



Catarina Correia da Cruz Pereira

Licenciatura em Química Aplicada – perfil de Química Orgânica

**Identificação e quantificação de adutos covalentes formados entre a valina N-terminal da hemoglobina e o fármaco nevirapina em doentes de HIV:
Desenvolvimento e validação de um método analítico por espectrometria de massa de alta resolução**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Bioorgânica

Orientador: Alexandra M. M. Antunes, Investigador Principal,
CQE-IST
Elemento de ligação: Paula Sérgio Branco, Professor Auxiliar,
FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor António Jorge Dias Parola
Arguente: Prof. Doutora Sofia de Azeredo Pereira
Vogal: Prof. Doutora Alexandra Maria Moita Antunes



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro, 2015

Identificação e quantificação de adutos covalentes formados entre a valina N-terminal da hemoglobina e o fármaco nevirapina em doentes de HIV: Desenvolvimento e validação de um método analítico por espectrometria de massa de alta resolução.

Copyright © Catarina Correia da Cruz Pereira, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer à Doutora Alexandra Antunes pela oportunidade que me deu de poder trabalhar consigo, foi sem dúvida um privilégio. Quero também agradecer-lhe pela sua amizade, por nunca ter deixado de acreditar em mim e por todos os conhecimentos que me transmitiu.

À Prof. Doutora Matilde Marques pela partilha de conhecimentos, disponibilidade e simpatia.

À Doutora Cristina Jacob por todo o apoio, disponibilidade, partilha de conhecimentos e formação que me deu na área da química analítica.

À Doutora Conceição Oliveira por toda a simpatia, disponibilidade, partilha de conhecimentos e pelas análises de espectrometria de massa.

À Doutora Sofia Azeredo Pereira pelas análises por cromatografia líquida acoplada a um detetor de fluorescência.

A todos os colegas do grupo VII, em especial, à Ana Godinho, à Ana Dias, à Inês Martins, à Catarina Charneira, à Shrika Harjivan, ao Pedro Pinheiro e ao João Nunes pela vossa amizade e por todos os conhecimentos que me transmitiram.

À Catarina Sequeira da Faculdade de Ciências Médicas pela amizade e por todo o apoio.

À minha colega e amiga Lara Fidalgo por todo o apoio, amizade e partilha de conhecimentos.

Ao Davide Mendes pelo carinho, apoio incondicional, paciência e por nunca me deixar desistir.

E finalmente quero agradecer aos meus pais, avós e tios, em especial ao meu pai por me apoiar e incentivar constantemente, e à minha mãe pelo carinho, por me acompanhar, motivar e apoiar em mais uma etapa da minha vida académica.

Resumo

A nevirapina é o fármaco antirretroviral mais utilizado nos países em desenvolvimento para combater o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Apesar dos seus efeitos benéficos, a nevirapina tem sido associada a casos de hipersensibilidade cutânea e hepatotoxicidade graves ou mesmo fatais. Estudos recentes sugerem o envolvimento da bioactivação do seu metabolito de Fase I, 12-OH-Nevirapina, a espécies electrofílicas capazes de formar adutos covalentes com proteínas. A identificação dos adutos formados, por esta via de bioactivação, com a valina *N*-terminal da hemoglobina (Hb) isolada de doentes sob terapêutica com a nevirapina foi já efectuada. A técnica analítica utilizada envolveu a utilização do método de derivatização *N*-alquilo Edman que, por reacção com fenilisotiocianato (PITC), permite destacar o aduto formado com o resíduo *N*-terminal da Hb, sob a forma de uma hidantoina, que foi posteriormente analisado e quantificado por cromatografia líquida acoplado à espectrometria de massa de *tandem* por ionização de *electrospray*.

O presente trabalho teve como objectivo inicial otimizar o procedimento experimental envolvido no procedimento de *N*-alquilo Edman, tendo-se inicialmente comparado a sensibilidades obtidas mediante a utilização de dois agentes derivatizante: o PITC e o isotiocianato de fluoresceína (FTIC). Este processo inicial permitiu estabelecer que a utilização do PITC como agente de derivatização conduzia a melhores resultados, tendo-se prosseguido com o desenvolvimento e a validação do método analítico para a quantificação deste aduto por cromatografia líquida acoplado a espectrometria de massa de alta resolução (LC-HRMS). O método analítico desenvolvido apresentou recuperações entre 36 e 57 %, supressão de sinal de 19 % e um limite de quantificação (LOQ) de 1,4 ppb (média da exactidão = 98 %; CV = 5 %). A metodologia validada foi depois aplicada na quantificação de adutos de nevirapina em duas amostras de Hb isolada de doentes de HIV e os níveis de adutos obtidos foram de 95 e 92 pmol/g de Hb.

Palavras-chave: Nevirapina, Toxicologia, Adutos de proteínas, Bioactivação, Hemoglobina, LC-ESI-MS.

Abstract

Nevirapine is the antiretroviral drug most widely used in developing countries. Despite its beneficial effects, nevirapine is associated with severe cutaneous hypersensitivity and hepatotoxicity. Recent studies suggest that the bioactivation of its Phase I metabolite, 12-OH-Nevirapine, may be the cause of these toxic reactions, involving the formation of electrophilic species capable of forming covalent adducts with proteins. The identification of adducts formed by this bioactivation, pathway with the *N*-terminal valine of hemoglobin (Hb) isolated from patients on nevirapine, was already performed. The analytical procedure initially used involved the use of *N*-alkyl Edman derivatization method which, by reaction with phenyl isothiocyanate (PTIC), allowed the detachment of the adduct formed with the *N*-terminal of Hb residue, as an hydantoin, which was subsequently analyzed and quantified by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry by electrospray ionization (LC-ESI-MS/MS).

This work had as initial objective to optimize the experimental procedure involved in the *N*-alkyl Edman procedure. The first approach involved the comparison of the sensitivities obtained upon use of two derivatizing agents: the phenyl isothiocyanate (PITC) and fluorescein isothiocyanate (FITC). This initial process established that the use of PITC as derivatizing agent led to better results, having pursued the development and validation of the analytical method for the quantification of this adduct by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry (LC-HRMS), using as internal standard the deuterated derivative of the hydantoin. The analytical method developed showed recovery of 36 - 57 %, 19 % suppression signal and a limit of quantification (LOQ) of 1,4 ppb (average accuracy = 98 %; CV = 5 %). The validated methodology was then used for the quantification of nevirapine adducts in two Hb samples isolated from HIV patients on NVP and adducts levels obtained were 95 and 92 pmol/g of Hb.

Keywords: Nevirapine, toxicology, protein adducts, bioactivation, hemoglobin, LC-ESI-MS

Índice de Matérias

1. Introdução	1
1.1. Nevirapina	2
1.2. Biotransformação	4
1.3. Bioativação e Toxicidade	4
1.4. Metodologias de detecção e quantificação de adutos formados com a valina terminal da hemoglobina	7
1.5. Metodologia de detecção e quantificação por espectrometria de massa de alta resolução	9
1.6. Validação dos métodos analíticos	10
1.7. Objectivo do trabalho	12
2. Discussão de Resultados	13
2.1. Avaliação da utilização dos agentes de derivatização fenilisotiocianato e isotiocianato de fluoresceína (FITC), na metodologia de degradação de <i>N</i>-alquil Edman para a detecção dos adutos formados entre o carbono C-12 da nevirapina e a valina <i>N</i>-terminal da hemoglobina	14
2.1.1. Síntese e caracterização do aduto 12-[5-isopropil-4-oxo-3-fluoresceína-2-tioimidazolidin-1-il]-NVP (22).....	15
2.1.2. Síntese e caracterização do aduto 12-[5-isopropil-4-oxo-3-fenil-2-tioimidazolidin-1-il]-NVP (14).....	17
2.1.3. Comparação dos resultados obtidos por análise de LC-ESI-MS de soluções padrão dos adutos 14 e 22.....	18
2.1.4. Comparação do método de degradação de <i>N</i> -alquil Edman utilizando o fenilisotiocianato e isotiocianato de fluoresceína, na análise de adutos de nevirapina formados com a hemoglobina isolada de doentes sob a terapêutica com este fármaco.....	19
2.1.5. Análise do aduto 22 por cromatografia líquida por detecção de fluorescência.....	20
2.2. Desenvolvimento e optimização do método analítico para a quantificação do aduto 14	22
2.2.1. Síntese do padrão interno.....	22
2.2.2. Optimização das condições de degradação de <i>N</i> -alquil Edman dos adutos da valina terminal da hemoglobina.....	24
2.2.3. Primeira abordagem para o estudo da linearidade do método.....	25
2.2.4. Exactidão e Precisão do método.....	26
2.2.5. Efeito matriz e Recuperação.....	28
2.2.6. Optimização da metodologia experimental para aumentar a recuperação do método analítico.....	29
2.3. Validação do método de quantificação optimizado	35
2.3.1. Linearidade do método.....	35

2.3.2.	Exactidão, Precisão, Efeito de matriz e Recuperação.....	36
2.3.3.	Limite de detecção (LOD) e limite inferior de quantificação (LLOQ).....	39
2.4.	Análise das amostras dos doentes pelo método validado.....	41
2.5.	Conclusões.....	41
3.	Procedimento Experimental.....	43
3.1.	Inclusão de pacientes, recolha de dados clínicos e amostras de sangue.....	44
3.2.	Reagentes, Solventes e Materiais.....	44
3.3.	Equipamento.....	45
3.4.	Síntese dos padrões.....	47
3.4.1.	Síntese do aduto 12-[5-isopropil-4-oxo-3-fenil-2-tioxoimidazolidin-1-il]-NVP, 14	47
3.4.1.1.	Preparação do complexo hexametilfosforamida (oxodiperóxido)(piridina) molibdénio (MoOPH).....	47
3.4.1.2.	Preparação de 11-ciclopropil-5,11-di-hidro-4-(hidroximetil)-6 <i>H</i> -dipirido-[3,2-b:2',3'-e]diazepina-6-ona, (12-OH-NVP, 5).....	47
3.4.1.3.	Preparação de 11-ciclopropil-5,11-di-hidro-4-metil-(metanossulfoximetil)-6 <i>H</i> -dipirido-[3,2-b:2',3'-e]diazepina-6-ona, (12-MsO-NVP, 23).....	48
3.4.1.4.	Formação do aduto 12-(valinato de etilo- <i>N</i> ^α -il)-NVP, 24	48
3.4.1.5.	12-[5-Isopropil-4-oxo-3-fenil-2-tioxoimidazolidin-1-il]-NVP, 14	49
3.4.2.	Síntese do aduto 12-[5-isopropil- <i>d</i> ₇ -4-oxo-3-fenil-2-tioxoimidazolidin-1-il]-NVP, 29	49
3.4.2.1.	Preparação do éster etílico da <i>L</i> -valina- <i>d</i> ₈	49
3.4.2.2.	Formação do aduto 12-(valinato de etilo- <i>d</i> ₈ - <i>N</i> ^α -il)-NVP, 27	49
3.4.2.3.	12-[5-isopropil- <i>d</i> ₇ -4-oxo-3-fenil-2-tioxoimidazolidin-1-il]-NVP, 29	50
3.4.3.	Síntese do aduto 12-[5-isopropil-4-oxo-3-fluorescein-2-tioxoimidazolidin-1-il]-NVP, 22	50
3.5.	Comparação dos diferentes métodos de degradação de <i>N</i>-alquil Edman.....	51
3.5.1.	Comparação da intensidade dos dois sinais obtidos por análise de LC-ESI-MS de soluções padrão dos adutos 14 e 22	51
3.5.1.1.	Aduto padrão 14	51
3.5.1.2.	Aduto padrão 22	51
3.5.2.	Comparação da intensidade dois sinais obtidas por análise de LC-ESI-MS após degradação de <i>N</i> -alquil Edman da Hb isolada de doentes.....	52
3.5.2.1.	Usando como reagente derivatizante o isotiocianato de fluoresceína (FITC).....	52
3.5.2.2.	Usando como reagente derivatizante o fenil-isotiocianato (PITC).....	52
3.5.2.2.1.	Método I.....	52
3.5.2.2.2.	Método II.....	52

3.5.3. Análise do aduto 22 por cromatografia líquida acoplada a um detector de fluorescência (LC-FL).....	53
3.6. Optimização e Validação do método analítico.....	53
3.6.1. Preparação das soluções padrão stock, soluções de trabalho e soluções mãe.....	53
3.6.1.1. Aduto padrão 14	53
3.6.1.2. Padrão Interno 29	54
3.6.1.3. Curva de calibração.....	54
3.6.1.4. Preparação das soluções dopadas e soluções fortificadas.....	55
3.6.1.5. Avaliação da estabilidade.....	55
3.6.2. Determinação da exactidão e precisão do método.....	55
3.6.3. Determinação da recuperação e efeito matriz.....	56
3.6.4. Testes para melhorar a percentagem de recuperação.....	56
3.6.4.1. Extração em fase sólida (EFS) vs extracção líquido-líquido (ELL).....	56
3.6.4.2. Influência da polaridade do solvente utilizado para reconstituir os analitos.....	56
3.6.4.3. Influência da ordem de adição de um solvente aquoso ou orgânico após a evaporação do 2-propanol.....	57
3.6.4.4. Influência do 2-propanol no meio reaccional e o uso de ultrassons.....	57
3.6.4.5. Influência da quantidade de hemoglobina utilizada.....	57
3.7. Análise das amostras obtidas após aplicação do procedimento optimizado de degradação de <i>N</i>-alquil Edman a hemoglobinas isoladas de doentes.....	58
3.7.1. Procedimento para isolar a hemoglobina a partir das células vermelhas.....	58
3.7.2. Reacção de degradação de <i>N</i> -alquil Edman para as hemoglobinas dos doentes e soluções dopadas.....	58
4. Bibliografia.....	59

Índice de Figuras

Figura 1.1. Esquema dos mecanismos de bioativação e toxicidade. Adaptado de [17].....	5
Figura 2.1. Estruturas das hidantoínas 14 e 22	14
Figura 2.2. Espectro de ¹ H-NMR do aduto 22	16
Figura 2.3. Espectro de MS/MS do aduto 14	18
Figura 2.4. Espectros de excitação e emissão do aduto 22 em meio alcalino, pH >8.....	21
Figura 2.5. Espectros de excitação e emissão do aduto 22 em meio ácido, pH < 7.....	21
Figura 2.6. Estrutura do aduto deuterado utilizado como padrão interno 29	24
Figura 2.7. (A) Cromatograma iónico obtido por extracção do ião de m/z 499,1911 de uma solução dopada (188 ppb de aduto 14 contendo 90 ppb de padrão interno 29); (B) espectro de massa do aduto 14 , apresentando a distribuição isotópica.....	25
Figura 2.8. Primeira curva de calibração para as concentrações testadas numa gama de 0 – 940 ppb de solução padrão de aduto 14 contendo 90 ppb de padrão interno 29	26
Figura 2.9. Curva de calibração otimizada para as concentrações testadas numa gama de 0 – 940 ppb de solução padrão 14 contendo 90 ppb de padrão interno.....	35

Índice de Esquemas

Esquema 1.1. Estrutura da NVP (1), dos seus metabolitos de Fase I, 2-OH-NVP (2), 3-OH-NVP (3), 8-OH-NVP (4) e 12-OH-NVP (5), 4-carboxi-NVP (6) e dos conjugados com glutationa (GSH) (7 e 8) e <i>N</i> -Acetilcisteína (NAC) (9 e 10).....	3
Esquema 1.2. Metabolitos reactivos da NVP (1), 12-sulfoxi-NVP (12), e derivado quinóide 11, aduto com a hemoglobina 13, e aduto 14, detectado <i>in vivo</i> por LC-MS, após tratamento da Hb recolhida de doentes sob terapêutica com NVP por degradação de <i>N</i> -alquil Edman.....	6
Esquema 1.3. Reacção de degradação de <i>N</i> -alquil Edman utilizando o reagente derivatizante PFPITC, 15. A formação da hidantoina 16, leva à quebra da ligação com o resto da proteína não modificada 17.....	8
Esquema 1.4. Reacção de degradação de <i>N</i> -alquil Edman utilizando o reagente derivatizante PITC, 18. A formação da hidantoina 19, leva à quebra da ligação com o resto da proteína não modificada 17.....	8
Esquema 1.5. Reacção de degradação de <i>N</i> -alquil Edman utilizando o reagente derivatizante FITC, 20. A formação da hidantoina 21, leva à quebra da ligação com o resto da proteína não modificada 17.....	9
Esquema 2.1. Síntese do aduto com o FITC 22.....	15
Esquema 2.2. Síntese do aduto com o PITC 14.....	17
Esquema 2.3. Degradação de <i>N</i> -alquil Edman utilizando o FITC.....	19
Esquema 2.4. Degradação de <i>N</i> -alquil Edman utilizando o PITC, método I.....	20
Esquema 2.5. Degradação de <i>N</i> -alquil Edman utilizando o PITC, método II.....	20
Esquema 2.6. Síntese do padrão interno 29.....	22
Esquema 2.7. Procedimento experimental de degradação de <i>N</i> -alquil Edman dos adutos da valina terminal da Hb.....	24
Esquema 2.8. Descrição da metodologia experimental utilizada para estudar a recuperação.....	28
Esquema 2.9. Descrição da metodologia de degradação de <i>N</i> -alquil Edman otimizada.....	34

Índice de tabelas

Tabela 2.1. Resultados obtidos para a exactidão, precisão, recuperação e efeito matriz para o primeiro dia de inter dia.....	27
Tabela 2.2. Diferentes métodos de extracção e as suas respectivas recuperações.....	29
Tabela 2.3. Diferentes métodos de reconstituição e as suas respectivas recuperações.....	30
Tabela 2.4. Diferentes métodos de extracção e as suas respectivas recuperações.....	30
Tabela 2.5. Diferentes métodos de extracção com e sem a presença de 2-propanol no meio de extracção e as suas respectivas recuperações.....	31
Tabela 2.6. Diferentes métodos de extracção com e sem aquecimento a 60 °C, para diferentes quantidades de Hb e as suas respectivas recuperações.....	33
Tabela 2.7. Resultados obtidos para o primeiro dia dos ensaios inter e intra dia.....	37
Tabela 2.8. Resultados obtidos para o segundo dia dos ensaios inter e intra dia.....	38
Tabela 2.9. Resultados obtidos para o estudo de determinação do LLOQ.....	40
Tabela 2.10. Dados dos pacientes analisados e respectivas concentrações de aduto obtidas.....	41

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

2-OH-NVP	5,11-dihydro—2-hidroxi-4-metil-4 <i>H</i> -dipirido[3,2- <i>b</i> :2',3'- <i>e</i>]-[1,4]diazepina-6-ona, 2-hidroxi-NVP
3-OH-NVP	11-ciclopropil-5,11-di-hidro-3-hidroxi-4-metil-6 <i>H</i> -dipirido-[3,2- <i>b</i> :2',3'- <i>e</i>][1,4] diazepina-6-ona, 3-hidroxi-NVP
4-carboxi-NVP	Ácido 4-(11-ciclopropil-5,11-di-hidro-6 <i>H</i> -dipirido[3,2- <i>b</i> :2',3' <i>e</i>][1,4] diazepina-6-ona carboxílico
8-OH-NVP	11-ciclopropil-5,11-di-hidro-8-hidroxi-6 <i>H</i> -dipirido[3,2- <i>b</i> :2',3'- <i>e</i>][1,4] diazepina-6-ona, 8-hidroxi-NVP
12-MsO-NVP	11-ciclopropil-5,11-di-hidro-4-metil-(metanossulfoximetil)-6 <i>H</i> -dipirido[3,2- <i>b</i> :2',3'- <i>e</i>][1,4]diazepina-6-ona, 12-mesiloxi-NVP
12-OH-NVP	11-ciclopropil-5,11-di-hidro-4-(hidroximetil)-6 <i>H</i> -dipirido-[3,2- <i>b</i> :2',3'- <i>e</i>] diazepina-6-ona, 12-hidroxi-NVP
12-sulfoxi-NVP	11-ciclopropil-5,11-di-hidro-4-(sulfoximetil)-6 <i>H</i> -dipirido-[3,2- <i>b</i> :2',3'- <i>e</i>] diazepina-6-ona
AcOEt	Acetato de etilo
ACN	Acetonitrilo
cART	terapia combinatória anti-retroviral
c.c.	Cromatografia em coluna
c.c.f.	Cromatografia em camada fina
c.c.f.p.	Cromatografia em camada fina preparativa
CDC	Centro de Controlo e Prevenção de doenças
CE-LIF	Electroforese capilar acoplada a um detector laser de fluorescência induzida
CYP	Citocromo P450
CV	Coefficiente de variação, RSD
¹³ C-RMN	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
ELL	Extracção líquido-líquido
EM	Espectrometria de massa
Eq.	Equivalentes
EIC	Cromatograma Iónico Extraído
EMEA	Agência Europeia de Medicina
ESI	Ionização por electrospray

FDA	Administração de Alimentos e Fármacos da U.S.
FITC	Fenilisotiociano de fluoresceína
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a um detector de espectrometria de massa
GSH	Glutationa
Hb	Hemoglobina
HIV	Virus da Imunodeficiência Humana
HRMS	Espectrometria de massa de alta resolução
HSA	Albumina do soro humano
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta pressão acoplada a um detector de Diode Array
¹ H-RMN	Ressonância magnética nuclear de próton
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LC-FL	Cromatografia líquida acoplada a um detector de fluorescência
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a um detector de espectrometria de massa
LC/TOF-MS	Cromatografia líquida por tempo de voo acoplada a um detector de espectrometria de massa
LDA	Di-isopropilamido de lítio
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
LRMS	Espectrometria de massa de baixa resolução
<i>m</i>	Multiplete
Me	Metilo
MS/MS	Espectrometria de massa tandem
MoOPH	Complexo hexametilfosforamida(oxodiperoxido)(piridina)molibdênio
MsCl	Cloreto de mesilo
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
NAC	<i>N</i> -acetil cisteína
NNRTIs	Inibidor da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeos
NVP	Nevirapina
PFITC	Pentafluorofenil isotiocianato
PITC	Fenil isotocianato
ppb	Parte por bilhão
ppm	Parte por milhão
RSD	Desvio padrão relativo, CV
RMN	Ressonância magnética nuclear
<i>s</i>	Singuleto
S/N	Razão sinal/ruído

