SÍNTESE DO ÁCIDO 5-AMINOLEVULÍNICO (5-ALA) PARA APLICAÇÃO EM CIRURGIA GUIADA POR FLUORESCÊNCIA PARA GLIOMAS: PRODUÇÃO NACIONAL E DE BAIXO CUSTO

Palavras-Chave: câncer, glioblastoma, levulinato de metila, SUS

Autores/as:
Giovana da Costa Venancio [Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNICAMP]
Thayná Fernanda Fonseca [Anhanguera Educacional]
Ms. Xisto Antônio de Oliveira Neto [Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNICAMP]
Ms. Natália Barreto dos Santos [Instituto de Biologia - UNICAMP]
Prof. Dr. João Luiz Vitorino Araújo [Faculdade de Ciências Médicas – Santa Casa de São Paulo]
Prof. Dr. Daniel Fábio Kawano [Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNICAMP]
Profª. Drª. Catarina Raposo Dias Carneiro (orientadora) [Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNICAMP]

INTRODUÇÃO:

Gliomas são as neoplasias primárias mais frequentes do sistema nervoso central. Os gliomas de grau IV (glioblastomas, GBs) são os mais comuns e de pior prognóstico. Apesar de existir tratamento para GBs, baseado na ressecção cirúrgica do tumor associada à radioterapia e quimioterapia, este é apenas paliativo, levando à uma sobrevida média de 15 meses (LIM et al., 2018; STEPP; STUMMER, 2018).

O principal fator capaz de aumentar a sobrevida do paciente é a ressecção tumoral de 98% ou mais (LACROIX et al., 2001). Contudo, a ressecção total do GB é de alta complexidade em razão da dificuldade em diferenciar o tecido neoplásico do tecido cerebral saudável. Dentre as estratégias mais promissoras para sanar essa dificuldade, está a introdução da cirurgia guiada por fluorescência empregando o ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) (HADJIPANAYIS et al., 2015; SASAKI et al., 2001). O 5-ALA exógeno, quando administrado por via oral, promove o acúmulo de um metabólito fotossensível, a protoporfirina IX (PpIX), de forma seletiva em células neoplásicas com alto grau de malignidade (COLLAUD et al., 2004).

Esse método já é considerado padrão ouro em hospitais de países Europeus e do Japão, sendo empregado também nos Estados Unidos da América (STEPP; STUMMER, 2018). No Brasil, o 5-ALA não tem registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), e seu alto custo faz com que sua utilização no Sistema Único de Saúde (SUS) seja pouco viável. Considerando o papel do 5-ALA na melhora do prognóstico e qualidade de vida dos pacientes diagnosticados com GB, pode-se entender a importância do desenvolvimento de um produto de baixo custo que seja de fato aplicável no SUS, sendo este o objetivo deste estudo.

METODOLOGIA:

1. Síntese

A rota de síntese planejada do composto foi baseada na metodologia descrita e otimizada por Zai e colaboradores (2019) com alterações nos métodos de purificação para viabilizar sua realização com reagentes e equipamentos disponíveis em laboratório. O processo ilustrado na **Figura 1** ocorreu em três etapas, compostas pelas reações de bromação, amonização e, por fim, acidificação.

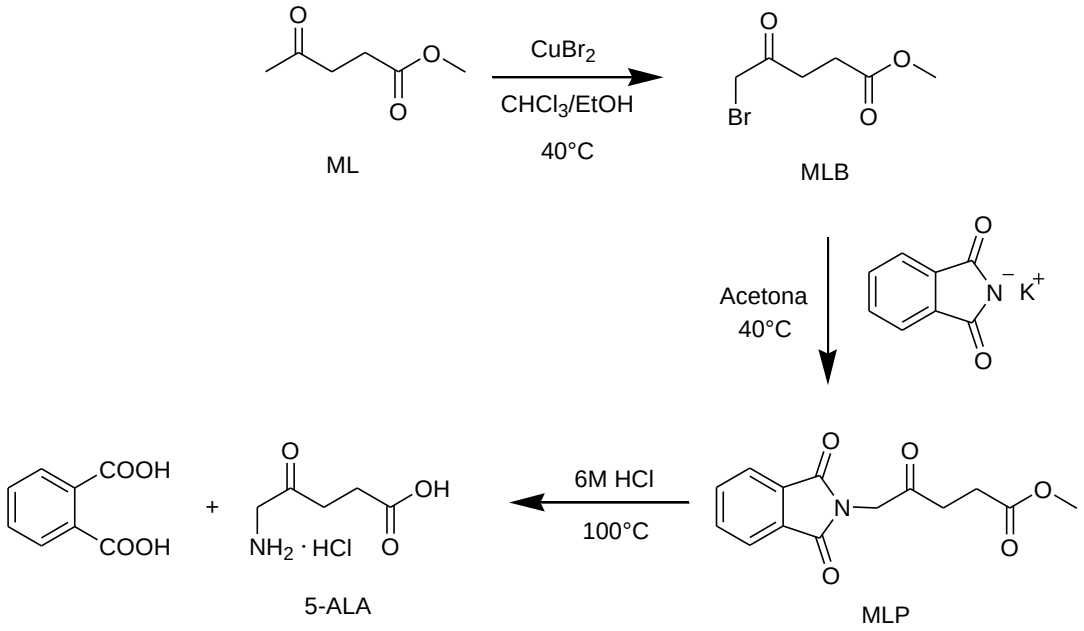

Figura 1: Rota de síntese do 5-ALA a partir do levulinato de metila envolvendo três etapas: bromação, amonização e acidólise. Adaptado de Zai e colaboradores (2019).

