado, com rendimento de 3%. Acredita-se que este baixo rendimento está relacionado às dificuldades da reação seletiva em um diol simétrico. Esta substituição seletiva em uma das hidroxilas torna-se algo difícil, devido à grande cadeia carbônica que separa uma hidroxila da outra, fazendo com que estas se comportem como grupos independentes, favorecendo a formação do produto dissustituído. Além disso, por tratar-se de uma $\text{S}_{\text{N}}2$ (Substituição nucleofílica bimolecular), o nucléofilo ataca o centro de menor densidade eletrônica pela retaguarda e para que isso aconteça, em velocidades máximas e menor tempo, esta região do substrato deve estar livre de grupos volumosos. O baixo rendimento também pode estar relacionado ao fato do bromometilcicloexano (substrato) possuir em sua estrutura um grupo volumoso (cicloexano) provocando um decréscimo na velocidade da reação.

De acordo com os resultados obtidos da síntese direta do intermediário IIIa, esta metodologia não se mostrou adequada devido ao elevado tempo de reação (6 dias) e baixo rendimento (3%). Portanto a metodologia descrita por Agresta e colaboradores (2003), baseada na monoproteção inicial do diol, foi escolhida.

5.2. Obtenção indireta do 10-(cicloexilmetoxi)1-decanol (IIIb) e do 10-(ciclobutilmetoxi)1-decanol (V)

Para a via indireta de obtenção do 10-(cicloexilmetoxi)1-decanol (IIIb) e do 10-(ciclobutilmetoxi)1-decanol (V), 3 etapas foram realizadas: a) monoproteção do 1,10-decanodiol empregando-se cloreto de benzila; b) adição do grupo cicloexilmetílico e do ciclobutilmetílico; c) desproteção dos álcoois para obtenção do 10-(cicloexilmetoxi)1-decanol (IIIb) e 10-(ciclobutilmetoxi)1-decanol (V).

5.2.1. Obtenção do intermediário 10-(benziloxi)1-decanol (I) (Monoproteção do 1,10-decanodiol)

Esquema 9: Esquema de Monoproteção do 1,10-decanodiol (I).

A etapa referente à monoproteção do 1,10-decanodiol com cloreto de benzila foi realizada com sucesso, resultando no rendimento de 56%. A reação foi acompanhada por CCD empregando-se como fase móvel hexano/acetato de etila (3:1), sendo observado um $R_f = 0,5$ para o produto e $R_f = 0,9$ para o derivado dissustituído, subproduto da reação. Após purificação, o produto foi confirmado por análise de RMN de ^1H e ^{13}C . **10-(benziloxi)1-decanol (I):** RMN ^1H (DMSO, 300 MHz): δ 7,34-7,28 ppm (m, 5H), 4,44 ppm (s, 2H), 3,42-3,38 ppm (m, 4H), 3,30 ppm (s, 2H), 1,51 ppm (t, 2H, $J = 6,4$ Hz), 1,39 ppm (t, 2H, $J = 6,4$ Hz), 1,25 ppm (s, 12H) (Anexo 5). RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz): δ 138,75 ppm, 128,32 ppm, 127,60 ppm, 127,44 ppm, 77,44 ppm, 77,01 ppm, 76,59 ppm, 72,85 ppm, 70,53 ppm, 63,05 ppm, 32,80 ppm, 29,75 ppm, 29,49 ppm, 29,43 ppm, 29,38 ppm, 26,17 ppm, 25, 72 ppm (Anexo 6).

A formação do 10-(benziloxi)1-decanol (I), intermediário monoprotetido, foi comprovada pelos deslocamentos em 7,34-7,28 ppm referente aos hidrogênios do anel aromático, pelo multiplete 4,42- 3,38 ppm (m, 4H) referentes aos sinais **c** e **d** que na análise utilizando DMSO deuterado apresentaram-se sobrepostos (Anexo 5) e o sinal em 4,44 ppm (s, 2H), que caracteriza a formação do éter (Anexo 2). O sinal em 3,30 ppm refere-se à água, provavelmente presente no solvente DMSO deuterado.

Na análise de espectrometria de RMN de ^{13}C , os sinais importantes obtidos pelos deslocamentos químicos gerados pela formação do produto (I) foram observados em 138,75 ppm referente carbono pertencente ao anel aromático, 63,05 ppm referente à presença do carbono vizinho à hidroxila, o que comprova ser o composto mono-substituído e não o dissustituído, e os sinais em 72,85 ppm e 70,53 ppm referentes ao deslocamento dos carbonos ligados ao oxigênio, comprovando a formação do éter (Tabela III).

Tabela III. Principais atribuições de RMN ^1H (DMSO_3 , 300MHz) e RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz), para o 10-(benziloxi)1-decanol (I):

	H	Multiplicidade/J	δ
H_a	5H	multiplete	7,34-7,28 ppm
H_b	2H	singleto	4,44 ppm
H_{c,d}	4H	multiplete	3,42-3,38 ppm
C_b	—	—	72,85 ppm
C_c	—	—	63,05 ppm
C_d	—	—	70,53 ppm
C_e	—	—	138,75 ppm

Inicialmente, esta etapa consistiu em uma reação ácido-base, em que o 1,10-decanodiol atua como um ácido fraco sendo capaz de reagir com hidreto (NaH) formando um alcóxido. A reação permaneceu sob agitação constante durante 2 h e em seguida, foi adicionado o cloreto de benzila para formação do éter, por meio de

uma reação tipo S_N2 , o que implica que para maiores rendimentos o tempo reacional deve ser avaliado cuidadosamente, já que o substrato possui um grupo volumoso (anel benzênico) em sua estrutura, o que torna a reação mais lenta. Entretanto, diferentemente do bromometilcicloexano, o substrato desta etapa, cloreto de benzila é muito mais reativo devido à presença do anel aromático, o que acarretou em um rendimento de 56%. Valores superiores de rendimento não foram alcançados devido às dificuldades da reação seletiva em um diol simétrico de cadeia alquílica longa, levando à formação concomitante do subproduto dissustituído. Assim, estima-se que um estudo relacionado ao tempo da reação (aumento) e variação das proporções dos reagentes possa levar a um aumento considerável no rendimento desta etapa.

5.2.2. Obtenção do éter 10-(benziloxi)decilcicloexilmetílico (II) e éter 10-(benziloxi)decilciclobutilmetílico (IV)

Esquema 10: Esquema de obtenção dos intermediários éter 10-(benziloxi)decilcicloexilmetílico (II) e do éter 10-(benziloxi)decilciclobutilmetílico (IV)

Nesta etapa, procederam-se à adição do grupo bromometilcicloexano e bromometilciclobutano ao intermediário monoprottegido (I), obtendo-se o intermediário II com rendimento de 68% e o intermediário IV com rendimento de 53%. O mecanismo da reação envolveu novamente a formação de alcóxido devido ao uso de NaH e, em seguida, formação do éter. A reação foi acompanhada por CCD empregando-se hexano/acetato de etila (4:1) como fase móvel, sendo observado um $R_f = 0,3$ para o composto (I), $R_f = 0,7$ para o produto (II) e um $R_f = 0,5$ para o produto (IV). Após purificação de ambos, a confirmação dos produtos foi feita por análise de RMN de ^1H . **éter 10-(benziloxi)decilcicloexilmetílico:** RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): δ 7,33-7,24 ppm (m, 5H), 4,49 ppm (s, 2H), 4,05 ppm (t, 2H, J=

6,7 Hz), 3,46 ppm (t, 2H, J= 6,6 Hz), 3,27 ppm (d, 2H, J= 6,4 Hz), 1,26-1,01 ppm (m, 27H) (Anexo 7). **éter 10-(benziloxi)decilciclobutilmetílico: RMN ^1H** (CDCl_3 , 300 MHz): δ 7,33 ppm (m, 5H), 7,19 ppm (CDCl_3), 4,42 ppm (s, 2H), 4,06 ppm (s, 2H), 3,36 ppm (t, 2H, J=6,6 Hz), 2,23 ppm (d, 6H, J=6,4 Hz), 1,19 ppm. (Anexo 8).

