



ISEL

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
ÁREA DEPARTAMENTAL DE ENGENHARIA QUÍMICA

BIOACTIVAÇÃO DE FÁRMACOS MEDIADA PELA
***TRAMETES VERSICOLOR* LACASE**

IOLANDA SOFIA DE MORAIS SANTOS
(Licenciada em Engenharia Química e Biológica)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do
Grau de Mestre em Engenharia Química e Biológica

Orientadores:

Professora Doutora Maria Paula Alves Robalo
Professora Doutora Alexandra Maria Moita Antunes

Júri:

Presidente: Professor Doutor João Pereira Gomes
Vogais: Professora Doutora Paula Branco
Professora Doutora Maria Paula Alves Robalo

Lisboa

Dezembro de 2016



ISEL

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
ÁREA DEPARTAMENTAL DE ENGENHARIA QUÍMICA

BIOACTIVAÇÃO DE FÁRMACOS MEDIADA PELA
***TRAMETES VERSICOLOR* LACASE**

IOLANDA SOFIA DE MORAIS SANTOS
(Licenciada em Engenharia Química e Biológica)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do
Grau de Mestre em Engenharia Química e Biológica

Orientadores:

Professora Doutora Maria Paula Alves Robalo
Professora Doutora Alexandra Maria Moita Antunes

Júri:

Presidente: Professor Doutor João Pereira Gomes
Vogais: Professora Doutora Paula Branco
Professora Doutora Maria Paula Alves Robalo

Lisboa

Dezembro de 2016

Resumo

Este trabalho teve como objectivo avaliar a capacidade da enzima *Trametes versicolor* lacase (TvL) em mimetizar as reacções de biotransformação de fármacos, levadas a cabo pelo citocromo P450 (CYP). A TvL tem a grande vantagem de ser acessível comercialmente e a baixo preço.

Para este estudo escolheram-se vários fármacos cujos efeitos adversos estão ligados ao fenómeno de bioactivação, do próprio fármaco ou de metabolitos de Fase I a metabolitos reactivos quinóides. Numa primeira aproximação, testou-se a capacidade da TvL em oxidar os fármacos Nevirapina (NVP), Trimetoprim (TMP) e Paracetamol (APAP) a compostos quinóides capazes de reagir com bionucleófilos (por exemplo, a glutationa (GSH) e a *N*-acetil-cisteína (NAC)). Foi possível identificar por espectrometria de massa (MS) os mono-aductos e os di-aductos de GSH e NAC do APAP. As mesmas condições foram testadas para a oxidação dos metabolitos fenólicos 2-OH-NVP e 8-OH-Efavirenz (8-OH-EFV), dos fármacos anti-HIV NVP e Efavirenz (EFV). Ao contrário do que aconteceu com o 8-OH-EFV, a oxidação do 2-OH-NVP mediada pela TvL resultou na formação da quinona-imina correspondente. Tendo sido identificados por MS não só os produtos de hidrólise deste metabolito reactivo como também um aducto formado com a lisina.

Testou-se ainda a capacidade do sistema TvL/ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) oxidar posições benzílicas, que são também posições de oxidação catalisadas pelo CYP. Esta capacidade foi comprovada pela formação do metabolito hidróxi-benzílico do fármaco Etravirina (ETV), que foi confirmada por espectrometria de massa de alta resolução.

Os resultados obtidos sugerem que a TvL pode ser utilizada como um sistema de oxidação capaz de mimetizar algumas das vias metabólicas catalisadas pelo CYP. Desta forma, pode-se antecipar a utilidade deste sistema em estudos de toxicologia molecular, dado o baixo custo desta enzima.

Palavras-chave: lacase, fármacos, bioactivação, oxidação biomimética, metabolitos reactivos.

Abstract

This work aimed to evaluate the enzyme's ability *Trametes versicolor* laccase (TvL) to mimic the drug biotransformation reactions, carried out by cytochrome P450 (CYP). The TvL has the great advantage of being available commercially and at a low price.

For this study were chosen several drugs whose side effects are linked to the phenomenon of bioactivation, of the drug itself or of Phase I metabolites into quinoid reactive metabolites. In a first approach, we tested the ability of TvL to oxidize Nevirapine (NVP), Trimethoprim (TMP) and Paracetamol (APAP) to quinoid compounds capable of reacting with bionucleophiles (eg. glutathione (GSH) and *N*-acetyl-cysteine (NAC)). It was identified by mass spectrometry (MS) mono-adducts and di-adducts of GSH and NAC with APAP. The same conditions were tested for the oxidation of phenolic metabolites 2-OH-NVP and 8-OH-Efavirenz (EFV), of the anti-HIV drugs NVP and EFV. Contrasting with what was observed with the 8-OH-EFV, the oxidation of 2-OH-NVP mediated by TvL resulted in formation of the corresponding quinone-imine. This was attested through the identification by MS, not only of the hydrolysis products derived from the reactive metabolite, but also one lysine adduct.

It also tested the ability of TvL to mimic benzylic oxidations catalyzed by CYP. This ability was evidenced by the formation of hydroxy-benzylic metabolite of the anti-HIV Etravirine, a reaction mediated by 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS). The formation of this metabolite was evidenced upon analysis by high resolution mass spectrometry.

Taken together, these results suggest that TvL can mediate the oxidation reactions mirroring the CYP metabolic pathways, which anticipates the usefulness of this system for molecular toxicology studies.

Keywords: laccase, drugs, bioactivation, biomimetic oxidation, reactive metabolites.

Agradecimentos

Antes de mais, quero agradecer às minhas orientadoras, Doutora Alexandra Antunes e Doutora Paula Robalo, pela oportunidade de trabalho, pela disponibilidade dispensada, pelos conselhos práticos e pela dedicação.

Um especial agradecimento à Doutora Catarina Sousa pelo seu apoio incondicional prestado no laboratório e no decorrer deste trabalho, pela compreensão, e amizade, o meu sincero obrigado.

Agradeço à Ana Dias pela paciência, pela ajuda e esclarecimentos nas análises de Espectrometria de Massa e pela sua disponibilidade e carinho que sempre demonstrou por mim. Agradeço ainda aos meus colegas de laboratório que me integraram no Instituto Superior Técnico (IST), João Cardoso e Tiago Fernandes na sua partilha de conhecimentos, nas indicações e pela sua amizade. À Shrika Harjivan, ao Pedro Pinheiro e à Inês Martins pelo apoio prestado.

Aos meus colegas de faculdade, Adriana, Jerson, Marta e Miguel, que me receberam desde o primeiro dia e que sempre me apoiaram e estiveram presentes em todos os momentos destes últimos anos da minha vida estudantil.

Ao Luís pelo apoio incansável ao longo deste percurso académico, pela motivação, pela sua amizade, ternura e amor. Agradeço ainda à Sra. Anabela e ao Sr. José pela integração no ambiente familiar, pelo apoio e amizade.

Aos meus pais pelo apoio, incentivo e força que sempre me transmitiram apesar das milhas de distâncias. Agradeço também por me tornarem na pessoa que sou hoje, através das experiências que vivemos juntos e pela educação, amor e amizade que sempre me transmitiram.

À Luna pelo companheirismo, brincadeiras e pelo olhar tranquilizante.

Lista de abreviaturas:

ABTS	ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
APAP	Paracetamol
BR	Tampão Britton-Robinson
CYP	Citocromo P450
DMSO	Dimetilsulfóxido
EFV	Efavirenz
8-OH-EFV	(S)-6-cloro-4-(ciclopropiletinil)-8-hidróxi-4-(trifluormetilo)-1,4-dihidro-2H-3,1-benzoxazina-2-ona]
ESI	Ionização de <i>Electrospray</i>
ESI(+)-MS	Espectrometria de massa com ionização por <i>electrospray</i> em modo positivo
ESI(-)-MS	Espectrometria de massa com ionização por <i>electrospray</i> em modo negativo
ETV	Etravirina
GSH	Glutathiona
HBT	N-hidróxibenzotriazol
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta resolução acoplada com detector de fotodíodos
¹ H-RMN	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton
LC-ESI-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa de “tandem” por ionização de <i>electrospray</i>
LC-HRMS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa de alta resolução por ionização de <i>electrospray</i>
MH ⁺	Molécula protonada
M-H-	Molécula desprotonada
MR	Metabólitos Reactivos
MS	Espectrometria de Massa
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
NAC	N-acetil-cisteína
NAL	N-acetil-lisina
NNRTI	Inibidor da transcriptase reversa não análogo de nucleósido
NVP	Nevirapina
2-OH-NVP	5,11-dihydro-2-hidróxi-4-metil-4H-dipirido[3,2-b:2',3'-e]-[1,4]diazepina-6-ona, 2-hidróxi-NVP
ppm	Partes por milhão
Q-TOF	Quadrupolo <i>Time of Flight</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
TEMPO	2,2,6,6-tetrametil-piperidina-1-oxil
TMP	Trimetoprim

tr	Tempo de retenção
TvL	Lacase comercial isolada de fungo <i>Trametes versicolor</i>
UV-vis	Espectroscopia de ultravioleta-visível
δ	Desvio químico em relação ao tetrametilsilano (em ppm)

Índice

1. Introdução	1
1.1. Enzimas na biocatálise	1
1.2. Lacases	2
1.2.1. Caracterização Estrutural	3
1.2.2. Centro catalítico das lacases	3
1.3. O papel da bioactivação na toxicidade induzida por fármacos	7
1.4. Fármacos cuja toxicidade está associada à Bioactivação	11
1.4.1. Nevirapina	12
1.4.2. Efavirenz	16
1.4.3. Etravirina	19
1.4.4. Trimetoprim	21
1.4.5. Paracetamol	23
1.5. Âmbito e objectivos.....	26
2. Resultados e Discussão	27
2.1. Ensaio preliminares de oxidação do ABTS pela TvL na presença de bionucleófilos	28
2.2. Ensaio preliminares da TvL com os bionucleófilos	30
2.3. Oxidação dos fármacos para obtenção de metabolitos quinóides.....	32
2.3.1. Paracetamol	32
2.3.2. Nevirapina e Trimetoprim.....	44
2.4. Oxidação enzimática de fármacos a metabolitos hidróxi-benzílicos.....	53
2.4.1. Etravirina	53
2.5. Reacções de oxidação enzimática de metabolitos de Fase I a derivados quinóides.....	59
2.5.1. Oxidação do 8-OH-EFV ((S)-6-cloro-4-(ciclopropiletinil)-8-hidróxi-4-(trifluormetilo)-1,4-dihidro-2H-3,1-benzoxazina-2-ona] pela TvL	59
2.5.2. Oxidação do 2-OH-NVP (11-ciclopropil-2-hidróxi-4-metil-5,11-dihidro-6H-dipirido[3,2-b:2'3'-e][1,4]diazepina-6-ona) pela TvL	63
3. Conclusões e Perspectivas de Trabalho Futuro	73
4. Procedimento Experimental	75
4.1. Considerações gerais	75
4.1.1. Reagentes e Solventes.....	75
4.1.2. Cromatografia em camada fina.....	75
4.1.3. Cromatografia líquida de Alta Resolução (HPLC)	75

4.1.4.	Espectrometria de Massa (MS).....	76
4.1.5.	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	77
4.1.6.	Espectroscopia de Ultravioleta-Visível (UV-Vis).....	77
4.2.	Ensaio de enzimas com o ABTS	77
4.2.1.	Ensaio preliminar de oxidação do ABTS pela TvL na presença de bionucleófilos.....	77
4.3.	Reacções de oxidação enzimática do bionucleófilo NAC.....	78
4.4.	Ensaio enzimático dos fármacos	78
4.4.1.	Reacções de oxidação enzimática dos fármacos APAP, NVP e TMP....	78
4.4.2.	Reacção de bioactivação dos metabolitos reactivos com os bionucleófilos.....	78
4.5.	Oxidações químicas dos fármacos	79
4.5.1.	Procedimento geral para as reacções de oxidação do APAP com sal de Frémy.....	79
4.5.2.	Reacção da NAPQI (54) com o bionucleófilo NAC.....	80
4.6.	Oxidação enzimática de fármacos a metabolitos hidróxi-benzílicos.....	80
4.6.1.	Etravirina	80
4.7.	Síntese dos metabolitos de Fase I.....	80
4.7.1.	Síntese do 8-OH-EFV (33).....	80
4.7.1.1.	Preparação do ligando bpmen.....	80
4.7.1.2.	Preparação do [Fe ^{II} (bpmen)(OTf ₂)].....	81
4.7.1.3.	Preparação do 8-OH-EFV (33)	81
4.7.2.	Síntese do 2-OH-NVP (14)	82
4.7.2.1.	Preparação do 2-acetóxi-NVP (61).....	82
4.7.2.2.	Preparação do 2-OH-NVP (14).....	82
4.8.	Ensaio enzimático com os metabolitos de Fase I	83
4.8.1.	Procedimento geral para as reacções de oxidação enzimática para o 2-OH-NVP.	83
4.8.2.	Procedimento geral para as reacções de oxidação enzimática para o 8-OH-EFV.....	83
4.8.3.	Procedimento geral para as reacções de oxidação enzimática do 2-OH-NVP na presença de bionucleófilo.....	83
4.8.4.	Procedimento geral para as reacções de oxidação enzimática do 8-OH-EFV na presença de bionucleófilo.....	84
5.	Referências Bibliográficas	85

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Formação do complexo enzima-substrato e a conversão do substrato em produtos.....	1
Figura 1.2 – Modelo do centro catalítico da lacase fúngica, <i>Trametes versicolor</i>	4
Figura 1.3 – Esquema geral do centro catalítico, mostrando a transferência de electrões do centro de cobre T1 para o <i>cluster</i> T2/T3, para o caso das lacases bacterianas.....	5
Figura 1.4 – Estruturas moleculares de alguns mediadores, ABTS (1), HBT (2), TEMPO (3).....	6
Figura 1.5 – Representação esquemática dos ciclos redox catalisados pela lacase, na presença de mediador.....	6
Figura 1.6 – Representação esquemática das diferentes fases de acção de um dado fármaco.....	7
Figura 1.7 – Influência da NAC na síntese da GSH.....	10
Figura 1.8 – Estruturas moleculares dos fármacos em estudo.....	11
Figura 2.1 – Oxidação do ABTS ao radical catião (verde escuro), na presença de lacases.....	28
Figura 2.2 – Formação do dímero pela oxidação de grupos tiol (-SH), em que o grupo “R” representa a NAC ou a GSH.....	29
Figura 2.3 – Representação esquemática dos ciclos redox catalisados pela TvL, na presença do ABTS como mediador e na presença de NAC como bionucleófilo.....	29
Figura 2.4 – Sobreposição dos espectros de ¹ H-RMN (500 MHz) da NAC em CD ₃ OD; A) NAC; B) NAC em Tampão BR pH 6, após 16h de reacção; C) NAC e TvL em Tampão BR pH 6, após 16h de reacção.....	31
Figura 2.5 – Cromatograma obtido para o padrão do APAP em tampão BR pH 6 e o respectivo perfil de UV-Vis.....	32
Figura 2.6 – Formação do aducto NAC-APAP (56) por oxidação com o sal de Frémy, após 30 minutos de reacção.....	33
Figura 2.7 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos na reacção do APAP na presença de TvL, ensaio 1, até 3h de reacção.....	34
Figura 2.8 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos por HPLC-DAD da reacção do APAP com a NAC, ensaio 1, até 2h.....	36

