

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Estudo da síntese de análogos da miltefosina como
potenciais agentes antineoplásicos

CAMILA AYAMI YAMAMOTO TANABE

São Paulo
2011

CAMILA AYAMI YAMAMOTO TANABE

Estudo da síntese de análogos da miltefosina como potenciais
agentes antineoplásicos

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

Área de concentração: Insumos
Farmacêuticos

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

São Paulo
2011

Camila Ayami Yamamoto Tanabe

**Estudo da síntese de análogos da miltefosina como potenciais
agentes antineoplásicos**

Comissão julgadora da
dissertação para a obtenção do grau de Mestre

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

1^o. examinador

Prof. Dr. Flavio da Silva Emery

2^o. examinador

Prof. Dr. Guilherme Costa Matsutani

São Paulo, 20 de dezembro de 2011.

*Aos meus pais, Antônio e Luiza
e ao meu irmão, Anderson,
toda a minha gratidão
pelo imensurável incentivo,
compreensão e carinho.*

À minha querida tia Carmen Kazuko Yamamoto Ide (In memoriam).

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder força e persistência para esta caminhada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado concedida.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), pela oportunidade e infra-estrutura para a realização deste projeto.

Aos meus pais, Antônio e Luiza, que me educaram da melhor forma possível e que sempre acreditaram na minha competência, por todo amor e educação que me deram durante toda a minha vida e pelo apoio em tempo integral.

Ao meu irmão Anderson, pela solidariedade e por todo suporte durante a realização deste trabalho, pelos ensinamentos e pelo companheirismo.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Carlota de Oliveira Rangel Yagui, pela oportunidade, confiança, incentivo e paciência.

À Prof^a. Dr^a. Kátia Cirlene Alves Botelho, pela disponibilidade, por suas sugestões durante o desenvolvimento da parte experimental, pelos momentos de descontração, pela amizade e por toda ajuda.

Ao Prof. Dr. Roberto Parise Filho, pela dedicação, paciência e incentivo, e por toda ajuda disponível sempre que precisei. Agradeço muito por todo conhecimento agregado e pela disponibilidade.

Ao Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior, pela disponibilização de seu laboratório para a realização de parte deste trabalho.

À amiga Kely Medeiros Turra pela amizade de todos esses anos e por toda ajuda que precisei.

À amiga Marcela de Siqueira Cardoso Silva, pela disponibilidade, ajuda e amizade durante todo o convívio no laboratório, pelas conversas, cumplicidade e boas risadas, além dos cafés diários.

Aos amigos e colegas de laboratório: Ellen, Letícia, Arthur, Juliana, Nathália, Maurício, Mariana, Charles e Carina, pela amizade e pela convivência agradável.

Ao Prof. Dr. Diogo Seibert Lüdtke e suas alunas Ana Dionéia e Adrieli pela amizade e por toda ajuda, pelos momentos de descontração e pelo café nosso de cada dia. Em especial ao Hugo pela paciência e ajuda, assim que ingressei no mestrado.

À Prof^a. Tit. Elizabeth Igne Ferreira, pela disponibilidade dos equipamentos de seu laboratório e aos amigos e colegas do LAPEN: Bárbara, Natanael, Fredson, Marina, Ricardo, Vanessa, Andressa, Soraya, Jeanine, Tacila, Patrícia e João Paulo. E ao Prof. Dr. Gustavo Trossini, pelas sugestões durante o desenvolvimento deste projeto, pelos momentos de descontração e pelos cafés e ao Marco Arribas por toda ajuda e sugestões.

Aos amigos e colegas de outros laboratórios: Daiana, Nathália, Hugo, Fernando, Jesus, Flávia, Stanley e Eliane por toda ajuda e pelos momentos de descontração.

Aos que moraram comigo, Alex, Camilo e Gabriela, pelo convívio agradável e pelos momentos de descontração.

À toda a minha família, que sempre esteve presente, pelo incentivo, pelas palavras de conforto nas horas mais difíceis e pelo apoio incondicional. Em especial aos meus primos, pela cumplicidade, paciência, amizade e compreensão.

A todos que não foram citados, mas que de alguma forma participaram e colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho.

"Há três métodos para ganhar sabedoria: primeiro, por reflexão, que é o mais nobre; segundo, por imitação, que é o mais fácil; e terceiro, por experiência, que é o mais amargo."

Confúcio

RESUMO

TANABE, C. A. Y. **Estudo da síntese de análogos da miltefosina como potenciais agentes antineoplásicos**. 2011. 79f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

O câncer é umas das principais causas de morte no mundo. Com a falta de critério individual para o tratamento de câncer metastático, a quimioterapia ainda é realizada com fármacos de toxicidade significativa como antraciclinas e taxanos. Portanto, a busca por novos fármacos é de suma importância. Os alquilfosfolipídios constituem uma nova classe de fármacos antineoplásicos, tendo como protótipo a miltefosina, empregada para o tratamento tópico de metástases cutâneas de câncer de mama. No entanto, este fármaco apresenta toxicidade gastrointestinal e ação hemolítica. Neste trabalho, investigou-se a rota sintética da miltefosina, bem como a síntese de novos análogos cicloalquílicos possivelmente menos hemolíticos e menos tóxicos. Para a síntese da miltefosina, 4 etapas foram realizadas: a) obtenção do Dicloreto de fosforoexadecila; b) obtenção de 2-(hexadeciloxi)-3-metil-oxa-1,3,2-oxazofosfolano; c) obtenção do fosfato de 2-(metilamino) etil hexadecila; d) obtenção da miltefosina (hexadecilfosfocolina); sendo o fármaco obtido com sucesso. Em seguida, metodologias de monossustituição em dióis simétricos foram investigadas para obtenção de ω -hidroxidecil-cicloalquilmetil éteres a serem empregados na rota da miltefosina visando análogos alcóxicicloalquílicos. Diversas tentativas foram empregadas sem sucesso, impedindo-nos de dar continuidade à síntese destes análogos. Partindo-se do reagente cicloexanoetanol e empregando-se a rota de síntese aprimorada da miltefosina, obtivemos o intermediário fosfato de 2-(metilamino)etil cicloexila puro. A última etapa, referente à metilação da amina, resultou em composto dimetilado ao invés do trimetilado esperado. Um ajuste dos parâmetros reacionais como, por exemplo, aumento da concentração dos reagentes de partida, deve resultar no composto planejado. Tanto o intermediário obtido quanto o análogo desejado poderão ser futuramente ensaiados quanto à atividade antitumoral e potencial hemolítico.

Palavras-chave: Quimioterápicos, alquilfosfocolinas, miltefosina, planejamento de fármacos.

ABSTRACT

TANABE, C. A. Y. **Study of miltefosine analogues synthesis aiming at new antineoplastic agents.** 2011. 79f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Cancer is one of the major causes of death worldwide. Due to the lack of individual standard treatment for metastatic cancer, chemotherapy is still based in the use of significantly toxic drugs like anthracyclines and taxanes. Hence, there is a need to search for new anticancer agents. Alkylphospholipids recently emerged as a new antitumor class and its lead compound, miltefosine, has been used for the topical treatment of cutaneous metastasis in breast cancer. However, this drug exhibits gastrointestinal toxicity and hemolytic activity. We investigated miltefosine synthetic route as well as the synthesis of cycloalkyl analogues possibly less toxic and hemolytic. We started from miltefosine synthesis, which included four steps: a) generation of hexadecyl phosphorodichloridate; b) generation of 2-(hexadecyloxy)-3-methyl-oxo-1,3,2-oxazaphospholane; c) generation of hexadecyl 2-(methylamino) ethyl phosphate; d) production of the final product miltefosine (hexadecyl-phosphocholine). The route was optimized, resulting in the desired drug. After that, several methods for symmetrical diols monoprotection were investigated aiming at the generation of ω -hydroxydecyl cycloalkylmethyl ethers to be further employed in miltefosine synthetic route aiming at alkoxy-cycloalkyl analogues. Several attempts were realized however unsuccessfully, preventing us to move on in these analogues synthesis. In a different approach, we started from cyclohexylethanol and, employing the synthetic route of miltefosine, obtained the third intermediate, 2-cyclohexylethyl 2-(methylamino)ethyl phosphate pure. The methylation step, last one to obtain the cycloalkyl analogue, resulted in a dimethyl analogue instead of a trimethyl one. We believe that adjusting the reaction parameters, such as increasing reagents concentrations, should result in a successful methylation step. The intermediate obtained as well as the analogue planned might be future evaluated in terms of hemolytic potential and antitumor activity.

Keywords: Chemotherapeutic agents, alkylphosphocholines, miltefosine, drug design.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1. Câncer	14
2.1.1. Desenvolvimento do câncer	16
2.1.2. Metástase	17
2.1.3. Câncer de mama	19
2.1.4. Tratamento	20
2.2. Lipídios de membrana.....	22
2.3. Membrana plasmática.....	24
2.4. Alquilfosfocolinas	26
2.4.1. Mecanismo de ação.....	30
2.4.2. Desenvolvimento de novas alquilfosfocolinas	33
3. OBJETIVOS	36
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1. Material	37
4.1.1. Reagentes, solventes e material para cromatografia.....	37
4.1.2. Equipamentos.....	38
4.2. Métodos	38
4.2.1. Síntese do fármaco miltefosina.....	38
4.2.1.1. Obtenção de dicloreto de fosforoexadecila (I).....	38
4.2.1.2. Obtenção de 2-(hexadeciloxi)-3-metil-2-oxa-1,3,2-oxazofosfolano (II).....	39
4.2.1.3. Obtenção de fosfato de 2-(metilamino)etil hexadecila (III)	40
4.2.1.4. Obtenção do produto final hexadecilfosfocolina (IV)	40
4.2.2. Síntese dos análogos alcocicicloalquílicos	41
4.2.2.1. Obtenção do intermediário ω -hidroxidecil-cicloexilmetil éter (VII) ...	41
4.2.2.1.1. Obtenção do ω -hidroxidecilbenzil éter (Va) – Bouzide <i>et al.</i> (1997).....	41
4.2.2.1.2. Obtenção do ω -hidroxidecilbenzil éter (Va) – Agresta <i>et al.</i> (2003).....	42

4.2.2.1.3. Obtenção do ω -hidroxideciltetraidropirano éter (Vc) – Deka e Sarma (2001)	42
4.2.3. Síntese dos análogos cicloalquílicos da miltefosina	43
4.2.3.1. Obtenção de dicloreto de fosforoalquilcicloexila (Ia-b)	43
4.2.3.2. Obtenção de 2-(cicloexilalquiloxi)-3-metil-oxa-1,3,2-oxazofosfolano (IIa-b).....	44
4.2.3.3. Obtenção de fosfato de 2-(metilamino)alquil cicloexila (IIIa-b).....	45
4.2.3.4. Obtenção do produto final alquilcicloexanofosfocolina (IVa-b).....	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1. Síntese da miltefosina.....	47
5.1.1. Obtenção do dicloreto de fosforoexadecila (I)	48
5.1.2. Obtenção do 2-(hexadeciloxi)-3-metil-oxa-1,2,3-oxazofosfolano (II)	48
5.1.3. Obtenção do fosfato de 2-(metilamino)etil hexadecila (III).....	50
5.1.4. Obtenção da hexadecilfosfocolina (IV)	50
5.2. Síntese dos análogos alcóxicicloalquílicos	51
5.2.1. Síntese do intermediário ω -hidroxidecil-cicloexilmetil éter.....	52
5.2.1.1. Monoproteção do 1,10-decanodiol.....	52
5.2.1.1.1. Metodologia empregada por Bouzide <i>et al.</i> (1990).....	53
5.2.1.1.2. Metodologia empregada por Agresta <i>et al.</i> (2003)	54
5.2.1.1.3. Metodologia empregada por Deka e Sarma (2001)	55
5.3. Síntese dos análogos cicloalquílicos da miltefosina	57
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
8. ANEXOS	70
8.1. Espectros	70

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O câncer pode ser definido como um conjunto de doenças e corresponde a uma das maiores causas de morte no Brasil e no mundo. Só nos Estados Unidos, o câncer provoca cerca de 500 mil mortes a cada ano. É a segunda causa de morte na população brasileira desde 2003 e representa aproximadamente 17% das mortes por causa conhecida. O câncer de mama é o mais comum em mulheres e corresponde ao segundo tipo mais freqüente no mundo (INCA, 2011). Mundialmente, os cânceres mais comuns em 2008 foram o de pulmão, de estômago, de mama, e cólon e reto. Estimativas apontaram o câncer de pele do tipo não-melanoma, o de próstata, mama feminina, cólon e reto, pulmão, estômago e colo do útero como os tipos de maior incidência na população brasileira em 2010 (Figura 1) (INCA, 2011; Merkle, 2007).

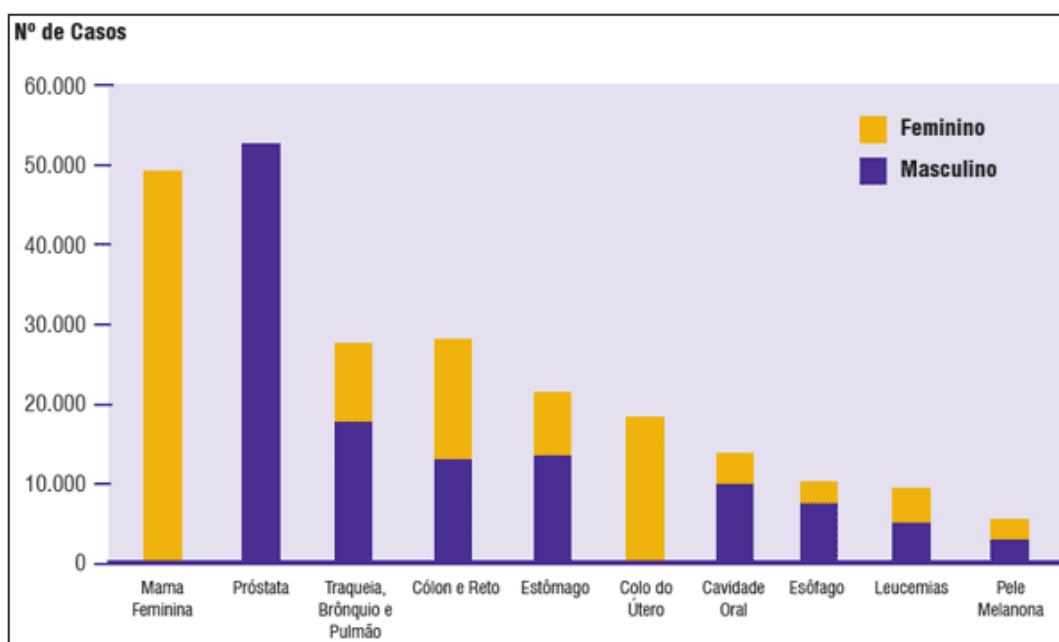


Figura 1. Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2010, exceto pele não-melanoma, na população brasileira (INCA, 2011).

Atualmente, a quimioterapia para tratar o câncer de mama ainda é realizada com antraciclinas e taxanos, fármacos que apresentam toxicidade significativa, visto que atuam na inibição direta do ciclo celular. Em vista das limitações terapêuticas para o tratamento de câncer, em particular do câncer de mama, é evidente a necessidade de novos agentes antitumorais que apresentem melhor espectro de

ação, eficácia contra tumores resistentes aos fármacos disponíveis e, ainda, que melhorem a tolerabilidade ao tratamento (Leighl, *et al.*, 2008).

As alquilfosfocolinas mostraram ser uma classe de fármacos quimioterápicos bastante promissora, apresentando potente atividade antitumoral. Essa atividade, entretanto, é limitada pelos seus efeitos adversos consideráveis, destacando-se o potencial hemolítico e toxicidade gastrointestinal. Considerando-se o potencial da classe dos alquilfosfolipídios como agentes antitumorais, a busca por novos análogos da miltefosina mais potentes e menos tóxicos é de grande interesse.

Em planejamento e desenvolvimento de fármacos por modificação molecular, algumas estratégias são utilizadas para obtenção de compostos mais eficazes. Por exemplo, a regra das mínimas modificações, na qual os análogos são obtidos através de pequenas modificações em sua estrutura, apresentando alta similaridade com o protótipo. Essas modificações são obtidas através de reações orgânicas simples como hidrogenações, hidroxilações, metilações e substituições isostéricas, podendo produzir tanto aumento na potência ou na seletividade quanto supressão de efeitos tóxicos ou indesejados (Wermuth, 2008).

Neste trabalho, o planejamento de novos análogos foi baseado nos estudos de Papazafiri e colaboradores (2005), os quais demonstraram que modificações na porção lipídica (como a adição de anéis cicloalquílicos) da molécula da miltefosina podem resultar em aumento de atividade antitumoral e redução do efeito hemolítico, ou seja, compostos mais eficazes, preconizando-se as modificações mínimas e introduzindo-se sistemas anelares no composto protótipo. Além disto, a ciclização de estruturas abertas ou a criação de um sistema anelar adicional em uma estrutura estabelecida representa uma alternativa interessante na pesquisa por conformações biologicamente ativas (Wermuth, 2008).

Assim, acredita-se que a presença de anéis cicloalcanos na cadeia alquílica possa originar análogos com atividade antitumoral semelhante ou até melhor quando comparado à miltefosina, porém com ação hemolítica reduzida, resultando em compostos potencialmente interessantes para o tratamento de câncer.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Câncer

Atualmente, o câncer é um importante problema de saúde pública não somente em países desenvolvidos, mas também em países em desenvolvimento. Embora as maiores taxas de incidência de câncer sejam encontradas em países desenvolvidos, dos 10 milhões de novos casos identificados a cada ano, 5,5 milhões são diagnosticados em países em desenvolvimento, geralmente devido aos processos de globalização e mudanças de hábitos de vida da população mundial (Achutti, Azambuja, 2004; Guerra *et al.*, 2005).

Segundo dados estatísticos recentes, estima-se que o número de novos casos de câncer seja de 16 milhões para o ano de 2020 e de 27 milhões para 2030, significando quase o triplo da incidência vista atualmente no mundo (IARC/WHO, 2011). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2011), são estimados aproximadamente 500 mil novos casos de câncer no Brasil para o ano de 2011, sendo que nos Estados Unidos, espera-se um total de 1.596.670 novos casos de câncer e 571.950 mortes em 2011.

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

A palavra câncer tem origem do latim, cujo significado é caranguejo. Ao que se sabe, foi empregada em virtude do modo como a doença se desenvolve, infiltrando-se em órgãos e tecidos, da mesma forma como o crustáceo introduz suas patas na areia ou lama para se fixar, dificultando sua remoção (Almeida *et al.*, 2005).

O câncer corresponde cientificamente a uma neoplasia, palavra de origem grega que significa “nova proliferação”, na qual ocorre crescimento excedente e descontrolado de tecido anormal formando uma massa, denominada tumor. Este termo é referido originalmente a um inchaço causado por inflamação aguda não-persistente em que se identificam os principais sinais de inflamação (rubor, calor, dor e edema), entretanto, é comumente utilizado como sinônimo de neoplasia. Definido como um conjunto de mais de 100 patologias, o câncer é caracterizado por alterações no ácido desoxirribonucléico (ADN), o que acarreta em desenvolvimento de células anormais (Almeida *et al.*, 2005; Merkle, 2007).

Células cancerosas são formadas quando as células normais perdem o mecanismo de regulação que controla o crescimento e a multiplicação. Estas células se tornam nocivas e geralmente perdem as características especializadas que distinguem um tipo de célula de outro tipo (por exemplo, uma célula hepática de uma célula sanguínea), processo conhecido como “perda de diferenciação” (Patrick, 2009).

O crescimento celular descontrolado pode ser resultado da alteração hereditária em uma ou mais células, que permite a evasão de vários mecanismos de homeostase responsáveis pelo controle da proliferação celular, e acarreta em angiogênese, ou seja, a formação de novos vasos sanguíneos para promover a nutrição destas células. É provável que a alteração ocorra em células capazes de divisão. Quando isso ocorre, as células são chamadas de “células transformadas”, embora essa denominação fosse inicialmente empregada quando a alteração celular ocorria em um sistema experimental *in vitro*. A transformação pode ser desencadeada por vários fatores incluindo exposição química, viral ou à radiação (Mitchell *et al.*, 2006).

A etiologia ainda é desconhecida, no entanto acredita-se que haja fatores de risco importantes para o desencadeamento da doença, como fatores genéticos, desequilíbrios hormonais, influências ambientais, idade avançada e estilo de vida (Kasapovic *et al.*, 2008; Mitchell *et al.*, 2006). Na maioria dos casos, a base da transformação geralmente é uma mutação na estrutura primária do ADN, mas também é suscetível de ser influenciada por eventos epigenéticos (mudanças na expressão gênica) (Evans, 1991; Mitchell *et al.*, 2006). Cerca de 80% dos casos podem estar relacionados ao meio ambiente, o que inclui ambiente ocupacional,

social, cultural, de consumo e o meio em geral, onde se encontram vários fatores de risco de câncer (Almeida *et al.*, 2005).

Há diferentes tipos de câncer, todos caracterizados pela multiplicação desordenada de células. Podem-se classificar os tumores em dois tipos gerais, de acordo com o seu comportamento: benigno e maligno. Neoplasias benignas não invadem tecidos adjacentes, embora substituam esses tecidos, já que aumentam de tamanho. Neoplasias malignas são caracterizadas pela incapacidade de se dividir e de se diferenciar de forma normal, além de adquirir a capacidade de invadir tecidos adjacentes, podendo atingir locais distantes. Assim, os tumores malignos são formados através do acúmulo de massa celular, a qual pode adquirir a capacidade de se desprender do tumor e originar a metástase, utilizando os vasos linfáticos e a circulação sanguínea para atingirem outros órgãos (Almeida *et al.*, 2005).

Essa propagação metastática de tumores sólidos é direta ou indiretamente responsável pelas mortes relacionadas ao câncer (Kumar *et al.*, 2005; Menon, Teicher, 2002; Silva *et al.*, 2002). Aproximadamente 30% dos pacientes com câncer têm metástases clinicamente detectáveis na diagnose inicial e cerca de 30 - 40% desses pacientes apresentam metástases ocultas. Há uma necessidade iminente de prognosticar o potencial metastático do tumor característico, identificando o foco metastático oculto, para impedir a disseminação e a transformação de tumores em fenótipos mais invasivos (Evans, 1991; Menon, Teicher, 2002).

2.1.1. Desenvolvimento do câncer

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

Possivelmente até 30% dos cânceres são causados pelo fumo, enquanto outros 30% estão relacionados à dieta do indivíduo. Substâncias químicas carcinogênicas no cigarro, na comida e no meio ambiente podem causar câncer pela indução de mutação genética ou interferindo na diferenciação de células normais. O câncer pode ser originado por eventos químicos, normalmente mutagênicos, mas

para que o câncer se desenvolva, a exposição à outros fatores mutagênicos é geralmente requerida (Patrick, 2009)

Teorias sobre carcinogênese citam três etapas envolvidas no processo: iniciação, promoção e progressão. Na etapa de iniciação, primeiro estágio da carcinogênese, as células sofrem um efeito, direto ou indireto, dos agentes cancerígenos (oncoiniciadores), quando são expostas à essas substâncias durante a replicação do ADN, provocando algumas modificações genéticas precoces. Nesta fase, as células se apresentam geneticamente alteradas, não sendo possível ainda detectar clinicamente um tumor (INCA, 2011; Merkle, 2007).

No segundo estágio da carcinogênese, a promoção, as células geneticamente modificadas são expostas a um segundo grupo de agentes cancerígenos, denominados oncopromotores, que aumentam o seu crescimento. Para que a célula iniciada seja transformada em célula maligna, é necessário um contato longo e contínuo com o agente oncopromotor (por exemplo hormônios), sendo que a interrupção deste contato, tanto por fatores relacionados ao hospedeiro quanto por fatores relacionados com o tumor, muitas vezes pode cessar o processo neste estágio. Esta fase também é conhecida como o período latente, pois geralmente leva muitos anos para ocorrer. Os oncopromotores podem alterar a função dos genes que controlam o crescimento celular e a duplicação, podem também alterar a comunicação celular e inibir a resposta celular relacionada ao estímulo de crescimento (Menon, Teicher, 2002; Mitchell *et al.*, 2006).

Na progressão, último estágio da carcinogênese, as células alteradas estão em contínua e irreversível proliferação descontrolada, devido à ação de agentes oncoaceleradores. Neste estágio o câncer está instalado, apresentando-se como uma extensa massa tumoral, que evolui até o aparecimento das primeiras manifestações clínicas. No final desta fase pode ocorrer a invasão de tecidos adjacentes e a presença de metástases em regiões distantes do sítio tumoral. (INCA, 2011; Merkle, 2007).

2.1.2. Metástase

Na cascata metastática, as células tumorais sofrem uma série de alterações, que resultam em pré ou pós-regulação das moléculas de superfície celular,

proteases, inibidores de proteases, fatores de motilidade, fatores de estimulação do crescimento e moléculas promotoras de angiogênese. Assim, o desenvolvimento de micro-colônias de células tumorais em um órgão secundário é facilitado pelos fatores de crescimento e os fatores angiogênicos são essenciais para o desenvolvimento de metástases. Metástase é a principal diferença entre tumores malignos e benignos. O mecanismo de invasão e metástase ocorre em etapas sequenciais (Figura 2), podendo ser interrompido a qualquer tempo ou estágio tanto por fatores relacionados ao hospedeiro, quanto por fatores relacionados ao tumor (Menon, Teicher, 2002; Mitchell *et al.*, 2006).

