



Fundação Educacional do Município de Assis
Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis
Campus "José Santilli Sobrinho"

RAPHAEL OLIVEIRA DOS SANTOS

**SÍNTESE ASSIMÉTRICA DE COMPOSTOS ANÁLOGOS AO AZUL
DE METILENO**

**Assis
2011**

RAPHAEL OLIVEIRA DOS SANTOS

**SÍNTESE ASSIMÉTRICA DE COMPOSTOS ANÁLOGOS AO AZUL
DE METILENO**

Trabalho apresentado ao Programa de Iniciação Científica (PIC) do Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis - IMESA e a Fundação Educacional do Município de Assis – FEMA

Orientando: Raphael Oliveira dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Idécio Nogueira da Silva

Linha de Pesquisa: Ciências Exatas e da Terra

**Assis
2011**

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	04
2.	TERAPIA FOTODINÂMICA.....	05
2.1	HISTÓRICO.....	05
2.2	MECANISMOS ENVOLVIDOS NA TERAPIA FOTODINÂMICA..	07
3.	ANÁLOGOS DA FENOTIAZINA.....	10
4.	AZUL DE METILENO.....	11
5.	METODOLOGIA.....	12
5.1	MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	12
5.2	MÉTODOS.....	13
5.2.1	Síntese do tetraiodeto de fenotiazina.....	13
5.2.2	Preparação de análogos do azul de metileno.....	14
5.2.3	Procedimento geral para adição da primeira amina.....	15
5.2.4	Procedimento geral para adição da segunda amina.....	15
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
6.1	SÍNTESE DO TETRAIODETO FENOTIAZINA.....	16
6.2	PREPARAÇÃO DE ANÁLOGOS DO AZUL DE METILENO.....	17
6.3	ADIÇÃO DA PRIMEIRA AMINA (DI-N-BUTILAMINA).....	18
6.4	PROCEDIMENTO GERAL PARA ADIÇÃO DA SEGUNDA AMINA.....	19
7.	CONCLUSÃO.....	20
8.	CRONOGRAMA FÍSICO DE EXECUÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA.....	21
	REFERÊNCIAS.....	22

1. INTRODUÇÃO

A terapia fotodinâmica (PDT) envolve a administração de uma molécula fotossensibilizadora no paciente e irradiação com luz no tecido alvo para ativação do fotossensibilizador. A destruição do tecido alvo é feita deste modo com muita seletividade.

Devido se tratar de uma técnica que utiliza de medicamentos e equipamentos de alto custo, tem-se a necessidade da busca por novos fotossensibilizadores de custo baixo e acessível. (Fernandes, 2010)

Estudos do uso de fenotiazinas em terapia fotodinâmica de câncer como fotossensibilizadoras tem se concentrado no azul de metileno e seus análogos.

O azul de metileno exibiu fototoxicidade numa variedade de células tumorais in vitro (Melish et al., 2002). Estudos em ratos demonstraram ação efetiva do azul de metileno em carcinoma sólido Ehrlich (Konig et al., 1987)

Gorman et al. (2006) sintetizaram derivados assimétricos da fenotiazina e mediram a eficiência de geração de oxigênio singlete e a potencial aplicação destes compostos como fotossensibilizadores para terapia fotodinâmica. Estudos preliminares sugerem que o aumento na lipofilicidade é uma característica importante para alta atividade de destruição de tumor.

Devido a possibilidade de substituição de grupos R do azul de metileno para aumento da lipofilicidade deste composto, este trabalho teve como objetivo a síntese de análogos do azul de metileno a partir da fenotiazina e posterior análise de sua eficácia na terapia fotodinâmica.

2. TERAPIA FOTODINÂMICA

2.1 HISTÓRICO

Oscar Raab descreveu no ano de 1900 a ação de um corante, a acridina, quando empregado no microrganismo *Paramécio*, observando a morte deste quando submetido à presença de luz solar (PELOI, 2007).