A formação do éter 10-(benziloxi)decilcicloexilmetílico (II) foi evidenciada pelos mesmos sinais de deslocamentos dos hidrogênios do álcool monoprotetido (I) na faixa de 7,33-7,24 ppm (m, 5H) confirmando a presença do anel aromático, 4,49 ppm e 4,05 ppm referentes aos deslocamentos de hidrogênios para o sinal do éter, juntamente com novos sinais referentes à adição do grupo metilcicloexano. Estes sinais são 3,46 ppm (J= 6,6 Hz) e 3,27 ppm (J= 6,4 Hz), referentes à formação do éter no lugar do álcool e os sinais de 1,26-1,01 ppm, que confirmam a presença do cicloexano, sendo que os hidrogênios do cicloexano acoplam com os da cadeia alquílica, integrando para 27 H em um multiplete. A seguir, são evidenciadas as principais atribuições de RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz), para o éter 10-(benziloxi)decilciclo-hexilmetílico (II) (Tabela IV).

Tabela IV. Principais atribuições de RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz), para éter 10-(benziloxi)decilcicloexilmetílico (II):

	H	Multiplicidade/J	Δ
H_a	5H	Multiplete	7,33-7,24 ppm
H_b	2H	singleto	4,49 ppm
H_c	2H	triplete/ J= 6,7 Hz	4,05 ppm
H_d	2H	triplete/ J= 6,6 Hz	3,46 ppm
H_e	2H	duplete/ J=6,4 Hz	3,27 ppm

A formação do éter 10-(benziloxi)decilciclobutilmetílico (IV) foi evidenciada pelos sinais do deslocamentos dos hidrogênios na faixa de 7,24- 7,21 ppm (m, 5H) confirmando a presença do anel aromático, 4,42 ppm e 4,06 ppm referentes aos

deslocamentos dos hidrogênios vizinhos ao éter, juntamente com sinais em 2,23 ppm (d, 6H) referentes à adição do grupo metilciclobutano. No entanto, o sinal referente ao deslocamento dos hidrogênios da cadeia carbônica apresenta-se com integração não correspondente, sugerindo-se a presença de hidrocarbonetos. Assim, a amostra foi lavada com hexano (tratado) para remoção dessas impurezas e em seguida submetida à próxima etapa reacional (TabelaV)

Tabela V. Principais atribuições de RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz), para éter 10-(benziloxi)decilciclobutilmetílico (VI):

	H	Multiplicidade/J	Δ
H_a	2H	singleto	4,42 ppm
H_b	5H	multiplete	7,26- 7,21 ppm
H_c	2H	singleto	4,02 ppm
H_d	2H	triplete, J= 6,6 Hz	3,36 ppm
H_e	6H	duplete, J=6,4 Hz	2,23 ppm

5.2.3. Obtenção do 10-(cicloexilmetoxi)1-decanol (IIIb) e do 10-(ciclobutilmetoxi)1-decanol (V)

Esquema 11: Esquema de obtenção dos intermediários 10(cicloexilmetoxi)1-decanol (IIIb) e do 10-(ciclobutilmetoxi)1-decanol (V)

Nesta etapa de hidrogenação empregando-se Pd/C como catalisador, após 30 minutos de reação observou-se por CCD os produtos obtidos, com R_f de 0,3, (IIIb) e R_f de 0,2 (V). Após 3 h de reação observou-se por CCD o desaparecimento total da mancha do intermediário II. Os produtos obtidos foram purificados por meio de cromatografia em sílica-gel empregando-se como fase móvel hexano/acetato de etila (3:1) e procedeu-se à caracterização por espectrométrica de RMN de ¹H. **10-(cicloexilmetoxi)1-decanol (IIIb):** RMN ¹H (DMSO, 300 MHz): 3,45 ppm (t, 2H, J=6,3 Hz), 3,38 ppm (t, 2H, J=6,7 Hz) e 3,36 ppm (t, 2H, J= 6,5 Hz), 3,33 ppm (água), 2,50 ppm (DMSO), 1,57-1,53 ppm (m, 2H), 1,42 ppm (d, 2H, J= 7.3 Hz), 1,26 ppm (s, 11H), 1,07 ppm (t, 3H, J=7,1) (Anexo 9). **10-(ciclobutilmetoxi)1-decanol (V):** RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): 3,51 ppm (s, 2H), 3,36 ppm (s, 4H), 1,46 ppm (s, 15H), 1,19 ppm (s, 8H). RMN ¹³C (CDCl₃, 75 MHz): 77,41- 76,57 ppm (CDCl₃), 75,55 ppm, 71,12 ppm, 63,07ppm, 35,22 ppm, 32,80 ppm, 29,70 ppm, 29,50 ppm, 29,44 ppm, 29,38 ppm, 26,13 ppm, 25,71 ppm, 25,19 ppm, 18,61 ppm

Na análise do espectro do intermediário IIIb observamos a presença do sinal referente ao deslocamento de hidrogênios vizinhos à hidroxila em 3,45 ppm (J=6,3 Hz), confirmando a desproteção do grupo alcóolico da estrutura e o deslocamento em 1,26 ppm (J=7,3 Hz) correspondem aos acoplamentos dos hidrogênios do cicloexano, gerando um singleto correspondente a 11 H, os sinais referentes ao deslocamento dos hidrogênios vizinhos ao oxigênio do éter, foram observados em 3,38 ppm (J= 6,7 Hz) e 3,36ppm (J=3,36 Hz). Desta maneira, foi possível confirmar a formação do intermediário IIIb (Tabela VI).

Tabela VI. Principais atribuições de RMN ¹H (DMSO, 300MHz), do intermediário 10-(cicloexilmetoxi)1-decanol (IIIb):

	H	Multiplicidade/J	Δ
H _a	2H	tripeto/J=6,3 Hz	3,45 ppm
H _b	2H	tripeto/J=6,7 Hz	3,38 ppm
H _c	2H	tripeto/J=6,5 Hz	3,36 ppm
H _d	11H	singleto	1,26 ppm

Na análise do espectro do intermediário V observamos os sinais referentes ao deslocamento de hidrogênios vizinhos à hidroxila em 3,51 ppm, confirmando a desproteção do grupo alcóolico da estrutura, o sinal em 3,36 ppm referente ao acoplamento dos hidrogênios vizinhos ao oxigênio do éter e o sinal em 1,46 ppm referente ao acoplamento do ciclo-butano com a cadeia alquílica. Pela análise do RMN de ^{13}C o sinal em 35,22 ppm evidencia a presença do ciclo-butano, comprovando a formação do composto (Tabela VII).

Tabela VII. Principais atribuições de RMN ^1H (CDCl_3 , 300MHz) e RMN ^{13}C (CDCl_3 , 75 MHz), do intermediário 10- (ciclobutilmetoxi)1-decanol (V):

	H	Multiplicidade/J	Δ
H_a	2H	singleto	3,51 ppm
H_b	4H	singleto	3,36 ppm
C_a	-	-	63,07 ppm
C_b	-	-	75,55 ppm
C_b	-	-	71,12 ppm
C_c	-	-	35,22 ppm

No mecanismo de reação para obtenção dos intermediários IIIb e V, as moléculas do gás hidrogênio interagem com o Pd/C e a ligação H-H é parcialmente clivada (adsorvida), então os átomos de hidrogênio se ligam ao metal que promoverá a aproximação com o anel aromático para maior reatividade. Assim, o hidrogênio se ligará ao oxigênio devido a seus pares de elétrons livres ocasionando a redução, liberando tolueno e os intermediário IIIb e V. Acredita-se que devido ao intermediário II possuir em sua extremidade éteres com semelhanças estruturais, a reação em ambos os lados da molécula pode ocorrer, o que justificaria o rendimento de 76% para o 10- (cicloetilmetoxi)1-decanol (IIIb). O rendimento para o 10- (ciclobutilmetoxi)1-decanol (V) foi de 66%. Esta etapa será repetida com controle da

pressão de H₂ no meio reacional, já que possivelmente o excesso de H₂ favoreceu a hidrogenólise também da outra extremidade da molécula.

Assim, ao término das três etapas propostas, na metodologia de Agresta e colaboradores (2003) o rendimento global foi de 52% para o 10- (cicloetilmetoxi)1-decanol (IIIb) e 42% para o 10- (ciclobutilmetoxi)1-decanol (V), o que justifica a escolha da metodologia.

5.3. Síntese dos Análogos Alcóxicicloexilmetílico, Alcóxiciclobutilmetílico e Alcóxibenzílico

Os intermediários IIIb (10-(cicloexilmetoxi)1-decanol), V (10-(ciclobutilmetoxi)1-decanol) e I (10-(benziloxi)1-decanol) foram empregados como alcoóis de partida para obtenção dos análogos da miltefosina. A reação ocorreu em quatro etapas e os resultados estão apresentados em função destas.

