



2020

XXXI Congresso de  
Iniciação Científica  
Unicamp

## Síntese de um fosfolípido ligado a uma partícula sólida como ferramenta para a elucidação do mecanismo de ação de alquilfosfolípidios em células tumorais

**Palavras-Chave:** câncer; fosfolípidios antitumorais; edelfosina.

**Autores/as:**

Erika Silva dos Santos [Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNICAMP]

Ms. Xisto Antônio de Oliveira Neto [Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNICAMP]

Prof. Dr. Daniel Fábio Kawano [Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNICAMP]

---

### INTRODUÇÃO:

O câncer se caracteriza pela proliferação de células de maneira descontrolada e anormal. Essas células invadem os tecidos adjacentes e se espalham para outras partes do corpo, dando origem à metástase, processo que ocorre através dos sistemas linfático e sanguíneo (BACAC; STAMENKOVIC, 2008). Algumas estratégias quimioterápicas são capazes de atingir seletivamente às células cancerígenas, promovendo sua apoptose sem prejudicar as células saudáveis do organismo (MASHIMA; TSURUO, 2005). Neste contexto, a utilização de fosfolípidios antitumorais se apresenta como uma estratégia terapêutica promissora.

Um importante expoente da classe dos fosfolípidios antitumorais é a edelfosina, molécula base para a linha de pesquisa do trabalho descrito. De forma geral, existem duas teorias principais acerca do mecanismo de ação pelo qual a edelfosina desencadeia a apoptose em células tumorais. A primeira se refere a interação com os receptores de morte celular, também denominados receptores Fas (FELDERHOFF-MUESER et al., 2006), enquanto a segunda diz sobre a capacidade dos mesmos de inibir a enzima trifosfato de citidina (CTP): fosfocolina citidililtransferase (CCT), enzima essencial na via da CDP-colina (VAN DER LUIT et al., 2002).

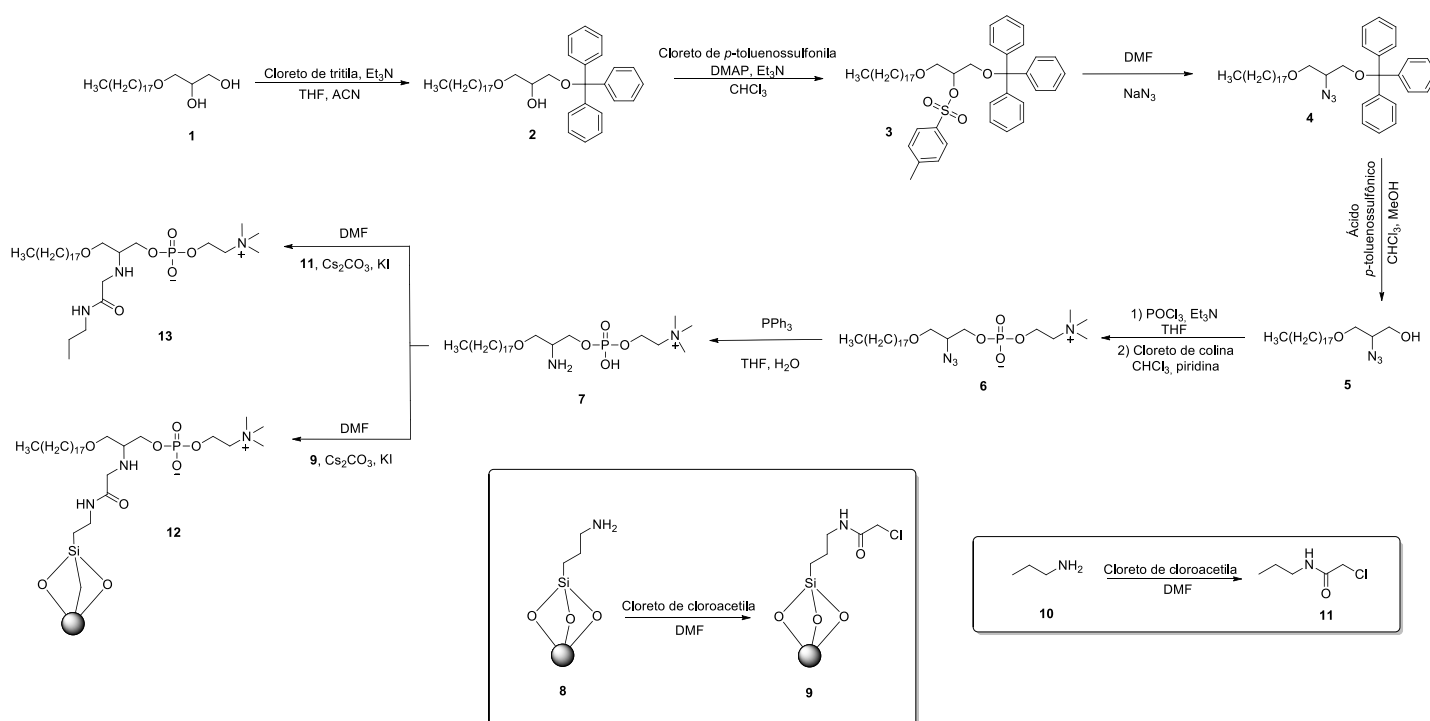
Desta forma, este trabalho propõe a síntese de um análogo da edelfosina imobilizado em uma partícula insolúvel de sílica, permitindo a interação do fosfolípido com os *lipid rafts* na membrana da célula tumorais, mas impossibilitando sua internalização para interação com a enzima CCT citosólica. No caso específico deste projeto, estes compostos seriam incubados com células tumorais, objetivando-se avaliar a ação pró-apoptótica do fosfolípido, de modo a fornecer evidências sobre qual dos dois