Os primeiros a utilizarem o termo terapia fotodinâmica foram fisiologistas alemães, descrevendo os danos causados em tecidos vivos decorrente da combinação de três fatores: fotossensibilizador, oxigênio e luz (GONZALES, 2007).

Nos anos 50, Schwartz dá início a primeira geração de fármacos para TFD, compostos por derivados hematoporfíricos. Por meio dos experimentos de Meyer-Bertz, pode concluir-se que o princípio ativo não era a hematoporfirina, mas várias substâncias oligoméricas constituintes destes fármacos empregados. Baseado nesta constatação Schwartz enriqueceu o composto com oligômeros e orientou Lipson, na década de 60, a investigar a ação destes com a incidência de luz em tumores implantados em camundongos (PELOI, 2007,).

No fim da década de 60, Lipson obteve sucesso utilizando o composto de oligômeros e irradiação seletiva no tratamento de um câncer de mama dando início a utilização desta técnica como terapia clínica para o câncer (PELOI, 2007).

Além do tratamento do câncer e neoplasias, a TFD está sendo empregada no tratamento de doenças oriundas de crescimento anormal de tecidos como degeneração macular da retina, psoríase, artrite reumatóide sistêmica, restenosis, micoses fungóides, infestações bacterianas, verrugas, arteriosclerose entre outras (TADA, 2007).

A preparação de vários derivados porfirínicos para testes em TFD culminou com o desenvolvimento do medicamento Photofrin II®, que é um melhoramento do

composto de oligômeros presentes nos derivados hematoporfíricos feito por Dougherty.

Na década de 80 uma empresa de alta tecnologia conhecida como QLT, aperfeiçoou através de purificações a formulação do Photofrin II®, culminando com melhores resultados e sendo nomeado este fármaco de Photofrin® que é o único medicamento aprovado pelo FDA/EUA (Food and Drug Administration) para o tratamento de câncer através da TFD no ano de 1998 (SIMPLÍCIO et al., 2002).

Buscando a melhoria das propriedades foto-físicas em relação ao Photofrin®, foi desenvolvida a chamada segunda geração de fármacos para a TFD, resultando na produção dos fármacos Levulan®Kerastick, aprovado pelo FDA em 1999, e o Visudyne® que é utilizado no tratamento de degeneração macular, aprovado pelo FDA em 2000 (SIMPLÍCIO et al., 2002).

2.2 MECANISMOS ENVOLVIDOS NA TERAPIA FOTODINÂMICA

A TFD consiste na utilização de um fotossensibilizador que, após se agregar ao tecido alvo por acumulação ou metabolização, ao ser irradiado com luz de determinada frequência produz espécies reativas de oxigênio (EROS) (GONZALES, 2007).

Através do diagrama de Jablonski é possível representar os processos foto-físicos que um fotossensibilizador pode sofrer ao absorver radiação.