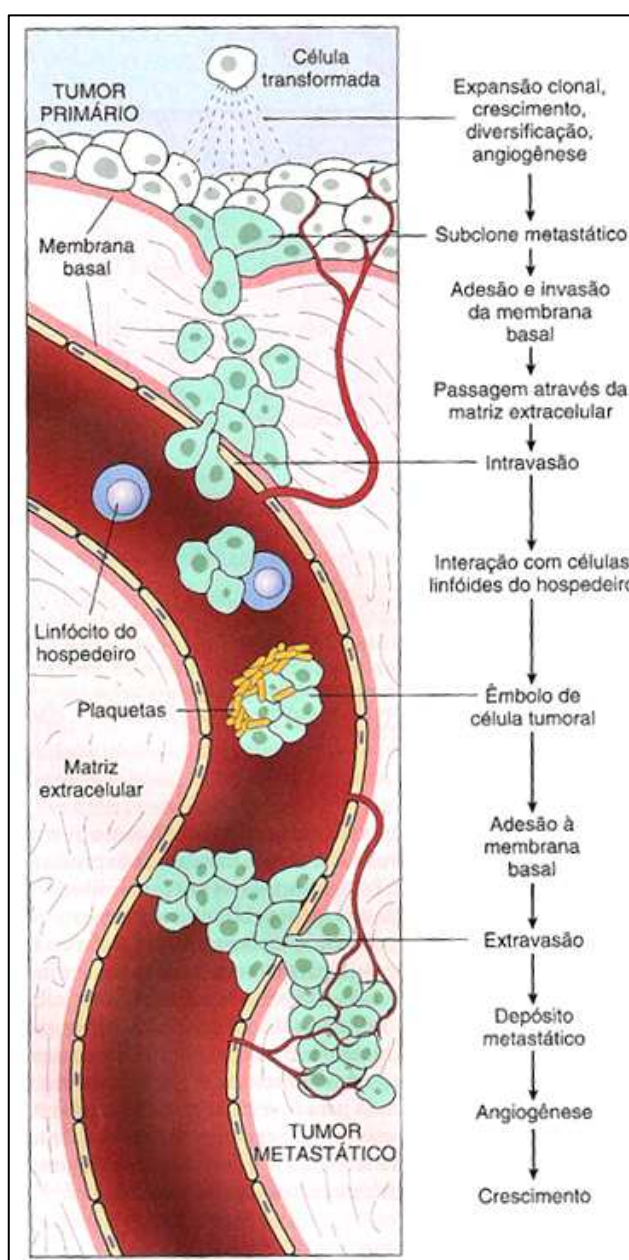


Figura 2. Cascata metastática (Mitchell *et al.*, 2006).

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

2.1.3. Câncer de mama

Mundialmente, o câncer de mama afeta aproximadamente 1,15 milhões de mulheres a cada ano, o que resulta em 22% de todos os cânceres femininos (INCA, 2011). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*, WHO) e o INCA, as neoplasias malignas são a segunda causa de morte na população brasileira, sendo o câncer de mama de maior incidência nas mulheres. As estimativas para o ano de 2011 eram de 49 mil novos casos de câncer de mama em mulheres, só no Brasil (INCA, 2011; WHO, 2008).

Este tipo de câncer se tornou um importante problema de saúde pública na América Latina, pois nos últimos quarenta anos observou-se um aumento nas taxas de mortalidade por câncer de mama nesta região. Além disso, um estudo realizado no estado de São Paulo identificou o câncer de mama como a principal causa de morte por neoplasias em mulheres de idade entre 30 e 49 anos no período de 1991 a 1995 (Guerra *et al.*, 2005).

O câncer de mama tem início como doença local, a maioria começa nos ductos (carcinomas ductais), mas pode se disseminar para pontos distantes no organismo e evoluir para metástase, processo no qual os linfonodos, vasos sanguíneos e cavidades corporais são invadidos pelo tumor. A hiperproliferação desordenada de células mamárias, tanto do tecido epitelial quanto do tecido conjuntivo, é comum (Heim *et al.*, 2005; Mitchell *et al.*, 2006; Weigelt *et al.*, 2005).

No caso de câncer de mama, particularmente, a presença de marcadores de expressão gênica de tumor de glândula mamária pode ser um dos meios de identificar os pacientes mais suscetíveis a desenvolver câncer metastático. Além disso, poderia beneficiar na terapia adjuvante erradicando as células tumorais de mama que talvez já tenham se propagado para sítios remotos na ocasião do diagnóstico (Weigelt *et al.*, 2005).

Ainda que haja avanços na prevenção do câncer de mama, no diagnóstico precoce e na terapia adjuvante, muitos pacientes desenvolverão metástase, uma doença incurável com a sobrevida média de aproximadamente dois anos (18-24 meses) (Mitchell *et al.*, 2006).

2.1.4. Tratamento

Atualmente o tratamento para o câncer de mama baseia-se em três segmentos: cirurgia, radioterapia e terapia farmacológica. Entretanto, estes tratamentos não se ajustam a todos os pacientes, sendo necessária a terapia associada, na qual a sua escolha é determinada por diversos fatores como a idade do paciente, menopausa, o tipo de câncer, o estágio da doença e se o tumor contém receptores de hormônios. Qualquer terapia ou todas elas podem ser utilizadas separadamente ou, frequentemente, associadas (em diferentes combinações) com o objetivo de erradicar o câncer. De acordo com estudos, um tratamento local não-associado para pacientes com câncer de mama avançado proporciona uma sobrevida baixa (Almeida *et al.*, 2005; Frasci *et al.*, 2010; Leigh, *et al.*, 2008).

A técnica cirúrgica é muito utilizada para remoção de tumores e apresenta alta eficácia em casos sem metástase. A radioterapia, geralmente é utilizada em associação com a cirurgia, promovendo a sinergia do tratamento. A radioterapia isoladamente já é capaz de reduzir tumores grandes, a recorrência e a chance de metástase. Logo, é uma técnica bastante utilizada no tratamento de neoplasias, porém, apresenta muitas limitações, já que causa efeitos colaterais severos (Calabresi *et al.*, 2006; Merkle, 2007).

A quimioterapia é realizada com fármacos citotóxicos administrados via oral ou intravenosa. Comumente são utilizadas combinações de fármacos com diferentes mecanismos de ação, visando aumentar a eficiência do tratamento, diminuir a

toxicidade e reduzir a resistência ao fármaco. No entanto, os fármacos empregados podem provocar morte celular inclusive de células saudáveis, pois atuam sistemicamente, e em sua maioria não apresentam boa seletividade, atuando nas células tumorais e normais, particularmente em células gastrointestinais, capilares e do sistema imunológico, isto é, células de crescimento rápido. A ausência de seletividade explica parte dos efeitos adversos dos quimioterápicos como náuseas, vômitos, perda de cabelos e maior suscetibilidade a infecções. Após o tratamento, porém, o organismo é capaz de se recuperar (Almeida *et al.*, 2005; Calabresi, 2006).

Muitos agentes citostáticos usados na terapia antineoplásica atuam no ADN, como as antraciclinas (por exemplo, doxorubicina), na organização do fuso mitótico como, por exemplo, a vimblastina e os taxanos (paclitaxel e docetaxel), inibindo diretamente o desenvolvimento do ciclo celular, diferentemente da miltefosina, a qual age no citoesqueleto (Wieder *et al.*, 1999) (Figura 3).

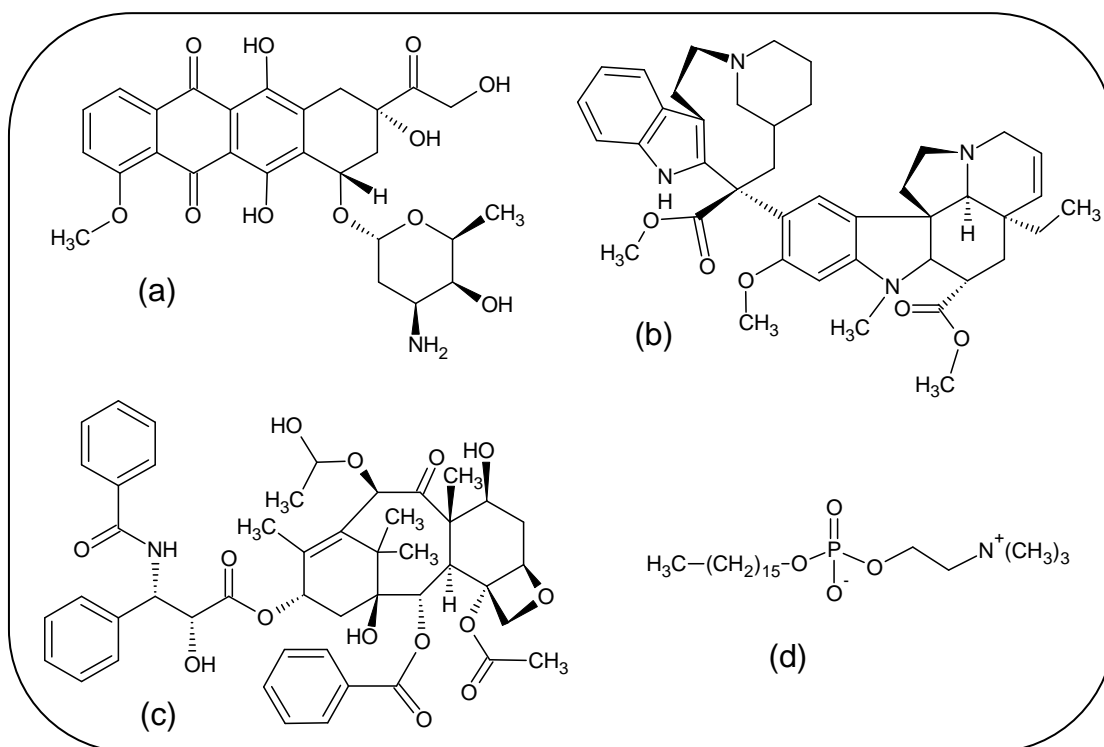


Figura 3. Agentes citostáticos. (a) doxorubicina. (b) vimblastina. (c) paclitaxel. (d) miltefosina.

Enquanto não há tratamento padrão para o câncer de mama metastático, a quimioterapia para o estágio avançado da doença continua sendo realizada principalmente com antraciclinas e taxanos, classes de fármacos que apresentam toxicidade significativa, o que compreende mielossupressão, fadiga, alopecia,

cardiotoxicidade (induzida por antraciclinas) e neuropatia periférica (induzida por taxanos) (Leighl *et al.*, 2008).

2.2. Lipídios de membrana

Os lipídios compõem o quarto grupo principal de moléculas encontradas em todas as células. Constituem um grupo quimicamente diferente entre si e suas funções biológicas são tão diferentes quanto as suas características químicas. Diferentemente dos ácidos nucléicos, proteínas e polissacarídeos, não são moléculas poliméricas. Devido às suas estruturas químicas são capazes de se agregarem e, dessa forma, exercer sua função como matriz estrutural das membranas celulares (Nelson, Cox, 2004; Voet *et al.*, 2006). Em suma, os lipídios, juntamente com proteínas, são componentes essenciais das membranas biológicas, além de servirem de reserva energética através de suas cadeias de hidrocarbonetos e promoverem eventos de sinalização intra e intercelular. Componentes do grupo de lipídios, como os esteróis e os fosfolipídios, são elementos estruturais importantes nas membranas (Voet *et al.*, 2006).

Glicerofosfolipídios (Figura 4) ou fosfoglicerídios constituem o principal componente lipídico de membranas biológicas. Consistem em glicerol-3-fosfato, ou seja, um grupo fosforila ligado à estrutura do glicerol, no qual as posições C1 e C2 são esterificadas com um ácido graxo saturado, de 16 ou 18 átomos de carbono e com um ácido graxo insaturado, de 18 ou 20 átomos de carbonos, respectivamente. Além disso, há um grupo X, usualmente polar, ligado ao grupo fosforila, tornando os glicerofosfolipídios moléculas anfifílicas (Nelson, Cox, 2004; Voet *et al.*, 2006).

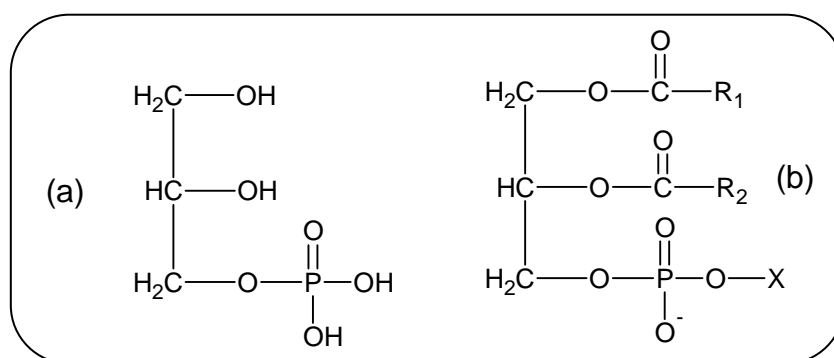


Figura 4. (a) Estrutura do glicerol-3-fosfato. (b) Estrutura geral dos glicerofosfolipídios, onde R₁ e R₂ são cadeias longas de hidrocarbonetos dos ácidos graxos e X é um grupo polar.

Os glicerofosfolipídios são hidrolisados por enzimas denominadas fosfolipases e há uma enzima para cada ligação hidrolisável do glicerofosfolipídio. De acordo com os produtos das reações de hidrólise catalisadas pelas fosfolipases, são determinadas as estruturas químicas dos glicerofosfolipídios. Por exemplo, a fosfolipase A₂ remove por hidrólise o resíduo de ácido graxo da posição C2, formando um lisofosfolipídio. Por serem esterases, não atacam a ligação éter de plasmalogênios, glicerofosfolipídios em que o substituinte do C1 do glicerol está ligado por meio de uma ligação éter α , β -insaturada na configuração cis no lugar de uma ligação éster. Os lisofosfolipídios são potentes tensoativos que podem causar lise da célula, através do rompimento da membrana celular. Cada uma das fosfolipases C e D hidrolisam uma das ligações fosfodiéster do grupo fosfato. Através da ação da fosfolipase C, um derivado de lipídio é gerado, o 1,2-diacilglicerol, o qual age como sinalizador intracelular e ativa proteína quinase (catalisam reações de fosforilação dependentes de ATP) (Nelson, Cox, 2004; Voet *et al.*, 2006).

Esfingolipídios (Figura 5), que também constituem membranas celulares, são derivados de esfingosina, um aminoálcool com cadeia alquílica longa que apresenta duplas ligações com a configuração *trans*. Apresentam uma porção polar e duas caudas apolares, porém não contém glicerol, diferindo dos glicerofosfolipídios. Os esfingolipídios são divididos em três classes, com diferentes grupos na cabeça polar: esfingomielinas, glicolipídios neutros e gangliosídios, os dois últimos contém açúcares em sua composição (Nelson, Cox, 2004; Voet *et al.*, 2006).

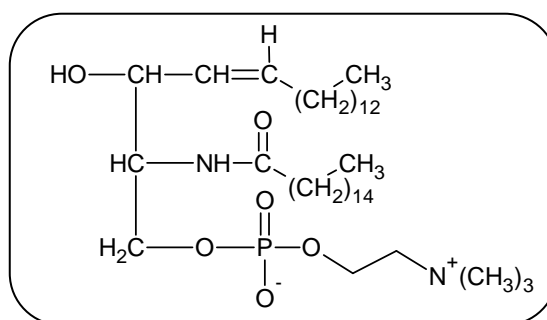


Figura 5. Estrutura da esfingomielina, um esfingolipídio.

Os esfingolipídios, assim como os glicerofosforolipídios, são fontes de lipídios e correspondem à uma das maiores classes de lipídios de membrana. Além disso, possuem atividade sinalizadora discreta. As atividades de proteínas quinases

(adicionam grupos fosfatos a proteínas) e proteínas fosfatases (remove grupo fosfato das proteínas), enzimas envolvidas na regulação do crescimento e na diferenciação celular, parecem ser moduladas pela esfingomielina, bem como pelas porções ceramidas dos esfingolipídios mais complexos (Nelson, Cox, 2004).

Os esteróis (Figura 6) também estão presentes nas membranas da maioria das células eucarióticas, apresentam estrutura característica representada por quatro anéis fundidos. São, portanto, derivados do ciclopentanoperidrofenantreno. O principal esterol encontrado nos tecidos animais é o colesterol (Nelson, Cox, 2004).

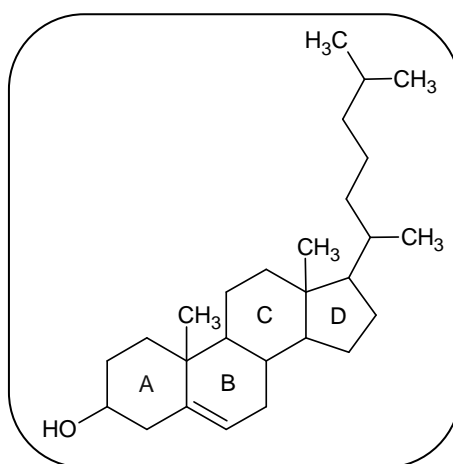


Figura 6. Estrutura do colesterol, um esterol.

2.3. Membrana plasmática

As membranas estabelecem o limite externo das células e regulam o fluxo de íons e moléculas. Assim, organizam sequências de reações complexas e são essenciais tanto para a conservação de energia quanto para a comunicação entre células. As propriedades físicas das membranas são responsáveis pelas atividades biológicas, já que são flexíveis e permitem alterar a forma, acompanhando o crescimento celular e a movimentação. Membranas celulares são estruturas auto-selantes, ou seja, duas membranas são capazes de se fundir, como na exocitose, ou um compartimento envolto por uma membrana pode sofrer uma fissão produzindo dois compartimentos selados, como na endocitose ou na divisão celular, sem que ocorram grandes perdas através das superfícies celulares. Além disso, as membranas celulares são seletivamente permeáveis, podendo reter certos compostos e íons dentro das células e impedir a passagem de outras substâncias (Nelson, Cox, 2004).

Na superfície celular, transportadores são responsáveis pela condução de solutos orgânicos específicos, enquanto receptores identificam sinais extracelulares e desencadeiam alterações moleculares na célula. No interior das células, ocorrem processos celulares organizados pelas membranas como a síntese de lipídios e de algumas proteínas, transduções de energia nas mitocôndrias e cloroplastos (Nelson, Cox, 2004; Voet *et al.*, 2006).

As membranas biológicas são constituídas por uma dupla camada de lipídios, a qual age como uma barreira impedindo a passagem de moléculas e íons, esses lipídios são moléculas anfifílicas, ou seja, com uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica. Isso promove interações entre as porções lipofílicas e interações entre as porções hidrofílicas com a água, resultando em organização das moléculas que compõem a membrana em lâminas, conhecidas como bicamadas de membrana. Esses lipídios são os principais componentes das membranas celulares, sendo os glicerofosfolipídios os mais abundantes (Nelson, Cox, 2004; Voet *et al.*, 2006).

A bicamada é formada em função da orientação dos fosfolipídios, os quais mantêm as porções hidrofóbicas de cada uma das faces voltadas para o centro da bicamada e as porções hidrofílicas para o exterior, interagindo com a fase aquosa. Possui proteínas em sua estrutura, mantidas principalmente por interações hidrofóbicas com os lipídios, as quais catalisam reações químicas, participam do processo de transmissão de informação, além de mediar o fluxo de nutrientes e outras substâncias. Um exemplo destas proteínas são as flipases, proteínas que catalisam os movimentos de transbicamada (em inglês, *flip-flop*) de fosfolipídios específicos (transporte por difusão facilitada). Em especial, essa difusão *flip-flop* ocorre para transpor os fosfolipídios sintetizados na superfície interna para a superfície externa (Nelson, Cox, 2004; Voet *et al.*, 2006).

Devido à sua estrutura química, lipídios raramente são encontrados como moléculas livres, ao invés disso, estão associados a outros lipídios, resultando na formação de agregados lipídicos. A formação desses agregados ocorre quando moléculas anfifílicas estão em meio aquoso, visando minimizar contatos desfavoráveis entre a água e a cauda hidrofóbica dessas moléculas, favorecendo a solvatação das cabeças polares. Podem formar três tipos de agregados: as micelas, estruturas geralmente esféricas, nas quais a região hidrofóbica está agregada no interior; a bicamada, constituída por uma lâmina bidimensional (duas monocamadas

de lipídios, também chamadas de folhetos), que apresenta regiões hidrofóbicas nas suas margens, e que ocasionalmente entram em contato com a água, podendo formar o terceiro tipo de agregado, denominados lipossomos, agregados resultante do dobramento da bicamada, que criam um compartimento aquoso no interior (Nelson, Cox, 2004; Voet *et al.*, 2006).

A partir de estudos iniciais, acreditava-se que os fosfolipídios eram componentes simples da membrana, entretanto, estudos mais recentes identificaram uma gama de propriedades dos fosfolipídios, entre elas, a ligação entre os compartimentos intracelular e extracelular. Dentre as funções caracterizadas, duas são consideradas de maior importância: a transdução do sinal celular e a provisão de uma matriz para interações proteína-lipídio específicas, na qual a ativação depende de diversas enzimas. Assim, as porções lipídicas são consideradas domínios dinâmicos da membrana plasmática enriquecidos com esfingolipídios saturados e colesterol juntamente com proteínas específicas (Berkovic *et al.*, 1998; Heczková, Slotte, 2006).

Fosfatidilinositol e os derivados da esfingosina atuam como sinalizadores intracelulares em diferentes níveis para regular a estrutura da célula e o metabolismo celular. Do lado citosólico da membrana plasmática, o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato atua como sítio de ligação específico para algumas proteínas do citoesqueleto e proteínas solúveis envolvidas em fusão de membranas durante a exocitose, além disso, serve como reservatório de moléculas mensageiras que são liberadas no interior da célula, em resposta aos sinalizadores extracelulares que interagem com receptores específicos na superfície externa da membrana plasmática. A sinalização intracelular ocorre em várias etapas, partindo da remoção enzimática de um grupo fosfolipídico e conclui com a ativação da proteína quinase C (PKC) (Nelson, Cox, 2004; Voet *et al.*, 2006).

2.4. Alquilfosfocolinas

Os alquilfosfolipídios sintéticos pertencem a uma classe heterogênea de agentes antineoplásicos. Apresentam alta estabilidade metabólica, e potente atividade citotóxica contra diferentes tipos de tumores, devido à ação antiproliferativa e indução de apoptose, observadas para diversos tipos de células tumorais humanas

in vitro e *in vivo*, além da atividade antiparasitária *in vitro* (Arthur, Bittman, 1998; Heczková, Slotte, 2006; Li *et al.*, 2006; Papazafiri *et al.*, 2005, Vink *et al.*, 2007).

A partir de extensos estudos de relação estrutura-atividade realizados em uma variedade de alquil lisofosfolipídios, concluiu-se que uma cadeia alquílica longa e uma porção fosfocolina constituem os requisitos estruturais mínimos para que os análogos éter lipídicos apresentem atividade antineoplásica. Esses estudos levaram à descoberta de um novo grupo de compostos, as alquifosfocolinas. Portanto, as alquifosfocolinas são derivadas das alquil-lisofosfocolinas citotóxicas (Huang *et al.* 2005; Unger *et al.*, 2010).

Oberle e colaboradores (2005) demonstraram, a partir das propriedades físico-químicas, que alquifosfocolinas exibiam uma alta similaridade à lisofosfatidilcolina, que é metabolizada assim que incorporada na membrana celular. As lisofosfatidilcolinas são um tipo especial de fosfolipídio, originado a partir da hidrólise de um ácido graxo presente em diversos fosfolipídios. A metabolização das alquifosfocolinas, entretanto, é mais restrita, resultando em acúmulo desses lipídios na membrana. Estas investigações deram origem à classe das alquifosfocolinas, derivados de fosfolipídios sintéticos. Dentre os homólogos de cadeia alquílica, a hexadecilfosfocolina (miltefosina) apresenta atividade antitumoral terapeuticamente útil e foi aprovada em 1992, na Alemanha, para o tratamento tópico de metástase cutânea do câncer de mama (Avlonitis *et al.*, 2003; Fos *et al.*, 1995; Papazafiri *et al.*, 2005).

Os dois primeiros agentes antitumorais pertencentes à família das alquifosfocolinas estudados em ensaios clínicos foram a edelfosina (1-O-octadecil-2-O-metil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, Et-18-OCH₃) e a miltefosina (hexadecilfosfocolina). Infelizmente, esses compostos apresentaram algumas desvantagens, pois apesar de os experimentos *in vitro* terem demonstrado potente atividade antitumoral da edelfosina, os resultados *in vivo* foram apenas moderados, devido à presença da cadeia principal de glicerol, a qual é rapidamente degradada por enzimas do metabolismo de fosfolipídios. Além disso, a administração intravenosa apresentou severos efeitos adversos dependentes de concentração do fármaco, provavelmente em razão da alta similaridade das alquifosfocolinas com lisolipídios, acarretando em destruição de membranas celulares de células saudáveis. Assim como a administração sistêmica, a administração via oral da edelfosina e da miltefosina ainda não está

disponível para tratamentos de câncer. A aplicação da miltefosina é limitada ao tratamento tópico de pacientes com metástase cutânea de câncer de mama. Com isso, há uma necessidade por novos compostos que possuam a mesma atividade antitumoral ou até melhor, porém com menos efeitos adversos que as alquilfosfocolinas disponíveis (Oberle *et al.*, 2005).

Além de ser o protótipo da classe das alquilfosfocolinas, a miltefosina ou hexadecilfosfocolina (Figura 7) foi o primeiro fármaco derivado de fosfolipídios aprovado clinicamente para o tratamento tópico de metástases cutâneas de câncer mamário (Miltex®, atualmente aprovado em vários países europeus) e, ainda, para o tratamento oral de leishmaniose visceral (Impavido®) (Bäumer *et al.*, 2010; Fiegl *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2006; Lindner *et al.*, 2008; Saraiva *et al.*, 2002; Wieder *et al.*, 1999). Recentemente, descobriu-se o potencial da miltefosina como agente antifúngico de amplo espectro (Obando *et al.*, 2007). Também tem sido demonstrada eficiência do fármaco no tratamento tópico em pacientes com linfoma cutâneo, metástase cutânea de melanoma e carcinoma de células escamosas. Entretanto, ensaios clínicos de pacientes com câncer de células escamosas na cabeça e pescoço, sarcoma avançado de tecidos moles e câncer metastático colorretal indicaram benefícios limitados. O desenvolvimento de tratamento oral com a miltefosina foi suspenso, pois o nível plasmático da miltefosina nestes pacientes não poderia alcançar a faixa esperada da atividade antitumoral *in vitro*, devido à toxicidade gastrointestinal dependente da dose (Chakrabandhu *et al.*, 2008).

