UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Estudo da síntese de análogos benzil alquil éter da miltefosina e da erufosina

Luciana de Moura Bueno

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientadora:
Profa. Dra. Carlota de Oliveira Rangel Yagui

São Paulo
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Estudo da síntese de análogos benzil alquil éter da miltefosina e da erufosina

Luciana de Moura Bueno

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientadora:
Profa. Dra. Carlota de Oliveira Rangel Yagui

São Paulo
2016

LUCIANA DE MOURA BUENO

Estudo da síntese de análogos benzil alquil éter da miltefosina e da erufosina

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção de título de Mestre

Profa. Dra. Carlota de Oliveira Rangel Yagui

orientadora/presidente

_____

Profa. Dra. Daniela Gonçalves Rando

_____

Profa. Dra. Elizabeth Igne Ferreira

São Paulo, 16 de setembro de 2016.

Aos meus pais, Vera e José,
ao meu irmão, Lucas,
e ao meu parceiro, Patrick,
toda a minha gratidão
pela educação, incentivo e carinho.

À minha amada avó Eunice Vicente Laporte (*In memorian*)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF/USP) pela oportunidade de aprendizagem e contato com inúmeros profissionais qualificados.

Às agências de fomento, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - processo nº 2014/07811-7) pelas bolsas de mestrado.

À minha orientadora, Profa. Dra. Carlota de Oliveira Rangel Yagui, pela oportunidade e agregar conhecimento na minha formação profissional, além do incentivo e paciência.

Ao Prof. Dr. Leoberto Costa Tavares, por disponibilizar a infraestrutura laboratorial.

Ao Prof. Dr. Felipe Rebello Lourenço, pela contribuição nas discussões estatísticas da dissertação.

Aos meus pais, Vera e José, e ao meu irmão Lucas, por apoiarem as minhas decisões e acreditarem nos meus projetos de vida.

Ao meu parceiro, Patrick, pelo carinho, cuidado e preocupação tanto profissional quanto pessoal.

Aos meus amigos do laboratório, Alexsandra Apolinário, Larissa Bentim, João Murayama, Fanny Berl, Adelson Lopes, Cynthia Fernandes, Elys Cardoso, Fernando Gatti, Juliana Pachioni, Valker Feitosa, Talita Camila, e os muitos outros que também me acompanharam nessa etapa, agradeço a todos pela troca de conhecimento, amizade e carinho.

RESUMO

BUENO, L. M. **Estudo da síntese de análogos benzil alquil éter da miltefosina e da erufosina.** 2016. 63f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

O câncer corresponde a um conjunto de doenças que vem aumentando sua incidência durantes os anos e atualmente é considerado um problema mundial. Os tratamentos tradicionais em sua grande maioria agem no maquinário genético e causam citotoxicidade, debilitando o paciente. Desta forma, a busca por novos fármacos é de fundamental importância para se encontrar moléculas mais seletivas e menos tóxicas para o paciente. A classe dos alquilfosfolipídeos tem se destacado por apresentar vários análogos com atividade antitumoral atuando na membrana celular, sendo a miltefosina o protótipo estrutural. A miltefosina exibe potente atividade antitumoral *in vitro* e frente a alguns modelos tumorais, sendo aprovada clinicamente para o uso tópico em metástases cutâneas de câncer de mama. No entanto, este fármaco apresenta toxicidade gastrointestinal e ação hemolítica. A partir desse protótipo, novos análogos foram sintetizados chegando à estrutura da erufosina, análogo homocolínico da miltefosina, com atividade antitumoral e com administração via intravenosa, por ser menos hemolítica. Outros estudos evidenciam que grupos volumosos na parte apolar também reduzem a atividade hemolítica. Portanto, nesse trabalho estudamos a síntese de análogos benzil alquil éter da miltefosina e da erufosina. Tentativas de síntese foram realizadas por meio da síntese de intermediários éteres ω-hidroxibenzilalquílicos, sendo a obtenção desses intermediários otimizada por meio de planejamento fatorial e mudança do reagente haleto de benzila. A melhor condição reacional foi definida a temperatura ambiente por 6h, com rendimento reacional de 38% e 43% para 10-(benziloxi)decan-1-ol e 12-(benziloxi)dodecan-1-ol, respectivamente. Para a formação dos análogos benzil alquil éter da miltefosina e da erufosina, diversas condições foram testadas empregando-se a reação dos éteres ω-hidroxibenzilalquílicos com oxicloreto de fósforo e, subsequentemente, com *N*-metiletanolamina ou *N*-metilpropanolamina, para análogos da miltefosina e da erufosina, respectivamente. Na sequência, a *N*-metilação com iodeto de metila foi realizada para os análogos da erufosina. No caso

da miltefosina, estudou-se a síntese de um análogo *N*-metilfosfoetanolamínico. A confirmação dos respectivos produtos de interesse e o grau de pureza foram inferidos por análises de RMN. Devido à complexidade das rotas e, principalmente, à dificuldade de purificação pelo caráter anfifílico das moléculas sintetizadas, os compostos ainda não foram obtidos em quantidade e grau de pureza suficientes para testes biológicos *in vitro*. Entretanto, esse estudo aponta para a possibilidade da utilização da rota proposta para obter os compostos planejados, com necessidade de se aprimorar a etapa final de purificação dos compostos obtidos.

Palavras-chaves: câncer, antitumoral, alquilfosfolipídeos, miltefosina, erufosina.

ABSTRACT

BUENO, L. M. **Study of the synthesis of benzyl alkyl ether analogs of miltefosine and erufosine.** 2016. 63f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Cancer corresponds to a group of diseases with increasing incidence over the years, and is currently considered a global problem. Traditional treatments mostly act on the genetic machinery causing cytotoxicity and debilitating patients. Therefore, the search for new drugs is of paramount importance to find more selective and less toxic drugs. The class of alkylphospholipids deserves attention for presenting several analogs with antitumor activity by acting on the cell membrane. This class has miltefosine as a structural prototype. Miltefosine exhibits potent antitumor activity *in vitro* and against some tumor models, and has been clinically approved for topical use in cutaneous metastases of breast cancer. However, this drug is associated with gastrointestinal toxicity and hemolytic activity. From this prototype, new analogs were synthesized resulting in erufosine, which besides antitumor activity is capable of stimulating the production of human bone marrow cells and can be administered intravenously, since it is less hemolytic. Other studies show that the presence of bulky groups in the nonpolar moiety of alkylphospholipids also reduces the hemolytic activity. In this work, we designed benzyl alkyl ether analogs of miltefosine and erufosine. We studied the synthesis of ω-hydroxibenzylalkyl ethers intermediates by means of a factorial design and studying the alkyl halide to be employed. Best reaction condition was defined as room temperature and reaction time of 6h, with yields of 38% and 43% for 10-(benzyloxy)decane-1-ol and 12-(benzyloxy)dodecane-1-ol, respectively. For the benzyl alkyl ether analogs, several reaction conditions were investigated by reacting the ω-hydroxibenzylalkyl ethers with phosphorus oxychloride and subsequently with *N*-methyl propanolamine (for erufosine analogs) or *N*-methyl ethanolamine (for miltefosine analog). In the sequence, *N*-methylation with methyl iodide was carried out for erufosine analogs. For mitefosine, the analog obtained was an *N*-methylphosphoethanolamine. Structures confirmation was based on NMR analysis. Owing to the complexity of the synthetic routes and mainly difficulty in purification of amphiphilic molecules, the analogs panned were not obtained in adequate quantities and degree of purity to be submitted to *in vitro* biological test.

Nonetheless, this study already points to the possibility of the synthetic routes investigated to obtain the compounds designed, with need to improve final purification steps.

Keywords: cancer, antitumor activity, alkylphospholipids, miltefosine, erufosine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática das conformações das moléculas de miltefosina, erufosina, e os agregados supramoleculares formados pela miltefosina e erufosina..... 17
Figura 2 - Linha do tempo dos alquilfosfolipídeos..... 22
Figura 3 - Representação esquemática dos formatos das moléculas de miltefosina e erucilfosfocolina (ErPC), e dos agregados supramoleculares formados por estas moléculas..... 24
Figura 4 - Equilíbrio entre monômeros e formação da micela..... 25
Figura 5 - Componentes da equação do parâmetro crítico de empacotamento..... 26
Figura 6 - Figura dos análogos benzil alquil éter da erufosina planejados 27
Figura 7 - Figura do benziloxidecil *N*-metil fosfoetanolamina..... 27
Figura 8 - Reação com cloreto de benzila..... 29
Figura 9 - Reação com brometo de benzila..... 31
Figura 10 - Esquema sintético dos análogos da erufosina..... 32
Figura 11 - Estrutura química do benziloxidecil *N*-metil fosfoetanolamina. 34
Figura 12 - Gráfico de contornos para o rendimento reacional (%) em função do tempo (h) e temperatura (ºC) de reação..... 40
Figura 13 - Superfície resposta do efeito do tempo reacional (h) e da temperatura (ºC) sobre o rendimento reacional (%)..... 41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Planejamento experimental 2^2 mais ponto central, referente à reação de formação do alcóxido..... 30
Tabela 2 - Valores de cLogP calculado para as moléculas monossubstituída (A) e dissubstituída (B), partindo-se do álcool 1,10-decanodiol..... 36
Tabela 3 - Valores de cLogP calculado para as moléculas monossubstituída (A) e dissubstituídas (B), partindo-se do 1,12-dodecanodiol..... 37
Tabela 4 - Planejamento experimental 2^2 mais ponto central, referente à reação de formação do alcóxido, bem como resultados obtidos expressos em rendimento da produção do éter..... 39
Tabela 5 - Análise de regressão multivariável para o rendimento reacional (%) em função das variáveis do estudo na forma codificada..... 40
Tabela 6 - Análise de variância do modelo de regressão multivariável para rendimento reacional (%)..... 40
Tabela 7 - Rendimento reacional dos éteres ω-hidroxibenzilalquílicos em cada ensaio realizado..... 43
Tabela 8 - Valores de cLogP do produto e dos subprodutos da síntese a partir do 10-(benziloxi)decan-1-ol..... 45

LISTA DE ABREVIATURAS

APCs	alquifosfocolinas
APLs	alquilfosfolipídeos
BnBr	brometo de benzila
CCD	cromatografia em camada delgada
$CDCl_3$	clorofórmio deuterado
CD_3OD	metanol deuterado
cLogP	coeficiente de partição computacional
CMC	concentração micelar crítica
DMF	*N*,*N*-dimetilformamida
Et_3N	trietilamina
ErPC	erucilfosfocolina
ErPC3	erufosina
HETCOR	correlação heteronuclear
NaCl	cloreto de sódio
MeOH	metanol
POPC	palmitoil oleoil fosfatidilcolina
RMN	ressonância magnética nuclear
TCE	tricloroetileno
μ	momento dipolo elétrico

ANEXOS

Anexo 1 - Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do 10-(benziloxi)decan-1-ol..... 55
Anexo 2 - Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) do 10-(benziloxi)decan-1-ol..... 56
Anexo 3 - Espectro de HETCOR ^{1}H-^{13}C ($CDCl_3$) do 10-(benziloxi)decan-1-ol registrado a 30 °C..... 57
Anexo 4 - Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do 12-(benziloxi)dodecan-1- ol..... 58
Anexo 5 - Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) do 12-(benziloxi)dodecan-1-ol..... 59
Anexo 6 - Espectro de HETCOR ^{1}H-^{13}C (CDCl3) do 12-(benziloxi)dodecan-1-ol registrado a 30 °C..... 60
Anexo 7 - Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, CD_3OD) indicando os principais sinais para a identificação do benziloxidecil fosfo-homocolina.. 61
Anexo 8 - Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do benziloxidecil *N*-metil fosfoetanolamina..... 62
Anexo 9 - Ficha do aluno..... 63
Anexo 10 - Informações para os Membros da Banca Julgadoras de Mestrado..... 65

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA 15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 18
2.1 Neoplasia 18
2.2 Alquilfosfolipídeos 20
3. OBJETIVO 27
4. MATERIAL E MÉTODOS 28
4.1 Material 28
4.2 Métodos Analíticos 28
4.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD) 28
4.2.2 Cromatografia em coluna 28
4.2.3 Espectrometria por Ressonância Magnética Nuclear 29
4.2.4 Métodos de obtenção dos análogos alcoxibenzilalquilfosfo-homocolínicos 29
4.2.4.1 Obtenção dos éteres ω-hidroxibenzilalquílicos 29
4.2.4.1.1 Reação com cloreto de benzila 29
4.2.4.1.1.1 Planejamento Fatorial 30
4.2.4.1.2 Reação com brometo de benzila 31
4.2.4.2 Obtenção dos análogos da erufosina 31
4.2.4.3 Obtenção do análogo *N*-metilfosfoetanolamínico da miltefosina (VI) 33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 35
5.1 Síntese dos éteres ω-hidroxibenzilalquílicos 35
5.1.1 Reação com cloreto de benzila 35
5.1.1.1 Síntese do 10-(benziloxi)decan-1-ol 35
5.1.1.2 Síntese do 12-(benziloxi)dodecan-1-ol 36
5.1.1.3 Planejamento Fatorial 38
5.1.2 Reação com brometo de benzila 41
5.1.2.1 Síntese do 10-(benziloxi)decan-1-ol 41
5.1.2.2 Síntese do 12-(benziloxi)dodecan-1-ol 42
5.1.3 Análise das sínteses dos éteres ω-hidroxibenzilalquílicos 42
5.2 Síntese dos análogos da erufosina 43
5.3.1 Síntese do benziloxidecil *N*-metil fosfoetanolamina 46
6. CONCLUSÃO 47
REFERÊNCIAS 49
ANEXOS 55

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A cada ano o câncer vem crescendo tanto em incidência quanto em número de óbitos, evidenciando ser um problema mundial significativo (INCA, 2015). A taxa de mortalidade mundial relacionada ao câncer é maior do que a soma das relacionadas à AIDS/HIV, tuberculose e malária. Em uma avaliação quantitativa, uma em cada sete mortes mundiais está relacionada ao câncer. Em 2012, foram estimados mais de 14 milhões de diagnósticos e por volta de 8 milhões de mortes no mundo. Em 2030, valores ainda maiores são estimados, devido ao crescimento demográfico e ao número de idosos, com 21,7 milhões de novos casos e 13 milhões de mortes devidas ao câncer (ACS, 2016).

No Brasil foram estimados 600 mil novos casos para o biênio 2016-2017. O tipo de câncer de maior incidência em ambos os sexos é o câncer de pele não melanoma, mas ao excluí-lo e separando o restante por gênero, observa-se a seguinte ordem decrescente de incidência: homens - próstata, pulmão, intestino, estômago e cavidade oral; mulheres - mama, intestino, colo do útero, pulmão e estômago (INCA, 2015).

Existem três planos de prevenção ao câncer em diferentes fases da carcinogênese: prevenção primária, secundária e terciária. A primária está direcionada à exclusão das causas do câncer, como por exemplo alteração do estilo de vida ou imunização (MACHADO; LEAL, 2013). Esta prevenção engloba o tabagismo, que é o maior causador de mortes mundiais e o principal fator que causa o tipo de câncer de maior incidência mundial, o câncer de pulmão (INCA, 2015; ACS, 2016). A prevenção secundária foca na redução da morbimortalidade e envolve identificação prévia nos pacientes assintomáticos, impedindo o avanço da doença. Por fim, a prevenção terciária relaciona-se ao tratamento do enfermo com câncer, prevenindo o seu óbito ou adversidades que a doença possa causar (MACHADO; LEAL, 2013).

O tratamento para o câncer tradicionalmente envolve uma combinação de terapias, sendo as mais comuns a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia. Os atuais quimioterápicos focam na inibição do crescimento tumoral ou na eliminação

das células tumorais por meios diversos, como agentes causadores de apoptose ou por induzirem citotoxicidade (SALEM, 2015).

Os quimioterápicos, na sua grande maioria, por não apresentarem seletividade de alvo, proporcionam danos tanto em células tumorais quanto nas células saudáveis. Por também atuarem em células sadias, há inúmeros efeitos colaterais com estas terapias, como a supressão da medula óssea, lesão no trato gastrointestinal, queda de cabelo e náusea (ABDALLA; SILVA, 2013; SALEM, 2015). Além dos efeitos causados pela falta de seletividade de atuação, o tumor pode acabar desenvolvendo vias metabólicas paralelas, adaptando-se aos efeitos dos agentes tóxicos (SALEM, 2015). Desta forma, a descoberta de novos fármacos e outras abordagens, como terapias envolvendo alvos moleculares mais específicos, se fazem necessárias (WUJCIK, 2014; ACS, 2016).

Dentre as inúmeras classes de moléculas sintéticas, os alquilfosfolipídeos (APLs) têm se destacado por apresentarem uma gama de estudos relatando atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*. Os APLs exibem uma vantagem diferencial em relação aos quimioterápicos tradicionais, pois enquanto os medicamentos tradicionais precisam atravessar a barreira celular para atuarem no material genético, esta classe age prontamente na membrana celular (VAN BLITTERSWIJK; VERHEIJ, 2013).