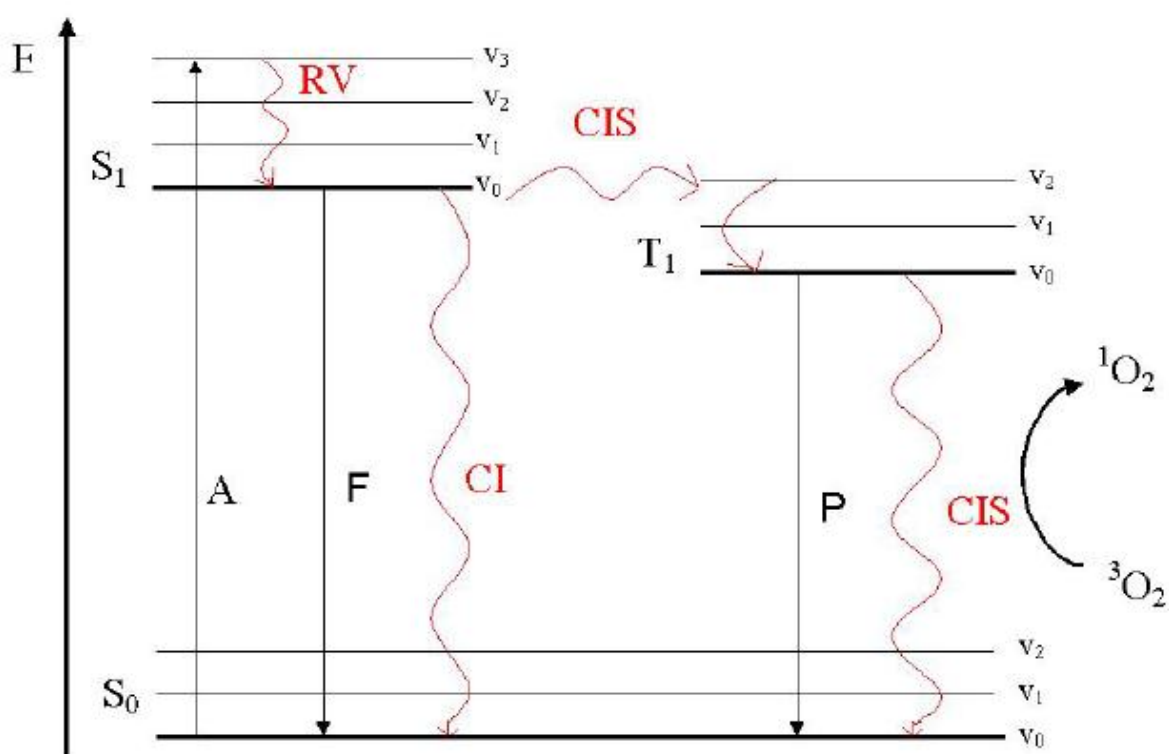


Figura 1. Diagrama de Jablonski (In: PELOI, 2007)

Após ser irradiado com luz de comprimento adequado, o fotossensibilizador em seu estado fundamental (S₀) absorve energia, sendo induzido a ir para seu estado singlete excitado (S₁). Este estado singlete excitado possui tempo de vida bastante curto, na ordem de nanosegundos, podendo dissipar essa energia excedente através de processos radiativos (emissão de fluorescência [F]) ou não radiativos (conversão interna [CI] ou cruzamento intersistema, CIS). O processo de maior importância para a TFD é o cruzamento intersistema, onde ocorre a inversão do spin

do elétron, fazendo com que o fotossensibilizador passe para o primeiro estado triplete excitado (T_1). Neste estado excitado o fármaco pode dissipar a energia excedente por meio da conversão interna ou relaxamento vibracional, em que a energia é liberada em forma de calor para o meio ao seu redor, e da emissão de fosforescência (P). O tempo de vida do estado excitado T_1 é da ordem de microsegundos (μs), sendo suficiente para que este interaja com substâncias reativas como o oxigênio molecular ou com tecidos do organismo que possuem oxigênio em sua composição, ocorrendo a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) através de processos fotoquímicos ou fotodinâmicos. Esses processos fotoquímicos podem ser do tipo I e II, sendo necessária a presença de oxigênio (GONZALES, 2007).

O processo tipo I é caracterizado pela transferência de elétrons do composto excitado T_1 para um substrato orgânico (A), formando como produto substrato oxidado (A^{\bullet}) e redução do fármaco (${}_1T^{+\bullet}$) que ao reagir com o oxigênio molecular (3O_2) forma espécies reativas de oxigênio como o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila (OH^{\bullet}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que são compostos com grande capacidade de gerar oxidação nos tecidos e células, causando danos de maneira irreparável (PELOI, 2007).