mecanismos propostos contribuiria mais significativamente para a atividade antitumoral. Para complementar o estudo, um composto livre de estrutura similar ao composto imobilizado seria sintetizado para servir como controle capaz de ser internalizado para consequente interação com a CCT citosólica.

## METODOLOGIA:

### 1. Síntese

A rota de síntese planejada do composto foi proposta através de trabalhos anteriores nos quais diferentes fosfolipídios, incluindo fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina foram imobilizados através do estabelecimento de ligações covalentes com a sílica gel (ONG; LIU; PIDGEON, 1996). O processo ilustrado na **Figura 1** contempla 10 etapas de síntese, sendo que apenas as três primeiras foram realizadas até o momento.



**Figura 1.** Rota para síntese dos derivados de edelfosina na forma solúvel e imobilizada em sílica.

#### 1.1 Proteção da hidroxila primária do álcool batílico

Para dar início ao protocolo foi necessário realizar a secagem do clorofórmio a ser utilizado como solvente reacional. A destilação de clorofórmio, desta forma, buscou retirar toda a água do solvente, a partir de três etapas principais: Partição do clorofórmio com água, secagem da solução com K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e destilação em Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em sistema próprio e temperatura de 60 °C (ARMAREGO; CHAI, 2009).

A síntese se deu pela adição de álcool batílico (1) (0,100 g, 0,0003 mmol) e cloreto de trietila (0,011 g, 0,0004 mmol) à 369 mL de clorofórmio anidro. Em seguida, foram adicionados 93 mL de acetonitrila e 17,75 mL de DIPEA (0,0009 mmol) à solução, a qual foi agitada a 50°C por 17 horas em condições anidras, ou seja, em atmosfera inerte (KOVALEVSKI et al., 2010).

O processo de purificação iniciou-se com uma cristalização em éter de petróleo, buscando retirar as impurezas mais apolares. Em seguida, uma cristalização em etanol buscava retirar impurezas polares, como o álcool batílico em excesso.

## **1.2 Tosilação da hidroxila secundária do álcool batílico monotritilado**

Para utilização do cloreto de tosila (ou cloreto de p-toluenossulfonila) foi necessária sua purificação, visando remover produtos de degradação como o ácido tósico e o ácido clorídrico. A purificação do cloreto de tosila foi feita pela dissolução de 10 g em volume mínimo de clorofórmio (25 mL). Em seguida, a solução foi filtrada e diluída com cerca de 125 mL de éter de petróleo para precipitação das impurezas. Por fim, a solução obtida foi clarificada com carvão ativado e evaporada resultando no cloreto de tosila puro (ARMAREGO; CHAI, 2009).

Em seguida, para iniciar a tosilação, preparou-se uma solução do intermediário **2** (3,380 g, 0,0060 mmol) e DMAP (0,070 g, 0,0006 mmol) em 16,9 mL de diclorometano e, em seguida, adicionou-se a trietilamina (2,848 mL, 0,0280 mmol). A solução foi resfriada a 0°C para permitir a adição do cloreto de tosila (3,853 g, 0,0200 mmol) de maneira gradual. Por fim, a reação foi agitada em temperatura ambiente durante 12 horas. A purificação do produto obtido na reação se deu a partir de uma partição em éter etílico e brine, seguida de uma cristalização em etanol, uma vez que cloreto de tosila é altamente solúvel em etanol, enquanto o produto final apresenta uma baixa solubilidade no mesmo solvente, dada a sua cadeia alquílica longa (MANZO et al., 2011).