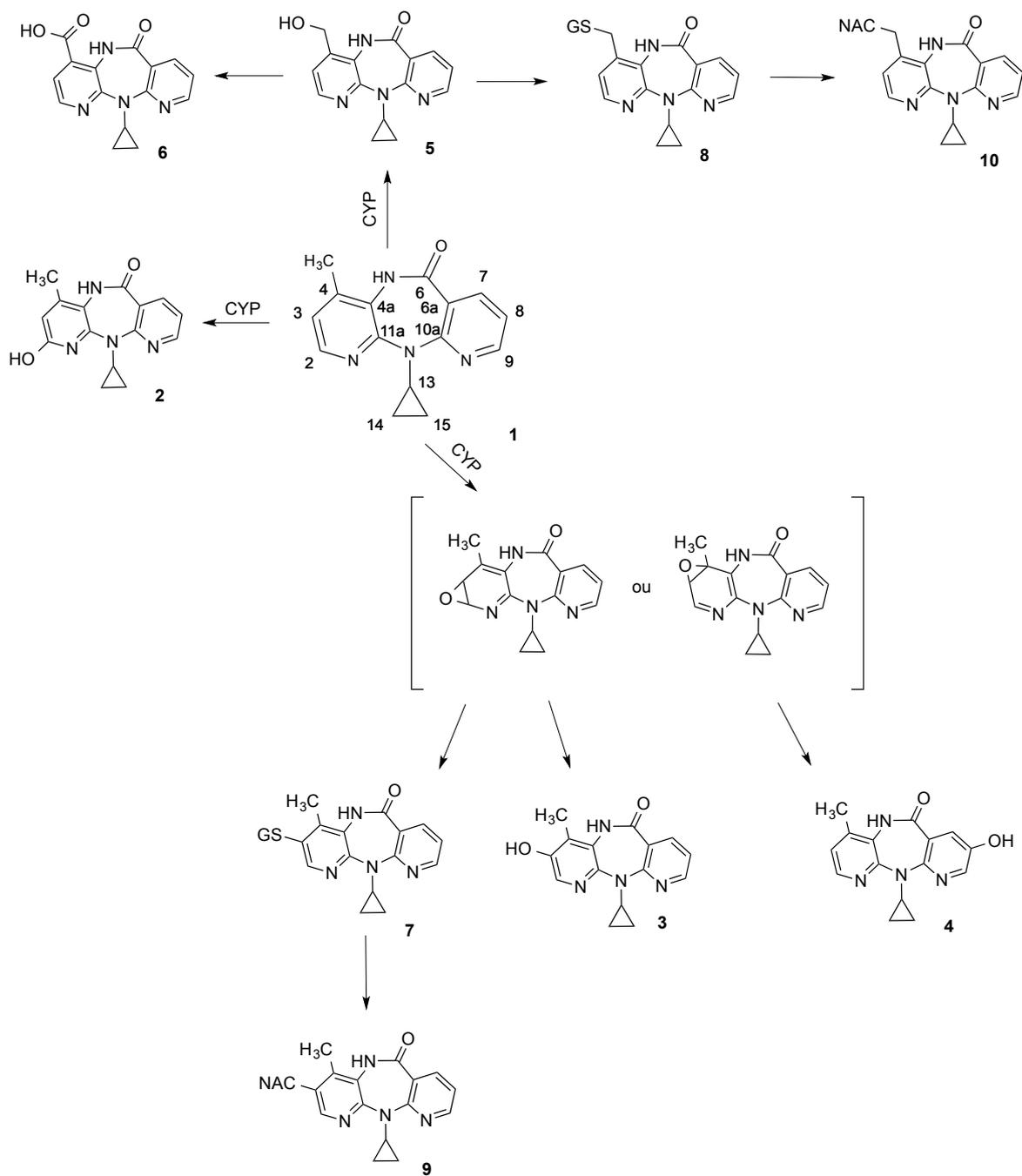
SPE	Extracção em fase sólida
t	Tripleto
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetra-hidrofurano
UV	Ultravioleta
Val-OEt	Valinato de etilo
δ	Desvio químico em relação ao tetrametilsilano

1. Introdução

1.1. Nevirapina

A nevirapina (11-ciclopropilo-5,11-di-hidro-4-metil-6H-dipirido[3,2-b:2',3'-e][1,4] diazepina-6-ona, **NVP, 1, Figura 1**) foi o primeiro inibidor da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeos (NNRTI) aprovado pela U.S. Food and Drug Administration (FDA). No entanto, presentemente a NVP continua a ser um dos NNRTIs mais utilizados globalmente, contribuindo para este facto diversos factores. Nomeadamente, o baixo custo e a sua existência sob a forma de genérico justificam o facto da NVP ser o NNRTI mais utilizado em países em desenvolvimento (onde o HIV é mais prevalente), sendo utilizado tanto na prevenção da transmissão vertical do vírus da imunodeficiência humana (HIV) de mães para filhos como também na terapia combinada antirretroviral (cART)^[1,2]. Adicionalmente, nos países desenvolvidos este continua ser o NNRTI de primeira linha indicado por norma para o tratamento de crianças com idade inferior a 3 anos.^[3] A alta eficácia deste fármaco, conjuntamente com o facto de ter um perfil lipídico favorável^[4] e de poder também ser utilizado durante a gravidez^[5], são factores adicionais que justificam a grande utilização da NVP nas estratégias terapêuticas anti-HIV.

Apesar da sua eficácia clínica, a utilização da NVP tem sido associada a eventos tóxicos, como hipersensibilidade cutânea^[6-8] e hepatotoxicidade^[9-11], que podem ser fatais e muitas vezes levam à descontinuação da terapia. Estes efeitos tóxicos ocorrem mais frequentemente nas primeiras seis semanas de toma do fármaco e têm uma incidência maior em mulheres com contagem de células CD4 superiores a 250 células/mL^[12]



Esquema 1.1. Estrutura da NVP (1), dos seus metabolitos de Fase I, 2-OH-NVP (2), 3-OH-NVP (3), 8-OH-NVP (4) e 12-OH-NVP (5), 4-carboxi-NVP (6) e dos conjugados com glutationa (GS) (7 e 8) e N-Acetilcisteína (NAC) (9 e 10).

1.2. Biotransformação

O fígado recebe cerca de 80 % da corrente sanguínea pelo percurso gastrointestinal e é um dos maiores responsáveis pelas biotransformações de Fase I e Fase II.^[13] A biotransformação da NVP ocorre por interacção com as enzimas do sistema citocromo P450 (CYP) que conduz à formação de metabolitos hidroxilados, nas posições aromáticas (2-, 3-, e 8-hidroxi-NVP) (**2-4, Esquema 1**) e na posição C12 da NVP, 12-OH-NVP (**5**). Ocorre ainda a formação do metabolito 4-carboxi-NVP (**6**), por oxidação secundária do metabolito 12-OH-NVP. A formação dos diferentes metabolitos hidroxilados está associada a diferentes isoformas do CYP. A formação do metabolito 2-OH-NVP e 3-OH-NVP é mediada exclusivamente pelo CYP3A e pelo CYP2B6, respectivamente, enquanto que o metabolito 8-OH-NVP é mediado por um grupo de subfamílias CYP3A4, CYP2B6 e CYP2D6. A formação do metabolito 12-OH-NVP é mediada pelo CYP3A4 e pensa-se também ser mediada pelo CYP2D6 e CYP2C9. As enzimas envolvidas na formação do metabolito 4-carboxi-NVP ainda são desconhecidas. Todos os metabolitos hidroxilados da NVP formam conjugados glucurónidos que são posteriormente eliminados por via urinária.^[14]

1.3. Bioactivação e Toxicidade

Muito embora o metabolismo/biotransformação tenha como objetivo fundamental transformar o fármaco em metabolitos mais hidrofílicos, de modo a poder promover a sua excreção, muitas vezes ocorre também bioactivação. Este processo consiste na formação de metabolitos reactivos capazes de reagir com bionucleófilos (DNA ou proteínas), formando adutos covalentes que poderão estar na génese de eventos tóxicos como a carcinogenicidade (no caso dos adutos de DNA) ou reacções imunogénicas (no caso da formação de adutos com proteínas) (**Figura 1**). Efectivamente, a bioactivação de metabolitos reactivos constitui um dos mecanismos mais frequentes na toxicidade induzida por fármacos.^[13,14]

Apesar de não se saber exactamente qual/ais o/os mecanismo/s envolvido/s nas reacções adversas induzidas pela NVP, vários estudos indicam a possibilidade do envolvimento da bioactivação deste fármaco.^[15,16]

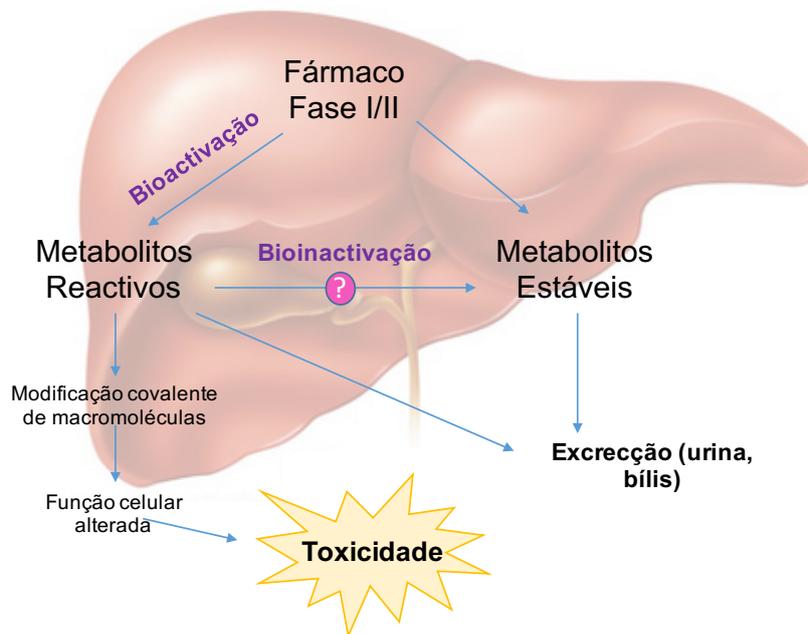
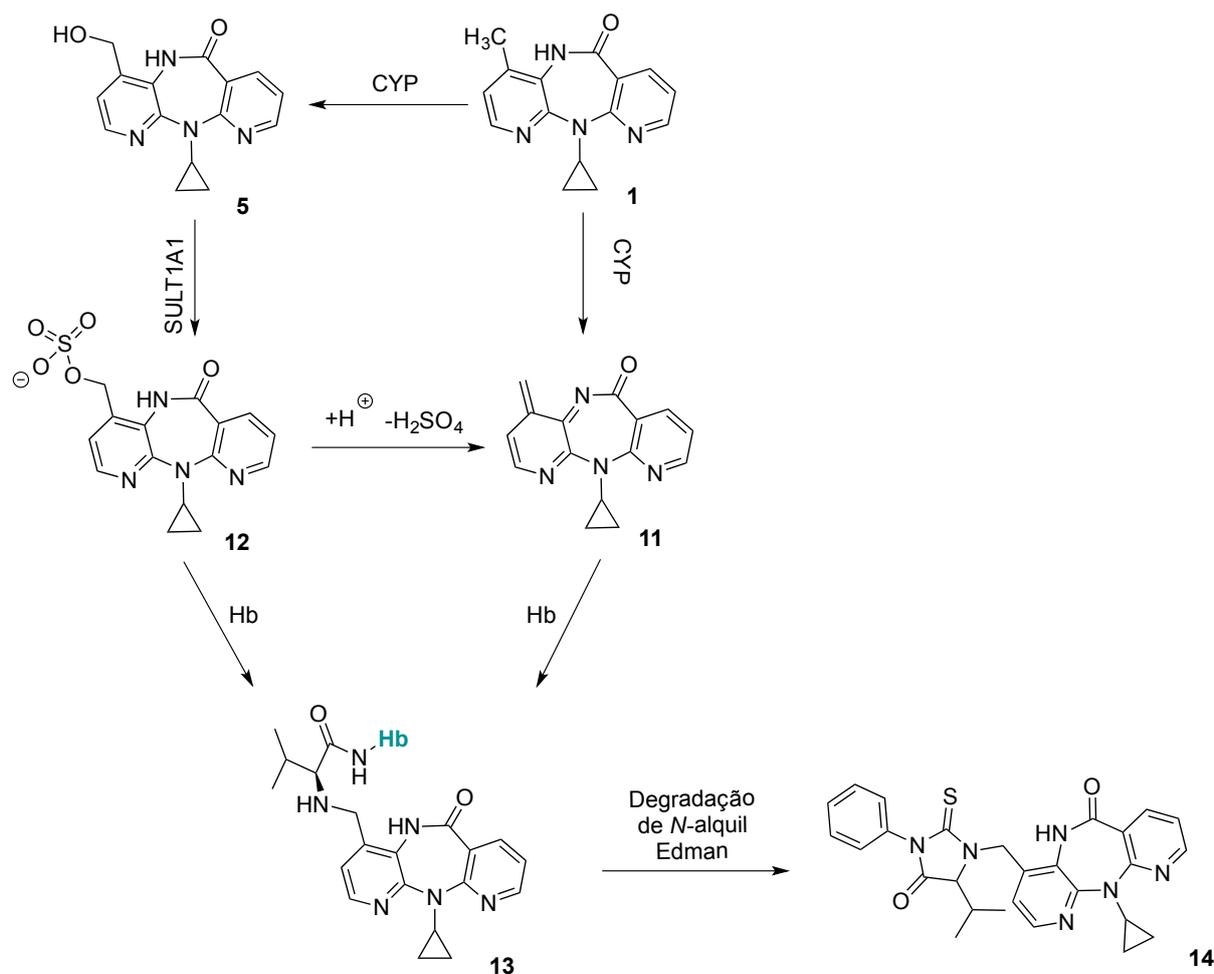


Figura 1.1. Esquema dos mecanismos de bioativação e toxicidade. Adaptado de ^[17].

A primeira evidência de bioativação metabólica da NVP foi obtida através da análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) de urina de doentes sob terapia com NVP, onde foram detectados os mercapturatos na posição C3 da NVP (**9**) (maioritário) e na posição C-12 (minoritário) (**10**).^[14] Muito embora estes resultados sugiram a formação de metabolitos reactivos tanto na posição fenólica como na posição C12 da NVP, é esta última via de bioativação que tem sido mais frequentemente ligada à indução de reacção adversas pela NVP: 1) o metabolito de Fase II do 12-OH-NVP (**5**), o 12-sulfoxi-NVP (**12**) (**Esquema 1**), identificado na urina e plasma de ratos,^[14,18] foi sugerido como sendo responsável pela hipersensibilidade cutânea induzida pela NVP^[19]; 2) a formação do derivado quinóide **11**, que pode ser gerado por desidratação da NVP ou a partir do metabolito **9**, foi sugerido estar envolvido nas reacções de hepatotoxicidade.^[20]



Esquema 1.2. Metabólitos reactivos da NVP (**1**), 12-sulfoxi-NVP (**12**), e derivado quinóide **11**, aduto com a hemoglobina **13**, e aduto **14**, detectado *in vivo* por LC-MS, após tratamento da Hb recolhida de doentes sob terapêutica com NVP por degradação de *N*-alquil Edman.

A primeira evidência de que os metabólitos reactivos **11** e/ou **12** subsistem tempo suficiente *in vivo* para reagir com bionucleófilos foi dado por Caixas *et al.*(2012)^[21] Estes autores detectaram o aduto **14** (**Esquema 2**) após tratamento da hemoglobina (Hb) isolada de doentes sob terapêutica com NVP, por degradação de *N*-alquil Edman seguida por análise de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa de tandem (LC-MS/MS), por comparação com padrão sintético. Efectivamente, este aduto poderá ser formado por ataque nucleófilo da valina *N*-terminal da Hb aos metabólitos **11** e **12**. Embora este trabalho tenha tido um papel muito importante provando que a NVP pode efectivamente ser bioactivada a espécies reactivas susceptíveis de reagirem com bionucleófilos, não permitiu o estabelecimento de correlações entre a formação destes adutos e o diagnóstico de eventos tóxicos induzidos pela NVP, ou a identificação de factores de risco, dado o reduzido número de amostras analisadas e falta de validação do método analítico utilizado. Posteriormente, a detecção de um aduto compatível com a ligação da Histidina 146 da albumina do soro humano (HSA) com a posição C12 NVP^[22] veio corroborar os resultados anteriormente obtidos por Caixas *et al.*(2012) Muito embora as

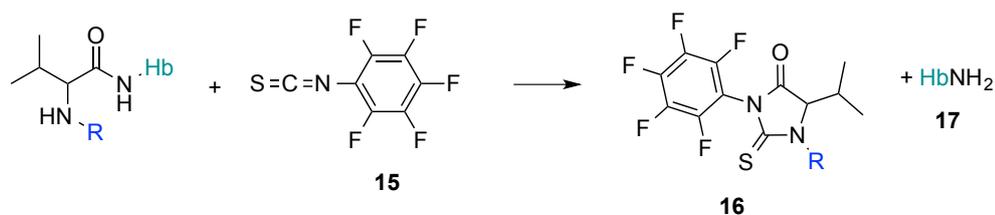
abordagens analíticas usadas por estes dois grupos de investigação sejam adequadas para a detecção de adutos, para efeitos de quantificação, necessária para o estabelecimento de relações risco-benefício e a identificação de factores de risco, o método usado por Caixas *et al.*(2012) será mais adequado não só devido à maior simplicidade do método de tratamento da proteína após recolha como também devido à existência de padrões sintéticos da hidantoína, 14.

1.4. Metodologias de detecção e quantificação de adutos formados com a valina terminal da hemoglobina

Os metabolitos reactivos (em geral espécies electrofilicas), provenientes da bioactivação dos fármacos, são compostos químicos com um período de vida muito curto e, conseqüentemente, torna-se difícil a sua detecção *in vivo*. Por outro lado, por serem espécies extremamente reactivas conseguem estabelecer ligações covalentes com biomacromoléculas (proteínas, lípidos e DNA), formando adutos estáveis, com tempos de vida longos, tornando possível a sua detecção e quantificação *in vivo*.^[23,24] A importância de se poder detectar e quantificar estes adutos deve-se à necessidade de monitorizar a exposição de tecidos ou órgãos a um determinado agente tóxico. Os adutos formados com as proteínas da Hb e da HSA são frequentemente utilizados para monitorizar a exposição a agentes tóxicos por serem facilmente obtidas em grandes quantidades por métodos não invasivos. A recolha de 1 mL de sangue gera aproximadamente 150 mg de Hb (obtida a partir das células vermelhas) e 30 mg de HSA. O tempo de vida relativamente elevado destas duas proteínas e o facto de os adutos de proteína não serem reparados, tal como acontece com os adutos de DNA, são factores adicionais que contribuem para a acumulação dos adutos ao longo do tempo facilitando a sua monitorização.^[23]

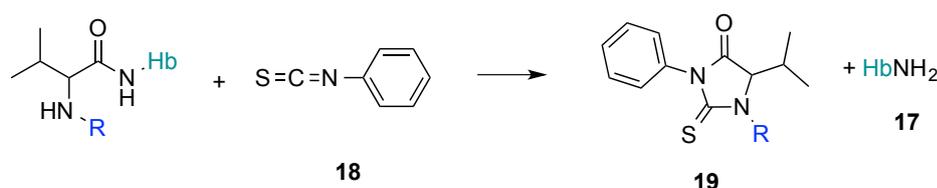
A grande utilização dos adutos de Hb para a monitorização da exposição a agentes químicos^[24-26] deve-se em grande parte ao desenvolvimento do método de degradação de *N*-alquil Edman. Este é um método químico que, mediante a utilização de um isotiocianato como agente derivatizante, permite destacar selectivamente os adutos formados com a valina *N*-terminal da Hb sob a forma de hidantoínas que são analisadas por recurso a técnica hifenada de cromatografia com detecção por espectrometria de massa.^[27,28] Uma vantagem adicional deste método prende-se com a simplicidade da metodologia e a possibilidade de extrair selectivamente as hidantoínas formadas para um solvente orgânico, o que minimiza as interferências da matriz e possibilita a detecção destes adutos com níveis elevados de sensibilidade por métodos de detecção por espectrometria de massa. O sucesso da utilização desta metodologia para monitorizar a bioativação de agentes tóxicos deve-se também maioritariamente à grande acessibilidade dos resíduos valina *N*-terminais da Hb a diferentes xenobióticos e ao facto de uma grande fracção destes resíduos estar sob a forma não ionizada (portanto nucleófila) no pH do sangue, o que justifica a grande reactividade destes resíduos com espécies reactivas electrófilas.^[23]

A metodologia de degradação de *N*-alquil Edman desenvolvida inicialmente consistia na detecção e quantificação dos adutos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). Dada a necessidade de volatilizar a amostra, inerente ao método analítico utilizado o reagente derivatizante utilizado era o pentafluorofenil isotiocianato (PFPIITC, **15**, **Esquema 3**). Devido às propriedades químicas das moléculas a monitorizar, tornava-se, por vezes, necessário derivatizar novamente a molécula por acetilação ou sililação, tornando o método longo e demorado.^[29,30]



Esquema 1.3. Reacção de degradação de *N*-alquil Edman utilizando o reagente derivatizante PFPIITC **15**. A formação da hidantoina **16**, leva à quebra da ligação com o resto da proteína não modificada **17**.

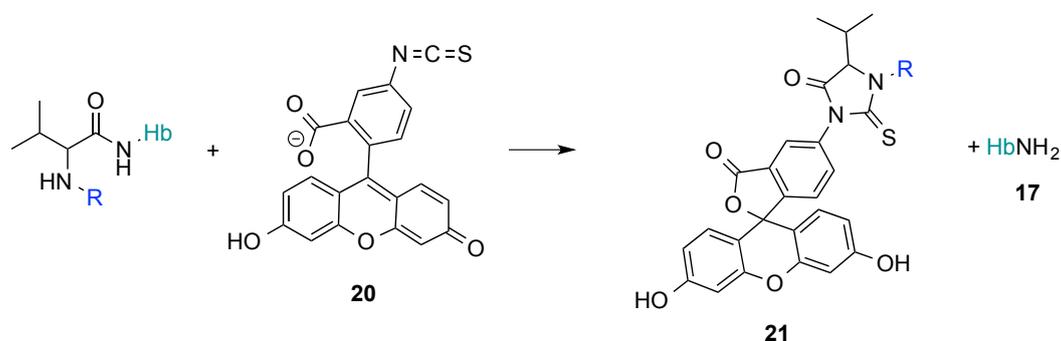
Apesar do método por GC-MS apresentar uma sensibilidade muito alta, devido às características obrigatórias para uma análise por cromatografia gasosa (as moléculas serem voláteis, apolares e termo estáveis), existiam dificuldades em analisar alguns analitos. Desta forma, o desenvolvimento de um método analítico por cromatografia líquida de alta resolução-espectrometria de massa (LC-MS), resultou no método modificado de degradação de *N*-alquil Edman, com análises mais rápidas e abrangentes a uma variedade de moléculas polares e não voláteis. Este método, utiliza como agente derivatizante o fenilisotiocianato (PITC, **18**, **Esquema 4**) e o método de preparação das amostras consiste numa extracção por fase sólida (SPE) que pode ser automatizada.^[31,32]



Esquema 1.4. Reacção de degradação de *N*-alquil Edman utilizando o reagente derivatizante PITC **18**. A formação da hidantoina **19**, leva à quebra da ligação com o resto da proteína não modificada **17**.