A TFD tipo I pode ser representada pelo seguinte esquema:

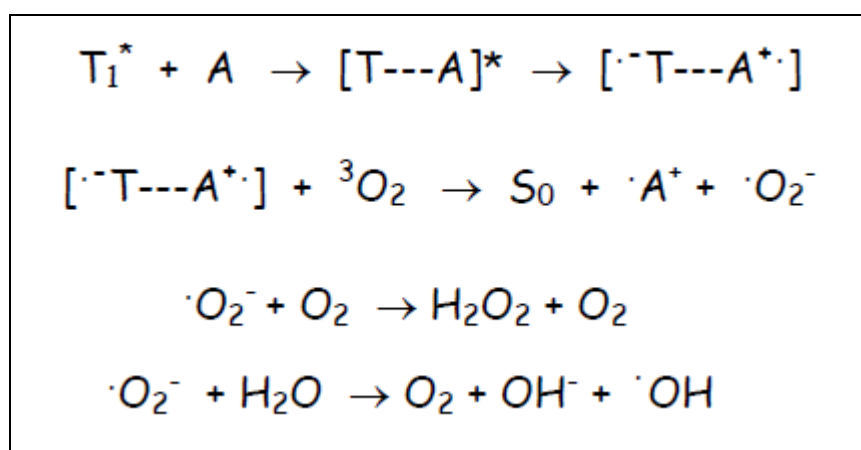


Figura 2. Reação de formação de radicais livres (In: PELOI, 2007)

O processo tipo II ocorre com a transferência de excesso de energia do fármaco excitado T_1 para o oxigênio molecular (3O_2), ocorrendo a formação do oxigênio no estado singlete excitado (1O_2), sua reação citotóxica é devido a rápida e indiscriminada que ocorre com os tecidos do organismo ricos em elétrons como os lipídios insaturados (Colesterol), aminoácidos (triptofano, histidina, metionina, etc.), proteínas e ácidos nucleicos, resultando em danos as células e tecidos do organismo (GONZALES, 2007).

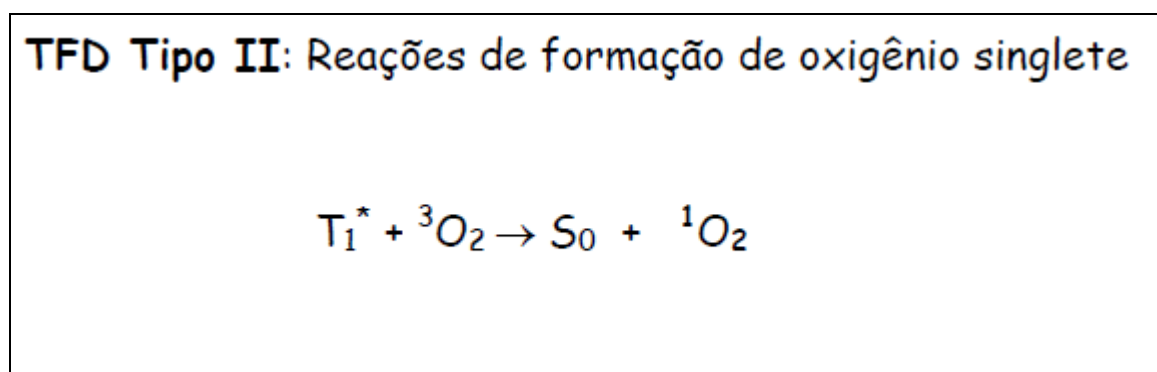


Figura 3. Formação de oxigênio singlete (In: PELOI, 2007)

Os danos que ocorrem nos tecidos do organismo podem ocorrer tanto pelos produtos formados na TFD tipo I quanto na TFD tipo II, sendo a última a mais expressiva e importante para esta técnica (GONZALES, 2007).

O dano foto-induzido pode ser de dois tipos, a necrose e a apoptose. A necrose se caracteriza pelo rompimento da parede celular onde o conteúdo desta é espalhado na região onde está localizada causando danos às células vizinhas e causar inflamação na área a seu redor. A apoptose é caracterizada pela diminuição do volume celular onde ocorre a formação de corpos apoptóticos que impedem o material intracelular vazar sendo esta mais favorável a este tratamento (GABRIELLI, 2007)

A determinação de fatores como a concentração do fotossensibilizador, tempo de pré-incubação da célula ao fármaco antes da exposição à luz, intensidade e espectro de emissão do laser adequado e duração da exposição é muito importante para que o tratamento seja efetivo (GONZALES, 2007).