Figura 2.9 – Excerto do cromatograma obtido por HPLC-DAD da mistura reaccional (APAP, NAC e TvL), ao fim de 2h de reacção (A), Perfil de UV do aducto 56 (B) e Estrutura molecular do aducto NAC-APAP (C).	37
Figura 2.10 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos por HPLC-DAD da reacção do APAP com a GSH, ensaio 1, até 2h.....	38
Figura 2.11 – Excerto do cromatograma obtido por HPLC-DAD da mistura reaccional (APAP, GSH e TvL), ao fim de 2h de reacção (A), Perfil de UV do aducto 55 (B) e Estrutura molecular do aducto GSH-APAP (C).	39
Figura 2.12 – Espectro de MS/MS obtido por LC-ESI(+)-MS do ião com m/z 313 correspondente à molécula protonada do aducto NAC-APAP	40
Figura 2.13 – Esquema da fragmentação por ESI (+)-MS/MS proposta para o aducto NAC-APAP a partir da molécula protonada a m/z 313.	40
Figura 2.14 – Espectro de MS/MS obtido por LC-ESI(+)-MS do ião com m/z 457 correspondente à molécula protonada do aducto 55.....	41
Figura 2.15 – Esquema da fragmentação por ESI(+)-MS/MS proposta para o aducto GSH-APAP a partir da molécula protonada a m/z 457.....	41
Figura 2.16 – Espectro de MS/MS obtido por LC-ESI(+)-MS do ião a m/z 472 correspondente à molécula protonada do diNAC-APAP (58).	43
Figura 2.17 – Espectro de MS/MS obtido por LC-ESI(-)-MS do ião a m/z 760 correspondente à molécula desprotonada do diGSH-APAP (59).	43
Figura 2.18 – Cromatograma obtido para o padrão da NVP em tampão BR pH 6 e o respectivo perfil de UV-Vis.....	44
Figura 2.19 – Cromatograma obtido para o padrão do TMP em tampão BR pH 6 e o respectivo perfil de UV-Vis.....	44
Figura 2.20 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos na reacção da NVP (10 mM) na presença de TvL (4 U).	46
Figura 2.21 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos na reacção da NVP (10 mM) na presença de TvL (400 U).	46
Figura 2.22 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos na reacção da NVP com a TvL, na presença de NAC, relativamente ao ensaio 1, até 4h de reacção.	48
Figura 2.23 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos até 2h de reacção da NVP com a TvL, na presença de NAL, relativamente ao ensaio 3.	49
Figura 2.24 – Cromatograma obtido para o precipitado obtido na reacção da NVP com a TvL, na presença de NAL, após 2h de reacção.	49
Figura 2.25 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos na reacção do TMP com a TvL, ensaio 1, até 24h de reacção.	51

Figura 2.26 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos na reacção do TMP com a TvL, na presença de NAC, ensaio 1, até 24h de reacção.	52
Figura 2.27 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos por HPLC da mistura reaccional com o TMP, nas condições apresentadas para o ensaio 3, até 96h.	53
Figura 2.28 – Cromatograma obtido para o padrão da ETV em tampão BR pH 6 e o respectivo perfil de UV-Vis.....	54
Figura 2.29 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos na reacção de oxidação da ETV com o sistema TvL/ABTS, na presença de TvL ($v = 0.2$ mL).....	55
Figura 2.30 – Sobreposição dos cromatogramas iónicos extraídos a m/z 451.0503 obtidos em: (A) Reacção de oxidação da ETV com o sistema TvL/ABTS, na após 24 h de reacção; (B) Incubações da ETV na fracção S9 mix de fígado humano.	56
Figura 2.31 – Espectro de MS/MS obtido por ESI (+) do ião a m/z 451.0503 correspondente à molécula protonada do metabolito hidróxi-benzílico.	56
Figura 2.32 – Cromatograma iónico extraído a m/z 449.0340 obtido na reacção de oxidação da ETV com o sistema TvL/ABTS, após 24 h de reacção.	57
Figura 2.33 – Espectro de MS/MS obtido por ESI (+) do ião com m/z 449.0340 correspondente à molécula protonada do aldeído.....	57
Figura 2.34 – Esquema da fragmentação proposta por ESI(+)-MS/MS para o aldeído a partir da molécula protonada a m/z 449.0340.	58
Figura 2.35 - Cromatograma obtido para o padrão do 8-OH-EFV em tampão BR pH 6 e o respectivo perfil de UV-Vis.	60
Figura 2.36 - Cromatograma obtido para o padrão do EFV em metanol e o respectivo perfil de UV-Vis.	60
Figura 2.37 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos na reacção do 8-OH-EFV na presença de TvL, até 24h de reacção.	61
Figura 2.38 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos na reacção do 8-OH-EFV com a TvL, na presença da NAC como bionucleófilo até 3h de reacção.	62
Figura 2.39 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos na reacção do 8-OH-EFV com a TvL, na presença da NAC como bionucleófilo até 24h de reacção.	62
Figura 2.40 - Cromatograma obtido para o padrão do 2-OH-NVP em tampão BR pH 6 e o respectivo perfil de UV-Vis.	64
Figura 2.41 – Excerto do cromatograma obtido por HPLC da reacção do 2-OH-NVP com a TvL, até 3h de reacção (A), perfil de UV do spiro 30 (B) e a sua estrutura (C)..	65
Figura 2.42 – Espectro de MS/MS obtido por LC-ESI (+)-MS do ião com m/z 299 correspondente à molécula protonada do spiro.	66
Figura 2.43 – Espectro de MS/MS obtido por ESI (+) do ião com m/z 299 correspondente à molécula protonada do composto 62.	66

Figura 2.44 – Esquema da fragmentação por ESI(+)-MS/MS proposta para o composto 62 (P2) a partir da molécula protonada a m/z 299.	67
Figura 2.45 – Cromatograma iónico obtido por LC-ESI(+)-MS após 3h de reacção de oxidação da 2-OH-NVP com a TvL na presença de lisina (A), 1 Full Scan; 2 Moléculas protonadas com m/z 299, nomeadamente o composto 62 e o composto spiro 30; 3 Molécula protonada com m/z 427 correspondente ao aducto (63); perfil de UV do aducto (B) e a sua estrutura molecular (C).	68
Figura 2.46 – Espectro de MS/MS obtido por LC-ESI (+)-MS do ião com m/z 427 correspondente à molécula protonada do aducto com a lisina (63).....	69
Figura 2.47 – Esquema da fragmentação por ESI(+)-MS/MS proposta para o aducto com a lisina a partir da molécula protonada a m/z 427.	70

Índice de Esquemas

Esquema 1.1 - Representação esquemática do papel da bioactivação na indução de efeitos tóxicos por fármacos.	8
Esquema 1.2 – Formação do conjugado Fármaco-GSH e a consequente degradação no conjugado mercapturato (Fármaco-NAC). MR Metabolitos Reactivos; (A) Bioactivação; (B) γ -glutamiltanspeptidase; (C) cisteínaglicina e aminopeptidase; (D) <i>N</i> -acetiltransferase; (E) <i>N</i> -deacetilase	9
Esquema 1.3 – Biotransformação da NVP nos seus metabolitos de Fase I	13
Esquema 1.4 – Biotransformação da NVP no metabolito de Fase I (17), mediada pelo CYP e subsequente bioactivação no metabolito sulfonado (19) de Fase II, seguida da formação da quinona <i>methide</i> (20) que forma o aducto com a GSH (21) e com a NAC (22)	14
Esquema 1.5 – Vias de biotransformação e bioactivação da NVP nos metabolitos 14 e 15 e no epóxido-2,3-NVP (23), mediadas pelo CYP. Este último reage com a GSH originando o aducto 24 e posteriormente o produto 25	15
Esquema 1.6 – Formação dos aductos com o valinato de etilo através da <i>orto</i> -quinona (26) e da quinona-imina (27), provenientes da oxidação do 2-OH-NVP (14) e a formação do composto spiro (30), a partir da quinona-imina, seguida da decomposição no produto (31) e no derivado da nicotinamida (32)	16
Esquema 1.7 – Metabolitos obtidos a partir da oxidação do EFV (10) e seus derivados glucuronidados e sulfonados	18
Esquema 1.8 – Biotransformação da ETV (11) nos metabolitos de Fase I	20
Esquema 1.9 – Biotransformação do TMP (12) nos metabolitos de Fase I	22
Esquema 1.10 – Reacção do intermediário quinona-imina <i>methide</i> (49) com a NAC como bionucleófilo, originando dois aductos 50 e 51	23
Esquema 1.11 – Metabolitos obtidos numa administração terapêutica de paracetamol, sendo as vias principais as que correspondem às reacções de glucuronidação, onde se obtém o metabolito APAP-G (52), e de sulfonação, onde se obtém o metabolito APAP-S (53). Forma-se também o metabolito reactivo, NAPQI, através das enzimas hepáticas do CYP, que se conjuga com a GSH e posteriormente leva à formação do mercapturato (56)	24
Esquema 1.12 – Via metabólica do NAPQI com a GSH reduzida ou com biomacromoléculas, quando a dose de APAP se encontra em excesso	25

Esquema 2.1 – Reacção de oxidação do APAP com o sal de Frémy, originando o NAPQI, que na presença de NAC origina o NAC-APAP.	33
Esquema 2.2 – Mecanismo proposto para a formação do aducto NAC-APAP (56) e do diNAC-APAP (58).	42
Esquema 2.3 – Reacção de oxidação da NVP através da TvL, originando a quinona <i>methide</i>	45
Esquema 2.4 - Reacção de oxidação da NVP mediada pela TvL, originando a quinona <i>methide</i> (27), que na presença de NAL dá origem ao aducto NAL-NVP (60).....	47
Esquema 2.5 - Reacção de oxidação, mediada pela TvL, do TMP ao intermediário quinona-imina <i>methide</i> (49).	50
Esquema 2.6 – Reacção de oxidação da Etravirina com o sistema TvL/ABTS, originando o metabolito mono-hidroxilado (40).	54
Esquema 2.7 – Via sintética para a obtenção do metabolito fenólico 8-OH-EFV (33).59	
Esquema 2.8 – Via sintética para a obtenção do metabolito fenólico 2-OH-NVP (14).63	
Esquema 2.9 – Mecanismo proposto para a formação do spiro (30), através do intermediário quinona-imina (27).....	64
Esquema 2.10 – Mecanismo proposto para a formação do aducto formado entre a lisina e o composto 62, que é o produto de hidrólise da quinona-imina 27.....	69
Esquema 2.11 – Esquema geral apresentando os produtos da hidrólise da quinona-imina e o aducto formado entre o composto 62 e a lisina.....	71

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 – Reacção de oxidação do ABTS pela TvL, na presença de NAC e de GSH, em Tampão BR pH 4, à temperatura ambiente. A ordem de adição foi ABTS, seguida de TvL e por fim os bionucleófilos.	29
Tabela 2.2 – Estudo de inibição enzimática da TvL na presença de NAC e de GSH, em Tampão BR pH 4, à temperatura ambiente. A ordem de adição foi ABTS, seguida dos diferentes bionucleófilos e por fim a TvL.	30
Tabela 2.3 – Condições experimentais testadas nos ensaios com a NAC, a 37 °C, em Tampão BR pH 6.	31
Tabela 2.4 – Condições experimentais testadas para o APAP na presença de TvL, realizadas em Tampão BR pH 6.	34
Tabela 2.5 – Condições experimentais testadas para o APAP na presença de TvL e ainda de NAC como bionucleófilo, realizadas em Tampão BR pH 6.	35
Tabela 2.6 – Condições experimentais testadas para o APAP na presença de TvL e ainda de GSH como bionucleófilo, realizadas em Tampão BR pH 6.	37
Tabela 2.7 – Condições experimentais testadas para a NVP, a 37 °C, em tampão BR pH 6, com 7% de DMSO no meio reaccional.	45
Tabela 2.8 – Condições experimentais testadas para a NVP na presença de NAC e NAL como bionucleófilos, num volume de 2 mL, a 37 °C, em tampão BR pH 6, com 7% de DMSO no meio reaccional.	47
Tabela 2.9 – Condições experimentais testadas para o TMP, num volume de 2 mL, a 37 °C, em tampão BR pH 6, com 7% de DMSO no meio reaccional.	50
Tabela 2.10 – Condições experimentais testadas para o TMP na presença de NAC e NAL como bionucleófilos, num volume de 2 mL, a 37 °C, em tampão BR pH 6, com 7% de DMSO no meio reaccional.	51
Tabela 4.1 - Condições experimentais testadas para os diferentes Fármacos, na ausência de bionucleófilo.	78
Tabela 4.2 – Condições experimentais testadas para a reacção do APAP com a TvL e os bionucleófilos.	79
Tabela 4.3 – Condições experimentais testadas para a reacção da NVP e do TMP com a TvL e os bionucleófilos.	79

1. Introdução

1.1. Enzimas na biocatálise

As enzimas são proteínas que promovem reacções bioquímicas, que ocorrem nas células dos organismos vivos, através das suas funções catalíticas, isto é, aceleram a velocidade das reacções, sem se consumirem e sem interferirem no equilíbrio químico dessa reacção. Comparativamente aos catalisadores químicos, as enzimas apresentam algumas propriedades que trazem mais-valias na sua utilização, como a regio- e estereoselectividade, serem altamente específicas tanto para o tipo de reacção que catalisam como para o tipo de substrato em que actuam e operarem a temperaturas e pressões moderadas.¹⁻³

São geralmente moléculas complexas e de grandes dimensões contendo na sua estrutura longos polímeros de resíduos aminoácidos ligados entre si por ligações peptídicas, entre o grupo amina de um aminoácido e o grupo carboxilo do aminoácido adjacente, com a perda de uma molécula de água.¹

A região da enzima que participa directamente na reacção de conversão do substrato em produto é o centro activo da enzima. O mecanismo é conhecido como modelo “chave-fechadura” e encontra-se ilustrado na Figura 1.1. O substrato liga-se ao centro activo da enzima formando o complexo enzima-substrato. Este complexo é um intermediário do processo e decompõe-se rapidamente dando origem aos produtos e à regeneração da enzima, que como qualquer catalisador não é consumida na reacção.²

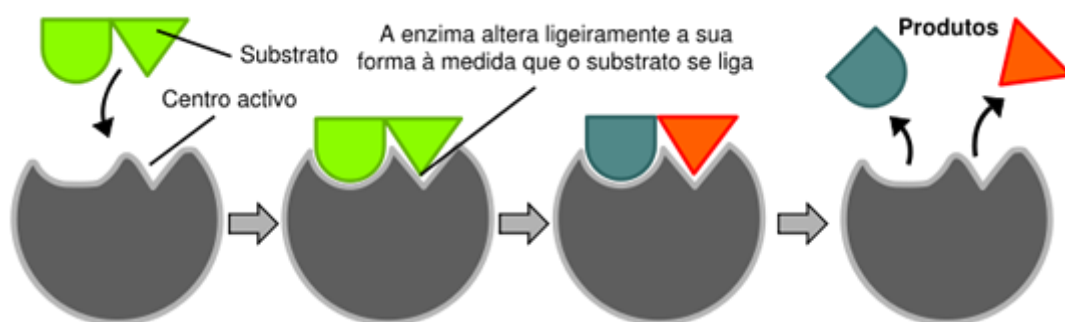


Figura 1.1 – Formação do complexo enzima-substrato e a conversão do substrato em produtos.⁴

A actividade enzimática varia em função de diversos factores, nomeadamente a temperatura, o pH, a presença de inibidores, a concentração de substrato e de enzima. Estes parâmetros são de extrema importância porque podem afectar a

estrutura e conseqüentemente a actividade da enzima, uma vez que cada enzima apresenta um valor de temperatura e pH óptimos, para os quais a sua actividade é máxima.²

A temperatura está relacionada com a desnaturação, isto é, o aumento da temperatura para valores acima da temperatura óptima afecta a estrutura da enzima, levando à perda significativa e mesmo irreversível da actividade enzimática, proveniente da desnaturação da enzima.^{1,2}

O pH é outro factor bastante importante uma vez que ao diminuir ou aumentar o pH para valores distantes do pH óptimo, as cadeias laterais dos resíduos aminoacídicos podem comportar-se como ácidos ou bases, alterando as conformações da estrutura da enzima, comprometendo a reacção enzimática.^{1,2}

As enzimas são classificadas, pela *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB), de acordo com a classe e a reacção química que catalisam através de um número de código e da origem. Geralmente o número de código é antecedido pelo EC (*Enzyme Commission*), que no caso das lacases apresentam a seguinte classificação, EC 1.10.3.2.¹