Com o aperfeiçoamento da metodologia analítica por LC-MS para quantificar adutos com a valina *N*-terminal da Hb, testou-se a utilização de diferentes agentes derivatizantes para aumentar a sensibilidade do método.^[30] A utilização do reagente derivatizante fenilisotiocianato de fluoresceína (FITC, **20**, **Esquema 5**) resultou no desenvolvimento do procedimento de FIRE®.^[33] Segundo vários estudos, o reagente FITC apresentava uma sensibilidade muito superior à dos reagentes PITC e

PFPIITC.^[29,34] A utilização do reagente FITC para a formação da hidantoína, conferia à molécula uma característica fluorescente que lhe permitia ser analisada tanto por LC-MS como por electroforese capilar acoplada a um detector de fluorescência induzida por laser (CE-LIF).^[23]



Esquema 1.5. Reacção de degradação de *N*-alquil Edman utilizando o reagente derivativante FITC **20**. A formação da hidantoína **21**, leva à quebra da ligação com o resto da proteína não modificada **17**.

1.5. Metodologia de detecção e quantificação por espectrometria de massa de alta resolução

Nos últimos anos, a espectrometria de massa de alta resolução (HRMS) é cada vez mais utilizada para variados tipos de aplicações, sejam elas na área ambiental^[35], alimentar^[36] ou clínica (metabolómica)^[37]. Esta técnica permite utilizar a aquisição em modo full-scan com alta sensibilidade, combinada com alto poder de resolução (>50000 FWHM) e medição de massa exacta (1-5 ppm).^[36] A utilização de HRMS permite análises rápidas, selectivas e robustas para aplicações qualitativas e quantitativas.^[35] A possibilidade de guardar grande volume de informação de dados obtidos do full scan e a obtenção de espectros de MS/MS dependentes dos dados com elevada exactidão de massa, o que permite uma análise retrospectiva, são alguns dos benefícios da utilização de HRMS. A robusteza da análise em full-scan depende maioritariamente da estabilidade da exactidão da massa, da precisão e do poder de resolução em termos de ser capaz de distinguir espécies isobáricas. A confirmação da identidade de cada analito é obtida através da sua massa exacta e da informação isotópica do ião molecular, que estão directamente disponíveis na aquisição de full-scan. A informação do espectro de massa dos iões fragmentados, pode ser adquirida utilizando funções específicas.^[35] A abordagem mais comum utilizada nos aparelhos de Q-TOF/MS baseia-se em aquisições dependentes dos dados, para produzir espectros de MS/MS de alta qualidade. Numa primeira fase de filtração, os iões percursoros são isolados e depois são fragmentados selectivamente.^[38]

As regras mais comuns aplicadas para confirmar a presença do composto alvo nas amostras analisadas são:^[35]

1. Detecção da massa exacta com imprecisão até 5 ppm;
2. Tempo de retenção do composto analisado não pode variar mais de 2,5 % do tempo de retenção do padrão;
3. Perfil isotópico de acordo com a composição elementar;
4. Fragmentos característicos do composto analisado.

Assumindo que o poder de resolução é suficientemente alto para se obter a selectividade necessária, as variáveis a serem avaliadas para a validação do método são muito similares às de espectrometria de massa de baixa resolução (MS).^[35] Em HRMS, a quantificação é feita através da construção de uma curva de calibração, numa gama linear de concentrações de padrão do metabolito a analisar. As concentrações de metabolito são estimadas pelas áreas obtidas do padrão em full-scan *versus* as áreas obtidas do padrão interno. O limite de quantificação (LOQ) é determinado pela concentração de metabolito à qual a razão de sinal/ruído (S/N) é igual a 10 e o limite de detecção (LOD) é determinado pela concentração de metabolito à qual a razão de sinal/ruído (S/N) é igual a 3.^[37]

1.6. Validação dos métodos analíticos

A validação de um método analítico é o procedimento no qual é provado, através de estudos laboratoriais, que as características de execução do procedimento correspondem às exigências das aplicações analíticas pretendidas. Estas exigências são determinadas por regras estabelecidas por entidades como a FDA^[39] e a European Medicines Agency (EMA)^[40]. Os critérios e parâmetros, abaixo descritos, são as regras estabelecidas pela FDA e EMA, utilizadas para certificar que foi validado um método de quantificação.

- **Exactidão**

A exactidão de um método analítico descreve a proximidade do valor determinado, obtido pelo método analítico, em relação ao valor de referência.^[41] É determinada pela análise de réplicas de amostras padrão com concentrações conhecidas. A exactidão deve ser analisada, no mínimo, com três níveis diferentes de concentração. Cada concentração deve ser analisada, no mínimo, cinco vezes. O valor médio determinado para cada concentração deve estar dentro dos 15 % do valor real, excepto para o LOQ, que não deve desviar mais do que os 20 %.^[39] O desvio do valor determinado em relação ao valor de referência serve como medida de exactidão.

- **Precisão**

A precisão descreve a proximidade das medições individuais repetidas do analito. É usualmente

expressa como variação, desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV). A precisão do método deve ser analisada, no mínimo, com três níveis diferentes de concentrações na gama de concentrações esperadas. Cada concentração deve ser analisada, no mínimo, cinco vezes. A precisão determinada para cada nível de concentração não deve exceder os 15 % do coeficiente de variação (CV), excepto para o LOQ, que não deve exceder os 20 %.^[39]

- **Recuperação**

A recuperação é definida como a fracção de analito recuperado após adição de uma quantidade conhecida do mesmo na amostra, e é utilizada para a medição da eficácia do método analítico. A recuperação do analito não necessita ser 100 %, no entanto, a concentração extraída de analito e de padrão interno deve ser consistente e reprodutível. As análises das recuperações devem ser feitas por comparação dos resultados analíticos de 3 soluções dopadas com diferentes concentrações (baixa, média e alta) com amostras fortificadas com padrão interno que representam 100 % de recuperação (eq. 1).^[39]

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Média das áreas obtidas de padrão interno das soluções Dopadas}}{\text{Média das áreas obtidas de padrão interno das soluções Fortificadas}} \quad (\text{Eq. 1})$$

- **Linearidade**

A linearidade de um método analítico é a capacidade de obter resultados de teste que são directamente proporcionais à concentração de analito na amostra. Para a determinação da linearidade são recomendadas, pelo menos, cinco concentrações de padrão.^[42] Os padrões fazem parte da curva de calibração. A curva de calibração determina a relação entre a resposta do instrumento e as concentrações conhecidas do analito.^[39]

- **Sensibilidade**

A sensibilidade do método é definida pela concentração mínima medida com limite aceitável de exactidão e precisão^[43], sendo expressa como limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ). O LOD é a quantidade mínima de analito na amostra que pode ser detectado sendo determinado pela concentração de metabolito à qual a razão de sinal/ruído (S/N) é igual a 3. O LOQ é determinado pela concentração de metabolito à qual a razão de sinal/ruído (S/N) é igual a 10.^[37]

- **Selectividade**

A selectividade é a capacidade do método analítico de diferenciar e quantificar o analito na presença de outros componentes da amostra.^[39] Amostras de brancos da matriz biológica adequada (soro, urina, plasma, ou outras matrizes) devem ser analisadas e obtidas a partir de

pelo menos seis fontes diferentes. Cada amostra de branco deve ser testada no que respeita a interferentes ao nível do LOQ assegurando assim a selectividade do método analítico.

- **Efeito Matriz**

O efeito matriz é definido como a supressão do sinal do analito que ocorre devido a outros componentes da matriz da amostra que comprometem a reprodutibilidade, linearidade e exactidão do método analítico (eq. 2).^[45,46] Os compostos da matriz competem com os iões do analito durante o processo de ionização, influenciando a eficiência de ionização do analito.^[47] Para minimizar os efeitos da matriz, várias abordagens podem ser aplicadas para melhorar as diversas etapas do processo analítico, incluindo a preparação da amostra, a separação por LC e a detecção por MS.^[38]

$$\text{Efeito Matriz (\%)} = 1 - \frac{\text{Média das áreas obtidas de padrão interno das Soluções Fortificadas}}{\text{Média das áreas obtidas de padrão interno das Soluções Padrão}} \quad (\text{eq. 2})$$

1.7. Objectivo do trabalho

Pretendeu-se desenvolver e validar um método analítico para quantificação de adutos da NVP formados com a valina terminal da Hb por cromatografia líquida acoplada a um espectrómetro de massa de alta resolução (LC-HRMS). Para tal, foi necessário otimizar o procedimento de *N*-alquil Edman, por comparação das sensibilidades de dois adutos de NVP com isotiocianatos diferentes, o FITC e o PITC, por LC-ESI-MS.

No final, pretendeu-se ainda quantificar adutos da NVP formados com a valina terminal da Hb, de amostras de doentes infectados com HIV.

2. Discussão de Resultados

2.1. Avaliação da utilização dos agentes de derivatização fenilisotiocianato e isotiocianato de fluoresceína (FTIC), na metodologia de degradação de *N*-alquilo Edman para a detecção dos adutos formados entre o carbono C-12 da nevirapina e a valina *N*-terminal da Hemoglobina

Uma vez que a sensibilidade dos métodos de detecção por LC-MS das hidantoínas obtidas de degradação de *N*-alquilo Edman depende largamente do tipo de isotiocianato utilizado^[30] surgiu a necessidade de estudar qual o isotiocianato mais adequado para a detecção dos adutos formados na posição C-12 da NVP. Para tal, sintetizaram-se os dois adutos padrão, 12-[5-Isopropil-4-oxo-3-fenil-2-tioxiimidazolidin-1-il]-NVP **14** e 12-[5-isopropil-4-oxo-3-fluoresceína-2-tioxiimidazolidin-1-il]-NVP **22** (**Figura 2**), correspondentes às hidantoínas obtidas por utilização de PITC e FTIC, respectivamente, na degradação de *N*-alquil Edman dos adutos formados entre a valina *N*-terminal da Hb e a posição C-12 da NVP. Posteriormente fez-se uma análise comparativa das sensibilidades obtidas por análise em LC-ESI-MS de soluções padrão preparadas a partir dos padrões sintéticos. Avaliou-se ainda a possibilidade da aplicação da metodologia de cromatografia líquida por detecção por fluorescência (LC-FL) para a identificações do aduto **22** na gama de concentrações expectáveis *in vivo* (0,5 a 5 ppb). Por último, comparou-se ainda a sensibilidade relativa obtida mediante a utilização destes dois agentes de derivatização na análise dos adutos formados com a Hb de um doente sob terapia com NVP.

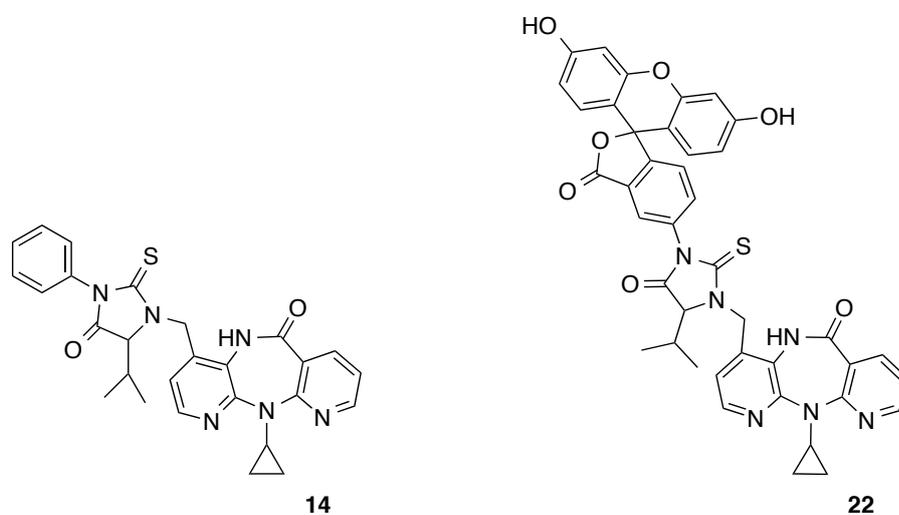
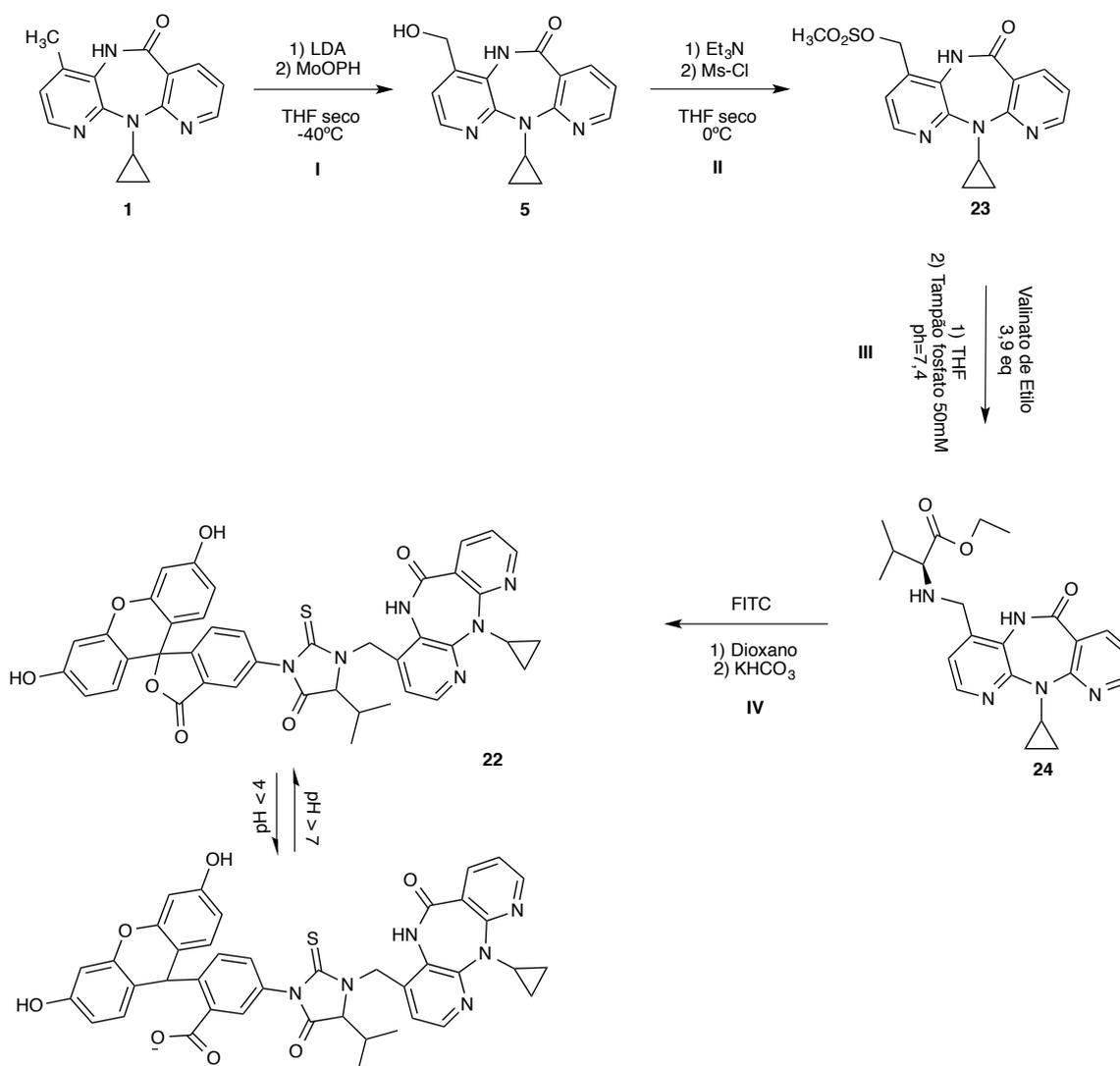


Figura 2.1. Estruturas das hidantoínas **14** e **22**.

2.1.1. Síntese e caracterização aduto 12-[5-isopropil-4-oxo-3-fluoresceína-2-tioimidazolidin-1-il]-NVP (22).

Para a síntese do padrão da hidantoína **22**, seguiu-se uma metodologia similar à já utilizada para a preparação da hidantoína **14**,^[48] que envolve quatro passos reaccionais (**Esquema 6**):

- I. Oxidação da NVP (**1**) ao metabolito 12-OH-NVP (**5**)
- II. Mesilação do metabolito 12-OH-NVP (**5**)
- III. Substituição nucleofílica do éster ao modelo electrófilo **23**
- IV. Reacção de degradação de *N*-alquil Edman do aduto **24**.



Esquema 2.1. Síntese do aduto com o FITC **22**.

A reacção de oxidação da NVP ao metabolito, 12-OH-NVP (**5**), foi efectuada por um procedimento anteriormente descrito^[49], envolvendo a formação *in situ* dos aniões na posição 12 da NVP, por adição de um excesso de di-isopropilamido de lítio (LDA) à NVP dissolvida em THF. A formação do anião na posição 12 é termodinamicamente favorecida, pelo que a sua formação é conseguida com um controlo da temperatura. De seguida, o anião é directamente oxidado pela adição do agente oxidante MoOPH. O produto obtido foi purificado por cromatografia em coluna, obtendo-se um rendimento de 43 %. A formação do modelo electrófilo **23**, a partir do metabolito 12-OH-NVP (**5**) foi efectuada adoptando um método já descrito^[50], envolvendo a utilização de cloreto de metanossulfonilo na presença de uma quantidade equimolar de trietilamina.

A reacção do valinato de etilo com o modelo electrófilo **23**, decorreu de acordo com um procedimento já descrito na literatura^[48], envolvendo inicialmente a libertação da base conjugada do hidrocloreto do éster por reacção com carbonato de potássio em tampão fosfato 50 mM pH = 7,4, seguida de incubação a 37°C durante 3 dias com o modelo electrófilo **23**.

Para a formação da hidantoína **22**, efectuou-se a reacção do produto **24**, com um excesso de FITC em meio básico, na presença de hidrogenocarbonato de potássio, numa solução de dioxano, à temperatura ambiente. Incubou-se a mistura reaccional a 60°C durante 72 h. O produto foi isolado e purificado por cromatografia em camada fina preparativa (c.c.f.p.), tendo-se obtido um rendimento de 5,5 %. O produto foi analisado por LC-ESI-MS e por RMN (¹H-RMN e ¹³C-RMN). Na análise por LC-ESI-MS obteve-se um sinal a m/z 753, correspondente à molécula protonada da hidantoína **22**. Os espectros de RMN obtidos (¹H RMN, HSQC e HMBC) confirmam a presença das unidades de NVP e da hidantoína (**Figura 3**). Devido à pequena quantidade de aduto formado não foi possível obter-se o espectro de carbono. Contudo, os sinais de carbono foram extrapolados através da análise dos espectros bidimensionais de HSQC e HMBC.