3. ANÁLOGOS DA FENOTIAZINA

Os estudos relacionados ao uso de fenotiazinas se concentram na utilização de azul de metileno, azure C, tionina, azul de toluidina, entre outros, onde o primeiro exibe fototoxicidade para vários tipos de neoplasias *in vitro*, como linfoma de Gardner, Sarcoma 180, adenocarcinoma mamário, carcinoma de bexiga de rato, carcinoma de bexiga humano, adenocarcinoma cervical humano, linfoma humano de células T e de células B. (GABRIELLI, 2007).

A figura a seguir apresenta a estrutura dos análogos Fenotiazínicos onde os grupos R podem ser substituídos.

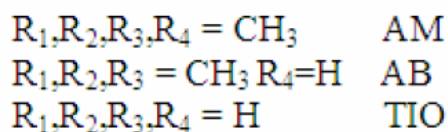
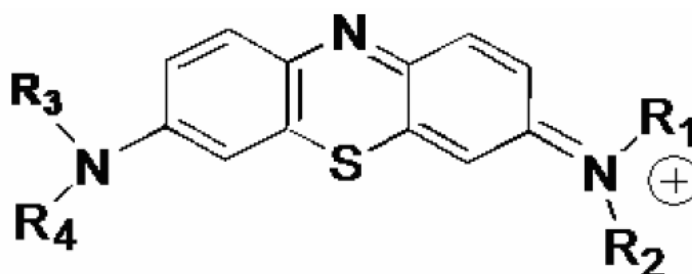


Figura 4: estrutura dos análogos da fenotiazina azul de metileno (AM), Azure B (AB) e tionina (TIO) (In: GABRIELLI, 2007)

4. AZUL DE METILENO

O azul de metileno é um composto com potencial uso a TFD devido a elevada produção de oxigênio singlete resultante do grande rendimento quântico de cruzamento entre sistemas, a sua absorção na faixa de 600 a 660 nm, comprimento de onda requerido para penetração efetiva dos tecidos alvo, possuir citotoxicidade baixa no escuro, fácil acessibilidade a este composto, entre outros. (GABRIELLI, 2007; FERNANDES, 2010).

A figura 5 mostra a fórmula geral dos análogos do azul de metileno. Os grupos R podem ser introduzidos variando-se as aminas substituídas que reagem com a fenotiazina.

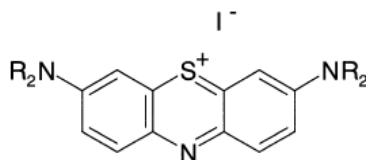


FIGURA 5: Fórmula estrutural dos análogos do azul de metileno

Os novos fotossensibilizadores devem apresentar dentre vários requisitos uma boa taxa de geração de oxigênio singlete, baixa toxicidade aos tecidos saudáveis, absorvidades em regiões mais adequadas a cada tipo de tratamento. Devem ser estáveis, não serem mutagênicos ou carcinogênicos, entre outros (FERNANDES, 2010).

5. METODOLOGIA

5.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

- Fenotiazina
- Iodo
- Di-N-butilamina
- Acetato de Amônio
- Dietanolamina
- N-metilanilina
- Prolina
- Clorofórmio
- Metanol
- Éter etílico
- Placas de cromatografia de camada delgada
- Espectrofotômetro UV-Vis
- Evaporador Rotatório
- Agitador magnético

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Síntese do tetraiodeto de fenotiazina

O composto foi sintetizado conforme procedimento da literatura (New, 2009). A uma solução de iodo (8,4g, 33 mmol) em clorofórmio (175 mL), foi adicionada, gota a gota e sob agitação, a uma solução de fenotiazina (2,1g, 11 mmol) em clorofórmio (100 mL) durante um período de 1 h em temperatura ambiente. A mistura reacional foi agitada por mais 30 minutos a uma temperatura de 7° C e o precipitado resultante lavado com clorofórmio, seco em temperatura ambiente por 3 horas obtendo o tetraiodeto de fenotiazina.

