OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS REACIONAIS NA SÍNTESE DE GLICEROFOSFOLIPÍDIOS

Palavras-Chave: Glicerofosfolipídios, Fosfolipídios, Fosfocolina.

Autores(as):

Maria Carolina Santos Gomes, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNICAMP

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

Prof. Dr. Daniel Fábio Kawano (orientador), Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

Os lipídios constituem uma classe diversa de macromoléculas cuja principal característica é a hidrofobicidade (ou anfipaticidade, em alguns casos) (COCKCROFT, 2021). São componentes essenciais das membranas celulares, com funções que incluem armazenamento de energia, sinalização e regulação estrutural (HUBLER; KENNEDY, 2016). Dentre os lipídios, os glicerofosfolipídios são os mais abundantes nas membranas e se destacam pela presença de um grupo fosfato ligado ao esqueleto de glicerol. A dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) é um exemplo clássico desse grupo, composta por duas cadeias acílicas e um grupo fosfocolina na posição *sn-3* do glicerol (BOGOJEVIC et al., 2022).

A fosfocolina, por sua vez, é um grupo polar que confere caráter anfipático aos glicerofosfolipídios, favorecendo sua organização em bicamadas lipídicas e facilitando interações com proteínas de membrana. Essas propriedades estruturais são fundamentais para o papel dos fosfolipídios em processos como formação de vesículas, transporte de fármacos e reconhecimento molecular em sistemas biológicos (WANG; TONTONOZ, 2019). Devido a estas características, estruturas contendo fosfocolina têm sido amplamente exploradas em formulações farmacêuticas, na biocompatibilização de materiais e no desenvolvimento de agentes terapêuticos (ONTONG et al., 2024).

No entanto, a síntese química de glicerofosfolipídios, especialmente a etapa de inserção da fosfocolina, ainda enfrenta desafios significativos. Protocolos tradicionais frequentemente recorrem a reagentes tóxicos, instáveis e de difícil manuseio, como oxicloretos e solventes clorados (BONJOUKLIAN; PHILLIPS, 1987; NORTH et al., 2009; VRIEZE et al., 2015).

Além disso, a baixa solubilidade de compostos contendo fosfocolina em solventes orgânicos compromete o rendimento das reações e dificulta a purificação dos produtos (FURUTA et al., 2009). Dessa forma, este projeto propôs a padronização de uma rota sintética curta e eficiente para a síntese de fosfatidilcolinas, utilizando como modelo a inserção do grupo fosfocolina em um derivado protegido de glicerol, visando à síntese da DPPC.

METODOLOGIA:

A rota sintética delineada, representada na **Figura 1**, tem início a partir do composto comercial 2,2-Dimetil-1,3-dioxolano-4-metanol-p-toluenossulfonato (**1**), o qual foi submetido a reações de substituição nucleofílica

bimolecular (SN2) no carbono *sn-3*, sob diferentes condições reacionais, utilizando sais de fosforilcolina como fonte do grupo fosfocolina (KNOPIK; BRUZIK; STEC, 1991; GONTIJO et al., 2015). A partir dessa etapa, o intermediário (**2**) seria tratado com meio ácido para promover à clivagem do grupo isopropilideno, originando o composto **3**. As hidroxilas livres presentes nesse intermediário seriam tão funcionalizadas de forma simétrica por meio de reações de esterificação com cloreto de palmitoíla, resultando na formação da dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC).