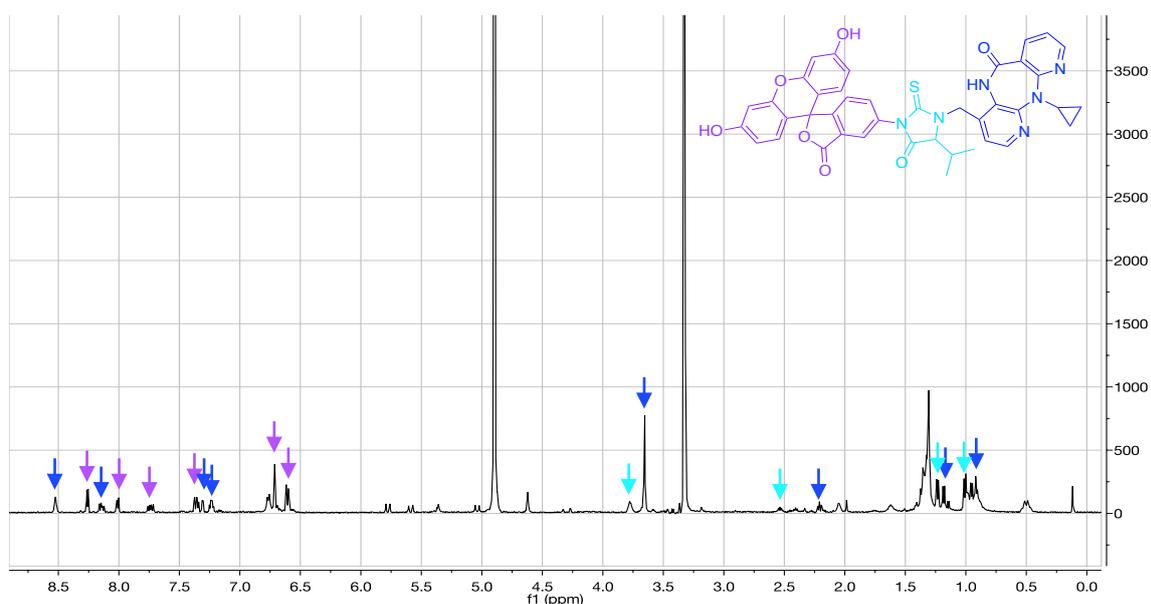
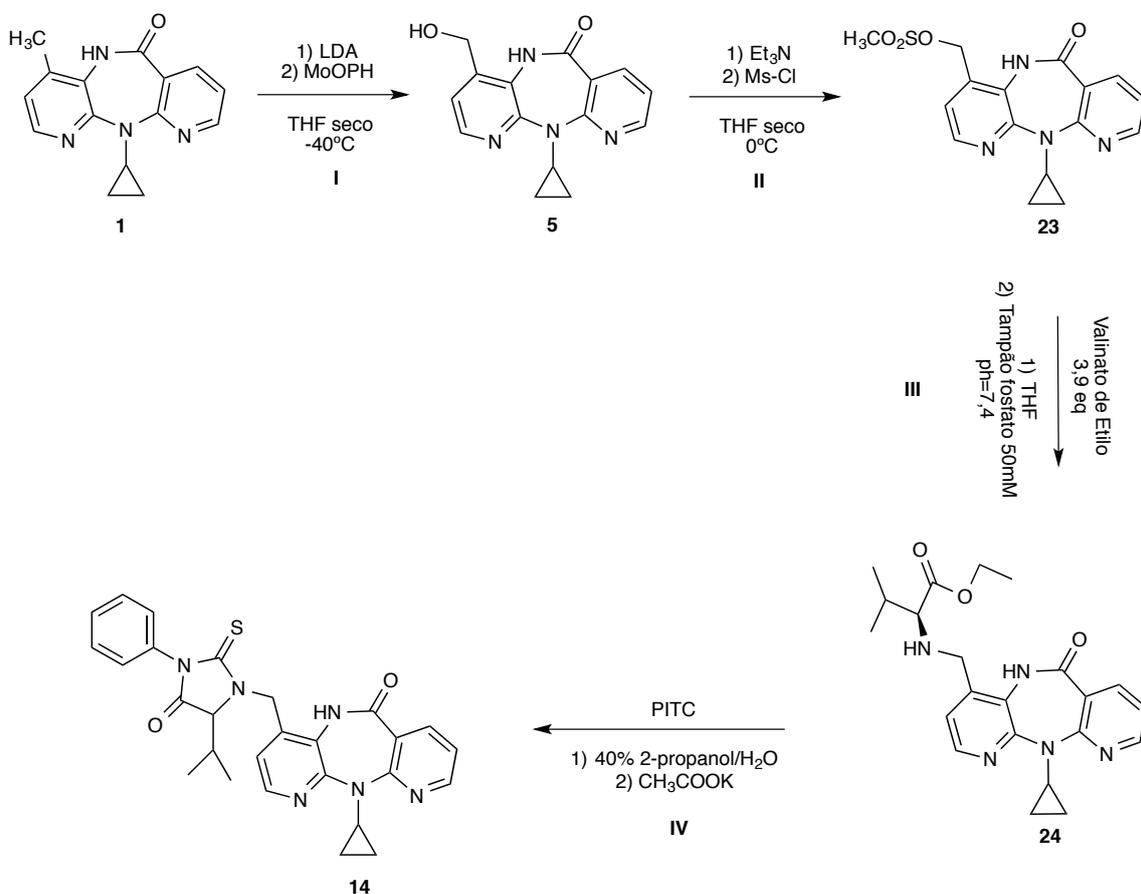


Figura 2.2. Espectro de ¹H-NMR do aduto **22**.

2.1.2. Síntese e caracterização do 12-[5-isopropil-4-oxo-3-fenil-2-tioimidazolidin-1-il]-NVP (14).



Esquema 2.2. Síntese do aduto com o PITC **14**.

A síntese do aduto **14** foi efectuada por uma metodologia similar ao descrito em Antunes *et al.*^[48], sendo similar à metodologia utilizada para a síntese de **22**, nos passos, I, II e III. Para a formação da hidantoína **14**, utilizaram-se condições idênticas às descritas por Bjellaas *et al.*^[32] Efectuou-se a reacção do produto **24**, com um excesso de PITC em meio básico e na presença de acetato de potássio, numa solução de 2-propanol (40 %) em água, à temperatura ambiente. Após 18 h, a mistura reaccional foi analisada por HPLC-DAD, tendo-se observado existir ainda material de partida por reagir. Assim, para promover o consumo total do material de partida incubou-se a mistura reaccional a 45°C durante 2 h. O produto foi purificado por HPLC semi-preparativo, tendo-se obtido com um rendimento de 29 %. Quando o composto foi analisado por LC-ESI-MS obteve-se um sinal a m/z 499 que corresponde à massa da molécula protonada. Quando analisado por espectrometria de massa de tandem (MS/MS) obteve-se um padrão de fragmentação idêntico ao anteriormente descrito^[21]. O fragmento a m/z 265 correspondente à perda da unidade de NVP a partir da molécula protonada do aduto **14**. A análise por

MS³ deste fragmento gerou dois fragmentos a m/z 237 e 223 correspondentes à perda dos grupos carbonilo e ciclopropilo, respectivamente, a partir do fragmento a m/z 265.

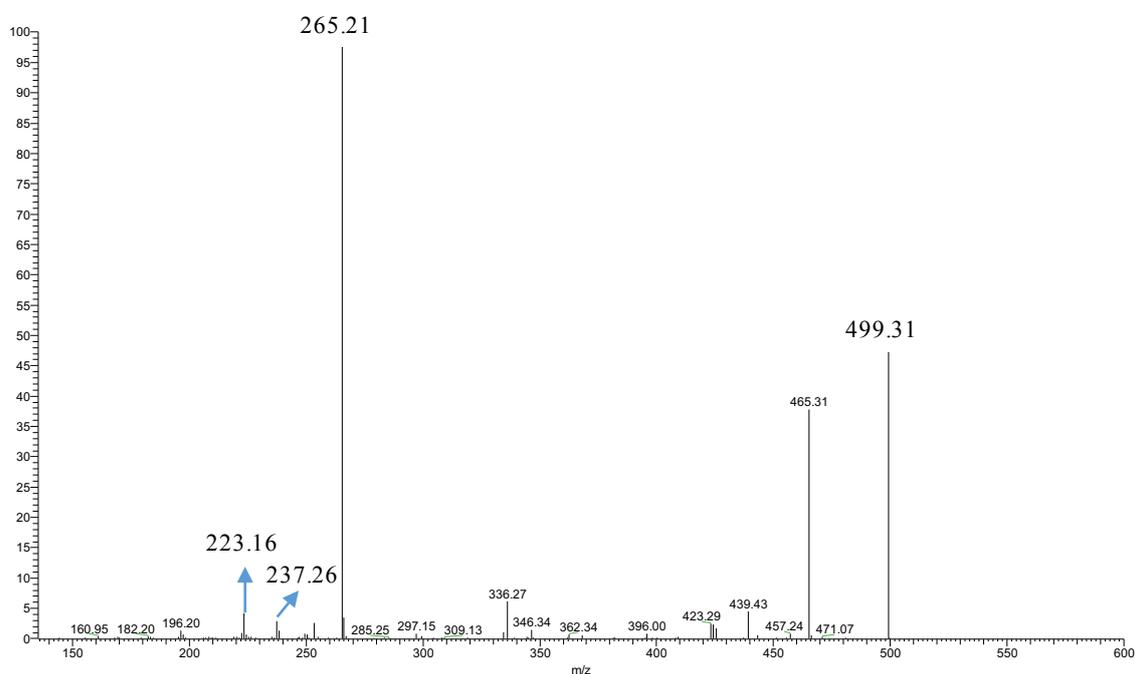


Figura 2.3. Espectro de MS/MS do aduto **14**.

2.1.3 Comparação dos resultados obtidos por análise de LC-ESI-MS de soluções padrão dos adutos **14** e **22**.

Tendo em conta as concentrações de aduto **14** detectadas em Caixas *et al.*^[21], entre 0,5 ppb e 5 ppb, para a análise da sensibilidade dos adutos **14** e **22** por LC-ESI-MS, prepararam-se duas soluções de concentrações diferentes (0,5 e 5 ppb) a partir de uma solução padrão stock de aduto **14** e **22**, de concentração 0,5 mg/mL. As soluções padrão foram analisadas por MS/MS do ião a m/z 499 e 753, por ordem crescente de concentração. Os sinais obtidos por análise do aduto **14** apresentavam uma área considerável mesmo para a concentração mais baixa de 0,5 ppb. No entanto, a análise do aduto **22** não revelou qualquer sinal nesta gama de concentrações. Apenas se conseguiu detectar sinal para o aduto **22**, quando se analisou a solução mãe de aduto com concentração de 0,5 mg/mL. Os resultados obtidos permitiram concluir que a ionização do aduto **22** é muito menos efectiva em relação ao aduto **14**, nas condições de análise, muito provavelmente devido à estabilidade da molécula **22**.

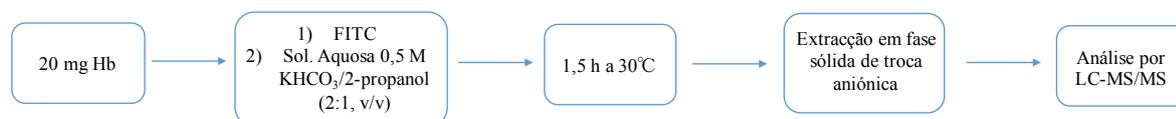
2.1.4. Comparação do método de degradação de *N*-alquil Edman utilizando fenilisotiocianato e isotiocianato de fluoresceína, na análise LC-MS de adutos de nevirapina formados com a hemoglobina isolada de doentes sob terapêutica com este fármaco.

Apesar de nas soluções padrão de aduto **22** não se ter observado sinal na gama de concentrações onde foram detectados os adutos por Caixas *et al.*(2012)^[21], procedeu-se à análise de uma amostra de um doente infectado com HIV. Como o procedimento de degradação de *N*-alquil Edman utilizando o FITC, para amostras de Hb isolada de doentes, incluiu um passo de purificação por extracção em fase sólida de troca aniónica, pensou-se que este poderia aumentar o sinal. Para tal, compararam-se três métodos diferentes de degradação de *N*-alquil Edman, a partir de uma amostra de doente de HIV.

Os métodos utilizados foram:

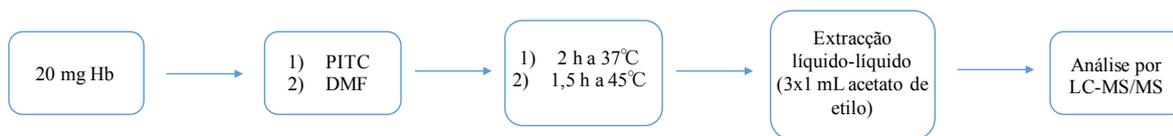
1. Degradação de *N*-alquil Edman utilizando o FITC, descrito por Stedingk *et al.*(2010)^[33]
2. Degradação de *N*-alquil Edman utilizando o PITC:
 - 2.1. Método I, descrito por Törnqvist (1994)^[29]
 - 2.2. Método II, descrito por Bjellaas *et al.*(2007)^[32]

No método de degradação de *N*-alquil Edman com o FITC (**Esquema 8**), a formação da hidantoína ocorre em meio básico numa solução aquosa de 0,5 M KHCO₃/2-propanol (2:1, v/v). Estudos anteriores demonstraram que as hidantoínas obtidas com o agente derivatizante, FITC, apresentavam uma maior sensibilidade quando analisadas por LC-MS, comparativamente às obtidas com outros agentes de derivatização. Contudo, neste trabalho, à semelhança do que havia acontecido para as soluções padrão de **22**, a amostra de Hb recolhida do doente que foi sujeita ao processo de degradação de *N*-alquilo Edman descrito por Stedingk *et al.* (2010)^[33] não apresentou qualquer sinal quando analisada por LC-MS/MS do ião a *m/z* 753 correspondente à molécula diprotonada de **22**.



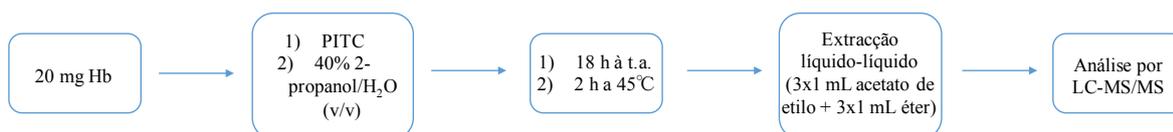
Esquema 2.3. Degradação de *N*-alquil Edman utilizando o FITC.

A degradação de *N*-alquil Edman com o PITC pode ser realizada utilizando dois métodos diferentes já descritos^[29,32], em que a principal diferença reside no solvente utilizado como meio reaccional para a formação da hidantoína. O método I, utiliza uma solução de dimetilformamida (DMF) (**Esquema 9**) enquanto que o método II, utiliza uma solução de 40 % 2-propanol/H₂O.



Esquema 2.4. Degradação de *N*-alquil Edman utilizando o PITC, método I.

Quando se analisaram, por LC-MS/MS do sinal a m/z 499 correspondente à molécula protonada de **14**, as amostras de Hb sujeitas aos processos de degradação com PITC, apenas a amostra obtida pelo método II apresentou um sinal no cromatograma, confirmando o padrão de fragmentação já descrito em Caixas *et al.*(2012)^[21] Muito provavelmente a presença de DMF nas amostras obtidas pelo método I pode suprimir o sinal do espectrómetro de massa, observando-se assim um decréscimo da sensibilidade. Assim sendo, concluiu-se que para análise dos adutos de NVP por LC-MS o melhor procedimento a adoptar será a utilização de PTIC como agente derivatizante, usando uma solução de de 40 % 2-propanol/H₂O como solvente de derivatização (**Esquema 10**).



Esquema 2.5. Degradação de *N*-alquil Edman utilizando o PITC, método II.

2.1.5. Análise do aduto **22** por cromatografia líquida por detecção de fluorescência

Tendo em conta os resultados obtidos por análise de **22** por LC-MS experimentou-se uma abordagem alternativa para o detectar. O facto do aduto **22** ter na sua constituição uma molécula de fluoresceína oferece a possibilidade deste aduto poder ser analisado por técnicas de LC-FL, em analogia com o que já foi reportado por outros autores na análise de adutos similares^[30]. Anteriormente à análise da sensibilidade do aduto com o FITC por LC-FL, foi necessário determinar os máximos de excitação e de absorção deste aduto a diferentes valores de pH. Desta forma, prepararam-se duas soluções de aduto **22**: solução A) contendo 0,5 mg de aduto **22** diluídas em 5 mL de uma solução ACN/H₂O com 0,1 % de ácido fórmico, pH = 7 e solução B) contendo 0,5 mg de aduto **22** diluídas em 5 mL de uma solução de ACN/H₂O com 5 % de hidróxido de amónia, tendo-se obtido espectros de absorção e espectros de emissão das mesmas. Os resultados obtidos permitiram concluir que a fluorescência do aduto em meio alcalino pH > 8 ($\lambda_{\text{excitação}} = 480 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{máx emissão}} = 529 \text{ nm}$, $\epsilon = 13822,5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (**Figura 5**) é muito superior em comparação à fluorescência do aduto em meio ácido pH < 7 ($\lambda_{\text{excitação}} = 440 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{máx emissão}} = 548 \text{ nm}$, $\epsilon = 547,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (**Figura 6**), como seria espectável pelas estruturas do aduto **22** (**Esquema 6**).

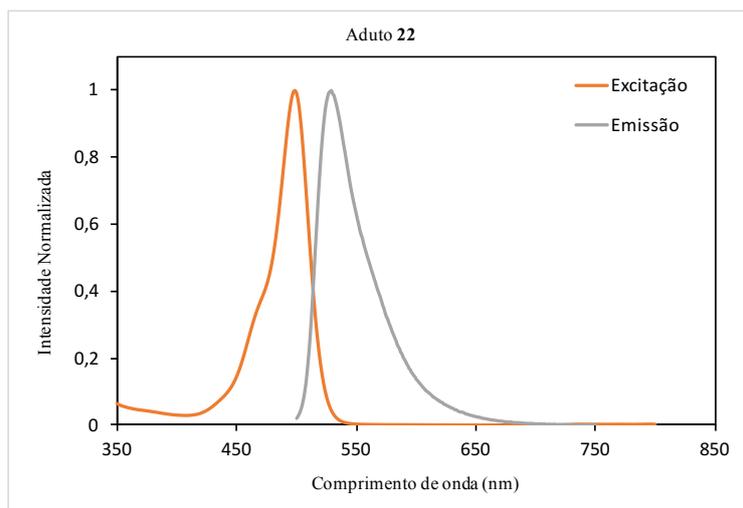


Figura 2.4. Espectros de excitação e emissão do aduto **22** em meio alcalino, pH > 8.

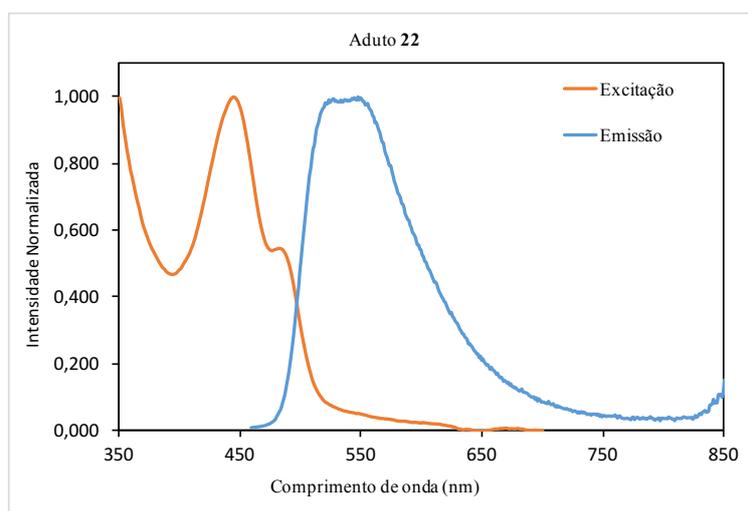


Figura 2.5. Espectros de excitação e emissão do aduto **22** em meio ácido, pH < 7.

Como a hidantoina **22**, em meio alcalino, apresentava maior fluorescência, analisaram-se por cromatografia líquida acoplada a um detector de fluorescência (LC-FL) soluções de **22**, preparadas em tampão ACN/H₂O contendo 2 mM de acetato de amônia pH 8, na mesma gama de concentrações das analisadas por LC-ESI-MS. Na análise das soluções padrão observou-se que apenas na solução mãe e na solução de trabalho de aduto **22**, com concentrações de 0,5 mg/mL e 5 µg/mL respectivamente, se obteve sinal. Analisou-se também a mesma amostra do doente infectado com HIV analisada anteriormente por LC-ESI-MS, que foi evaporada à secura e redissolvida no mesmo tampão utilizado para preparar as soluções padrão a pH 8. Apesar de se ter detectado sinal, os resultados obtidos não permitiram concluir se o sinal observado correspondia ao aduto **22** ou se seria devido a um excesso de FITC que tivesse ficado por reagir na solução.

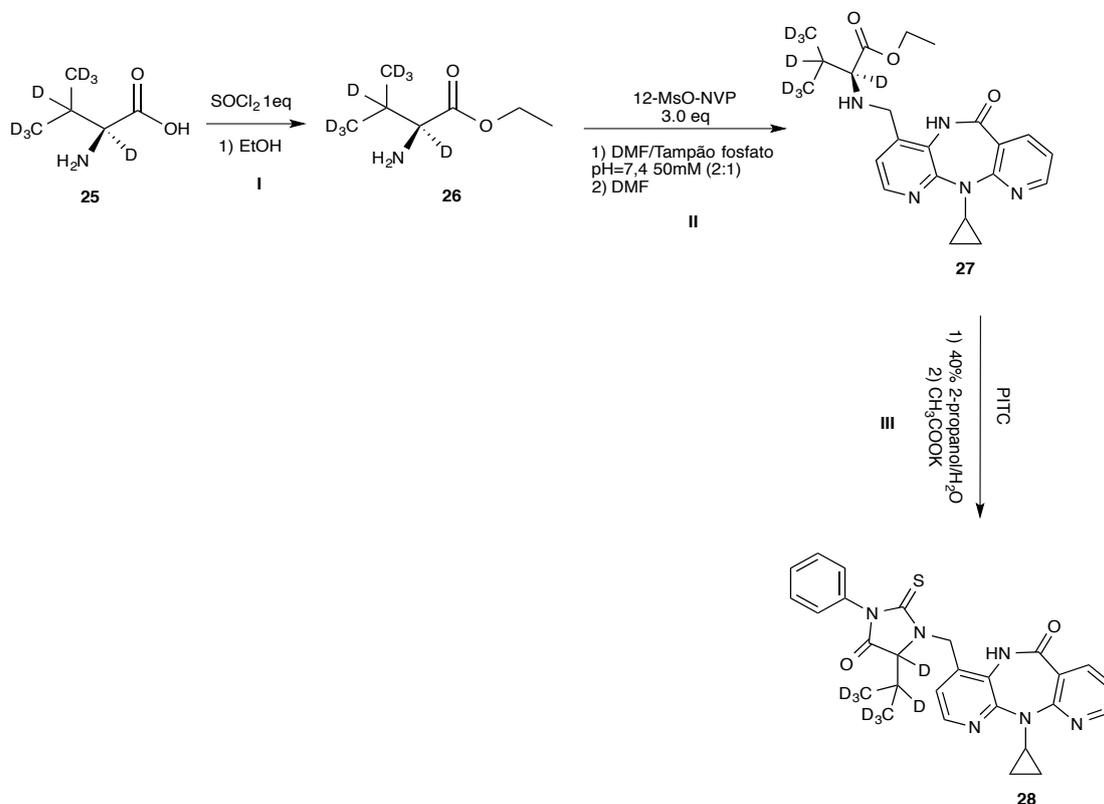
2.2 Desenvolvimento e otimização do método analítico para a quantificação do aduto 14.

Depois de identificado qual o melhor método de degradação de *N*-alquil Edman para a hidantoína em estudo, foi necessário proceder ao desenvolvimento do método analítico. A metodologia adoptada para quantificação do aduto 14 baseia-se na utilização de um padrão interno, que deve ter as mesmas propriedades físico-químicas que o analito que se quer quantificar. Desta forma, o melhor padrão interno que se poderia utilizar seria um derivado do aduto 14 isotopicamente marcado, pois teria a recuperação de extracção, o tempo de retenção e o padrão de fragmentação similar ao do análogo não deuterado.

2.2.1. Síntese do padrão interno

A síntese do padrão interno efectuou-se de forma similar à do aduto 14 e 22, descrita em Antunes *et al.* (2010)^[48], seguindo a mesma metodologia nos passos, I e II (**Esquema 5 e 6**). Após a formação do modelo electrófilo 23, efectuaram-se mais três passos reaccionais:

- I. Reacção de esterificação da valina-*d*₈
- II. Substituição nucleofílica do éster 26, ao modelo electrófilo 23
- III. Reacção de degradação de *N*-alquil Edman do aduto 27



Esquema 2.6. Síntese do padrão interno 28.