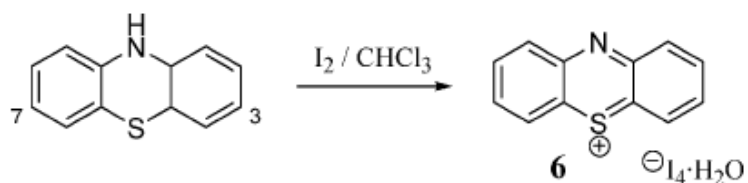


Figura 6: síntese do tetraiodeto de fenotiazina

5.2.2 Preparação de análogos do azul de metileno

Segundo Gorman et al. (2006) Uma solução da amina (Por exemplo, hexadecilamina) (3,6 mmol) em 50 mL de metanol foi adicionada gota a gota a uma solução de tetraiodeto de fenotiazin-5-ium em 300 mL de metanol durante um período de 60 minutos e a mistura foi agitada por 14h. Em seguida, o volume da mistura foi reduzido por evaporação e a solução deixada esfriar. O sólido depositado foi separado por filtração, lavado com éter etílico e seco. A 100 mL de uma solução de 0,34 mmol deste sal em diclorometano foi adicionado 0,40 mmol de trietilamina em diclorometano e a segunda amina (se for o caso) em 50 mL de diclorometano, adicionado gota a gota por 60 minutos. O sistema foi agitado por 14 horas em temperatura ambiente. Em seguida, o precipitado foi separado por filtração e a sua pureza confirmada por cromatografia de camada delgada.

5.2.3 Procedimento geral para adição da primeira amina

Segundo Streckowski et al. (1993), a uma solução do tetraiodeto de fenotiazina (0,834 g) em metanol (20 mL), foi adicionada, gota a gota sob agitação a 23°C, a uma solução da amina (2,5 mmol) em metanol (4 mL). A mistura foi agitada durante um período de 2 a 3 horas até que todo o tetraiodeto fosse consumido (reação monitorada por TLC e espectrofotômetro). O precipitado formado foi filtrado e extraído com metanol (5x 10 mL). O sólido resultante é o produto monossustituído.

5.2.4 Procedimento geral para adição da segunda amina

Segundo Streckowski et al. (1993), uma solução do produto monossustituído (93 mg, 0,15 mmol) em metanol (10 mL), foi agitada a 23°C e tratada, gota a gota, com uma solução da amina (0,35 mmol) em metanol (2 mL). O progresso da reação foi monitorado por espectrofotômetro. Após 4 horas de agitação o precipitado resultante foi filtrado, lavado com metanol frio e em seguida, éter. A cristalização foi feita a partir do metanol.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 SÍNTESE DO TETRAIODETO FENOTIAZINA

A reação foi feita de acordo com a literatura sendo que teoricamente a massa esperada de obtenção para esta era de cerca 6,8 g representando 74% de rendimento. Na prática foi obtida uma massa 6,5892g, rendimento de 72%, próximo do esperado para esta reação.

A seguinte figura apresenta o aspecto do produto formado nesta etapa.



Figura 7: tetraiodeto de fenotiazina obtido na reação

6.2 PREPARAÇÃO DE ANÁLOGOS DO AZUL DE METILENO

Na síntese do o composto monossustituído 3-di-n-butilfenotizin-5-ium, após 14 horas de reação de adição da primeira amina não ocorreu a precipitação esperada. A solução então foi evaporada num roto-evaporador, resultando num precipitado oleoso de cor azulada.