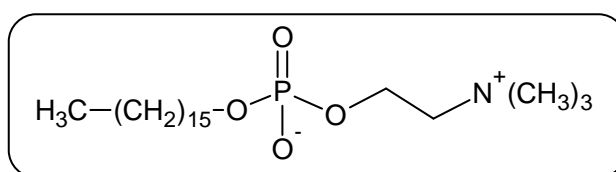


Figura 7. Estrutura química do fármaco miltefosina (hexadecilfosfocolina).

O fármaco miltefosina é uma molécula anfifílica, ou seja, é constituída por uma porção hidrofílica, a qual consiste em um grupo fosfocolina e uma porção hidrofóbica, a qual consiste em uma cadeia alquílica hexadecílica, apresentando capacidade de formar micelas em meio aquoso a uma concentração micelar crítica (CMC) de 2-10 μM (Castro *et al.*, 2001). A miltefosina pertence à classe de tensoativos zwitteriônicos, sendo estruturalmente semelhante aos fosfolipídios

presentes nas membranas biológicas (Castro *et al.*, 2001; MacDonald *et al.*, 1991). Desta maneira, possui a capacidade de interagir com a membrana de células tumorais e de protozoários, atingindo rapidamente outras membranas subcelulares, sendo capaz de afetar o metabolismo em diferentes níveis (Huang *et al.*, 2005; Marco *et al.*, 2009). Assim, a membrana celular parece ser o sítio de ação primário deste fármaco (Wieder *et al.*, 1999).

A miltefosina é um fármaco eficaz, porém, há efeitos adversos consideráveis, um problema limitante na terapia antitumoral. Não apresenta eficácia clínica contra tumores quando administrada oralmente, já que o tratamento oral é dificultado pela toxicidade gastrointestinal, que não permite que os níveis plasmáticos sejam suficientes para o tratamento sistêmico de câncer. A administração intravenosa da miltefosina micelar, por sua vez, não é possível devido à sua ação hemolítica. Quando em associação com éster de glicerol, entretanto, este fármaco é rapidamente absorvido através do tecido cutâneo, favorecendo o seu uso tópico (Agersta *et al.*, 2003; Fiegl *et al.*, 2008; Leonard *et al.*, 2001; Lindner *et al.*, 2008; Seifert *et al.*, 2007).

Em estudos anteriores (Clive *et al.*, 1999; Wieder *et al.*, 1999), tornou-se evidente que a membrana plasmática é um compartimento celular envolvido na transdução de sinal e o rompimento dos caminhos de sinalização pelos ativadores de membrana foi descrito como uma nova alternativa para a quimioterapia. Neste sentido, análogos de fosfolipídios são compostos sintéticos com elevada estabilidade metabólica, os quais são rapidamente incorporados à membrana celular, devido à sua similaridade com os fosfolipídios naturais, onde sua principal ação é inibir PKC e interferir na transdução de sinal da membrana. Portanto, estes compostos representam candidatos promissores a novos fármacos antineoplásicos. Por quase duas décadas as alquilfosfocolinas têm sido estudadas como uma classe de agentes antitumorais promissores, sendo que duas vantagens importantes são apontadas em relação a agentes antitumorais convencionais: (a) a ausência de ligação direta com o ADN e a capacidade de induzir apoptose; (b) indícios de seletividade destes compostos para células tumorais, já que estudos demonstraram que as células normais permaneceram inalteradas (Oberle *et al.*, 2005).

2.4.1. Mecanismo de ação

Ao contrário dos quimioterápicos clássicos, os alquilfosfolípidios representam uma classe de fármacos lipofílicos que não atuam no ADN nem interferem diretamente na sua síntese, mas sim, nas membranas celulares. Interferem primariamente na permeabilidade e fluidez da membrana, composição lipídica da membrana, regulação do metabolismo de fosfolípidios e, desse modo, acometendo a proliferação celular, progressão do ciclo celular, diferenciação, invasão e angiogênese. Além disso, estes fármacos são potentes indutores de apoptose em células tumorais. Contudo, o mecanismo de ação ainda necessita maior elucidação. Até o momento, estudos têm mostrado que essa classe de fármacos induz apoptose em vários modelos de câncer e também em linhagem celular de leucemia (Fiegl *et al.*, 2008; Ruitter *et al.*, 2001; Vink *et al.*, 2007; Wieder *et al.*, 1999).

Originalmente, acreditou-se que a ação inibitória dos alquil lisofosfolípidios no crescimento celular era indireta e mediada pela ativação de macrófagos. Estudos subseqüentes, entretanto, mostraram que os alquil lisofosfolípidios causam destruição direta das células tumorais e que este efeito está associado com a perturbação do metabolismo de fosfolípidios da membrana (Ruitter *et al.*, 2001).

As alquil lisofosfocolinas e as alquilfosfocolinas são predominantemente incorporadas nos compartimentos celulares lipídicos, assim acredita-se que os compostos dessas classes interferem no metabolismo ou composição lipídica da membrana (Berkovic *et al.*, 1995). Rakotomanga e colaboradores (2004) estudaram o mecanismo de interação da miltefosina com a membrana e concluíram que a miltefosina se inserem membrana fosfolipídica pela miscibilidade e pela interação com esteróis da membrana.

Segundo Van der Luit e colaboradores (2007), a miltefosina e a edelfosina induzem apoptose através da inibição da fosfocolina citidiltransferase (CTP), enzima chave na biossíntese de fosfatidilcolina, possivelmente pela indução de translocação da forma ativa da enzima ligada à membrana para o citosol. A fosfatidilcolina é uma das representantes de moléculas anfifílicas zwitteriônicas amplamente presentes em membranas celulares (Arthur, Bittman, 1998; Kang *et al.*, 2005).

O efeito citostático da miltefosina tem sido demonstrado em uma variedade de tumores (células de carcinoma de próstata, carcinoma de células uroteliais,

carcinoma de células renais, diversas linhagens celulares leucêmicas humanas e de murinos, tumor cerebral humano, câncer de pulmão, câncer de ovário, cólon, mama e fibrosarcomas) através de estudos bioquímicos que revelaram uma quantidade considerável de efeitos em enzimas celulares, as quais estão ligadas à renovação dos fosfolípidios e à transdução de sinal das membranas celulares, incluindo a inibição da PKC, fosfolipase C, e fosfoinositida. Uma vez ativada, a PKC fosforila outras proteínas, incluindo proteínas quinases, desencadeando uma cascata anormal da modulação de informação celular, proliferação, diferenciação e morte das células (Arthur, Bittman, 1998; Hubieki, *et al*, 1996).

Embora o mecanismo de ação das alquilfosfocolinas ainda não é completamente conhecido, o papel central, atualmente, é atribuído à inibição da PKC, sendo que diversos análogos éter lipídios demonstraram em estudos *in vitro* a inibição direta da atividade da enzima. O mecanismo de inibição da PKC pela miltefosina é parecido ao modo de ação dos alquil lisofosfolípidios, a competição com a fosfatidilserina, um ativador biológico. Isso é um fato interessante já que a miltefosina não apresenta a porção de diacilglicerol (Arthur, Bittman, 1998; Clive *et al.*, 1999; Leonard *et al.*, 2001; Ruitter, *et al.*, 2001; Überall *et al.*, 1991).

Proteínas quinases são elementos essenciais na transdução de sinais celulares gerados por fator de crescimento e por hormônios, além de desempenharem um papel fundamental na regulação de diferenciação e proliferação celular. Desta maneira, a interferência farmacológica com a PKC parece uma estratégia terapêutica racional, pois em certas neoplasias experimentais, as alterações de expressão ou função da PKC foram associadas à transformação maligna (Courage *et al.*, 1995; Wieder *et al.*, 1999).

Em células viáveis, a membrana fosfolipídica natural é submetida a processos de *turnover* rápidos e constantes, os quais são essenciais para o caminho de sinalização que permite que a célula sobreviva. As enzimas envolvidas nesses *turnovers* lipídicos basicamente incluem todas as fosfolipases conhecidas (tipos C, D e A), transacilases e enzimas biossintéticas. Algumas dessas enzimas, as catabólicas, são essenciais para a geração de segundo mensageiros lipídicos (por exemplo, diacilglicerol, ácido fosfatídico, ácido araquidônico e derivados), especialmente quando células são ativadas pelos fatores de crescimento. Outras enzimas, as anabólicas, servem para repor a combinação de fosfolípidios

degradados para possibilitar a renovação da degradação do receptor mediado pela fosfolipase. Assim, a sinalização associada ao *turnover* fosfolipídico de fosfatidilinositol (PI), fosfatidilcolina (PC) e esfingomiéline ocorre em ciclos, por exemplo, hidrólise e ressíntese (Ruiter *et al.*, 2001; Ruiter *et al.*, 2003).

Devido à sua única cadeia alquílica longa, alquil lisofosfolipídios facilmente se inserem no folheto externo da membrana plasmática, sendo que suas ligações éteres (como na edelfosina) ou ligações ésteres (como na miltefosina) os tornam relativamente resistentes à atividade da fosfolipase e, por isso, esses compostos acumulam persistentemente em membranas celulares. Como consequência, alquil lisofosfolipídios causam perturbação em *turnover* rápidos e constantes e, portanto, na biossíntese de fosfolipídios naturais (Ruiter *et al.*, 2001; Ruiter *et al.*, 2003).

Evidências da morte por apoptose foram demonstradas em formas promastigotas do parasita *Leishmania donovani* tratadas com miltefosina. Porém, a forma como este agente induz apoptose, tanto em células de mamíferos como em parasitas, não é completamente conhecida. Conforme mencionado anteriormente, a hipótese atual baseia-se na inibição da síntese de fosfatidilcolina, elemento essencial para a síntese e integridade das membranas celulares e fonte de moléculas de sinalização, através da inibição da CTP. A inibição da biossíntese da fosfatidilcolina está bem correlacionada com o efeito antiproliferativo de determinados lipídios e depende do comprimento da cadeia alquílica e da natureza do grupo polar (Wieder *et al.*, 1999). Para que este efeito ocorra, é necessário um acúmulo intracelular do fármaco. Neste sentido, linhagens celulares resistentes demonstram acumular menos fármaco, sendo que essa acumulação ocorre em três etapas que parecem comuns às células eucarióticas: o fármaco se liga à membrana plasmática da célula, penetra na mesma e atinge o seu alvo (Heczková, Slotte, 2006; Lindner *et al.*, 2008; Van der Luit *et al.*, 2007; Wright *et al.*, 2004).

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

onde controla a translocação de fosfolipídios. Para a ligação do fármaco à membrana, a composição fosfolipídica da membrana celular parece ser relevante. Cepas de *L. donovani* resistentes à miltefosina, por exemplo, apresentam diferenças na composição de seus ácidos graxos (devido às alterações nos processos de insaturação e alongação) e esteróis (por alteração na acilação do C-24) (Rakotomanga, *et al.*, 2007; Sundar, Olliaro, 2007).

A atividade citotóxica e citostática dos alquil lisofosfolipídios é notavelmente seletiva para células cancerosas, entretanto, ainda não se conhece o mecanismo de ação responsável por esta seletividade. Uma explicação plausível é baseada na habilidade que os éter lipídios apresentam em se acumularem preferencialmente em altas concentrações na membrana celular de células cancerosas, acarretando na destruição destas células. Essa acumulação seletiva pode, por sua vez, ser devido às diferenças na organização ou composição da membrana entre células normais e células cancerosas (Koufaki *et al.*, 1996), pois estas últimas parecem não ter a enzima alquil-glicero-mono-oxidase, encontrada em tecidos normais (Berkovic, 1998; Heesbeen *et al.*, 1994; Papazafiri *et al.*, 2005)

2.4.2. Desenvolvimento de novas alquilfosfocolinas

Alquil lisofosfolipídios sintéticos consistem em um grupo heterogêneo de lisofosfolipídios anormais com diferentes efeitos biológicos, como a inibição da invasão de células tumorais, indução da diferenciação celular e apoptose. O protótipo desses alquil lisofosfolipídios é o análogo do fator de ativação plaquetária, edelfosina (Figura 8), caracterizada pela presença de uma cadeia longa e uma curta, cada cadeia ligada ao glicerol, por ligações quimicamente estáveis, e uma cabeça fosfocolina (Arthur, Bittman, 1998; Rutter, *et al.*, 2001; Überall *et al.*, 1991).

A descoberta da estrutura mínima requerida para a atividade antineoplásica dos análogos éter lipídicos levou à síntese das alquilfosfocolinas. A miltefosina foi o primeiro antitumoral desta classe introduzido na terapêutica. Porém, devido à toxicidade gastrointestinal e atividade hemolítica, compostos com modificações tanto na porção polar quanto na cadeia alquílica foram sintetizados e avaliados (Mravljak *et al.*, 2005; Papazafiri *et al.*, 2005).

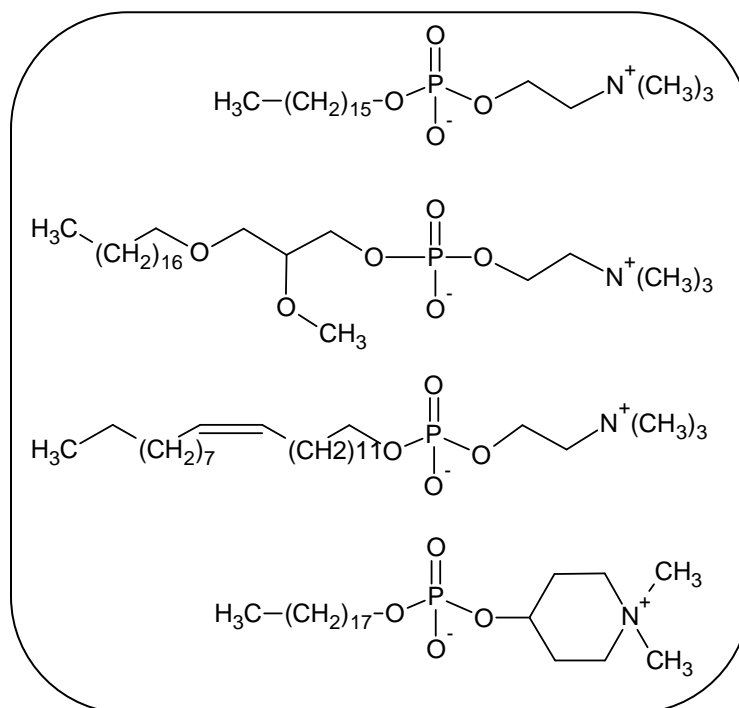


Figura 8. Estruturas da miltefosina, edelfosina, erucilfosfocolina e perifosina, respectivamente.

Um grande número de modificações na estrutura dos alquil lisofosfolípidios tem sido explorado. Inicialmente, a maioria das tentativas foi voltada para o aumento da potência através de mudanças na cabeça polar e na estrutura do glicerol, por exemplo (Fos *et al.*, 1995). A porção lipofílica vem sendo estudada mais recentemente. Avlonitis e colaboradores (2003) propuseram estudar a influência de anéis cicloalquílicos na atividade anti-leishmaniose e observaram que alguns compostos com anéis cicloalquílicos na porção apolar mostraram ser mais potentes e menos tóxicos do que a miltefosina.

A edelfosina é o composto protótipo da primeira geração de alquil lisofosfolípidios (análogo sintético de 2-lisofosfocolina) e a miltefosina é o composto representante da segunda geração (Heesbeen *et al.*, 1994). A perifosina, octadecil(1,1-dimetil-4-piperidinoil)fosfato, representada na Figura 8, também pertence à segunda geração das alquilfosfocolinas, é um análogo heterocíclico da miltefosina e um candidato promissor dentre os diversos compostos obtidos. Esta molécula pode ser considerada terapeuticamente importante e foi selecionada para desenvolvimento clínico devido à melhora significativa da tolerância gastrointestinal em ensaios pré-clínicos, principalmente em preparações lipossomais.

Recentemente, iniciaram-se estudos clínicos de fase I com este composto (Kondapaka *et al.*, 2003; Unger *et al.*, 2010). *In vitro*, a perifosina apresentou efeitos

antineoplásicos semelhantes ou mais potentes que a miltefosina contra melanoma, câncer do sistema nervoso, de pulmão, de próstata, de cólon e de mama. Alguns estudos demonstraram que a administração intravenosa de vários compostos da primeira geração de alquilfosfocolinas como a miltefosina não é possível, pois estes compostos induzem hemólise grave, bem como necrose e tromboflebite no local da aplicação. Já a erucilfosfocolina (Figura 8) é o primeiro fármaco da classe das alquilfosfocolinas, administrado via intravenosa, o qual apresenta potente atividade antitumoral frente a carcinoma mamário induzido por metil-nitroso-uréia e linhagem celular de tumor cerebral *in vitro* (Papazafiri *et al.*, 2005).

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

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho consistiu em estudar a síntese do fármaco miltefosina e análogos alcocicloalquílicos (Figura 10) e cicloalquílicos (Figura 11), inéditos. Para isso, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- (1) Síntese da miltefosina através de quatro etapas sintéticas.
- (2) Desenvolvimento de metodologias adaptadas para síntese dos análogos propostos.

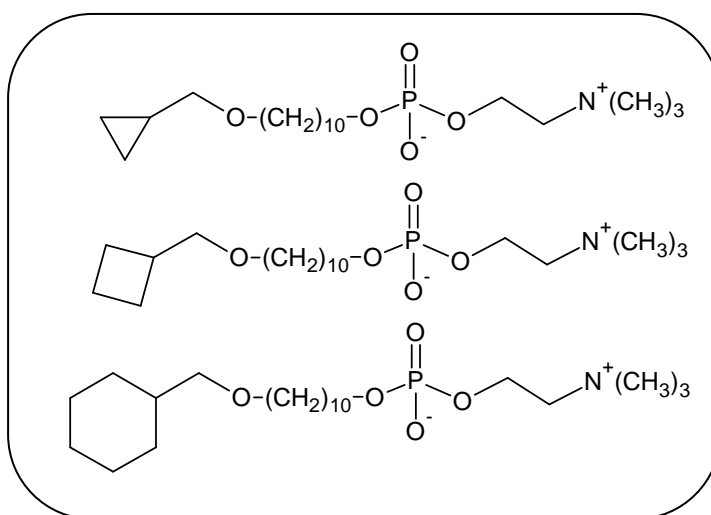


Figura 9. Análogos alcocicloalquílicos da miltefosina propostos.

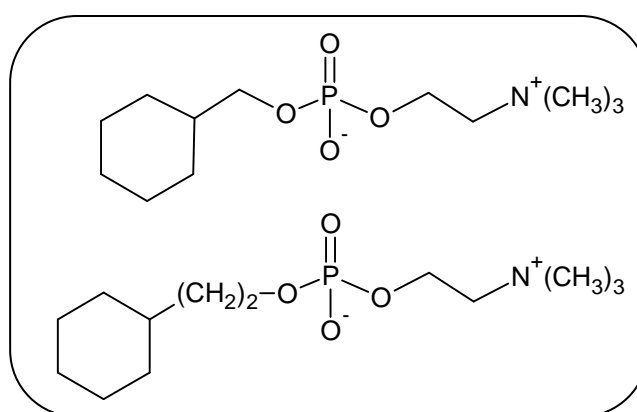


Figura 10. Análogos cicloalquílicos da miltefosina propostos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Reagentes, solventes e material para cromatografia

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

- Acetona
- Acetato de etila
- Ácido clorídrico (HCl)
- Bromometilcicloexano
- Cicloexanoetanol
- Cicloexanometanol
- Cloreto de benzila
- Clorofórmio (CHCl₃)
- Diclorometano (CH₂Cl₂)
- 3,4-diidro-2H-pirano (DHP)
- *N,N*-Dimetilformamida (DMF)
- 1,10-Decanodiol
- Etanol (EtOH)
- Éter de petróleo
- Éter dietílico
- Hexadecanol
- Hexano
- Hidreto de sódio (NaH)
- Hidróxido de sódio (NaOH)
- Iodo (I₂)
- Iodometano (CH₃I)
- Metanol (MeOH)
- *N*-metiletanolamina
- Oxicloreto de fósforo (POCl₃)
- Óxido de prata (Ag₂O)
- Sulfato de sódio (Na₂SO₄)
- Tetraidrofurano (THF)
- Tiosulfato de sódio
- Tricloroetileno
- Trietilamina (Et₃N)

Além dos reagentes, utilizaram-se placas de sílica para a análise de cromatografia em camada delgada (CCD), sílica gel para coluna cromatográfica e resina polimérica para cromatografia de troca iônica:

- CCD Silica gel 60 F₂₅₄ - MERCK.
- Sílica gel (60-230 mesh) - MERCK.
- Resina Amberlite Mixed Bed-Exchanger (wet mesh 16-50) - SIGMA

4.1.2. Equipamentos

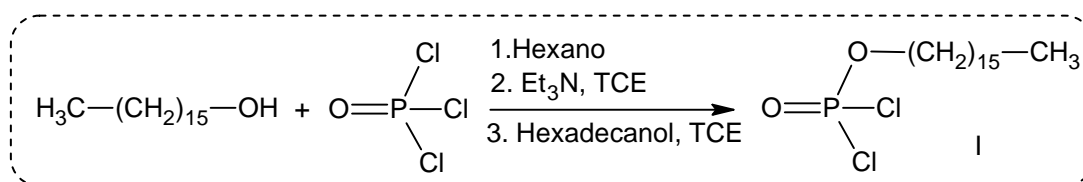
- Agitadores magnéticos (FISATOM e IKA)
- Mantas com agitação (FISATOM)
- Centrífuga modelo BRA4i (JOUAN)
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear 300 MHz modelo Advance DPX300 (BRUKER)
- Evaporador rotatório modelo R-215 (BUCHI Switzerland)
- Bomba à vácuo modelo 1-C48 (EDWARDS)
- Microondas doméstico ME27F (ELECTROLUX)
- Microondas para síntese orgânica, modelo Discover (CEM)

4.2. Métodos

4.2.1. Síntese do fármaco miltefosina

Para obtenção da miltefosina, quatro etapas devem ser cumpridas, a saber: a) obtenção do dicloridrato de fosforoexadecila; b) obtenção de 2-(hexadeciloxi)-3-metil-oxa-1,3,2-oxazofosfolano; c) obtenção do fosfato de 2-(metilamino) etil hexadecila; d) obtenção do produto final miltefosina (hexadecilfosfocolina).

4.2.1.1. Obtenção de dicloreto de fosforoexadecila (I)

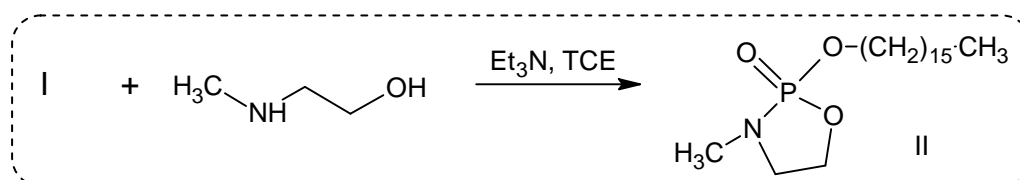


Esquema 1. Esquema de obtenção do dicloreto de fosforoexadecila (I).

Adicionou-se 30 mmol (4,6 g) de POCl_3 em 10 mL de hexano sob agitação, em banho de gelo. Em seguida, adicionou-se lentamente uma solução de 30 mmol (3,0 g) de Et_3N em 20 mL de tricloroetileno, sob agitação e resfriamento. Por fim, gotejou-se uma solução de hexadecanol 20 mmol (4,8 g) em 80 mL de tricloroetileno na mistura reacional, durante 30 minutos, mantendo-se a agitação e resfriamento em

sistema inerte (argônio). A formação do dicloridrato de fosforoexadecila resultou em precipitação do cloridrato de trietilamônio. Foi feita uma CCD, utilizando-se mistura de solventes éter de petróleo/ éter dietílico/ metanol 70:20:10 (v/v/v). Procedeu-se com a filtração simples da mistura reacional para remoção do precipitado e, em seguida, remoção de solvente em excesso por evaporação sob pressão reduzida, obtendo-se um líquido oleoso castanho. O rendimento foi de 100% nesta etapa e o composto obtido foi caracterizado por RMN ^1H . **Dicloreto de fosforoexadecila:** fórmula $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{Cl}_2\text{O}_2\text{P}$, MM 359,34. **RMN ^1H** (CDCl_3 , 300 MHz) δ 4,33 (m, 2H); δ 1,80 (m, 2H); δ 1,36 (t, 2H); δ 1,26 (s, 24H); δ 0,88 (t, 3H); anexo 1.

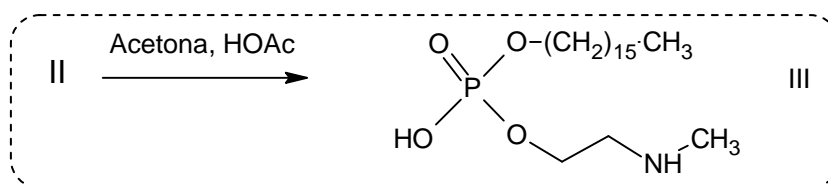
4.2.1.2. Obtenção de 2-(hexadeciloxi)-3-metil-2-oxa-1,3,2-oxazofosfolano (II)



Esquema 2. Esquema de obtenção de 2-(hexadeciloxi)-3-metil-2-oxa-1,3,2-oxazofosfolano (II).

Preparou-se uma solução contendo 22 mmol (1,65 g) de *N*-metiletanolamina e 80 mmol (8,0 g) de Et_3N em 50 mL de tricloroetileno. Gotejou-se esta solução em uma solução de 20 mmol (7,2 g) de dicloreto de fosforoexadecila (I) em 50 mL de tricloroetileno, sob agitação e resfriamento, em atmosfera inerte (argônio). Realizou-se uma CCD, utilizando-se mistura de solventes éter de petróleo/ éter dietílico/ metanol 70:20:10 (v/v/v). Procedeu-se com a filtração simples da mistura reacional para remoção do cloridrato de trietilamônio precipitado e, em seguida, remoção do excesso de solvente por evaporação sob pressão reduzida. O líquido remanescente (oleoso, de coloração amarela) foi recristalizado em hexano diversas vezes, até que resultou em cristais brancos e o rendimento observado foi de 30%. Caracterizou-se o composto por RMN ^1H . **2-(hexadeciloxi)-3-metil-2-oxa-1,3,2-oxazofosfolano:** fórmula $\text{C}_{19}\text{H}_{40}\text{NO}_3\text{P}$, MM 361,54. **RMN ^1H** (CDCl_3 , 300 MHz) δ 4,23 (m, 1H); δ 4,03 (m, 1H); δ 3,05 (t, 2H); δ 2,68 (t, 3H); δ 1,34 (t, 2H); δ 1,25 (s, 26H); δ 0,87 (t, 3H); anexo 2.