Para a esterificação da valina- d_8 , gerou-se *in situ* o cloreto de ácido por reacção com uma quantidade equimolar de cloreto de tionilo. A reacção foi efectuada em etanol na presença de peneiros moleculares (4Å). O sal de hidrocloreto **26**, foi seco no excicador com NaOH sob vácuo. Obteve-se um sólido branco com um rendimento de 95,65 %. O produto foi analisado por LC-ESI-MS tendo-se obtido um sinal a m/z 154 correspondente à massa da molécula protonada e, quando analisado por espectrometria de massa de tandem (MS/MS), apresentou um sinal a m/z 80 que corresponde à perda do grupo éster.

A reacção do éster deuterado **26**, com o modelo electrófilo **23** foi efectuada por um procedimento similar ao utilizado para a formação do aduto não deuterado **24**,^[48] envolvendo inicialmente a libertação da base conjugada do hidrocloreto do éster **26**, por reacção com carbonato de potássio em tampão fosfato 50 mM pH = 7,4, seguida de incubação a 37°C durante 3 dias com o modelo electrófilo **23**. A única alteração ao método utilizado anteriormente para o análogo não deuterado foi a utilização de DMF (e não THF)^[48] como solvente orgânico para a dissolução do éster e do 12-MsO-NVP. Esta modificação foi necessária para contornar a maior insolubilidade do éster deuterado nas condições anteriormente utilizadas. O produto obtido **27**, nesta reacção foi confirmado por injeção no HPLC-DAD e evaporado à secura para seguir reacção com o PITC.

Para a formação da hidantoína **28**, efectuou-se a reacção do produto **27**, com um excesso de PITC em meio básico, na presença de acetato de sódio, numa solução de 2-propanol (40 %) em água, à temperatura ambiente. Após 18 h, a mistura reaccional foi analisada por HPLC-DAD, tendo-se observado existir ainda material de partida por reagir.

Assim, para promover o consumo total do material de partida incubou-se a mistura reaccional a 45°C durante 2 h. O produto foi purificado por HPLC semi-preparativo, tendo-se obtido com um rendimento de 4,5 %. Quando o composto obtido foi analisado por LC-ESI-MS, obteve-se um sinal a m/z 506. Este sinal apresenta menos uma unidade de massa em relação à molécula protonada do aduto, **28**, esperado, indicando que muito provavelmente houve a troca de um deutério por um protão no passo final de formação da hidantoína. Poder-se-á explicar esta troca devido ao carácter ácido do deutério na posição α da valina. O aduto deuterado, quando analisado por espectrometria de massa de tandem (MS/MS), apresentou um padrão de fragmentação similar ao apresentado pelo seu análogo não deuterado^[21], sendo observado o fragmento a m/z 265 correspondente à perda da unidade de NVP a partir da molécula protonada do aduto **28**. A análise por MS³ deste fragmento gerou dois fragmentos a m/z 237 e 223 correspondentes à perda dos grupos carbonilo e ciclopropilo, respectivamente, a partir do fragmento a m/z 265. Também por LC-MS/MS, verificou-se que este padrão deuterado sintético contém aproximadamente 1% de padrão não deuterado, sendo esta contaminação contabilizada na construção de curvas de calibração e na quantificação de metabolito (LOD).

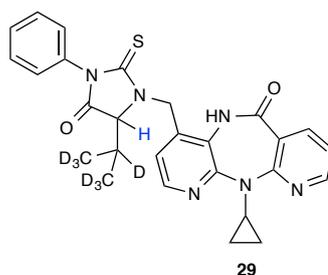
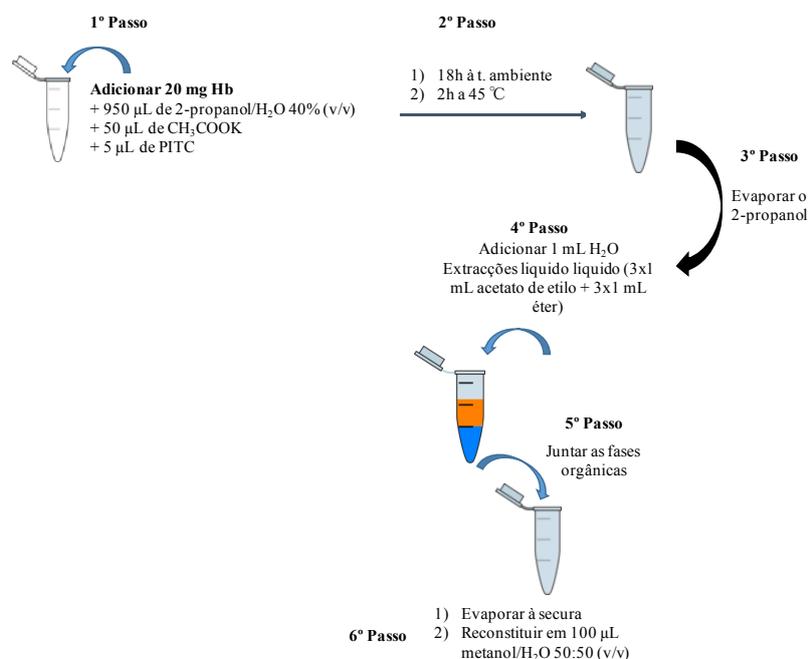


Figura 2.6. Estrutura do aduto deuterado utilizado como padrão interno, **29**.

2.2.2. Otimização das condições de degradação de *N*-alquil Edman dos adutos da valina terminal da hemoglobina.

Para a otimização das condições de degradação de *N*-alquil Edman, utilizou-se um procedimento já descrito por Bjellaas *et al.* (2007)^[32] no qual, a 20 mg de Hb foram adicionados 950 μ L de uma solução de 40 % 2-propanol/H₂O (v/v), 50 μ L de uma solução de acetato de potássio e ainda 5 μ L de PITC. A mistura reaccional resultante foi incubada à t.a. durante 18 h e depois a 45°C durante 2 h. Evaporou-se o 2-propanol sob pressão reduzida e adicionou-se água (1 mL). O produto foi extraído com acetato de etilo (3x1 mL) e éter (3x1 mL). No final, juntaram-se as fases orgânicas e evaporou-se à secura. O sólido obtido foi redissolvido numa solução de 50% metanol/H₂O para ser analisado por LC-MS (Esquema 12).

Reação de degradação de *N*-alquil Edman



Esquema 2.7. Procedimento experimental da degradação de *N*-alquil Edman dos adutos da valina terminal da Hb.

A análise de adutos de NVP formados com a valina terminal da Hb por LC-ESI-MS/MS foi realizada anteriormente por Caixas *et al.*(2012), utilizando espectros de transições MS³ do aduto protonado para aumentar a selectividade do método.^[21] A desvantagem desta técnica é que ao aumentar a selectividade da análise, diminui a sensibilidade do método. A utilização de LC-HRMS permite a análise dos adutos directamente em auto-MS/MS obtendo uma elevada sensibilidade e selectividade, na medida em que a confirmação do aduto é obtida através da sua massa exacta, da informação isotópica e fragmentação do ião (pseudo)-molecular (**Figura 8**).

A separação cromatográfica realizou-se com um fluxo de 150 µL/min, utilizando como fase móvel um gradiente linear de acetonitrilo, contendo 0,1 % de ácido fórmico (eluente A), e H₂O, contendo 0,1 % de ácido fórmico (eluente B): dos 0 aos 2 minutos eluição isocrática de 5 % de B, dos 2 aos 15 minutos gradiente de 5 - 100 % de B, dos 15 aos 20 minutos eluição isocrática de 100 % de B, dos 20 aos 22 minutos gradiente de 100 - 5 % de B, dos 22 aos 30 minutos eluição isocrática de 5 % de B. O volume de injeção utilizado foi de 5 µL. Os espectros de massa foram obtidos em full-scan e MS/MS e a confirmação do analito foi feita através da massa exacta, do seu perfil isotópico e fragmentação. Para a quantificação, utilizou-se o padrão interno **29**.

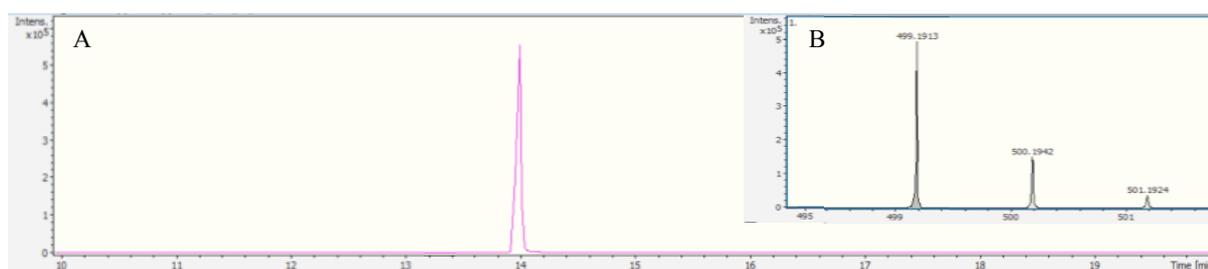


Figura 2.7. (A) Cromatograma iónico obtido por extracção do ião de m/z 499,1911 de uma solução dopada (188 ppb de aduto **14** contendo 90 ppb de padrão interno **29**); (B) espectro de massa do aduto **14**, apresentando a distribuição isotópica.

2.2.3. Primeira abordagem para o estudo da linearidade do método

Para testar a linearidade do método, construiu-se uma curva de calibração para seis soluções de diferentes concentrações de solução padrão (940, 650, 470, 188, 94 e 0 ppb de aduto **14** contendo 90 ppb de padrão interno **29**). Obteve-se uma curva de calibração linear com um declive de 0,0191 e um coeficiente de correlação (r^2) de 0,99617, o que significa um bom ajuste para a curva de calibração. Todas as soluções foram feitas em quadruplicado e o desvio do valor nominal das concentrações não excedeu os 10 %.

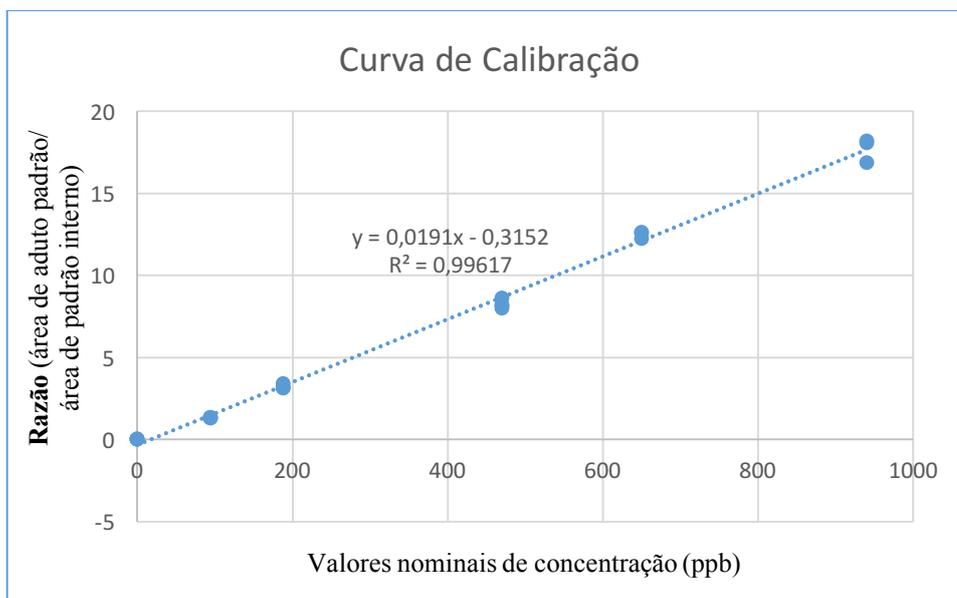


Figura 2.8. Primeira curva de calibração para as concentrações testadas numa gama de 0 – 940 ppb de aduto **14** contendo 90 ppb de padrão interno **29**.

2.2.4. Exactidão e Precisão do método

Para validar o método foi necessário realizar ensaios intra e inter dia. Numa primeira abordagem, realizaram-se ensaios intra dia e determinaram-se os RSD, a exactidão e a recuperação para três níveis diferentes de amostras dopadas de concentrações de aduto padrão (650, 470 e 94 ppb de aduto **14** contendo de 90 ppb de padrão interno **29**). A exactidão dos ensaios foi avaliada por comparação do valor da média experimental com o valor nominal das concentrações de três soluções dopadas independentes (940, 470 e 188 ppb de aduto **14** contendo 90 ppb de padrão interno **29**, num total de 5 amostras por nível de concentração e por dia, em dois dias diferentes). A precisão dos ensaios foi estimada pelos coeficientes de variação obtidos dos ensaios intra dia.

Os resultados dos ensaios do primeiro dia dos inter e intra dia mostraram que a exactidão está dentro dos 15% admitidos pela FDA e EMEA mas a precisão para a solução de 94 ppb de aduto padrão **14** contendo 90 ppb de padrão interno **29**, está superior aos 15 % admitidos, o que sugere um erro de preparação da amostra.

Tabela 2.1. Resultados obtidos para a exactidão, precisão, recuperação e efeito matriz para o primeiro dia de inter dia.

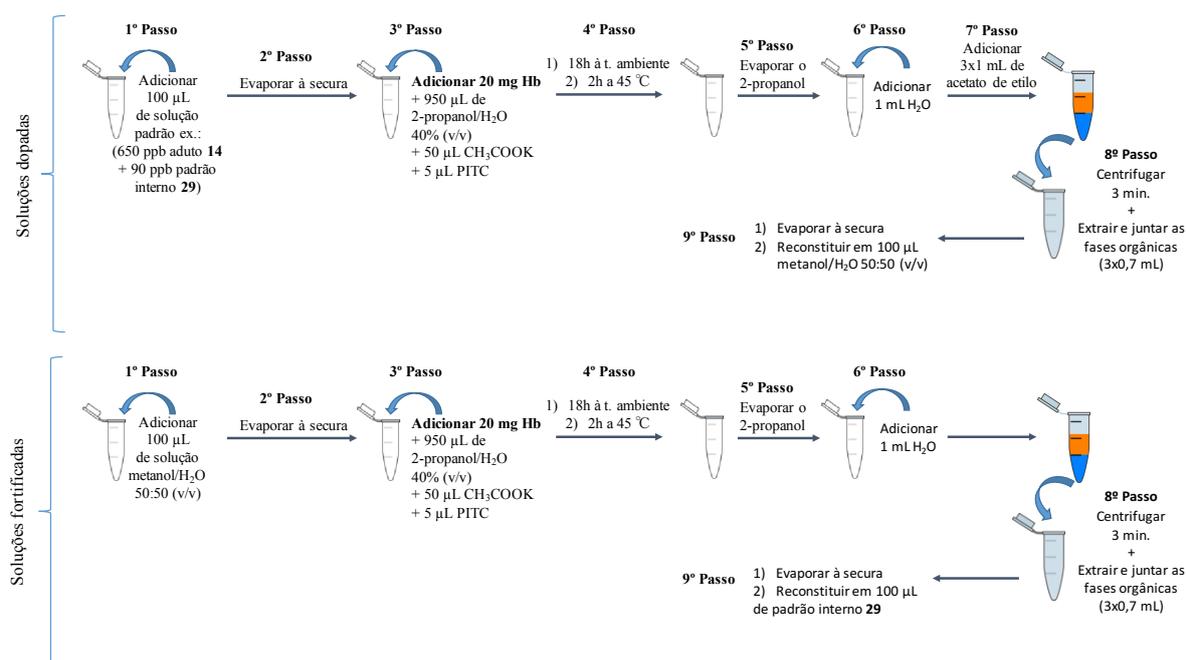
Amostras	Concentração (ppb)	Concentração real (ppb)	Média (ppb)	SD (%)	RSD (%)	Exactidão (%)	Recuperação (%)	Supressão Sinal (%)
1a	650	523	557	43	8	86	17	18
1b	650	503						
1c	650	573						
1d	650	604						
1e	650	583						
2a	470	415	419	22	5	89	17	
2b	470	409						
2c	470	446						
2d	470	389						
2e	470	437						
3a	94	111	95	17	17	101	18	
3b	94	112						
3c	94	75						
3d	94	83						
3e	94	93						

2.2.5. Efeito de matriz e Recuperação

O efeito matriz foi testado e estimado pela razão entre as áreas dos picos provenientes de amostras fortificadas com 90 ppb de solução de padrão interno, isto é, amostras que passam pelo mesmo processo experimental (**Esquema 12**) mas que, no final, são reconstituídas com padrão interno, e as áreas de padrão interno obtidas de uma solução de padrão (188 ppb de aduto **14** contendo 90 ppb de padrão interno **29**).

Para o estudo da recuperação foram preparadas três soluções dopadas de concentrações (650, 470 e 94 ppb de aduto **14** com 90 ppb de padrão interno **29**). A recuperação das extracções foi calculada pela razão entre as áreas obtidas de padrão interno das amostras dopadas em função das áreas obtidas de padrão interno das amostras fortificadas com 90 ppb de padrão interno **29** (**Esquema 13**). As amostras fortificadas foram realizadas em triplicado.

A recuperação obtida para cada concentração de analito para o primeiro dia de inter dia foi muito baixa, nomeadamente, entre 17 a 18 %. Portanto, foi necessário testar em qual/quais do/dos passos envolvidos na degradação de *N*-alquil Edman seria o principal responsável pela perda de analito.



Esquema 2.8. Descrição da metodologia experimental utilizada para estudar a recuperação.

2.2.6. Otimização da metodologia experimental para aumentar a recuperação do método analítico

A primeira abordagem para aumentar a recuperação do método analítico foi comparar as recuperações obtidas por extração líquido-líquido (ELL), reduzindo o número de extrações só para três de acetato de etilo, e por extração em fase sólida (EFS) usando uma fase estacionária de RP18. Para tal, partiu-se de 6 soluções padrão de 470 ppb de aduto **14** contendo 90 ppb de padrão interno **29**, e seguiu-se a reacção de degradação de *N*-alquilo Edman até ao passo 4, como descrito no **Esquema 12**. Destas soluções, três seguiram o passo 5 e 6 utilizando a extração líquido-líquido enquanto que as outras três soluções foram extraídas por fase sólida, recorrendo a cartuchos HLB C18, tendo sido utilizado 3x1 mL de acetonitrilo para a sua eluição. Foram também feitas seis soluções de amostras fortificadas com 90 ppb de padrão interno **29**, que foram extraídas como as acima descritas, três soluções por ELL e as outras três por EFS.

Os resultados descritos na **Tabela 2** mostram que as extrações por EFS e ELL apresentam percentagens de recuperação muito semelhantes, o que indica que, muito provavelmente, o erro não advém do método de extração mas sim de um passo anterior.

Tabela 2.2. Diferentes métodos de extração e as suas respectivas recuperações.

Ensaio	Concentração (ppb)	Método de extração	Recuperação (%)
1	470	EFS	7
2	470	ELL	5

A segunda abordagem foi testar a influência da polaridade do solvente utilizado para reconstituir os analitos antes da análise por espectrometria de massa (**Esquema 12**, passo 7). Testaram-se vários procedimentos:

1. Reconstituir em 100 µL de metanol;
2. Reconstituir em 50 µL de metanol, levar 5 minutos aos ultrassons e depois adicionar mais 50 µL de H₂O.
3. Reconstituir em 100 µL de uma solução previamente preparada de 50 % metanol/H₂O (v/v).

Como se pode observar na **Tabela 3**, os resultados foram muito semelhantes. Notou-se apenas uma ligeira melhoria quando se utilizou 100 % de metanol na reconstituição. Apesar do resultado não ter sido significativo o suficiente para resolver a questão da baixa percentagem de recuperação, passou-se a utilizar 100 µL de metanol para reconstituir as soluções e avançou-se para o estudo dos passos das extrações.

Tabela 2.3. Diferentes métodos de reconstituição e as suas respectivas recuperações.

Ensaio	Concentração (ppb)	Método de reconstituição	Recuperação (%)
1	188	100 µL metanol	130
2	188	50 µL metanol + 50 µL H ₂ O	99
3	188	100 µL metanol/ H ₂ O	108
4	188	metanol/H ₂ O	
5	188	metanol/H ₂ O	

De seguida, testou-se a influência da ordem de adição dos solventes aquoso e orgânico após a evaporação do 2-propanol (**Esquema 12**, passo 5). Os resultados obtidos (**Tabela 4**) mostram que a ordem de adição do solvente orgânico e solvente aquoso é indiferente, pois as áreas obtidas de ambos são muito idênticas. Assim sendo, manteve-se a ordem de adição de H₂O e depois o acetato de etilo.

Tabela 2.4. Diferentes métodos de extração e as suas respectivas recuperações.

Ensaio	Concentração (ppb)	Método de extração	Recuperação (%)
1	188	1º acetato de etilo– 2º H ₂ O	98
2	188	1º H ₂ O–2º acetato de etilo	100
3	188	-	
4	188	-	

No passo de extração líquido-líquido, testou-se ainda se efectivamente a presença de 2-propanol poderia influenciar a extração do aduto e se a utilização de ultrassons poderia ou não facilitar este processo. Estes ensaios foram efectuados com uma solução padrão (188 ppb de aduto **14** contendo 90 ppb de padrão interno **29**) na presença e na ausência de 20 mg de Hb.

Os resultados obtidos, presentes na **Tabela 5**, mostram que na presença de Hb a diferença da percentagem de recuperação na presença de 2-propanol é apenas 14 %, o que não é significativo para a percentagem de perda que se está a verificar, ou seja, a maior perda de produto está relacionada com a presença de Hb na reacção. Como se pode observar, pelos resultados obtidos para os ensaios 1 e 2, ou seja, amostras dopadas sem Hb, as recuperações são de 67 a 72 %, enquanto que nos ensaios 3 e 4, utilizando o mesmo método de extração a recuperação desce drasticamente para os 30 a 44 %.

Tabela 2.5. Diferentes métodos de extração com e sem a presença de 2-propanol no meio de extração e as suas respectivas recuperações.