Foram tirados espectros na faixa de 300 a 750 nm do precipitado oleoso em metanol, para saber o comprimento de onda de absorção máxima e comparar o resultado obtido com valores de substâncias conhecidas da literatura. O λ máximo de absorção foi de 659 nm. Não foi encontrado o λ máximo esperado para o 3-di-n-butilfenotizin-5-ium. No entanto, Wainwright et al (2009) mostram que o 3-di-n-etilfenotizin-5-ium e o 3-di-n-propilfenotizin-5-ium, compostos semelhantes ao 3-di-n-butilfenotizin-5-ium, tem λ máximo de 580 nm. O valor 659 nm obtido é muito diferente do valor dos compostos semelhantes, indicando que não era o produto monossustituído. Supondo que ocorreu uma dissustituição, Mellish et al (2002) encontraram λ máximo de absorção de 680 nm para o composto 3-7-bis(dimetilamino)fenotiazin-5-ium. Muito mais próximo do valor obtido neste experimento, sugerindo que ocorreu uma dissustituição no anel fenotiazínico.

A imagem a seguir apresenta o aspecto do produto dissustituído simetricamente.



Figura 8: Produto obtido simetricamente

6.3 ADIÇÃO DA PRIMEIRA AMINA (DI-N-BUTILAMINA)

Como a metodologia anterior resultou numa dissubstituição, decidiu-se utilizar uma segunda metodologia, onde após a utilização de um menor tempo de reação controlada por cromatografia de camada delgada (TLC) foi tirado um espectro para analisar o comprimento de onda de absorção máxima para comparar com absorbâncias conhecidas através da literatura de compostos semelhantes. Os volumes e massas para a solução da amina a ser adicionada e da solução do composto monossustituído foram respectivamente de 0,43 mL da amina em 4 mL de metanol e 0,8338 g de tetraiodeto de fenotiazina em 20 mL de metanol. A massa obtida foi de 0,4467g do produto monossustituído. A figura a seguir apresenta a comparação do λ de absorção máxima do composto obtido com valores conhecidos da literatura.

λ de Absorção Máxima esperada (Mono)	λ de Absorção Máxima esperada (Di)	λ de Absorção Máxima obtida
580 nm	660 nm	578 nm

Figura 9: Comparação de λ absorção máxima do composto obtido com valores conhecido em literatura

Pode-se concluir pela comparação dos λ máximo de absorção que o composto obtido foi o monossustituído.

6.4 PROCEDIMENTO GERAL PARA ADIÇÃO DA SEGUNDA AMINA

Para adicionar a segunda amina no composto 3-di-n-butilfenotizina-5-ium foram adicionadas a dietanolamina, a N-metilanilina e a prolina, sendo que as massas e volumes utilizados para estas sínteses estão representadas no seguinte esquema:

	Solução da amina	Solução do composto monossustituído
Dietanolamina	0,16 mL da amina 9,6 mL de metanol	0,4467g do composto mono 48 mL de metanol
N-metilanilina	0,409 mL da amina 21,5 mL de metanol	1g do composto mono 107,5 mL de metanol
Prolina	0,4334 g da amina 21,5 mL de metanol	1g do composto mono 107,5 mL de metanol

Figura 10: massas e volumes utilizados

As massas para os compostos 3-di-N-butil-7-dietanolfenotiazina-5-ium, 3-di-N-butil-7-metilanifenotiazina-5-ium e 3-di-N-butil-7-prolinafenotiazina-5-ium foram respectivamente de 0,1091g, 0,8421g e 0,9336g sendo que sua lavagem, recristalização através do metanol e subsequente caracterização de suas estruturas por meio de análise em RMN ^1H e RMN ^{13}C , serão feitas posteriormente para comprovar a formação destes compostos.

7 CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos pode-se observar que o tempo de reação da adição da primeira amina deve ser controlado para que não haja um ataque aos dois sítios de ligação do composto fenotiazínico devido à simetria e semelhança da reatividade apresentada por este composto, e conseqüente formação de produto simétrico. As sínteses são bem simples sendo que para se possa realmente ter uma confirmação da formação dos compostos esperados é necessário a utilização de equipamentos adequados (RMN ^1H , RMN ^{13}C , etc) para caracterização e análise mais eficazes das estruturas dos compostos obtidos, devido o fato de ter sido utilizado dados obtidos pelo espectrofotômetro somente como um indicativo da formação do produto dissustituído assimetricamente.