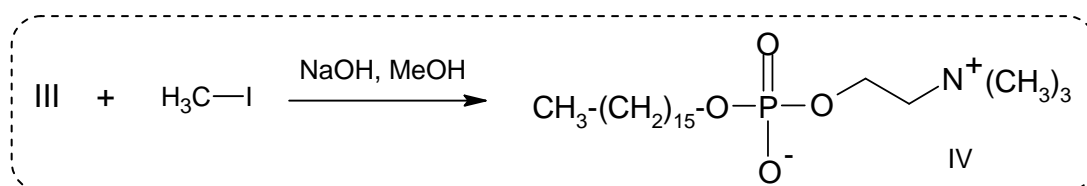
4.2.1.3. Obtenção de fosfato de 2-(metilamino)etil hexadecila (III)



Esquema 3. Esquema de obtenção de fosfato de 2-(metilamino)etil hexadecila (III).

Adicionou-se 18 mmol (6,5 g) do composto II em 200 mL de acetona e 100 mL de ácido acético 20%, a temperatura ambiente e sob agitação. Após 24h, centrifugou-se a 9961xg por 5 minutos e coletou-se o precipitado, correspondente ao produto desta etapa (III). Realizaram-se mais duas lavagens com acetona para purificação do produto, coletando-se o produto por centrifugação. Após cada adição de solvente, o sistema foi homoganeizado em vórtex. Transferiu-se o precipitado para um balão para então, remover todo o solvente por evaporação sob pressão reduzida, obtendo-se um rendimento de 51%. O composto foi caracterizado por RMN ^1H . **2-(metilamino)etil hexadecila**: fórmula $\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{NO}_4\text{P}$, MM 379,55. **RMN ^1H** (CDCl_3 , 300 MHz) δ 9,77 (s, 1H); δ 4,16 (s, 1H); δ 3,83 (m, 2H); δ 3,16 (s, 1H); δ 2,70 (t, 2H); δ 1,25 (s, 26H); δ 0,87 (t, 3H); anexo 3.

4.2.1.4. Obtenção do produto final hexadecilfosfocolina (IV)



Esquema 4. Esquema de obtenção da hexadecilfosfocolina (IV).

A uma solução de 18 mmol (6,8 g) do composto III em 100 mL de metanol contendo 20 mmol (0,8 g) de NaOH, adicionou-se 200 mmol (12,4 mL) de CH_3I . A reação se completou após 48h, à temperatura ambiente e sob proteção da luz. Ao final, evaporou-se o excesso de solvente sob pressão reduzida, obtendo-se um sólido amarelado. Rendimento de 54%. O produto foi caracterizado por RMN ^1H . **Hexadecilfosfocolina** (impura): fórmula $\text{C}_{21}\text{H}_{46}\text{NO}_4\text{P}$, MM 407,57; **RMN ^1H** (CDCl_3 , 300 MHz) δ 4,42 (s, 1H); δ 3,99 (s, 2H); δ 3,89 (t, 2H); δ 3,48 (s, 9H); δ 1,63 (s, 2H); δ 1,25 (s, 26H); δ 0,87 (t, 3H); anexo 4.

Atribuições para o composto miltefosina, segundo MacDonald e colaboradores (2001): fórmula $C_{21}H_{46}NO_4P \cdot H_2O$; RMN 1H (10mg/mL em $CDCl_3$, 200 MHz) δ 4,26 (t, 2H); δ 3,80 (t, 2H); δ 3,77 (t, 2H); δ 3,38 (s, 9H); δ 1,56 (m, 2H); δ 1,25 (s, 26H); δ 0,88 (t, 3H).

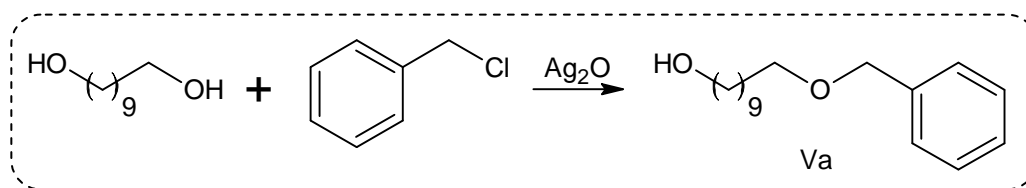
4.2.2. Síntese dos análogos alcocicicloalquílicos

A rota sintética de obtenção dos análogos alcocicicloalquílicos (esquema 13) foi iniciada através da obtenção dos ω -hidroxidodecil-cicloalquilmetil éteres (Agresta *et al.*, 2003) e posteriormente estes intermediários seriam utilizados na rota sintética anteriormente descrita para a síntese da miltefosina (MacDonald *et al.*, 1991), em substituição ao hexadecanol.

4.2.2.1. Obtenção do intermediário ω -hidroxidodecil-cicloexilmetil éter (VII)

Para obtenção do intermediário ω -hidroxidodecil-cicloexilmetil éter (VII) três etapas estão envolvidas: a) obtenção do ω -hidroxidodeciltetrahidropirano éter (V); b) obtenção do ω -tetrahidropiranoxidecil-cicloexilmetil éter (VI); c) obtenção do ω -hidroxidodecil-cicloexilmetil éter (VII).

4.2.2.1.1. Obtenção do ω -hidroxidodecilbenzil éter (Va) – Bouzide *et al.* (1997)

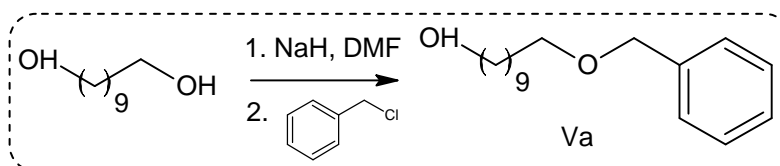


Esquema 5. Esquema de obtenção do ω -hidroxidodecilbenzil éter (Va).

Adicionou-se 1 mmol (0,18 g) do 1,10-decanodiol em 50 mL de CH_2Cl_2 tratado e 1,2 mmol (0,28 g) de Ag_2O , formando uma suspensão. Esta suspensão foi agitada e mantida em banho de gelo enquanto 1,4 mmol (0,18 g) de cloreto de benzila foram adicionados em aproximadamente 5 minutos. O banho de gelo foi removido e a reação foi agitada por 18h à temperatura ambiente (25°C) e em atmosfera inerte (argônio). A suspensão foi então filtrada à vácuo através de funil de vidro sinterizado G4 e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O líquido remanescente foi

solubilizado em 10 mL de 5% de THF em hexano, e posteriormente, aplicado em uma coluna de sílica-gel utilizando-se como fase móvel 5% de THF em hexano. Após a passagem pela coluna, o solvente foi completamente evaporado sob pressão reduzida.

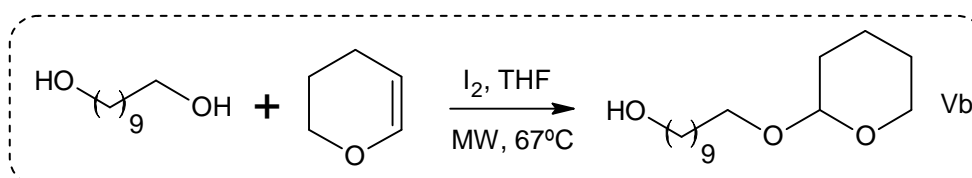
4.2.2.1.2. Obtenção do ω -hidroxidecilbenzil éter (Va) – Agresta *et al.* (2003)



Esquema 6. Esquema de obtenção do ω -hidroxidecilbenzil éter (Va).

Suspenderam-se 5,5 mmol (0,22 g) de NaH em 20 mL de DMF e adicionaram-se 5 mmol (0,89 g) de 1,10-decanodiol. Após a agitação por 10 horas, a 50°C, sob refluxo, resfriou-se a mistura à temperatura ambiente (25°C). Adicionaram-se, gota a gota, 5 mmol (0,63 g) de cloreto de benzila e manteve-se a mistura reacional sob agitação e à temperatura ambiente (25°C) por 24h. Após a neutralização do meio com solução de HCl 5%, extraiu-se a mistura com hexano. Coletou-se a fase orgânica e procedeu-se a uma nova extração com água. Em seguida, secou-se o extrato obtido com Na₂SO₄ por 5h, filtrou-se e o excesso de solvente do filtrado foi evaporado sob pressão reduzida. O líquido remanescente foi purificado em coluna de sílica-gel e após a passagem pela coluna (fase móvel: MeOH/ CHCl₃ 1:1), o solvente foi completamente evaporado sob pressão reduzida.

4.2.2.1.3. Obtenção do ω -hidroxideciltetrahidropirano éter (Vb) – Deka e Sarma (2001)



Esquema 7. Esquema de obtenção do ω -hidroxideciltetrahidropirano éter (Vb).

Adicionou-se iodo e DHP à solução de 1,10-decanodiol em 2 mL de THF tratado. A reação ocorreu no reator por microondas, irradiada com potência 300W

por 340s, a 67°C. Após o resfriamento acrescentou-se e cerca de 50 mL de solução saturada de tiosulfato de sódio, em seguida, adicionaram-se cerca de 50 mL de CHCl_3 para extração líquido-líquido. A fase orgânica foi coletada e adicionaram-se cerca de 50 mL de água para realizar outra extração. Coletou-se novamente a fase orgânica e adicionou-se Na_2SO_4 anidro para secar o extrato. Após aproximadamente 5h filtrou-se a mistura e o solvente foi evaporado sob pressão reduzida. O produto foi purificado em sílica-gel, utilizando-se como fase móvel: acetato de etila/ hexano 1:2 e caracterizado por RMN ^1H . **ω -hidroxideciltetraidropirano éter (Vb)**: fórmula $\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{O}_3$, MM 258,42; **RMN ^1H** (CDCl_3 , 300 MHz) δ 4,50 (t, 1H); δ 3,65 (m, 2H); δ 3,56 (t, 2H); δ 3,31 (m, 1H); δ 1,48 (m, 9H); δ : 1,18 (m, 16H); anexo 9, 10 e 11.

Tabela 1. Estequiometrias utilizadas.

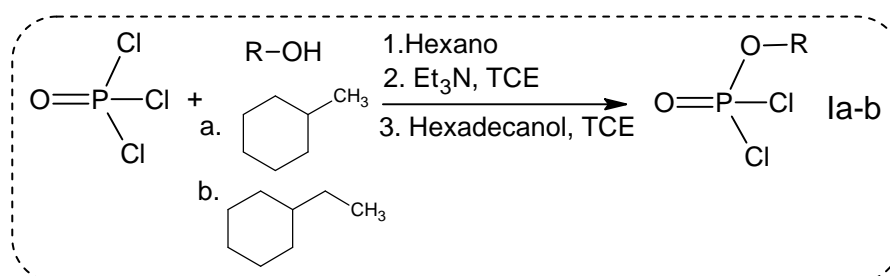
1,10-decanodiol	DHP	I_2	Anexo
1 mmol (0,18 g)	1,3 mmol (0,12 mL)	5% (0,013 g)	9
1 mmol (0,18 g)	1 mmol (0,09 mL)	5% (0,013 g)	10
1,25 mmol (0,22 g)	1 mmol (0,09 mL)	5% (0,016 g)	11

Devido ao insucesso na monoproteção do 1,10-decanodiol, não foi possível dar continuidade à rota sintética de obtenção do ω -hidroxidecil-cicloexilmetil éter.

4.2.3. Síntese dos análogos cicloalquílicos da miltefosina

Para obtenção dos análogos cicloalquílicos, quatro etapas devem ser cumpridas, a saber: a) obtenção do Dicloreto de fosforoalquilcicloexila; b) obtenção de 2-(cicloexilalquiloxi)-3-metil-oxa-1,3,2-oxazofosfolano; c) obtenção do fosfato de 2-(metilamino)alquil cicloexila; d) obtenção de alquilcicloexanofosfocolina.

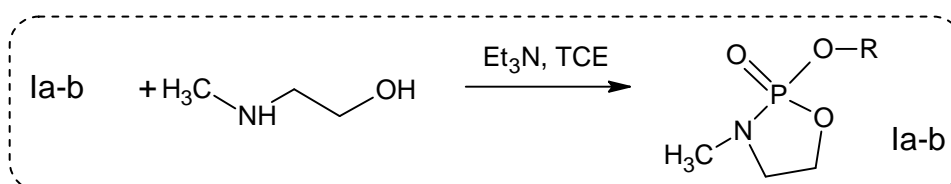
4.2.3.1. Obtenção de dicloreto de fosforoalquilcicloexila (Ia-b)



Esquema 8. Esquema de obtenção do dicloreto de fosforoalquilcicloexila (Ia-b).

Adicionaram-se 15 mmol (2,3 g) de POCl_3 a 5 mL de hexano tratado sob agitação, em banho de gelo. Adicionou-se lentamente 15 mmol (1,5 g) de Et_3N em 10 mL de tricloroetileno tratado, sob agitação e resfriamento. Em seguida, gotejou-se na mistura reacional uma solução de 10 mmol (1,23 mL; 1,38 mL) do álcool correspondente (ciclohexanometanol e cicloexanoetanol, respectivamente) em 40 mL de tricloroetileno tratado, mantendo-se a agitação e resfriamento da reação, em atmosfera inerte (argônio), por mais 30 minutos (ciclohexanometanol) ou 60 minutos (cicloexanoetanol), resultando em precipitação do cloridrato de trietilamônio. Realizou-se CCD com a mistura de solventes: éter de petróleo/ éter dietílico/ metanol 70:20:10 (v/v/v), utilizando como padrão, o material de partida ciclohexanometanol, onde se observou o desaparecimento da mancha referente ao reagente (R_f 0,48). A reação realizada com cicloexanoetanol foi monitorada através da CCD (fase móvel: CHCl_3), em que se observou o consumo do material de partida durante a reação (R_f 0,15). Procedeu-se com a filtração simples da mistura reacional para remoção do cloreto de trietilamônio precipitado e, em seguida, remoção de solvente em excesso por evaporação sob pressão reduzida. Rendimento de 43% (ciclohexanometanol) e 100% (cicloexanoetanol).

4.2.3.2. Obtenção de 2-(cicloexilalquiloxi)-3-metil-oxa-1,3,2-oxazofosfolano (IIa-b)

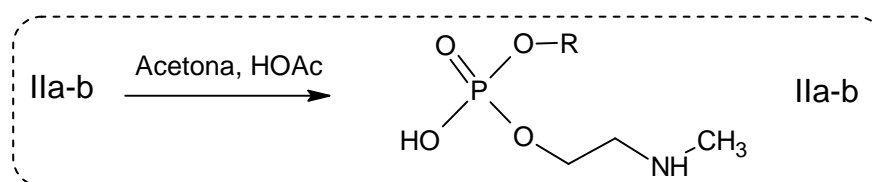


Esquema 9. Esquema de obtenção do 2-(cicloexilalquiloxi)-3-metil-oxa-1,3,2-oxazofosfolano (IIa-b).

Preparou-se uma solução contendo 11 mmol (0,88 mL) de *N*-metiletanolamina e 40 mmol (5,6 mL) de Et_3N em 25 mL de tricloroetileno tratado. Esta solução foi gotejada em uma solução de 10 mmol (2,15 g; 2,29 g) do composto Ia-b em 50 mL de tricloroetileno tratado, sob agitação e resfriamento em banho de gelo, em atmosfera inerte (argônio). Após 60 minutos, procedeu-se com a filtração simples da mistura reacional para remoção do cloridrato de trietilamônio precipitado e, em seguida, remoção do excesso de solvente por evaporação sob pressão reduzida. Rendimento de 84% do derivado metilcicloexano. Para o derivado etilcicloexano, utilizou-se diclorometano e hexano para forçar uma separação. A fase menos

densa foi purificada em coluna de sílica-gel (fase móvel: MeOH/ CHCl₃, em diferentes proporções até se obter o produto puro. **2-(cicloexilmetiloxi)-3-metil-2-oxa-1,3,2-oxazofosfolano**: fórmula C₁₀H₂₀NO₃P, MM 233,24; **RMN** ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 4,21 (m, 1H); δ 3,82 (t, 2H); δ 2,89 (t, 1H); δ 2,69 (d, 3H); δ 1,67 (m, 7H); δ 1,20 (m, 3H); anexo 13. **2-(cicloexiletiloxi)-3-metil-2-oxa-1,3,2-oxazofosfolano**: fórmula C₁₁H₂₂NO₃P, MM 247,27; **RMN** ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 4,15 (s, 2H); δ 3,88 (m, 2H); δ 3,10 (s, 2H); δ 2,67 (s, 3H); δ 1,68 (d, 5H); δ 1,50 (m, 1H); δ 1,39 (m, 1H); δ 1,18 (m, 3H); δ 0,92 (t, 2H); anexo 14.

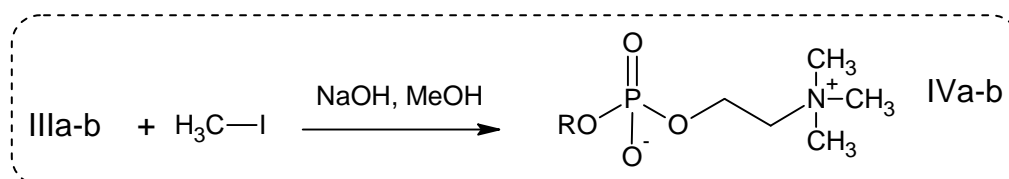
4.2.3.3. Obtenção de fosfato de 2-(metilamino)alquil cicloexila (IIa-b)



Esquema 10. Esquema de obtenção do fosfato de 2-(metilamino)alquil cicloexila (IIa-b).

Adicionou-se 18 mmol (4,2 g; 4,4 g) do composto IIa-b em 200 mL de acetona e 100 mL de ácido acético a 20%, sob agitação por 16h à temperatura ambiente. A reação permaneceu límpida e incolor e, ao final, evaporou-se o solvente sob pressão reduzida, obtendo-se um líquido oleoso amarelo claro. Rendimento de 100% para ambos os derivados impuros. O derivado etilcicloexano foi purificado em coluna cromatográfica (fase móvel: MeOH/ CHCl₃ 1:1). **Fosfato de 2-(metilamino)etil cicloexila) puro**: fórmula C₁₁H₂₂NO₃P, MM 247,27; **RMN** ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 4,14 (s, 2H); δ 3,88 (m, 2H); δ 3,09 (s, 2H); δ 2,64 (s, 3H); δ 1,94 (s, 1H); δ 1,68 (d, 5H); δ 1,50 (m, 2H); δ 1,38 (m, 1H); δ 1,20 (m, 3H); δ 0,92 (t, 2H); anexo 15. **RMN** ³¹P (CDCl₃, 500MHz) δ 1,12; anexo 16.

4.2.3.4. Obtenção do produto final alquilcicloexanofosfocolina (IVa-b)



Esquema 11. Esquema de obtenção da alquilcicloexanofosfocolina (IVa-b).

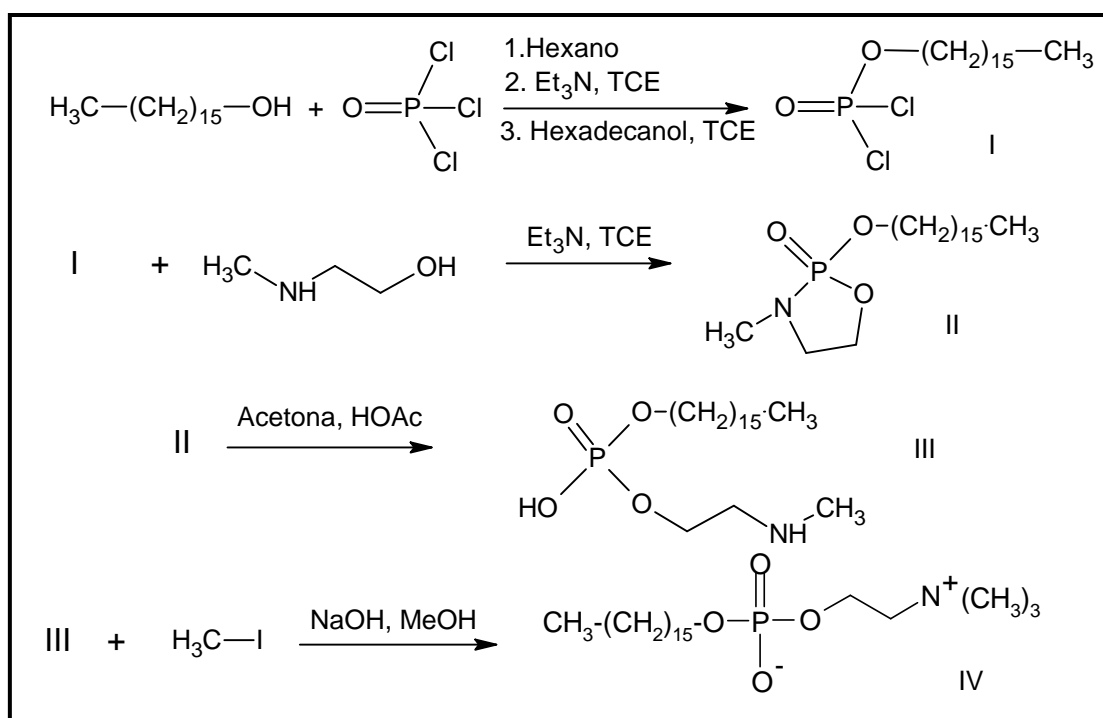
A uma solução de 18 mmol (4,5 g; 4,8 g) do composto IIIa-b em 100 mL de metanol contendo 20 mmol (0,8 g) de NaOH, adicionou-se 200 mmol (12,4 mL) de CH₃I. A reação foi interrompida após 48h sob proteção da luz e à temperatura ambiente. O produto foi obtido após evaporar todo o solvente sob pressão reduzida, o líquido remanescente era oleoso e límpido. **Metilcicloexanofosfocolina** (impura): fórmula C₁₂H₂₆NO₄P, MM 279,31; **RMN ¹H** (CDCl₃, 300 MHz) δ 3,88 (m, 1H); δ 3,60 (t, 2H); δ 3,50 (m, 2H); δ 3,20 (t, 14H); δ 2,56 (d, 2H); δ 1,87 (s, 9H); δ 1,62 (t, 5H); δ 1,25 (t, 3H); δ 0,97 (t, 2H); anexo 18. **Etilcicloexanofosfocolina** (impura): fórmula C₁₃H₂₈NO₄P, MM 293,35; **RMN ¹H** (CDCl₃, 300 MHz) δ 3,98 (s, 2H); δ 3,86 (d, 2H); δ 2,82 (s, 2H); δ 2,51 (s, 2H); δ 2,27 (s, 2H); δ 1,69 (d, 5H); δ 1,50 (d, 2H); δ 1,35 (s, 1H); δ 1,21 (d, 3H); δ 0,92 (t, 2H); anexo 19.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Síntese da miltefosina

A maioria dos métodos publicados para a formação de fosfodiésteres contendo a porção colina preocupa-se com a importância biológica das fosfatidilcolinas. Devido à facilidade que a cadeia de éster de ácido graxo apresenta em hidrolisar, condições brandas devem ser empregadas nas rotas sintéticas. Diante disso, as reações foram realizadas em condições amenas, visando a estabilidade dos compostos.

O procedimento experimental para a rota sintética do fármaco foi baseado na metodologia de MacDonald e colaboradores (1991). No entanto, durante as tentativas de síntese realizadas, algumas alterações foram propostas, visando o aumento do rendimento. O procedimento final empregado está descrito no item 4.2.1. e a rota sintética da miltefosina está representada no Esquema 12.

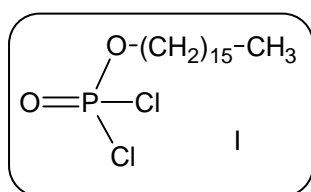


Esquema 12. Esquema geral de síntese para obtenção da miltefosina.

Nas primeiras tentativas de síntese, em que o procedimento foi realizado sem qualquer alteração, a recuperação do material foi ínfima, o que não possibilitou caracterização por análises espectrométricas de RMN. A baixa quantidade de

produto obtido estaria relacionada provavelmente à perda de produto em etapas como a filtração à vácuo e a recristalização com hexano. Assim, a rota sintética foi otimizada devido ao baixo rendimento obtido inicialmente. Os procedimentos alterados ao longo da síntese resultaram em um aumento de rendimento.

5.1.1. Obtenção do dicloreto de fosforoexadecila (I)

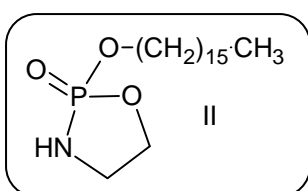


Na primeira etapa sintética, partiu-se do POCl_3 e do hexadecanol, sendo que uma substituição nucleofílica no átomo de fósforo resultou na formação do produto desejado, o dicloreto de fosforoexadecila (intermediário I).

A reação ocorreu sob agitação, banho de gelo e em atmosfera inerte (argônio). Todos os solventes foram tratados, visando um aumento no rendimento. Após a evaporação sob pressão reduzida do solvente, obteve-se um líquido oleoso castanho. Uma CCD referência foi feita a partir da solução de hexadecanol inicialmente gotejada e o desaparecimento da mancha foi confirmado ao final da reação, sugerindo a conversão completa do hexadecanol ao produto desejado. O R_f encontrado para a banda de hexadecanol foi de 0,81, valor próximo ao descrito na literatura: 0,85 (MacDonald *et al.*, 1991). Foi observado um bom rendimento nesta etapa, na qual a reação ocorreu de forma bastante limpa sendo que o primeiro intermediário da reação foi utilizado diretamente na próxima etapa, sem purificação.

Para o intermediário I, obtido nesta etapa, foi realizada uma análise de RMN ^1H (anexo 1), na qual pode se observar os sinais que podem identificar o composto, como em δ 0,88 com integral para três hidrogênios, indicando a presença da metila (**a**); sinais em δ 1,26 e δ 1,37 (**c** e **d**, respectivamente) e principal sinal é em δ 4,33 que possivelmente corresponde aos hidrogênios (**e**) (OCH_2).