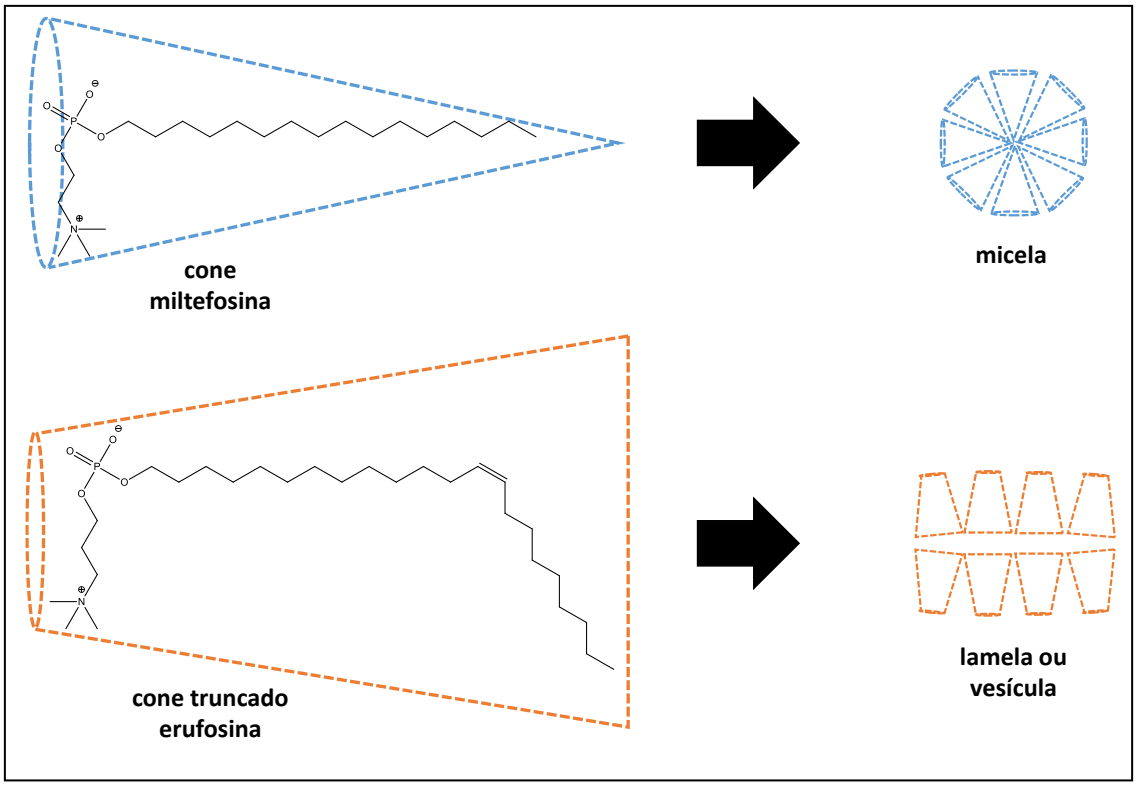
A classe dos APLs tem como protótipo a miltefosina, que é utilizada no tratamento tópico de metástases cutâneas de câncer de mama e no tratamento das três principais formas de leishmaniose (LEONARD et al., 2001; RAMA; KUMAR; BALAJI, 2015). Por mostrar toxicidade gástrica e atividade hemolítica, este protótipo sofreu modificações estruturais que, após o estudo de várias séries congêneres, resultou na descoberta do análogo homocolínico erufosina (VAN BLITTERSWIJK; VERHEIJ, 2013).

A erufosina representa um grande avanço para a classe dos APLs pois pode ser administrada via intravenosa, apresenta menor efeito hemolítico e estimula a produção de células da medula óssea humana (ZAHARIEVA et al., 2007; YOSIFOV et al., 2011). Uma das possíveis explicações para a reduzida atividade hemolítica se deve à forma geométrica e tipo de agregação em meio aquoso que estas moléculas assumem. Por ter forma de cone, a miltefosina em água se agrega

preferencialmente em micelas. No caso da erufosina, agregados vesiculares ou lamelares tendem a se formar sob determinadas condições (Figura 1).

Com base nas vantagens apresentadas pela erufosina, em estudos que mostram que grupamentos cíclicos ligados à cadeia alquílica dos APLs resultam em análogos com maior atividade antitumoral (PAPAZAFIRI et al., 2005) e unindo as informações de dados experimentais de potencial hemolítico de APLs que constatam que a presença de porções catiônicas menores e grupamentos volumosos como anéis no final da cadeia alquílica resultam em compostos menos hemolíticos (SÁ et al., 2014), nesse trabalho planejou-se e estudou-se a síntese de análogos da miltefosina e da erufosina potencialmente menos tóxicos e esperando terem maior atividade antineoplásica.

Figura 1 - Representação esquemática das conformações das moléculas de miltefosina, erufosina e os agregados supramoleculares formados pela miltefosina e erufosina.



Fonte: o autor.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Neoplasia

As neoplasias são agregados celulares que possuem taxa de crescimento descontrolada e maior do que as células normais, podendo também serem denominadas tumores. Existem classificações mais específicas para as neoplasias como, por exemplo, pelo comportamento biológico, aspectos clínico ou morfológico; entretanto, no geral, podem ser denominadas como benignas e malígnas (ALVES; MELLO; FILHO, 2013).

As células de tumores benignos proliferam lentamente, sendo que esta expansão é condensada e sem invasão de tecidos circunvizinhos, possuindo um limite bem definido (ALVES; MELLO; FILHO, 2013).

Os tumores malignos são também nomeados de cânceres. Seu desenvolvimento faz com que ocorra deslocamento de células e formação de colônias neoplásicas nos tecidos adjacentes ou em vasos sanguíneos e linfáticos, que as levarão para outras localidades e formarão uma nova colônia, sendo este processo denominado metástase. Sua expansão crescente nem sempre equivale à taxa de crescimento dos vasos sanguíneos, gerando zonas de necrose intratumorais por falta de nutrientes (ALVES; MELLO; FILHO, 2013).

O câncer é uma doença genética que expressa os genes de forma descontrolada devido as mutações do DNA. Embora a etiologia dos diversos tipos de cânceres ainda seja desconhecida, inúmeros fatores podem influenciar na incidência, distribuição geográfica e no comportamento específico do câncer, tendo como exemplo: sexo, idade, etnia, predisposição genética e exposição a carcinógenos ambientais (STRICKER; KUMAR, 2010).

Os tratamentos mais eficientes para o câncer são a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia. Na quimioterapia ocorre a utilização de fármacos para destruir (citotóxico) ou limitar a proliferação (citostático) das células tumorais. 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, os antimetabólitos, os compostos antimitóticos e os análogos da camptotecina.

Os agentes alquilantes são fármacos que se ligam covalentemente com biomacromoléculas provocando a morte celular, tendo como exemplos dacarbazina, procarbazina e temozolomida (PUYO; MONTAUDON; POURQUIER, 2014). Os antimetabólitos são antineoplásicos que apresentam semelhança estrutural com os metabólitos naturais das vias bioquímicas e competem pelos sítios ativos interrompendo a cascata reacional corpórea, os quais podem ser exemplificados pelo metrotexato, fluorouracila e mercaptopurina (HERTZ; RAE, 2015). Os compostos antimitóticos são fármacos que interrompem o ciclo mitótico na etapa de metáfase por agir na tubulina, proteína formadora dos microtúbulos. Alguns exemplos desses fármacos são vimblastina, vincristina e paclitaxel (BATES; EASTMAN, 2016). 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. Nesse grupo de fármacos incluem-se irinotecano e topotecano (KAI et al., 2015). Essas substâncias, entretanto, geralmente apresentam citotoxicidade considerável, agindo tanto em células tumorais quanto em células saudáveis. Desta maneira, regiões onde as células apresentam taxa de crescimento acelerada sofrem efeitos colaterais mais pronunciados no indivíduo, sendo os mais comuns a supressão da medula óssea, lesão no trato gastrointestinal, queda de cabelo e náusea (NUSSBAUMER et al., 2011).

A terapia do câncer sofreu mudança significativa com o surgimento de fármacos 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, ativada por fatores de crescimento (VINK et al., 2005). Alguns genes, denominados oncogenes, podem levar à superexpressão das proteínas constituintes dessas vias, o que por sua vez, resulta em aumento do número de células, devido ao fato de estarem em constante processo de ativação. Na tentativa de interromper esse ciclo, foram desenvolvidos os inibidores de proteínas quinases. O primeiro fármaco aprovado, em 2001, com esse mecanismo de ação foi o imatinibe, empregado principalmente para o tratamento da leucemia mielóide crônica (LMC) (DOBBIN; GADELHA, 2002). Devido

ao sucesso observado com este fármaco, vários novos inibidores de proteínas quinases têm sido estudados. Como exemplo de fármacos já disponíveis, podem-se citar inibidores de EGFR (*Epidermal Growth Factor*) erlotinibe, gefitinibe e lapatinibe; e os inibidores de VEGFR (*Vascular Epidermal Growht Factor*) sunitinibe, sorafenibe e pazopanibe. Além disso, merece destaque o grupo dos alquilfosfolipídeos sintéticos, que se acredita exercer efeito farmacológico sobre proteínas quinases, embora seu mecanismo de ação ainda não seja totalmente elucidado (PACHIONI et al., 2013).

2.2 Alquilfosfolipídeos

Desde o início da década de 1970 já havia confirmação de atividade antitumoral de alguns éteres de fosfolipídeos. A partir de então, teve início a síntese de inúmeros análogos desta classe (BRACHWITZ; VOLLGRAF, 1995). Em 1980, Eibl e Unger (1990) identificaram a hexadecilfosfocolina (miltefosina, Figura 2) com a ausência do glicerol e a definiram como exigência mínima estrutural dos alquifosfolipídeos (APL). A miltefosina exibe potente atividade antitumoral *in vitro* e frente a alguns modelos tumorais *in vivo* (UNGER et al., 1989; MARINO et al., 2015). A miltefosina tornou-se, então, o protótipo das alquilfosfocolinas (APC), derivadas dos APL (VINK et al., 2007).

Estudos sobre o mecanismo de ação destes fármacos demonstraram que eles atuam inibindo vias de sinalização celular desencadeadas em proximidade à membrana celular, incluindo vias que são sabidamente ativadas pelas Ras GTPases. Por exemplo, os alquilfosfolipídeos inibem a interação das Ras GTPases com as Raf-1, desta forma, bloqueando a via de sinalização das "*mitogen activated protein kinases*" (MAPK) (SAMADDER et al., 2003; VINK et al., 2007). Estes compostos também inibem diretamente a via de sinalização da "*phosphatidylinositol-3-kinase" (*PI3K) (RUITER et al., 2003; VINK et al., 2007), uma via também acionada pelas Ras GTPases.

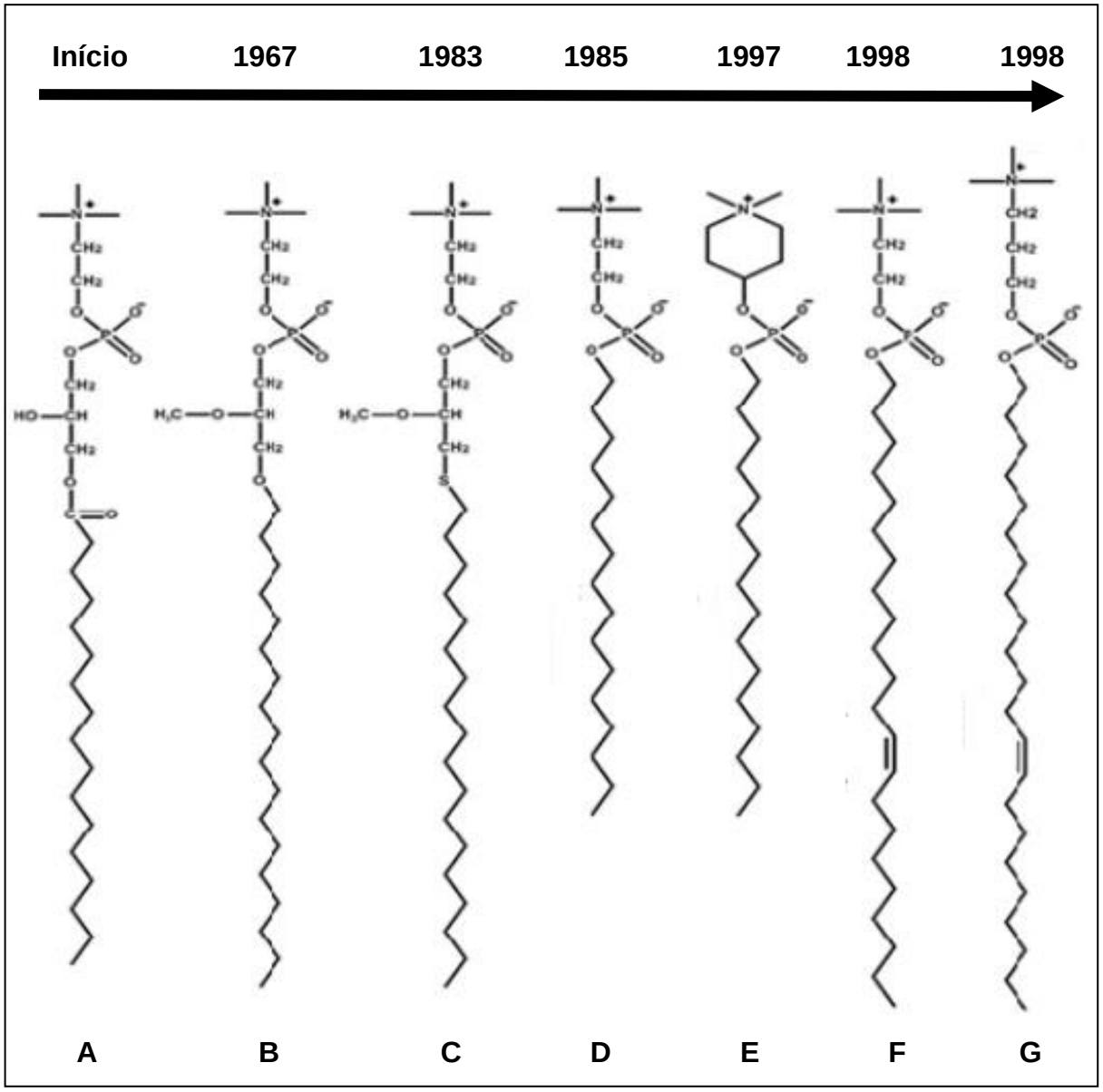
Estudo realizado por Jiménez-López e colaboradores (2010) foi observada a ação da miltefosina no impedimento da formação do esfingolipídeo, com acúmulo interno da serina, e de esterificação do colesterol, pertubando a homeostase do colesterol no organismo. Estas mudanças proporcionadas pela miltefosina têm inúmeras consequências como, por exemplo, alterações nas proporção desses

componentes da membrana celular; ou comprometimento da funcionalidade dos microdomínios lipídicos de membrana (*lipid rafts*) que podem danificar a integridade da membrana aumentando sua permeabilidade ou desregular sua funcionalidade e suas vias de sinalização. Um estudo computacional realizado com a miltefosina interagindo com bicamadas ratifica a propensão da interação da miltefosina com colesterol, e também com os *lipid rafts* (SÁ et al., 2015).

Finalmente, um dos alvos mais bem caracterizados desta classe farmacológica é a proteína quinase serina-treonina (PKC) (ÜBERALL et al., 1991; VINK et al., 2007). A família da PKC contém enzimas agindo nas vias de transdução e através da fosforilação das hidroxilas dos resíduos de serina e treonina, controlando assim a síntese de outras proteínas. Em 1991, a miltefosina mostrou inibir a PKC de forma competitiva com a fosfatidilserina e não competitiva com Ca^{2+} (SHOJI et al., 1991). Em 2015, Sá & Rangel-Yagui mostraram através de estudos computacionais as possíveis interações de APC no domínio C2 da subfamília PKCα. No modelo simulado, observaram mudanças conformacionais causadas pelos ligantes ALP e APC no domínio de ligação de cálcio e também um efeito de "*packing mismatch*" entre os lipídios de membrana e as caudas apolares de ALP/APC que parece impeder o ancoramento do domínio C2 da PKCα no folheto interno da mmbrana, interrompendo a ativação dessa proteína (SÁ; RANGEL-YAGUI, 2015).

Devido à interação com membrana, a miltefosina causa toxicidade gastrointestinal e efeito hemolítico (KOTTING et al., 1992). Estudos antineoplásicos realizados em pacientes com sarcomas metastáticos de tecido mole administrando 150 mg/dia e de câncer coloretal com dose de até 200 mg/dia evidenciaram doses limites de tolerância gástrica para esse fármaco quando administrado via oral (PLANTING; STOTER; VERWEIJ, 1993; VERWEIJ et al., 1993). Entretanto, a miltefosina aplicada topicamente 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 metástases cutâneas do câncer de mama (LEONARD et al., 2001). Além de sua aplicação como agente anticancerígeno, a miltefosina é atualmente utilizada via oral com dose máxima de 100 mg/dia no tratamento de leishmaniose (BERMAN, 2006; PACHIONI et al., 2013).

Figura 2 - Linha do tempo dos alquilfosfolipídeos.



A= lisofosfatidilcolina; B= edelfosina; C= ilmofosina; D= miltefosina; E= perifosina; F= erucilfosfocolina ou ErPC; G=erufosina ou ErPC3.

Fonte: Adaptado de PACHIONI et al., 2013.

A miltefosina foi o primeiro fármaco regulamentado para utilização via oral no tratamento de leishmaniose visceral. Um estudo realizado na Índia, sobre tal tratamento, revelou algumas das preocupações com relação a este fármaco, como o problema de adesão ao tratamento, que pode levar à seleção de resistência do parasita ao medicamento e à teratogenicidade. Dessa forma, sugeriu-se um tempo curto de utilização da miltefosina associada a qualquer outro medicamento para o tratamento deste tipo de leishmaniose (SUNDAR; OLLIARO, 2007).