8 CRONOGRAMA FÍSICO DE EXECUÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Mês	Atividade
Fevereiro 2011	Revisão Bibliográfica
Março 2011	Revisão Bibliográfica
Abril 2011	Preparação do análogo de azul de metileno com hexadecilamina
Maio 2011	Preparação do análogo de azul de metileno com N,N-dibutilamina
Junho 2011	Elaboração de Relatório
Julho 2011	Preparação do análogo de azul de metileno com N,N-dihehexadecilamina
Agosto 2011	Medida das propriedades físico-químicas das moléculas obtidas
Setembro 2011	Medida das propriedades físico-químicas das moléculas obtidas
Outubro 2011	Elaboração do Relatório Final

REFERÊNCIAS

GABRIELLI, Dino Santesso. **Eficiência Fotodinâmica dos Fenotiazínicos em Mitocôndrias e Células Tumorais**. 2007. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

GONZALES, Fernanda pereira. **Triagem, identificação e determinação de parâmetros funcionais de fotossensibilizadores com ação antifúngica**. 2007. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de ciências farmacêuticas de ribeirão preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

GORMAN, Stephen A.; BELL, Andrea L.; GRIFFITHS, John; ROBERTS, Dave; BROWN, Stanley B. The Synthesis and Properties of Unsymmetrical 3,7-diaminophenothiazin-5-ium iodide salts: Potential Photosensitizer for Photodynamic Therapy. **Dyes and Pigments**, v.71, 2006, p153-160.

KENNEDY, J.C; POTTIER, R.H., **Endogenous protoporphyrin IX, a clinical useful photosensitizer for photodynamic therapy**. *Jphotochem* 14:274-92, 1992.

KONIG, K., BOCKHORN, V., DIETEL, W., SHUBERT, H. **Photochemotherapy of animal tumors with the photosensitizer methylene methylene blue using krypton laser**. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* ,113, pp301-303, 1987.

KRAMMER, B.; MALIK, Z.; STEPP, H. **Photodynamic Therapy with ALA: A Clinical Handbook**. Cambridge, RSC Publishing, UK 2006: 15-77.

MELLISH, Kirste, J.; COX, Russwel D., VERNON, David I.; GRIFFINTHS, J.; BROWN, Stanley B. **In vitro Photodynamic Activity of a Series of Mehtylene Blue Analogues**. *J Photochem. Photobiol.* 75(04), p.392-397, 2002.

New, Olivia M.; Dolphin David; Design and synthesis of novel phenothiazinium photosensitizer derivatives. **European Journal Organic Chemistry.**, 2009, p.2675-2686.

PELOI, Lílian Somenci. **Estudos da Aplicação do Corante Azul de Metileno em Terapia Fotodinâmica**. 2007. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas – Universidade Estadual de Maringá – Paraná, Maringá, 2007.

TADA, Dayane Batista. **Desenvolvimento de Nanopartículas Fotossensibilizadoras**. 2007. Tese (Doutorado) – Instituto de Química – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

SIMPLICIO, Fernanda Ibanez; MAIONCHI, Florângela; HIOKA, Noboru. Terapia Fotodinâmica: Aspectos Farmacológicos, Aplicações e Avanços Recentes no Desenvolvimento de Medicamentos. **Química Nova**, V. 25, n.5, 2002, p.801-807.

STREKOWSKI, Lucjan; HOU, Dong-Feng; WYDRA, Roman L. A synthetic route to 3-(dialkylamino)phenotiazin-5-ium salts and 3,7-disubstituted derivatives containing two different amino groups. **Heterocyclic Chemistry**, v.30, 1993, p.1693-1695.