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



A síntese do intermediário 2-(hexadeciloxi)-3-metil-2-oxa-1,2,3-oxazofosfolano foi realizada com sucesso baseando-se na metodologia descrita na literatura, em atmosfera inerte (argônio) e com resfriamento.

O mecanismo reacional pode ser descrito como um ataque nucleofílico ao átomo de fósforo pelo grupo hidroxila, seguido de ataque pela amina secundária, com formação da fosfoamida cíclica. A reação foi monitorada por CCD ao final da reação, revelando-se com iodo. O valor de Rf (0,16) encontrado foi próximo do valor descrito na literatura (0,2).

Na primeira recristalização, adicionou-se hexano à quente e, após resfriamento em banho de gelo, procedeu-se com a filtração do composto recristalizado. Porém, a recuperação do material foi ínfima, impossibilitando o prosseguimento da rota sintética. A baixa quantidade de produto obtido foi atribuída à solubilização do precipitado durante a filtração, já que em temperatura ambiente o produto apresentou boa solubilidade em hexano, apesar de este solvente ter sido descrito na literatura para a realização deste procedimento.

Após tentativas frustradas de recristalização com hexano devido à ressolubilização do precipitado assim que o frasco era retirado da geladeira, alterou-se o procedimento de recristalização (tentou-se recristalizar o produto mantendo-se o balão em gelo após retirá-lo da geladeira e utilizou-se solvente gelado).

Em tentativas posteriores, realizou-se um teste com diferentes solventes (Tabela 2), visando encontrar o solvente mais adequado para a recristalização do produto desta etapa. Iniciou-se o teste com a adição à temperatura ambiente do solvente ao precipitado, observando-se o seu comportamento. Em seguida, aqueceu-se o meio, objetivando a solubilização do precipitado. Por fim, manteve-se o meio em geladeira para verificar a ocorrência de recristalização. A partir dos resultados obtidos, o procedimento de recristalização passou a ser realizado com acetato de etila.

Tabela 2. Resultados de recristalização do 2-(hexadeciloxi)-3-metil-oxa-1,2,3-oxazofosfolano.

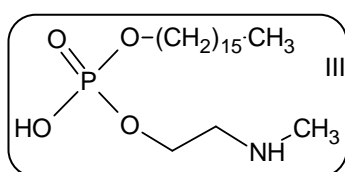
Solvente	Solubilidade		Precipitação
	t.a.	Δ	
CH ₂ Cl ₂	Solúvel	--	--
Acetona	Insolúvel	Solúvel	Ocorreu
MeOH	Insolúvel	Pouco solúvel	Não ocorreu
EtOAc	Insolúvel	Muito solúvel	Ocorreu

t.a. : temperatura ambiente

Δ : aquecimento

O intermediário obtido nesta etapa foi caracterizado por RMN ^1H (anexo 2), verificando-se um sinal característico em δ 2,68 que poderia estar relacionado com os hidrogênios (**g**) ($\text{H}_3\text{C-N}$), sinal que possui integração desses três hidrogênios e encontra-se em campo desblindado, já que está ligado a um elemento eletronegativo, o nitrogênio. Outros sinais identificados que podem caracterizar o intermediário obtido nesta etapa são: o sinal em δ 4,23 que possivelmente são dos hidrogênios (**e**) e o sinal em δ 3,06 que pode corresponder aos hidrogênios (**f**). Além dos sinais observados no espectro do intermediário anterior (I): δ 0,88; δ 1,26 e δ 1,35 dos hidrogênios (**a**), (**c**) e (**b**), respectivamente.

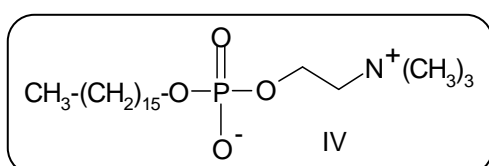
5.1.3. Obtenção do fosfato de 2-(metilamino)etil hexadecila (III)



Na terceira etapa, o intermediário (II) obtido na etapa anterior foi solubilizado em acetona e transferido para um meio aquoso ácido (ácido acético glacial em água 2:10), sob agitação e a temperatura ambiente, visando à abertura do anel por hidrólise da ligação fosfoamida. O produto obtido foi centrifugado e em seguida, foram realizadas lavagens com acetona, utilizando-se a centrifugação para coleta do produto precipitado.

Para este intermediário também foi realizada a análise de RMN ^1H (anexo 3), observando-se sinais que possivelmente caracterizam o produto final desta etapa, o intermediário III. Dentre os sinais encontrados, o principal é em δ 9,77 com integração para um único hidrogênio e que provavelmente representa o hidrogênio da hidroxila ligada ao fósforo (**d**). O pico encontra-se bem alargado e a posição do sinal é característica deste tipo de hidrogênio, entretanto a intensidade do sinal é bem fraca. Este sinal caracteriza a molécula, pois o intermediário que deu origem a ela não apresenta essa hidroxila.

5.1.4. Obtenção da hexadecilfosfocolina (IV)



Para obtenção do produto final, hexadecilfosfocolina (miltefosina), procedeu-se uma reação de metilação do fosfato de 2-(me -

tilamino)etil hexadecila por meio de reação com CH_3I em presença de NaOH e sob proteção da luz, mantendo-se a agitação durante 48 horas. Verificou-se um rendimento de 54% nesta última etapa. Entretanto, o produto obtido não foi purificado, mas foi caracterizado por RMN ^1H (anexo 4), observando-se sinais próximos aos descritos no artigo de MacDonald e colaboradores (1991). Dentre eles, o sinal em δ 3,48, o qual possivelmente corresponde aos hidrogênios (**g**), das metilas ligadas ao nitrogênio (com integral para nove hidrogênios) e que estava ausente no espectro do intermediário III, indicando a metilação da amina.

Tentativas anteriores de purificação não foram bem sucedidas, pois resultaram em perda significativa de produto e em produto impuro. Inicialmente utilizou-se a cromatografia de troca iônica (com resina amberlite mixed), baseado no artigo de MacDonald e colaboradores (1991). Previamente à passagem na coluna cromatográfica, foi feita uma CCD da solução contendo o produto da síntese em CHCl_3 : MeOH (1:1), encontrando-se uma mancha com R_f 0,81. Após a passagem pela coluna, entretanto, nenhuma mancha foi observada em nenhuma das frações coletadas.

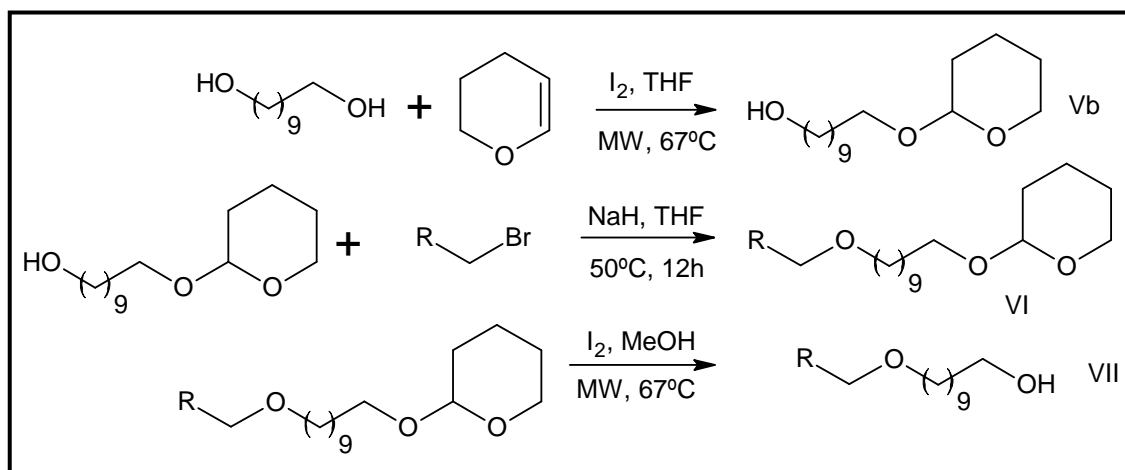
Todas as frações obtidas foram então combinadas para formar uma só solução e esta foi evaporada sob pressão reduzida, resultando em um precipitado branco não solúvel em acetona ou água. Uma CCD foi feita em fase móvel CHCl_3 : MeOH (1:1) do precipitado obtido, resultando em uma pequena mancha próxima ao ponto de aplicação da amostra, R_f 0,16. Apesar do valor de R_f obtido diferir muito daquele observado previamente à passagem pela coluna, aproxima-se bastante ao descrito na literatura para a miltefosina nesta mesma fase móvel, R_f 0,25 (MacDonald, *et al.*, 1991).

A dificuldade de purificação deve-se principalmente ao fato de a miltefosina ser uma molécula anfifílica, o que dificulta abordagens de purificação baseadas e hidrofobicidade. Portanto, a purificação da miltefosina ainda necessita ser aprimorada.

5.2. Síntese dos análogos alcoxicicloalquílicos

Para obtenção do intermediário ω -hidroxidecil-cicloexilmetil éter (VII) três rotas sintéticas foram testadas para a monoproteção do 1-10-decanodiol. A primeira

utilizou o cloreto de benzila como grupo protetor e óxido de prata como catalisador, e foi baseada na metodologia descrita por Bouzide e colaboradores (1997), com adaptações realizadas com base no artigo de Tanabe e colaboradores (1990). Entretanto, com o emprego desse procedimento não foi possível obter o ω -hidroxidecilbenzil éter (Va). A segunda rota sintética foi proposta por Agresta e colaboradores (2003) e também utilizou o cloreto de benzila como grupo protetor, porém em presença de NaH, entretanto não foi possível obter o intermediário Va. A terceira foi descrita por Deka e Sarma (2001) e utilizou o 3,4-diidro-2H-pirano como grupo protetor. A aplicação deste procedimento não permitiu a obtenção do composto ω -hidroxideciltetraidropirano éter (Vb), conforme será descrito no item 5.2.1.1.3.



Esquema 13. Esquema geral de síntese para a obtenção do intermediário ω -hidroxidecil-cicloexilmetil éter (VII).

Os resultados de cada tentativa de síntese foram separados em etapas, de acordo com a obtenção de cada composto e a metodologia usada.

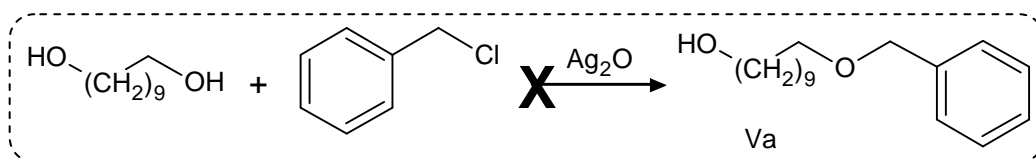
5.2.1. Síntese do intermediário ω -hidroxidecil-cicloexilmetil éter

5.2.1.1. Monoproteção do 1,10-decanodiol

Diversas metodologias foram investigadas para a monoproteção do 1,10-decanodiol e apresentam-se descritas a seguir. Para o procedimento final definiu-se

a metodologia descrita por Deka e Sarma (2001), em que o DHP serviu como grupo protetor e a reação foi catalisada por iodo.

5.2.1.1.1. Metodologia empregada por Bouzide *et al.* (1990)



Esquema 14. Esquema de síntese para a obtenção do ω-hidrosidecibenzil éter (Va).

Nas primeiras tentativas de síntese, em que o procedimento foi realizado sem qualquer alteração, a suspensão obtida após a reação não pode ser purificada em coluna cromatográfica, pois só se observava uma mancha na CCD (fase móvel: 5% THF em hexano). Como ainda havia óxido de prata na suspensão a coluna cromatográfica foi utilizada visando a separação do líquido remanescente e do óxido de prata (fase móvel: CH_2Cl_2). A análise espectrofotométrica de RMN ^1H do líquido remanescente determinou somente picos característicos do cloreto de benzila, evidenciando que não houve formação do produto. Acredita-se que os oxigênios do 1,10-decanodiol interagiram com o átomo de prata, formando um complexo que ficou retido na coluna cromatográfica. **Cloreto de benzila:** RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7,25-7,38 (m, 5H); δ 5,28 (s, 3H); δ 4,58 (s, 2H); anexo 5.

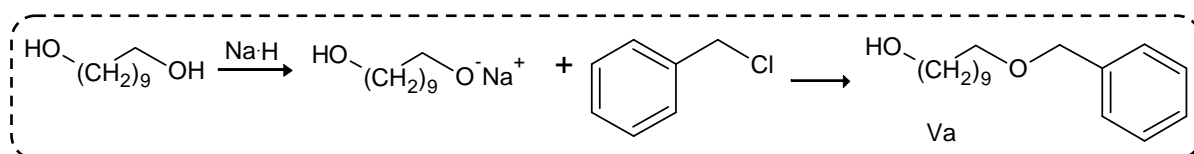
Em outra tentativa, após a alteração no procedimento, a CCD (fase móvel: 5% MeOH em CHCl_3) feita após 2h de reação indicou a presença do 1,10-decanodiol (Rf: 0,32), do possível produto (Rf: 0,44) e do cloreto de benzila (Rf: 0,95). Estes valores de Rfs foram atribuídos ao 1,10-decanodiol e ao cloreto de benzila após um ensaio de CCD, na qual empregaram-se os próprios reagentes como padrão e obtiveram-se valores de Rfs característicos dos mesmos. Após 18h de reação, outra CCD foi realizada mostrando a presença do possível subproduto (Rf: 0,70) e do cloreto de benzila (Rf: 0,97). O líquido final foi caracterizado pela análise espectroscópica de RMN ^1H na qual foi possível observar somente a mistura de tetraidropirano (THP) e 1,10-decanodiol sem reagir. **Mistura de material de partida** (diol e DHP): RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7,32-7,39 (m, 5H); δ 4,59 (s, 2H); δ 3,61-3,65 (t, 4H); δ 1,67 (s, 1H); δ 1,54-1,58 (m, 4H); δ 1,30-1,36 (s, 12H); anexo 6.

A síntese foi repetida e a reação foi acompanhada por CCD (fase móvel: 5% MeOH em CHCl_3) de hora em hora para controlar a formação do produto. Após 2h de reação a CCD indicou a presença do 1,10-decanodiol (Rf: 0,23), do possível produto (Rf: 0,40) e do cloreto de benzila (Rf: 0,95). Após 4h de reação já não se observava a mancha correspondente ao produto, somente as do 1,10-decanodiol (Rf: 0,24), do possível subproduto (Rf: 0,80) e do cloreto de benzila (Rf: 0,97). Este resultado se manteve até o final das 18h de reação.

Para confirmar a hipótese de formação do produto logo no início da reação, repetiu-se a síntese e parou-se a reação após 2h, quando a CCD (fase móvel: 5% MeOH em CHCl_3) indicou a presença do 1,10-decanodiol (Rf: 0,23), do possível produto (Rf: 0,40) e do cloreto de benzila (Rf: 0,90). Procedeu-se à filtração simples para remoção do óxido de prata e outra CCD foi realizada, porém já não se observava a presença do produto, somente manchas correspondentes ao 1,10-decanodiol (Rf: 0,23) e ao cloreto de benzila (Rf: 0,93). O filtrado foi então evaporado sob pressão reduzida, resultando em cristais brancos. O espectro de RMN ^1H revelou apenas a presença do álcool. **1,10-decanodiol:** RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 3,62-3,66 (t, 4H); δ 1,54-1,59 (t, 6H); δ 1,30 (s, 12H); δ 1,22 (t, 2H); anexo 7. Os sinais característicos do diol estão em δ 1,30, referente à cadeia alquílica e em δ 3,65 dos hidrogênios próximos às hidroxilas.

Provavelmente o composto com Rf: 0,40 que se acreditava ser o produto, na realidade é o complexo formado entre o 1,10-decanodiol e o óxido de prata, pois após a filtração para a remoção do óxido de prata, a mancha observada na CCD desapareceu. Após tentativas frustradas, concluiu-se que não conseguimos obter o ω -hidroxidecilbenzil éter (Va) com o emprego desse procedimento. Por isso optou-se por uma nova metodologia para a monoproteção do 1,10-decanodiol baseada no procedimento experimental descrito por Agresta e colaboradores (2003).

5.2.1.1.2. Metodologia empregada por Agresta *et al.* (2003)



Esquema 15. Esquema de síntese para a obtenção do ω -hidroxidecilbenzil éter (Va).

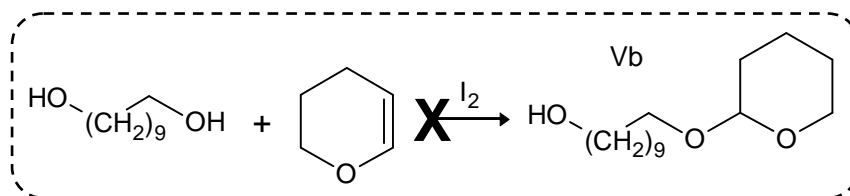
Partiu-se do diol e NaH suspensos em DMF, em sistema inerte (argônio), mantendo-se a agitação a 50°C por 10h, a fim de tornar o oxigênio mais reativo. Resfriou-se o balão à temperatura ambiente e gotejou-se o cloreto de benzila, para a formação da ligação éter, conseqüentemente a proteção da hidroxila.

Após algumas tentativas de neutralização do meio reacional ao final da reação, foi possível purificar o óleo obtido e a fase móvel que permitiu melhor separação dos compostos foi MeOH/ CHCl₃ (1:1). Após esta etapa foi realizada análise de RMN ¹H do composto obtido. **ω-hidrodecilbenzil éter (Va)**: RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 7,18-7,26 (m, 6H); δ 4,42 (s, 2H); δ 3,36-3,41 (s, 2H); δ 1,51-1,56 (m, 2H); δ 1,19-1,20 (m, 15H); anexo 8. Entretanto, não é possível afirmar que o composto desejado foi realmente obtido, pois não se observam deslocamentos diferentes para os hidrogênios (**e**) e para os hidrogênios (**h**). O sinal em 3,38 com integral para 4H, possivelmente indica que não houve a ligação do cloreto de benzila ao diol.

Ainda que o produto desejado (Va) fosse obtido com o emprego desta metodologia, o rendimento da reação foi de apenas 8%, impossibilitando dar continuidade à rota sintética para a obtenção do intermediário ω-hidrodecilcicloexilmetil éter (VI). Novas tentativas foram realizadas, visando maior rendimento, entretanto os rendimentos foram 7% e 9%. O baixo rendimento pode ser devido à presença de água no solvente e à estequiometria utilizada para a reação (o excesso de NaH não foi suficiente para garantir a ativação do oxigênio da molécula de diol).

O rendimento esperado para esta reação conforme descrito por Agresta *et al.* (2003) era 60-70%, porém a formação de subproduto prejudicou a obtenção do ω-hidrodecilbenzil éter (Va). Diante desses resultados, uma nova metodologia foi testada para monoproteção do 1,10-decanodiol, utilizando como grupo protetor o DHP (Deka, Sarma, 2001).

5.2.1.1.3. Metodologia empregada por Deka e Sarma (2001)



Esquema 16. Esquema de síntese para a obtenção do ω-hidrodeciltetraidropirano éter (Vb).

A princípio, as reações foram realizadas em um aparelho de microondas doméstico, porém não obtivemos êxito. Após diversas tentativas e em um estágio avançado do projeto, o LAPEN adquiriu um equipamento de microondas específico para sínteses orgânicas, o qual foi utilizado para tentativas posteriores.

Nas primeiras tentativas de síntese, em que o procedimento foi realizado sem qualquer alteração e em aparelho de microondas convencional, a solução obtida após a adição do tiosulfato de sódio ainda apresentava coloração alaranjada escura, evidenciando a presença de iodo. Quando o iodo permanece em solução pode ocorrer a formação de complexos entre o iodo e o produto formado, tornando este menos disponível para a próxima etapa de síntese, a qual ficará prejudicada.

Assim, a quantidade de iodo foi reduzida e utilizou-se uma solução saturada de tiosulfato de sódio. No entanto, mesmo com estas alterações a solução ainda apresentava uma coloração alaranjada. Também foi testada a adição, em dobro, da solução saturada de tiosulfato de sódio e a adição antes e depois da extração líquido-líquido, mas não se obteve sucesso. A quantidade de iodo foi então reduzida para 0,05 mmol, o que possibilitou a destruição de praticamente todo o iodo ao final, gerando uma solução levemente amarelada.

Com o emprego das condições aprimoradas e equipamento de microondas específico para sínteses, foi possível remover todo o iodo com uma solução de tiosulfato de sódio, o que não era possível quando a reação ocorria em um equipamento de microondas doméstico, mesmo com a redução da quantidade do catalisador. Para esta metodologia, partiu-se de 1,10-decanodiol, I₂ e DHP em THF, em diferentes proporções (tabela 3). A reação ocorreu em 340s, a 67°C com potência de 300W em um equipamento de microondas próprio para sínteses orgânicas.

Tabela 3. Estequiometrias utilizadas na reação de obtenção do ω-hidroxideciltetraidropirano éter empregando-se microondas.

1,10-decanodiol	DHP	I ₂	Anexo
1 mmol	1,3 mmol	5%	9
1 mmol	1 mmol	5%	10
1,25 mmol	1 mmol	5%	11

Realizaram-se as devidas extrações líquido-líquido e o extrato foi armazenado com sulfato de sódio anidro em geladeira. Procedeu-se então à purificação em

coluna de sílica-gel (fase móvel: acetato de etila/ hexano 1:2). O produto apresentou-se como um líquido oleoso levemente rosa. Após a purificação o solvente foi evaporado sob pressão reduzida e a solução remanescente foi colocada na bomba à vácuo para retirada completa do solvente.

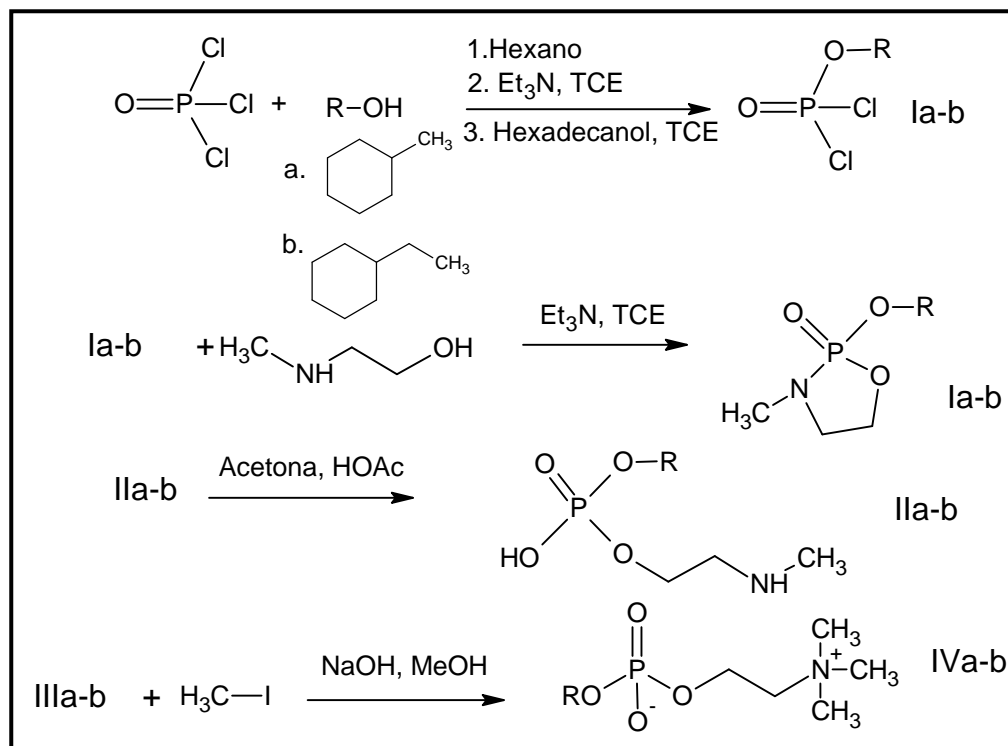
Os espectros de RMN ^1H (anexos 9, 10 e 11) indicam que o produto desejado não foi obtido. A princípio, acredita-se que houve a ligação do grupo protetor ao diol, porém formando uma molécula diferente do produto desejado, já que deslocamentos dos hidrogênios dos carbonos próximos aos oxigênios não são observados no espectro, além disso, as integrais não são coerentes com o composto esperado.

Baseado em literatura (Singh *et al.*, 2004) concluiu-se que não se obteve o produto esperado. Embora se observe um sinal em 4,58 (t, 1H) que, talvez, pudesse indicar a ligação do DHP ao diol, sinais entre δ 3,0 e δ 4,0 apresentam integrais incoerentes (deveriam ter 2H cada pico) com a molécula desejada, o que possivelmente indica a presença de THP sem reagir. Outros sinais como os observados em δ 1,30 e em δ 3,65 coincidem com os sinais da molécula do diol. Ou seja, podemos observar nestes espectros, uma mistura de materiais de partida.

Devido ao insucesso na obtenção do ω -hidroxidecil-cicloexilmetil éter, não foi possível dar continuidade a rota sintética de obtenção do análogo alcóxicicloalquílico.

5.3. Síntese dos análogos cicloalquílicos da miltefosina

A síntese dos análogos cicloalquílicos da miltefosina foi realizada com base na metodologia de MacDonald *et al.* (1991). Algumas alterações no procedimento experimental foram realizadas, em virtude das características dos materiais de partida, conforme descrito no item 4.2.3. e a rota sintética utilizada está representada no Esquema 17.



Esquema 17. Esquema geral de síntese para a obtenção de análogos cicloalquílicos da miltefosina.

Devido à similaridade do procedimento experimental para a síntese da miltefosina, não será detalhado todo o procedimento. É importante destacar que o protocolo utilizado para a síntese dos dois análogos foi diferente, já que foram realizados separadamente e devido à maior disponibilidade do reagente cicloexanoetanol, foi possível realizar mais tentativas com este reagente para se aprimorar a rota sintética.