1.2. Lacases

As lacases (benzenodiol:oxigénio oxidoreductases, EC 1.10.3.2,) são enzimas extracelulares representantes de um grupo interessante de biocatalisadores, as oxidases com múltiplos centros de cobre.⁵ São descritas pela primeira vez em 1883, por Yoshida na planta *Rhus vernicifera*, uma árvore abundante no Japão. Encontram-se distribuídas por diferentes organismos e já foram identificadas lacases em várias plantas, géneros de insectos, bactérias e em vários fungos. São particularmente abundantes nos fungos envolvidos na degradação da lenhina.^{6,7}

As lacases provenientes das plantas têm uma função biológica importante no processo de polimerização dos constituintes da parede celular na presença de oxigénio, ou seja, são a chave para a lignificação, enquanto que as fúngicas servem para degradar a lenhina e produzir esporos e por último, as lacases bacterianas têm como principal função proteger as células contra o H₂O₂ e a radiação UV.^{8,9}

De acordo com o seu potencial redox, as lacases são divididas em três grupos: as de potencial elevado (730-780 mV), potencial médio (470-710 mV) e baixo potencial (340-490 mV) estando relacionado com a estrutura e propriedades do centro de cobre.⁸ As lacases com elevado potencial redox encontram-se principalmente em *basidiomicetes*, especialmente em fungos de “podridão branca” e as de baixo potencial redox encontram-se nas bactérias, nos insectos e nas plantas.^{10,11}

Devido à elevada gama de substratos oxidáveis, as lacases são consideradas oxidases versáteis. São aplicadas numa grande variedade de processos oxidativos industriais como por exemplo, na indústria têxtil,¹² na biorremediação,¹³ na degradação de poluentes orgânicos,¹⁴ no desenvolvimento de biossensores,¹⁵ em tratamento e eliminação de fármacos¹⁶ e em síntese orgânica.¹⁷ Mostram também ter um excelente potencial para a indústria alimentar.¹⁸

1.2.1. Caracterização Estrutural

As lacases aparecem sob a forma de monómeros ou homodímeros. O peso molecular de cada monómero varia entre 50 e 130 kDa e é constituído por manose, *N*-acetil-glucosamina e galactose que são hidratos de carbono que conferem estabilidade à enzima e representam cerca de 10% a 45% da massa da proteína.^{15,19} Contudo, nas lacases fúngicas, o conteúdo de hidratos de carbono é mais baixo, ou seja 10-20% do peso molecular.^{6,15}

Em particular, os fungos podem apresentar isoformas de lacases devido à presença de múltiplos genes. Estas isoenzimas diferem principalmente no peso molecular, no pH ótimo, na especificidade para com o substrato e nas propriedades estruturais e catalíticas.⁶

A *Trametes versicolor* (TvL) é uma lacase comercial de origem fúngica sob a forma de um monómero organizado sobre três domínios (D1, D2 e D3), que apresentam uma estrutura do tipo barril β .^{20,21}

1.2.2. Centro catalítico das lacases

O centro catalítico das lacases é constituído por quatro átomos de cobre (Figura 1.2), um centro de cobre do tipo 1 (T1), um centro de cobre do tipo 2 (T2) e dois centros de cobre do tipo 3 (T3). Os centros de cobre T2/T3 formam um *cluster* constituído por um cobre do tipo 2 e por dois cobres do tipo 3.^{8,15,20}

O centro mononuclear de cobre T1, envolvido na oxidação do substrato, tem uma coordenação trigonal com dois resíduos de histidina e um resíduo de cisteína. Se a enzima for de origem bacteriana apresenta como ligando axial uma metionina e se for de origem fúngica uma fenilalanina ou leucina.²² Devido à ligação covalente cobre-cisteína, o centro T1 absorve com muita intensidade na zona do visível, mais precisamente a 600 nm, conferindo desta forma a cor azul característica destas enzimas. O centro mononuclear de cobre T2 encontra-se coordenado a dois resíduos de histidina e a uma molécula de água, é incolor e não absorve na zona do visível. Em

relação ao centro de cobre T3, encontra-se ligado a 3 resíduos de histidina e a sua absorção é na zona do ultravioleta, a 330 nm, proveniente da transferência de carga entre os átomos de cobre e as pontes de hidrogénio formadas pela cisteína e a histidina, usadas na redução do oxigénio a água.^{8,19}

O átomo de cobre do T1 encontra-se a uma distância de aproximadamente 12 Å do centro de cobre T2/T3 que por sua vez se encontram distanciados entre si de 4 Å.^{8,15}

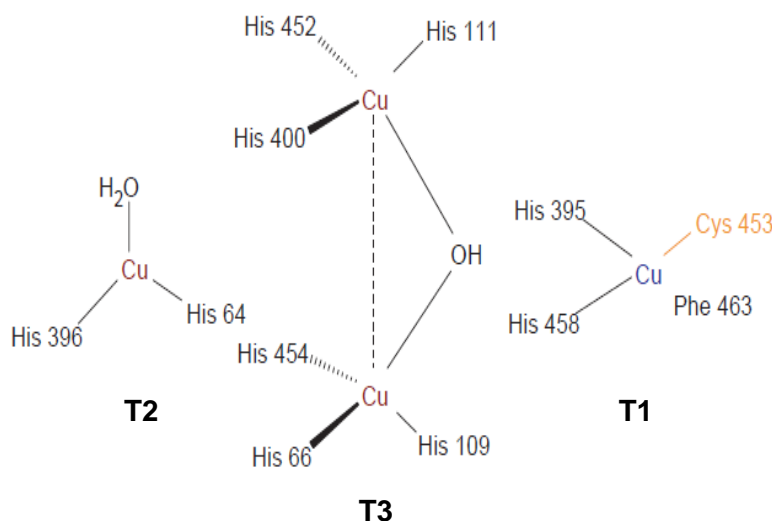


Figura 1.2 – Modelo do centro catalítico da lacase fúngica, *Trametes versicolor*.⁵

Através de um mecanismo radicalar, as lacases catalisam reacções de oxidação nas quais o centro de cobre T1 remove um electrão do substrato, originando o respectivo radical. De seguida, dá-se a transferência electrónica interna do centro T1 para o centro de cobre trinuclear (T2/T3), ocorrendo concomitantemente a redução do oxigénio molecular a água no *cluster* T2/T3 (Figura 1.3).^{5,8,9,19} Por promoverem processos de oxidação de diferentes substratos, sem recorrer à utilização de cofactores e utilizando o O₂ como aceitador de electrões são largamente utilizadas como biocatalisadores industriais.⁷

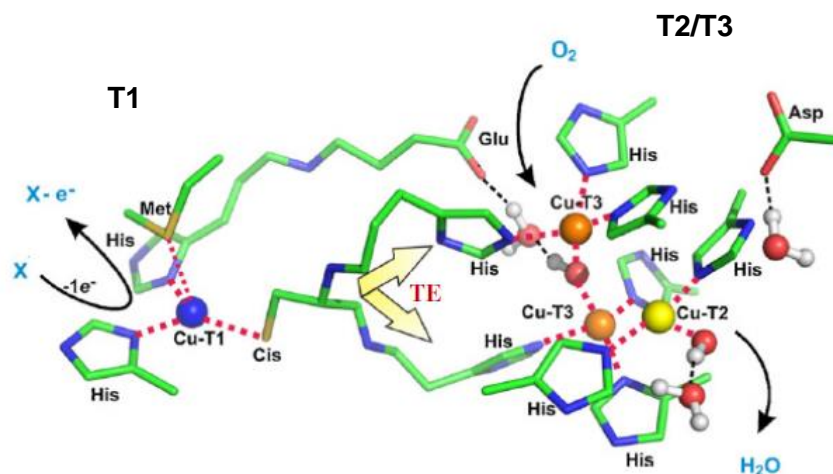


Figura 1.3 – Esquema geral do centro catalítico, mostrando a transferência de electrões do centro de cobre T1 para o *cluster* T2/T3, para o caso das lacases bacterianas. ²³

As lacases podem ser inibidas por pequenos aniões como o ião cianeto, azida, halogeneto e hidroxilo, que se ligam ao centro de cobre trinuclear (T2/T3) e interrompem a transferência interna de electrões, inibindo a actividade catalítica da enzima. Existem também outros tipos de inibidores, tais como os iões metálicos (Hg^{2+}), os ácidos gordos e os reagentes sulfidrilo que provocam modificações a nível dos resíduos aminoacídicos, modificações conformacionais ou quelação nos centros de cobre. ^{19,24} Outro parâmetro importante na catálise enzimática é o pH, pois afecta não só a actividade enzimática das lacases como também o valor do potencial de oxidação do substrato. Está directamente relacionado com o tipo de substrato em estudo, ou seja, para substratos fenólicos o pH óptimo para lacases isoladas de plantas é 9, enquanto que para lacases obtidas a partir de fungos o pH pode variar entre 3 e 7. ⁸

Em contraste com a maioria das enzimas, que são específicas para determinados substratos, as lacases conseguem oxidar substratos fenólicos como *orto*- e *para*-difenois, metóxi-fenois, benzenotiois e diferentes aminas aromáticas. ^{15,24} A gama de substratos oxidáveis pelas lacases pode ainda ser alargada com recurso a mediadores redox, como é o caso do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6sulfónico) (ABTS). O ABTS foi o primeiro mediador a ser introduzido, actualmente existe uma grande variedade de mediadores sintéticos (Figura 1.4), como por exemplo o 2,2,6,6-tetrametil-piperidina-1-oxil (TEMPO), o *N*-hidróxibenzotriazol (HBT). ⁵

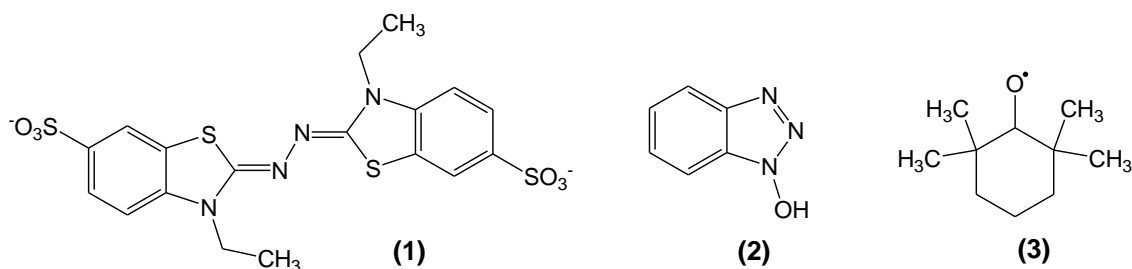


Figura 1.4 – Estruturas moleculares de alguns mediadores, ABTS (1), HBT (2), TEMPO (3).⁵

No geral, os mediadores são um grupo de compostos orgânicos, que conseguem ser oxidados pela lacase formando radicais, que são capazes de interagir com os substratos de elevado potencial redox.^{8,15} A combinação da lacase com mediadores promove rendimentos e taxas de transformação de substratos mais elevados.⁹

De acordo com a Figura 1.5, a enzima oxida o mediador, formando-se o mediador oxidado (radical estável), que por sua vez oxida o substrato por uma via não enzimática.²⁵

A oxidação do HBT e do TEMPO pela lacase ocorre através de mecanismos de transferência de electrões e de átomos de hidrogénio, enquanto que no ABTS a oxidação é realizada através de uma transferência de electrões. A oxidação do ABTS pela lacase envolve dois passos, nomeadamente a oxidação do ABTS formando o radical catiónico ($\text{ABTS}^{\cdot+}$), e a oxidação subsequente desse radical ao respectivo dicatión (ABTS^{2+}), que por sua vez oxida os respectivos substratos de elevado potencial oxidativo.^{8,26}

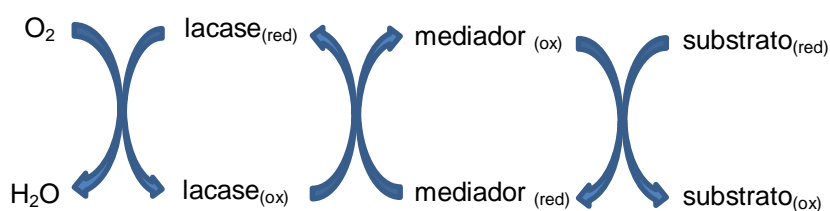


Figura 1.5 – Representação esquemática dos ciclos redox catalisados pela lacase, na presença de mediador.⁵

1.3. O papel da bioactivação na toxicidade induzida por fármacos

Os fármacos são substâncias biologicamente activas, regularmente prescritas com o objectivo de prevenir e restabelecer a saúde dos seres humanos ou animais. ²⁷

A administração de um fármaco requer três fases: fase farmacêutica, fase farmacocinética e fase farmacodinâmica (Figura 1.6). A fase farmacêutica está relacionada com a desintegração e a dissolução do fármaco no organismo, a fase farmacocinética indica onde é absorvido, como é metabolizado e onde é excretado o fármaco e por último a farmacodinâmica relaciona a interacção do fármaco com o seu alvo. ^{27,28}

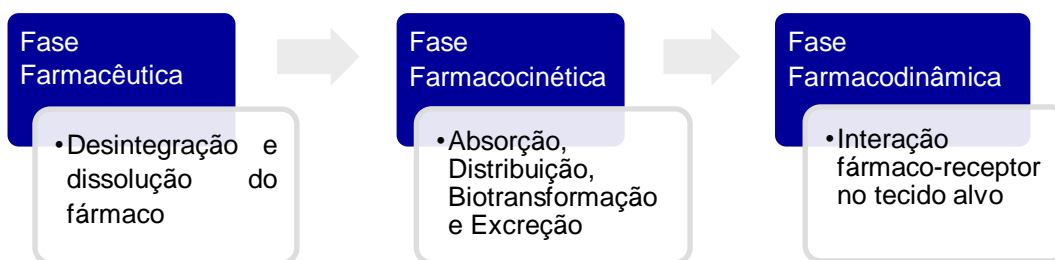
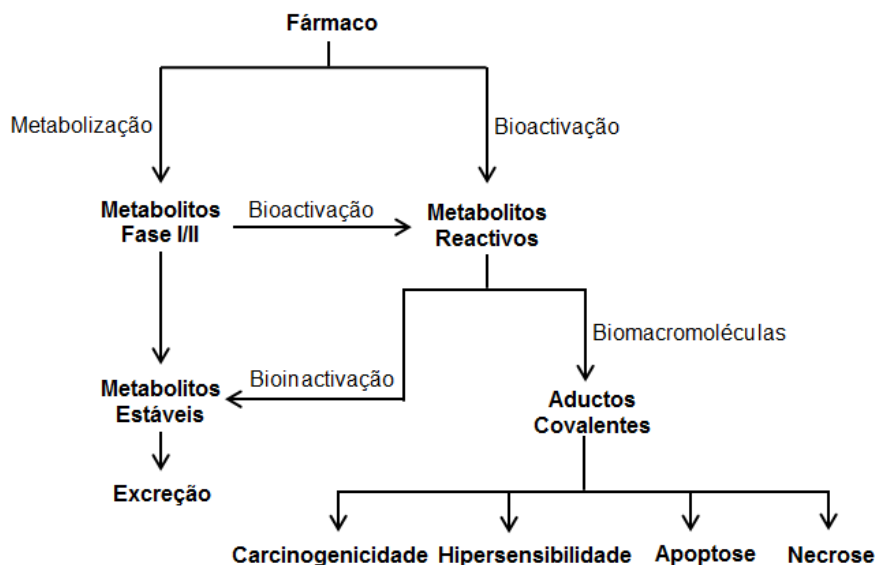


Figura 1.6 – Representação esquemática das diferentes fases de acção de um dado fármaco. ²⁷

As reacções responsáveis pela transformação dos fármacos em metabolitos fenólicos são designadas por biotransformações e têm como objectivo promover a sua excreção. Estas reacções são denominadas por reacções de Fase I e de Fase II. As reacções da Fase I ocorrem principalmente no fígado, onde existem enzimas hepáticas, sendo destacado o citocromo P450 (CYP 450), que é um conjunto de enzimas e é responsável pelas transformações de Fase I. Nesta fase ocorrem reacções de oxidação, redução e hidrólise. As reacções de Fase II envolvem reacções de conjugação, como por exemplo reacções de glucuronidação, sulfonação, acilação, metilação e formação de conjugados com a glutathione (GSH). ^{27,28,29}