1.1 Bromação

A bromação foi realizada por meio da incubação de 0,475 mL (3, 8 mmol) de levulinato de metila (ML) com 2,575 g (11,5 mmol) de Brometo de Cobre II (CuBr2) e 45,5 mL da mistura dos solventes metanol/clorofórmio na proporção de 1:1 por 24 h a 40°C. O bruto reacional foi tratado por duas filtrações em sílica com 100 mL da mistura de solventes éter de petróleo/éter etílico (4:1) e uma vez com éter de petróleo/éter etílico (1:1), seguido por extração com éter de petróleo, não sendo possível purificar

completamente o produto (MLB). Considerando as dificuldades enfrentadas na purificação do intermediário, decidiu-se pela sua aplicação na reação seguinte apesar da presença de impurezas.

1.2 Amonização

Considerando um rendimento hipotético de 70% na reação de bromação, foram adicionados à um balão de fundo redondo 0,52 g de MLB e 0,83 g de ftalimida de potássio (4,5 mmol) junto a 25 mL de acetona. A solução foi aquecida à 40 °C por 24 h, momento em que a reação foi interrompida e o bruto reacional evaporado e extraído com água/éter etílico. A fase orgânica contendo o MLP ainda impuro foi concentrada e utilizada na próxima etapa.

1.3 Acidificação

A reação de acidificação foi realizada utilizando MLP parcialmente impuro (1,15 g) 16,6 mL de HCl (ácido clorídrico) 6 M. A solução foi aquecida até alcançar fervura por um período de 24 h para, em seguida, ser resfriada a -23 °C para a precipitação do ácido o-ftálico. Ao filtrado coletado foi adicionado carvão ativado para adsorção das impurezas de menor peso molecular.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Na reação de bromação, foi comparado o material de partida levulinato de metila (ML) e uma alíquota do meio reacional. Usando uma fase móvel composta pela mistura dos solventes hexano/acetato de etila na proporção 7:3, e solução de anisaldeído como revelador, como ilustrado na **Figura 2**, pôde-se avaliar por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) de sílica o surgimento de uma mancha de fator de retenção (Rf) maior que o do material de partida, o que indica provável formação do produto MLB. O aumento no Rf em comparação ao do levulinato de metila, se deve a adição de um átomo de bromo na cadeia, que diminui a polaridade da molécula.

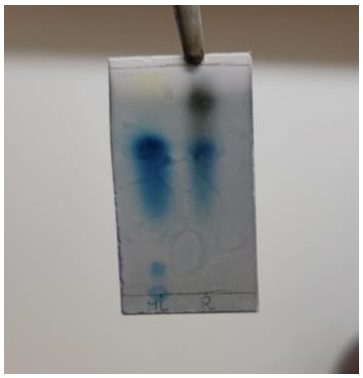

Figura 2. Placa de CCDA da reação de bromação do levulinato de metila, sendo o ponto à esquerda referente ao material de partida (ML) e à direta uma alíquota da reação 5 horas após seu início. Fase móvel hexano/acetato de etila (7:3)

A pequena variação na estrutura entre o material de partida ML e o produto MLB garante aos compostos propriedades físico-químicas altamente similares, resultando em desafios na etapa de purificação. Durante tentativas de purificação por extração líquido-líquido em diferentes sistemas de água e solvente orgânico (incluindo diclorometano, éter de petróleo e hexano) ambos os compostos permaneceram na fase aquosa, impossibilitando sua separação. Considerando que o levulinato de metila não é uma molécula passível de funcionalização pela ftalimida de potássio, e dado que a etapa seguinte (amonização) geraria um produto com características estruturais drasticamente diferentes do material de partida e intermediário anterior, decidiu-se seguir a rota one-pot, ou seja, sem a purificação completa do intermediário.

Para a etapa de amonização, foi comparado o reagente ftalimida de potássio e uma alíquota da reação, sendo a fase móvel uma mistura dos solventes éter etílico/éter de petróleo na proporção 3:2 e o revelador da placa uma solução de anisaldeído. Neste caso foi possível observar a formação do produto pelo surgimento de uma mancha avermelhada com aparente alta concentração na placa cromatográfica, como pode ser constatado na **Figura 3**. Pode-se observar também a presença de uma grande quantidade de impurezas na reação, como o ácido o-ftálico, KBr, ftalimida de potássio que estava em excesso na reação e, portanto, não reagiu, entre outras que não puderam ser identificadas.