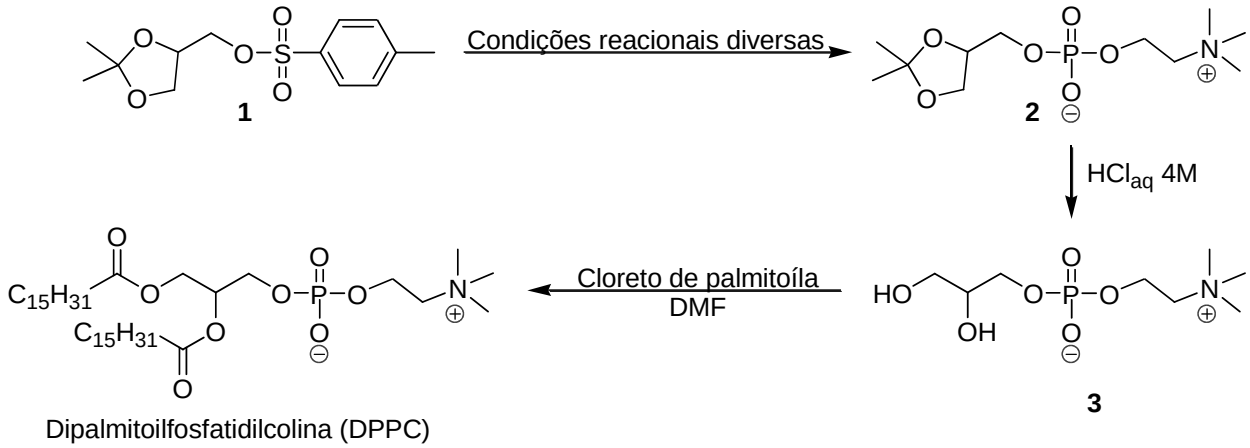

***Figura 1**. Rota proposta para síntese de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC).*

Inicialmente, foi realizada a troca de íon do sal de cálcio de cloreto de fosforilcolina (1g, 3,88 mmol), sendo esse tratado com solução aquosa de ácido oxálico (0,384 g, 4,27 mmol em 2,7 mL de água), o oxalato de cálcio formado foi removido por filtração a vácuo. Em seguida, hidróxido de tetrabutilamônio (TBAH) foi adicionado ao filtrado até atingir pH 9. O solvente foi então completamente removido por evaporação rotativa a vácuo, seguido da secagem do intermediário em dessecador a vácuo com pentóxido de fósforo (P_2O_5).

Posteriormente, o sal de tetrabutilamônio obtido (0,435 g, 0,63 mmol) e o reagente comercial **1** (0,150 g, 0,524 mmol) foram solubilizados em 3 mL de acetonitrila anidra e permaneceram sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas, seguido de 5 horas em refluxo. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) de sílica, sendo a fase móvel clorofórmio (CH_3Cl), metanol (MeOH) e água (H_2O) (65:24:4, v/v/v), e revelação com reagente de Dragendorff, seletivo para aminas terciárias e quaternárias.

O tratamento da reação foi iniciado por partição em CH_3Cl, MeOH e H_2O, na proporção 3:4:3 (v/v/v). Em seguida, diferentes métodos de purificação foram avaliados. Inicialmente, foi empregada cromatografia em coluna clássica (CCC) com sílica como fase estacionária. A eluição foi realizada com aumento gradual da polaridade da fase móvel, começando com CH_3Cl e MeOH (10:1), passando por CH_3Cl, MeOH (65:24) e finalizando com CH_3Cl, MeOH e H_2O (65:24:4). Como os resultados foram insatisfatórios, testou-se a mesma técnica utilizando alumina como fase estacionária, com CH_3Cl, MeOH (50:1) como fase móvel, com aumento gradual da polaridade da fase móvel.

Na tentativa seguinte, foi realizada filtração em coluna de sílica, iniciando a eluição com diclorometano (DCM) puro, seguido por DCM e MeOH nas proporções 9:1 e posterior aumento da polaridade. Como o composto de interesse permaneceu retido na fase estacionária, adotou-se, por fim, uma estratégia baseada em troca iônica. Para isso, a mistura de reação foi submetida a partição entre DCM e água, com adição gradual de iodeto de potássio (KI) até que fosse observada a separação do produto e das impurezas entre as fases.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Durante a reação de inserção da fosfocolina, não foi possível monitorar a formação do produto por CCDA, dado que o R_f esperado para o produto e do sal de fosforilcolina empregado na reação eram semelhantes. Ainda assim, observou-se o consumo quase completo do material de partida tosilado (**1**), sugerindo a formação do produto e permitindo o início do processo de purificação. Após a remoção completa do solvente e realização de uma partição em CH_3Cl, MeOH e H_2O (3:4:3), foi possível perceber a presença de um composto de R_f = 0,3, possivelmente se tratando do produto **2** desejado (indicado como **P** na **Figura 2)**. No entanto, também foi identificada uma impureza majoritária (**I**), de R_f superior ao suposto produto e maior intensidade durante revelação por reagente de Dragendorff.