Estas reacções de Fase II são normalmente de desintoxicação, uma vez que os produtos obtidos são em geral rapidamente excretados. No entanto, a metabolização não resulta sempre na sua excreção, muitas vezes resulta na formação de metabolitos reactivos, num processo denominado por bioactivação. Este é um dos processos mais frequentemente envolvidos na toxicidade de fármacos. De facto os metabolitos reactivos, geralmente espécies electrófilas, reagem com biomacromoléculas (proteínas, lípidos e DNA), levando à formação de aductos covalentes, que poderão despoletar mecanismos de carcinogenicidade e hipersensibilidade (Esquema 1.1). ^{30,31}



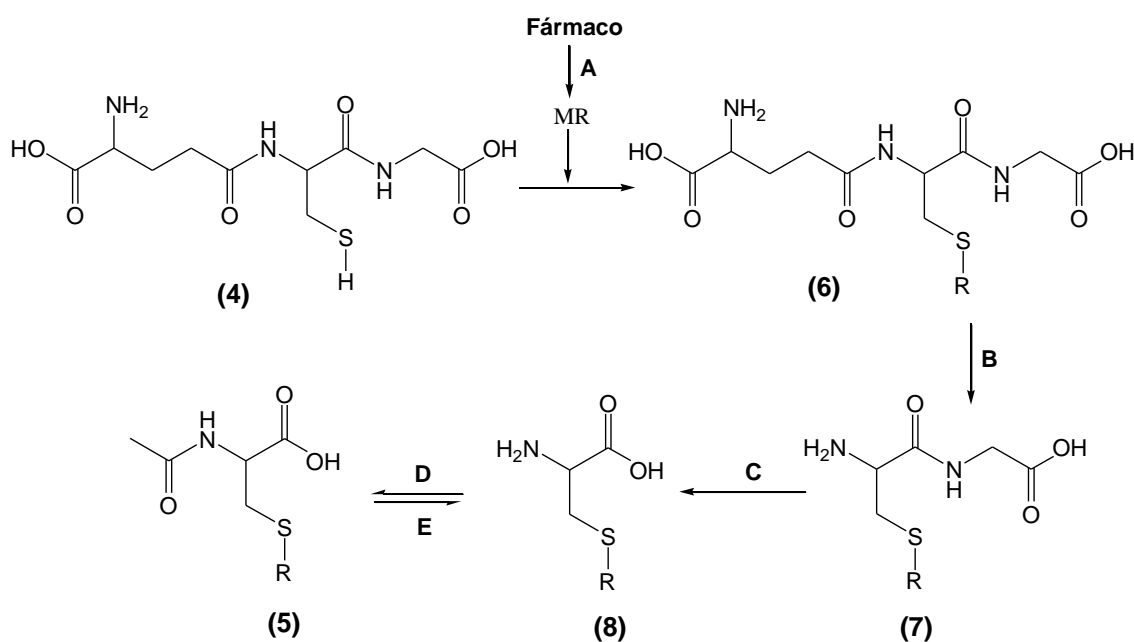
Esquema 1.1 - Representação esquemática do papel da bioativação na indução de efeitos tóxicos por fármacos.³⁰

A grande dificuldade na identificação destes metabolitos reactivos deve-se à sua instabilidade *in vivo* e em condições miméticas, comprometendo a sua identificação. Contudo, ao reagirem com bionucleófilos (DNA, proteínas ou a GSH) dão origem a aductos estáveis, tornando possível a sua identificação e quantificação. Estes aductos covalentes além de apresentarem um papel fundamental na identificação dos efeitos tóxicos dos fármacos, podem também ser usados como potenciais biomarcadores de bioativação/toxicidade.³¹

Os metabolitos fenólicos de Fase I podem ser activados formando metabolitos reactivos quinóides. Devido ao seu carácter electrófilo, estes têm a capacidade de reagir com bionucleófilos (NAC e GSH) através de uma adição tipo Michael, que leva à formação do aducto covalente correspondente. Efectivamente estas reacções de conjugação com a GSH constituem, em geral, o processo maioritário de destoxificação destas espécies reactivas.^{32,33}

A GSH (4) é um péptido de baixo peso molecular constituído por três aminoácidos, a glicina, a cisteína e o ácido glutâmico (γ -Glu-Cys-Gly) e apresenta um grupo tiol (-SH), que é fundamental para a sua actividade biológica. Encontra-se em alguns tecidos e células, numa concentração muito reduzida (mM) e é das moléculas mais importantes na defesa contra compostos tóxicos quimicamente reactivos, como aldeídos e peróxidos, e contra o *stress* oxidativo.³⁴⁻³⁶ Apesar disso, a administração directa de GSH não é recomendada, devido à sua baixa disponibilidade e à sua limitada capacidade de atravessar a dupla camada fosfolipídica das células.^{37,38}

Os metabolitos reactivos gerados nos processos de bioactivação dos fármacos reagem com a GSH, espontaneamente ou através da enzima glutationa-transferase, para promover a reacção de conjugação. Independentemente do percurso, a conjugação com a GSH representa uma defesa para o organismo contra a formação de metabolitos reactivos. Estes aductos de GSH são posteriormente catabolizados, levando à formação dos mercapturatos (5), que são excretados pela urina.³⁰ O catabolismo dos aductos de GSH (6) envolve a formação do conjugado cisteínaglicina (7), de seguida ao conjugado cisteína (8) e posteriormente ao conjugado *N*-acetilcisteína (NAC, 5), também designados por mercapturatos (Esquema 1.2). Este processo envolve uma remoção sequencial dos grupos glutamilo e glicina, promovendo a acetilação do grupo amino da cisteína produzindo o mercapturato, que promove a desintoxicação do fígado.³⁹



Esquema 1.2 – Formação do conjugado Fármaco-GSH e a consequente degradação no conjugado mercapturato (Fármaco-NAC). **MR** Metabolitos Reactivos; **(A)** Bioactivação; **(B)** γ -glutamyltranspeptidase; **(C)** cisteínaglicina e aminopeptidase; **(D)** *N*-acetiltransferase; **(E)** *N*-deacetilase.³⁹

Embora os mercapturatos (5) e os conjugados com GSH (6) sejam metabolitos de excreção, são também frequentemente utilizados como biomarcadores de exposição e bioactivação, permitindo o estabelecimento de correlações risco/benefício e a identificação de factores de risco. Daí ser tão importante desenvolver metodologias que permitam preparar estes conjugados. Efectivamente, a preparação de aductos

padrão é uma ajuda imprescindível para o desenvolvimento de metodologias analíticas para a identificação destes aductos em biofluidos. Uma técnica usada na detecção dos aductos é a espectrometria de massa.²⁹

Por outro lado, o conhecimento da reactividade destes metabolitos com os bionucleófilos de enxofre (em particular com a NAC) dá também indicações sobre medidas terapêuticas em caso de intoxicações por fármacos.³⁴ Este bionucleófilo tem sido administrado como antídoto aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), tanto intravenosa como oralmente, no tratamento de sobredosagem com alguns fármacos, devido à sua actividade hepato-protectora. Uma vez que o esgotamento de GSH, provocado pela sobredosagem dos fármacos, é um passo crítico na hepatotoxicidade induzida pelo fármaco, dado que a sua presença é fundamental na desintoxicação do fígado.⁴⁰

Quando é administrada oralmente, a NAC é rapidamente absorvida (30 min a 1h) pelo intestino delgado e sofre um metabolismo hepático, o qual dá origem ao resíduo aminoacídico L-cisteína, a partir do qual o fígado sintetiza a GSH (Figura 1.7). Assim, as fontes de GSH são restabelecidas e este é libertado no plasma através de um transportador de membranas, mantendo-se na célula a baixas concentrações. Desta forma é possível, por conjugação destes bionucleófilos com os metabolitos reactivos, promover a destoxificação do fármaco.^{39,41} Para além disso, a NAC também fornece energia mitocondrial ao ciclo de Kreb's e repõe os níveis de ATP hepáticos ajudando assim, a manter o balanço entre as espécies reactivas e a defesa do sistema antioxidante no organismo.^{36-38,42}

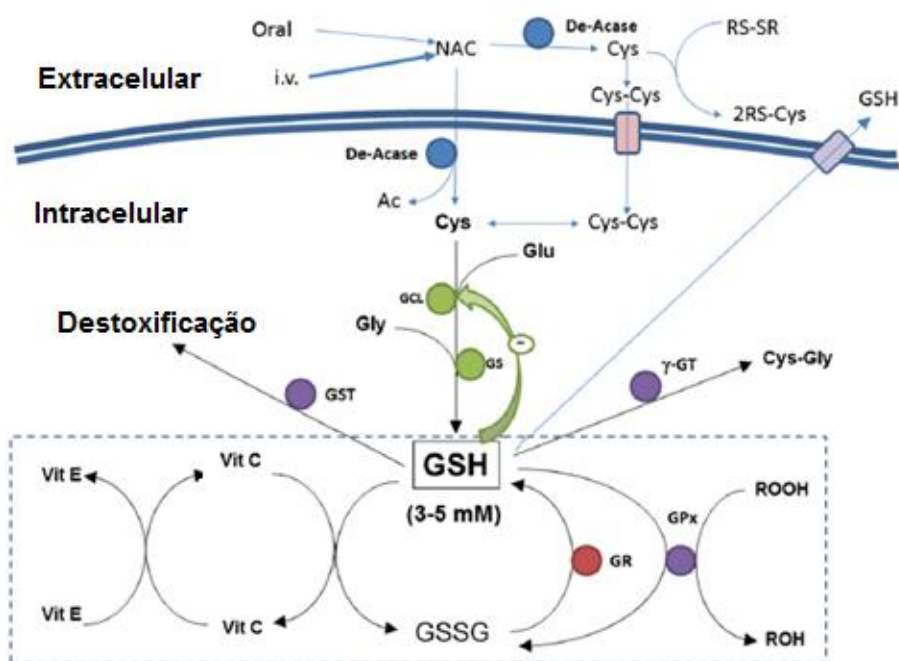


Figura 1.7 – Influência da NAC na síntese da GSH.³⁸

1.4. Fármacos cuja toxicidade está associada à Bioativação

Neste capítulo serão abordados vários exemplos de fármacos de uso prolongado como é o caso dos anti-retrovirais, Nevirapina (NVP, 9, Figura 1.8), Efavirenz (EFV, 10) e Etravirina (ETV, 11), do antibacteriano, Trimetoprim (TMP, 12) e do antipirético e analgésico, Paracetamol (APAP, 13). O uso prolongado destes fármacos está associado a um aumento de toxicidade que envolve a bioativação a metabolitos reactivos capazes de formarem aductos covalentes com bionucleófilos. A desintoxicação destes metabolitos envolve a formação de aductos com a GSH, formando aductos não-tóxicos que são geralmente excretados.³⁸ Por outro lado, os metabolitos reactivos podem formar aductos com biomacromoléculas conduzindo à disfunção das proteínas, a danos no DNA, ao *stress* oxidativo, que por sua vez podem resultar na morte celular e na falha de alguns órgãos.³⁰

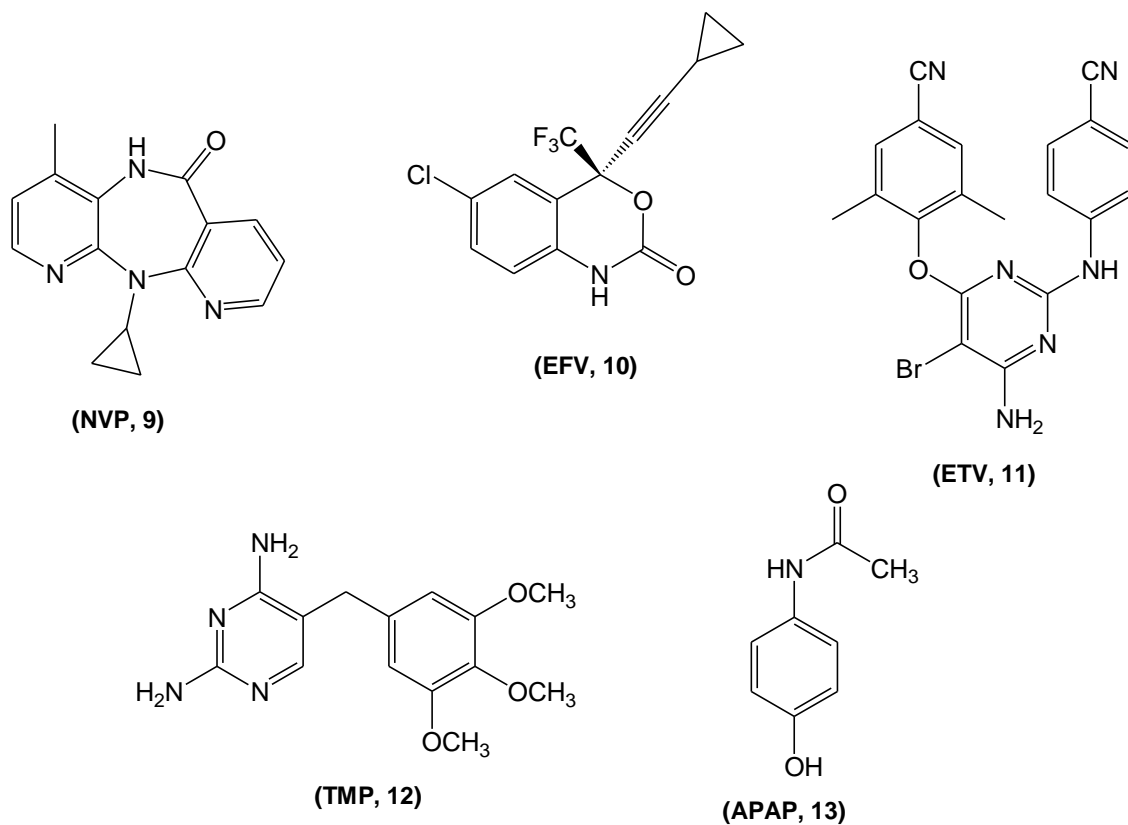


Figura 1.8 – Estruturas moleculares dos fármacos em estudo.