Ensaio	Concentração (ppb)	Massa de Hb (mg)	Método de extração	Recuperação (%)
1	188	0	sem 2-propanol	67
2	188	0	com 2-propanol	72
3	188	20	sem 2-propanol	30
4	188	20	com 2-propanol	44
5	188	20	sem 2-propanol, com ultra-sons	30
6	188	20	com 2-propanol, com ultra-sons	40
7	188	0	-	
8	188	0	-	

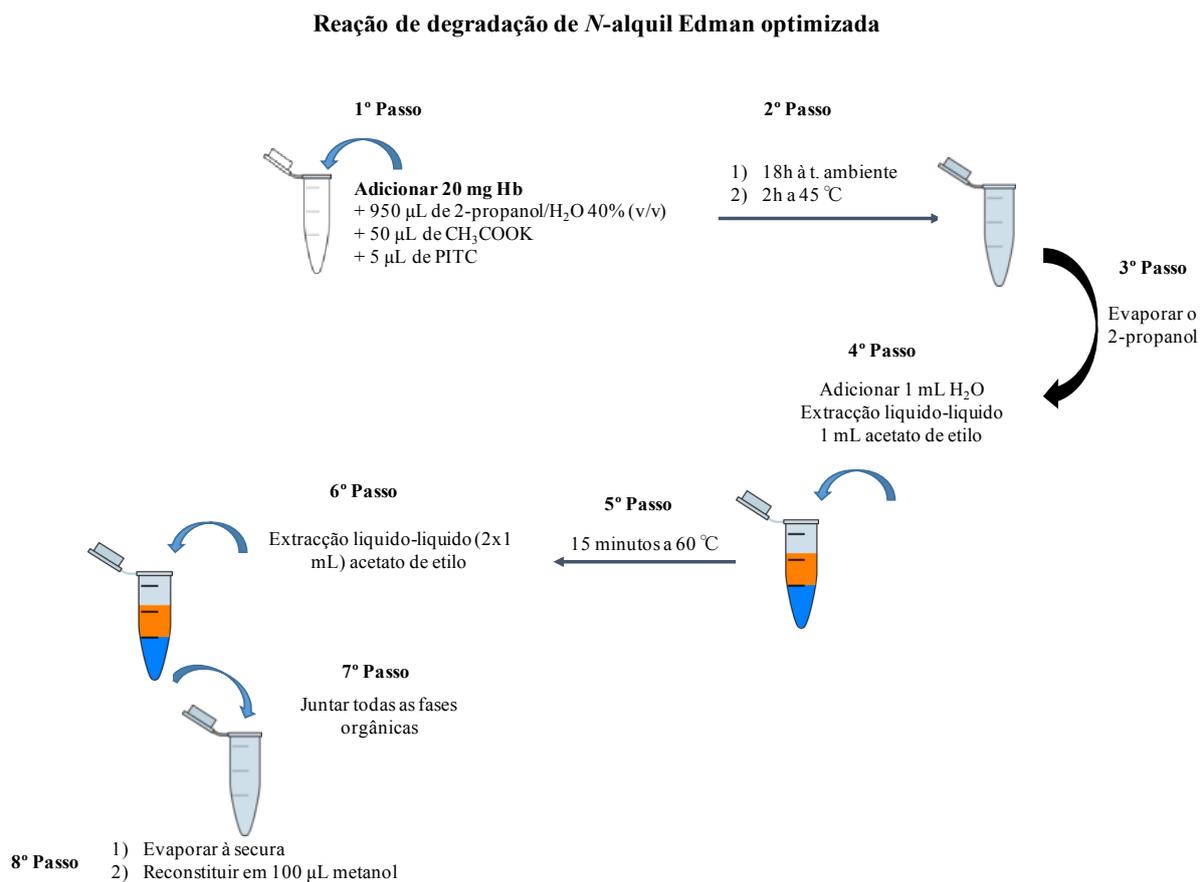
Tendo em conta estes resultados, colocou-se a hipótese do aduto poder estar a ficar retido na Hb. Para testar esta hipótese, testou-se o processo de ELL para duas quantidades de Hb diferentes (20 e 80 mg) e testou-se a inclusão de um passo adicional envolvendo a desnaturação da Hb antes do início das extracções e, depois de uma primeira extracção com acetato de etilo, aquecendo a mistura reaccional a 60°C durante 15 minutos (secção 5.4.1.5.). Estes ensaios foram mais uma vez efectuados a partir de uma solução 188 ppb de aduto **14** contendo 90 ppb de padrão interno **29**, e foram realizados em duplicado.

Como se pode observar na **Tabela 6**, os resultados mostram que ao se utilizar menor quantidade de Hb, existe menos possibilidade do aduto ficar retido e, por conseguinte, as percentagens de extracção aumentam. Outra consideração a ter em conta é que utilizando o passo de aquecimento, após uma primeira extracção, a percentagem de recuperação aumenta dos 20 % para os 33 %, o que significa que o aduto **14** não se degrada com o aumento da temperatura e, ainda, a desnaturação da proteína ajuda a libertá-lo.

Tabela 2.6. Diferentes métodos de extração com e sem aquecimento a 60 °C, para diferentes quantidades de Hb e as suas respectivas recuperações.

Ensaio	Concentração (ppb)	Massa Hb (mg)	Método de extração	Recuperação (%)
1a	188	20	Antes do aquecimento 60°C	33
1b	188	20	Antes do aquecimento 60°C	
2a	188	20	Depois do aquecimento 60°C	26
2b	188	20	Depois do aquecimento 60°C	
3a	188	20	Sem aquecimento	20
3b	188	20	Sem aquecimento	
4a	188	80	Antes do aquecimento 60°C	10
4b	188	80	Antes do aquecimento 60°C	
5a	188	80	Depois do aquecimento 60°C	9
5b	188	80	Depois do aquecimento 60°C	
6a	188	80	Sem aquecimento	11
6b	188	80	Sem aquecimento	
7a	188	0	-	
7b	188	0	-	
7c	188	0	-	

A otimização das condições experimentais para degradação de *N*-alquil Edman permitiram chegar ao procedimento descrito no **Esquema 14**. Como se pode observar, as alterações realizadas em relação ao procedimento do **Esquema 12**, foram a diminuição do número de extracções de seis (três de acetato de etilo mais três de éter) para três de acetato de etilo, e o acréscimo do passo de aquecimento a 60 °C, após uma primeira extracção com acetato de etilo, para desnaturar a proteína.



Esquema 2.9. Descrição da metodologia de degradação de *N*-alquil Edman otimizada.

2.3. Validação do método de quantificação otimizado

2.3.1. Linearidade do método

As soluções de aduto padrão **14** foram preparadas individualmente a partir de uma mistura de 50 % metanol/H₂O (v/v). A resposta obtida, a partir das razões das áreas de aduto padrão não deuterado *versus* as áreas de padrão interno, foi linear numa gama de concentrações de aduto **14**, de 0 – 940 ppb contendo 90 ppb de padrão interno **29**. Obteve-se uma curva com declive de 0,0173 e com coeficiente de correlação (r^2) de 0,9861. As sete soluções de concentrações diferentes foram analisadas em duplicado e os desvios obtidos dos valores nominais não excederam os 15 %.

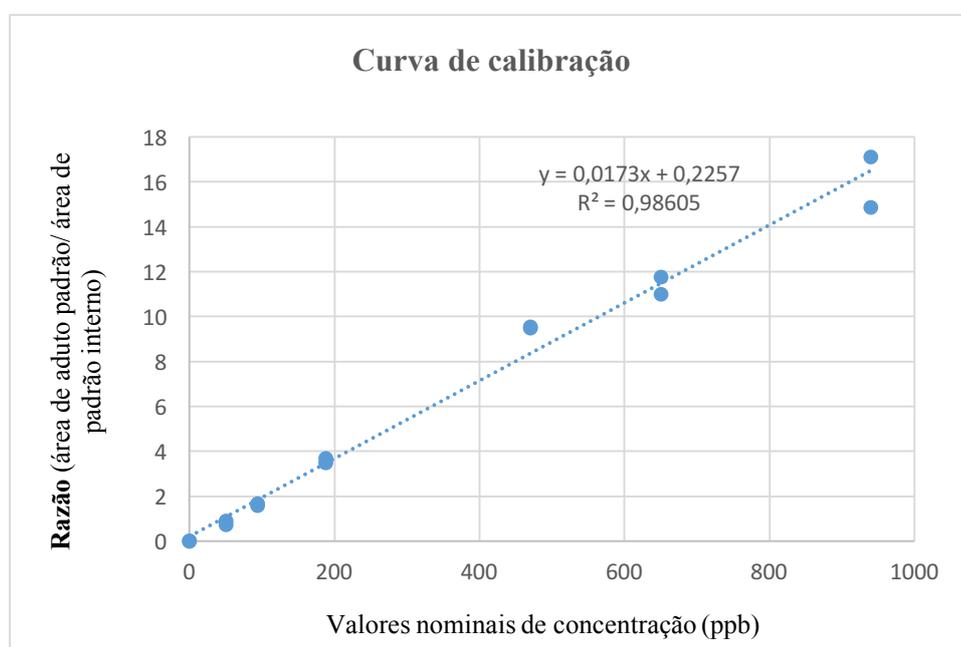


Figura 2.9. Curva de calibração otimizada para as concentrações testadas numa gama de 0 – 940 ppb de aduto padrão **14** contendo 90 ppb de padrão interno **29**.

2.3.2. Exactidão, Precisão, Efeito de matriz e Recuperação

O método foi validado pelos ensaios dos inter e intra dias feitos para três níveis de concentrações diferentes de aduto **14** (940, 470 e 188 ppb) contendo 90 ppb de padrão interno **29**, já com a nova metodologia de degradação de *N*-alquil Edman otimizada (**Esquema 14**).

Em ambos os dias, os valores obtidos para os desvios dos valores nominais não excederam os 10 % e os RSD foram sempre inferiores a 10 % (excepto para o LOQ, onde o valor de RSD foi de 15 %).

O efeito matriz foi testado e estimado pela razão entre as áreas dos picos provenientes de uma amostra fortificada com 90 ppb de solução de padrão interno e as áreas obtidas da solução padrão (188 ppb de aduto **14** contendo 90 ppb de padrão interno **29**). A supressão de sinal obtido para o primeiro dia foi de 13 % e para o segundo dia foi de 24 %.

Para o estudo da recuperação foram preparadas três soluções dopadas de concentrações (650, 470 e 94 ppb de aduto **14** contendo 90 ppb de padrão interno **29**) que foram submetidas ao procedimento experimental descrito acima (**Esquema 14**). As recuperações das extracções foram calculadas pela razão das áreas obtidas das amostras dopadas em função das áreas obtidas das amostras fortificadas com 90 ppb de padrão interno **29**. As amostras fortificadas foram realizadas em triplicado.

A média das percentagens obtidas para a recuperação em ambos os dias foi de 43 % para o 1º dia e 46 % para o 2º dia.

Tabela 2.7. Resultados obtidos para o primeiro dia dos ensaios inter e intra dia.

Amostras	Concentração (ppb)	Concentração Real (ppb)	Média (ppb)	SD (%)	RSD (%)	Exactidão (%)	Recuperação (%)	Supressão Sinal (%)
1a	940	830	874	46	5	93	36	13
1b	940	819						
1c	940	904						
1d	940	895						
1e	940	921						
2a	470	453	452	28	6	96	50	
2b	470	488						
2c	470	458						
2d	470	410						
2e	470	449						
3a	188	184	184	12	7	98	41	
3b	188	198						
3c	188	196						
3d	188	172						
3e	188	172						
Amostra Fortificada	0	1						
Amostra Fortificada	0	2						
Amostra Fortificada	0	1						
Sol. Padrão	188	202						
Sol. Padrão	188	202						
Sol. Padrão	188	213						

Tabela 2.8. Resultados obtidos para o segundo dia dos ensaios inter e intra dia.

Amostras	Concentração (ppb)	Concentração Real (ppb)	Média (ppb)	SD (%)	RSD (%)	Exactidão (%)	Recuperação (%)	Supressão Sinal (%)
1a	940	988	953	91	10	101	36	24
1b	940	1028						
1c	940	817						
1d	940	1029						
1e	940	904						
2a	470	507	514	16	0	109	44	
2b	470	523						
2c	470	489						
2d	470	525						
2e	470	527						
3a	188	165	174	13	0	92	58	
3b	188	192						
3c	188	161						
3d	188	167						
3e	188	183						
Amostra Fortificada	0	1						
Amostra Fortificada	0	2						
Sol. Padrão	188	189						
Sol. Padrão	188	207						
Sol. Padrão	188	201						

2.3.3. Limite de detecção (LOD) e limite inferior de quantificação (LLOQ)

O limite de detecção (LOD) foi estimado pela média das concentrações obtidas para as amostras fortificadas, ou seja, o LOD é de 1,39 ppb.

O limite inferior de quantificação (LLOQ) foi estimado pela análise de duas soluções dopadas com diferentes concentrações (30 e 15 ppb de aduto **14** contendo 90 ppb de padrão interno **29**, num total de 5 amostras por composto) e determinou-se a concentração mínima à qual o desvio do valor nominal da concentração e o coeficiente de variação não excederam os 20 %. O valor obtido para o LLOQ foi de 15 ppb.

Tabela 2.9. Resultados obtidos para o estudo de determinação do LLOQ.

Amostras	Concentração (ppb)	Concentração Real (ppb)	Média (ppb)	SD (%)	RSD (%)	Exactidão (%)	Recuperação (%)	Supressão Sinal (%)
1a	30	26	28	2	9	92	46	13
1b	30	30						
1c	30	27						
1d	30	30						
1e	30	26						
2a	15	17	15	2	13	102	45	
2b	15	14						
2c	15	18						
2d	15	14						
2e	15	14						

2.4. Análise das amostras dos doentes pelo método validado

Tendo em conta o método otimizado, foram analisadas duas amostras de dois doentes que tomam NVP há mais de 3 anos. Os resultados obtidos (**Tabela 10**) mostram que foram encontrados adutos nos dois doentes com concentrações na ordem dos 95 pmol/g e 92 pmol/g de Hb.

Tabela 2.10. Dados dos pacientes analisados e respectivas concentrações de aduto obtidas.

Amostra	Anos de toma de NVP	Sexo	Concentração pmol/g de Hb
Doente 1	9	M	95
Doente 2	13	F	92

2.5. Conclusões

Optimizou-se e validou-se a metodologia de degradação de *N*-alquil Edman para a identificação e quantificação de adutos formados entre o carbono C-12 da NVP e a valina *N*-terminal da Hb, por LC-HRMS. O método foi testado em duas amostras de doentes infectados com HIV sob a terapêutica com NVP e foram obtidos bons resultados.

De futuro, pretende-se analisar um maior número de amostras de doentes infectados com HIV para se estabelecer correlações entre os níveis de adutos encontrados e os eventos tóxicos mencionados. Pretende-se ainda identificar os factores de risco que estão envolvidos na formação de adutos.

3. Procedimento Experimental

3.1. Inclusão de pacientes, recolha de dados clínicos e amostras de sangue

As amostras de sangue foram recolhidas por punção venosa no Centro Hospitalar de Lisboa Central, EPE. Este trabalho foi realizado em concordância com a Declaração de Helsinki. O protocolo de estudo recebeu aprovação prévia da Comissão de Ética do Centro Hospitalar de Lisboa Central, EPE (número do processo 32-CHLC) e do Hospital Prof. Doutor Fernando Fonseca, EPE (número do processo CA 21/2011), e também foi aprovado pela Comissão Nacional de Protecção de Dados (número do processo 6567/2009).

Todos os pacientes deram o seu consentimento escrito e a sua adesão foi controlada por questionário pelo clínico. Todos os pacientes eram adultos infectados com HIV documentados, que receberam tratamento contínuo com NVP contendo regime de cART (400 mg uma vez todos os dias) por mais de um mês, independentemente do seu passado terapêutico. O critério de exclusão foi definido como sendo menor de 18 anos de idade, condições definidas de HIV, e complicações associadas. Os dados clínicos recolhidos para cada paciente foram: idade, género, etnia, peso e altura, tempo de toma de NVP, carga viral, contagens de células CD4 T, e parâmetros lipídicos (HDL, LDL, TG e TC). As amostras de sangue foram recolhidas por punção venosa.

3.2. Reagentes, Solventes e Materiais

A nevirapina foi adquirida à Cipla (Mumbai, Índia), a *L*-valina- d_8 foi fornecida pela Cambridge Isotope Laboratories, Inc., Andover, MA, USA. Todos os restantes reagentes e solventes foram fornecidos pela Sigma-Aldrich. O reagente fenilisotiocianato de fluoresceína (FITC) foi purificado segundo um método já descrito.^[33] Sempre que necessário, os solventes foram purificados e secos de acordo com os métodos padronizados.^[51]

Para a realização das cromatografias em camada fina (c.c.f.) e camada fina preparativa (c.c.f.p.) foram utilizadas placas de sílica gel GF254 da Merck com espessura 0.2 mm e 0.5 mm, respectivamente. A detecção dos compostos foi feita por irradiação de raios ultravioleta (UV) a 254 nm ou com revelador de ninidrina, seguido de calor. A cromatografia em coluna foi realizada com Sílica Gel A60 da Merck 70-230 mesh, e o eluente usado foi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ (8:2, v/v).

Para as extracções em fase sólida (SPE) de troca aniónica utilizaram-se cartuxos OASIS MAX da Waters e de RP18 utilizaram-se cartuxos OASIS HLB C18 da Waters.

Para as SPE, condicionou-se a coluna com metanol (3 mL), de seguida lavou-se com H_2O (6 mL) e depois de secar adicionou-se a amostra (3 mL) (pH = 12/14). Adicionou-se uma solução de 5 % hidróxido de amónia (5 mL) e lavou-se novamente a coluna com metanol (4 mL). A eluição foi feita com uma solução de 0,5% de ácido ciano acético em ACN/ H_2O (v/v) (5 mL).

Para as filtrações com filtro de crivagem molecular, utilizaram-se AMICON (10 kDa) da Waters.

3.3. Equipamento

A cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) foi efectuada com um aparelho Dionex Ultimate 3000, equipado com uma bomba UltiMate 3000 da Dionex, injector automático Rheodine 27385, *loop* de 1000 μL e detector UltiMate 3000 *Photodiode Array* da Dionex. A coluna analítica utilizada foi uma Phenomenex Luna C18 100 Å (250 x 4,60 mm, i.d., tamanho da partícula 5 μm) com um fluxo de 1 mL/min e a coluna preparativa utilizada foi uma Phenomenex Luna C18 100 Å (250 x 10 mm, i.d., tamanho da partícula 5 μm) com um fluxo de 3 mL/min. A fase móvel utilizada para a coluna analítica foi um gradiente linear de tampão H_2O com 0,1 % de ácido fórmico (eluente C) e ACN (eluente A): dos 0 aos 30 minutos gradiente de 95 - 30 % de C, dos 30 aos 32 minutos gradiente de 30 - 0 % de C, dos 32 aos 40 minutos eluição isocrática de 100 % de A. A fase móvel utilizada para a coluna preparativa foi um gradiente linear de tampão H_2O com 0,1 % de ácido fórmico (eluente B) e ACN (eluente A): dos 0 aos 30 minutos gradiente de 95 - 30 % de B, dos 30 aos 32 minutos gradiente de 30 - 0 % de B, dos 32 aos 37 minutos eluição isocrática de 100 % de A, dos 37 aos 39 minutos gradiente 0 - 95 % de B e por fim dos 39 aos 44 minutos eluição isocrática de 95 % de B.

Os espectros de massa foram obtidos por aparelho Ion trap LC-MS com duas bombas cromatográficas 210-LC com um injector automático da ProStar 410, *loop* de 20 μL e detector da ProStar 335 *Photodiode Array*, acoplado a um espectrómetro de massa LCQ FleetTM Ion trap da Thermo Scientific.. A coluna analítica utilizada foi uma Phenomenex Luna C18 100 Å (150 x 2,0 mm, i.d., tamanho da partícula 3 μm) com um fluxo de 0,2 mL/min. A temperatura do forno da coluna foi 30 °C. A fase móvel utilizada foi um gradiente linear de tampão água com 0,1 % de ácido fórmico (eluente A) e ACN (eluente B): aos 0 minutos tem-se 95 % de A e 5 % de B, dos 0 aos 30 minutos gradiente de 95 - 30 % de A, dos 30 aos 35 minutos gradiente de 30 - 0 % de A, dos 35 aos 40 minutos eluição isocrática de 100 % de B, e dos 40 aos 45 minutos gradiente linear de 0 - 5 % de A. O volume de injeção utilizado foi de 20 μL .

O espectrómetro de massa foi operado em modo positivo e os parâmetros otimizados foram: temperatura do capilar: 300 °C; voltagem do capilar a 28 V; voltagem do spray de iões a 4,5 kV; fluxo do gás de varrimento a 5 a.u.; fluxo do gás auxiliar a 10 a.u.; fluxo do gás de arrefecimento a 35 a.u.

As análises por LC-FL foram realizadas num aparelho de cromatografia líquida da Shimadzu LC-10ADVP, com duas bombas cromatográficas Shimadzu FCV-10ALVP, com um injector automático da Shimadzu SIL-20AC, *loop* de 100 μL e detector da Shimadzu SPD-10AVP UV-Visível, acoplado a um detector de fluorescência Shimadzu RF-10AXL. A coluna analítica utilizada foi uma Phenomenex Luna C18 100 Å (150 x 2,0 mm, i.d., tamanho da partícula 3 μm) com um fluxo de 0,8 mL/min. A temperatura do forno da coluna foi 30°C. A fase móvel utilizada foi uma eluição isocrática 70:30 (v/v) de água com

2 mM de acetato de amónia (eluyente A) e ACN (eluyente B). O volume de injeção utilizado foi de 20 μ L.