Figura 2. *Análise por CCDA de sílica das frações aquosa e orgânica obtidas após partição em CH_3Cl, MeOH e H_2O (3:4:3) da reação entre **1** e **2**, as setas indicam a localização da principal impureza (**I**), até então de estrutura desconhecida, e do possível produto (**P**).*

Considerando a grande diferença nos valores de R_f entre o suposto produto (**P**) e a impureza (**I**) decidiu-se por empregar o método de CCC em sílica para obtenção do produto puro. Apesar de ser possível realizar a eluição da impureza **I** de acordo com o esperado, o produto **P** jamais foi eluido, mesmo após empregadas fases móveis com altas concentrações de MeOH e H_2O.

Hipotetizou-se que o grupo isopropilideno foi clivado durante o contato prolongado com a sílica, cujo caráter ácido seria responsável pela clivagem, gerando um derivado mais polar pela presença de hidroxilas livres. Os grupos hidroxila formados, somados ao caráter altamente polar do grupo fosfocolina, poderiam intensificar a interação com os grupos silanol da fase estacionária por meio de ligações de hidrogênio, tornando sua eluição inviável mesmo com a aplicação de fases móveis altamente polares.

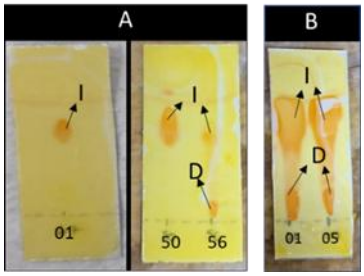

Figura 3. *Placas de CCDA das frações coletadas da CCC em alumina, reveladas com Dragendorff. As setas indicam a localização da impureza **I** e de um possível produto de degradação **D**. **(A)** CCDAs realizadas no momento da coleta das frações. **(B)** CCDA realizada após algumas horas de repouso das frações. Fase móvel utilizada: CH_3Cl:MeOH:H_2O (65:24:4)*

Como forma de impedir a suposta clivagem do grupo isopropilideno pela sílica, uma CCC com alumina neutra e fase móvel de CH_3Cl e MeOH (50:1) foi proposta. Análises por CCDA das frações obtidas a partir da CCC de alumina revelaram a eluição de um composto com R_f similar a **P**. No entanto, análises posteriores por CCDA revelaram que o composto detectado era, na verdade, um produto de degradação da impureza **I**, que surgia gradativamente em qualquer fração que contivesse a impureza em questão (**Figura 3**). Apesar de existirem evidências na literatura que diversas reações podem acontecer em superfícies de alumina (POSNER, 1978), não foram encontrados estudos que esclareçam especificamente o tipo de degradação sofrida por **I**.

Como alternativa à CCC em sílica, a filtração em sílica foi proposta seguindo uma lógica similar, já que o tempo de contato entre a amostra e a superfície de sílica reduzido poderia significar o impedimento ou redução da suposta clivagem do isopropilideno. No entanto, os resultados foram semelhantes à CCC em sílica, com a impossibilidade de eluição de **P**, mesmo em fases móveis altamente polares.

A estrutura de **I** foi então investigada. Considerando os reagentes utilizados, postulou-se que se tratava do sal de tosila do tetrabutilamônio (TBATs), formado pela combinação do cátion de tetrabutilamônio (TBA^+) com o grupo tosilato liberado do material de partida (**1**). A fim de averiguar a hipótese, foi realizado um teste empregando reagentes comerciais, o cloreto de tetrabutilamônio (TBACl) foi particionado em água e diclorometano (DCM), seguida pela adição de ácido p-toluenossulfônico para promover a troca do íon e formar o TBATs. Análises por CCDA das fases orgânica e aquosa confirmaram que o produto gerado apresentava R_f e coloração em reagente de Dragendorff similares à **I**, como pode ser observado na **Figura 4.** Adicionalmente, a partir do isolamento de **I** e

posterior análise por ressonância magnética nuclear de prótons (H^1 RMN), foi possível identificar que a impureza se tratava de um derivado de TBA.