Nas primeiras tentativas de síntese de análogos da miltefosina realizadas baseando-se no trabalho de MacDonald et al. (1991), houve grande perda de produto durante as diversas etapas, tanto devido à reatividade dos intermediários quanto devido ao fato do processos de purificação realizados após cada etapa serem ineficientes e resultarem em baixos rendimentos. Desta forma, o procedimento descrito foi aprimorado, sendo que dentre as adaptações realizadas podemos citar: alteração do tempo de reação, alteração da fase móvel utilizada para CCD, alteração de procedimentos de recuperação e purificação de intermediários e produto final.

A alteração realizada referente à diminuição do tempo reacional ocorreu devido à observação de que o tempo proposto era maior que o necessário para a formação dos compostos desejados. As mudanças nos tempos de reação foram alcançadas pelo acompanhamento por CCD, sendo que dessa maneira determinamos o tempo reacional necessário para que se estabelecesse o equilíbrio de reação, ou seja, a formação de produto estabilizasse. O resultado desse processo foi a diminuição do tempo de reação da última etapa sintética, resultando em 24h a menos do que o originalmente proposto por MacDonald et al. (1991) sem prejuízo nos rendimentos esperados.

A fase móvel utilizada na CCD para acompanhamento e controle da última etapa reacional também foi alterada permitindo melhor identificação dos produtos

formados em relação aos subprodutos. A fase móvel escolhida foi diclorometano/metanol/ NH_4OH 25% (75:22:3) (Zaffalon et al, 2011).

As etapas de purificação por sílica-gel em coluna cromatográfica destes compostos apresentaram dificuldade devido ao fato de estas moléculas serem anfifílicas e interagiram com a sílica. A presença da carga efetiva no nitrogênio e a longa cadeia alquílica também aumentam a dificuldade de purificação. Assim, foram realizadas cinco etapas de solubilização em metanol para precipitação de impurezas, as quais foram filtradas e evaporadas entre cada uma delas. Os produtos obtidos foram submetidos a análises para caracterização.

5.3.1. Obtenção do dicloridrato de {[10-(cicloexilmetoxi)decil]oxi} de fosfonoila (VI), dicloridrato de {[10-(ciclobutilmetoxi)decil]oxi} de fosfonoila (X) e dicloridrato de {[10-(benziloxi)decil]oxi} de fosfonoila (XIV)

Esquema 12. Esquema de obtenção dos intermediários VI, X e XIV.

Na primeira etapa sintética, partiu-se da reação do POCl_3 com os intermediários I, IIIb e V, sendo que a substituição nucleofílica no átomo de fósforo resultou na formação dos produtos desejados, o dicloridrato {[10-(cicloexilmetoxi)decil]oxi} de fosfonoila (VI), o dicloridrato {[10-(ciclobutilmetoxi)decil]oxi} de fosfonoila (X) e o dicloridrato de {[10-(benziloxi)decil]oxi} de fosfonoila (XIV). A reação ocorreu sob agitação, banho de gelo e em atmosfera inerte (argônio) e foi evidenciada pela presença do precipitado correspondente ao cloridrato de trietilamina. O andamento da reação foi acompanhado por CCD (revelador vanilina). Em seguida realizou-se filtração simples para retirada do cloridrato de trietilamina e os intermediários VI, X e XIV foram diretamente empregados na próxima etapa, sem purificação.

5.3.2. Obtenção dos intermediários 2{[10-cicloexilmetoxi]decil]oxi}-metil-1,2,3 oxazafosfolidina-2ona (VII), 2{[10-ciclobutilmetoxi]decil]oxi}-metil-1,2,3 oxazafosfolidina-2ona (XI), 2{[10-benziloxi]decil]oxi}-metil-1,2,3 oxazafosfolidina-2ona (XV)

Esquema 13. Esquema de obtenção dos intermediários VII, XI e XV.

A síntese dos intermediários 2{[10-cicloexilmetoxi]decil]oxi}-metil-1,2,3-oxazafosfolidina-2-ona (VII), 2{[10-cicloexilmetoxi]decil]oxi}-metil-1,2,3-oxazafosfolidina-2-ona (XI) e 2{[10-benziloxi]decil]oxi}-metil-1,2,3-oxazafosfolidina-2-ona (XV) foram realizadas em atmosfera inerte (argônio) e com resfriamento. O mecanismo de reação pode ser descrito como um ataque nucleofílico ao átomo de fósforo pela amina secundária, seguido do ataque pelo grupo hidroxila, com formação da fosfoamida cíclica. O tempo reacional foi monitorado através de CCD. As formações dos produtos também foram evidenciadas pelo surgimento de um precipitado branco referente ao cloridrato de trietilamina. Após o fim da reação, os conteúdos foram filtrados, evaporados sob pressão reduzida e subsequentemente submetidos à próxima etapa.

5.3.3. Obtenção dos intermediários ácido {[10-(cicloexilmetoxi]decil]oxi}[2-(metilamino)etoxi] fosfínico (VIII), ácido {[10-(cicloexilmetoxi]decil]oxi}[2-(metilamino)etoxi] fosfínico (XII) e ácido {[10-(benziloxi]decil]oxi}[2-(metilamino)etoxi] fosfínico (XVI)

Esquema 14. Esquema de obtenção dos intermediários VIII, XII e XVI.

Na terceira etapa, os intermediários VII, XI e XV obtidos na etapa anterior foram solubilizados em solução de acetona:água (30:3) (v/v) e mantidos sob agitação em temperatura ambiente, visando à abertura do anel por hidrólise da ligação fosfoamida.

Para a realização desta etapa, o tempo reacional foi de 2 horas. Após o término da reação, os produtos apresentaram-se sólidos/precipitados como o intermediário correspondente na síntese da miltefosina (MACDONALD et al., 1991). Desta maneira, evaporou-se o solvente sob pressão reduzida para remoção total da acetona. Em seguida, várias lavagens com clorofórmio gelado foram realizadas. Finalizado este procedimento, prosseguiu-se com a última etapa de obtenção dos análogos.

5.3.4. Obtenção dos produtos finais 10-cicloexilmetoxi decilfosfocolina (IX), 10-ciclobutilmetoxi decilfosfocolina (XIII) e 10-benziloxi decilfosfocolina (XVII)

Esquema 15. Obtenção dos compostos IX, XIII e XVII.

Para obtenção dos produtos finais, procedeu-se à reação de metilação dos intermediários VIII, XII e XVI, por meio de reação com CH₃I em presença de metanol

e NaOH e na ausência de luz, mantendo-se a agitação durante 24 horas. Nesta etapa a utilização de NaOH foi feita para tornar o meio básico e facilitar a metilação.

A reação foi acompanhada por CCD, sendo que foram observadas 3 manchas, as quais foram atribuídas, respectivamente, à impurezas referentes às demais etapas reacionais ($R_f = 0,6$), ao intermediário monometilado da 3ª etapa ($R_f = 0,35$) e ao produto trimetilado da última etapa ($R_f = 0,14$). A purificação dos produtos foi feita através de recristalização com clorofórmio e metanol, obtendo-se um sólido branco amorfo, igualmente descrito na literatura.

Os rendimentos dos produtos finais correspondem a aproximadamente 37% para o composto IX, 29% para o composto XIII e 42% para o composto XVII. Os compostos IX e XIII que foram os análogos propostos na síntese deste projeto tiveram sua caracterização realizada pelas análises de ponto de fusão, RMN de ^1H , HPLC e espectroscopia no infravermelho. Para o composto XVII, somente a espectroscopia de RMN foi realizada até o momento.

Na análise do ponto de fusão obtivemos para o composto IX a faixa de 58,5 °C- 60,9 °C e para o composto XIII a faixa de 57,8 °C-59,0 °C, assim podemos inferir que esses compostos possuem um grau de pureza elevada, já que apresentam ponto de fusão bem definido, ou seja, faixa estrita na variação da temperatura.