A otimização e a validação do método analítico por cromatografia líquida (Dionex Ultimate 3000 RSLC nano) acoplada à espectrometria de massa de alta resolução (LC-HRMS), usando um espectrómetro de massa quadrupolo-tempo de voo (Q-ToF), Impact II, Bruker. A separação cromatográfica realizou-se com uma coluna Kinetex C18 100 Å (2,1 x 150 mm, 1,7 μ m) mantida a 35°C, com um fluxo de 150 μ L/min. A fase móvel utilizada foi um gradiente linear de ACN contendo 0,1 % de ácido fórmico (eluyente A) e H₂O contendo 0,1 % de ácido fórmico (eluyente B): dos 0 aos 2 minutos eluição isocrática de 5 % de B, dos 2 aos 15 minutos gradiente de 5 - 100% de B, dos 15 aos 20 minutos eluição isocrática de 100 % de B, dos 20 aos 22 minutos gradiente de 100 - 5 % de B, dos 22 aos 30 minutos eluição isocrática de 5 % de B. O injetor automático foi arrefecido aos 8°C e o volume de injeção utilizado foi de 5 μ L. A análise foi efectuada numa fonte de electrospray (Bruker) operando em modo positivo e os parâmetros otimizados foram: voltagem do capilar a 4500 V; gama de massa/carga: 50 a 1000 m/z ; nebulizador: 40 psi; fluxo do gás de secagem: 8 L/min; temperatura de secagem: 200°C; velocidade de aquisição: 3 Hz; modo de aquisição: Análise de dados dependente (auto-MS/MS) com lista de precursores (499,1911 e 506,2350 m/z); tempo de ciclo: 3 s.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de protão (¹H-RMN) foram obtidos num espectrómetro Bruker Avance III 300 ou Bruker Avance III 400 operando a 300 MHz e 400 MHz, respectivamente. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13 (¹³C-RMN) foram obtidos num espectrómetro Bruker Avance III 400 e Bruker Avance III Plus 500, operando a 100,6 MHz e 120,8 MHz, respectivamente. Os desvios químicos são expressos em partes por milhão (ppm) em relação ao tetrametilsilano (TMS), e as constantes de acoplamento (J) em Hz. Em cada situação será indicado o solvente usado bem como os dados obtidos que serão apresentados da seguinte forma: Núcleo estudado (solvente): desvio químico (δ , ppm) [intensidade relativa (nH, como número de protões), multiplicidade (s - singuleto; d - duplete; t - tripleto; dd - duplo de duplete; m - multiplete), constante de acoplamento (J , Hz) e atribuição na molécula].

A elucidação estrutural de todos os compostos sintetizados foi efectuada com base na análise dos resultados obtidos nas experiências bidimensionais. As experiências de Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC), Heteronuclear Multiple Bond Correlation (HMBC) e Homonuclear Correlation Spectroscopy (COSY) foram efectuadas usando os programas de pulso standard da Bruker.

Os espectros de emissão e de absorção de uma solução contendo 0,5 mg de aduto **22** diluído em ACN/H₂O (1:1, v/v) com 0,1 % de ácido fórmico, pH < 7 e de uma solução contendo 0,5 mg de aduto **22** diluído em ACN/H₂O (1:1, v/v) contendo 5 % de hidróxido de amónia, pH > 8, foram obtidos por

um fluorímetro Horiba-Jobin Yvon Fluorolog-3 e por um espectrofotômetro Jasco V-660 com um controlador de temperatura. Os espectros de emissão foram realizados em scans de 1 em 1 nm dos 500 aos 750 nm. Os espectros de absorção foram realizados em scans de 1 em 1 nm dos 800 aos 350 nm.

3.4. Síntese dos padrões

3.4.1. Síntese do aduto 12-[5-isopropyl-4-oxo-3-fenil-2-tioxoimidazolidin-1-il]-NVP, 14.

3.4.1.1. Preparação do complexo hexametilfosforamida (oxodiperóxido)(piridina) molibdênio (MoOPH)^[52]

Adicionou-se H₂O₂ (150 mL) a MoO₃ (30,0141 g). A mistura reaccional foi colocada num banho de água com temperatura controlada, aproximadamente 40°C. Após o período exotérmico (30 minutos) a mistura ficou a 35°C durante 3,5 h até formar um sólido branco suspenso na solução. A mistura foi arrefecida a 20°C, filtrada a vácuo sob uma camada de celite.

O filtrado foi arrefecido a 10°C num banho de gelo e adicionou-se 36 mL de HMPA gota-a-gota durante 5 minutos. Obteve-se um precipitado de cristais amarelos. Após mais 15 min de reacção o precipitado foi filtrado sob vácuo. Os cristais obtidos foram transferidos para um erlenmeyer a que se adicionou uma quantidade mínima de metanol (25 mL) de modo a dissolver os cristais a 40°C sob agitação. A solução saturada foi colocada no congelador durante a noite. Obtiveram-se cristais amarelos que foram filtrados em vácuo e lavados com metanol gelado (30 mL). O sólido obtido de MoO₅H₂O.HMPA, com um rendimento de 14 % (23,8 g) foi desidratado, protegido da luz, num excicador com pentóxido de fósforo sob vácuo durante dois dias, até peso constante. Obteve-se um sólido amarelo de MoO₅.HMPA (22,0 g), que foi dissolvido em THF anidro (100 mL) sob agitação numa atmosfera de azoto. A 20°C foi adicionada piridina (5 mL) gota-a-gota durante 10 min. Formou-se um precipitado amarelo que foi filtrado em vácuo e lavado com THF anidro e éter etílico anidro. Os cristais obtidos foram transferidos para um frasco escuro e desidratados num excicador com óxido de fósforo sob vácuo durante 2,5 h. Obteve-se o produto sólido MoO₅Py.HMPA com um rendimento de 83,3 % (42 g).

3.4.1.2. Preparação de 11-ciclopropil-5,11-di-hidro-4-(hidroximetil)-6H-dipirido-[3,2-b:2',3'-e]diazepina-6-ona, (12-OH-NVP, 5)

A uma solução de nevirapina (3 g, 11,28 mmol, 1.0 eq.) em THF (120 mL), sob fluxo de azoto e num banho de gelo, adicionou-se gota a gota LDA (7 mL, 53 mmol, 1,3 eq.). A solução foi posteriormente arrefecida a -40°C e foi adicionado LDA (20 mL, 151,5 mmol, 1,3 eq) durante 1 min.

Após a adição de MoOPH (6 g, 18,5 mmol, 1,6 eq.) a mistura foi agitada a -40°C durante 3h. No final adicionou-se 100 mL de NH₄Cl saturado para parar a reacção. A fase aquosa foi saturada com NaCl e o produto foi extraído com acetato de etilo (5x100 mL). Juntaram-se as fases orgânicas recolhidas e secou-se com sulfato de magnésio anidro. O produto foi filtrado o solvente foi destilado à secura num evaporador rotativo. O sólido amarelo esbranquiçado obtido (mistura de NVP com 12-OH-NVP) que foi purificado por cromatografia em coluna CH₂Cl₂/AcOEt (8:2, v/v). Obteve-se 12-OH-NVP, sob a forma de um sólido esbranquiçado, com um rendimento de 43 % (1,36 g). ¹H-NMR (DMSO, d₆): δ 9,72 (1H, s, troca com D₂O, NH), 8,51 (1H, dd, J=4,77 e J=1,98, H9), 8,19 (1H, d, J=4,9, H2), 8,01 (1H, dd, J=7,6 e J=1,98, H7), 7,25 (1H, d, J=4,9 H3), 7,19 (1H, dd, J=7,59 e J=4,77 H8), 5,55 (1H, m, OH), 4,75 (1H, dd, J=15,5 e J=6 H12), 4,53 (1H, dd, J=15,2 e J=4,6 H12), 3,63 (1H, m, H13), 0,89 (2H, d, J=6,78 H14 ou H15), 0,41-0,29 (2H, m, H14 ou H15). Os sinais obtidos estão de acordo com os descritos descrito na literatura.^[53]

3.4.1.3. Preparação de 11-ciclopropil-5,11-di-hidro-4-metil-(metanossulfoximetil)-6H-dipirido-[3,2-b:2',3'-e]diazepina-6-ona, (12-MsO-NVP, 23)

A uma solução de 12-OH-NVP (109,4 mg, 0,3893 mmol, 1.0 eq.) foram adicionados trietilamina (70 µL, 0,506 mmol, 1,3 eq.) e cloreto de mesilo (39 µL, 0,506 mmol, 1,3 eq.) em THF seco (8 mL). A mistura reacional foi agitada durante 40 minutos num banho de água e gelo. No final, adicionou-se 38 mL de água e o produto foi extraído com diclorometano (5x12 mL). As fases orgânicas foram reunidas, secas com sulfato de magnésio anidro e o solvente foi evaporado a pressão reduzida. Obteve-se um sólido amarelo com um rendimento de 87,20 % (95,4 mg). ¹H-NMR (CDCl₃): δ 9,33 (1H, s, troca com D₂O, NH), 8,55 (1H, dd, J=4,68 e J=1,6 H9), 8,33 (1H, d, J=4,88 H2), 8,15 (1H, dd, J=15,2 e J=7,4 H7), 7,15 (1H, d, J=4,9 H3), 7,09 (1H, dd, J=2,72 H8), 5,39-5,26 (2H, m, H12), 3,77-3,64 (1H, m, H13), 2,83 (3H, s, CH₃), 0,93-0,85 (2H, m, H14 ou H15), 0,49-0,48 (2H, m, H14 ou H15). Os sinais obtidos estão de acordo com os descritos na literatura.^[50]

3.4.1.4. Formação do aduto 12-(valinato de etilo-N^α-il)-NVP, 24

A uma solução hidrocloreto de valinato de etilo (39,28 mg, 0,27054 mmol, 3,9 eq.) em tampão fosfato 50 mM pH = 7,4 (2 mL) adicionou-se KHCO₃ (37,39 mg, 0,271 mmol, 3,9 eq.). A solução obtida foi incubada a 37°C durante 30 min, após o que se adicionou uma solução de 12-MsO-NVP (25 mg, 0,0698 mmol, 1,0 eq.) em THF (200 µL). A reacção foi incubada a 37°C durante 27 h. No final evaporou-se o solvente sob pressão reduzida. A reacção foi controlada por HPLC-DAD. A formação do aduto foi comprovada por comparação com um padrão existente no laboratório.

3.4.1.5. 12-[5-Isopropil-4-oxo-3-fenil-2-tioxoimidazolidin-1-il]-NVP, 14.

A uma solução de mistura reaccional obtida no ponto **III.3.1.4.** (40 mg), 40 % de 2-propanol/H₂O (v/v) (1,9 mL) adicionou-se uma solução de acetato de potássio 5 M (100 µL), e ainda PITC (10 µL). A mistura reaccional resultante foi incubada à t.a. durante 18 h e depois a 45°C durante 2 h. Evaporou-se o 2-propanol sob pressão reduzida e adicionou-se H₂O (1 mL). Extrauiu-se com acetato de etilo (3x1 mL) e éter (3x1 mL). Juntaram-se as fases orgânicas e evaporou-se à secura. A mistura reaccional foi purificada por HPLC semi-preparativo, tendo-se obtido um sólido branco com um rendimento de 29,30 % (6,1 mg). **MS (ESI):** *m/z* 499 [MH]⁺; 265 [M-C₁₂H₁₄N₂OS]⁺. Os sinais obtidos estão de acordo com os descritos na literatura.^[21]

3.4.2 Síntese do aduto 12-[5-isopropyl-*d*₇-4-oxo-3-fenil-2-tioxoimidazolidin-1-il]-NVP, 29.

3.4.2.1 Preparação do éster etílico da *L*-valina-*d*₈

Preparou-se uma solução de *L*-valina-*d*₈ (25 mg, 0,1997 mmol, 1,0 eq.) em etanol (1 mL) na presença de peneiros moleculares 4A. Após arrefecimento da solução a 0°C adicionou-se cloreto de tionilo (15 µL, 199,7 µmol, 1,0 eq.). A solução obtida foi posteriormente refluxada a 100°C durante 2 h. A reacção foi controlada c.c.f. (eluído com uma solução 2:1 metanol/H₂O (v/v), revelação com ninidrina). No final das 2 h transferiu-se a reacção para um balão tarado, evaporou-se o etanol à secura e adicionou-se mais etanol (2x2 mL) e evaporaram-se novamente os solventes no rotavapor. O produto final foi seco sob vácuo na presença de NaOH. Obteve-se um sólido branco, com um rendimento de 95,6 % (30,3 mg). **MS (ESI):** *m/z* 154 [MH]⁺; 80 [M-C₃H₆O₂]⁺.

3.4.2.2. Formação do aduto 12-(valinato de etilo-*d*₈-*N*^α-il)-NVP, 27.

A uma solução de valina-*d*₈ (27,5 mg, 0,176 mmol, 1,0 eq.) em DMF (2,67 mL) foi adicionada uma solução de K₂CO₃ (25 mg, 0,176 mmol, 1,0 eq.) em tampão fosfato 50 mM pH = 7,4 (1,3 mL). A solução foi incubada durante 30 minutos e depois foi-lhe adicionada uma solução de 12-MSO-NVP (170 mg, 0,529 mmol, 3,9 eq.) em DMF (400 µL). A mistura reaccional resultante foi incubada a 37°C durante 3 dias. No final evaporou-se o solvente sob pressão reduzida. A reacção foi controlada por HPLC-DAD.

3.4.2.3. 12-[5-isopropyl-*d*₇-4-oxo-3-fenil-2-tioxoimidazolidin-1-il]-NVP, 29.

A uma solução da mistura reaccional obtida no ponto **III.3.2.2.** (27,5 mg), 40 % 2-propanol/H₂O (v/v) (1,3 mL) adicionou-se uma solução de acetato de potássio 5 M (69 µL), e ainda PITC (7 µL). A mistura reaccional resultante foi incubada à t.a. durante 18 h e depois a 45°C durante 2 h. Evaporou-se o 2-propanol sob pressão reduzida e adicionou-se H₂O (1 mL). Extraiu-se com acetato de etilo (3x1 mL) e éter (3x1 mL). Juntaram-se as fases orgânicas e evaporou-se à secura. A mistura reaccional foi purificada por HPLC semi-preparativo, tendo-se obtido um sólido branco com um rendimento de 4,5 % (1,5 mg). **MS (ESI):** *m/z* 506 [MH]⁺; 265 [M-C₁₂H₁₄N₂OS]⁺; 237 [M-C₁₃H₆D₈N₂O₂S]⁺ e 223 [M-C₁₅H₁₁D₈N₂OS]⁺.

3.4.3. Síntese do aduto 12-[5-isopropyl-4-oxo-3-fluorescein-2-tioxoimidazolidin-1-il]-NVP 22.

A uma solução do aduto 12-(valinato de etilo-*N*^q-il)-NVP, **23**, (preparado de acordo com o procedimento descrito no ponto III.3.1.4.) (9,9 mg, 0,0242 mmol, 1,0 eq.) em dioxano (0,6 mL) adicionou-se uma solução aquosa de 0,125 M de KHCO₃ (164 µL). A mistura resultante foi incubada durante 5 min à t.a. após o que se adicionou uma solução de FITC (21,4 mg, 0,0549 mmol, 1,13 eq.) em dioxano (1mL). A mistura reaccional foi aquecida a 60°C durante 72 h e monitorizada por c.c.f. [acetato de etilo/Hexano (6:4, v/v)]. Adicionou-se HCl (109 µL) e H₂O (4 mL) e fizeram-se extracções com acetato de etilo (1x4 mL). Após evaporação do solvente da fase orgânica sob pressão reduzida, o produto foi purificado por c.c.f.p. [metanol/CH₂Cl₂ (1:9, v/v)]. Obteve-se um sólido amarelo fluorescente com um rendimento de 5,5 % (1,0 mg). **¹H-NMR (MeOD, *d*₄):** δ 8,53 (1H, m, NH), 8,26 (2H, d, *J*=5,1 OH), 8,15 (1H, m, H9-NVP), 8,01 (1H, d, *J*=6,9 H7-Hidantoina), 7,74 (2H, dd, *J*=8,3 e *J*=23,4 H11-hidantoina e H2-NVP), 7,36 (1H, m, H10-hidantoina), 7,31 (1H, d, *J*=15 H7-NVP), 7,24 (2H, m, H8 e H3-NVP), 6,77-6,6 (6H, m, xanteno), 3,78 (1H, s, H5-hidantoina), 3,65 (1H, s, H12-NVP), 2,54 (1H, m, H15-hidantoina), 2,41 (1H, m, H13-NVP), 1,25 (3H, d, *J*=4 H16 ou H17-hidantoina), 1,16 (2H, m, H14 ou H15-NVP), 0,98 (3H, d, *J*=6,9 H16 ou H17-hidantoina), 0,93-0,90 (2H, m, H14 ou H15-NVP). **¹³C-NMR (MeOD, *d*₄):** δ 140,3 (C9-NVP), 135,2 (C11-hidantoina), 129,4, 113,4, 102,7 (C-xanteno), 126,1 (C10-hidantoina), 126 (C7-hidantoina), 119,9 (C7-NVP), 119,5 (C8/C3), 70,1 (C12-NVP), 29,9 (C5-hidantoina), 29,3 (C15-hidantoina), 26,7 (C13-NVP). **MS (ESI):** *m/z* 753 [MH]⁺. **FL:** (0,5 mg de aduto X diluído em H₂O/ACN, (1:1, v/v), com 0,1% tampão fosfato pH 7) λexcitação 440 nm, λemissão 548 nm (máx); (0,5 mg de aduto **22** diluído em H₂O/ACN, (1:1, v/v), com 5 % NaOH pH 4) λexcitação 480 nm, λemissão 529 nm (máx).

3.5. Comparação dos diferentes métodos de degradação de *N*-alquil Edman

3.5.1 Comparação da intensidade dos dois sinais obtidas por análise de LC-ESI-MS de soluções padrão dos adutos 14 e 22

3.5.1.1. Aduto padrão 14

Solução padrão stock do aduto 14: pesou-se 0,5 mg de aduto **14** para um eppendorf de 1 mL e perfez-se o volume com uma solução 50 % ACN/H₂O (1:1, v/v), obtendo-se uma solução final com uma concentração de 0,5 mg/mL.

Soluções de trabalho de aduto 14: foram obtidas a partir de 10 µL da solução padrão stock do aduto **14** diluindo-a em 1000 µL de uma solução 50 % ACN/H₂O (1:1, v/v). Obteve-se uma solução com concentração final de 5 µg/mL.

Solução mãe de aduto 14: foram obtidas a partir de 10 µL da solução de trabalho de aduto **14** diluindo-a em 1000 µL de uma solução 50 % ACN/H₂O (1:1, v/v). Obteve-se uma solução final com uma concentração de 50 ng/mL.

Soluções analisadas de aduto 14: foram obtidas a partir de (10, 20, 40, 60, 80 e 100 µL) da solução mãe do aduto **14** diluindo-a em 1000 µL de uma solução 50 % ACN/ H₂O (1:1, v/v). Obtiveram-se seis soluções finais com concentrações de aduto **14** de: 0,5, 1, 2, 3, 4 e 5 ppb.

3.5.1.2. Aduto padrão 22

Solução padrão stock do aduto 22: pesou-se 0,5 mg de aduto 24 para um eppendorf de 1 mL e perfez-se o volume com uma solução 50 % ACN/H₂O (1:1, v/v), obtendo-se uma solução final com uma concentração de 0,5 mg/mL.

Soluções de trabalho de aduto 22: foram obtidas a partir de 10 µL da solução padrão stock do aduto **22** diluindo-a em 1000 µL de uma solução 50 % ACN/H₂O (1:1, v/v). Obteve-se uma solução com concentração final de 5 µg/mL.

Solução mãe de aduto 22: foram obtidas a partir de 10 µL da solução de trabalho de aduto **22** diluindo-a em 1000 µL de uma solução 50 % ACN/H₂O (1:1, v/v). Obteve-se uma solução final com uma concentração de 50 ng/mL.

Soluções analisadas de aduto 22: forma obtidas a partir de (10, 20, 40, 60, 80 e 100 µL) da solução mãe do aduto **22** diluindo-a em 1000 µL de uma solução 50 % ACN/H₂O (1:1, v/v). Obtiveram-se seis soluções finais com concentrações de aduto **22** de: 0,5, 1, 2, 3, 4 e 5 ppb.

3.5.2. Comparação da intensidade dos sinais obtidos por análise de LC-ESI-MS após degradação de *N*-alquil Edman da Hb isolada de doentes

3.5.2.1. Usando como reagente derivatizante o isotiocianato de fluoresceína (FITC)

A 20,4 mg de Hb adicionou-se uma solução aquosa de 0,5 M KHCO₃ em 2-propanol (2:1, v/v) (0,8 mL) e FITC (6 mg, 0,0154 mmol, 1,0 eq.). Incubou-se durante 1 h 30 a 60°C. Após filtração com um filtro de crivagem molecular, adicionou-se uma solução de 5 % de hidróxido de amónia (1,5 mL) para acertar o pH para 14 e fez-se uma separação por SPE de troca aniónica. Obteve-se um líquido amarelo claro que foi evaporado à secura e finalmente redissolvido em metanol para ser analisado por LC-MS.

3.5.2.2. Usando como reagente derivatizante o fenil-isotiocianato (PITC)

3.5.2.2.1. Método I

A 20,2 mg de Hb adicionou-se uma solução de DMF (0,6 mL), uma solução de 1 M NaOH (26 µL) e PITC (6 µL). Incubou-se durante 2h a 37°C e depois 1,5 h a 45°C. Adicionou-se H₂O (2,4 mL). Extraiu-se com acetato de etilo (3x0,8 mL). Juntaram-se as fases orgânicas e evaporou-se à secura. O sólido obtido foi redissolvido em metanol para ser analisado por LC-MS.

3.5.2.2.2. Método II

A 20,3 mg de Hb adicionou-se uma solução de 40 % 2-propanol/H₂O (v/v) (950 µL), uma solução de acetato de potássio 5 M (50 µL), e ainda PITC (5 µL). A mistura reacional resultante foi incubada à t.a. durante 18 h e depois a 45°C durante 2 h. Evaporou-se o 2-propanol sob pressão reduzida e adicionou-se H₂O (1 mL). Extraiu-se com acetato de etilo (3x1 mL) e éter (3x1 mL). Juntaram-se as

fases orgânicas e evaporou-se à secura. O sólido amarelo obtido foi redissolvido em metanol para ser analisado por LC-MS.

3.5.3. Análise do aduto 22 por cromatografia líquida acoplada a um detector de fluorescência (LC-FL).

Solução padrão stock do aduto 22: pesou-se 0,5 mg de aduto **22** para um eppendorf de 1 mL e fez-se o volume com uma solução 50 % ACN/H₂O (1:1, v/v) contendo 2 mM de acetato de amónia, obtendo-se uma solução final com uma concentração de 0,5 mg/mL.

Soluções de trabalho de aduto 22: foram obtidas a partir de 10 µL da solução padrão stock do aduto **22** diluindo-a em 1000 µL de uma solução 50 % ACN/H₂O (1:1, v/v) contendo 2 mM de acetato de amónia. Obteve-se uma solução com concentração final de 5 µg/mL.