Para a obtenção do análogo metilcicloexilfosfocolina, partiu-se do POCl_3 e do cicloexanometanol, para formar o dicloreto de fosforometilcicloexila, na primeira etapa sintética (intermediário Ia). A reação ocorreu sob agitação, banho de gelo e em atmosfera inerte (argônio). Após a evaporação sob pressão reduzida do solvente, obteve-se um óleo castanho. Foi observado um bom rendimento nesta etapa, na qual a reação ocorreu de forma bastante limpa sendo que o primeiro intermediário da reação foi utilizado na próxima etapa sem purificação.

A síntese do intermediário IIb, 2-(cicloexiletiloxi)-3-metil-2-oxa-1,2,3-oxazofosfolano foi realizada com base na metodologia descrita na literatura, em atmosfera inerte (argônio) e com resfriamento. Após filtrar a mistura e evaporar o excesso de solvente sob pressão reduzida, o líquido oleoso remanescente foi

caracterizado por RMN ^1H (anexo 13). Neste espectro, observaram-se sinais do grupamento cicloalquila, porém não há indícios da formação da fosfoamida cíclica.

Seguindo para a terceira etapa, solubilizou-se o intermediário (IIa) obtido na etapa anterior em acetona e transferiu-se para um meio aquoso ácido (ácido acético glacial em água 2:10), sob agitação e à temperatura ambiente, visando à abertura do anel por hidrólise da ligação fosfoamida. O produto obtido (IIIa) foi submetido à evaporação sob pressão reduzida para remoção do excesso de solvente, resultando em um líquido oleoso, amarelo claro.

Para obtenção do produto final, procedeu-se uma reação de metilação do intermediário IIIa por meio de reação com CH_3I em presença de NaOH e sob proteção da luz, mantendo-se a agitação durante 48 horas, para então, obter o produto final (líquido oleoso, amarelo claro) através da evaporação do solvente sob pressão reduzida. Através da análise de RMN ^1H (anexos 18) observou-se ausência de sinais que comprovem a formação do produto desejado. Verificamos a presença dos sinais referentes aos hidrogênios do ciclo, entretanto, o sinal dos hidrogênios que indicariam a metilação da amina não foi observado.

A partir destes resultados, concluiu-se que não ocorreu a ligação do grupamento ciclometila no fósforo, já na primeira etapa da síntese, prejudicando toda a rota sintética. Visando a otimização da rota, repetiu-se todo o procedimento, porém com o reagente cicloexanoetanol, realizando algumas adaptações, acompanhando cada passo e tendo o cuidado de purificar o intermediário obtido e secá-lo muito bem antes de caracterizá-lo.

Para a síntese do análogo etilcicloexilfosfocolina, utilizou-se o mesmo protocolo realizado para o análogo metilcicloexilfosfocolina na primeira etapa sintética para obtenção do intermediário Ib. Entretanto, após a filtração não se evaporou o solvente, sendo o filtrado utilizado diretamente na segunda etapa. Previamente a este procedimento alterado, realizou-se a etapa 1 conforme o procedimento utilizado para o análogo Ia, purificando-se o produto desta reação em coluna de sílica-gel com fase móvel: 10% MeOH em CHCl_3 e, seguido de secagem em bomba à vácuo, caracterizou-se o produto obtido através de RMN ^1H . **Dicloreto de fosforoetilcicloexila** (puro): fórmula $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{PCl}_2\text{O}$, MM 229,09; **RMN ^1H** (CDCl_3 , 300 MHz) δ 4,23 (m, 4H); δ 3,75 (d, 2H); δ 2,64 (s, 1H); δ 1,67 (d, 5H); δ 1,58 (q, 2H); δ 1,34 (t, 3H); δ 1,22 (t, 3H); δ 1,00 (m, 2H); anexo 12.

Após a verificar a obtenção do intermediário Ib através do RMN ^1H , alterou-se o procedimento experimental, realizando-se a etapa 2 imediatamente após a etapa 1 (sem evaporação do solvente), gotejando-se uma solução contendo *N*-metiletanolamina, Et_3N e tricloroetileno no filtrado da etapa 1. A reação ocorreu em sistema inerte e com banho de gelo. Ao final, filtrou-se o precipitado, e o excesso de solvente do filtrado foi evaporado sob pressão reduzida. Visando a purificação desta etapa, tentou-se forçar a precipitação do produto, solubilizando o óleo remanescente da evaporação com diclorometano e gotejando hexano até ocorrer a separação. Entretanto, formaram-se duas fases líquidas, provavelmente por que o produto desejado não seja sólido. A fase menos densa foi purificada em coluna de sílica-gel, utilizando como fase móvel $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$ (3:7), em seguida, $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$ (1:1) e, por fim, MeOH . O produto obtido da purificação foi caracterizado por RMN ^1H (anexo 14). Confirmou-se a obtenção do produto desejado através do espectro de RMN, no qual observou-se um sinal em δ 3,88 que indicaria a ligação do cicloexanoetanol ao oxigênio ligado ao fósforo e o sinal em δ 2,67 com integral para 3H (NCH_3), além disso, o número de hidrogênios do espectro corresponde ao da molécula esperada.

Em seguida, adicionou-se acetona ao intermediário (Iib) obtido na etapa anterior e uma solução de ácido acético em água (2:10), sob agitação e à temperatura ambiente, visando à abertura do anel por hidrólise da ligação fosfoamida. Após 16h, a mistura reacional foi neutralizada, com o intuito de remover o ácido da reação e, então, submetida à evaporação sob pressão reduzida para remoção do excesso de solvente, resultando em um líquido oleoso, amarelo claro. O produto obtido foi purificado em coluna de sílica-gel, utilizando como fase móvel $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$ (7:3), logo após utilizou-se $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$ (1:1) e ácido acético. Após evaporar o solvente sob pressão reduzida, obteve-se um óleo amarelo, o qual foi caracterizado por RMN ^1H (anexo 15). Todos os hidrogênios da molécula foram observados no espectro, indicando a obtenção do produto desejado. Além disso, foram realizados análise de RMN ^{31}P (anexo 16) e RMN 2D (HETCOR, anexo 17) para confirmação de que o composto esperado foi obtido. O RMN ^{31}P confirmou a presença do fósforo da porção fosfato do composto, com deslocamento de δ 1,12. O espectro de RMN 2D HETCOR, por sua vez, permitiu identificar as interações dos hidrogênios com os carbonos da molécula.

Para obtenção do produto final, etilcicloexanofosfocolina, procedeu-se uma reação de metilação do intermediário IIIb por meio de reação com CH_3I em presença de NaOH e sob proteção da luz, mantendo-se a agitação durante 48h. O produto obtido não foi purificado, porém foi caracterizado por RMN ^1H (anexo 19), observando-se sinais referentes ao cicloexano entre δ 0,89 e δ 1,71 e os sinais dos hidrogênios (a), (i) e (j), em δ 3,98; δ 4,38 e δ 2,82 respectivamente. Observa-se ainda, um forte sinal em δ 2,45, que provavelmente indica a presença do intermediário III, monometilado (material de partida). O principal deslocamento, referente aos hidrogênios (I) (das metilas ligadas ao nitrogênio) é observado em δ 2,27, de um provável composto dimetilado.

Portanto, acreditamos que a reação de metilação ocorre, mas até o momento não obtivemos o composto trimetilado. Considerando-se que esta reação corresponde a uma substituição nucleofílica do tipo SN_2 , ou seja, a velocidade depende das concentrações dos reagentes, uma possibilidade seria o aumento da concentração inicial do intermediário III, juntamente com excesso de CH_3I . Também merece ser investigado o aumento do tempo de reação, visando à obtenção do composto etilcicloexilfosfocolina.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

A rota sintética para obtenção da miltefosina foi aprimorada com sucesso, já que foi possível obter intermediários mais puros. Porém ainda se faz necessário aprimorar a purificação do produto final.

A obtenção dos intermediários alcocicloalquílicos foi dificultada pela reação de monoproteção seletiva do 1,10-decanodiol, sendo que metodologias diferentes foram empregadas, sem sucesso. Devido à simetria do diol, a proteção de apenas uma das hidroxilas é bastante trabalhosa, e muitas vezes ocorre a substituição das duas hidroxilas. Isso origina um subproduto e acarreta em baixo rendimento, conseqüentemente, prejudica as etapas seguintes.

Quanto à obtenção de análogos cicloalquílicos, obtivemos o intermediário fosfato de 2-(metilamino)etil cicloexila puro, proporcionando a perspectiva de obtenção do novo análogo cicloexiletilfosfocolina planejado. Além disso, a tentativa realizada para trimetilar este composto resultou em uma molécula dimetilada, aumentando a expectativa de se obter o análogo cicloalquílico da miltefosina. E assim, ambos poderão ser futuramente submetidos a ensaios de potencial hemolítico e de atividade antitumoral.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AGRESTA, M.; D'ARRIGO, P.; FASOLI, E.; LOSI, D.; PEDROCCHI-FANTONI, G.; RIVA, S.; SERVI, S.; TESSARO, D. Synthesis and antiproliferative activity of alkylphosphocholines. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 126, n. 2, p. 201-210, 2003.

ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L.; LOPES, M.T.P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ARTHUR, G.; BITTMAN, R. The inhibition of cell signaling pathways by antitumor ether lipids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1390, n. 1, p. 85-102, 1998.

AVLONITIS, N.; LEKKA, E.; DETSI, A.; KOUFAKI, M.; CALOGEROPOULOU, T.; SCOULICA, E.; SIPI, E.; KYRIKOU, I.; MAVROMOUSTAKOS, T.; TSOTINIS, A.; GRDADOLNIK, S.G.; MAKRIYANNIS, A. Antileishmanial ring-substituted ether phospholipids. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n.5, p.55-767, 2003.

BÄUMER, W.; WLAZ, P.; JENNINGS, G.; RUNDFELDT, C. The putative lipid raft modulator miltefosine displays immunomodulatory action in T-cell dependent dermal inflammation models. **European Journal of Pharmacology**, v. 628, n. 1-3, p. 226-232, 2010.

BERKOVIC, D. Cytotoxic etherphospholipid analogues. **General Pharmacology**, v. 31, n. 4, p. 511-517, 1998.

BOUZIDE, A.; SAUVÉ, G. Highly selective silver (I) oxidized mediated monoprotection of symmetrical diols. **Tetrahedron Letters**, v. 38, n. 34, p. 5945-5948, 1997.

CALABRESI, P.; CHABNER, B.A. Quimioterapia das doenças neoplásicas. In: BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. Quimioterápicos. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 11.ed. São Paulo: Mcgraw-hill, 2006.

CALEGOROPOULOU, T.; ANGELOU, P.; DETSI, A.; FRAGIADAKI, I.; SCOULICA, E. Design and synthesis of potent antileishmanial cycloalkylidene-substituted ether phospholipid derivatives. **Journal Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 4, p. 897-908, 2008.

CASTRO, B.; GAMEIRO, P.; LIMA, J.L.F.C.; MATOS, C.; REIS, S. Interaction of drugs with hexadecylphosphocholine micelles. Derivative spectroscopy, acid-base and solubility studies. **Material Science and Engineering C**, v.18, n. esp., p.71-78, 2001.

CHAKRABANDHU, K.; HUAULT, S.; HUEBER, A. Distinctive molecular signaling in triple negative breast cancer cell death triggered by hexadecylphosphocholine (miltefosine). **FEBS Letters**, v. 582, n. 30, p.4176-4184, 2008.

CLIVE, S.; GARDINER, J.; LEONARD, R.C.F. Miltefosine as a topical treatment for cutaneous metastases in breast carcinoma. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v.4, supl., p.S29-S30, 1999.

COURAGE, C.; BUDWORTH, J.; GESCHER, A. Comparison of ability of protein kinase C inhibitors to arrest cell growth and to alter protein kinase C localisation. **British Journal of Cancer**, v. 71, n. 4, p. 697-704, 1995.

DEKA, N.; SARMA, J.C. Microwave-mediated selective monotetrahydropyranylation of simmetrical diols catalyzed by iodine. **Journal of Organic Chemistry**, v. 66, n. 6, p. 1947-1948, 2001.

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

FIEGL, M.; LINDNER, L.H.; JUERGENS, M.; EIBL, H.; HIDDEMANN, W.; BRAESS, J. Erufosine, a novel alkylphosphocholine, in acute myeloid leukemia: Single activity and combination with other antileukemic drugs. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v.62, n.2, p.321-329, 2008.

FOS, E.; SUESA, N.; BORRAS, L.; LOBATO, C.; BANFI, P.; GAMBETTA, R.A.; ZUNINO, F.; MAULEÓN, D.; CARGANICO, G. Synthesis of alkyl chain-modified ether lipids and evaluation of their *in vitro* cytotoxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**. v.38, n.7, p.1216-1228, 1995.

FRASCI, G.; D'AIUTO, G.; COMELLA, P.; D'AIUTO, M.; DI BONITO, M.; RUFFOLO, P.; IODICE, G.; PETRILLO, A.; LASTORIA, S.; OLIVIERO, P.; CAPASSO, I.

MONTELLA, M.; SIANI, C.; SANTAGELO, M.; VIZIOLI, L.; COMELLA, G. Preoperative weekly cisplatin, epirubicin, and paclitaxel (PET) improves prognosis in locally advanced breast cancer patients: an update of the Southern Italy Cooperative Oncology Group (SICOG) randomized trial 9908. **Annals of Oncology**, v. 21, n. 4, p. 707-716, 2010.

GUERRA, M. R.; GALLO, C. V. M.; AZEVEDO, G.; MENDONÇA, S. Risco de Câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v.51, n. 3, p. 227-234, 2005.

HECZKOVA, B.; SLOTTE, J.P. Effect of anti-tumor ether lipids on ordered domains in model membranes. **Febs Letter**, v. 580, n. 10, p. 2471-2476, 2006.

HEESBEEEN, E.C.; VERDONCK, L.F.; STAAL, G.E.J.; RIJKSEN, G. Protein kinase C is not involved in the cytotoxic action of 1-octadecyl-2-O-methyl-*sn*-glycerol-3-phosphocholine in HL-60 and K562 cells. **Biochemical Pharmacology**, v.47, n.9, p.1481-1488, 1994.

HEIM, S.; MITELMAN, F. Tumor of the Breast. In: _____. **Cancer cytogenetics**. 2.ed. New York: Wiley – Liss, Inc. 1995. cap.14, p.369-388.

HUANG, F.; QU F.; PENG, Q.; XIA, Y.; PENG, L. Synthesis and characterization of photolabeling probes of miltefosine. **Journal of Fluorine Chemistry**, v.126, n.5, p.739-743, 2005.

HUBIEKI, M.P.; GANDOUR, R.D.; ASHENDEL, C.L. Synthesis of optically pure cyclic lipoidal ammonium salts and evaluation of inhibition of protein kinase C. **The Journal of Organic Chemistry**, v.61, n.26, p.9379-9384, 1996.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Disponível em <<http://www.iarc.fr/>>. Acesso em: 17 agosto 2001.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Disponível em <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/>>. Acesso em: 20 agosto 2011.

KANG, E.; KATAOKA, S.; KATO, K. Synthesis and properties of alkyl phosphorylcholine amphiphiles with a linear and an asymmetrically branched alkyl chain. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v.78, n.8, p.1558-1564, 2005.

KASAPOVIC, J.; PEJIC, S.; TODOROVIC, A.; STOJILJKOVIC, V.; PAJOVIC, S. Antioxidant status and lipid peroxidation in the blood of breast cancer patients of different ages. **Cell biochemistry and Function**, v. 26, n. 6, p. 723-730, 2008.

KONDAPAKA, S.B.; SINGH, S.S.; DASMAHAPATRA, G.P.; SAUSVILLE, E.A.; ROY, K.K. Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation. **Molecular Cancer Therapeutics**, v.2, n.11, p. 1093-1103.

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

LEIGHL, N.B.; DENT, S.; CLEMONS, M.; VANDENBERG, T.A.; TOZER, R.; WARR, D.G.; CRUMP, R.M.; HEDLEY, D.; POND, G.R.; DANCEY, J.E.; MOORE, M. A Phase 2 study of perifosine in advanced or metastatic breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.108, n.1, p.87-92, 2008.

LEONARD, R.; HARDY, J.; VAN TIENHOVEN, G.; HOUSTON, S.; SIMMONDS, P.; DAVID, M.; MANSI, J. 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.

LI, X.; LUWOR, R.; LU, Y.; LIANG, K.; FAN, Z. Enhancement of antitumor activity of the anti-EGP receptor monoclonal antibody cetuximab/c225 by perifosine in PTEN-deficient cancer cells. **Oncogene**, v.25, n.4, p.525-535, 2006.

LINDNER, L.H.; HOSSANN, M.; VOGESER, M.; TEICHERT, N.; WACHHOLZ, K.; EIBL, H.; HIDDEMANN, W.; ISSELS, R.D. Dual role of hexadecylphosphocholine (miltefosine) in thermosensitive liposomes: Active ingredient and mediator of drug release. **Journal of Controlled Release**, v.125, n.2, p.112-120, 2008.

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

MARCO, C.; JIMENEZ-LOPEZ, J.M.; RIOS-MARCO, P. Hexadecylphosphocholine alters nonvesicular cholesterol traffic from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum and inhibits the synthesis of sphingomyelin in HepG2 cells. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, n. 6, p. 1296-1303, 2009.

MENON, K.; TEICHER, B.A. Metasis models. In: TEICHER, B. A. **Tumor models in cancer research**. Totowa: Human Press Inc., 2002. p. 277-278.

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

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

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

NELSON, D.L.; COX, M.M. Lipídios. In: _____. **Lehninger: Princípios de bioquímica**, 4.ed. São Paulo: Sarvier Ltda, 2004, p. 341-418.

OBANDO, D.; WIDMER, F.; WRIGHT, L. C.; SORRELL, T. C.; JOLLIFFE, K.A. Synthesis, antifungal and antimicrobial activity of alkylphospholipids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.15, n.15, p.5158-5165, 2007.

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

PAPAZAFIRI, P.; AVLONITIS, N.; ANGELOU, P.; CALOGEROPOULOU, T.; KOUFAKI, M.; SCOULICA, E.; FRAGIADAKI, I. Structure-activity relationships of antineoplastic ring-substituted ether phospholipid derivatives. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v.56, n.3, p. 261-270, 2005.

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

RAKOTOMANGA, M.; BLANC, S.; GAUDIN, K.; CHAMINADE, P.; LOISEAU, P. M. Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, n.4, p.1425-1430, 2007.

RUITER, G.A.; ZERP, S.F.; BARTELINK, H.; VAN BLITTERSWIJK, W.J; VERHEIJ, M. Anti-cancer alkyl-lysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase–Akt/PKB survival pathway. **Anti-cancer Drugs**, v. 14, n. 2, p. 167-173, 2003.

RUITER, G.A.; VERHEIJ, M.; ZERP, S.F.; VAN BLITTERSWIJK, W.J. Alkyl-lysophospholipids as anticancer agents and enhancers of radiation-induced

apoptosis. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v.49, n.2, p.415-419, 2001.

SARAIVA, V.B.; GIBALDI, D.; PREVIATO, J.O.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; BOZZA, M.T.; FREIRE-DE-LIMA, C.G.; HEISE, N. Proinflammatory and cytotoxic effects of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against drug-resistant strains of *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, n.11, p.3472-3477, 2002.

SEIFERT, K.; LEMKE, A.; CROFT, S.L.; KAYSER, O. Antileishmanial Structure-activity relationships of synthetic phospholipids: In vitro and in vivo activities of selected derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, n.12, p.4525-4528, 2007.

SIEGEL R.; WARD E., BRAWLEY O.; JEMAL A. Cancer Statistics, 2011: The Impact of Eliminating Socioeconomic and Racial Disparities. **A Cancer Journal for Clinicians**. v. 61, n.4, p. 212-235, 2011

SILVA, A.S.; ROPELATTO, C.; FILIPPINI, C.A.F.; BIANCHINI, E.; BAGATINI, F.; BROCARD, G. A.; THIESEN, K.; HAAS, P. Ocorrência de câncer de mama no Brasil e no estado de Santa Catarina. **NewsLab**, v.52, p.98-110, 2002.

SINGH, V.; SAPEHIYIA, V. Novel heterogeneously catalysed selective, solventless monotetrahydropyranlation of different symmetrical 1,n-diols and various alcohols using ZrO₂-pillared clay. **Catalysis communications**, v. 5, n 8, p. 463-468, 2004.

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

TANABE, M.; PETERS, R.H. (R,S)-Mevalonolactone 2 - ¹³C. **Organic Syntheses**, Coll. Vol. 7, p.386, 1990.

ÜBERALL, F.; OBERHUBER, H.; MALY, K.; ZAKNUN, J.; DEMUTH, L.; GRUNICKE, H.H. Hexadecylphosphocholine inhibits inositol phosphate formation and protein kinase C activity. **Cancer research**, v. 51, n. 3, p. 807-812, 1991.

UNGER, C.; BERDEL, W.; HANAUSKE, A.; SINDERMAN, H.; ENGEL, J.; MROSS, K. First-time-in-man and pharmacokinetic study of weekly oral perifosine in patients with solid tumors. **European Journal of Cancer**, v. 46, n. 5, p. 920-925, 2010.

VAN DER LUIT, A.H.; VINK, S.R.; KLARENBECK, J.B.; PERRISOUD, D.; SOLARY, E.; VERHEIJ, M.; VAN BLITTERSWIJK, W.J. A new class of anticancer alkylphospholipids uses lipid rafts as membrane gateways to induce apoptosis in lymphoma cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v.6, n.8, p.2337-2345, 2007.

VINK, S.R.; VAN DER LUIT, A.H.; KLARENBECK, J.B.; VERHEIJ, M.; VAN BLITTERSWIJK, W.J. Lipid rafts and metabolic energy differentially determine uptake of anti-cancer alkylphospholipids in lymphoma versus carcinoma cells. **Biochemical Pharmacology**, v.74, n.10, p.1456-1465, 2007.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. Lipídeos e membranas biológicas. In: _____. **Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular**, 2.ed. São Paulo: Artmed Editora S.A., 2006, p. 233-311.

WEIGELT, B.; PETERSE, J.L.; VAN'T VEER, L.J. Breast cancer metastasis: Markers and models. **Nature**, v.5, n.8, p.591-602, 2005.

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

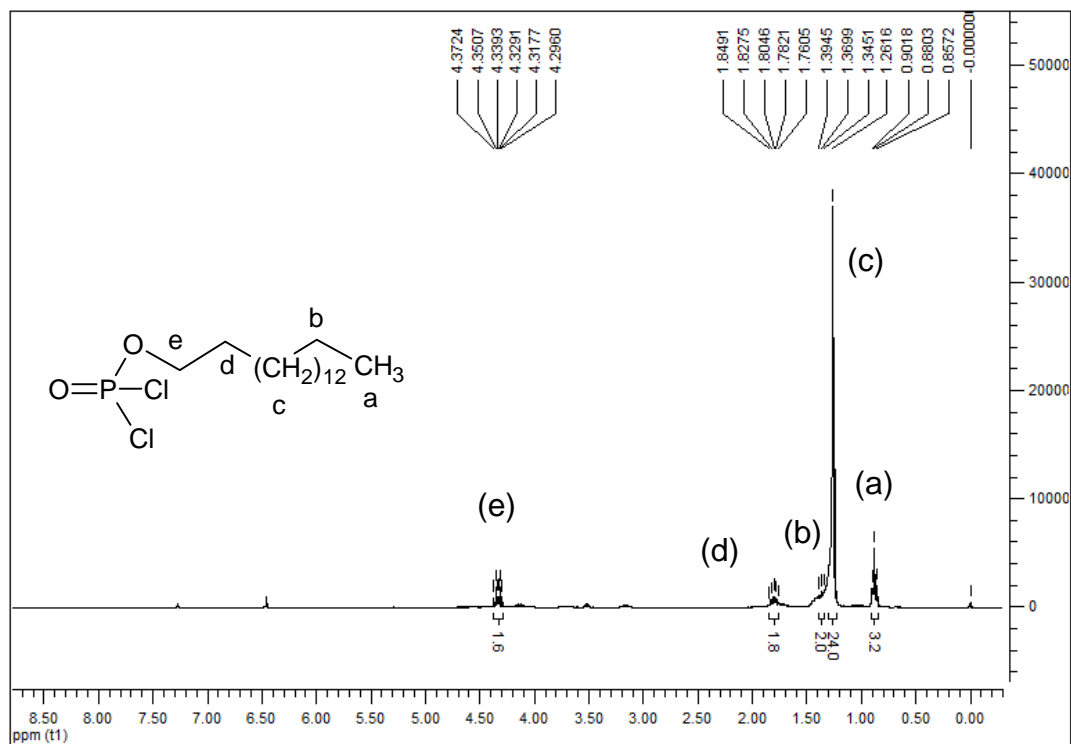
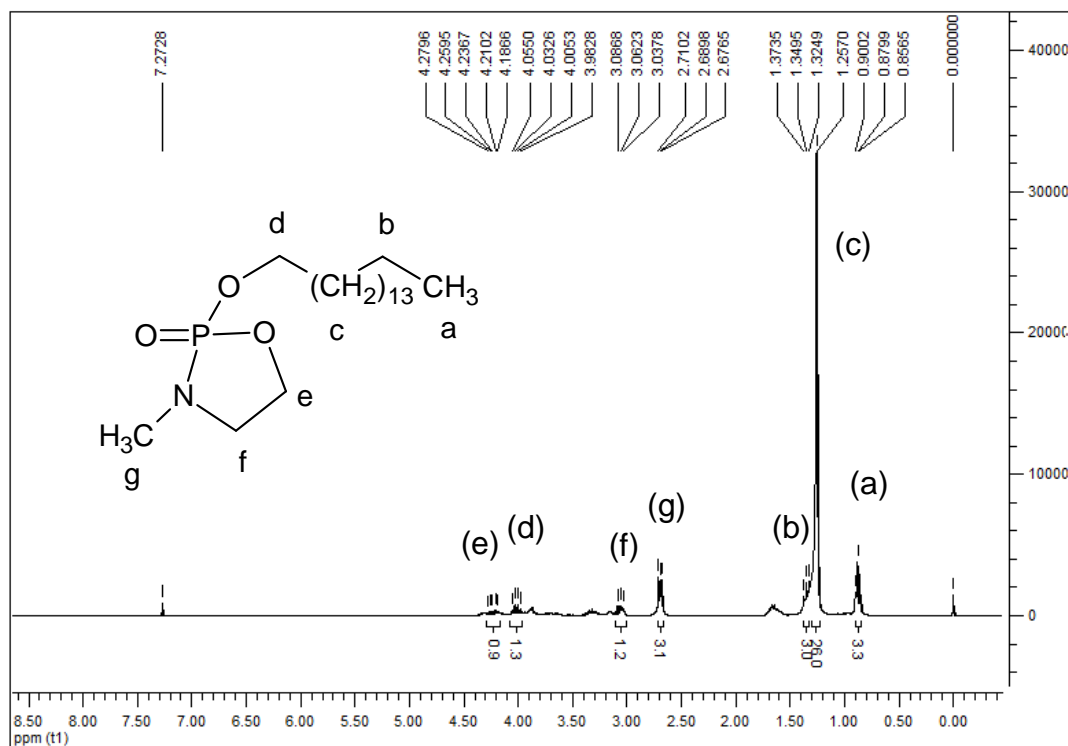
WHO. World Health Organization. Disponível em <<http://www.who.int/infobase/report.aspx?iso=BRA&rid=119&goButton=Go>> Acesso em: 23 out. 2008.