## **1.3 Substituição da posição dois do glicerol por uma azida**

A reação de substituição se deu pela adição de 0,442 g (0,0068 mmol) de azida de sódio a uma solução contendo 1,268 g (0,0017 mmol) do intermediário **3** em 16 mL de DMF. A solução foi agitada a 110 °C por 24 horas em refluxo (MANZO et al., 2011).

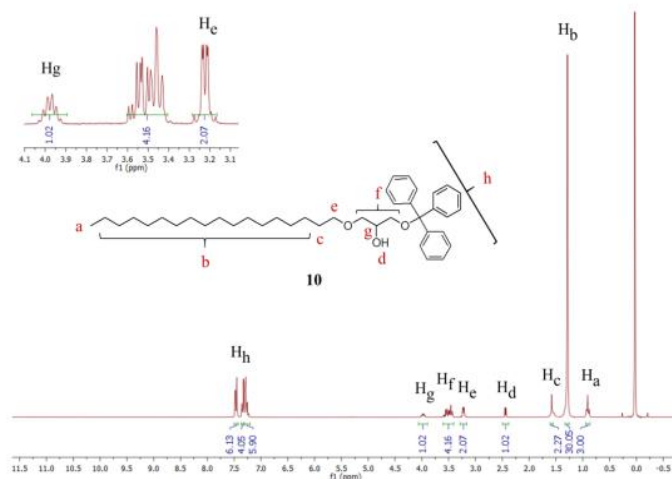
A purificação do produto foi feita através de uma cristalização em acetona e água, a qual buscou retirar o excesso de NaN<sub>3</sub> presente na solução final. No entanto, a partir das análises por cromatografia em camada delgada analítica realizadas, ficou claro que a cristalização não é capaz de retirar totalmente a azida de sódio da solução. Assim, foi realizada uma partição em água e hexano, uma vez que a azida de sódio permanece na água e o produto apresenta muita afinidade pelo hexano. Por fim, para obter o produto final, foi realizada uma última cristalização em etanol para retirar as outras impurezas presentes.

# **RESULTADOS E DISCUSSÃO:**

## **2.1 Proteção da hidroxila primária do álcool batílico**

A primeira reação partiu de 0,100 g de **1** e obteve um rendimento final de 10,8%, com uma massa total de 0,011 g de produto. Após o tempo de reação, a solução resultante foi filtrada para retirar os sais de DIPEA existentes. Em seguida, o líquido obtido foi rotaevaporado, dando origem a um óleo marrom, o qual seguiu para as etapas de cristalização subsequentes, objetivando a purificação do produto. Ao todo foram executadas duas cristalizações, sendo a primeira em éter de petróleo e a segunda em etanol.

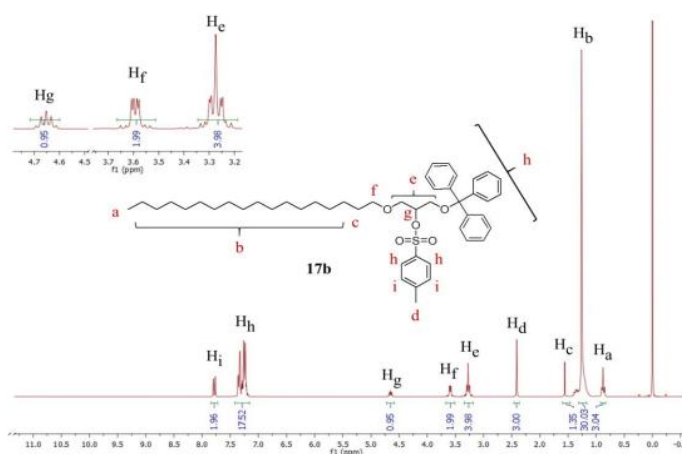
De uma forma geral, os processos obtiveram o resultado esperado, dando origem a um produto final 2 puro, como pode ser observado no espectro de RMN da **Figura 2** ( $R_f$  0,45, éter de petróleo/éter etílico, 5:1, v/v). O baixo rendimento da reação se deve, provavelmente, a baixa eficiência nos procedimentos de purificação do produto, as quais consistem, em sua maioria, de cristalizações.



**Figura 2.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 1 (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

#### 1.4 Tosilação da hidroxila secundária do álcool batílico monotritilado

Após a reação, o produto obtido foi purificado através de uma partição em éter etílico e brine. O cloreto de tosilato excedente e o produto **3** permaneceram na fase orgânica, enquanto a trietilamina e o DMAP na fase aquosa. Em seguida foi realizada uma cristalização em etanol, uma vez que cloreto de tosilato é altamente solúvel em etanol, enquanto o produto final apresenta uma baixa solubilidade no mesmo solvente, dada a sua cadeia alquílica longa. Esta cristalização gerou 2,537 g (69,3% de rendimento) do composto **3**, cuja caracterização estrutural está disposta na **Figura 3** ( $R_f$  2 0,46, hexano/éter etílico 4:1 v/v).