1.4.1. Nevirapina

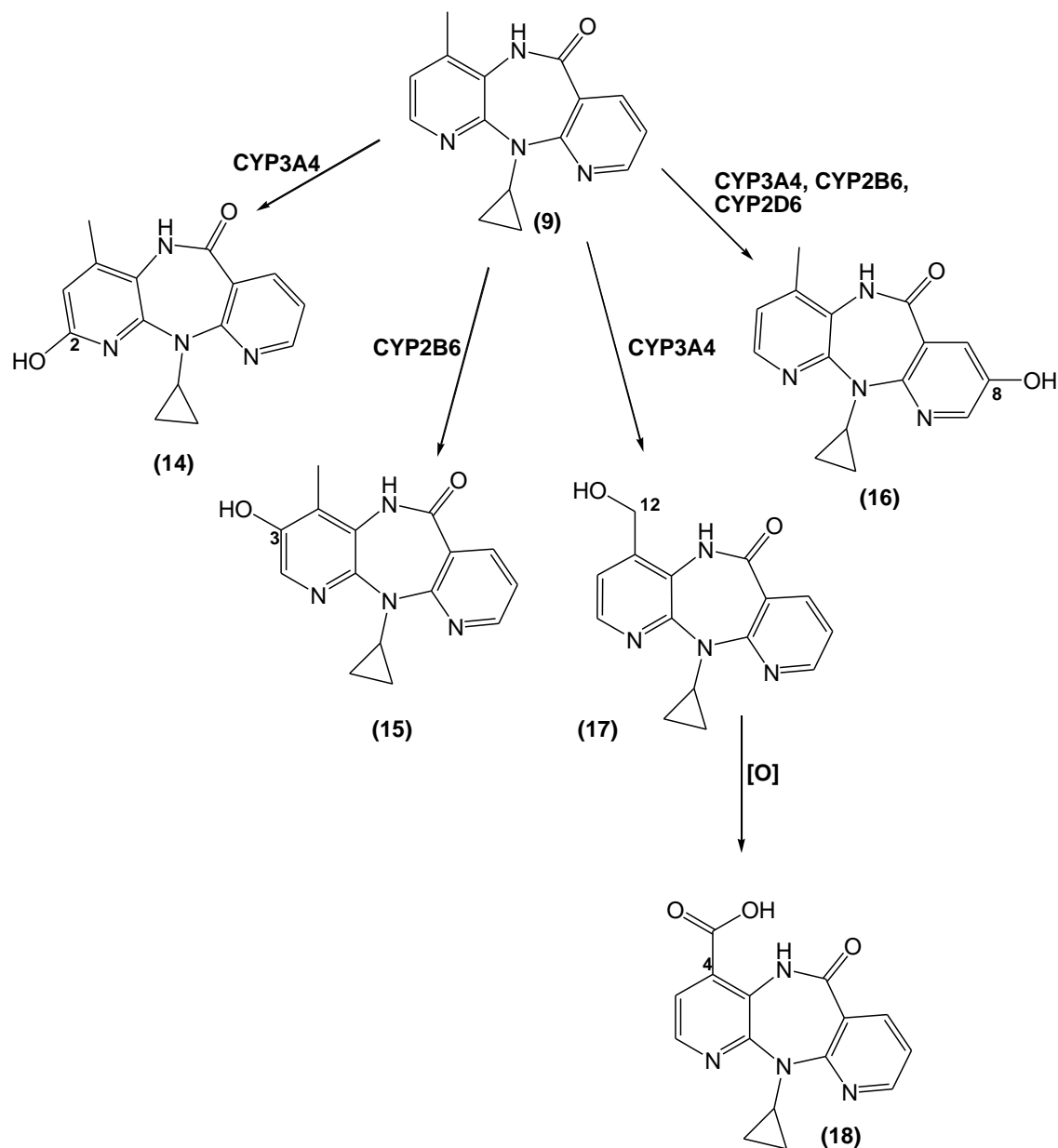
A Nevirapina (11-ciclopropil-5,11-di-hidro-4-metil-6H-dipirido[3,2-b:2',3'-e][1,4] diazepina-6-ona, NVP, (9), Esquema 1.3) é uma dipiridodiazepinona e foi o primeiro inibidor da transcriptase reversa não análogo de nucleósido (NNRTI) a ser aprovado pela FDA em 1996.^{42,43} Actualmente é um dos fármacos anti-retrovirais mais prescritos nos países em desenvolvimento como terapia anti-retroviral combinada (cART), ou seja, administrada em combinação com agentes anti-retrovirais. Contudo, a NVP (9), pode ser administrada sozinha durante o parto e na fase de amamentação, prevenindo a transmissão vertical do HIV de mãe para filho.^{31,32,44-46}

A administração da NVP é mais eficaz se a dosagem for 200 mg por dia durante 14 dias seguida de 200 mg duas vezes ao dia.^{31,42,47}

Apesar dos benefícios no tratamento do HIV-1, a NVP encontra-se associada a uma variedade de respostas tóxicas, como por exemplo a hepatotoxicidade que é a mais severa, podendo ser fatal. Pode ainda provocar irritação cutânea, que é o efeito adverso mais comum. Existem estudos que mostram outro tipo de reacções cutâneas como a síndrome de Steven-Johnson, a necrose epidermal tóxica e a hipersensibilidade.^{32,42,44,45}

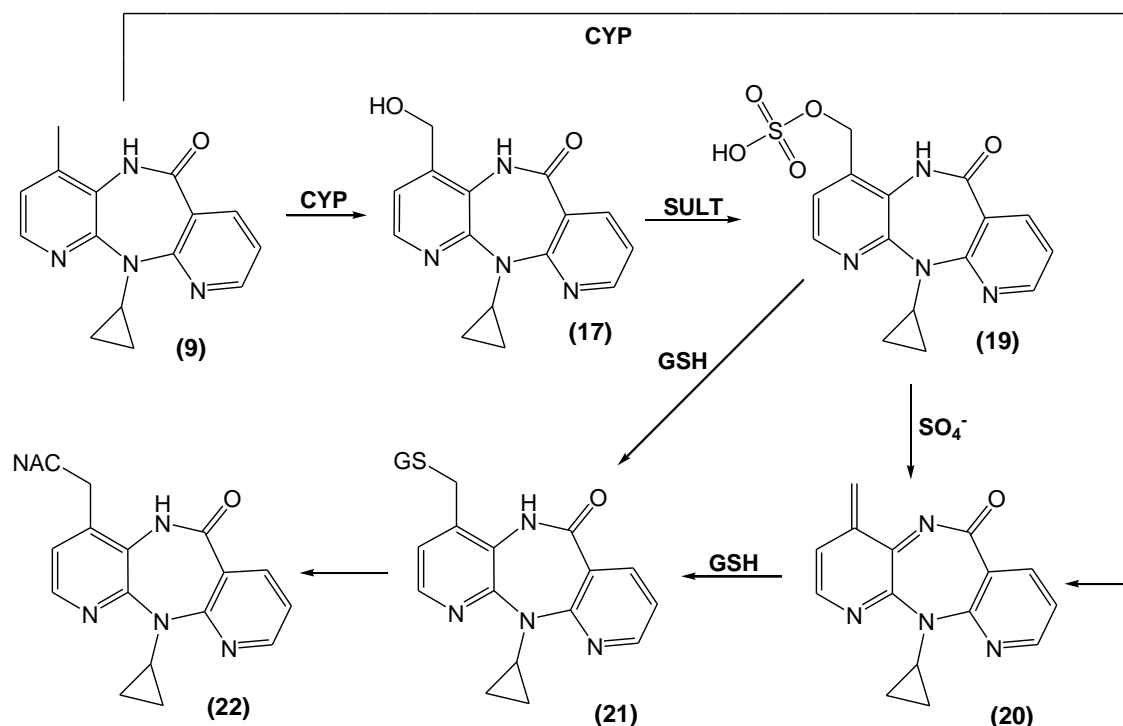
A NVP é excretada principalmente através dos metabolitos glucuronidados na urina (80%) e nas fezes (10%), sendo que aproximadamente 3% do fármaco administrado é directamente excretado pela urina.⁴²

A biotransformação da NVP (9) em metabolitos de Fase I encontra-se ilustrada no Esquema 1.3, e envolve hidroxilações aromáticas mediadas pelo CYP obtendo-se como metabolitos fenólicos o 2-hidróxi (14), o 3-hidróxi (15) e o 8-hidróxi-NVP (16) e uma oxidação na posição C12 formando-se o 12-hidróxi-NVP (17) e o 4-carbóxi-NVP (18).⁴⁵ Estes metabolitos sofrem uma reacção de glucuronidação e são subsequentemente excretados.^{31,32,42,44,48}



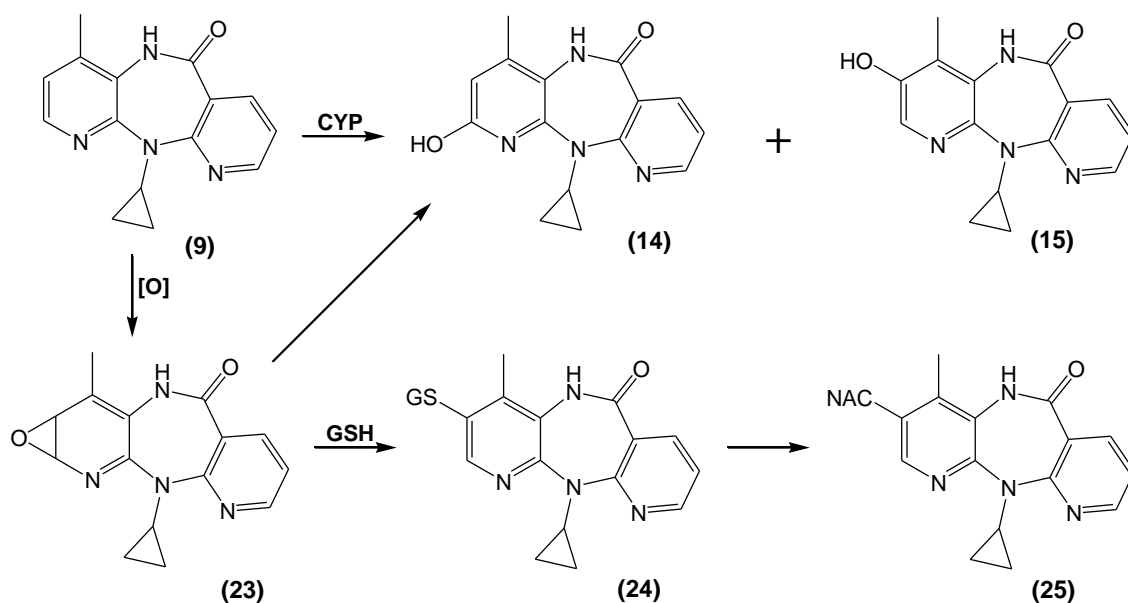
Esquema 1.3 – Biotransformação da NVP nos seus metabolitos de Fase I. ³¹

A via de bioativação do metabolito (17) é a mais amplamente estudada, pensado-se que seja responsável pela irritação cutânea em humanos e esteja envolvida na formação do metabolito sulfonado (12-sulfoxi-NVP, 19, Esquema 1.4) ou de um derivado quinóide (20), susceptíveis de ataque por bionucleófilos, formando-se aductos covalentes (21 e 22, Esquema 1.4). ³¹



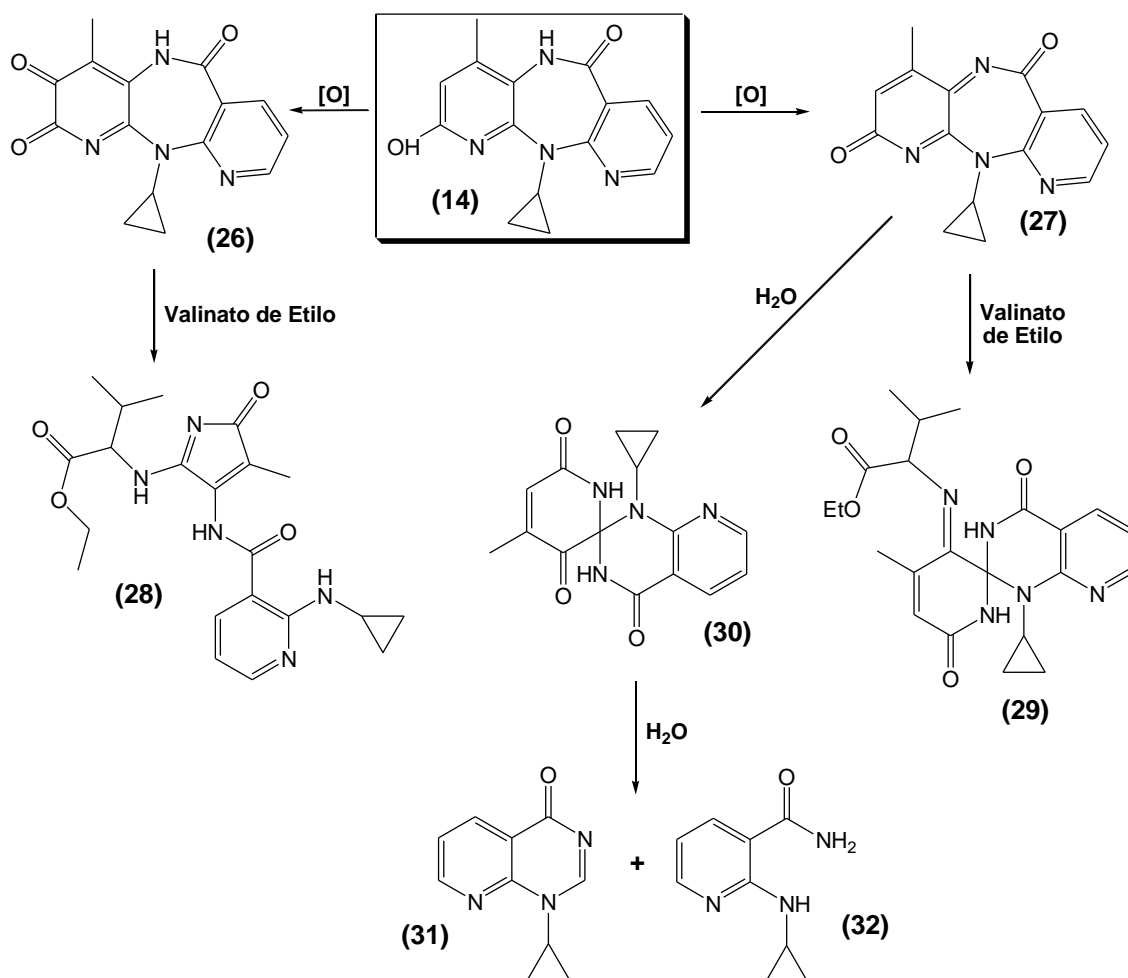
Esquema 1.4 – Biotransformação da NVP no metabolito de Fase I (17), mediada pelo CYP e subsequente bioactivação no metabolito sulfonado (19) de Fase II, seguida da formação da quinona *methide* (20) que forma o aducto com a GSH (21) e com a NAC (22).³¹

A biotransformação da NVP a metabolitos fenólicos 2-OH-NVP e 3-OH-NVP mediada pelo CYP envolve a formação de um intermediário epóxido (23, Esquema 1.5). Este é um metabolito reactivo podendo sofrer reacções de abertura do anel por ataque nucleófilo da GSH, que leva depois à formação do aducto covalente (24, Esquema 1.5) cujo catabolismo origina o mercapturato (25) que são facilmente excretados na urina. No entanto, estes derivados fenólicos podem também ser bioactivados a derivados quinóides, a *orto*-quinona e quinona-imina (26 e 27, Esquema 1.6) potencialmente tóxicos.³³



Esquema 1.5 – Vias de biotransformação e bioativação da NVP nos metabolitos 14 e 15 e no epóxido-2,3-NVP (23), mediadas pelo CYP. Este último reage com a GSH originando o aducto 24 e posteriormente o produto 25.³³

A *orto*-quinona e a quinona-imina (26 e 27, Esquema 1.6), têm a particularidade de reagir reversivelmente com bionucleófilos de enxofre, o que vai condicionar a sua desintoxicação pela via de conjugação com a GSH.⁴⁵ No entanto, formam-se aductos estáveis com bionucleófilos de azoto, o que poderá significar que a modificação de resíduos de lisina de proteínas pode ocorrer irreversivelmente, que poderá ter significado toxicológico. Um exemplo de uma reacção irreversível encontra-se apresentada no Esquema 1.6, onde os metabolitos 26 e 27 reagem com o valinato de etilo, formando os aductos 28 e 29, respectivamente. Outra via apresentada no Esquema 1.6 é a formação do spiro (30) em solução aquosa, a partir da hidrólise da quinona-imina (27). Este composto spiro decompõe-se rapidamente no composto (31) e no derivado da nicotinamida (32).³¹



Esquema 1.6 – Formação dos aductos com o valinato de etilo através da *orto*-quinona (26) e da quinona-imina (27), provenientes da oxidação do 2-OH-NVP (14) e a formação do composto spiro (30), a partir da quinona-imina, seguida da decomposição no produto (31) e no derivado da nicotinamida (32).³¹