Os produtos foram submetidos à análise de RMN ^1H , para confirmação de sua estrutura. **10-cicloexilmetoxi decilfosfocolina: RMN ^1H** (CDCl_3 , 300 MHz) δ : 7,19 ppm (CDCl_3), 4,23 ppm (s,4H), 3,75 ppm (s, 4H), 3,51 ppm (s, 2H), 3,36 ppm (s, 9H), 1,45 ppm (água), 1,18 ppm (s, 16H), 0,82-0,76 ppm (m, 11H) (Anexo 12). **10-ciclobutilmetoxi decilfosfocolina: RMN ^1H** (DMSO, 300 MHz) δ : 4,07-4,05 ppm (m, 4H), 3,73 ppm (m, 2H), 3,58 ppm (m,2H), 3,38 ppm (água), 3,22 ppm (d, 2H, $J=5,7$ Hz), 3,17 ppm (s, 9H), 2,51 ppm (DMSO), 2,39 ppm (d, 2H, $J=6,9$ Hz), 2,27 ppm (t, 2H, $J=1,5$ Hz), 2,19 ppm (t, 2H, $J=1,6$ Hz), 2,14 ppm (s, 1H), 1,67 ppm (s, 16H).(Anexo 13). **10-benziloxi decilfosfocolina: RMN ^1H** (DMSO, 300 MHz) δ : 7,34-7,29 ppm (m, 5H), 4,44 ppm (s,2H), 4,05 ppm (s, 2H), 3,65 ppm (dd, 4H, $J=4,3$ Hz e $J=10,9$ Hz), 3,56 ppm (t, 2H, $J=5,7$ Hz), 3,38 ppm (água), 3,15 ppm (s, 9H), 2,5 ppm (DMSO), 1,51-1,43 ppm (m 8H), 1,28-1,25 ppm (m, 8H).

A formação do composto IX foi evidenciada pelos sinais corresponde aos hidrogênios das metilas da porção colina observados em 3,36 ppm (s, 9H), pelos deslocamentos em 0,82-0,72 ppm (m,11H) referentes aos hidrogênios do

cicloexano, pelo sinal em 4,23 ppm (s, 4H) dos hidrogênios vizinhos ao grupamento fosfato, sinal em 3,75 ppm (s, 4H) referentes aos hidrogênios vizinhos a função éter, 1,18 ppm (s, 16H) indicando o deslocamento dos hidrogênios da cadeia carbônica e os sinais em 3,51 ppm (s, 2H) referente ao deslocamento dos hidrogênios do grupo metilênico da porção fosfocolina.

Tabela VIII. Principais atribuições de RMN ^1H (DMSO, 300MHz), para 10-cicloexilmetoxi decilfosfocolina (IX):

	H	Multiplicidade/J	Δ
H_a	4H	singleto	3,75 ppm
H_b	4H	singleto	4,23 ppm
H_c	2H	singleto	3,51 ppm
H_d	9H	singleto	3,36 ppm
H_e	11H	multipeto	0,82-0,72 ppm

Após a caracterização por RMN, o composto IX foi analisado por HPLC (Figura 9) para determinar sua pureza cromatográfica, em que os efeitos do fator de cauda (< 2) e da resolução (> 2) foram avaliados para observar a qualidade do método desenvolvido (SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2002). Inicialmente foram realizados testes com diferentes concentrações da fase móvel constituída por A (10 μM de NH_4OH em água) e a fase móvel B (10 μM de NH_4OH em metanol. Mais especificamente, foram estudadas as proporções A:B de 40:60, 30:70, 15:85 e 5:95 v/v., considerando os padrões da miltefosina relatados na literatura (DORLO et al. 2008). Alguns critérios foram selecionados para a escolha da fase móvel mais adequada, entre eles, solubilidade, estabilidade da amostra, e o tempo de retenção. A fase móvel correspondente a 5:95 v/v foi a que se mostrou a mais adequada, dentro dos critérios levados em consideração.

Na análise espectrométrica (resultante do HPLC) do composto IX (anexo 15), observou-se um pico majoritário simétrico, sem efeito de cauda, indicando possivelmente uma boa eficiência na separação do composto das impurezas. O

tempo de retenção encontrado foi de 2,5 minutos. Os valores calculados da resolução e do fator de cauda do pico majoritário são 0,00 e 1,24 respectivamente, indicando que o método escolhido pode ser melhorado, ainda que se tenha obtido 98% de pureza cromatográfica.

Figura 9 – Cromatograma, a 220nm, do 10-cicloexilmetoxi decilfosfocolina (IX):

A formação do composto IX também foi confirmada pelo espectro no infravermelho (anexo 17) em que a banda em 3433 cm^{-1} confirma a presença de água, já que a molécula é altamente higroscópica. As bandas na faixa de 1000 a 1500 cm^{-1} são referentes às ligações do fosfato, reforçado pelo harmônico destas ligações na faixa de 2300 a 2500 cm^{-1} . A banda em 2850 cm^{-1} é referente às ligações carbono-hidrogênio da cadeia alifática. A amina quaternária não apresenta absorção no infravermelho, assim não pode ser identificada.

Com relação à caracterização do composto XIII por RMN, este foi caracterizado pelo sinal em 3,17 ppm (s, 9H) referente ao deslocamento dos hidrogênios metilênicos da porção colina, os sinais em 2,39 ppm (d, 2H), 2,27 ppm (t, 2H), 2,19 ppm (t, 2H), 2,14 ppm (s, 1H), referentes aos sinais de hidrogênios do ciclo-butano, os sinais em 3,73 ppm (m, 2H), 3,58 ppm (m, 2H) referente aos hidrogênios vizinhos ao oxigênio do éter, o sinal em 4,07-4,05 ppm (m, 4H) correspondente aos hidrogênios das metilas da porção colina, 3,22 ppm (d, 2H) referente ao deslocamento dos hidrogênios do grupo metilênico da porção fosfocolina e o sinal em 1,67 ppm (s, 16H) indicando o deslocamento dos hidrogênios da cadeia carbônica.

Tabela IX. Principais atribuições de RMN ^1H (DMSO, 300MHz), para 10-ciclobutilmetoxi decilfosfocolina (XIII):

	H	Multiplicidade/J	Δ
$\text{H}_{a^1, a^2, a^3, a^4}$	7H	multiplete	2,39-2,27-2,19-2,14 ppm
H_b	4H	multiplete	4,07-4,05 ppm
H_c	2H	duplete	3,22 ppm
H_d	9H	singleto	3,17 ppm
H_e	2H	multiplete	3,73 ppm
H_f	2H	multiplete	3,58 ppm

O composto XIII foi analisado por HPLC (Figura 10) para determinar sua pureza cromatográfica. Na análise espectrométrica correspondente (anexo 16) observou-se um pico majoritário simétrico, sem efeito de cauda, indicando possivelmente uma boa eficiência na separação do composto das impurezas. O tempo de retenção encontrado também foi de 2,5 minutos e os valores calculados da resolução e do fator de cauda do pico majoritário foram 0,00 e 1,36 respectivamente, indicando que o método escolhido pode ser melhorado, ainda que tenha-se obtido 96% de pureza cromatográfica.

Os compostos IX e XIII foram comparados com o branco (metanol) que nas duas análises mostrou-se com as mesmas características, tanto na simetria do pico (metanol), como no tempo de retenção, podendo assim diminuir possíveis dúvidas frente a porcentagem da pureza cromatográfica.

Figura 10 – Cromatograma, a 220nm, do 10-ciclobutilmetoxi decilfosfocolina (XIII):

A formação do composto XIII também foi confirmada pelo espectro no infravermelho (anexo 18) em que a banda em 3433 cm^{-1} confirma a presença de água. As bandas na faixa de 1000 à 1613 cm^{-1} são referentes as ligações do fosfato, reforçado pelo harmônico destas ligações na faixa de 2300 à 2500 cm^{-1} . A pequena banda em 2852 cm^{-1} é referente às ligações carbono-hidrogênio da cadeia alifática.

Para o composto XVII, como mencionado anteriormente, a confirmação estrutural foi realizada somente por ^1H RMN, até o momento. Podemos destacar os sinais correspondentes aos hidrogênios das metilas da porção colina, observados em 3,15 ppm (s, 9H), os deslocamentos em 7,34-7,29 ppm (m, 5H) referente aos hidrogênios do anel aromático, o sinal em 4,44 ppm (s, 2H) dos hidrogênios do grupo metilênico ligado ao anel benzênico e 4,05 (s, 2H) dos hidrogênios vizinhos a função éter, sinais em 3,65 ppm (dd, 4H) referentes ao deslocamento dos hidrogênios vizinhos ao grupamento fosfato, 1,51-1,43 ppm (m, 8H) e 1,28-1,25 ppm (m, 8H) indicando o deslocamento dos hidrogênios da cadeia carbônica e o deslocamento em 3,56 ppm (t, 2H) referente ao deslocamento dos hidrogênios do grupo metilênico da porção fosfocolina.