Solução mãe de aduto 22: foram obtidas a partir de 10 µL da solução de trabalho de aduto **22** diluindo-a em 1000 µL de uma solução 50 % ACN/H₂O (1:1, v/v) contendo 2 mM de acetato de amónia. Obteve-se uma solução final com uma concentração de 50 ng/mL.

Soluções analisadas de aduto 22: foram obtidas a partir de (10, 20, 40, 60, 80 e 100 µL) da solução mãe do aduto **22** diluindo-a em 1000 µL de uma solução 50 % ACN/H₂O (1:1, v/v) contendo 2 mM de acetato de amónia. Obtiveram-se seis soluções finais com concentrações de aduto **22** de: 0,5, 1, 2, 3, 4 e 5 ppb.

3.6. Optimização e Validação do método analítico

3.6.1. Preparação das soluções padrão stock, soluções de trabalho e soluções mãe.

3.6.1.1. Aduto padrão 14

Solução padrão stock do aduto 14: pesou-se 4,7 mg de 12-[5-Isopropil-4-oxo-3-fenil-2-tioxiimidazolidin-1-il]-NVP, **14**, para um balão volumétrico de 5 mL e fez-se o volume com uma solução 50 % metanol/H₂O, obtendo-se uma solução final com uma concentração de 0,94 mg/mL.

Soluções de trabalho do aduto 14: foram obtidas a partir de 250 μL da solução padrão stock de **14** diluindo-a em 4750 μL de uma solução 50 % metanol/ H_2O . Obtiveram-se duas soluções com concentrações finais de 47 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Soluções mãe do aduto 14: foram obtidas a partir de 100 μL da solução de trabalho de aduto **14** diluindo-a em 4850 μL de uma solução de 50 % metanol/ H_2O e adicionando-lhe 50 μL de solução de trabalho deuterada. Obtiveram-se duas soluções com concentrações finais de 940 pg/mL .

3.6.1.2. Padrão interno, 29

Solução padrão stock do padrão interno 29: pesou-se 0,9 mg de padrão interno, **29**, para um balão volumétrico de 5 mL e fez-se o volume com uma solução 50 % metanol/ H_2O , obtendo-se uma solução final com uma concentração de 0,18 mg/mL .

Soluções de trabalho do padrão interno 29: foram obtidas a partir de 250 μL da solução padrão stock do padrão interno **29** diluindo-a em 4750 μL de uma solução 50 % metanol/ H_2O . Obtiveram-se duas soluções com concentrações finais de 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Solução mãe do padrão interno 29: foram obtidas a partir de 200 μL da solução de trabalho de padrão interno **29** diluindo-a em 19800 μL de uma solução de 50 % metanol/ H_2O . Obteve-se uma solução final com uma concentração de 90 pg/mL .

3.6.1.3. Curva de calibração

Soluções para a curva de calibração: foram obtidas a partir de (53, 100, 200, 500, 692 e 1000) μL da solução mãe do aduto **14** diluindo-a em (947, 900, 800, 500, 308 e 0) μL da solução mãe do padrão interno **29**. Obtiveram-se 6 soluções finais com concentrações de aduto **14** de 50, 94, 188, 470, 650 e 940 ppb, contendo 90 ppb de padrão interno **29**. Determinou-se o limite de quantificação aos 15 ppb de aduto **14** contendo 90 ppb de padrão interno **29**.

3.6.1.4. Preparação das soluções dopadas e soluções fortificadas

Soluções dopadas: foram preparadas a partir de 100 µL de uma solução de aduto **14**, que é evaporada à secura. Adicionou-se 20 mg de Hb, uma solução de 40 % 2-propanol/H₂O (v/v) (950 µL), uma solução de acetato de potássio 5 M (50 µL), e ainda PITC (5 µL). A mistura reaccional resultante foi incubada à t.a. durante 18 h e depois a 45°C durante 2 h. Evaporou-se o 2-propanol sob pressão reduzida e adicionou-se H₂O (1 mL). Extraíu-se com acetato de etilo (3x1 mL). Juntaram-se as fases orgânicas e evaporou-se à secura. O sólido amarelo obtido foi redissolvido em 100 µL de metanol para ser analisado por LC-MS.

Soluções fortificadas: foram preparadas a partir de 100 µL de uma solução 50 % água/metanol, que é evaporada à secura. Adicionou-se 20 mg de Hb, uma solução de 40 % 2-propanol/H₂O (v/v) (950 µL), uma solução de acetato de potássio 5 M (50 µL), e ainda PITC (5 µL). A mistura reaccional resultante foi incubada à t.a. durante 18 h e depois a 45°C durante 2 h. Evaporou-se o 2-propanol sob pressão reduzida e adicionou-se H₂O (1 mL). Extraíu-se com acetato de etilo (3x1 mL). Juntaram-se as fases orgânicas e evaporou-se à secura. O sólido amarelo obtido foi redissolvido em 100 µL de solução mãe do padrão interno **29** para ser analisado por LC-MS.

3.6.1.5. Avaliação da estabilidade

As soluções foram preparadas a partir de 100 µL de uma solução de aduto **14**, que é evaporada à secura. Adicionou-se uma solução de 40 % 2-propanol/H₂O (v/v) (950 µL), uma solução de acetato de potássio 5 M (50 µL), e ainda PITC (5 µL). A mistura reaccional resultante foi incubada à t.a. durante 18 h e depois a 45°C durante 2 h. Evaporou-se o 2-propanol sob pressão reduzida e adicionou-se H₂O (1 mL). Extraíu-se com acetato de etilo (3x1 mL). Juntaram-se as fases orgânicas e evaporou-se à secura. O sólido amarelo obtido foi redissolvido em 100 µL de metanol para ser analisado por LC-MS.

3.6.2. Determinação da exactidão e precisão do método

A exactidão do método foi avaliada pelos ensaios inter e intra-dias por comparação do valor da média experimental com o valor nominal das concentrações de três soluções dopadas independentes (940, 470 e 188 ppb de aduto **14** contendo 90 ppb de padrão interno **29**, num total de cinco amostras por composto por dia, em dois dias diferentes).

A precisão do método foi estimada pelos coeficientes de variação obtidos dos ensaios inter e intra dias. O limite de quantificação (LOQ) foi estimado pela análise de duas soluções dopadas com diferentes concentrações (30 e 15 ppb de aduto **14** contendo 90 ppb de padrão interno **29**, num total de cinco amostras por composto) e determinou-se a concentração mínima à qual o desvio do valor nominal da concentração e o coeficiente de variação não excederam os 20 %.

3.6.3. Determinação da recuperação e efeito matriz

O efeito matriz foi testado e estimado pelo rácio entre as áreas dos picos provenientes de amostras fortificadas com 90 ppb de padrão interno **29** e as áreas do padrão interno obtidas das soluções padrão injectadas (188 ppb de aduto **14** contendo 90 ppb de padrão interno **29**). As recuperações das extracções foram calculadas pelo rácio das áreas obtidas das amostras dopadas descritas na secção III.5.1.4. em função das áreas obtidas das amostras fortificadas com 90 ppb de padrão interno. As amostras fortificadas foram realizadas em triplicado.

3.6.4. Testes para melhorar a percentagem de recuperação

3.6.4.1. Extração em fase sólida (EFS) vs extração líquido-líquido (ELL)

A três soluções dopadas de uma solução de 470 ppb de aduto **14** contendo 90 ppb de padrão interno **29**, e a três soluções fortificadas com 90 ppb de padrão interno **29**, fizeram-se extracções líquido-líquido (ELL). A outras três soluções dopadas de uma solução de aduto **14** igual à anterior, e a outras três soluções fortificadas com 90 ppb de padrão interno **29**, fizeram-se extracções em fase sólida (EFS). As seis soluções foram redissolvidas em 100 µL de uma solução de 50 % metanol/H₂O para serem analisadas por LC-MS.

3.6.4.2. Influência da polaridade do solvente utilizado para reconstituir os analitos

Prepararam-se três soluções padrão de 100 µL (188 ppb aduto **14** contendo 90 ppb de padrão interno, **29**) e evaporou-se à secura. A solução A foi reconstituída com metanol (100 µL). A solução B foi reconstituída com metanol (50 µL). A solução C foi reconstituída com uma solução de 50 % metanol/H₂O (100 µL) já preparada. Colocaram-se as três soluções nos ultrassons durante 5 minutos. À solução 2, adicionou-se H₂O (50 µL) de forma a perfazer o volume final de 100 µL.

As três soluções foram analisadas por LC-MS.

3.6.4.3. Influência da ordem de adição de um solvente aquoso ou orgânico após a evaporação do 2-propanol

Prepararam-se duas soluções padrão de 100 µL (188 ppb aduto **14** contendo 90 ppb de padrão interno **29**) e evaporou-se à secura. Na solução A, adicionou-se H₂O (1 mL) e extraiu-se com acetato de etilo (3x1 mL). Na solução B, adicionou-se acetato de etilo (1 mL) e levou-se aos ultrassons durante 5 minutos. Adicionou-se H₂O (1 mL) e extraiu-se com acetato de etilo (2x1 mL). As duas soluções foram evaporadas à secura e redissolvidas em 100 µL de metanol para serem analisadas por LC-MS.

3.6.4.4 Influência do 2-propanol no meio reaccional e o uso de ultrassons

Prepararam-se duas soluções padrão de 188 ppb de aduto **14** contendo 90 ppb de padrão interno **29** (A e B) e procedeu-se à degradação de *N*-alquilo Edman, mas sem a presença de Hb. Paralelamente, prepararam-se quatro soluções dopadas de 100 µL de uma solução de 188 ppb de aduto **14** contendo 90 ppb de padrão interno **29**, e evaporou-se à secura. Nas duas soluções padrão (A e B) e em duas das soluções dopadas (C e D), testou-se a influência do 2-propanol na solução da reacção.

Na solução A e C, evaporou-se o 2-propanol e nas soluções B e D não se evaporou o 2-propanol. Nas duas soluções dopadas restantes (E e F) testou-se a influência do 2-propanol na solução com o uso de ultrassons antes das extracções. Na solução dopada E, evaporou-se o 2-propanol e levou-se 5 minutos aos ultrassons antes do passo das extracções. Na solução dopada F, não se evaporou o 2-propanol e levou-se 5 minutos aos ultrassons antes do passo das extracções.

Todas as soluções foram extraídas com acetato de etilo (3x1 mL) e evaporadas à secura. As seis soluções foram redissolvidas em 100 µL de metanol para serem analisadas por LC-MS.

3.6.4.5 Influência da quantidade de hemoglobina utilizada

Prepararam-se seis soluções dopadas de 100 µL de uma solução padrão (188 ppb aduto **14** contendo 90 ppb de padrão interno **29**), das quais três continham 20 mg de Hb (A, B e C) e as outras três continham 80 mg de Hb (D, E e F). As seis soluções foram preparadas em duplicado. Nas soluções A e D, evaporou-se o 2-propanol e adicionou-se H₂O (1 mL). Extraiu-se com acetato de etilo (1 mL). A reacção foi incubada durante 15 minutos a 60°C. Extraiu-se com acetato de etilo (2x1 mL). Nas soluções

B e E, evaporou-se o 2-propanol. A reacção foi incubada durante 15 minutos a 60°C e adicionou-se H₂O (1 mL). Extraiu-se com acetato de etilo (3x1 mL). Nas soluções C e F, evaporou-se o 2-propanol e adicionou-se H₂O (1 mL). Extraiu-se com acetato de etilo (3x1 mL). Todas as soluções foram redissolvidas em 100 µL de metanol para serem analisadas por LC-MS.

3.7. Análise das amostras obtidas após aplicação do procedimento optimizado de degradação de *N*-alquil Edman a hemoglobinas isoladas de doentes

3.7.1. Procedimento para isolar a hemoglobina a partir das células vermelhas

Aqueceu-se a 60°C 500 µL de hemácias durante 1h. Adicionaram-se 500 µL de uma solução salina a 0,9 %. De seguida, o hemolisado foi diluído com 750 µL de H₂O destilada. A 1 mL da diluição adicionou-se 6 mL de HCl 50 mM em 2-propanol gelado e centrifugou-se a 3000 g durante 10 minutos para remover as membranas celulares. Posteriormente, recolheu-se o sobrenadante e precipitou-se a Hb adicionando com agitação 30 mL de acetato de etilo. No final, lavou-se o precipitado com 1 mL de pentano e secou-se no speed-vaccum.

3.7.2. Reacção de degradação de *N*-alquil Edman para as hemoglobinas dos doentes e soluções dopadas

A 20 mg de Hb adicionou-se uma solução de 40 % 2-propanol/H₂O (v/v) (950 µL), uma solução de acetato de potássio 5 M (50 µL), e ainda PITS (5 µL). A mistura reaccional resultante foi incubada à t.a. durante 18 h e depois a 45°C durante 2 h. Evaporou-se o 2-propanol sob pressão reduzida e adicionou-se H₂O (1 mL). Extraiu-se com acetato de etilo (1x1 mL). Incubou-se novamente a reacção 15 minutos a 60°C. Extraiu-se com acetato de etilo (2x1 mL). Juntaram-se as fases orgânicas e evaporou-se à secura. O sólido amarelo obtido foi redissolvido em 100 µL de metanol para ser analisado por LC-TOF-MS.

4. Bibliografia

- [1] Marseille, E.; Kahn, J. G.; Mmimo, F.; Guay, L.; Musoke, P.; Fowler, M. G.; Jackson, J. B.; *Lancet.*, **1999**, 354, 803–809.
- [2] Lallemand, M.; Jourdain, G.; Le Coeur, S.; Mary, J. Y.; Ngo-Giang-Huong, N.; Koetsawang, S.; Kanshana, S.; McInstosh, K.; Thaineua, V.; *N. Engl. J. Med.*, **2004**, 351, 217–28.
- [3] Guidelines for the use of antiretroviral agents in pediatric HIV infection, **2010**, 16, 1–219.
- [4] Clotet, B.; Van der Valk, M.; Negredo, E.; Reiss, P.; *J. Acquir. Immune Defic Syndr.*, **2003**, 79–84.
- [5] Perinatal HIV Guidelines Working Group, Public Health Service Task Force recommendations for use of antiretroviral drugs in pregnant HIV-infected women for maternal health and interventions to reduce perinatal HIV transmission in the United States, **2009**, 1–90.
- [6] Pollard, R. B.; Robinson, P.; Dransfield, K.; *Clin. Ther.*, **1998**, 20, 1071–1092.
- [7] Warren, K. J.; Boxwell, D. E.; Kim, N. Y.; Drolet, B. A.; *Lancet.*, **1998**, 351, 567.
- [8] Fagot, J. P.; Mockenhaupt, M.; Bouwes-Bavinck, J. N.; Naldi, L.; Viboud, C.; Roujeau, J. C.; *AIDS*, **2001**, 15, 1843–1848.
- [9] Sanne, I.; Mommeja-Marin, H.; Hinkle, J.; Bartlett, J. A.; Lederman, M. M.; Maartens, G.; Wakeford, C.; Shaw, A.; Quinn, J.; Gish, R. G.; Rousseau, F.; *J. Infect. Dis.*, **2005**, 191, 825–829.
- [10] Baylor, M. S.; Johann-Liang, R.; *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, **2004**, 35, 538–539.
- [11] Wen, B.; Chen, Y.; Fitch, W. L.; *Drug Metabolism and Disposition*, **2009**, 37, 1557-1562.
- [12] Thompson, M. A.; Alberg, J. A.; Cahn, P.; Montaner, J. S.; Rizzardini, G.; Telenti, A.; Gatell, J. M.; Günthard, H. F.; Hammer, S.M.; Hirsch, M. S.; Jacobsen, D. M.; Reiss, P.; Richman, D. D.; Volberding, P. A.; Yeni, P.; Schooley, R. T.; *JAMA*, **2010**, 304, 321-333.
- [13] Park, B. K.; Kitteringham, N. R.; Maggs, J. L.; Pirmohamed, M.; Williams, D. P.; *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **2005**, 45, 177-202.

- [14] Srivastava, A.; Lian, L.; Maggs, J. L.; Chaponda, M.; Pirmohamed, M.; Williams, D. P.; Park, B. K.; *Drug Metabolism and Disposition*, **2010**, 38, 122-132.
- [15] Uetrecht, J.; *Handbook of Experimental Pharmacology*, **2010**, 196.
- [16] Walsh, J. S.; Miwa, G. T.; *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **2011**, 51, 145-167.
- [17] <http://aimms.vu.nl/en/news-events/news-archive/2013/genetic-factors-and-risks-for-severe-adverse-drugs-reactions.asp>. Consultado a 09.09.2015
- [18] Riska, P.; Lamson, M.; Macgregor, T.; Sabo, J.; Hattox, S.; Pav, J.; Keirns, J.; *Drug Metabolism and Disposition*, **1999**, 27, 895-901.
- [19] Chen, J.; Mannargudi, B. M.; Xu, L.; Uetrecht, J.; *Chem. Res. Toxicol.*, **2008**, 21, 1862-1870.
- [20] Sharma, A. M.; Li, Y.; Novalen, M.; Hayes, M. A.; Uetrecht, J.; *Chem. Res. Toxicol.*, **2012**, 25, 1708-1719.
- [21] Caixas, U.; Antunes, A. M. M.; Marinho, A. T.; Godinho, A. L. A.; Grilo, N. M.; Marques, M. M.; Oliveira, M. C.; Branco, T.; Monteiro, E. C.; Pereira, S. A.; *Toxicology*, **2012**, 301, 33-39.
- [22] Meng, X.; Howarth, A.; Earnshaw, C. J.; Jenkins, R. E.; French, N. S.; Back, D. J.; Naisbitt, D. J.; Park, B. K.; *Chem. Res. Toxicol.*, **2013**, 26, 575-583.
- [23] Tornqvist, M.; Fred, C.; Haglund, J.; Helleberg, H.; Paulsson, B.; Rydberg, P.; *Journal of Chromatography B*, **2002**, 778, 279-308.
- [24] Carlsson, H.; Stedingk, H.; Nilsson, U.; Törnqvist, M.; *Chem. Res. Toxicol.*, **2014**, 27, 2062-2070.
- [25] P. Rydberg, The N-alkyl Edman Method: Mechanisms and Application for Identification of Mutagens in the General Environment, Ph.D. Thesis, Dept. of Environmental Chemistry, Stockholm University, Stockholm, **2000**.
- [26] P. Rydberg, B. Luñing, C.A. Wachtmeister, L. Eriksson, M. Törnqvist, *Chem. Res. Toxicol.*, **2002**, 15, 570.
- [27] P. Kebarle, *J. Mass Spectrom.* **2000**, 35, 804.

- [28] K. Biemann, *Methods Enzymol.*, **1990**, 193, 455.
- [29] Törnqvist, M.; *Methods in Enzimology*, **1994**, 231, 650-657.
- [30] Rydberg, P.; Stedingk, H.; Björklund, J.; *International Journal of Analytical Chemistry*, **2009**, 2009, 1-13.
- [31] Rydberg, P.; Luning, B.; Wachtmeister, C. A.; Törnqvist, M.; *Acta Chemica Scandinavica*, **1993**, 47, 813-817.
- [32] Bjellaas, T.; Olesen, P., T.; Frandsen, H.; Haugen, M.; Stølen, L., H.; Paulsen, J. E.; Alexander, J.; Lundanes, E.; Becher, G.; *Toxicological Sciences*, **2007**, 98(1), 110-117.
- [33] Steding, H.; Rydberg, P.; Törnqvist, M.; *Journal of Chromatography B*, **2010**, 878, 2483-2490.
- [34] Carlsson, H.; Stedingk, H.; Nilsson, U.; Törnqvist, M.; *Chem. Res. Toxicol.*, **2014**, 27, 2062-2070.
- [35] Acena, J.; Stampachiachiere, S.; Pérez, S.; Barceló, D.; *Anal. Bioanal. Chem.*, **2015**, 407, 6289-6299.
- [36] Roca, M.; Leon, N.; Pastor, A.; Yusà, V.; *J. Chromatogr. A.*, **2014**, 1374, 66-76.
- [37] Meng-Reiterer, J.; Varga, E.; Nathanail, A. V.; Bueschl, C.; Rechthaler, J.; MacCormick, S. P.; Michlmayr, H.; Malachová, A.; Fruhmann, P.; Adam, G.; Berthiller, F.; Lemmens, M.; Schuhmacher, R.; *Anal. Bioanal. Chem.*, **2015**.
- [38] Oscar Núñez, O.; Gallart-Ayala, H.; Martins, C., P., B.; Lucci, P.; *Fast Liquid Chromatography Mass Spectrometry Methods in Food and Environmental Analysis*, **2015**.
- [39] Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, FDA, CDER, CVM, **2013**.
- [40] CHMP, Guideline on bioanalytical method validation, Canary Wharf, London, United Kingdom, **2015**.
- [41] European Commission, *J. Eur. Comm.*, **2002**, 221 , 8-36.
- [42] ICH harmonised tripartite guideline validation of analytical procedures: text and methodology., ICH, **2005**.

- [43] Bansal, S.; DeStefano, A.; *AAPS J.*, **2007**, *9*, 109–114.
- [44] SANCO/12495/2011. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed., **2012**.
- [45] Kloepfer, A.; Quintana, J. B.; Reemtsma, T.; *J. Chromatogr. A*, **2005**, *1067*, 153–160.
- [46] Gosetti, F.; Mazzucco, E.; Zampieri, D.; Gennaro, M. C.; *J. Chromatogr. A*, **2010**, *1217*, 3929-3937.
- [47] Taylor, P. J.; *Clin. Biochem.*, **2005**, **38**, 328–334.
- [48] Antunes, A. M. M.; Godinho, A. L. A.; Martins, I. L.; Justino, G. C.; Beland, F. A.; Marques, M. M.; *Chem. Res. Toxicol.*, **2010**, *23*, 888-899.
- [49] Patel, U. R.; Proudfoot, J. R.; *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*, 4023–4025.
- [50] Antunes, A. M. M.; Duarte, M. P.; Santos, P. P.; Gamboa da Costa, G.; Heinze, T. M.; Beland, F. A.; Marques, M. M.; *Chem. Res. Toxicol.*, **2008**, *21*, 1443-1456.
- [51] Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F.; Perrin, D. R.; *Purification of Laboratory Chemicals*, **1980**, 445-446.
- [52] Vedejs, E.; Larsen, S.; *Organic Syntheses*, **1990**, *7*, 277; **1986**, *64*, 127.
- [53] Patel, U. R.; Proudfoot, J. R.; *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*, 4023–4025.