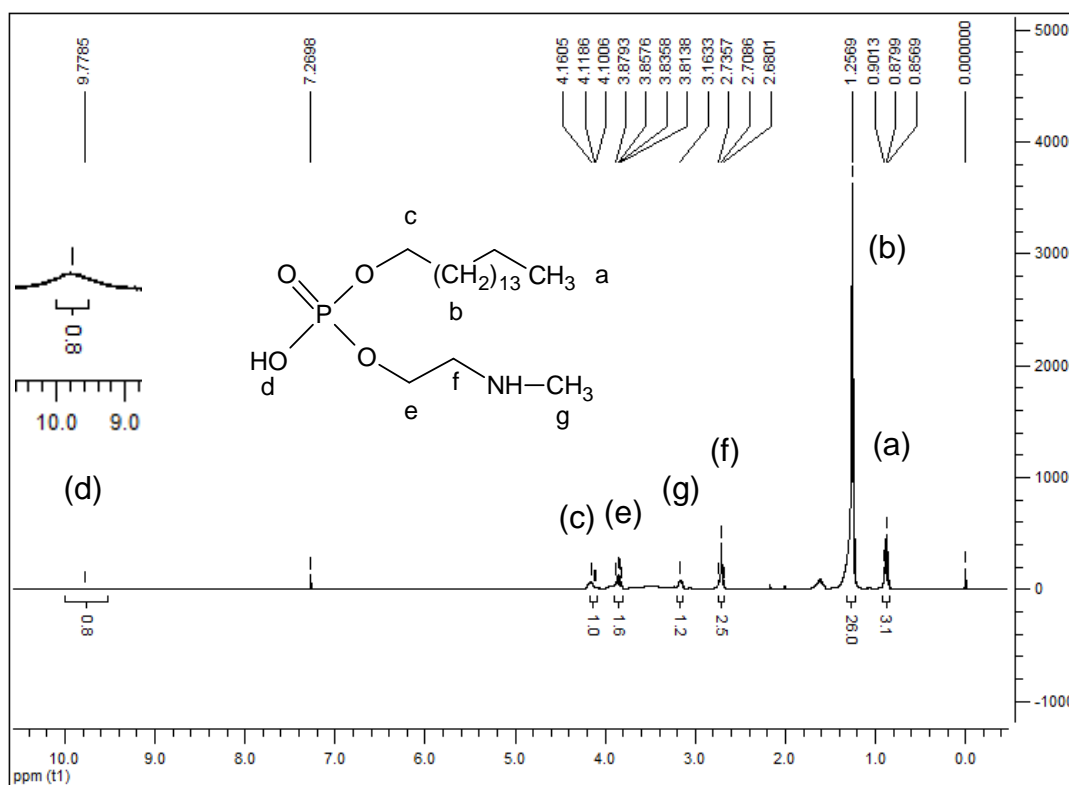
WIEDER, T.; REUTTER, W.; ORFANOS, C.E.; GEILEN, C.C. Mechanisms of action of phospholipid analogs as anticancer compounds. **Progress in Lipid Research**, v.38, n.3, p.249-259, 1999.

WRIGHT, M.M.; HOWE, A.G.; ZAREMBERG, V. Cell membranes and apoptosis: role of cardiolipin, phosphatidylcholine, and anticancer lipid analogues. **Biochemistry and Cell Biology**, v.82, n.1, p.18-26, 2004.

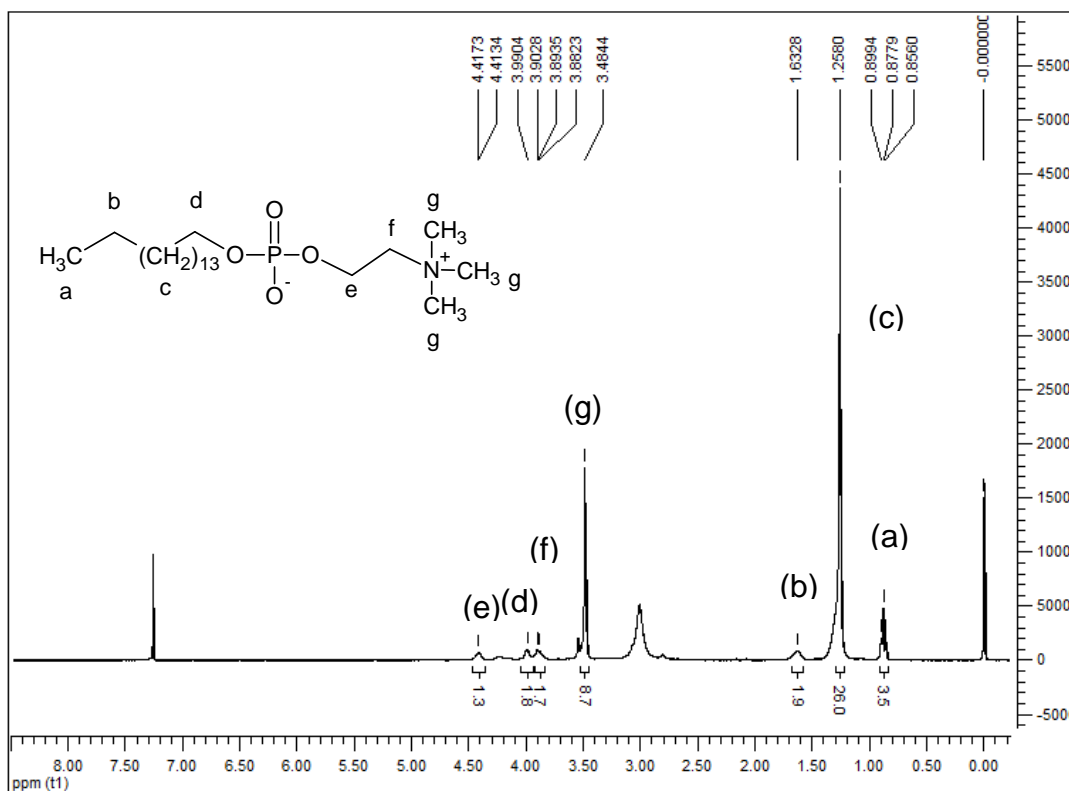
8. ANEXOS

8.1. Espectros

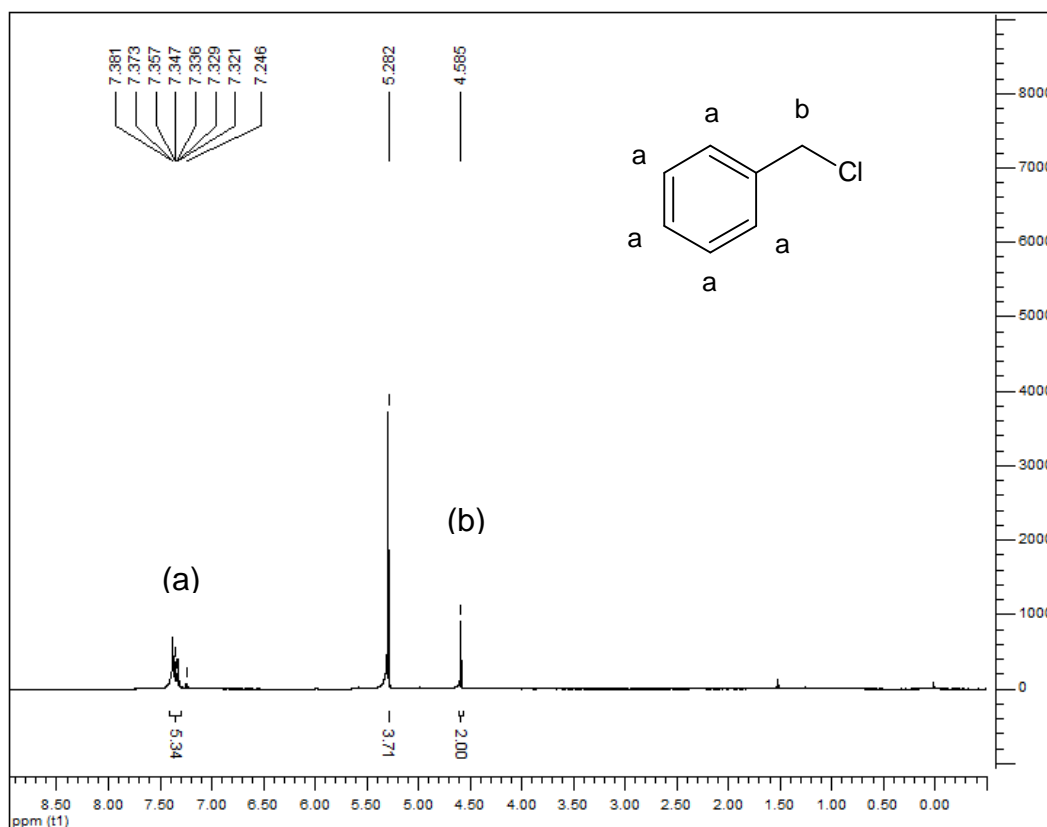
Anexo 1. Espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) do dicloreto de fosforexadecila (I).Anexo 2. Espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) do 2-(hexadeciloxi)-3-metil-2-oxa-1,3,2-oxazofosfolano (II).



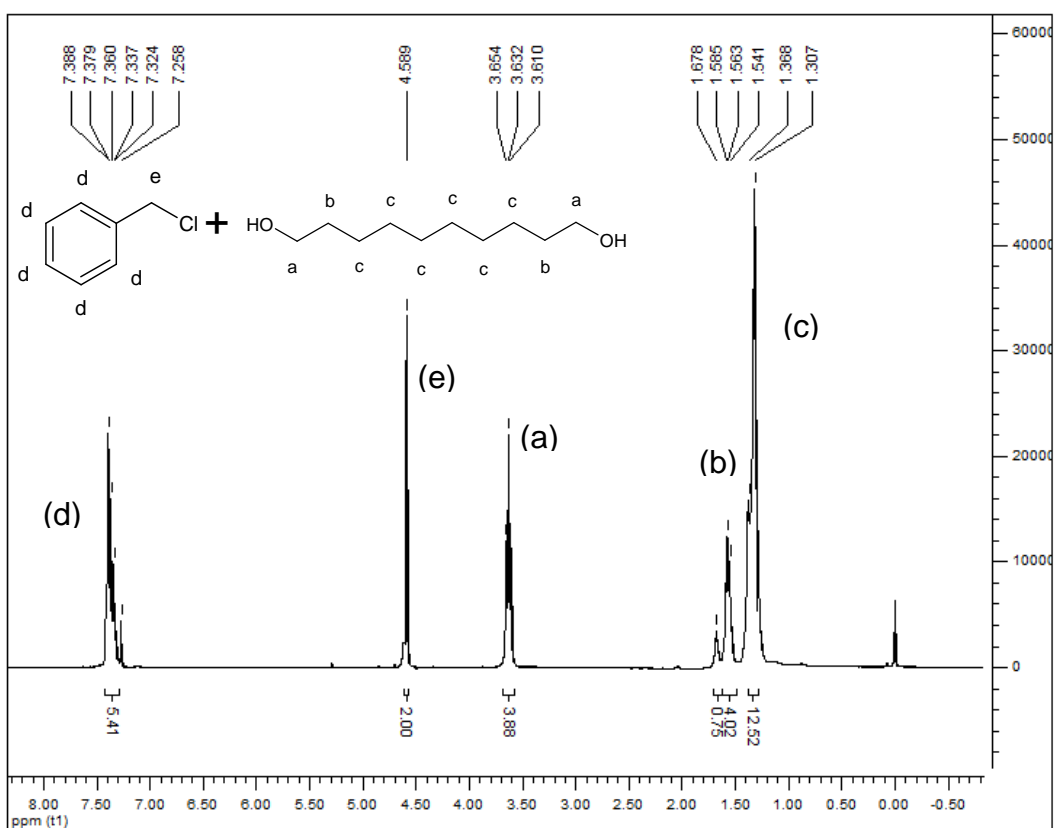
Anexo 3. Espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) do 2-(metilamino)etil hexadecila (III).



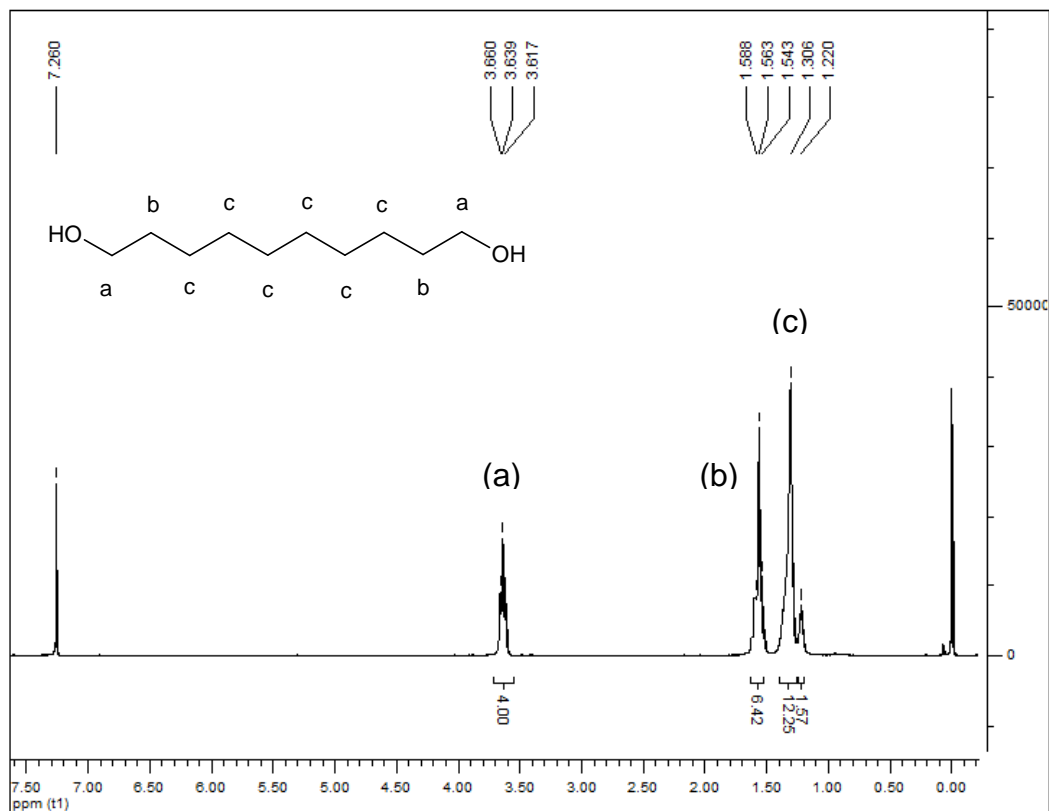
Anexo 4. Espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) do produto final, miltefosina (IV, impuro).



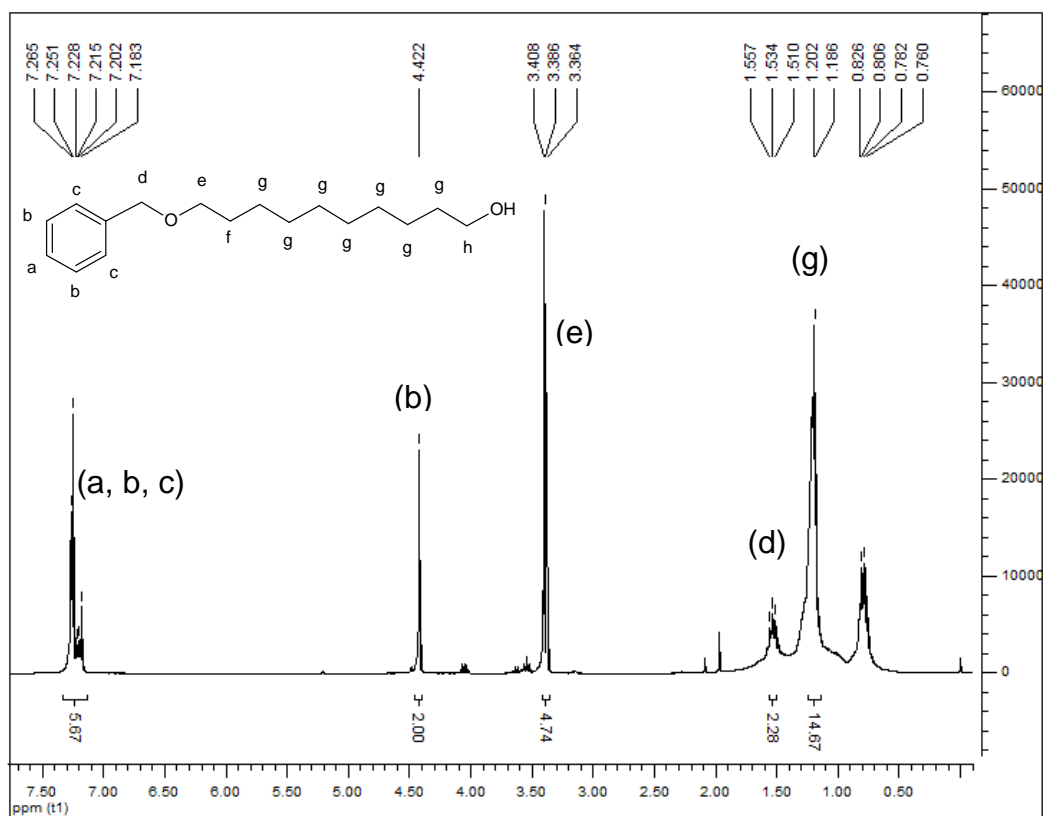
Anexo 5. Espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) do cloreto de benzila.



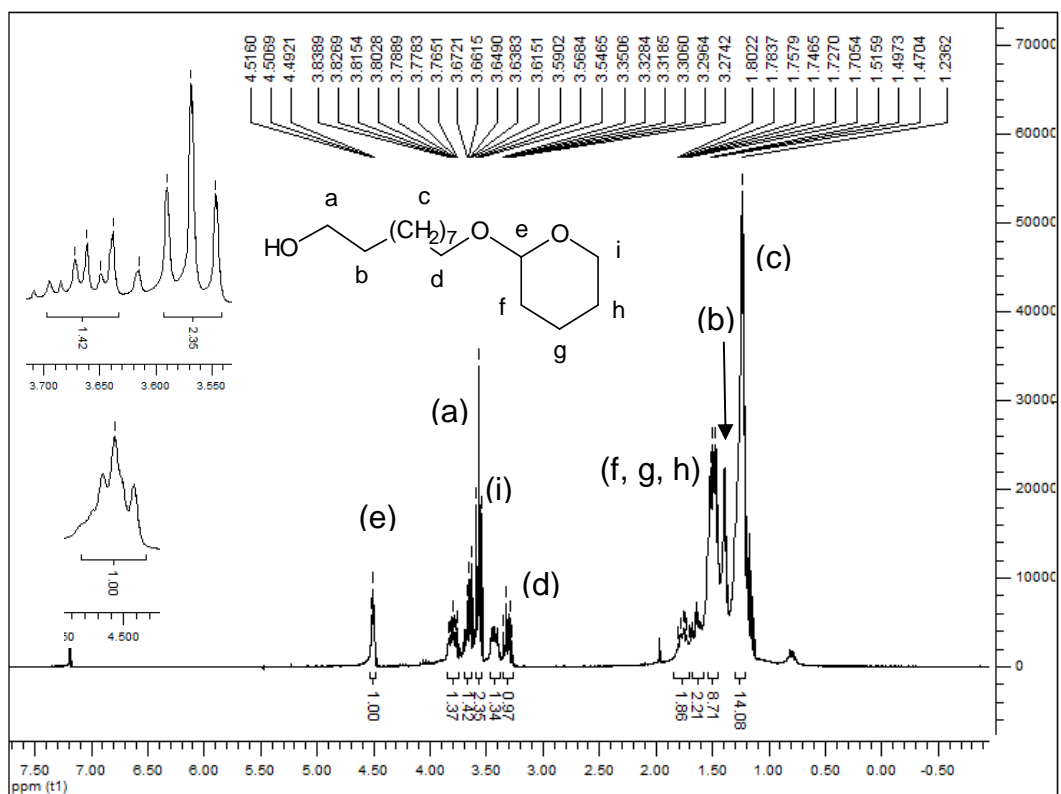
Anexo 6. Espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) de mistura dos materiais de partida (1,10-decanodiol e cloreto de benzila).



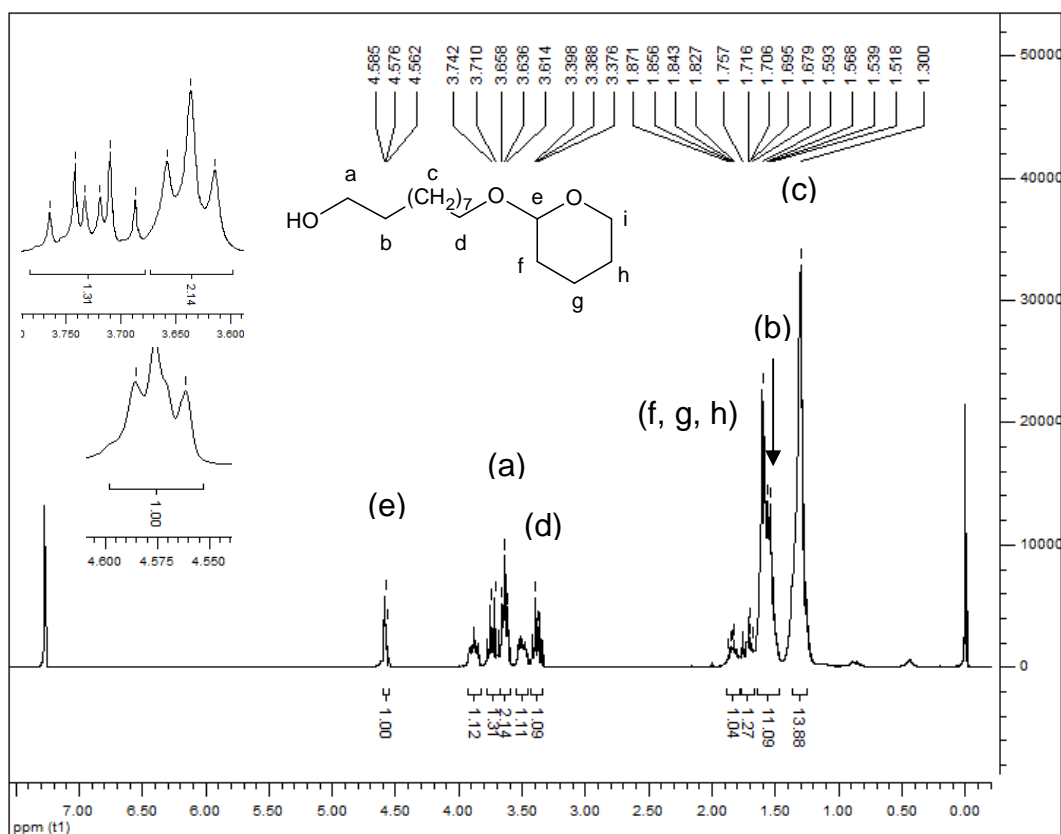
Anexo 7. Espectro de RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) do 1,10-decanodiol.



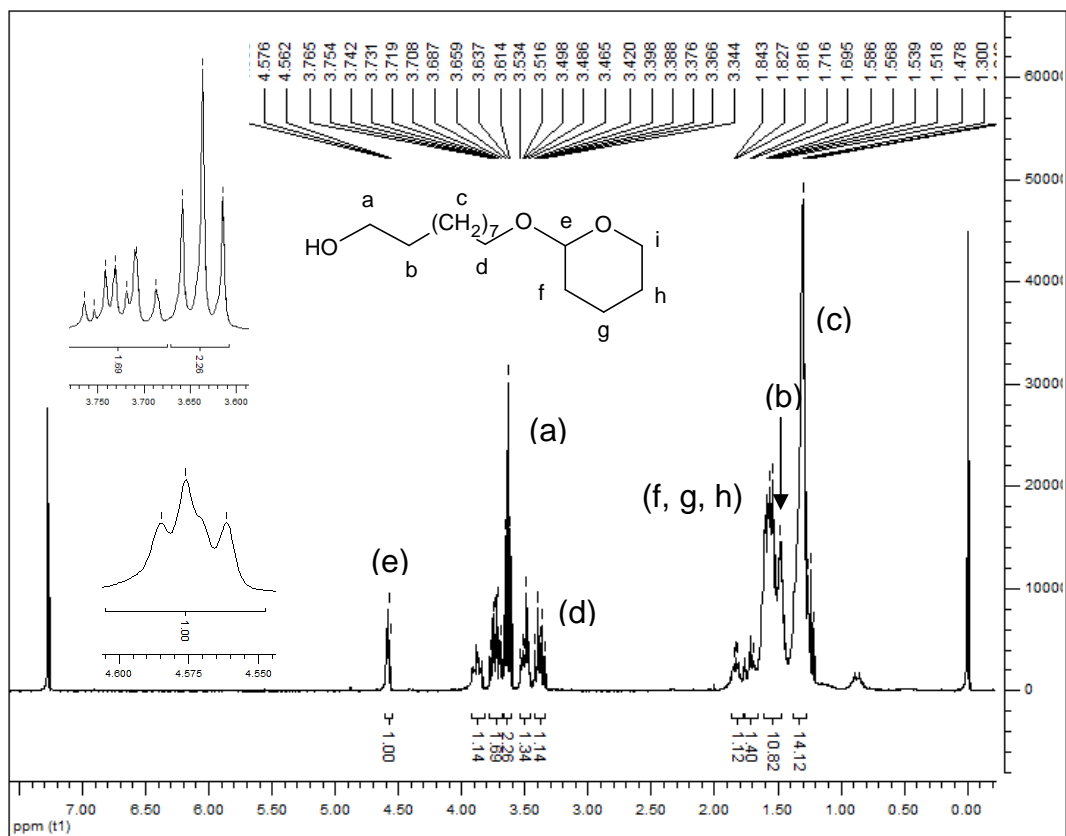
Anexo 8. Espectro de RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) do intermediário ω-hidroxidecylbenzyl éter (Va).