Tabela X. Principais atribuições de RMN ^1H (DMSO, 300MHz), para 10-benziloxi decilfosfocolina (XVII):

	H	Multiplicidade/J	Δ
H_a	2H	Singleto	4,05 ppm
H_b	4H	duplo dubleto/ $J = 4,3$ Hz e $J = 10,9$ Hz	3,65 ppm
H_c	2H	tripleto/ $J = 5,7$ Hz	3,56 ppm
H_d	9H	Singleto	3,15 ppm
H_g	5H	multipleto	7,34-7,29 ppm
H_i	2H	singleto	4,44 ppm

Após sintetizados e caracterizados, os compostos IX e XIII foram submetidos a ensaio biológico de viabilidade celular utilizando como padrão a miltefosina. Como pode ser observado nas figuras 11 e 12, a miltefosina diminuiu a viabilidade das linhagens de células H358 e A549 em concentrações superiores a 30 μM , quando comparada com os compostos IX e XIII. Nas linhagens de células H358 a miltefosina em 40 μM obteve um percentual de menos de 80% de células viáveis em relação ao controle; na concentração de 50 μM observou-se menos de 60% e na concentração de 60 μM aproximadamente 40% de células viáveis. Nas linhagens de células A549 a miltefosina nas concentrações de 30 μM e 40 μM obteve um percentual de menos de 80% de células viáveis em relação ao controle; na concentração de 50 μM observou-se 60% e em 60 μM a porcentagem de células viáveis foi menor que 40%. Em contrapartida, para ambas as linhagens celulares os compostos IX e XIII não resultaram em viabilidade celular inferior a 80% na faixa de concentração investigada.

Figura 11- Ensaios de citotoxicidade da miltefosina (controle), Composto IX e composto XIII frente à linhagem de células H358.

Figura 12- Ensaios de citotoxicidade da miltefosina (controle), Composto IX e Composto XIII frente à linhagem de células A549.

Segundo Papazafiri e colaboradores (2005), vários mecanismos podem ser responsáveis pelas diferentes sensibilidades das células tumorais as alquilfosfocolinas. Assim, considerando-se que as linhagens de células H358 e A549 são multirresistentes, pois possuem as proteínas de transporte MDR1, MDR2 e MRP, as diferentes sensibilidades observadas como resultados neste ensaio podem estar relacionadas ao efluxo dos compostos por essas proteínas o que confere resistência a essas células.

No entanto, considerando-se que no ensaio de MTT mede-se o metabolismo mitocondrial através da redução do corante formazan e que esse metabolismo pode ser afetado por outras variáveis além do número de células viáveis, esses compostos foram submetidos a ensaio de inibição celular (ensaio de inibição de formação de colônia). A cultura de células inicialmente testada foi de Hela, que são células de carcinoma epidermóide do colo do útero e são consideradas com alta capacidade de sobrevivência e expansão ilimitada (Figura 13).

Figura 13. Ensaio de inibição celular da miltefosina, Composto IX e Composto XIII frente à cultura de células Hela.

No resultado do ensaio de inibição celular, frente à cultura de células Hela, os compostos IX e XIII apresentaram nas concentrações 30 μM, 60 μM e 100 μM aproximadamente 50% de inibição, assim, pode-se considerar que não houve efeito dose-dependente e que menores concentrações devem ser avaliadas.

Considerando-se que a hemólise também é um problema observado com o uso das alquilfosfocolinas, o que impede sua utilização na forma injetável, é de extrema importância à realização de ensaios hemolíticos, já que os estudos comprovam que a presença de ciclo-alcanos na estrutura desses compostos, possivelmente diminuirá o efeito hemolítico (Calogeropoulou et al. 2008; Papazafiri et al. 2005).

6- CONCLUSÕES

Neste trabalho, realizamos a síntese do 10-(cicloexilmetoxi)1-decanol (IIIb), do 10-(ciclobutilmetoxi)1-decanol (V) e do 10-(benziloxi)1-decanol (I), obtendo-se um rendimento global de 32%, 25% e 58% respectivamente. Estes foram posteriormente empregados na obtenção de compostos análogos a miltefosina: 10-cicloexilmetoxi decilfosfocolina (IX), 10-ciclobutilmetoxi decilfosfocolina (XIII), 10-benziloxi decilfosfocolina (XVII), no entanto, apenas os compostos IX e XIII propostos no projeto foram confirmados por espectroscopia de RMN de ^1H , ponto de fusão, espectroscopia no infravermelho e HPLC, apresentando pureza cromatográfica de 98% e 96%, respectivamente. As etapas de purificação destes compostos apresentaram bastante dificuldade devido ao fato de estas moléculas serem anfifílicas e interagirem com a sílica. A presença da carga no nitrogênio e a longa cadeia alquílica também aumentaram a dificuldade de purificação. Nesse sentido, torna-se evidente a necessidade de se estudar novas metodologias para purificação e técnicas que permitam a detecção de impurezas.

Ensaio biológicos de viabilidade celular foram realizados empregando-se as linhagens celulares de carcinoma pulmonar humano H358 e A549. A miltefosina (padrão) diminuiu a viabilidade das linhagens de células H358 e A549 quando comparada com os compostos IX e XIII. No entanto, em ensaio de colônia os mesmos compostos apresentaram aproximadamente 50% de inibição das células Hela. Assim, conclui-se que diante dos resultados obtidos com o ensaio biológico, novos estudos devem ser realizados a fim de se obter dados mais conclusivos sobre a atividade biológica dos compostos sintetizados.

REFERÊNCIAS

ACHUTTI, A.; AZAMBUJA, M. I. R. Doenças crônicas não-transmissíveis no Brasil: repercussões do modelo de atenção à saúde sobre a seguridade social. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 9, n. 4, p. 833-840, 2004.

ACS, 2003. **American Cancer Society**. Disponível em: < <http://www.cancer.org> > Acesso em 01dez.2012.

AEZ. **Aeterna Zentaris**. Disponível em: <<http://www.aezsinc.com/en/index.php>> Acesso em 28 nov 2012.

ALDERLIESTEN, M. C. et al. Phosphoinositide phosphatase SHIP-1 regulates apoptosis induced by edelfosine, Fas ligation and DNA damage in mouse lymphoma cells. **Biochemistry Journal**, v. 440, p. 127–135, 2011.

ANDREESEN, R. et al. Selective destruction of human leukemic cells by alkyllysophospholipids. **Cancer Research**, v 38, p. 3894–3899, 1978.

ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; GUARDIA, M. Green Analytical Chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 6, p. 497-511, 2008.

AGRESTA, M. et al. Synthesis and antiproliferative activity of alkylphosphocholines. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 126, n. 2, p. 201-210, 2003.

ALDERLIESTEN M. C. Phosphoinositide phosphatase SHIP-1 regulates apoptosis induced by edelfosine, Fas ligation and DNA damage in mouse lymphoma cells. **Biochemical Journal**, v. 440, n. 1, p. 127–135, 2011.

ALMEIDA, V.L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ARAUJO, P.S. et al. Structure and thermodynamic properties of the complexes between phospholipase A2 and lipid micelles. **Biochemistry**, v. 18, n. 4, p. 580-586, 1979.

BANASIK, J. L. Neoplasia. In: COPSTEAD, E. L.; BANASIK, J. L. **Pathophysiology**. 4. ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, 2010. cap.7. p.128-157.

BERDEL W. E. et al. The influence of alkyl-lysophospholipids and lysophospholipidactivated macrophages on the development of metastasis of 3-Lewis lung carcinoma. **European Journal Cancer**, v. 16, p. 1199–1204, 1980.

BERMAN J. D. Development of miltefosine for the leishmaniasis. **Mini Reviews in Medical Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 145-151, 2006.

BORST, P. et al. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 16, p. 302-1295, 2000.

BRAY, F. et al. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. **The Lancet Oncology**, v. 13, n. 8, p. 790-801, 2012.

BREISER A. et al. Distribution and metabolism of hexadecylphosphocholine in mice, **Lipids**, v. 22, p. 925–926, 1987.

CALEGOROPOULOU, T. et al. Design and synthesis of potent antileishmanial cycloalkylidene-substituted ether phospholipid derivatives. **Journal Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 4, p. 897-908, 2008.

CASTRO, B. et al. Interaction of drugs with hexadecylphosphocholine micelles, Derivative spectroscopy, acid-base and solubility studies. **Material Science and Engineering C**, v. 18, p. 71-78, 2001.

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, cap. 51, 2006.

CHEN, R. et al. Human TMEM30a promotes uptake of antitumor and bioactive choline phospholipids into mammalian cells. **Journal of Immunology**, v. 186, n.5, p. 3215–3225, 2011.

CLIVE, S.; GARDINER, J.; LEONARD, R. C. F. Miltefosine as a topical treatment for cutaneous metastases in breast carcinoma. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 44, p. S29-S30, 1999.

DE VISSER, K. E.; JONKERS, J. Towards understanding the role of cancer-associated inflammation in chemoresistance. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, n. 16, p. 1844-1853, 2009.