1.4.2. Efavirenz

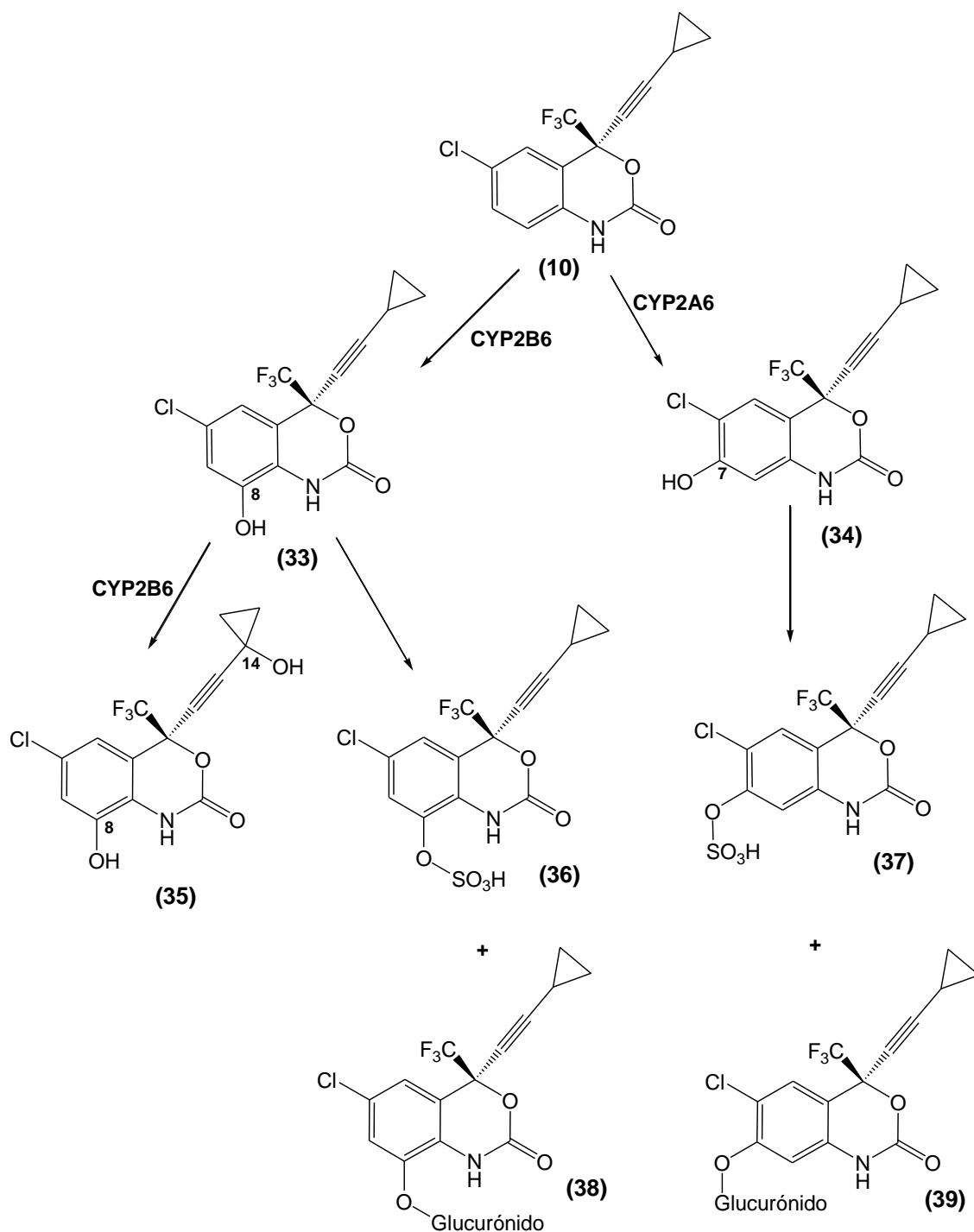
O Efavirenz [(S)-6-cloro-4-(ciclopropiletinil)-4-(trifluormetil)-1,4-dihidro-2*H*-3,1-benzoxazina-2-ona, EFV, 10, Esquema 1.7] contém um núcleo de benzoxazinona, que tem um grupo trifluorometilo e um grupo ciclopropilacetileno em C4. Pertencente à família dos NNRTIs, tal como a NVP e foi aprovado pela FDA em 1998, tornando-se rapidamente num componente preferido da terapia anti-retroviral devido ao seu longo tempo de meia vida (52h) quando administrada como uma dosagem única ou 40-55h em dosagens múltiplas.^{42,49-52}

A administração do EFV está indicada no tratamento do HIV-1 e da tuberculose, com uma dose diária de 600 mg.^{53,54} O EFV não é recomendado no

primeiro trimestre de gravidez ou em casos de amamentação, pois provoca teratogenicidade. Para além deste efeito associado, ainda existem outros a nível do Sistema Nervoso Central (SNC), como dores de cabeça, tonturas, insónias, amnésia, alucinações e fadiga. Outro efeito comum são as irritações cutâneas que aparecem nas primeiras 2 semanas de toma do EFV.^{31,42,52}

O EFV é excretado através da urina (14-34%), observando-se também a eliminação através das fezes (16-61%), sem qualquer alteração no fármaco.⁴²

O EFV (10) é metabolizado pelo CYP resultando em dois produtos fenólicos, o 8-hidróxi-efavirenz (8-OH-EFV, 33, Esquema 1.7) como produto maioritário e o 7-hidróxi-efavirenz (7-OH-EFV, 34) como produto minoritário, cuja formação é catalisada pelos CYP2B6 e CYP2A6, respectivamente. Como produto secundário resultante da hidroxilação no anel ciclopropano (C14), do 8-OH-EFV, tem-se o 8,14-di-hidróxi-efavirenz (8,14-diOH-EFV, 35), pela acção da enzima CYP2B6. Estes três metabolitos formados, principalmente o 8-OH-EFV são excretados predominantemente pela urina sob a forma de conjugados glucuronidados (38 e 39) ou conjugados sulfonados (36 e 37).^{31,50}



Esquema 1.7 – Metabolitos obtidos a partir da oxidação do EFV (10) e seus derivados glucuronidados e sulfonados.³¹

Estudos anteriores revelaram que a formação do metabolito fenólico 8-OH-EFV pode estar associada aos efeitos de neurotoxicidade evidenciados no EFV. Foi demonstrado que esse metabolito é mais neurotóxico do que o próprio fármaco.⁵⁵ Uma hipótese para este facto poderá estar ligada à possibilidade deste metabolito poder ser oxidado a uma quinona e/ou quinona-imina, que são susceptíveis de ataque

bionucleófilo.⁵⁰ Embora não se saiba qual o mecanismo subjacente à toxicidade deste fármaco, o facto desse metabolito fenólico poder ser bioactivado a espécies electrófilas reactivas realça o papel da bioactivação nas reacções adversas induzidas pelo EFV.^{31,56}

1.4.3. Etravirina

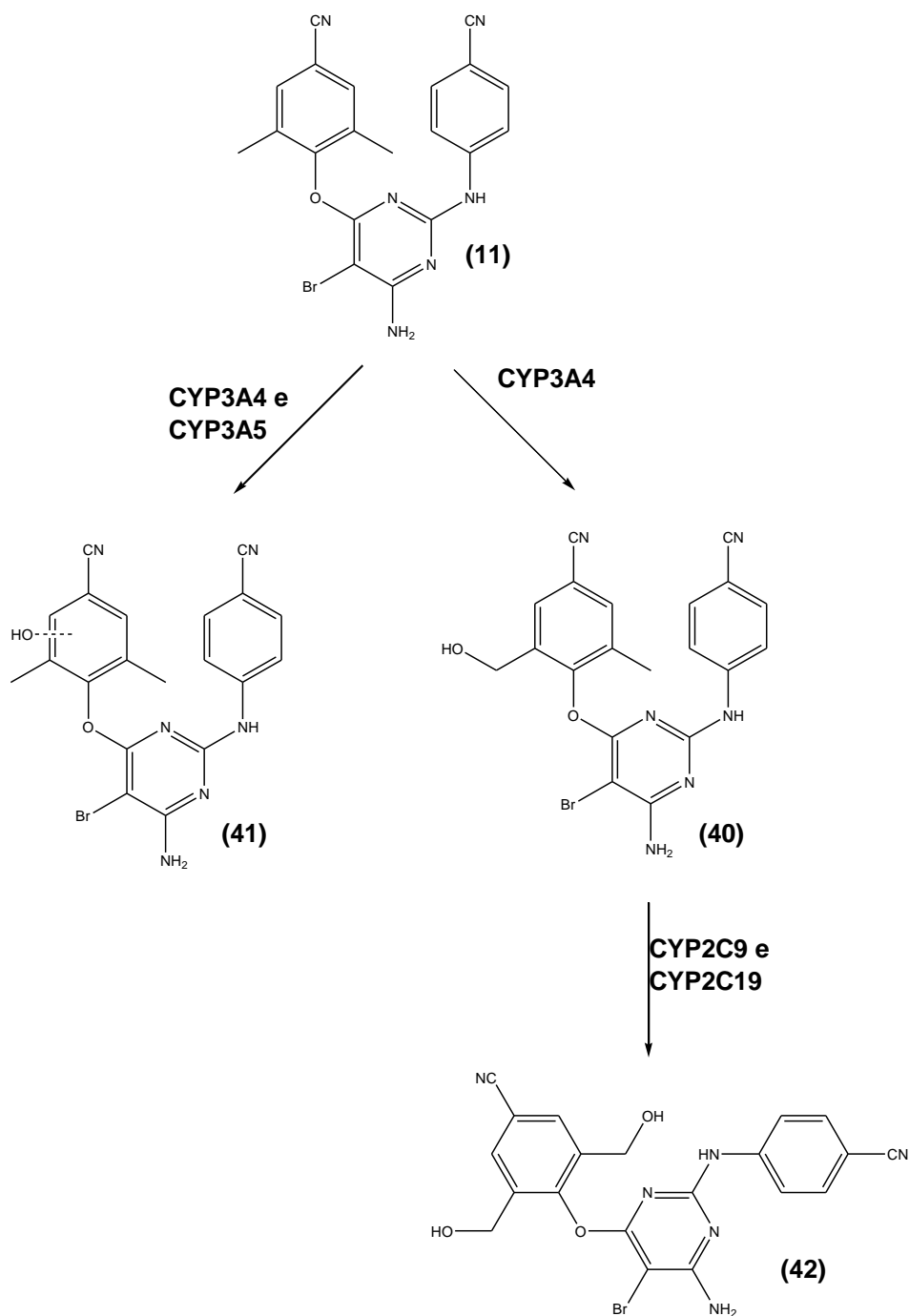
A Etravirina [4-[6-amino-5-bromo-2-(4-cianoanilina)pirimidina-4-il]oxi-3,5-dimetilbenzonitrilo, ETV, 11, Esquema 1.8] é uma diarilpirimidina e pertence à classe dos NNRTIs aprovada pela FDA em 2008.⁴⁸ É activa contra as estirpes do vírus que desenvolveram resistência aos fármacos da mesma classe, usados no tratamento do HIV-1, por exemplo o EFV e a NVP.^{43,58}

A ETV é muito solúvel em lípidos, então uma forma de aumentar a solubilidade e a sua permanência no suco gástrico é ser administrada com a comida, promovendo um aumento de absorção do fármaco até 50%. As concentrações máximas de plasma são geralmente atingidas 4-5 horas após a administração do fármaco e apresenta, tal como o EFV, um longo tempo de meia vida 30-40 horas. A dose de ETV aprovada é 200 mg duas vezes por dia, em combinação com outros agentes anti-retrovirais. Não é recomendada em fases de amamentação e em relação a pacientes pediátricos ainda não existem dados disponíveis sobre a sua segurança e eficácia.^{31,57-60}

Existem alguns efeitos associados à administração de ETV como irritação cutânea, náuseas, hipersensibilidade e efeitos gastrointestinais.⁵⁰

A ETV é excretada principalmente através das fezes (81.2-86.4% da dose administrada), na biliar (11%) e uma pequena parte é eliminado na urina (1%).^{42,59,60}

A ETV (11) é metabolizada via CYP, a qual sofre uma oxidação primária catalisada pelas isoenzimas CYP3A4 formando-se a ETV mono-hidroxilada (40, Esquema 1.8), que por sua vez sofre uma oxidação secundária a ETV di-hidroxilada (42), catalisada pelas enzimas CYP2C9 e CYP2C19. Estes metabolitos são glucuronidados e subseqüentemente excretados por via urinária. A via metabólica secundária ocorre no anel aromático dimetilado que sofre uma hidroxilação, por meio das enzimas CYP3A4 e CYP3A5 formando-se um metabolito que não se encontra completamente caracterizado (41).^{31,57,58}



Esquema 1.8 – Biotransformação da ETV (11) nos metabolitos de Fase I. ³¹

O mecanismo envolvido nos efeitos tóxicos induzidos por este fármaco ainda não é conhecido, contudo o facto de formar metabolitos hidróxi-benzílicos (similamente ao que acontece com a NVP), sugere que o papel da toxicidade da ETV possa ser idêntico. ³¹

1.4.4. Trimetoprim

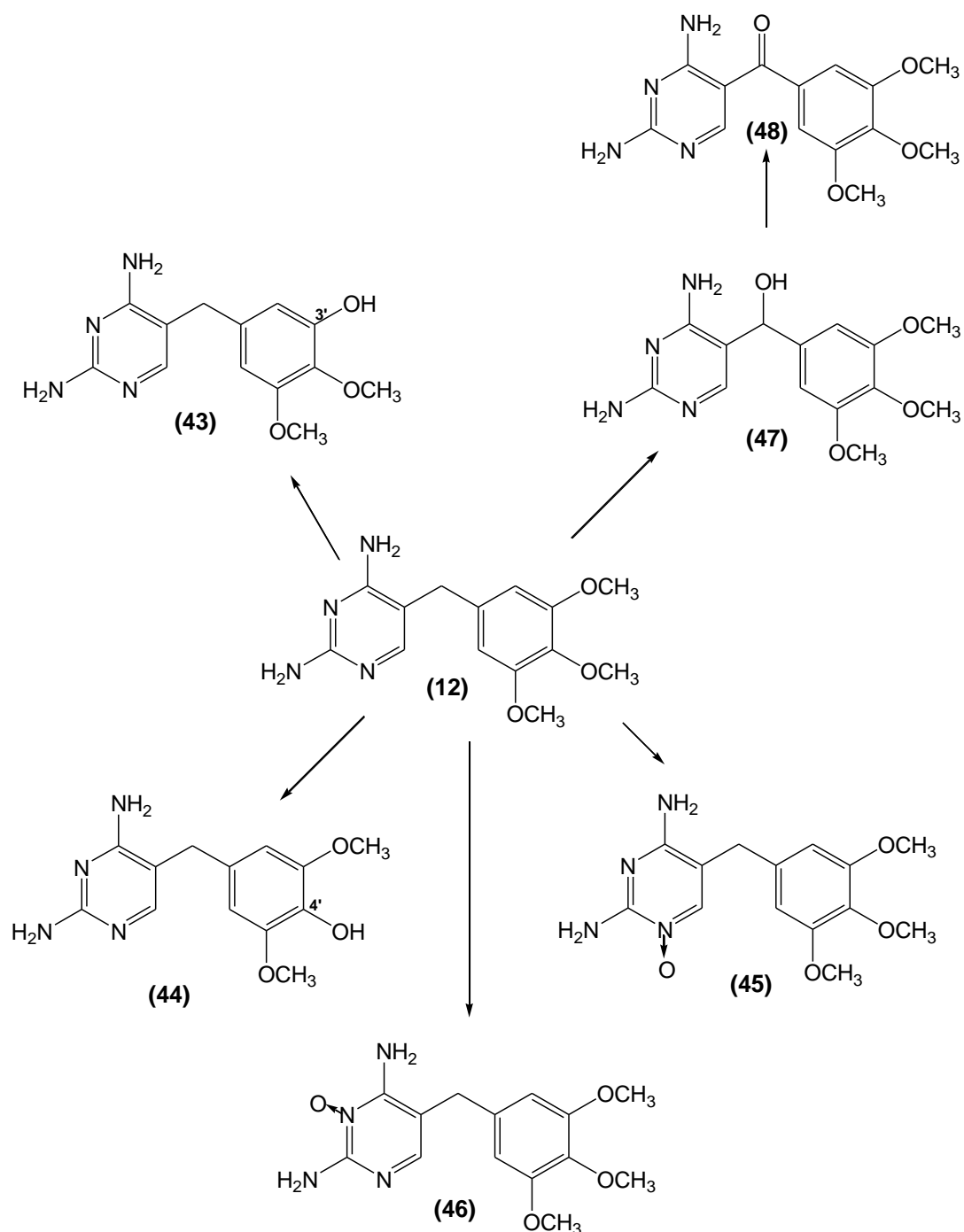
O Trimetoprim [2,4-diamino-5-(3',4',5'-trimetoxilbenzil)-pirimidina, TMP, 12, Esquema 1.9] é um agente antibacteriano usado como primeira linha no tratamento de infecções urinárias.^{61,62} O TMP pode ser usado em combinação com sulfonamidas, contudo esta combinação causa irritações cutâneas, toxicidade hepática e reacções de hipersensibilidade. Por esse motivo, o uso do TMP sozinho aumentou porque apesar deste provocar reacções adversas, não são tão severas.⁶³