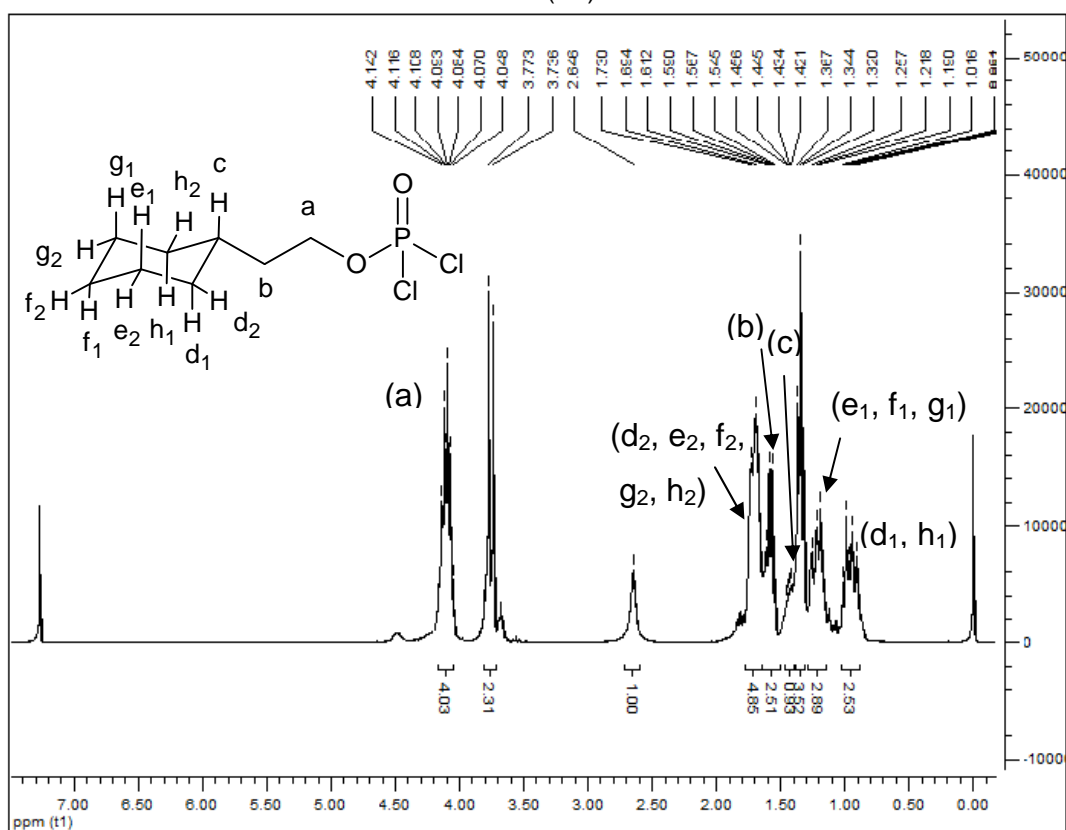
Anexo 9. Espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) do intermediário do ω -hidroxideciltetrahidropirano éter (Vb).



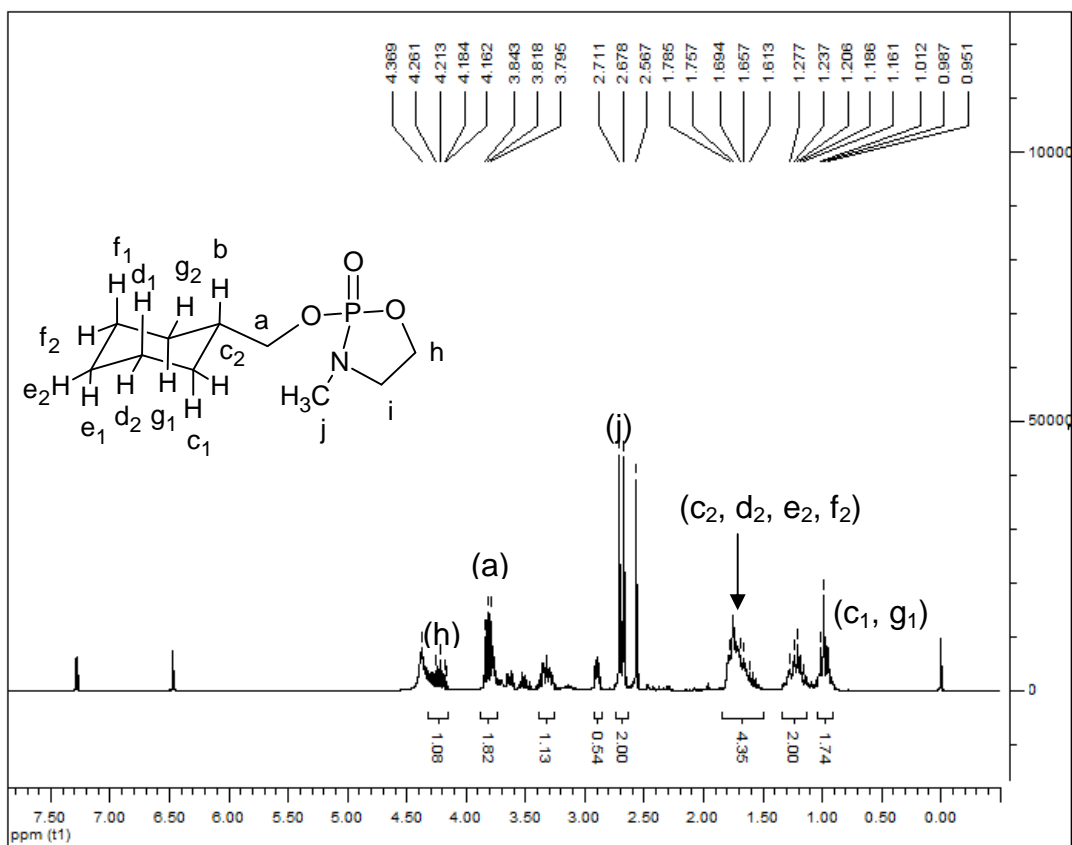
Anexo 10. Espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) do intermediário do ω -hidroxideciltetrahidropirano éter (Vb).



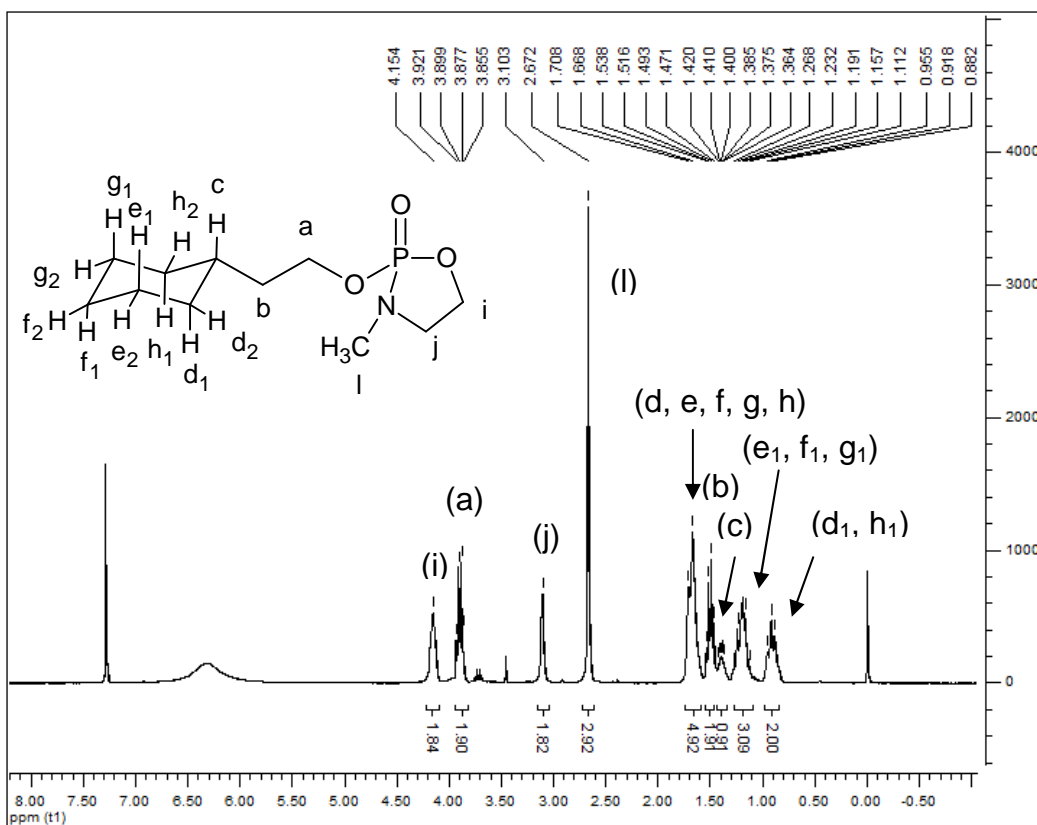
Anexo 11. Espectro de RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) do intermediário do ω-hidroxideciltetraopirano éter (Vb).



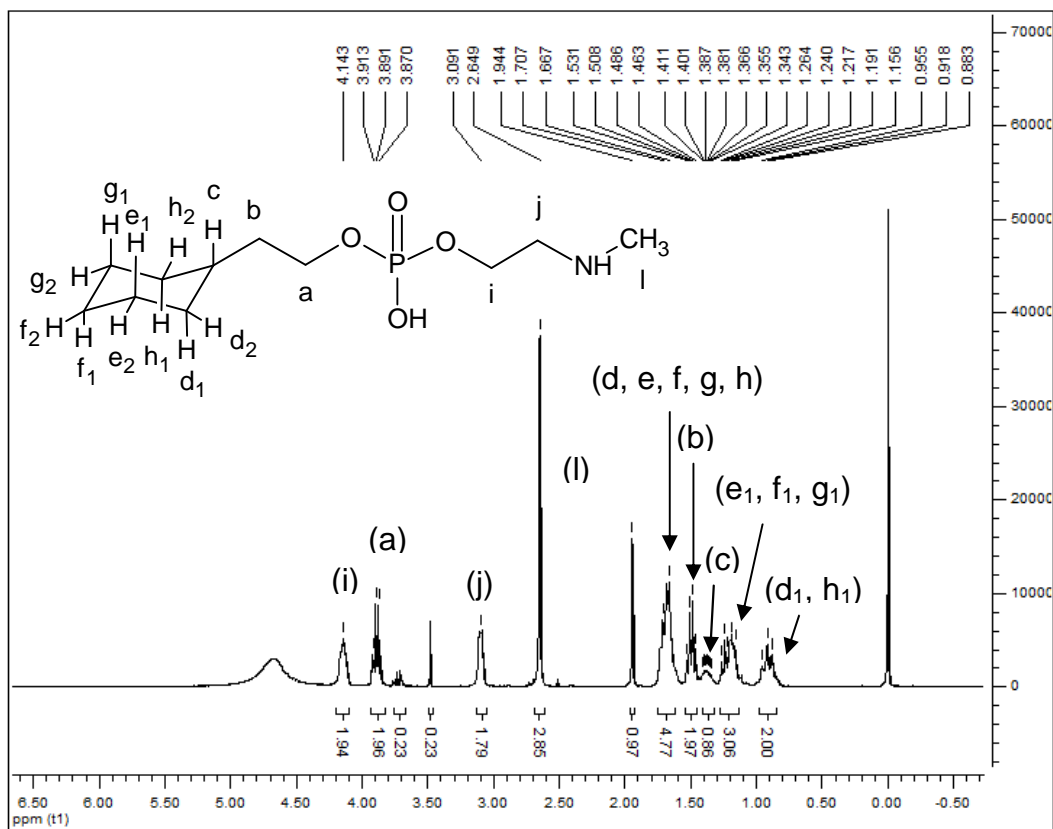
Anexo 12. Espectro de RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) do dicloreto de fosfoetilciclohexila (Ib).



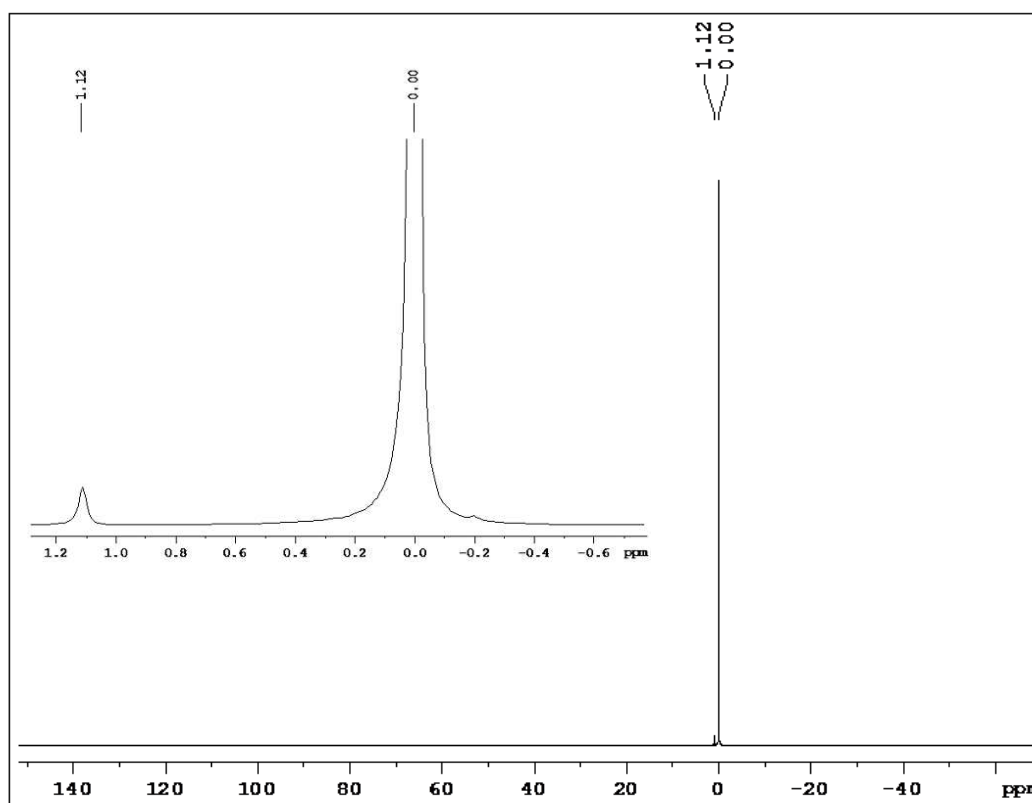
Anexo 13. Espectro de RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) 2-(cicloexilmetiloxi)-3-metil-2-oxa-1,3,2-oxazofosfolano (IIa).



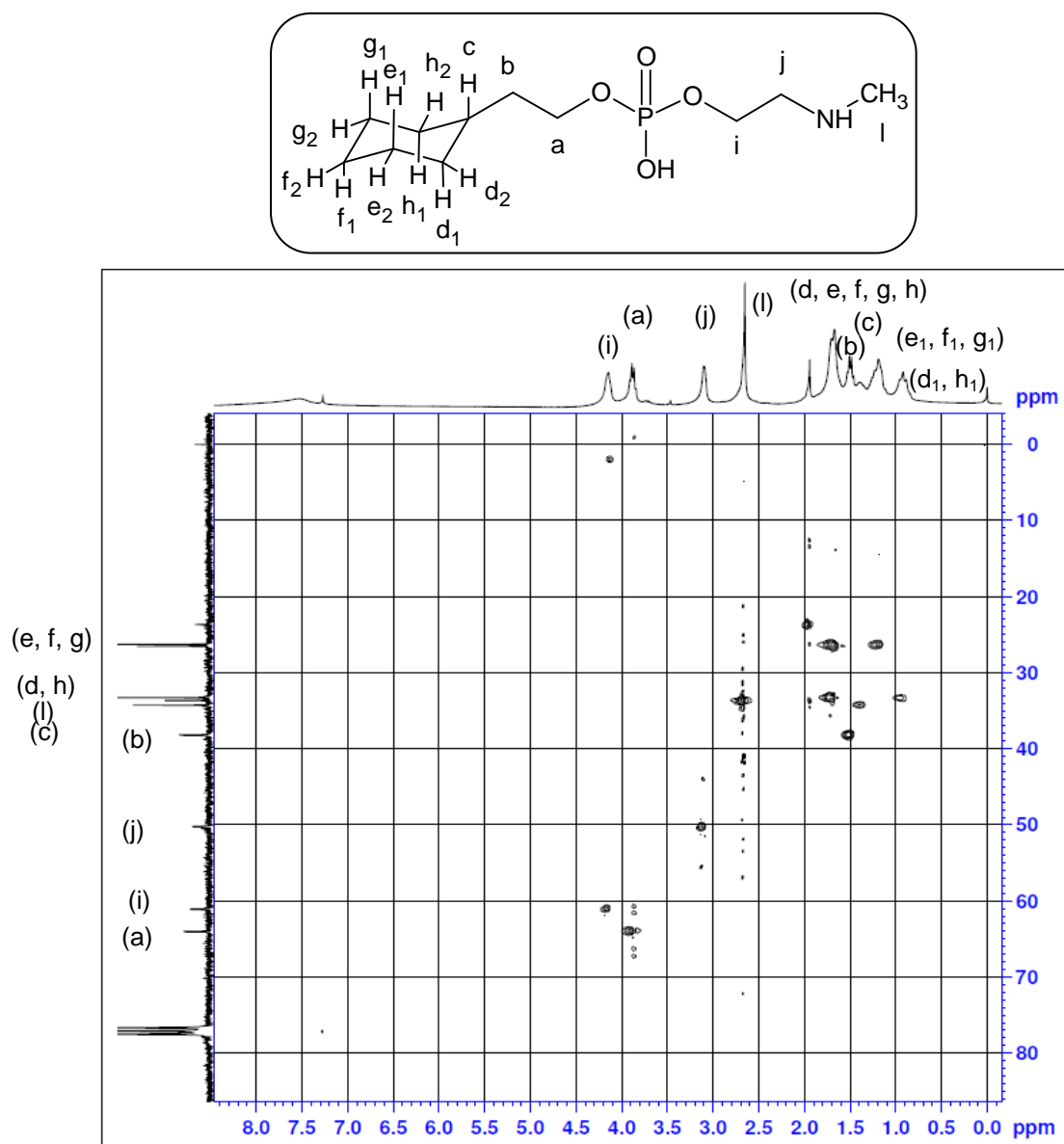
Anexo 14. Espectro de RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) do 2-(cicloexiletiloxi)-3-metil-2-oxa-1,3,2-oxazofosfolano (IIb).



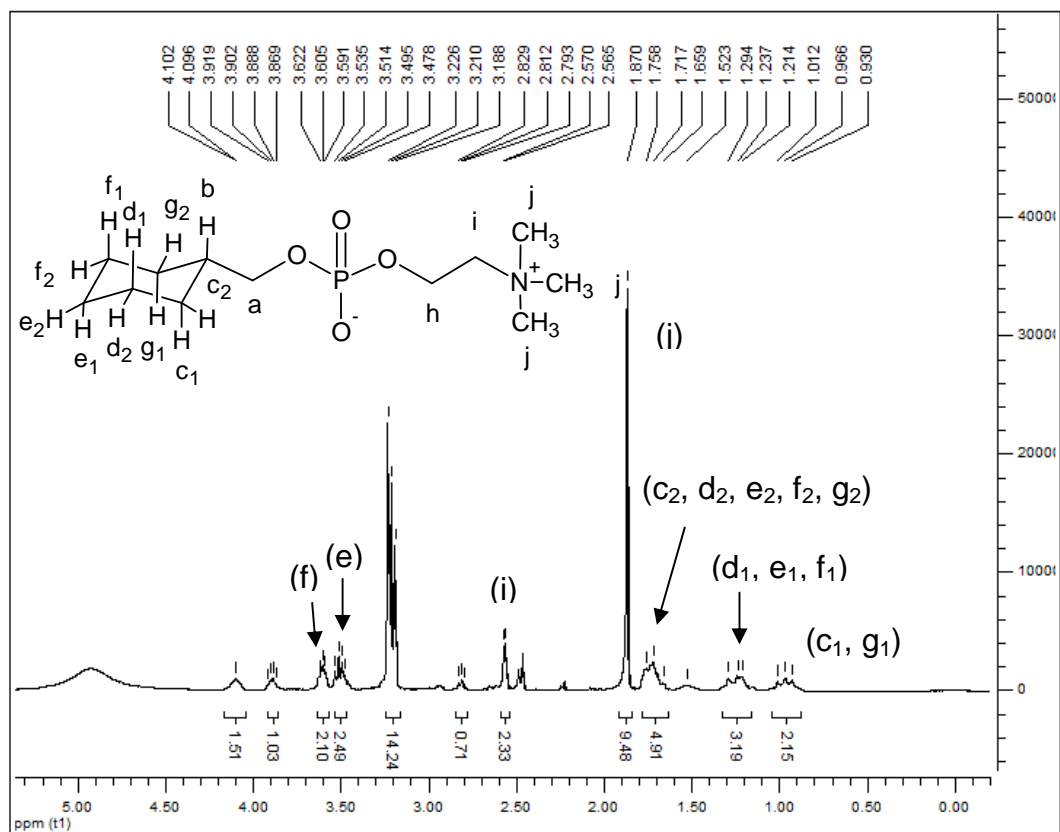
Anexo 15. Espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) do fosfato de 2-(metilamino)etil cicloexila (IIIb).



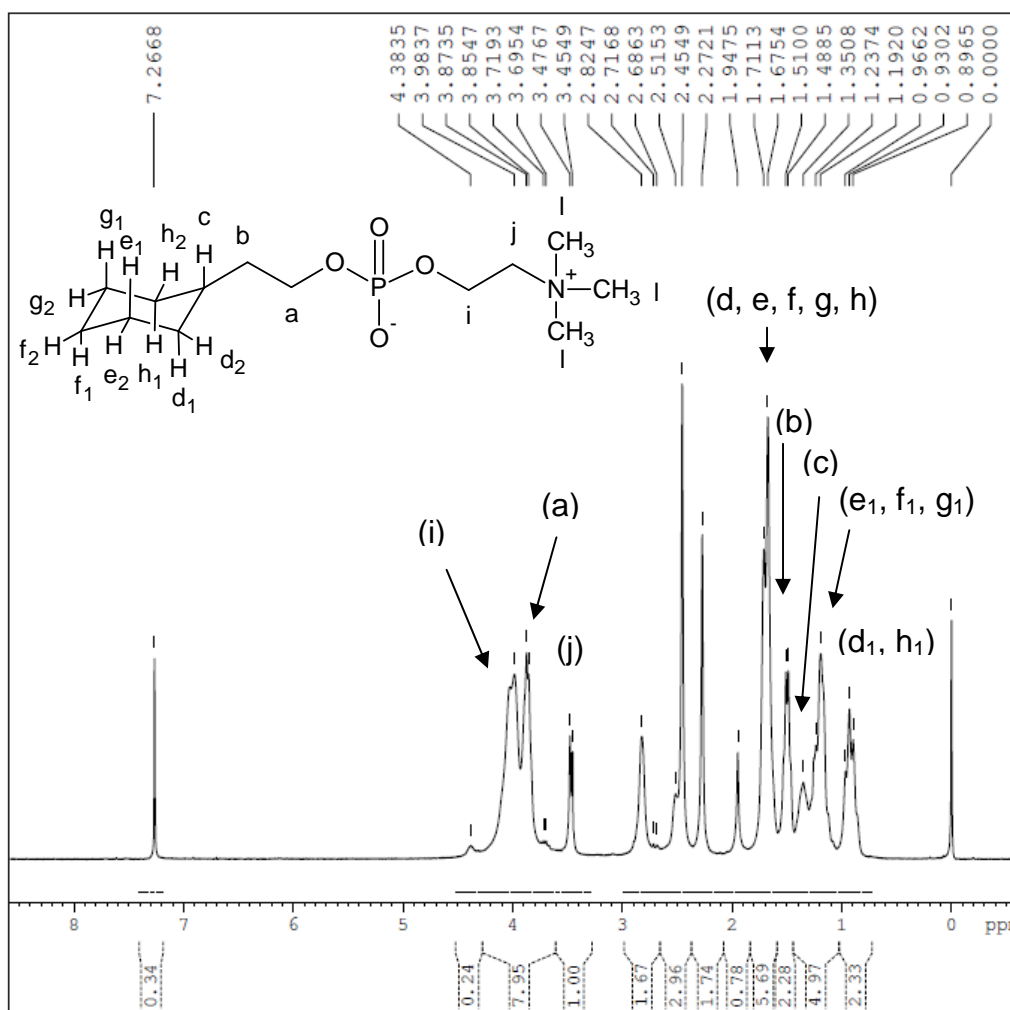
Anexo 16. Espectro de RMN ^{31}P (padrão de H_3PO_4 como referência em δ 0,0) do fosfato de 2-(metilamino)etil cicloexila (IIIb).



Anexo 17. Espectro de RMN 2D (300MHz, CDCl₃), HETCOR do fosfato de 2-(metilamino)etil cicloexila (IIIb).



Anexo 18. Espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) da metilcicloexanofosfocolina (IVa) impura.



Anexo 19. Espectro de RMN ^1H da etilcicloexanofosfocolina (IVb).