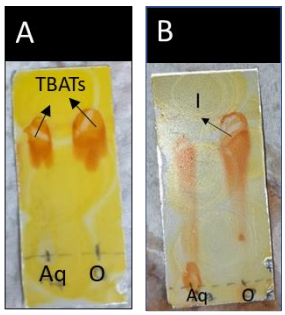

Figura 4. *Placas de CCDA de sílica reveladas em Dragendorff. Fase móvel: CH_3Cl:MeOH:H_2O (65:24:4).* ***(A)*** *Placa de CCDA das frações aquosa e orgânica de partição do sal TBATs gerado.* ***(B)*** *Placa de CCDA das frações aquosa e orgânica durante partição do bruto reacional*

Para superar as limitações de purificação enfrentadas até então, foi proposta uma nova estratégia baseada na troca iônica entre o cátion TBA^+ e íons iodeto, com base em um trabalho publicado por Fox e Qiu (2020). O TBAI, formado *in situ*, permanece preferencialmente na fase orgânica em partições entre diclorometano e água (**Figura 5**), enquanto compostos mais polares, como o produto (**P**), permaneceriam na fase aquosa, viabilizando seu isolamento.

Figura 5*. Análise por CCDA de sílica das frações aquosa (Aq) e orgânica (O) do sal TBAI comercial. Revelação em Dragendorff. Fase móvel: CH_3Cl:MeOH:H_2O (65:24:4).*

Dessa forma, a proposta de purificação consistiu na manutenção da primeira etapa de tratamento, com partição em $CHCl_3$, MeOH e água (3:4:3), seguida da evaporação da fase orgânica. Em seguida, o sólido resultante foi submetido a uma segunda partição entre água e DCM, com adição progressiva de pequenas quantidades de iodeto de potássio (KI), almejando a completa migração de **I** para a fase orgânica, enquanto **P** permaneceria na fase aquosa.

A estratégia de troca iônica com KI revelou-se ineficaz na prática. Após a adição de KI e realização da nova partição, a mancha anteriormente atribuída ao produto (**P**) deixou de ser visualizada, como exposto na **Figura 6**. Esse desaparecimento pode indicar a degradação ou alteração estrutural do composto, mas também evidencia uma limitação crítica: ainda não se sabe com certeza se a mancha inicialmente atribuída a **P** corresponde, de fato, ao produto da reação. Dada essa incerteza, torna-se inviável prever com segurança como o composto se comportará frente à presença de iodeto.

Figura 6. *Análise por CCDA de sílica das frações aquosa (Aq) e orgânica (O) da partição em H_2O e DCM adicionado de KI, revelando o desaparecimento de* ***P****. Revelação em Dragendorff. Fase móvel: CH_3Cl:MeOH:H_2O (65:24:4).*

CONCLUSÕES:

A padronização de uma rota sintética para inserção do grupo fosfocolina em glicerofosfolipídios mostrou-se particularmente desafiadora nas etapas de purificação do intermediário (**2**). Apesar da evidência indireta da formação do composto-alvo, as tentativas de isolamento por cromatografia em sílica e alumina foram comprometidas por degradação ou retenção excessiva dos compostos de interesse. A identificação da impureza majoritária como o sal de tetrabutilamônio com tosilato (TBATs) permitiu o delineamento de uma estratégia racional de purificação baseada em troca iônica com iodeto. No entanto, essa abordagem não resultou na recuperação do

produto, evidenciando limitações associadas à incerteza estrutural do intermediário formado. Ainda assim, os resultados obtidos indicam a viabilidade da reação de inserção e fornecem uma base sólida para futuras otimizações nas etapas de separação e caracterização. A continuidade do trabalho será direcionada à confirmação estrutural do intermediário através de novos protocolos de reação, como o emprego de éteres de coroa na síntese, visando subsequente purificação para conclusão da síntese da DPPC.