Através de estudos de variação estrutural das alquilfosfocolinas, desenvolveu-se a perifosina (Figura 2E), considerada um análogo de segunda geração (ALAM et al., 2012). Este composto é um alquilfosfolipídeo heterocíclico que apresenta um anel piperidínico *N*-dimetilado em substituição ao trimetilamônio da porção colina. Este anel promove maior estabilidade quando comparado com a estrutura da miltefosina e isso é observada no estudo de Vink e colaboradores (2005) através do tempo de meia vida, sendo para a miltefosina 96 horas e perifosina, 137 horas.

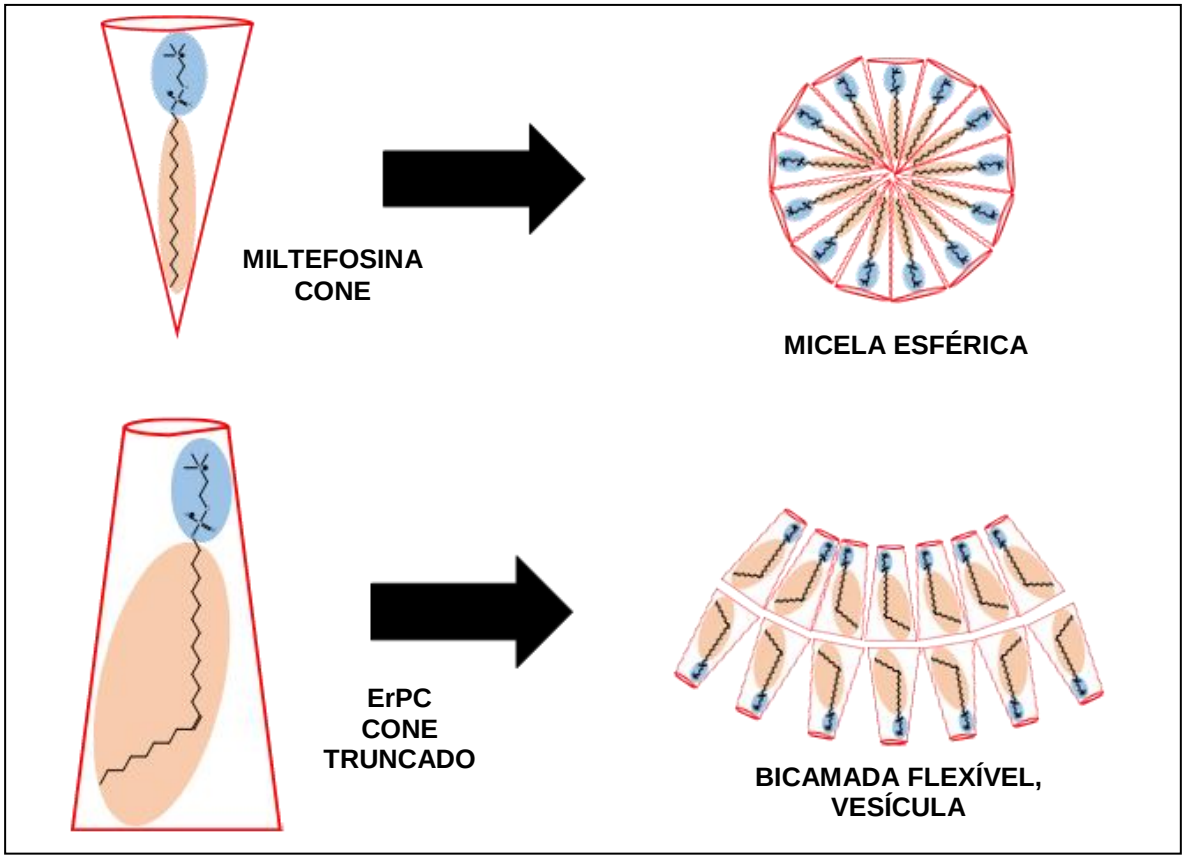
A perifosina apresenta melhor índice terapêutico em comparação à miltefosina sob linhagens de células cancerígenas humanas, como melanoma, cólon, pulmão, próstata (HILGARD et al., 1997). Quando administrada via oral em camundongos portadores de tumor, exibe eliminação lenta e alta distribuição nos tecidos saudáveis (VINK et al., 2005). Estudos mostram que pacientes com tumores sólidos toleram uma dose máxima de perifosina de 600 mg/semana, quando administrada nas refeições e com antieméticos para profilaxia, já que náusea e vômitos são alguns dos principais efeitos adversos do fármaco (UNGER et al., 2010).

Novos estudos de modificação estrutural levaram à síntese da erucilfosfocolina (ErPC, Figura 2F), primeiro análogo do grupo das alquilfosfocolinas a ser utilizado por via parenteral, apresentando significativa atividade antineoplásica *in vitro* e *in vivo* em animais. A ErPC tem grande acúmulo no tecido cerebral, tendo potencial quimioterápico frente a tumores malignos cerebrais (ERDLENBRUCH et al., 1999). A partir da erucilfosfocolina, surgiu seu homólogo erufosina (erucilfosfo-homocolina, ErPC3; Figura 2E), representante da terceira geração das alquilfosfocolinas com grande eficácia citotóxica e potencial hemolítico reduzido, em virtude da sua cadeia alquílica longa e insaturada (ZAHARIEVA et al., 2007). As alquilfosfocolinas de terceira geração apresentaram efeito citotóxico e citostático em linhagens de células cancerígenas humanas e em linhagens malignas de glioma em ratos (JENDROSSEK et al., 2002). Além disso, em 2011 Yosifov e colaboradores observaram que a erufosina, em vantagem a inúmeros antineoplásicos, estimula a produção de células da medula óssea humana.

O reduzido efeito hemolítico das alquilfosfocolinas de terceira geração pode ser atribuído ao fato de estas moléculas em meio aquoso, devido ao seu parâmetro crítico de empacotamento (de 1/3 a 1), formarem preferencialmente bicamadas flexíveis (lamelas) e/ou vesículas, ao invés de micelas. Neste sentido, qualquer abordagem que altere o padrão estrutural das moléculas para formato de cone

truncado ao invés de cone, deve favorecer o empacotamento estrutural em agregados lamelares ao invés de micelares, conforme representado na Figura 3 (ISRAELACHVILI, 2011).

Figura 3 - Representação esquemática dos formatos das moléculas de miltefosina e de erucilfosfocolina (ErPC), e dos agregados supramoleculares formados por estas moléculas.

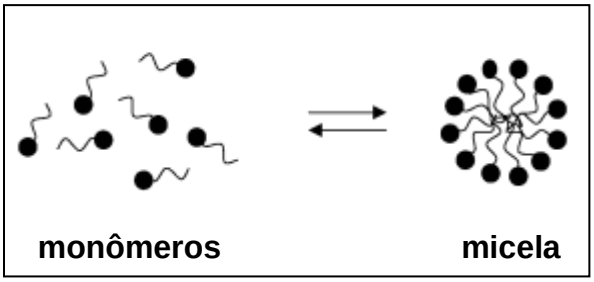


Fonte: Adaptado de ISRAELACHVILI, 2011.

A miltefosina em concentração micelar crítica (CMCs) baixas se apresenta na forma de monômeros solúveis em água. Entretanto, com o aumento da CMC, pode-se observar o fenômeno da saturação da interface ar-água pelos respectivos monômeros, formando estruturas micelares consideradas agregados altamente dinâmicos (MOREIRA et al., 2013). O processo de equilíbrio desses monômeros com as micelas ocorre em questão de microssegundos (FIGURA 4), tendo seu empacotamento características instáveis quando comparado com outras estruturas agregadas, como por exemplo as bicamadas (SCHREIER; MALHEIROS; PAULA, 2000). No trabalho de Rakotomanga e colaboradores (2004), constatou-se a

interação micelar da miltefosina às membranas monolamerales lipídicas de esteróis e POPC (palmitoil oleoil fosfatidilcolina). Essa interação das micelas de miltefosina fazem com que as mesmas se desagreguem em grupamentos de monômeros que, por sua vez, adentram tais membranas celulares, causando, como consequência, a ruptura da membrana (MOREIRA et al., 2013). A ErPC, por ser mais lipofílica que a miltefosina, devido à sua cadeia volumosa apolar, forma estruturas vesiculares de caráter pseudo-lamelar em altas concentrações em solução aquosa, e por isso, assim como a erufosina, apresenta efeito hemolítico reduzido (EIBL; KAUFMANN-KOLLE, 1995; HENKE et al., 2012).

Figura 4 - Equilíbrio entre monômeros e formação da micela.



Fonte: Adaptado de RANGEL-YAGUI; PESSOA-JR; TAVARES, 2005.

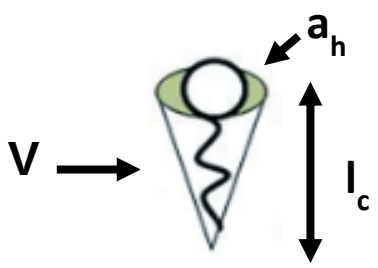
Neste mesmo sentido, Papazafiri e colaboradores (2005) mostraram que a presença de cicloalcanos na porção lipídica de análogos de alquilfosfocolinas reduz efeitos hemolíticos quando comparados à miltefosina, sendo que a maioria dos análogos estudados por estes autores apresentou melhora na atividade antineoplásica. Mais recentemente, esta mesma correlação também foi observada para atividade antileishmania (CALOGEROPOULOU et al., 2008). Claramente, a adição de estruturas cíclicas na porção lipídica de alquilfosfocolinas altera o parâmetro crítico de empacotamento e deve resultar em estruturas do tipo cone truncado. A equação abaixo apresenta o cálculo deste parâmetro (ISRAELACHVILI, 2011).

$$s = \frac{V}{a_h \cdot l_c} \qquad \text{Eq. 1}$$

Em que s corresponde ao parâmetro crítico de empacotamento (Figura 5), V é o volume ocupado pela cauda apolar (27,4 $Å^3$ para os grupos CH_3 e 26,9 $Å^3$ para os grupos CH_2), a_h corresponde à área da seção transversal da cabeça polar e l_c é o

comprimento da cadeia alquílica, que pode ser obtido com base no valor da distância entre a ligação carbono-carbono (1,265 Å). Valores de “s” menores que 1/3 resultam em estrutura espacial cônica, enquanto que valores entre 1/3 e 1 determinam a predominância da estrutura espacial de cone truncado. No caso da presença de anéis na porção apolar, aproximações são necessárias para o cálculo, mas a observação espacial destas moléculas já nos permite inferir que as mesmas tendem à estrutura de cone truncado.

Figura 5 - Componentes da equação do parâmetro crítico de empacotamento.



V= volume da cauda apolar;
$\mathbf{a_h}$= área de secção transversal da cabeça polar;
$\mathbf{l_c}$ = comprimento da cauda hidrocarbônica.

Fonte: Adaptado de ISRAELACHVILI, 2011.

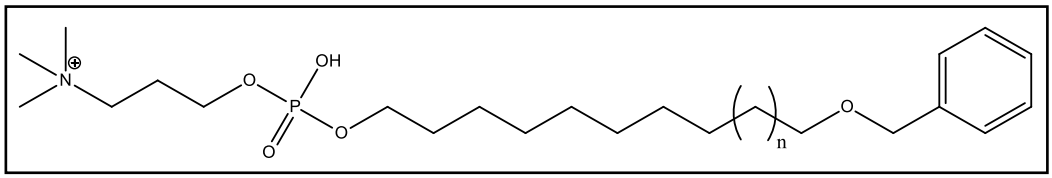
Portanto, a estratégia de adição de cicloalcanos ou grupamentos isósteros na porção lipídica de análogos das alquilfosfocolinas, aliada à recente alteração da porção colina realizada na erufosina (análogos homocolínicos), pode resultar em análogos com menor efeito hemolítico e potencialmente mais ativos.

Tendo em vista o exposto, neste trabalho estudamos a síntese de análogos da miltefosina e da erufosina, na busca por alquilfosfolipídeos menos tóxicos e mais ativos como antineoplásicos.

3. OBJETIVO

O principal objetivo deste trabalho consistiu em sintetizar análogos benzil alquil éter da erufosina (Figura 6), na busca por alternativas mais potentes e menos hemolíticas para o tratamento do câncer. Posteriormente, as moléculas planejadas e cuja síntese foi estudada nesse trabalho poderão ser submetidas à ensaios de atividade antitumoral e de potencial hemolítico.

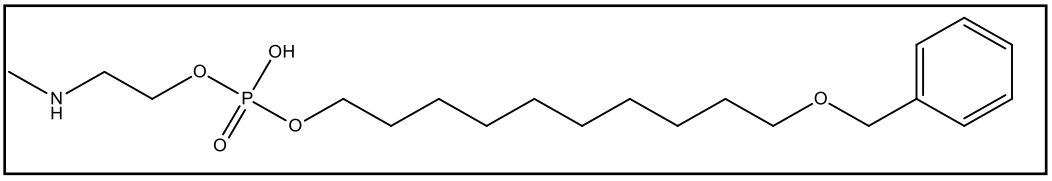
Figura 6 - Figura dos análogos benzil alquil éter da erufosina planejados.



n= 1,3.

Outro objetivo deste trabalho foi a síntese do composto benziloxidecil *N*-metil fosfoetanolamina (Figura 7) diferenciando-se dos análogos anteriores por não apresentar a amina quaternária na porção polar. O propósito de planejar essa molécula foi primeiramente a facilidade na sua rota sintética, por causa da ausência de carga. Em um segundo momento, poder compará-la com os análogos da erufosina, ao se testar uma molécula que não possui o nitrogênio quaternário na porção polar da mesma e a influência de tal característica na atividade e efeito hemolítico.

Figura 7 - Figura do benziloxidecil *N*-metil fosfoetanolamina.



4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Os dióis (1,10-decanodiol e 1,12-dodecanodiol), hidreto de sódio, cloreto de benzila, brometo de benzila, oxicloreto de fósforo, *N*-metilpropanolamina, *N*-metiletanolamina e iodeto de metila foram obtidos da Sigma Aldrich®. Os demais solventes e reagentes utilizados nos procedimentos foram de pureza analítica (P.A.).

4.2 Métodos Analíticos

4.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

As reações foram acompanhadas por CCD, empregando-se cromatoplacas de alumínio cobertas com sílica GF_{254} (Merck®), eluição com hexano/acetato de etila (3:1 e 4:1, v/v), clorofórmio/metanol (9:1, v/v) e clorofórmio/metanol/água (65:25:5, v/v/v).

4.2.2 Cromatografia em coluna

Os éteres ω-hidroxibenzilalquílicos obtidos foram purificados por cromatografia em coluna (40 cm de altura e diâmetro interno 1,5 cm) preparada com fase estacionária de sílica-gel (70-230 mesh, grau analítico, poro de 60 Å, Sigma Aldrich®) e fase móvel hexano/acetato de etila (3:1 e 4:1, v/v).

Os análogos da erufosina sintetizados foram purificados por cromatografia em coluna (4 cm de altura e diâmetro interno 2 cm) preparada com fase estacionária de sílica-gel, idêntica à utilizada para os éteres ω-hidroxibenzilalquílicos, e fase móvel clorofórmio/metanol (9:1, v/v) e clorofórmio/metanol/água (65:25:5, v/v/v).

4.2.3 Espectrometria por Ressonância Magnética Nuclear

As análises espectroscópicas de RMN de ^{1}H, ^{13}C e HETCOR ^{1}H-^{13}C foram efetuadas em espectrômetro Bruker 300 MHz, modelo Advanced DPX-300, disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

4.2.4 Métodos de obtenção dos análogos alcoxibenzilalquilfosfo-homocolínicos

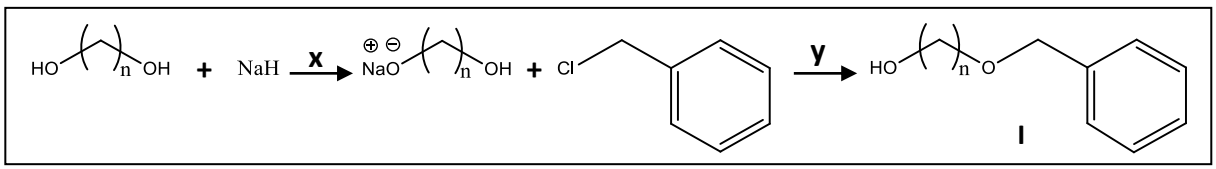
4.2.4.1 Obtenção dos éteres ω-hidroxibenzilalquílicos

Na síntese dos éteres ω-hidroxibenzilalquílicos foram adaptadas duas metodologias que produzem diferentes intermediários dependendo do diol de partida, 1,10-decanodiol ou 1,12-dodecanodiol. A diferença principal entre as duas metodologias são os haletos de benzila utilizados, sendo o cloreto de benzila sugerido por Dos Santos et al. (2010) e o brometo de benzila por Jin et al. (2007).

4.2.4.1.1 Reação com cloreto de benzila

Em um balão de fundo redondo, adicionaram-se 2 mmol (0,35 g) de 1,10-decanodiol em 3 mL de dimetilformamida (DMF). Após resfriar o sistema à temperatura de aproximadamente 0 ºC, adicionou-se 2 mmol (0,08 g) de hidreto de ódio (NaH 60% disperso em parafina). Após 10 h sob aquecimento a 50 ºC, a mistura foi resfriada e em seguida foram gotejados 2,4 mmol (0,28 mL) de cloreto de benzila. O sistema permaneceu sob agitação por 18 h à temperatura ambiente (Figura 8).

Figura 8 - Reação com cloreto de benzila.



n= 10 (Ia), 12 (Ib); **x=** DMF, 50 ˚C, 8 h; **y**= t.a., 18 h.