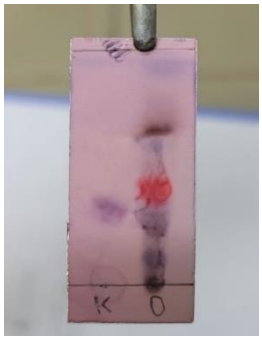

Figura 3. CCDA realizada após a reação de amonização do MLB, ponto à esquerda referente a ftalimida de potássio e à direta uma alíquota do bruto reacional. Fase móvel: éter etílico/éter de petróleo (3:2)

O alto número de impurezas prejudicou o tratamento e purificação do produto, tentativas de purificação utilizando técnicas de partição líquido-líquido e cristalização foram incapazes de isolar o produto desejado, de forma que mesmo a realização de purificações parciais acarretavam em grandes perdas de rendimento. Além disso, o uso de outros métodos de purificação, como a coluna cromatográfica, foi impossibilitado por conta da baixa resolução obtida em análises por CCDA.

Na etapa de acidificação, ao realizar o acompanhamento da reação por CCDA com fase móvel sendo a mistura de éter etílico/éter de petróleo na proporção 3:2 e o revelador solução de anisaldeído, pode-se observar o desaparecimento da mancha de coloração avermelhada e o surgimento de uma macha na origem da placa, como ilustrado na **Figura 4**. A presença de uma mancha na origem é um indicativo positivo acerca da formação do produto, uma vez que o 5-ALA estaria na forma de sal cloridrato após a reação de hidrólise ácida, o que reduziria drasticamente o seu Rf em análise por CCDA. Isto se deve ao fato de que sais em solução se encontram na forma de íons solvatados, que possuem carga, o que faz com que interajam fortemente com a sílica da placa cromatográfica dado seu caráter polar, conferindo a estes compostos Rfs muito baixos.

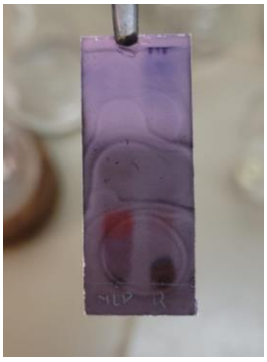

Figura 4. Placa de CCDA da reação de acidificação do MLP, sendo o ponto à esquerda referente ao material de partida (MLP impuro) e à direta uma alíquota do bruto reacional. Fase móvel: éter etílico/éter de petróleo éter etílico/éter de petróleo (3:2)

Após a cristalização da impureza ácido o-ftálico, seguida por filtração e purificação do líquido filtrado com carvão ativado, não foi mais possível observar manchas de maior Rf, sendo que a mancha na origem permanece, o que pode indicar que a purificação foi efetiva, demonstrado na **Figura 5**. Até o momento não foi possível realizar a análise por ressonância magnética nuclear para

caracterização estrutural do produto, uma vez realizada está etapa será possível confirmar a pureza do produto final por cromatografia liquida de alta eficiência e, por fim, avalia-lo quanto a sua atividade biológica.

Figura 5: CCDA de comparação entre o bruto reacional impuro da reação de amonização (à esquerda) e alíquota após purificação com carvão ativado (à direita). Fase móvel: éter etílico/éter de petróleo (3:2)

CONCLUSÕES:

Apesar da síntese do ácido 5-aminolevulínico ter sido retardada por uma série de obstáculos durante as etapas de purificação, o aparente sucesso da última etapa de síntese do composto evidencia o progresso em sua produção, mesmo que ainda não tenha sido possível realizar sua caracterização estrutural. Uma vez confirmada a síntese do produto desejado através de ressonância magnética nuclear, sua pureza será avaliada por cromatografia líquida de alta eficiência e sua atividade biológica testada *in vitro*. Adicionalmente, as técnicas de purificação dos intermediários serão refinadas para obtenção dos intermediários puros e caracterização estrutural dos mesmos.

BIBLIOGRAFIA

STEPP, H., STUMMER, W. **5-ALA in the management of malignant glioma. Lasers in surgery and medicine**, vol. *50*(5), p. 399–419, 2018.

COLLAUD, et al. **On the selectivity of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX formation**. Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents, vol. 4(3), p.301–316, 2004.

HADJIPANAYIS, C. G., WIDHALM, G., & STUMMER, W. **What is the Surgical Benefit of Utilizing 5-Aminolevulinic Acid for Fluorescence-Guided Surgery of Malignant Gliomas?.** Neurosurgery, vol. *77*(5), p. 663–673, 2015.

LACROIX, M., et al. **A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival**. Journal of neurosurgery, vol. *95*(2), p. 190–198, 2001.

LIM, M., XIA, Y., BETTEGOWDA, C., & WELLER, M. **Current state of immunotherapy for glioblastoma**. Nature reviews. Clinical oncology, vol. 15(7),p. 422–442, 2018.

SASAKI, K., et al. **Biosynthesis, biotechnological production and applications of 5-aminolevulinic acid**. Applied microbiology and biotechnology, vol. *58*(1), p. 23–29., 2002.

ZAI, Y., FENG, Y., ZENG, X., TANG, X., SUNABC, Y., & LINAB, L. (2019**). Synthesis of 5-aminolevulinic acid with nontoxic regents and renewable methyl levulinate**. RSC Adv.,2019, 9, 10091.