DEELEY, R. G.; COLE, S. P. Function, evolution and structure of multidrug resistance protein (MRP). **Seminars Cancer Biology**, v. 8, n.3, p. 193-204, 1997.

DEL DEBBIO, C.B.; TONON, L.M.; SECOLI, S.R. Terapia com anticorpos monoclonais: uma revisão de literatura. **Revista Gaúcha de Enfermagem**; v. 28, n. 1, p. 42-133, 2007.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products, a Biosynthetic Approach**, 3rd ed., Wiley: United Kingdom, 2009.

DINEVA, I. K. et al. Erufosine suppresses breast cancer in vitro and in vivo for its activity on PI3K, c-Raf and Akt proteins. **Journal Cancer Research Clinical Oncology**, v. 138, p. 1909–1917, 2012.

DOBBIN, A.; JANE, D.E.; GADELHA, P. I. MARIA. Mesilato de Imatinibe para Tratamento da Leucemia Mielóide Crônica. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 8, p. 429-438, 2002.

DORLO, T. P. et al. Development and validation of a quantitative assay for the measurement of miltefosine in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 865, n. 1-2, p. 55-62, 2008.

DUMMER, R. et al. Topical administration of hexadecylphosphocholine in patients with cutaneous lymphomas: results of a phase I/II study. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 29, n. 6, p. 963–970, 1993.

EIBL, H. et al. On the synthesis of alpha and beta lecithins and their ether analogs. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, v. 704, p. 226–230, 1967.

EIBL, H.; UNGER, C. Hexadecylphosphocholine: a new and selective antitumor Drug. **Cancer Treatment. Reveiws**, v. 17, n. 2-3, p. 233–242, 1990.

EISSA, M. M.; AMER, E. I. *Giardia lamblia*: A new target for miltefosine. **International Journal for Parasitology**, v. 42, n. 5, p. 443-452, 2012.

ERDLENBRUCH, B. et al. Antitumor effects of erucylphosphocholine on brain tumor cells in vitro and in vivo. **Anticancer Research**, v. 18, p. 2551–2557, 1998.

ERDLENBRUCH, B. et al. Erucylphosphocholine: pharmacokinetics, biodistribution and CNS—accumulation in the rat after intravenous administration. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 44, p. 484–490, 1999.

EVANS, C. W. The tumor cell phenotype. **The Metastatic Cell: Behaviour and biochemistry**. 1.ed. London: Champman and Hall, 1991. cap. 1, p.1-136.

FIEGL, M. et al. Erufosine, a novel alkylphosphocholine, in acute myeloid leukemia: Single activity and combination with other antileukemic drugs. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 62, n. 2, p. 321-329, 2008.

FRASCI, G. et al. Preoperative weekly cisplatin, epirubicin, and paclitaxel (PET) improves prognosis in locally advanced breast cancer patients: an update of the Southern Italy

Cooperative Oncology Group (SICOG) randomized trial 9908. **Annals of Oncology**, v. 21, n. 4, p. 707-716, 2010.

FU, D.; SHI, Z. X.; WANG, Y. Z. Bcl-2 plays a key role instead of mdr1 in the resistance to hexadecylphosphocholine in human epidermoid tumor cell line KB. **Cancer Letters**, v. 142, n. 2, p. 147–153, 1999.

GAZDAR, A. F. et al. Peripheral airway cell differentiation in human lung cancer cell lines. **Cancer Research**, v. 50, n. 7, p. 5481-5487, 1999.

GIACCIA, A. J.; ERLER, J. T. The Cellular Microenvironment and Metastases In: ABELOFF, M. D.; ARMITAGE, J. O.; NIEDERHUBER, J. E.; KASTAN, M. B.; MCKENNA, W. G., eds. **Abeloff's Clinical Oncology**. 4.ed. Philadelphia, PA Churchill Livingstone Elsevier, cap. 3, p.33-48, 2008.

GIANONIO, B. J. et al. Phase I and pharmacokinetic study of the cytotoxic ether lipid ilmofosine administered by weekly two-hour infusion in patients with advanced solid tumors. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 1282–1288, 2004.

GIRGERT, R. et al. Cytotoxicity of ether phospholipid BM 41.440 on neuroblastoma cells. **Journal Cancer Research Clinical Oncology**, v. 121, p. 262–266, 1995.

GONELLI, A. et al. Perspectives of protein kinase C (PKC) inhibitors as anti-cancer agents. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 4, p. 498-509, 2009.

GOTTLIEB, H. E.; KOTLYAR, V.; NUDELMAN, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. **Journal of Organic Chemistry**, v. 62, p. 7512-7515, 1997.

GUERRA, M. R. et al. Risco de Câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 3, p. 227-234, 2005.

GUERRERO-VALERO, M. et al. Structural and mechanistic insights into the association of PKC α -C2 domain to PtdIns(4,5). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 16, p. 6603-6607, 2009.

HENKE, G. et al. Pharmacokinetics and biodistribution of Erufosine in nude mice—implications for combination with radiotherapy. **Radiation Oncology**, v. 4, p. 46, 2009.

HERRMANN, D. B. In vivo antitumor activity of ilmofosine. **Cancer Treatment Reviews**, v. 17, n. 2-3, p. 247–252, 1990.

HILGARD, P. et al. D-21266, a new heterocyclic alkylphospholipid with antitumour activity. **European Journal of Cancer**, v. 33, n. 3, p. 442–446, 1994.

HILL, B. Drug Resistance. **International Journal of Oncology**, v. 9, n. 2, p. 9-197, 1996.

HIPFNER, D. R.; DEELEY, R. G.; COLE, S. P. Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1461, n. 2, p. 359, 1999.

HUANG, F. et al. Synthesis and characterization of photolabeling probes of miltefosine. **Journal Fluorine Chemistry**, v.126, p. 739-743, 2005.

HUBER, P. C.; MARUIAMA, C. H.; ALMEIDA, W. P. Glicoproteína-p, resistência a múltiplas drogas (mdr) e relação estrutura-atividade de moduladores. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2148-2154, 2010.

IARC/ OMS. **International Agency for Research on Cancer/ Organização Mundial da Saúde**. Disponível em: < <http://www.iarc.fr/en/websites/databases.php>> Acesso em: 06 ago. 2012.

INCA. **Instituto Nacional de Câncer**. Disponível em <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2011/>> Acesso em: 06 ago. 2012.

INCA. **Instituto Nacional de Câncer**. Disponível em <<http://www1.inca.gov.br/enfermagem/docs/cap2.pdf>> Acesso em: 18 març. 2012.

JACOBSON, J.O. et al. American Society of Clinical Oncology/Oncology Nursing Society Chemotherapy Administration Safety Standards. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 13, p. 1-7, 2009.

JASINSKI, P. et al. PKC-alpha inhibitor MT477 slows tumor growth with minimal toxicity in in vivo model of non-Ras-mutated cancer via induction of apoptosis. **Investigational New Drug**, v. 29, n. 1, p. 33-40, 2009.

JHA, T. K. et al. Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **New England Journal Medicine**, v. 341, n. 24, p. 1795–1800, 1999.

KASAPOVIC, J. et al. Antioxidant status and lipid peroxidation in the blood of breast cancer patients of different ages. **Cell Biochemistry and Function**, v. 26, n. 6, p. 723-730, 2008.

KING, A. T.; PRIMROSE J.N. Principles of cancer treatment by surgery. **The Medicine Publishing Company**, v. 21, n. 11, p. 284-288, 2003.

KOHOUT, S. C. et al. C2 Domain of Protein Kinase C α : Elucidation of the Membrane Docking Surface by Site-Directed Fluorescence and Spin Labeling. **Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 1254-1265, 2003.

KOTTING, J. et al. Hexadecylphosphocholine and octadecyl-methyl-glycero-3-phosphocholine: a comparison of hemolytic activity, serum binding and tissue distribution. **Progress Experimental Tumor Research**, v. 34, p. 131–142, 1992.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Neoplasia. In: **Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease**, 7.ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005, p. 270.

LANDGRAF, K. E.; MALMBERG, N. J.; FALKE, J. J. Effect of PIP₂ Binding on the Membrane Docking Geometry of PKC α C2 Domain: An EPR Site-Directed Spin-Labeling and Relaxation Study. **Biochemistry**, v.47, n. 32, p. 8301-8313, 2008.

LEIGHL, N.B. et al. Phase 2 study of perifosine in advanced or metastatic breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 108, n. 1, p. 87-92, 2008.

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.

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.