Após o término da reação, a mistura foi acidificada com HCl 5% até pH 3 e procederam-se extrações líquido-líquido em triplicata com acetato de etila (2 mL) e na sequência, a fase orgânica foi lavada com água. Ao fim, a fase orgânica foi coletada e adicionou-se Na_2SO_4 anidro para a retirada de água residual. Em seguida foi realizada uma filtração simples para retirada do sal hidratado. O excesso de solvente foi removido por pressão reduzida e o produto obtido (Ia - éter ω-hidroxibenzildecila ou Ib - éter ω-hidroxibenzildodecila) foi purificado por cromatografia em coluna com fase estacionária sílica-gel e fase móvel, hexano/acetato de etila (3:1, v/v). Para a formação do éter ω-hidroxibenzildodecila, partiu-se de 2 mmol (0,40 g) de 1,12-dodecanodiol, mantendo-se a proporção para o restante dos reagentes.

4.2.4.1.1.1 Planejamento Fatorial

Na tentativa de otimizar a obtenção dos éteres ω-hidroxibenzilalquílicos, um planejamento fatorial foi realizado referente à síntese do 10-(benziloxi)decan-1-ol variando-se os fatores tempo e temperatura, cada um deles em dois níveis, mais o ponto central realizado em triplicata, totalizando sete experimentos.

Tabela 1 - Planejamento experimental 2^2 mais ponto central, referente à reação de formação do alcóxido.

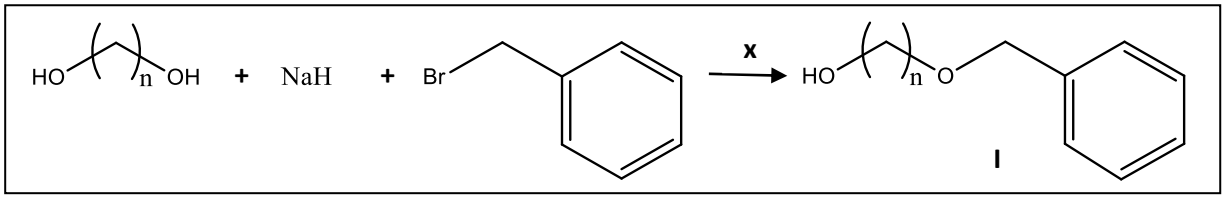
	Variáveis não codificadas		Variáveis codificadas	
Ensaio	Temperatura (±2 ˚C)	Tempo (h)	A	B
1	40	8	-1	-1
2	60	8	+1	-1
3	50	10	0	0
4	50	10	0	0
5	50	10	0	0
6	40	12	-1	+1
7	60	12	+1	+1

Os valores correspondentes ao ponto central foram escolhidos por serem estas as condições estipuladas no trabalho de Dos Santos e colaboradores (2010), e a variável resposta utilizada foi o rendimento reacional em porcentagem. Na Tabela 1 são apresentados os valores reais e codificados das variáveis tempo e temperatura.

4.2.4.1.2 Reação com brometo de benzila

Em um balão de fundo redondo, adicionaram-se 3 mmol de 1,10-decanodiol (0,52 g) e 4,5 mmol (0,12 g) de NaH na solução de 4,5 mmol (0,53 mL) de brometo de benzila (BnBr) em 15 mL de DMF anidra, sob agitação à temperatura ambiente (Figura 9). A reação foi interrompida após 6 h com adição 6 mL de água. A mistura foi submetida à extração líquido-líquido com 60 mL de acetato de etila e a fase orgânica foi lavada com água e solução saturada de NaCl. Em seguida, a fase orgânica foi secada com Na_2SO_4 anidro e por processo de filtração simples retirou-se o sal hidratado. Sob pressão reduzida, removeu-se o excesso de solvente e obteve-se o produto desejado (Ia – éter ω-hidroxibenzildecila ou Ib - éter ω-hidroxibenzildodecila) por purificação através de cromatografia em coluna com fase estacionária sílica-gel e fase móvel hexano/acetato de etila (4:1, v/v).

Figura 9 - Reação com brometo de benzila.



n= 10 (Ia), 12 (Ib); **x**= DMF, t.a., 6 h

Para a formação do éter ω-hidroxibenzildodecila, partiu-se de 2,9 mmol (0,58 g) de 1,12-dodecanodiol mantendo-se a proporção do restante dos reagentes.

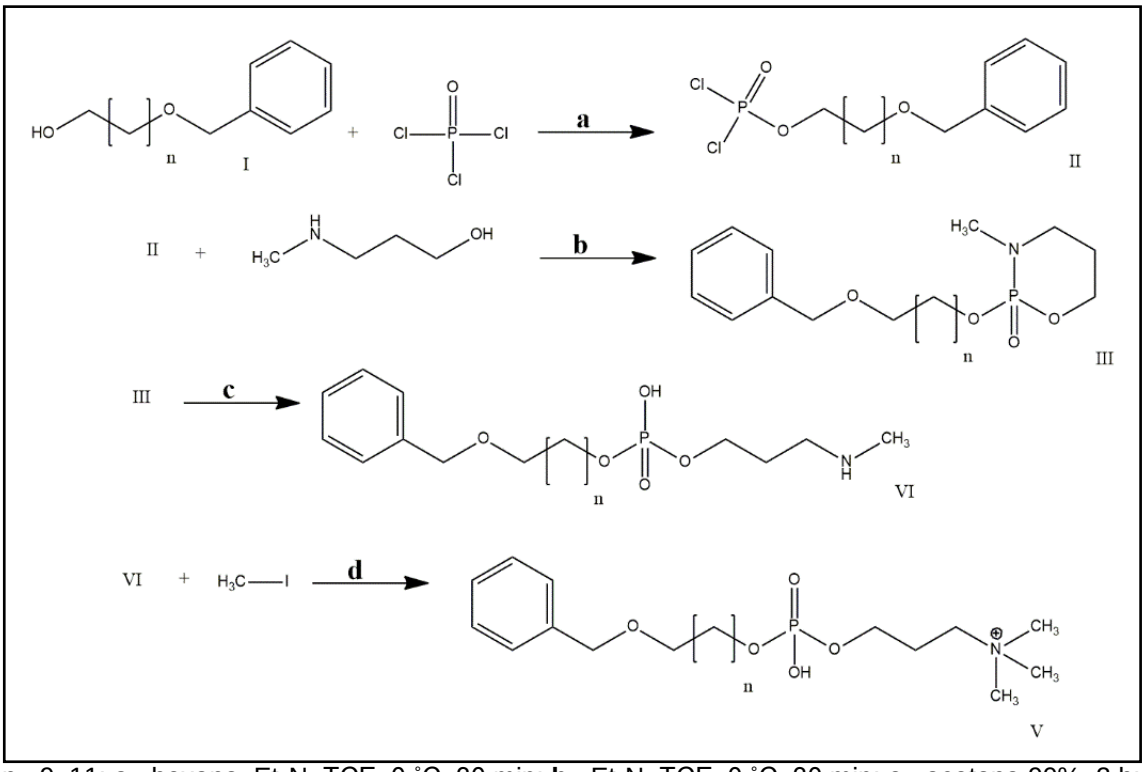
4.2.4.2 Obtenção dos análogos da erufosina

Para a obtenção dos análogos da erufosina foi utilizada a rota sintética proposta por MacDonald et al. (1991) (Figura 10), que compreende quatro etapas sintéticas descritas a seguir:

Etapa 1: Obtenção do intermediário II:

Em um balão, adicionou-se oxicloreto de fósforo (0,3 mL) dissolvido em 1 mL de hexano anidro gelado sob agitação. Ainda sob agitação e resfriamento lento, adicionou-se trietilamina (Et_3N, 0,4 mL) anidra em 2 mL de tricloroetileno (TCE). Em seguida, fez-se a adição por gotejamento do ω-hidroxibenzilalquiléter (I) (1,9 mmol) dissolvido em 7,6 mL de tricloroetileno. Após 30 minutos reagindo, pode-se verificar a precipitação do cloridrato de trietilamina que indica a formação do intermediário II. O cloridrato de trietilamina foi removido por filtração simples.

Figura 10 - Esquema sintético dos análogos da erufosina.



n= 9, 11; **a**= hexano, Et_3N, TCE, 0 ˚C, 30 min; **b**= Et_3N, TCE, 0 ˚C, 30 min; **c**= acetona 90%, 2 h; **d**= NaOH, MeOH, 24 h.

Etapa 2: Obtenção do intermediário III:

Na mistura contendo o intermediário II, gotejou-se uma solução contendo 0,2 mL de *N*-metilpropanolamina e 1,1 mL de Et_3N dissolvidos em 1 mL de TCE, por 30 minutos sob agitação e em banho de gelo. O precipitado formado, cloridrato de trietilamina, foi removido por filtração simples e o excesso de solvente foi evaporado sob pressão reduzida.

Etapa 3: Obtenção do intermediário IV:

Em um balão de fundo redondo, dissolveu-se o intermediário III em 14 mL de acetona e 1,4 mL de água, com agitação por 2 h a temperatura ambiente. O solvente foi removido sob pressão reduzida e na sequência foi adicionado clorofórmio gelado, extraindo o produto formado (intermediário IV) na fase orgânica e removendo a água. O excesso de solvente for removido sob pressão reduzida.

Etapa 4: Obtenção do produto final análogo benziloxialquil fosfo-homocolina (V):

Em um balão de fundo redondo, adicionou-se 1,2 mL de iodeto de metila em solução do composto IV dissolvido em 9,7 mL de metanol contendo 0,8 g de NaOH. A reação permaneceu por 24 h sob agitação, em ambiente protegido de luz e em temperatura ambiente. A remoção do excesso de solvente e reagente se fez por evaporação sob pressão reduzida. Em seguida, foram realizadas três formas de purificação: (i) cromatografia em coluna, sendo os eluentes: clorofórmio/metanol (9:1, v/v) e clorofórmio/metanol/água (65:25:5, v/v/v); (ii) cristalização, três lavagens (10 mL) com éter etílico para a precipitação do composto de amônio quaternário e posterior filtração; e (iii) cristalização lenta, solubilizando em clorofórmio e precipitando em acetona deixando a solução resfriando *overnight*. O produto V (Va- benziloxidecil fosfo-homocolina e Vb- benziloxidodecil fosfo-homocolina) obtido foi caracterizado por espectrometria de ressonância magnética nuclear.

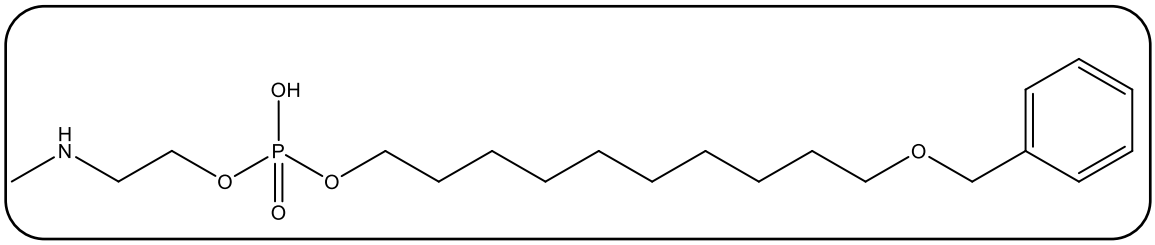
4.2.4.3 Obtenção do análogo *N*-metilfosfoetanolamínico da miltefosina (VI)

A rota sintética aplicada para a obtenção da molécula benziloxidecil *N*-metil fosfoetanolamina (Figura 11) é a mesma empregada para os análogos da erufosina (MacDonald et al., 1991) e descrita na figura 10, mas com suas devidas adaptações. As principais modificações na rota são a troca da *N*-metilpropanolamina por *N*-metiletanolamina, resultando em uma molécula fosfoetanolamínica e não fosfohomocolínica. A segunda alteração está na última etapa, reação com o iodeto de metila, que neste caso é suprimida de modo a se obter um análogo monometilado, mais precisamente *N*-metilfosfoetanolamílico.

No final da terceira etapa, eliminou-se o excesso de solvente por rotaevaporação com 2 mL isopropanol. Na sequência, adicionaram em 2mL de clorofórmio para

dissolver a mistura e por fim, acrescentaram 30 mL de acetona. A solução foi deixada na geladeira para ocorrer a precipitação do composto de interesse.

Figura 11 - Estrutura química do benziloxidecil *N*-metil fosfoetanolamina (VI).



5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese dos éteres ω-hidroxibenzilalquílicos

5.1.1 Reação com cloreto de benzila

5.1.1.1 Síntese do 10-(benziloxi)decan-1-ol

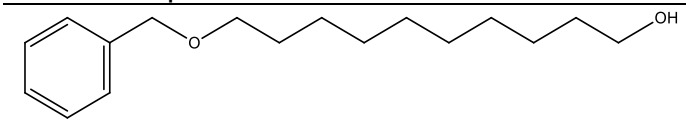
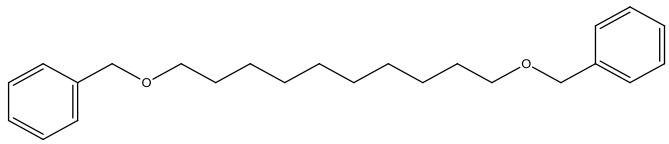
No primeiro momento, iniciou-se com uma reação ácido-base, em que o hidreto de sódio, uma base inorgânica, dissocia-se formando o íon hidreto e o íon sódio que são solvatados pelo DMF, por este ser um solvente polar aprótico. Em seguida, o íon hidreto desprotona a hidroxila do diol formando um alcóxido e o gás hidrogênio. Devido à reatividade do processo, utiliza-se o banho de gelo para reduzir a dissociação do hidreto de sódio e gerar aos poucos o gás hidrogênio que é inflamável.

Após a produção do alcóxido, este reage com o cloreto de benzila. Esta reação é conhecida como síntese de éteres de Williamson, em que o alcóxido participa de uma substituição nucleofílica bimolecular no carbono ligado ao cloro do haleto de benzila, resultando na formação do éter e de NaCl.

Pequenas modificações na metodologia de Agresta e colaboradores (2003) realizadas no trabalho de Dos Santos e colaboradores (2010) fizeram com que o rendimento reacional melhorasse, de 6% para 34%. Mais especificamente, alterou-se a proporção em mol dos reagentes, de 1,1 (NaH): 1(diol): 1(cloreto de benzila) para 1(NaH):1(diol):1,2 (cloreto de benzila). O aumento na quantidade do haleto de benzila resultou em maiores rendimentos devido ao cloreto ser um fraco grupo abandonador, assim comprometendo a reação.

Antes do processo de purificação por cromatografia em coluna, foi realizada uma avaliação no programa Chem Draw Ultra 12.0 para verificar o coeficiente de partição computacional (cLogP) das moléculas monossubstituída e dissubstituída produzidas no final da reação. Com os valores apresentados na Tabela 2, pode-se concluir que o composto dissubstituído é mais apolar e sairá primeiramente da coluna cromatográfica do que a molécula monossubstituída. Desta forma, direcionou-se o estudo na CCD e facilitando a coleta da amostra de interesse.

Tabela 2 - Valores de cLogP calculado para as moléculas monossubstituída (A) e dissubstituída (B), partindo-se do álcool 1,10-decanodiol.

Estrutura química	cLogP
 **A**	4,574
 **B**	7,138

Na CCD, o composto éter ω-hidroxibenzildecila apresentou fator de retenção (Rf) de 0,30, empregando-se hexano/acetato de etila (3:1, v/v) como eluente. Também foi observado o subproduto referente à dissubstituição no 1,10-decanodiol com Rf 0,6. O produto puro foi obtido por cromatografia em coluna com fase estacionária sílica-gel e fase móvel hexano/acetato de etila (3:1, v/v) e caracterizado por espectrometria de RMN de ^{1}H, ^{13}C e HETCOR ^{1}H-^{13}C (anexos 1, 2 e 3).

Dados de espectroscopia do análogo 10-(benziloxi)decan-1-ol são apresentados a seguir, correspondentes aos anexos 1 e 2: 10-(benziloxi)decan-1-ol: $C_{17}H_{28}O_2$; MM 264. Anexo 1: RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7,28 (m, 5H); δ 4,49 (s, 2H); δ 3,60 (t, 2H); δ 3,45 (t, 2H); δ 1,58 (m,5H); δ 1,28 (s, 13H). Anexo 2: RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 138,71; δ 128,33; δ 127,62; δ 127,47; δ 77,52-76,67 ($CDCl_3$); δ 72,86; δ 70,53; δ 62,93; δ 32,79; δ 29,76; δ 29,54; δ 29,52; δ 29,46; δ 29,42; δ 26,19; δ 25,76.

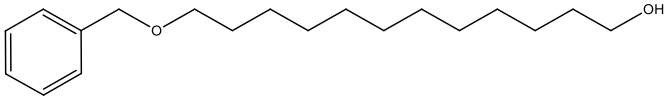
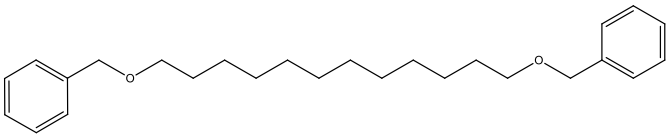
Para atestar a identificação correta dos hidrogênios e dos carbonos foi realizado o HETCOR ^{1}H-^{13}C que confirmou que cada hidrogênio está ligado ao seu respectivo carbono, excluindo os hidrogênios e carbonos relacionados ao solvente (anexo 3).

5.1.1.2 Síntese do 12-(benziloxi)dodecan-1-ol

Ao se utilizar a metodologia de Agresta e colaboradores (2003) para esse intermediário, o rendimento reacional foi de 4%, que após aplicar as proporções dos reagentes (Dos Santos et al., 2010) houve um aumento para 16%.