**Figura 3.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **3** (250 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

#### 1.1 Substituição da posição dois do glicerol por uma azida

Ao final da reação e purificação por cristalizações e partição, foi obtida uma massa total de 0,865 g de produto (**Figura 4**), correspondendo a 82,9% de rendimento. O rendimento obtido na reação foi

satisfatório e a perda provavelmente ocorreu no processo de purificação.

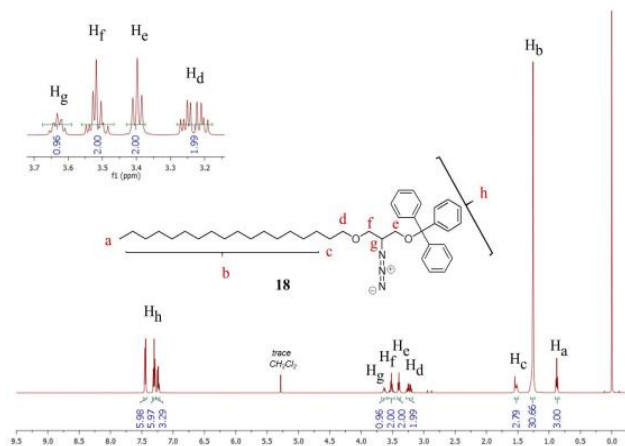


Figura 4. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de 4 (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

## CONCLUSÕES:

Três etapas da rota de síntese foram padronizadas e seus intermediários caracterizados por RMN <sup>1</sup>H. Existem aspectos a serem otimizados, tal como a etapa de proteção da hidroxila primária do álcool batílico, visto que o rendimento de 10,8% não é satisfatório. Para isso, faz-se necessário revisar protocolos de síntese e purificação dos compostos, a fim de aprimorar os rendimentos obtidos.

Apesar do projeto ter sido interrompido em março de 2023, os resultados aqui descritos podem servir como ponto de partida caso o mesmo volte a ser desenvolvido dentro do grupo de pesquisa. Vale ressaltar a importância do mesmo na avaliação da eficácia dos fosfolípidios antitumorais como indutores da apoptose em células cancerígenas, sendo uma estratégia terapêutica promissora no combate ao câncer.

---

## BIBLIOGRAFIA

- ARMAREGO, W. L. F.; CHAI, C. **Purification of Laboratory Chemicals**. 6ed. ed. Butterworth-Heinemann - Elsevier, 2009.
- BACAC, M.; STAMENKOVIC, I. Metastatic Cancer Cell. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 3, n. 1, p. 221–247, 1 fev. 2008.
- FELDERHOFF-MUESER, U. et al. Fas/CD95/APO-1 Can Function as a Death Receptor for Neuronal Cells in Vitro and in Vivo and is Upregulated Following Cerebral Hypoxic-Ischemic Injury to the Developing Rat Brain. **Brain Pathology**, v. 10, n. 1, p. 17–29, 5 abr. 2006.
- KOVALEVSKI-ISHAI, E.; ZINIUK, Z.; HALPERIN, G.; MENDEL, I.; FEIGE, E.; YACOV, N.; BREITBART, E. **Oxidized lipid compounds and uses thereof**. WO n. WO2010/052718 A1, 14 maio 2010.
- MANZO, E.; CARBONE, M.; MOLLO, E.; IRACE, C.; DI PASCALE, A.; LI, Y.; CIAVATTA, M. L.; CIMINO, G.; GUO, Y. W.; GAVAGNIN, M. Structure and synthesis of a unique isonitrile lipid isolated from the marine mollusk *actinocyclus papillatus*. **Organic Letters**, v. 13, n. 8, p. 1897–1899, 2011.
- MASHIMA, T.; TSURUO, T. Defects of the apoptotic pathway as therapeutic target against cancer. **Drug Resistance Updates**, v. 8, n. 6, p. 339–343, dez. 2005.
- ONG, S.; LIU, H.; PIDGEON, C. Immobilized-artificial-membrane chromatography: measurements of membrane partition coefficient and predicting drug membrane permeability. **Journal of Chromatography A**, v. 728, n. 1–2, p. 113–128, mar. 1996
- VAN DER LUIT, A. H. et al. Alkyl-lysophospholipid Accumulates in Lipid Rafts and Induces Apoptosis via Raft-dependent Endocytosis and Inhibition of Phosphatidylcholine Synthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 42, p. 39541–39547, out. 2002.