BIBLIOGRAFIA

BIAN, C. C.; LI, Y. Q.; YANG, H.; YU, X. M. Scalable, Stereocontrolled, Total Synthesis of Carolacton. **Synthesis**, v. 55, n. 20, p. 3349–3363, 2023.

BOGOJEVIC, O.; NYGAARD, J. V.; WIKING, L.; AREVÅNG, C.; GUO, Z. Designer phospholipids – structural retrieval, chemo-/bio- synthesis and isotopic labeling. **Biotechnology Advances**, v. 60, e108025, 2022.

BONJOUKLIAN, R.; PHILLIPS, M. L. 2-Alkoxy-1-alkoxy phosphoryl dichlorides. US n. 4659859 A, 21 Abril 1987.

COCKCROFT, S. Mammalian lipids: structure, synthesis and function. **Essays in Biochemistry**, v. 65, n. 5, p. 813–845, 2021.

FOX, R. J.; QIU, J. General User Guide for Partitioning of Tetraalkylammonium and Tetraalkylphosphonium Salts: Impacts of Cation, Anion, and Solvent. **Organic Process Research and Development**, v. 24, n. 2, p. 235-241, 2020.

FURUTA, T.; ONUKI, H.; MOCHIZUKI, M.; ITO, M.; INAI, M.; WAKIMOTO, T.; KAN, T. Solid-Supported Synthesis of Artificial Phospholipids. **Synlett**, v. 2009, n. 20, p. 3373–3377, 2009.

GONTIJO, V. S.; ESPURI, P. F.; ALVES, R. B.; DE CAMARGOS, L. F.; DOS SANTOS, F. V.; DE SOUZA JUDICE, W. A.; MARQUES, M. J.; FREITAS, R. P. Leishmanicidal, antiproteolytic, and mutagenic evaluation of alkyltriazoles and alkylphosphocholines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, p. 24–33, 2015.

HUBLER, M. J.; KENNEDY, A. J. Role of lipids in the metabolism and activation of immune cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 34, p. 1–7, 2016.

KNOPIK, P.; BRUZIK, K. S.; STEC, W. J. An improved synthesis of 6-(O-phosphorylcholine)hydroxyhexanoic acid. **Organic Preparations and Procedures International**, v. 23, n. 2, p. 214–216, 1991.

NORTH, E. J.; OSBORNE, D. A.; BRIDSON, P. K.; BAKER, D. L.; PARRILL, A. L. Autotaxin structure–activity relationships revealed through lysophosphatidylcholine analogs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 9, p. 3433–3442, 2009.

ONTONG, J. C.; SINGH, S.; SIRIYONG, T.; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. Transferosomes stabilized hydrogel incorporated rhodomyrtone-rich extract from Rhodomyrtus tomentosa leaf fortified with phosphatidylcholine for the management of skin and soft-tissue infections. **Biotechnology Letters**, v. 46, n. 1, p. 127–142, 2024.

POSNER, G. H. Organic Reactions at Alumina Surfaces. **Angewandte Chemie International Edition in English**. v. 17, n. 7, p. 487-496, 1978.

VRIEZE, M., JANSSENS, P., SZUCS, R., VAN DER EYCKEN, J., & LYNEN, F. Synthesis of a phosphocholine based lipid for improved micellar LC based in vitro predictions of human intestinal absorption and blood-brain barrier partitioning. **In High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 42nd International symposium, Abstracts**. Geneva, Switzerland, 2015.

WANG, B.; TONTONOZ, P. Phospholipid Remodeling in Physiology and Disease. **Annual Review of Physiology Annu. Rev. Physiol.**, v. 81, p. 165–188, 2019.

WANG, R.; CHEN, S.; CHEN, Q.; GUO, H.; YANG, F. Porphyrin with circularly polarized luminescence in aggregated states. **Dyes and Pigments**, v. 190, e109332, 2021.