Para as células bacterianas funcionarem correctamente, sobreviverem e se replicarem têm de sintetizar o seu próprio folato, que é um derivado do ácido fólico. O TMP actua ao nível das vias metabólicas de energia das células bacterianas, inibindo de forma competitiva a actividade da enzima dihidrofolato redutase (DHFR), ao ligar-se ao centro activo, impedindo-a de catalisar a conversão do ácido dihidrofólico à sua forma activa, o ácido tetrahidrofólico, inibindo a formação do folato, indispensável à sobrevivência das células bacterianas que provocam as infecções.^{61,64}

O TMP é rapidamente absorvido no tracto gastrointestinal, passando inicialmente pela veia hepática, depois pelo fígado e por fim para a corrente sanguínea. Para que este fármaco seja eficiente no tratamento da infecção urinária é imprescindível que seja activo no interior da urina, ou seja, ser solúvel em lípidos para mais tarde ser largamente distribuído nos tecidos e fluidos corporais.⁶⁴

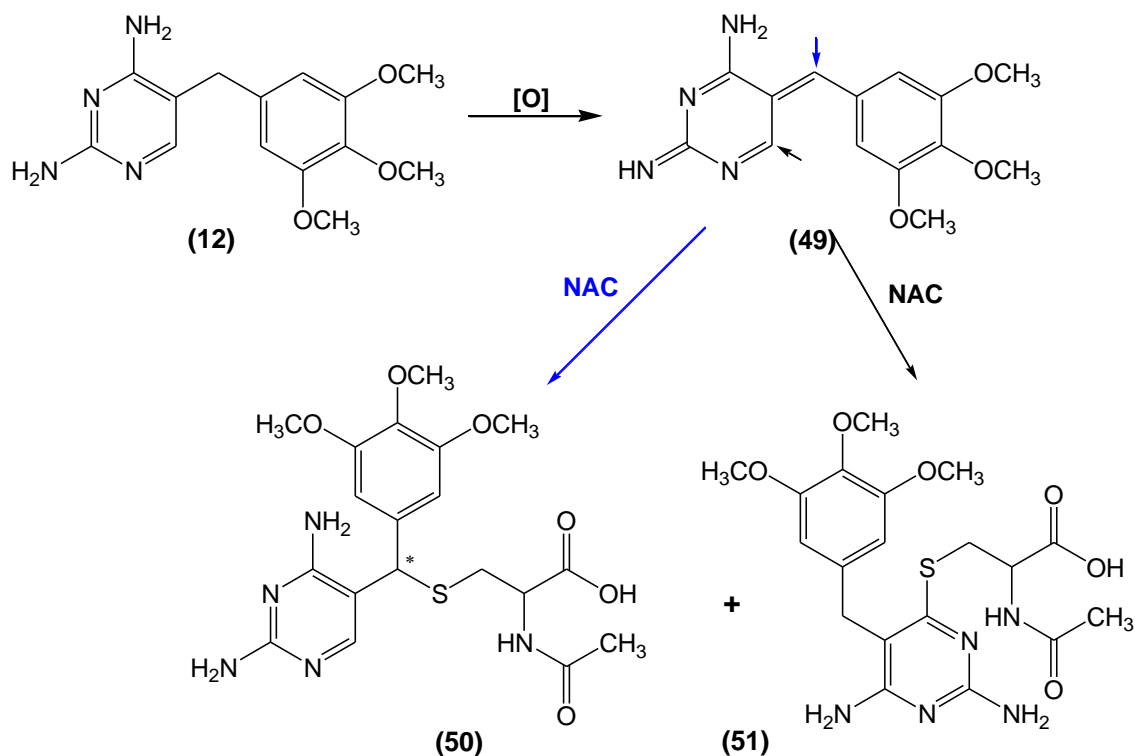
Cerca de 50% do TMP é excretado, sem qualquer alteração, pela urina num período até 24h após a sua administração, excepto em doentes com função renal reduzida em que o tempo de vida do fármaco é prolongado.⁶⁴

A biotransformação do TMP (12) em metabolitos de Fase I ocorre no fígado e envolve uma O-desmetilação obtendo-se como metabolitos fenólicos o 3'-OH-TMP (43, Esquema 1.9) e o 4'-OH-TMP (44), que podem ser transformados nos respectivos glucurónidos. Pode também ocorrer uma N-oxidação formando-se o 1-NO-TMP (45) e o 3-NO-TMP (46) e ainda uma hidroxilação do carbono metilénico originado o C α -OH-TMP (47), que por sua vez pode sofrer oxidação ao metabolito carbonílico (48). Ainda não existe informação acerca das enzimas do CYP responsáveis pela origem destes metabolitos.^{62,64}



Esquema 1.9 – Biotransformação do TMP (12) nos metabolitos de Fase I. ⁶⁵

Os efeitos tóxicos induzidos por este fármaco têm sido consistentemente associados à bioativação deste fármaco em metabolitos reactivos.⁶⁴ O TMP pode ser bioactivado ao intermediário reactivo (49, Esquema 1.10), que por apresentar características electrófilas reage com bionucleófilos contendo grupos sulfidrílo na sua constituição resíduos de cisteína das proteínas formando aductos covalentes como o 50 e 51, Esquema 1.10.⁶⁵



Esquema 1.10 – Reacção do intermediário quinona-imina *methide* (49) com a NAC como bionucleófilo, originando dois aductos 50 e 51.⁶⁵

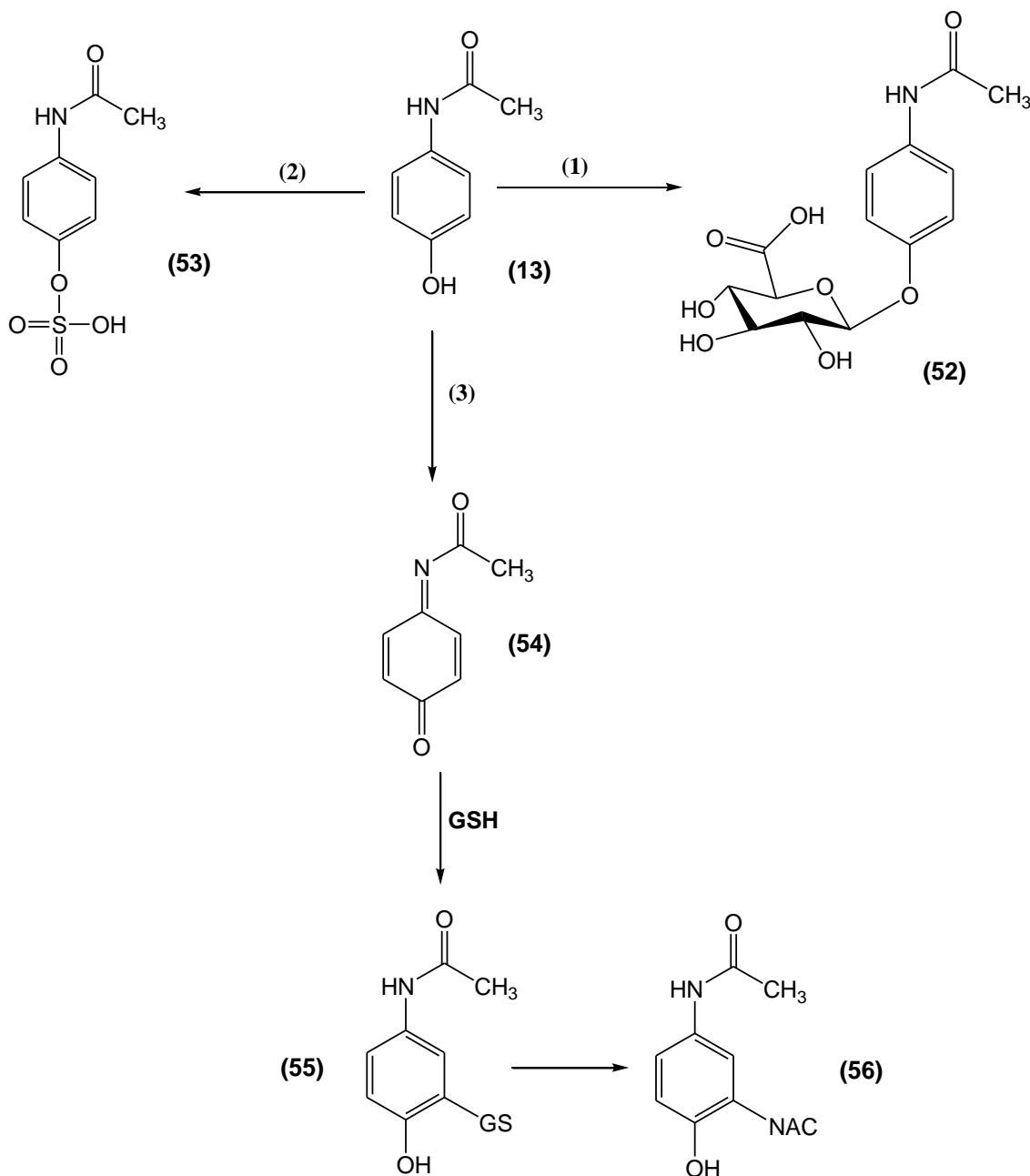
1.4.5. Paracetamol

O paracetamol [*N*-(4-hidróxifenil acetamida), APAP, 13, Esquema 1.11] é um anti-inflamatório não esteróide e consiste num anel benzénico com um grupo hidroxilo e na posição *para* substituído por um grupo NHCOCH₃. É um fármaco largamente usado pelas suas propriedades antipiréticas e analgésicas. O seu mecanismo de actuação é ainda desconhecido, mas estudos divulgaram que pode estar relacionado com a sua capacidade em inibir a síntese de prostaglandinas periféricas.⁶⁶⁻⁶⁸

O local de acção farmacológica do paracetamol encontra-se dentro do Sistema Nervoso Central e a sua administração pode ser feita via oral, rectal ou intravenosa.^{57,60} Para os adultos ou adolescentes com idade superior a 16 anos ou mais de 50 kg, a dose recomendada é 1g a cada 6 horas ou 650 mg a cada 4 horas, sem exceder as 4 g/dia. Em crianças entre os 2 e o 12 anos é indicado 15 mg/kg a cada 6 horas ou 12.5 mg a cada 4 horas, até um máximo de 75 mg/kg/dia.^{69,70}

Numa dose terapêutica, o paracetamol (13) é metabolizado no fígado, órgão onde sofre reacções de glucuronidação (APAP-G, 52) entre 47-62% e sulfonação (APAP-S, 53) entre 25-36%, antes da sua excreção. Apenas 1-4% é excretado sem quaisquer alterações, pela urina, enquanto que 8-10% do APAP é convertido, através

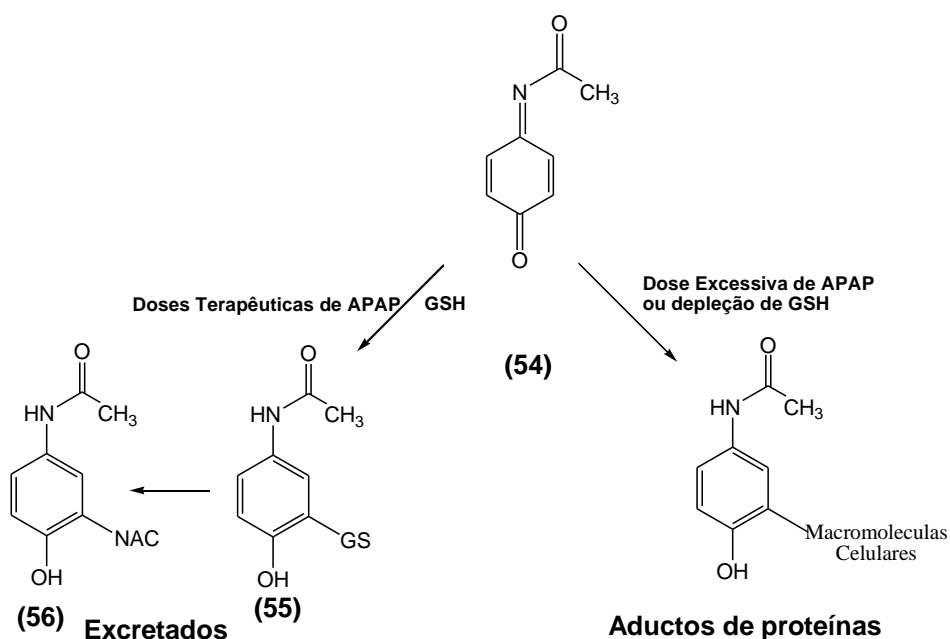
de enzimas hepáticas do CYP – CYP2E1, CYP1A2 e CYP3A4 - num metabolito altamente reactivo, a *N*-acetil-*p*-benzo-quinona-imina (NAPQI, 54).⁷⁰ Este metabolito é normalmente inactivado pela combinação com a GSH reduzida (55) e é excretado depois da metabolização no conjugado mercapturato (56) através da urina (Esquema 1.11).^{66,67,69,71,72}



Esquema 1.11 – Metabolitos obtidos numa administração terapêutica de paracetamol, sendo as vias principais as que correspondem às reacções de glucuronidação, onde se obtém o metabolito APAP-G (52), e de sulfonação, onde se obtém o metabolito APAP-S (53). Forma-se também o metabolito reactivo, NAPQI, através das enzimas hepáticas do CYP, que se conjuga com a GSH e posteriormente leva à formação do mercapturato (56).^{73,74}

Desde que surgiu o primeiro caso de hepatotoxicidade induzido por APAP, em 1966, têm sido realizados estudos de toxicidade deste fármaco, nos quais foi demonstrado que uma *overdose* ou dose excessiva de APAP satura as vias de glucuronidação e sulfonação (vias 1 e 2 do Esquema 1.11), levando à acumulação de elevadas quantidades de NAPQI (via 3 do Esquema 1.11). Como este metabolito é extremamente reactivo como electrófilo, reage com os grupos sulfidrilo das cisteínas presentes nas proteínas celulares, causando a perda de função da mitocôndria, isto é, conduz à inibição da respiração mitocondrial, que por sua vez leva à perda de ATP e à formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) na mitocôndria. A superprodução de radicais livres resultante do *stress* oxidativo pode ferir directamente a membrana hepatocelular e nefrocelular por peroxidação lipídica, o que leva aos danos no fígado e rins.^{67,71,72,75-77}

Em doses terapêuticas de APAP, o metabolito reactivo, NAPQI, é normalmente neutralizado pela combinação com a GSH, que promove a formação de aductos covalentes não tóxicos, que são excretados. Em contrapartida, nas doses excessivas de APAP, o NAPQI reage com todo o GSH presente nas células e como ainda existe NAPQI livre no fígado, este liga-se a alvos alternativos, nomeadamente macromoléculas, proteínas, DNA e lípidos insaturados (Esquema 1.12).⁶⁷ Por esse motivo, usa-se o antídoto, NAC, que fornece ao organismo cisteína. Como este bionucleófilo é um precursor da GSH promove a manutenção do grupo tiol presente nas proteínas, ajudando dessa forma, na desintoxicação do metabolito reactivo NAPQI e na eliminação dos radicais livres.⁷⁷



Esquema 1.12 – Via metabólica do NAPQI com a GSH reduzida ou com biomacromoléculas, quando a dose de APAP se encontra em excesso.⁶⁷

1.5. Âmbito e objectivos

Como referido, o uso prolongado da NVP, do EFV, da ETV, do TMP e do APAP está associado a eventos toxicológicos, existindo uma grande preocupação a nível do seu uso crónico.