Semelhantemente aos composto sintetizados a partir do 1,10-decanodiol, houve também a formação de produtos monossubstituídos e dissubstituídos a partir do 1,12-dodecanodiol. De igual natureza, diferenciando somente pela adição de dois grupos metilenos, os compostos sintetizados apresentaram o cLogP (Tabela 3) para o composto dissubstituído maior que o monossubstituído, constatando ser mais apolar e portanto, eluindo mais rapidamente pela coluna cromatográfica.

Tabela 3 - Valores de cLogP calculado para as moléculas monossubstituída (A) e dissubstituídas (B), partindo-se do 1,12-dodecanodiol.

Estrutura química	cLogP
 **A**	5,632
 **B**	8,196

O Rf na CCD foi de 0,4 para o 12-(benziloxi)dodecan-1-ol, e para o subproduto dissubstituído o Rf foi de 0,8. A purificação do composto foi realizada por meio de coluna cromatográfica com fase estacionária sílica-gel e fase móvel hexano/acetato de etila (3:1, v/v), sendo o produto obtido caracterizado por espectrometria de RMN de ^{1}H, ^{13}C e HETCOR ^{1}H-^{13}C (anexos 4, 5 e 6).

A seguir são apresentados os dados de espectroscopia do análogo 12-(benziloxi)dodecan-1-ol, correspondente aos anexos 4 e 5: 12-(benziloxi)dodecan-1-ol: $C_{19}H_{32}O_2$; MM 292. Anexo 4: RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 300 MHz) δ 7,25 (m, 5H); δ 4,42 (s, 2H); δ 3,55 (t, 2H); δ 3,38 (t,2H); δ 1,54 (m,4H); δ 1,20 (s, 16H). Anexo 5: RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 75 MHz) δ 138,69; δ 128,32; δ 127,62; δ 127,46; δ 77,63-76,78 ($CDCl_3$); δ 72,86; δ 70,54; δ 62,74; δ 32,80; δ 29,78; δ 29,66; δ 29,62; δ 29,51; δ 26,22; δ 25,84.

Corroborando com a identificação da estrutura, realizou-se o HETCOR ^{1}H-^{13}C (anexo 6) que confirmou a correlação de cada hidrogênio com seu respectivo carbono, excetuando os hidrogênios e carbonos do solvente.

5.1.1.3 Planejamento Fatorial

Na tentativa de otimizar a obtenção dos éteres ω-hidroxibenzilalquílicos, um planejamento fatorial 2^2 referente à síntese do 10-(benziloxi)decan-1-ol foi realizado, variando-se os fatores tempo e temperatura. A etapa reacional de formação do alcóxido é relevante pois o NaH em altas temperaturas dissocia muito rapidamente da parafina em que está disperso. Além disso, pelo fato de a reação não ser seletiva, o íon hidreto desprotona uma ou as duas hidroxilas do diol. Com isso buscou-se obter a temperatura e o tempo de reação mais adequados. Na Tabela 4 são reapresentados os valores reais e codificados das variáveis tempo e temperatura juntamente com os resultados obtidos, destacando-se o ensaio 6, que a 40 ºC por 12 h resultou no melhor rendimento observado (21%).

A análise de variância obtida a partir do planejamento experimental é apresentada nas Tabelas 5 e 6. Tanto o gráfico de contornos quanto a superfície de resposta para o planejamento realizado foram obtidos empregando-se o software *Minitab versão 16* e estão apresentados nas figuras 10 e 11, respectivamente. Através da análise de regressão multivariável (Tabela 5), pode-se observar o nível de significância de cada fator pelo valor p, sendo esse 0,29 para o tempo e 0,03 para a temperatura. Adotando que um termo para ter significância tem que possuir valor p menor ou igual a 0,05 (5% de erro), o único fator que mostra ter significância é a temperatura. Também neste tipo de análise são apresentados valores de coeficiente de determinação (R-Sq = 87%), coeficiente de determinação ajustado (R-Sq (adj) = 74%) e coeficiente de determinação predito (R-Sq (pred) = 0%). O valor de R-Sq por não se aproximar de 100%, evidencia que o modelo precisa de melhor ajuste. Avaliando o R-Sq (adj), o seu valor não está próximo ao do R-Sq sugerindo a adição de mais variáveis para se produzir um modelo satisfatório. Quanto ao valor R-Sq (pred) de 0%, este indica que o modelo é limitado, ou seja, seu emprego para prever as melhores condições de síntese é restrito. Uma possível solução para melhorar esses parâmetros seria o aumento dos níveis das variáveis estabelecidas no modelo, que poderia aumentar o R-Sq. A análise de variância (Tabela 6) para a regressão linear apresentou valor p de 0,05, sendo que a variação de temperatura foi a variável significativa para a melhora do rendimento (valor p= 0,027), enquanto

que para a variável tempo de reação não se pode observar contribuição significativa para o rendimento da reação (valor p= 0,295).

Tabela 4 - Planejamento experimental 2^2 mais ponto central, referente à reação de formação do alcóxido, bem como resultados obtidos expressos em rendimento da produção do éter.

	Variáveis não codificadas		Variáveis codificadas		
Ensaio	Temperatura (±2 ˚C)	Tempo (h)	A	B	Rendimento (%)
1	40	8	-1	-1	12
2	60	8	+1	-1	2
3	50	10	0	0	10
4	50	10	0	0	16
5	50	10	0	0	12
6	40	12	-1	+1	21
7	60	12	+1	+1	2

No gráfico de contornos (Figura 12) para os pontos definidos no experimento, pode-se confirmar a influência da temperatura no rendimento reacional. Com relação ao tempo reacional, a superfície de resposta obtida indica que entre 10 h e 12 h encontra-se o tempo ótimo para a formação do alcóxido (Figura 13). Mesmo não possuindo um modelo ajustado, os resultados sugerem que a uma temperatura de 40 ºC ou menos, juntamente com um tempo reacional entre 10 h e 11 h, o rendimento da reação aumente. Dessa maneira, realizou-se uma nova tentativa de reação a 35 ºC por 10 h que levou a um valor de rendimento de aproximadamente 37%, melhor rendimento adquirido de todas as sínteses realizadas para esse intermediário.

Tabela 5 - Análise de regressão multivariável para o rendimento reacional (%) em função das variáveis do estudo na forma codificada.

Variável independente	Coeficiente de regressão (Coef)	Estimativa coeficiente de regressão (SS Coef)	Valor *t*	Valor *p*
Constante	14,244	2,030	7,018	0,006
Tempo (h)	2,193	1,732	1,266	0,295
Temperatura (˚C)	-7,068	1,732	-4,081	0,027
Tempo $(h)^2$	-5,256	2,668	-1,970	0,143
S= 3,46382	PRESS= 367,526			
R-Sq= 87,16%	R-Sq (pred)= 0,00	R-Sq (adj)= 74,32%		

Tabela 6 - Análise de variância do modelo de regressão multivariável para rendimento reacional (%).

Fonte de Variação	Graus de Liberdade (DF)	Soma quadrática Sequencial (Seq SS)	Soma quadrática Ajustada (Adj SS)	Média Quadrática Ajustada (Adj MS)	Valor F	Valor *p*
Regressão	3	244,34	244,34	81,446	6,79	0,075
Linear	2	197,76	219,03	109,513	9,13	0,053
Tempo (h)	1	19,23	19,23	19,228	1,60	0,295
Temperatura (˚C)	1	176,55	199,80	199,798	16,65	0,027
Quadrática	1	46,56	46,56	46,560	3,88	0,143
Tempo $(h)^2$	1	46,56	46,56	46,560	3,88	0,143
Erro residual	3	35,99	35,99	11,998		
Falta de ajuste	1	20,84	20,84	20,839	2,75	0,239
Erro puro	2	15,15	15,15	7,577		
Total	6	280,33				

Figura 12 - Gráfico de contornos para o rendimento reacional (%) em função do tempo (h) e temperatura (ºC) de reação.

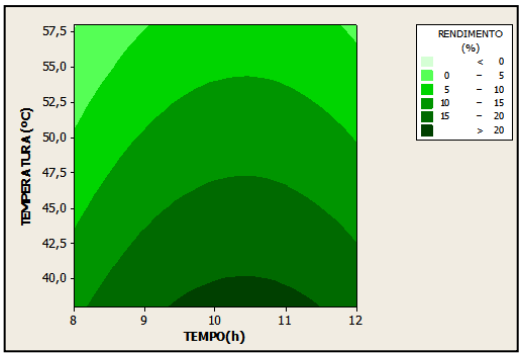
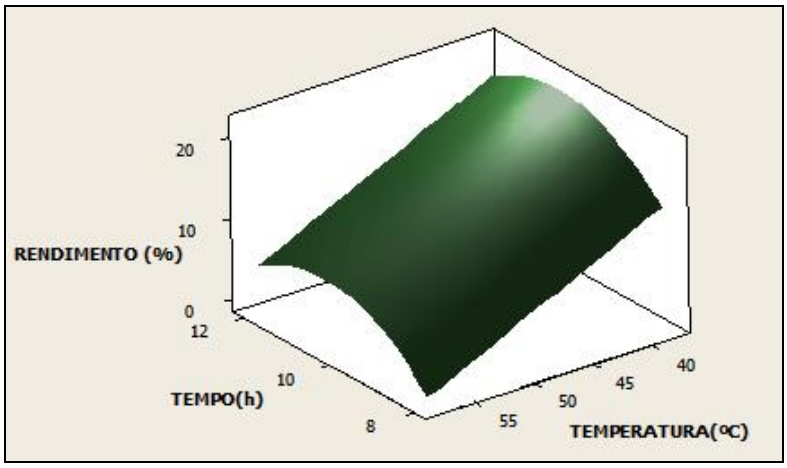


Figura 13 - Superfície resposta do efeito do tempo reacional (h) e da temperatura (ºC) sobre o rendimento reacional (%).



5.1.2 Reação com brometo de benzila

5.1.2.1 Síntese do 10-(benziloxi)decan-1-ol

A metodologia adaptada de Jin et al. (2007) foi empregada com o objetivo de conseguir melhores rendimentos reacionais e redução do tempo reacional. A reação ocorre da mesma maneira que a metodologia de Dos Santos et al. (2010), com a síntese do alcóxido a partir do 1,10-decanodiol e na sequência, produção dos éteres de Williamson. Ao final das 6 h de reação, a adição de água resulta na troca dos íons brometo pela hidroxila da água, e solubilização dos compostos de partida que não reagiram.

Na CCD, o composto éter ω-hidroxibenzildecila apresentou fator de retenção (Rf) de 0,2, empregando-se hexano/acetato de etila (4:1, v/v) como eluente. Também foi observado o subproduto referente à dissubstituição no 1,10-decanodiol com Rf 0,8. O produto puro foi obtido por cromatografia em coluna com fase estacionária sílica-gel e fase móvel hexano/acetato de etila (4:1, v/v) e caracterizado por espectrometria de RMN que apresentou os mesmos sinais quando sintetizado pelo cloreto de benzila (anexos 1, 2 e 3).

A alteração do haleto de benzila, de cloreto para brometo, entretanto, resultou em porcentagem de rendimento similar (38%) ao melhor resultado encontrado com o

cloreto de benzila, ainda que o brometo seja melhor grupo abandonador. Cabe ressaltar que a reação com o brometo de benzila não foi otimizada.

5.1.2.2 Síntese do 12-(benziloxi)dodecan-1-ol

Esta síntese foi realizada da mesma maneira que a síntese do 10-(benziloxi)decan-1-ol com o brometo de benzila, mudando somente o diol de partida, 1,12-dodecanodiol. O rendimento reacional foi de 43%.

Na CCD, obteve-se o fator de retenção (Rf) de 0,2 para o éter ω-hidroxibenzildodecila, empregando-se hexano/acetato de etila (4:1, v/v) como eluente. Também foi observado o subproduto referente à dissubstituição no 1,12-dodecanodiol com Rf 0,7. O produto puro foi obtido por cromatografia em coluna com fase estacionária sílica-gel e fase móvel hexano/acetato de etila (4:1, v/v) e caracterizado por espectrometria de RMN, com sinais idênticos quando este foi sintetizado com cloreto de benzila (anexos 4, 5 e 6).

5.1.3 Análise das sínteses dos éteres ω-hidroxibenzilalquílicos

A primeira tentativa para a obtenção dos éteres ω-hidroxibenzilalquílicos foi baseada na metodologia de Agresta e colaborados (2003), com obtenção de rendimentos muito baixos dos compostos desejados.

Na busca de melhorar esse rendimento, foi adotada a metodologia de Dos Santos et al. (2010). Nesse trabalho o grupo adapta a metodologia de Agresta et al. (2003) mantendo os mesmos reagentes, mas modificando suas proporções, o que resultou em maior rendimento reacional.

Analisando de forma mais direcionada, realizou-se o planejamento fatorial. Nesse terceiro ensaio manteve-se as condições realizadas pelo grupo do Dos Santos e foram alteradas a temperatura e o tempo reacional. Essa etapa somente foi realizada para um dos compostos, pois como foram feitas várias reações testes, escolheu-se o reagente (1,10-decanodiol). Nesse ensaio não observamos aumento do rendimento com as mudanças sugeridas. Um quarto ensaio foi realizado substituindo-se o cloreto de benzila por brometo de benzila. Os resultados gerados na produção dos éteres ω-hidroxibenzilalquílicos são similares, entretanto o tempo

total da reação é menor. Com isso, este foi selecionado para prosseguir na produção dos éteres.

Tabela 7 - Rendimento reacional dos éteres ω-hidroxibenzilalquílicos em cada ensaio realizado.

éteres ω-hidroxibenzilalquílicos	**10-(benziloxi)decan-1-ol**	**12-(benziloxi)dodecan-1-ol**
1º tentativa (Agresta et al., 2003)	**6%**	**4%**
2º tentativa (Dos Santos et al., 2010)	**34%**	**16%**
3º tentativa Planejamento fatorial	**37%**	**-**
4º tentativa Brometo de benzila	**38%**	**43%**

5.2 Síntese dos análogos da erufosina

Para essa rota, na primeira etapa reacional ocorre o ataque nucleofílico do éter ω-hidroxibenzilalquílico ao átomo de fósforo do oxicloreto de fósforo. Na segunda etapa, este sofre outro ataque nucleofílico pela hidroxila da *N*-metilpropanolamina, seguido de ataque pela amina, formando a fosfamida cíclica. Este ciclo é clivado na terceira etapa por hidrólise e na sequência, a molécula é alquilada em meio básico com o iodeto de metila para a formação dos análogos da erufosina.

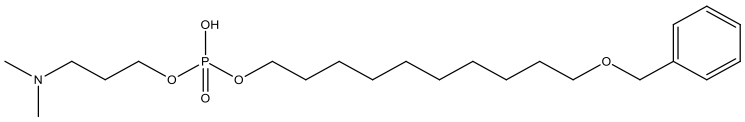
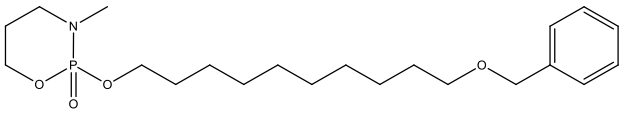
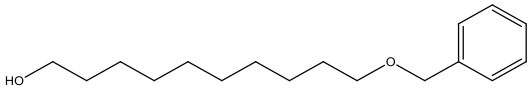
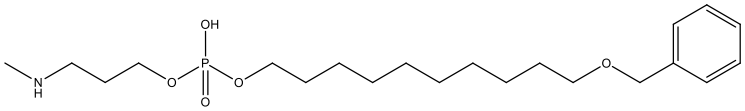
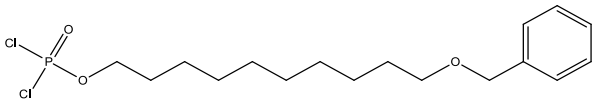
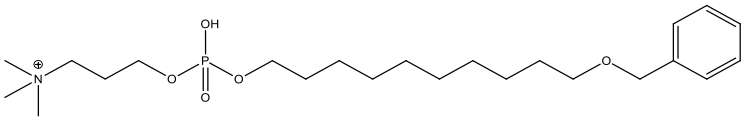
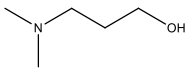
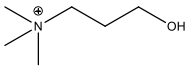
Os rendimentos reacionais foram ínfimos, não chegando a 1% para o benziloxidecil fosfo-homocolina e 2% para o benziloxidodecil fosfo-homocolina. Estas moléculas, por terem características anfifílicas e higroscópicas, apresentam purificação complexa. Metodologias de purificação foram aplicadas para separação dos produtos finais trimetilados (V) dos intermediários monometilados (IV), ou até mesmo dos intermediários dimetilados. Como mencionado anteriormente, três metodologias de purificação foram aplicadas nesse trabalho tentando-se obter o benziloxidecil fosfo-homocolina e o benziloxidodecil fosfo-homocolina.

Analisando a metodologia de purificação realizada por cromatografia em coluna, para os análogos produzidos a partir da 10-(benziloxi)decan-1-ol, calculou-se previamente cLogP (Tabela 7) para verificar a polaridade das prováveis moléculas de subproduto e de intermediários de reação ao final da síntese do produto final. Em um primeiro momento, buscou-se, com a aplicação da fase móvel clorofórmio e metanol, retirar os compostos mais apolares como o intermediário dissubstituído (composto 1; cLogP= 4,98) e o composto ciclofosfamídico (composto 2; cLogP= 4,86). Na sequência, com a adição de água à fase móvel, a polaridade foi aumentada e os compostos mais polares, como o benziloxidecil fosfo-homocolina (composto 6; cLogP= 0,71), seriam então eluídos. Nessas condições, entretanto, não obtivemos bons rendimentos. A sílica como fase estacionária pode ter dificultado a separação e contribuído para o baixo rendimento, pois como esta tem caráter polar é capaz de reter o composto final positivamente carregado, comprometendo assim o rendimento geral. Por conta disso, outra estratégia de purificação foi testada.