LIU, J. S.; CHEN, J. S.; FALLER, D. V. Characterization of p21Ras-mediated apoptosis induced by protein kinase C inhibition and application to human tumor cell lines. **Journal of Cellular Physiology**, v. 198, n. 2, p. 277-294, 2004.

LITMAN, T. et al. From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. **Cellular and Molecular life sciences**, v. 58, n. 7, p. 931, 2001.

LONGLEY, D. B.; JOHNSTON, P. G. Molecular mechanisms of drug resistance. **The Journal of Pathology**, v. 205, n. 2, p. 205- 275, 2005.

LUCAS, L. et al. Modulation of phospholipase D by hexadecylphosphorylcholine: a putative novel mechanism for its antitumoral activity. **Oncogene**, v. 20, n. 9, p. 1110-1117, 2001.

MACDONALD, P.M.; RYDALL, J.R.; KUEBLER, S.C. Synthesis and characterization of a homologous series of zwitterionic surfactants based on phosphocholine. **Langmuir**, v.7, n. 11, p. 2602-2606, 1991.

MERKLE, C. **Manual de fisiopatologia**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2007. p. 13-22.

MENON, K.; TEICHER, B. A. Metastasis models. In: TEICHER, B. A. **Tumor Models in Cancer Research**. Totowa: Human Press Inc., p. 277-278, 2002.

MEYERS, C. A. How chemotherapy damages the central nervous system. **Journal of Biological Chemistry**, v. 7, n. 11, p. 1-3, 2008.

MITSCHER, L. A. et al. Multiple drug resistance. **Medicinal Research Reviews**, v. 19, n. 6, p. 19-477, 1999.

MITCHELL, R.N.; KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran: fundamentos de patologia**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 176-201.

MOLLINEDO, F. et al. In vitro and In vivo selective antitumor activity of Edelfosine against mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia involving lipid rafts, **Clinical Cancer Research**, v. 16, p. 2046–2054, 2010.

MOLLINEDO, F. et al. Involvement of lipid rafts in the localization and dysfunction effect of the antitumor ether phospholipid edelfosine in mitochondria. **Cell Death Disease**, v. 2, p. 158, 2011.

MRAVLJAK, J.; ZEISIG, R.; PECAR, S. Synthesis and biological evaluation of spin-labeled alkylphospholipid analogs. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 20, p. 6393-6399, 2005.

MUNDER, P.G.; MODOLELL, M.; ANDREESEN, R., Lysophosphatidylcholine (lysolecithin) and its synthetic analogues. Immunomodulating and other biologic effects. **Immunopathology**, v. 2, p. 187–203, 1979.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger's Principle of Biochemistry**. 4.ed. Nova Iorque: W. H. Freeman, p. 1110, 2004.

OBERLE, C.; MASSING, U.; KRUG, H.F. On the mechanism of alkylphosphocholine (APC)-induced apoptosis in tumor cells. **Biological Chemistry**, v. 386, n. 3, p. 237-245, 2005.

PAPANASTASIOU, I. et al. Design and synthesis of new adamantly-substituted antileishmanial ether phospholipids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.20, n. 24, p. 5484- 5487, 2010.

PAPAZAFIRI, P. et al. Structure-activity relationships of antineoplastic ring-substituted ether phospholipid derivatives. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v.56, n.3, p. 261-270, 2005.

PATRICK, G. L. **An introduction to Medicinal Chemistry**. 4.ed. Oxford: Oxford University Press, 2009. p. 752.

PORTH, C. M.; MATFIN, G. **Fisiopatologia**. 8ª. Ed. Volumes 1 e 2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

PLANTING A. S.; STOTER G.; VERWEIJ J. Phase II study of daily oral miltefosine (hexadecylphosphocholine) in advanced colorectal cancer. **European Journal Cancer**, v. 29A, n. 4, p. 518–519, 1993.

RÜBEL, A. et al. The membrane targeted apoptosis modulators erucylphosphocholine and erucylphosphohomocholine increase the radiation response of human glioblastoma cell lines in vitro. **Radiation Oncology**, v.1, 2006

RUETZ, S.; GROS, P. Phosphatidylcholine translocase: a physiological role for the mdr2 gene. **Cell**, v. 77, n.7, p. 81-1071, 1994.

RUITER, G.A. et al. Alkyl-lysophospholipids activate the SAPK/JNK pathway and enhance radiation-induced apoptosis. **Cancer Research**, v. 59, p. 2457–2463, 1999.

RUNGE, M.H. et al. Destruction of human solid tumors by alkyllysophospholipids. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 64, p. 1301–1306, 1980.

SEIFERT, K. et al. Antileishmanial Structure-activity relationships of synthetic phospholipids: In vitro and in vivo activities of selected derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 12, n. 5, p. 4525-4528, 2007.

SHOJI, M. et al. Effects of hexadecylphosphocholine on protein kinase C and TPA-induced differentiation of HL60 cells. **Lipids**, v. 26, n. 2, p. 145-149, 1991.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2012. CA: **Cancer Journal of Clinicians**, v. 62, n. 1, p. 10-29, 2012.

SIEGEL, R. et al. Cancer Statistics, 2011 The Impact of Eliminating Socioeconomic and Racial Disparities. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n.4, p. 212–236, 2011.

STRICKER, T.P.; KUMAR, V: Neoplasia. In **Robbins basic pathology**. 8th edition. Edited by KUMAR V, ABBAS AK, FAUSTO N, MITCHELL RN. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007. p. 173-223.

SZAKACS, G. et al. Targeting multidrug resistance in cancer. **Nature Reviews, Drug Discovery**, v. 5, n. 3. p. 34- 219, 2006.

ÜBERALL, F. et al. Hexadecylphosphocholine Inhibits Inositol Phosphate Formation and Protein Kinase C Activity. **Cancer Research Journal**, v. 51, n. 3, p. 807-812, 1991.

UNGER, C. et al. Hexadecylphosphocholine, a new ether lipid analogue. Studies on the antineoplastic activity in vitro and in vivo. **Acta Oncologica**, v. 28, n. 2, p. 213–217, 1989.

UNGER, C. et al. Hexadecylphosphocholine in the topical treatment of skin metastases in breast cancer patients. **Cancer Treatment Reviews**, v. 17, n. 2-3, p. 243–246, 1990.

UNGER, C. et al. 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.

VAN BLITTERSWIJK, W. J. et al. Fas/CD95 down-regulation in lymphoma cells through acquired alkyllysophospholipid resistance: partial role of associated sphingomyelin deficiency. **Biochemical Journal**, v. 425, n.1, p. 225–234, 2010.

VAN BLITTERSWIJK, W.J.; VERHEIJ M. Anticancer mechanisms and clinical application of alkylphospholipids. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 1-12, 2012.

VAN DER LUIT, A. H. et al. Alkyl-lysophospholipid accumulates in lipid rafts and induces apoptosis via raft-dependent endocytosis and inhibition of phosphatidylcholine synthesis. **Journal Biological Chemistry**, v. 277, p. 39541–39547, 2002.

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. **European Journal Cancer**, v. 29A, p. 208–209, 1993.

VINK, S. R. et al. Tumor and normal tissue pharmacokinetics of perifosine, an oral anti-cancer alkylphospholipid. **Investigational New Drugs**, v. 23, n. 4, p. 279-283, 2005.

VINK, S. R. et al. Lipid rafts and metabolic energy differentially determine uptake of anti-cancer alkylphospholipids in lymphoma versus carcinoma cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, n. 10, p. 1456-1465, 2007.

VOGLER, W.R. et al. Autologous bone marrow transplantation in acute leukemia with marrow purged with alkyl-lysophospholipid. **Blood**, v. 80, p. 1423–1429, 1992.

WANG, Y. Z. et al. Antiproliferation effects of hexadecylphosphocholine on solid tumour and leukaemia selectively in vitro. **Drugs under Experimental and Clinical Research**, v. 23, p. 97–102, 1997.

WERMUTH, C.G. Application Strategies for the Primary Structure-Activity Relationship Exploration. **The Practice of Medicinal Chemistry**. 3.ed. London: Elsevier Academic Press, 2008. cap.19, p. 415-427.

WIEDER, T. et al. Mechanisms of action of phospholipid analogs as anticancer compounds. **Progress in Lipid Research**, v. 38, n. 3, p. 249-259, 1999.

WOOLLEY, P. V. et al. A phase II trial of ilmofosine in non-small cell bronchogenic carcinoma. **Investigational New Drugs**, v. 14, n.2, p. 219–222, 1996.