A segunda tentativa baseou-se na precipitação de sais de amônio quaternário com éter etílico e posterior filtração. O éter etílico (μ= 1,15D a 20 C˚), por ter caráter mais apolar, solubiliza os compostos de mesma característica e precipita os compostos mais polares, dentre eles o composto final benziloxidecil fosfo-homocolina. Nestas condições o composto final não apresentou precipitação significativa e houve perda na filtração. Deste modo, executou-se um terceiro processo de purificação com solventes considerados mais adequados para a recristalização.

O terceiro teste de purificação foi uma tentativa de recristalização através da dissolução da mistura contendo o produto final em clorofórmio e subsequente cristalização em acetona. Uma pequena quantidade de clorofórmio, devido ao seu caráter mais apolar (μ= 1,04D), foi utilizada para solubilizar a mistura com o produto final e manter os compostos mais apolares em solução quando da etapa de resfriamento. Uma pequena quantidade de acetona (μ= 2,88D) foi adicionada para solubilizar impurezas mais polares que o composto de interesse e então, foi dado sequência ao processo de resfriamento dessa solução, em que o produto final precipitou lentamente e as impurezas mantiveram-se em solução.

Tabela 8 - Valores de cLogP do produto e dos subprodutos da síntese a partir do 10-(benziloxi)decan-1-ol.

Composto	Molécula	cLogP
1		4,98
2		4,86
3		4,57
4		4,40
5		4,04
6		0,71
7		-0,11
8		-4,39

Dados de espectroscopia do análogo benziloxidecil fosfo-homocolina mostram sinais característicos dessa molécula apresentados no anexo 7. Os principais sinais característicos de deslocamento no espectro de RMN de hidrogênio (anexo 7) para o análogo benziloxidecil fosfo-homocolina são do anel aromático em 7,33 ppm, seguidos pelo singleto em 4,50 ppm correspondendo aos hidrogênios do carbono

situado entre o anel aromático e oxigênio da função éter; dois tripletos, em 3,61 ppm e 3,49 ppm, possivelmente referindo-se aos hidrogênios do carbono adjacente ao grupo benziloxi; e também um singleto em 3,38 ppm, podendo ser este da trimetilação da molécula, mas juntamente com residual do solvente empregado no RMN (metanol deuterado) após troca do deutério por próton.

A caracterização por RMN do composto benziloxidodecil fosfo-homocolina não foi possível, por conta da baixa quantidade sintetizada até o momento.

5.3.1 Síntese do benziloxidecil *N*-metil fosfoetanolamina

A rota sintética aplicada para a obtenção da molécula benziloxidecil *N*-metil fosfoetanolamina (Figura 7) é a mesma empregada anteriormente (MacDonald et al., 1991) para a síntese dos análogos homocolínicos e exposta na Figura 10, mas com suas devidas adaptações.

Na primeira etapa sintética, introduziu-se nessa rota o 10-(benziloxi)decan-1-ol para reagir com oxicloreto de fósforo, formando o intermediário I, idêntico ao proposto na rota dos análogos homocolínicos (Figura 10). Na segunda etapa, o processo de substituição nucleofílica ocorre pela ação da *N*-metiletanolamina sob o intermediário I, com formação do anel fosfamida que foi clivado por hidrólise na terceira etapa, assim formando o composto de interesse. O processo de purificação gerou um produto ainda impuro, necessitando novamente ser recristalizado para a remoção do excesso de impureza. Entretanto, analisando o espectro de RMN de hidrogênio buscando caracterizar esta molécula (anexo 8), pode-se observar sinais que condizem com os seus grupos químicos. Deslocamento do anel aromático ocorrendo em 7,31 ppm e pico de singleto dos hidrogênios correspondentes ao que se encontram entre o oxigênio do grupo químico éter e o anel aromático, 4,46 ppm. Constam na sequência multipletos em 4,10 ppm e 3,82 ppm, sendo o primeiro correspondente aos outros dois hidrogênios adjacentes ao oxigênio do éter e o segundo, dois dos quatro hidrogênios vizinhos ao grupo fosfato. Um tripleto é observado em 3,43 ppm referindo-se aos outros dois hidrogênios adjacentes ao fosfato e os hidrogênios do *N*-metil em 2,72 ppm. Por fim, os hidrogênios da cadeia alquílica são observados no campo alto do espectro em 1,59 ppm e 1,26 ppm.

6. CONCLUSÃO

Nesse trabalho estudou-se a síntese de análogos benzil alquil éter da miltefosina e da erufosina, na busca por compostos menos hemolíticos e mais potentes como antineoplásicos.

A primeira etapa sintética de obtenção dos éteres ω-hidroxibenzilalquílicos foi baseada na metodologia de Agresta et al. (2003). Os rendimentos foram em torno de 6 % e de 4% para os compostos 10-(benziloxi)decan-1-ol e 12-(benziloxi)dodecan-1-ol, respectivamente. A alteração das condições reacionais de modo a alterar a proporção em mol dos reagentes, de 1,1 (NaH): 1(diol): 1(cloreto de benzila) para 1(NaH):1(diol):1,2 (cloreto de benzila) proporcionou aumento no rendimento reacional dos compostos para 34% no caso do 10-(benziloxi)decan-1-ol e 16% para o 12-(benziloxi)dodecan-1-ol. Buscando uma racionalidade reacional e verificação das variáveis importantes dessa etapa, realizou-se o planejamento fatorial com duas variáveis, tempo e temperatura, mais o ponto central em triplicata para 10-(benziloxi)decan-1-ol, que indicou que a temperatura reacional tem importância significativa nessa etapa sintética. Este planejamento apontou maiores rendimentos a temperatura menores ou iguais a 40 ºC com tempo reacional entre 10 h e 11 h. Com base nessas condições, realizou-se uma reação a 35 ºC por 10 h resultado em um rendimento de 37%, corroborando com essa informação adquirida no planejamento. Ao substituir o haleto de benzila, de cloreto de benzila para brometo de benzila, obteve-se rendimento reacional superior às supracitadas metodologias, em 38% para 10-(benziloxi)decan-1-ol e 43% para 12-(benziloxi)dodecan-1-ol.

Na segunda etapa sintética, para a obtenção dos análogos da erufosina, o composto benziloxidecil fosfo-homocolina apresentou sinais característicos dos seus grupos funcionais no espectro de RMN de hidrogênio, entretanto, não estando na sua forma purificada. O outro composto proposto, benziloxidodecil fosfo-homocolina foi obtido com baixo rendimento reacional, não sendo possível caracterizá-lo.

O composto benziloxidecil *N*-metil fosfoetanolamina também foi sintetizado, sendo que ainda faz-se necessário o estudo de sua purificação para que o mesmo

possa ser avaliado quanto ao seu potencial hemolítico e atividade antiproliferativa frente à linhagens celulares tumorais.

Os alquilfosfolipídeos são compostos anfifílicos, na sua grande maioria higroscópicos e apresentam complexidade na sua purificação. Três metodologias de purificação foram testadas e ainda assim acredita-se que haja necessidade de se estudar outras possibilidades, como por exemplo a utilização de colunas de troca iônica para os compostos ionicamente carregados. Também poderia-se estudar outros processos de recristalização controlada dos compostos de interesse.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, C. M. Z; SILVA, C. A. P. Toxicidade Cutânea de drogas quimioterápicas. In: Hoff, P. M. G (Ed.). **Tratado de Oncologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2013. p. 1139-1156.

ACS - American Cancer Society. **Cancer Facts & Figures 2016**. Atlanta: American Cancer Society; 2016. 72p.

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

ALAM, M. M. et al. Synthesis and biological evaluation of cyclopentane-linked alkyl phosphocholines as potential anticancer agents that act by inhibiting Akt phosphorylation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.47, p. 485-492, 2012.

ALVES, V. A. F.; MELLO, E. S.; FILHO, A. L. Noções Básicas de Patologia e Imunoistoquímica. In: Hoff, P. M. G (Ed.). **Tratado de Oncologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2013. p. 10-20.

BATES, D.; EASTMAN, A. Microtubule destabilizing agents: far more than just antimitotic anticancer drugs. **British Journal of Clinical Pharmacology**, 2016, doi:10.1111/bcp.13126.

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

BRACHWITZ, H.; VOLLGRAF, C. Analogs of alkyllysophospholipids: chemistry, effects on the molecular level and their consequences for normal and malignant cells. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 66, n. 1, p. 39-82, 1995.

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

DOBBIN, J. A.; GADELHA, M. I. P. Mesilato de imatinibe para tratamento da leucemia mielóide crônica. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, p. 429-438, 2002.

DOS SANTOS, G. A. et al. Interaction of 10-(octyloxy) decyl-2-(trimethylammonium) ethyl phosphate with mimetic membranes and cytotoxic effect on leukemic cells. **Biochimica et Biophysica Acta** – Biomembranes, v. 1798, n. 9, p. 1714-1723, 2010.

EIBL, H.; UNGER, C. Hexadecylphosphocholine: a new and selective antitumor drug. **Cancer Treatment Reviews**, v. 17, p. 233-242, 1990.

EIBL, H.; KAUFMANN-KOLLE, P. Medical application of synthetic phospholipids as liposomes and drugs. **Journal of Liposome Research**, v. 5, p. 131-148, 1995.

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.

HENKE, G. et al. Effects of ionizing radiation in combination with erufosine on T98G glioblastoma xenograft tumours: a study in NMRI nu/nu mice. **Radiation Oncology**, v. 7, p. 1-10, 2012.

HERTZ, D. L.; RAE, J. Pharmacogenetics of Cancer Drugs. **Annual Review of Medicine**, v. 66, p. 65-81, 2015.

HILGARD, P. et al. D-21266, a new heterocyclic alkylphospholipid with antitumour activity **European Journal of Cancer**, v. 33, n. 3, p. 442-446, 1997.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2015. 122p.

ISRAELACHVILI, J. N. **Intermolecular and surface forces**. 3rd ed. New York: Academic Press, 2011. 674 p.

JENDROSSEK, V. et al. Structure-activity relationships of alkylphosphocholine derivatives: antineoplastic action on brain tumor cell lines in vitro. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 50, p. 71-79, 2002.

JIMÉNEZ-LÓPEZ, J. M. et al. Alterations in the homeostasis of phospholipids and cholesterol by antitumor alkylphospholipids. **Lipids in Health and Disease**, v. 9, 2010.

JIN, C. H. et al. Direct etherification of alkyl halides by sodium hydride in the presence of *N,N*-dimethylformamide. **Synlett**, n. 17, p. 2695-2698, 2007.

KAI, G. et al. Biosynthesis and biotechnological production of anti-cancer drug Camptothecin. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, p. 525-539, 2015.

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

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.

MACDONALD, P. M. et al. Synthesis and characterization of a homologous series of zwitterionic surfactants based on phosphocholine. **Langmuir**, v. 7, n. 11, p. 2602-2606, 1991.

MACHADO, K. K.; LEAL, A. I. C. Prevenção Primária e Secundária do Câncer. In: Hoff, P. M. G (Ed.). **Tratado de Oncologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2013. p. 875-901.

MARINO, R. et al. Tumor-selective anti-cancer effects of the synthetic alkyl phosphocholine analog CLR1404 in neuroblastoma. **American Journal of Cancer Research**, v. 5, p. 3422-3435, 2015.

MOREIRA, R. A. et al. Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Drug Transport and Metabolism Interaction of Miltefosine with the Lipid and Protein Components of the Erythrocyte Membrane. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 5, p.1661-1669, 2013.

NUSSBAUMER, S. et al. Analysis of anticancer drugs: A review. **Talanta**, v. 85, n. 5, p. 2265-2289, 2011.

PACHIONI, J. A. et al. Alkylphospholipids - A promising class of chemotherapeutic agents with a broad pharmacological spectrum. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 16, p. 742-759, 2013.

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.

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

PUYO, S.; MONTAUDON, D.; POURQUIER, P. From old alkylating agents to new minor groove binders. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 89, p. 43-61, 2014.

RAKOTOMANGA, M.; LOISEAU, P. M.; SAINT-PIERRE-CHAZALET, M. Hexadecylphosphocholine interaction with lipid monolayers. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1661, p. 212-218, 2004.

RANGEL-YAGUI, C. O.; PESSOA-JR, A.; TAVARES, L. C. Micellas solubilization of drugs. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, p. 147-163, 2005.

RAMA, M.; KUMAR, N. V. A.; BALAJI, S. A comprehensive review of patente antileishmanial agents. **Pharmaceutical Patent Analyst**, v. 4, n. 1, p. 37-56, 2015.

SÁ, M. M. et al. Alkylphosphocholines as promising antitumor agents: exploring the role of structural features on the hemolytic potential. **Molecular Informatics**, v. 33, p. 53-64, 2014.

SÁ, M. M. et al. Understanding miltefosine: Membrane interactions using molecular dynamics simulations. **Langmuir**, v. 31, p. 4503-4512, 2015.

SÁ, M. M.; RANGEL-YAGUI, C. O. Molecular determinants for the binding mode of alkylphosphocholines in the C2 domain of PKC alpha. **Molecular Informatics**, v. 34, p. 84-96, 2015.

RUITER, G. A. et al. Anti-cancer alkyl-lysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/PKB survival pathway. **Anti-Cancer Drugs**, v. 14, n. 2, p. 167-173, 2003.

SALEM, M. S. Z. Cancer: Some genetic considerations. **The Egyptian Journal of Medical Human Genetics**, v. 16, p. 1-10, 2015.

SAMADDER, P. et al. The antitumor ether lipid 1-Q-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycerophosphocholine (ET-18-OCH3) inhibits the association between Ras and Raf-1. **Anticancer Research**, v. 23, p. 2291-2295, 2003.

SCHREIER, S.; MALHEIROS, S. V. P.; PAULA, E. Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1508, p.210-234, 2000.

SHOJI, M. et al. **Lipids**, v. 26, p. 145-149, 1991.

STRICKER, T. P.; KUMAR, V. Neoplasias. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, E. C. **Robbins & Cotran** - Patologia: bases patológicas da doença, 8. ed. Rio de Janeiro: Elselvier, 2010. cap. 7, p. 259-330.

SUNDAR, S.; OLLIARO, P. L. Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 3, n. 5, p. 733-740, 2007.

ÜBERALL, F. et al. Hexadecylphosphocholine inhibits inositol phosphate formation and protein kinase C activity. **Cancer Research**, v. 51, n. 3, p. 807-812, 1991.

UNGER, C. et al. Hexadecylphosphocholine, a new ether lipid analogue studies on the antineoplasic 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, p. 243-246, 1990.

UNGER, C. et al. First-time-in-man and pharmacokinetic study of weekly oral perifosine in patients with solid tumours. **European Journal of Cancer**, 2010. In press.

VAN BLITTERSWIJK, W. J.; VERHEIJ, M. Anticancer mechanisms and clinical application of alkylphospholipids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1831, p. 663-674, 2013.

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 of Cancer**, v. 29, 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. 279-286, 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.

WNĘTRZAK, A.; ŁĄTKA, K.; DYNAROWICZ- ŁĄTKA, P. Interactions of alkylphosphocholines with model membranes - the Langmuir monolayer study. **The Journal of Membrane Biology**, 2013. In press.

YOSIFOV, D. Y. et al. Erucylphospho-*N*,*N*,*N*-trimethylpropylammonium (erufosine) is a potencial antimyeloma drug devoid of myelotoxicity. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 67, p. 13-25, 2011.

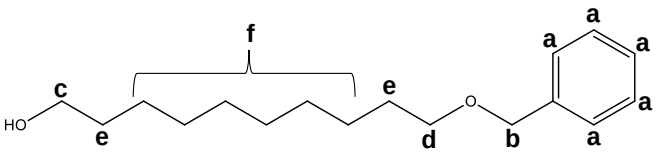
ZAHARIEVA, M. M. et al. Erufosine: A membrane targeting antineoplastic agent with signal transduction modulating effects. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1095, p. 182-192, 2007.

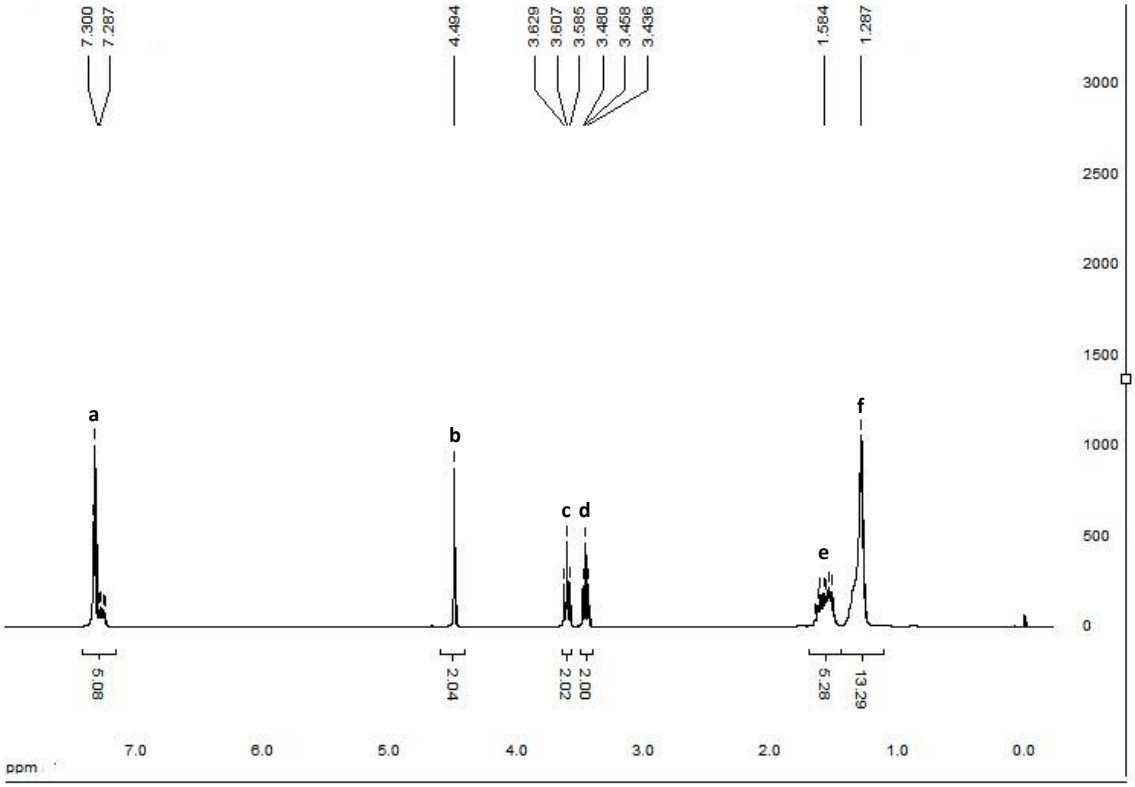
WUJCIK, D. Science and mechanism of action of targeted therapies in cancer treatment. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 30, n. 3, p. 139-146, 2014.

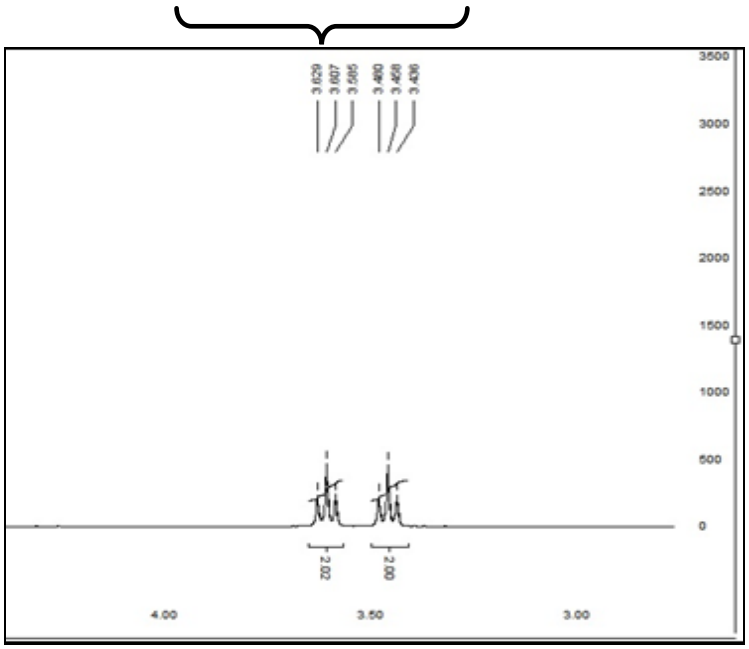
ANEXOS

Anexo 1 - Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do 10-(benziloxi)decan-1-ol.

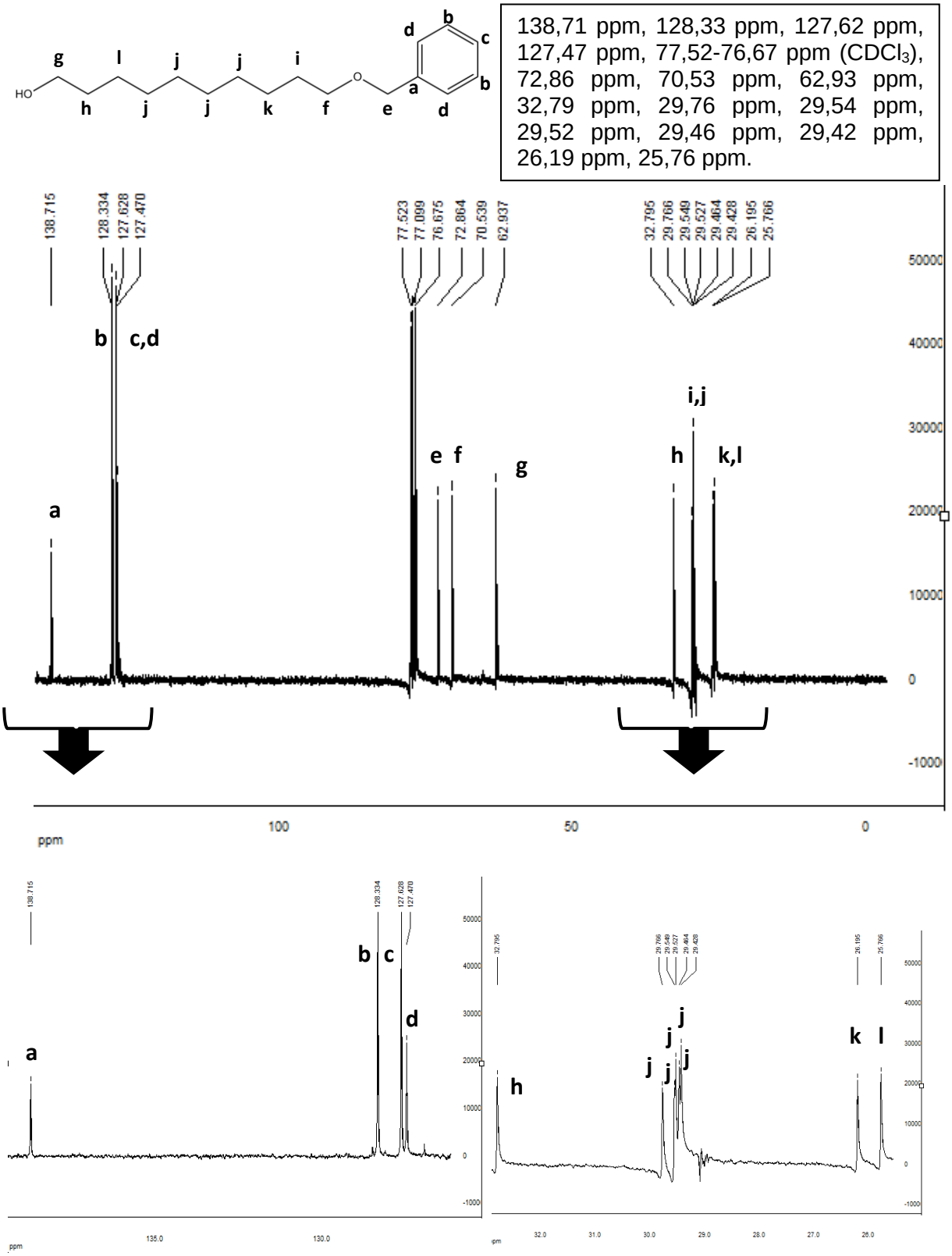
7,28 ppm (m, 5H), 4,49 ppm (s, 2H), 3,60 ppm (t, 2H), 3,45 ppm (t, 2H), 1,58 ppm (m,5H), 1,28 ppm (s, 13H).



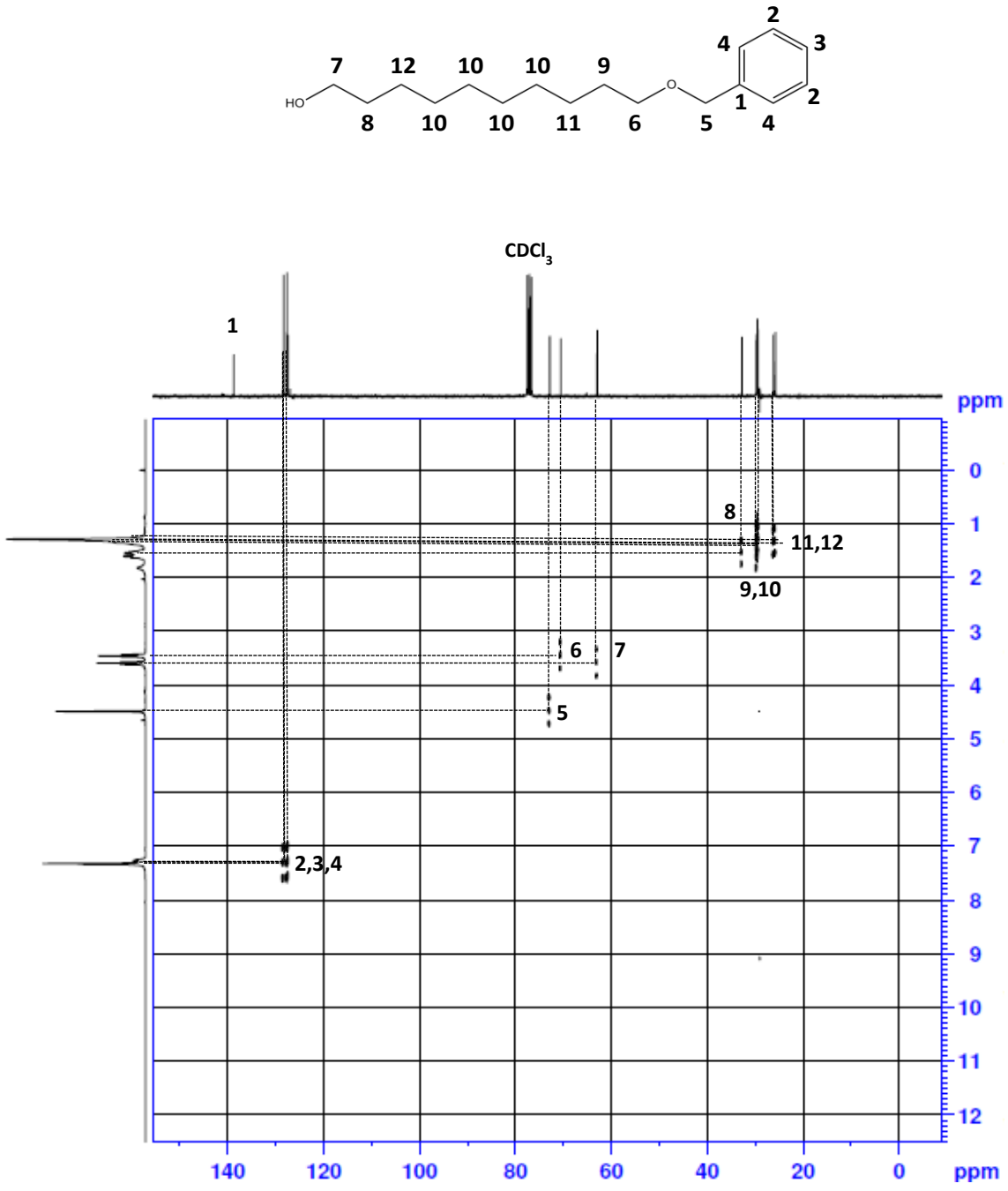




Anexo 2 - Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) do 10-(benziloxi)decan-1-ol.

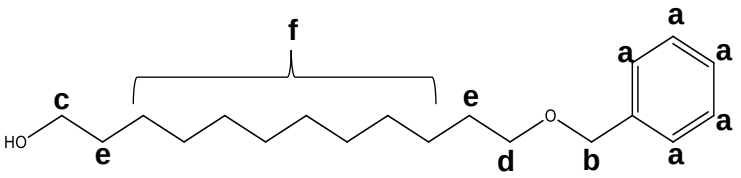


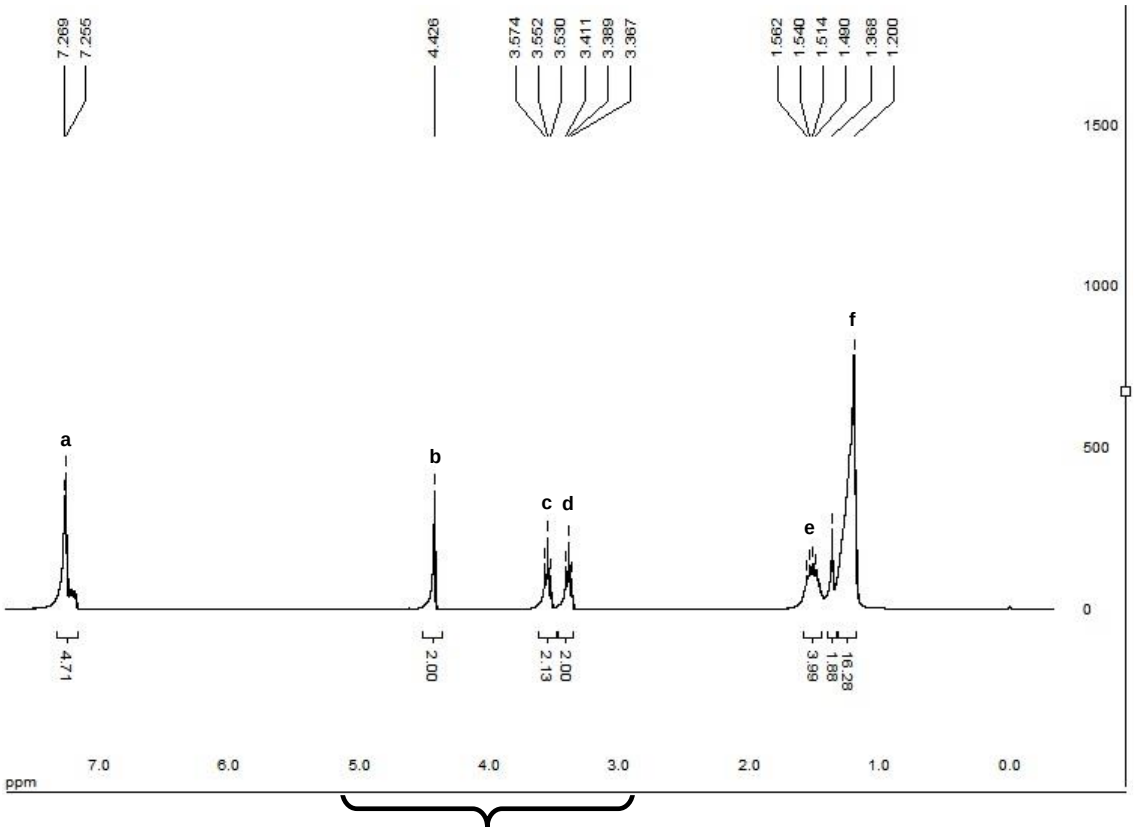
Anexo 3 - Espectro de HETCOR ^{1}H-^{13}C ($CDCl_3$) do 10-(benziloxi)decan-1-ol registrado a 30 °C.

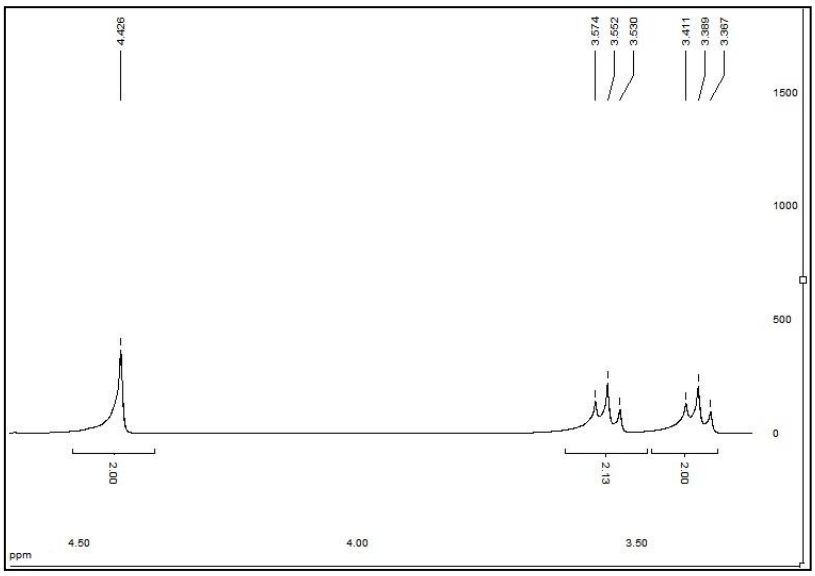


Anexo 4 - Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do 12-(benziloxi)dodecan-1- ol.

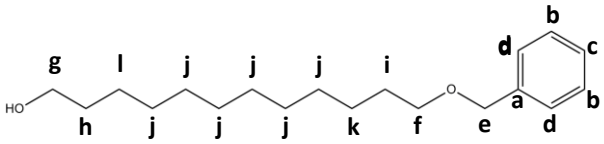
7,25 ppm (m, 5H), 4,42 ppm (s, 2H), 3,55 ppm (t, 2H), 3,38 ppm (t,2H), 1,54 ppm (m,4H), 1,20 ppm (s, 16H).