ZAYTSEVA, Y.Y. et al. mTOR inhibitors in cancer therapy. **Cancer Letters**, v. 319, n. 1, p. 1-7, 2012.

ZERP, S. F. et al. Alkylphospholipids inhibit capillary-like endothelial tube formation in vitro: anti-angiogenic properties of a new class of anti-tumor agents. **Anti-Cancer Drugs**, v. 19, n. 1, p. 65–75, 2008.

ANEXOS

Espectros

Anexo 1. Espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) do bromometilcicloexano

3,28 ppm (d, 2H, $J = 6,4$ Hz) e 1,86-1,00 ppm (m, 11H)

Anexo 2. Espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) do cloreto de benzila.

7,38-7,29 ppm (m, 5H,), 4,57 ppm (s, 2H)

Anexo 3. Espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) de mistura dos materiais de partida (1,10-decanodiol e cloreto de benzila)

Anexo 4. Espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) do intermediário 10- (cicloexilmetoxi)1- decanol obtido pela via direta (IIIa).

3,64 ppm (t, 2H, $J=6,3\text{Hz}$), 3,37 ppm (t, 2H, $J=6,7\text{Hz}$), 3,19 ppm (d, 2H, $J=6,6\text{Hz}$), 1,73 ppm (t, 4H, $J=13,2\text{Hz}$), 1,55 ppm (t, 4H, $J=13,7\text{ Hz}$), 1,29-1,18 ppm (m, 19H).

Anexo 5. Espectro de RMN ^1H (300MHz, DMSO) do intermediário 10-(benziloxi)1decanol (I).

7,34-7,28 ppm (m, 5H), 4,44 ppm (s, 2H), 3,42-3,38 ppm (m, 4H), 3,30 ppm (água), 2,5 ppm (DMSO), 1,51 ppm (t, 2H, $J=6,4$ Hz), 1,39 ppm (t, 2H, $J=6,4$ Hz), 1,25 ppm (s, 12H).

Anexo 6. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do intermediário 10-(benziloxy)1-decanol (I).

138,75 ppm, 128,32 ppm, 127,60 ppm, 127,44 ppm, 77,44-76,59 ppm (CDCl_3), 72, 85 ppm, 70,53 ppm, 63,05 ppm, 32,80 ppm, 29,75 ppm, 29,49 ppm, 29,43 ppm, 29,38 ppm, 26,17 ppm, 25, 72 ppm.

Anexo 7. Espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) do intermediário éter 10-(benziloxi)decilcicloexilmetílico (II)

7,33 ppm (m, 5H), 7,26 ppm (CDCl_3), 4,49 ppm (s, 2H), 4,05 ppm (t, 2H, $J=6,7$ Hz), 3,46 ppm (t, 2H, $J=6,6$ Hz), 3,27 ppm (d, 2H, $J=6,4$ Hz), 1,26 ppm (m, 27H).

Anexo 8. Espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) do intermediário éter 10-(benziloxi)decilciclobutilmetílico (IV)

7,26- 7,21 ppm (m, 5H), 7,18 ppm (CDCl_3), 4,42 ppm (s, 2H), 4,06 ppm (s, 2H), 3,36 ppm (t, 2H, $J=6,6$ Hz), 2,23 ppm (d, 6H, $J=6,4$ Hz), 1,19 ppm.

Anexo 9. Espectro de RMN ^1H (300MHz, DMSO) do intermediário 10-(cicloexilmetoxi)1-decanol (IIIb):

3,45 ppm (t, 2H, $J=6,3$ Hz), 3,38 ppm (t, 2H, $J=6,7$ Hz) e 3,36 ppm (t, 2H, $J=6,5$ Hz), 3,33 ppm (água), 2,50 ppm (DMSO), 1,57-1,53 ppm (m, 2H), 1,41 ppm (d, 2H, $J=7,3$ Hz), 1,26 ppm (s, 11H), 1,07 ppm (t, 3H, $J=7,1$).

Anexo 10. Espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) do intermediário 10-(ciclobutilmetoxi)1-decanol (V):

3,51 ppm (s, 2H), 3,36 ppm (s, 4H),
1,46 ppm (s, 15H), 1,19 ppm (s, 8H)

Anexo 11. Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do intermediário 10-(ciclobutilmetoxi)1-decanol (V):

77,41- 76,57 ppm (CDCl_3), 75,55 ppm, 71,12 ppm, 63,07 ppm, 35,22 ppm, 32,80 ppm, 29,70 ppm, 29,50 ppm, 29,44 ppm, 29,38 ppm, 26,13 ppm, 25,71 ppm, 25,19 ppm, 18,61 ppm

Anexo 12. Espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) do intermediário fosfato de [10-(cicloexilmetoxi)decil][2-(trimetilamina)etil] (IX):

7,19 ppm (CDCl_3), 4,23 ppm (s, 4H), 3,75 ppm (s, 4H), 3,51 ppm (s, 2H), 3,36 ppm (s, 9H), 1,45 ppm (água), 1,18 ppm (s, 16H), 0,82-0,76 ppm (m, 11H)

Anexo 13. Espectro de RMN ^1H (300MHz, DMSO) do intermediário fosfato de [10-(butiloxi)decil][2-(trimetilamina)etil] (XIII):

4,07-4,05 ppm (m, 4H), 3,73 ppm (m, 2H), 3,58 ppm (m, 2H), 3,38 ppm (água), 3,22 ppm (d, 2H, $J = 5,7$ Hz), 3,17 ppm (s, 9H), 2,51 ppm (DMSO), 2,39 ppm (d, 2H, $J = 6,9$ Hz), 2,27 ppm (t, 2H, $J = 1,5$ Hz), 2,19 ppm (t, 2H, $J = 1,6$ Hz), 2,14 ppm (s, 1H), 1,67 ppm (s, 16H).

Anexo 14. Espectro de RMN ^1H (300MHz, DMSO) do intermediário fosfato de [10-(benziloxi)decil][2-(trimetilamina)etil] (XVII):

7,34-7,29 ppm (m, 5H), 4,44 ppm (s, 2H), 4,05 ppm (s, 2H), 3,65 ppm (dd, 4H, $J=4,3$ Hz e $J=10,9$ Hz), 3,56 ppm (t, 2H, $J=5,7$ Hz), 3,38 ppm (água), 3,15 ppm (s, 9H), 2,5 ppm (DMSO), 1,51-1,43 ppm (m 8H), 1,28-1,25 ppm (m, 8H).

Cromatogramas

Anexo 15. Tabela de picos e cromatograma (220nm) do fosfato de [10-(cicloexilmetoxi)decil][2-(trimetilamina)etil] (IX) em comparação com o branco.

Picos	Temp. de Ret.	Área	Altura	Larg. de 50% da Al.	Resolução	Fator de caud.	Área %	Conc. %
1	2.571	24253275	1922449	0.192	0.000	1.240	98.482	0.000
2	3.834	1888	347	0.089	5.196	0.000	0.008	0.000
3	4.487	310524	6598	0.763	0.935	0.000	1.261	0.000
4	5.475	28840	1745	0.000	0.000	0.000	0.117	0.000
5	5.850	32494	993	0.000	0.000	0.000	0.132	0.000
Total		24627021	1932131				100.000

Anexo 16. Tabela de picos e cromatograma (220nm) do fosfato de [10-(ciclobutilmetoxi)decil][2-(trimetilamina)etil] (IX) em comparação com o branco.

Picos	Temp. de Ret.	Área	Altura	Larg. de 50% da Al.	Resolução	Fator de caud.	Área %	Conc.%
1	2.535	9183496	766093	0.179	0.000	1.366	95.969	95.969
2	3.415	5186	926	0.093	3.957	1.566	0.054	0.054
3	3.600	1392	195	0.130	1.139	2.291	0.015	0.015
4	4.497	333780	7658	0.637	1.700	0.000	3.488	3.488
5	5.475	23989	1535	0.000	0.000	0.000	0.251	0.251
6	5.850	16220	762	0.000	0.000	0.000	0.170	0.170
7	6.380	5195	278	0.000	0.000	0.000	0.054	0.054
Total		9569257	777446				100.000

Espectroscopia no Infravermelho

Anexo 17. Espectro no Infravermelho por ATR-FTIR (600-4000 cm^{-1}) do intermediário fosfato de [10-(cicloexilmetoxi)decil][2-(trimetilamina)etil] (IX):

Anexo 18. Espectro no Infravermelho por ATR-FTIR (600-4000 cm^{-1}) do intermediário fosfato de [10-(ciclobutilmetoxi)decil][2-(trimetilamina)etil] (XIII):