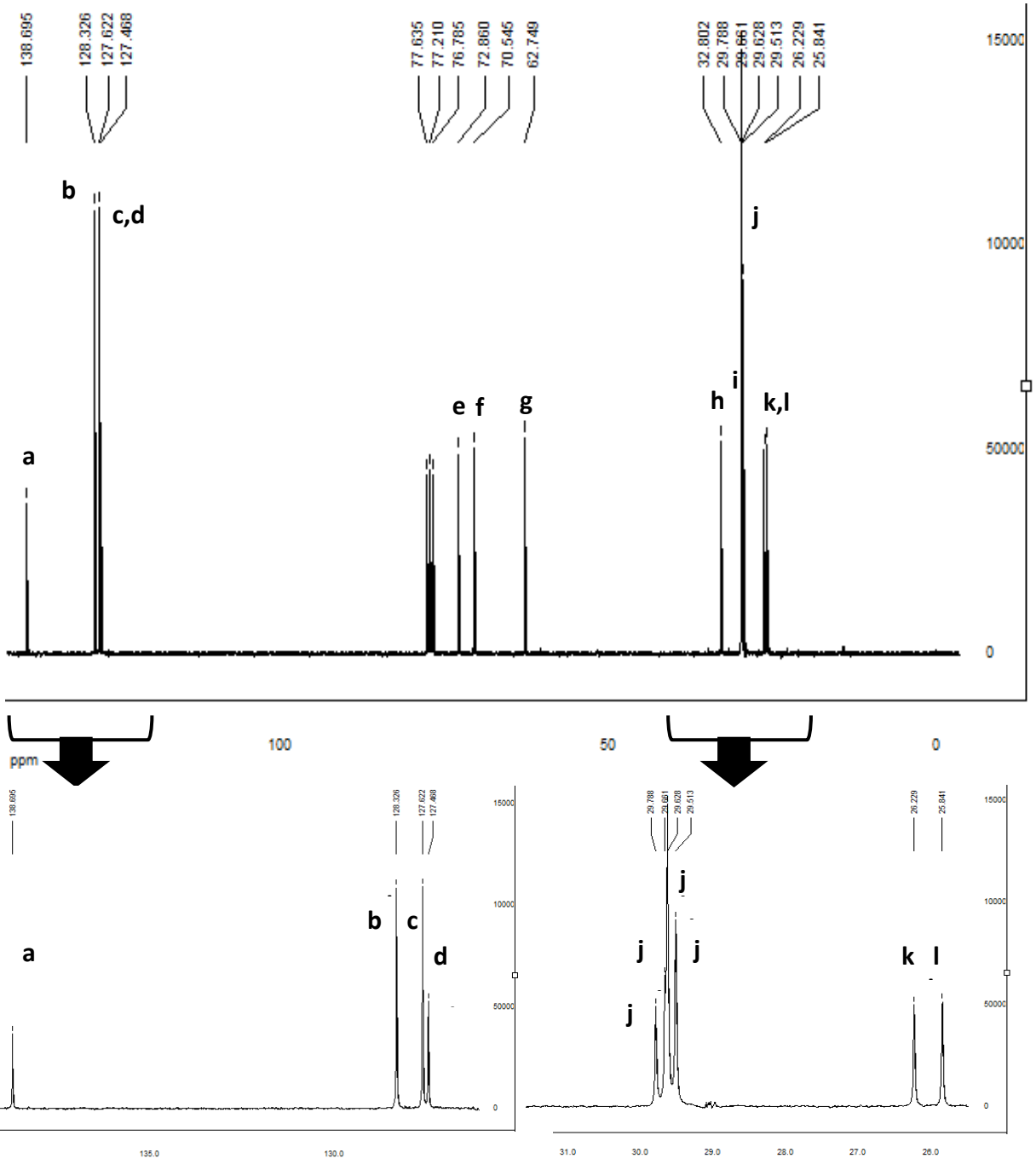




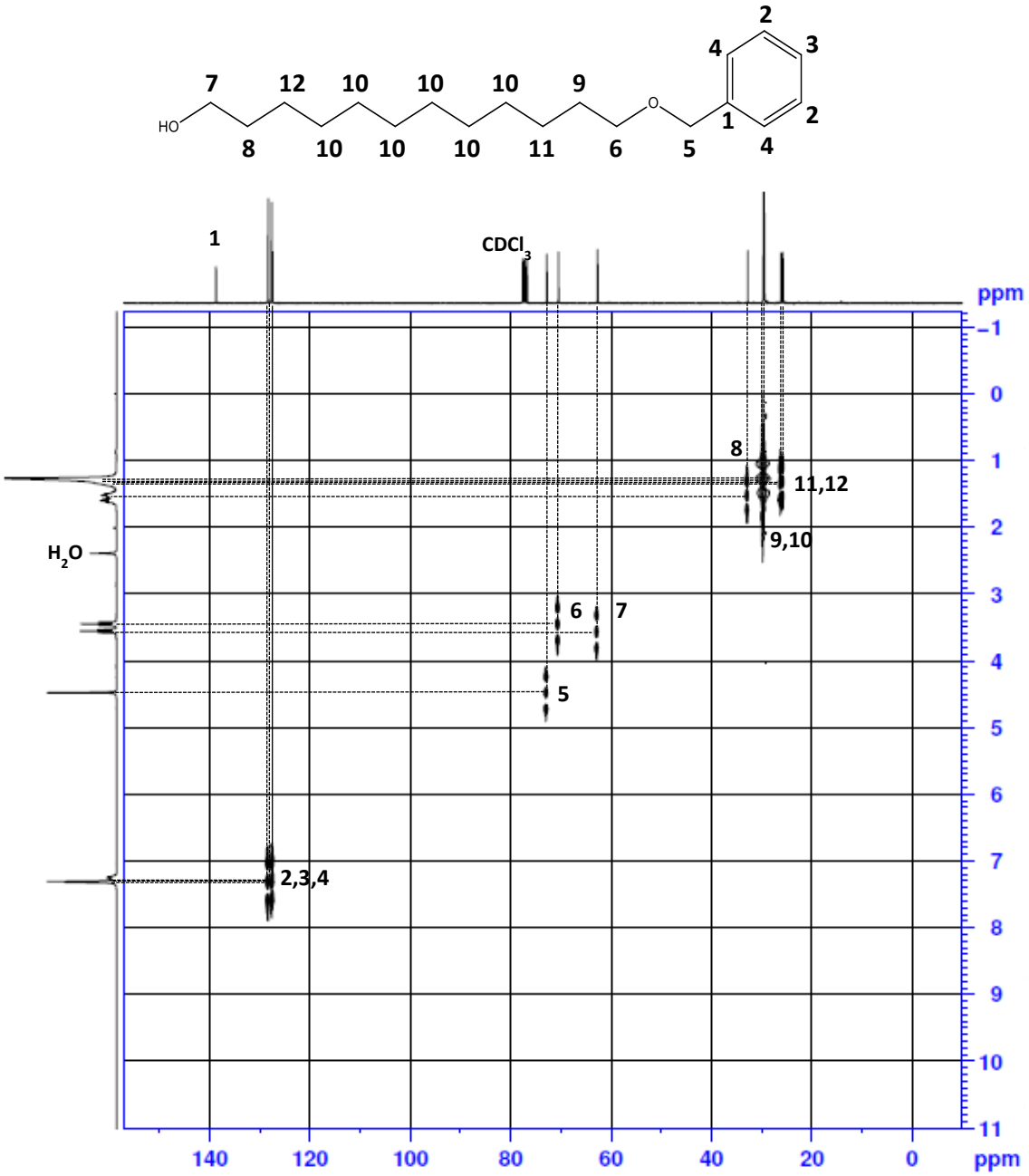
Anexo 5 - Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) do 12-(benziloxi)dodecan-1-ol.



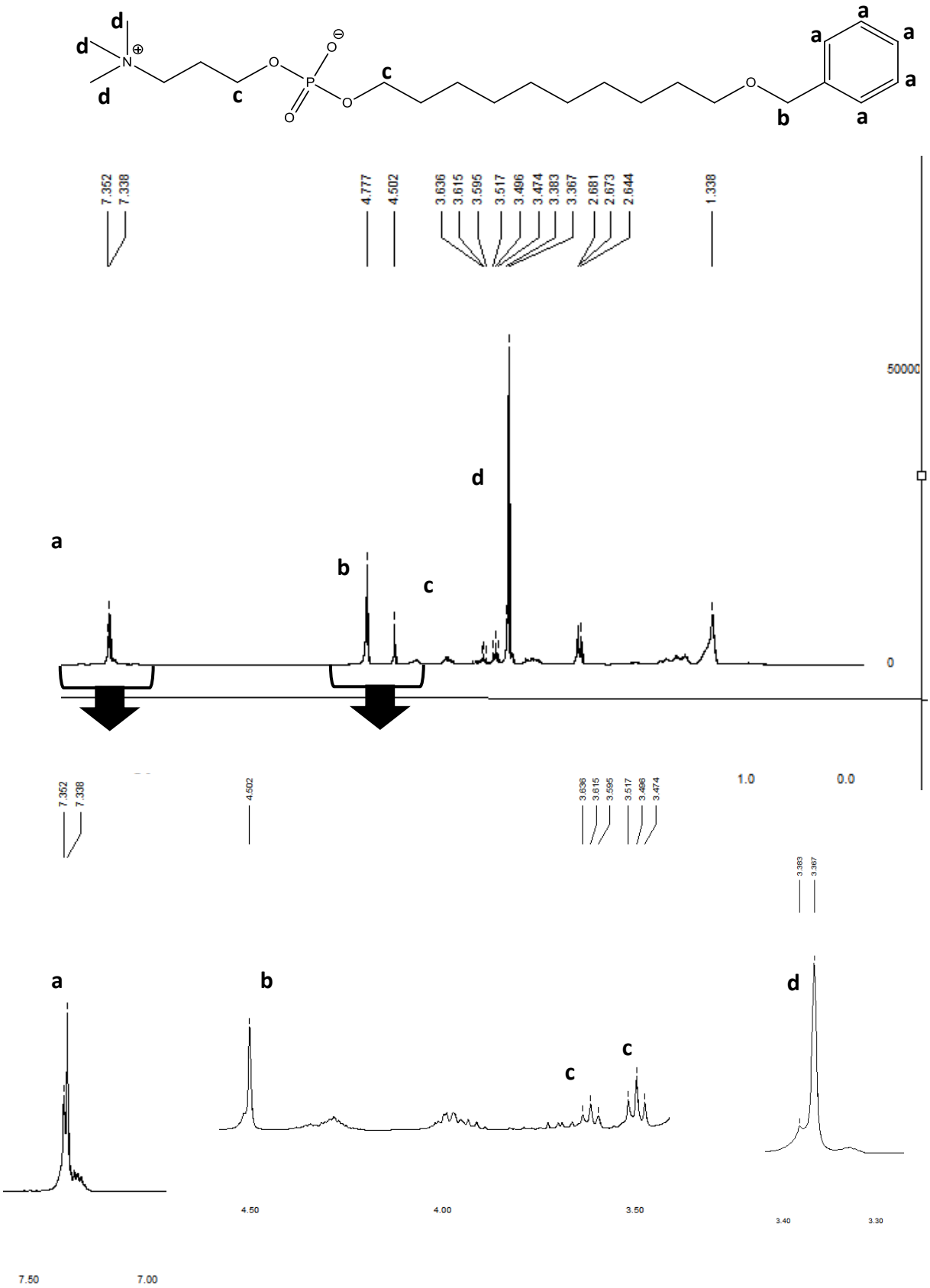
138,69 ppm, 128,32 ppm, 127,62 ppm, 127,46 ppm, 77,63-76,78 ppm ($CDCl_3$), 72,86 ppm, 70,54 ppm, 62,74 ppm, 32,80 ppm, 29,78 ppm, 29,66 ppm, 29,62 ppm, 29,51 ppm, 26,22 ppm, 25,84 ppm.



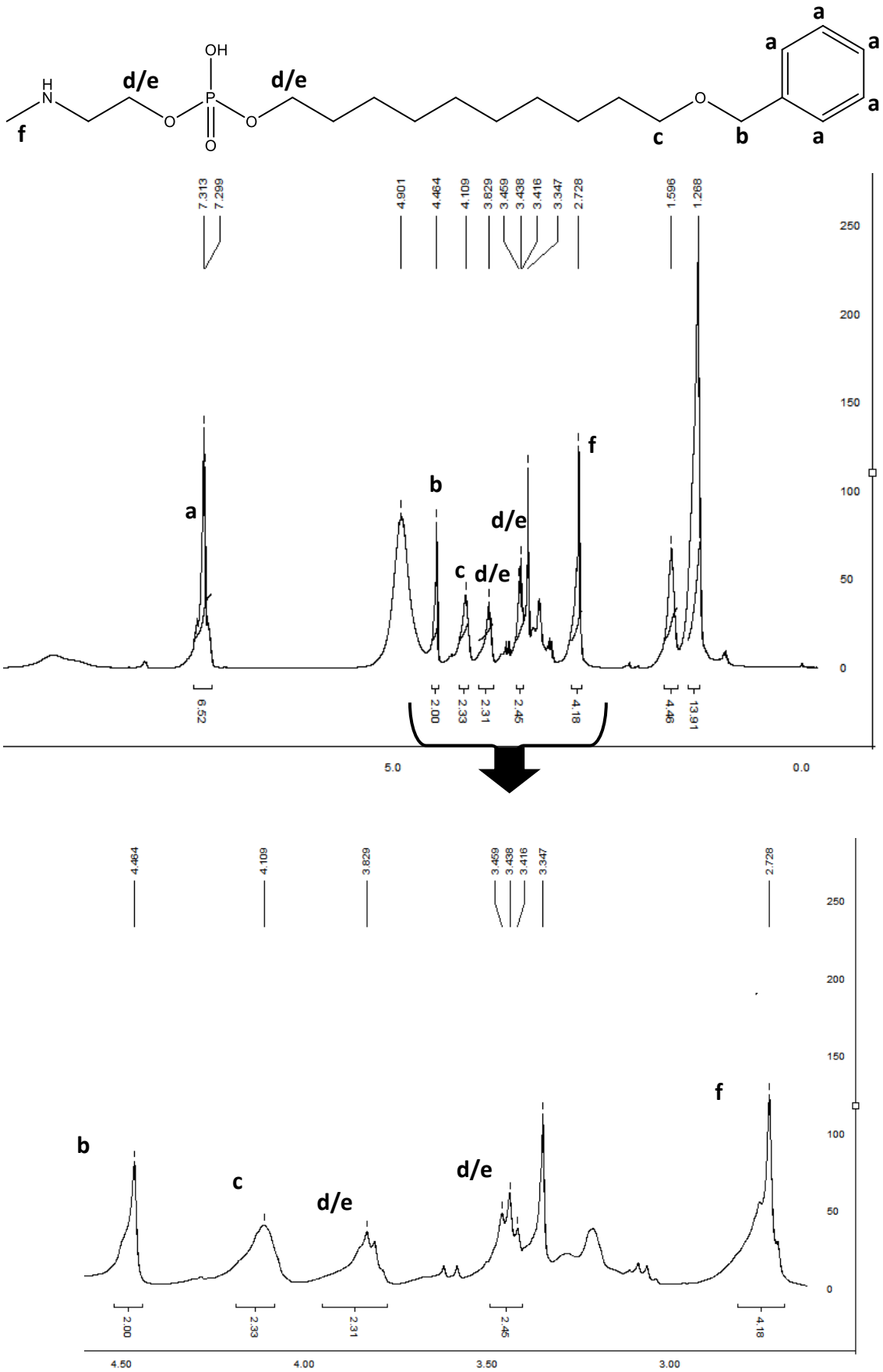
Anexo 6 - Espectro de HETCOR ^{1}H-^{13}C (CDCl3) do 12-(benziloxi)dodecano-1-ol registrado a 30 °C.



Anexo 7 - Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, CD_3OD) indicando os principais sinais para a identificação do benziloxidecil fosfo-homocolina.



Anexo 8 - Espectro de RMN ^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) do benziloxidecil *N*-metil fosfoetanolamina.



Anexo 9 - Ficha do aluno.

01/08/2016

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9138 - 6758292/2 - Luciana de Moura Bueno

Email:	lucianabueno@usp.br
Data de Nascimento:	29/11/1984
Cédula de Identidade:	RG - 55.412.904-8 - SP
Local de Nascimento:	Estado do Mato Grosso do Sul
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharel em Farmácia - Universidade Católica Dom Bosco - Mato Grosso do Sul - Brasil - 2008

Curso:	Mestrado
Programa:	Fármaco e Medicamentos
Área:	Insumos Farmacêuticos
Data de Matrícula:	04/02/2014
Início da Contagem de Prazo:	04/02/2014
Data Limite para o Depósito:	04/08/2016
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Carlota de Oliveira Rangel Yagui - 04/02/2014 até o presente. Email: corangel@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 04/02/2014
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 06/04/2015
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 04/02/2014

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 18/07/2016
Impresso em: 01/08/2016 02:51:24

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9138 - 6758292/2 - Luciana de Moura Bueno

01/08/2016

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5734-7/3	Mecanismos de Ação dos Fármacos aos Níveis Molecular e Eletrônico	04/02/2014	19/05/2014	90	6	100	B	N	Concluída
FBF5777-3/2	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I	13/02/2014	28/05/2014	45	3	100	A	N	Concluída
FBF5704-6/2	Análise Espectrométrica de Fármacos	17/02/2014	01/06/2014	150	10	96	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBF0415 -Química Farmacêutica I, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (1)	01/07/2014	30/11/2014	-	1	-	-	-	-
FBF5805-1/3	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	24/09/2014	28/10/2014	45	3	100	A	N	Concluída
FBA5754-1/2	Atualização em Ciências Farmacêuticas	20/10/2014	26/10/2014	30	2	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	25
Estágios:			
Total:	0	25	25

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Observações:

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão Coordenadora de Programa, em Sessão de 02/03/2015.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 18/07/2016

Impresso em: 01/08/2016 02:51:24

Anexo 10 - Informações para os Membros da Banca Julgadoras de Mestrado.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a argüição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na argüição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091 3621 - Fax (11) 3091 3141 – e-mail: pgfarma@usp.br