A biomonitorização de aductos covalentes formados entre os possíveis metabolitos reactivos e os bionucleófilos, nomeadamente os aductos de GSH e os mercapturatos, é extremamente útil para a avaliação do papel da bioactivação dos fármacos na sua toxicidade assim como na identificação de factores de risco.

A obtenção de padrões sintéticos destes aductos é crucial nesta tarefa, mas muitas vezes está condicionada pela dificuldade de obtenção de metabolitos reactivos por via sintética. Desta forma, a descoberta de enzimas que sejam facilmente obtidas em quantidades apreciáveis e que tenham a capacidade de mimetizar a actividade do CYP, é uma forma de contornar esta dificuldade. Neste trabalho pretende-se avaliar a capacidade da TvL para mimetizar a actividade do CYP, não só na formação de metabolitos reactivos quinóides mas também na formação de metabolitos hidróxi-benzílicos de Fase I.

2. Resultados e Discussão

Neste trabalho experimental utilizou-se a enzima TvL, uma lacase de origem fúngica, como biocatalisador na reacção de oxidação directa dos diferentes fármacos, nomeadamente a Nevirapina (9), a Etravirina (11), o Trimetoprim (12) e o Paracetamol (13). Para além destes substratos também foi possível realizar um estudo idêntico para os metabolitos de Fase I, obtidos por via sintética, designados por 2-OH-NVP (14) e 8-OH-EFV (31), provenientes da Nevirapina e do Efavirenz, respectivamente.

O objectivo principal consistiu na formação de intermediários reactivos, como por exemplo quinona-iminas, susceptíveis de ataque nucleófilo por parte de diferentes bionucleófilos com vista à formação de aductos padrão.

Antes de se dar início aos estudos de formação dos aductos, começou-se por realizar um trabalho experimental preliminar, tendo em vista i) a acção da TvL sobre alguns dos bionucleófilos (NAC e GSH) usados no estudo; e ii) o comportamento da TvL sobre um substrato modelo, o ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico), ABTS, na presença dos diferentes bionucleófilos. Foi também realizado um estudo dos fármacos na presença de diferentes concentrações de TvL, que em alguns casos foram de 4 U, 40 U e 400 U. Com base nos resultados obtidos prosseguiu-se com o estudo das reacções de oxidação dos diversos fármacos, mediadas pela TvL, na presença de bionucleófilos. Estas reacções foram realizadas numa primeira fase em placas de 96 poços e a sua monitorização foi efectuada por cromatografia líquida de alta resolução acoplada com um detector de fotodíodos (HPLC-DAD). As análises foram realizadas com base nos cromatogramas e nos perfis de UV-Vis obtidos.

Após identificar as condições óptimas para as reacções em estudo, os produtos obtidos foram analisados por espectrometria de massa. Foram ainda efectuados aumentos de escala, para alguns casos, numa tentativa de isolar e caracterizar estruturalmente por RMN os aductos padrão obtidos.

2.1. Ensaio preliminares de oxidação do ABTS pela TvL na presença de bionucleófilos

Com o objectivo de estudar se a presença de bionucleófilos interfere no desempenho da TvL como biocatalisador utilizou-se um substrato modelo, o ABTS (1, Figura 2.1) cuja reacção na presença de TvL dá origem a uma espécie radicalar corada (57). A análise dos resultados foi efectuada por espectrofotometria de Ultravioleta-visível (UV-Vis) usando um comprimento de onda a 420 nm, correspondente ao máximo de absorção do radical corado.

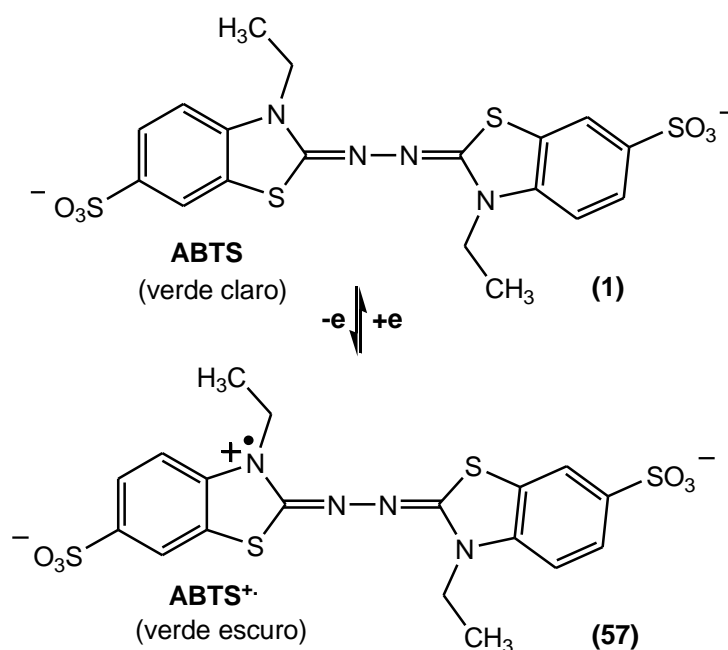


Figura 2.1 – Oxidação do ABTS ao radical catião (verde escuro), na presença de lacases.⁷⁸

A uma solução de ABTS em Tampão Britton-Robinson (BR), pH 4, foi adicionada a TvL (0.4 U), observando-se uma alteração na cor da mistura de verde pálido para verde escuro (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 – Reacção de oxidação do ABTS pela TvL, na presença de NAC e de GSH, em Tampão BR pH 4, à temperatura ambiente. A ordem de adição foi ABTS, seguida de TvL e por fim os bionucleófilos.

Condições	Substrato/Bionucleófilo (mM)	Cor observada
ABTS	---	Verde pálido
ABTS+TvL	---	Verde escuro
ABTS+TvL+NAC	1:0.01	Verde escuro
	1:1	Incolor
	1:5	Incolor
	1:50	Incolor
ABTS+TvL+GSH	1:0.01	Verde escuro
	1:1	Verde escuro
	1:5	Verde escuro
	1:50	Verde escuro

Esta alteração de cor deve-se à oxidação, mediada pela TvL, do ABTS ao respectivo radical, como ilustrado na Figura 2.1. A esta solução foi adicionada NAC, verificando-se que para baixas concentrações de NAC (0.01 mM), não se observa alteração de cor. Pelo contrário, ao adicionar concentrações deste bionucleófilo na mesma proporção ou em proporções superiores ao ABTS, verifica-se uma alteração de cor para incolor. Isto significa que o radical $ABTS^+$ (57, Figura 2.1) regressa à sua forma reduzida provocando a oxidação do bionucleófilo, NAC ao seu radical. Dois radicais NAC ligam-se por pontes de dissulfureto, originado a NAC-S-S-NAC (Figura 2.2).



Figura 2.2 – Formação do dímero pela oxidação de grupos tiol (-SH), em que o grupo “R” representa a NAC ou a GSH. ³⁸

A descoloração significa que o radical $ABTS^+$ foi consumido provavelmente na oxidação da NAC para formar o respectivo dímero. No entanto, com a GSH, não são observadas alterações na cor da solução, mantendo-se o verde escuro, o que significa que o $ABTS^+$ não foi consumido na presença de GSH. Conclui-se a partir destes resultados que o ABTS pode funcionar como mediador na formação do dímero NAC-NAC (Figura 2.3), enquanto que para a GSH este sistema redox não parece funcionar.

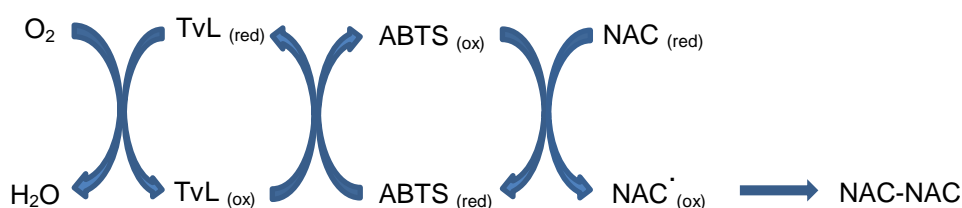


Figura 2.3 – Representação esquemática dos ciclos redox catalisados pela TvL, na presença do ABTS como mediador e na presença de NAC como bionucleófilo. ⁵

No segundo estudo, referente à Tabela 2.2, inverteu-se a ordem de adição, isto é, adicionou-se o bionucleófilo à solução contendo o ABTS e por fim a TvL, no sentido de avaliar se ocorre inibição enzimática na presença dos bionucleófilos NAC e GSH. Uma vez que a TvL é uma enzima constituída por resíduos de cisteína, estes podem ligar-se por pontes de dissulfureto, aos resíduos de NAC e da GSH podendo inibir a sua actividade enzimática.

Tabela 2.2 – Estudo de inibição enzimática da TvL na presença de NAC e de GSH, em Tampão BR pH 4, à temperatura ambiente. A ordem de adição foi ABTS, seguida dos diferentes bionucleófilos e por fim a TvL.

Condições	Substrato/Bionucleófilo (mM)	Cor observada
ABTS	---	Verde pálido
ABTS+NAC	---	Verde muito claro
ABTS+GSH	---	Verde muito claro
ABTS+NAC+TvL	1:0.01	Verde escuro
	1:5	Incolor
	1:50	Incolor
	1:1	Incolor
ABTS+GSH+TvL	1:0.01	Verde escuro
	1:5	Verde escuro
	1:50	Verde escuro
	1:1	Verde escuro

No primeiro ensaio observou-se a diminuição de intensidade de cor da solução. Para testar se a perda de coloração se devia apenas à reacção dos bionucleófilos com o ABTS⁺ e não à inibição da enzima adicionou-se 0.01 mM de NAC e neste caso obteve-se uma solução verde escura, o que prova que a NAC não inibe a enzima. Em todos os ensaios conduzidos com GSH obteve-se uma solução verde escura que comprova que a enzima não é inibida por este bionucleófilo.

2.2. Ensaio preliminares da TvL com os bionucleófilos

Foram realizados estudos com a NAC com o objectivo de avaliar a sua estabilidade em tampão (amostra B, Tabela 2.3) e avaliar a capacidade da TvL em promover a oxidação deste bionucleófilo na ausência de ABTS (amostra C, Tabela 2.3). Estas amostras foram comparadas com um padrão, NAC obtida comercialmente dissolvida em CD₃OD (amostra A, Figura 2.4), por ¹H-RMN.

Tabela 2.3 – Condições experimentais testadas nos ensaios com a NAC, a 37 °C, em Tampão BR pH 6.

Amostras	[NAC] (mM)	TvL	Tempo (h)
B	20	---	16
C	20	40 U	16

A partir da análise efectuada aos espectros de ^1H -RMN (Figura 2.4), realizados em CD_3OD , foi possível verificar (espectros B e C) que a oxidação da NAC ocorre numa extensão muito pequena quando comparado com o espectro A, que contém a NAC padrão. A comparação entre os espectros B (NAC em tampão) e C (NAC na presença de TvL) mostrou que a quantidade de NAC oxidada é muito semelhante. Conclui-se assim, que a presença de enzima não provoca um aumento da quantidade da espécie oxidada, sendo possível a utilização destes bionucleófilos nos ensaios de oxidação de fármacos com a TvL.

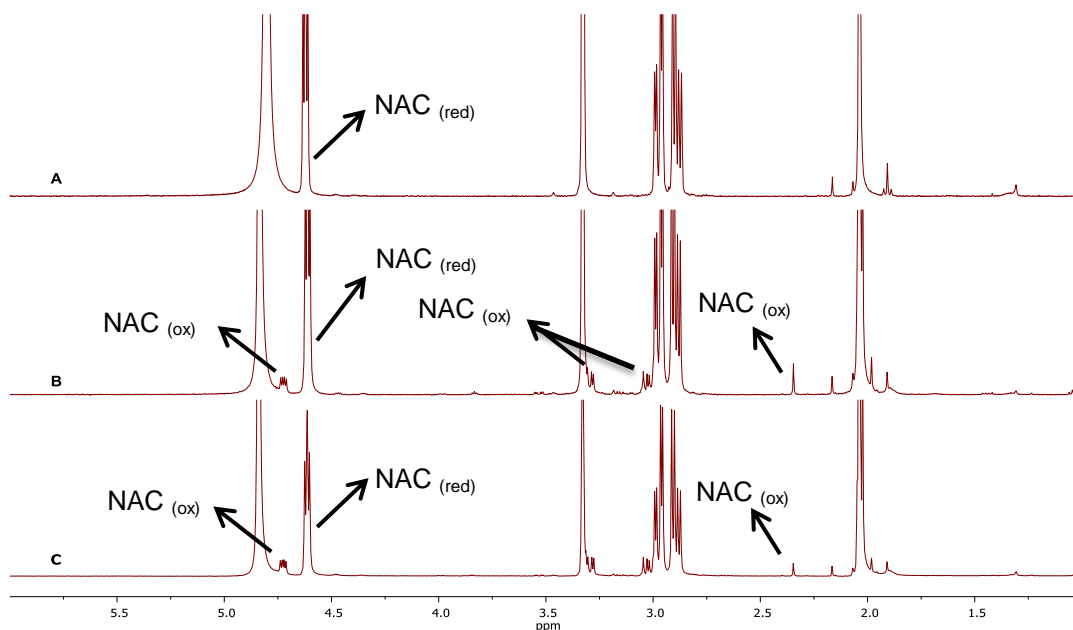


Figura 2.4 – Sobreposição dos espectros de ^1H -RMN (500 MHz) da NAC em CD_3OD ; A) NAC; B) NAC em Tampão BR pH 6, após 16h de reacção; C) NAC e TvL em Tampão BR pH 6, após 16h de reacção.

2.3. Oxidação dos fármacos para obtenção de metabolitos quinóides

2.3.1. Paracetamol

Antes de se iniciar as reacções de oxidação com os fármacos foram feitos uns estudos introdutórios, de forma a ter um conhecimento geral sobre os mesmos, nomeadamente o seu tempo de retenção (t_r) e o seu perfil de UV-Vis, obtidos a partir do HPLC-DAD (Figura 2.5).

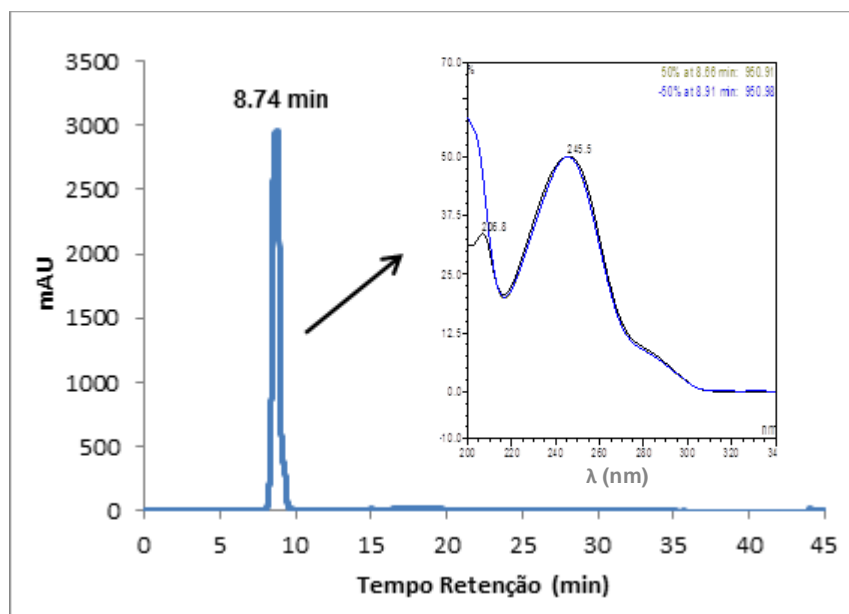
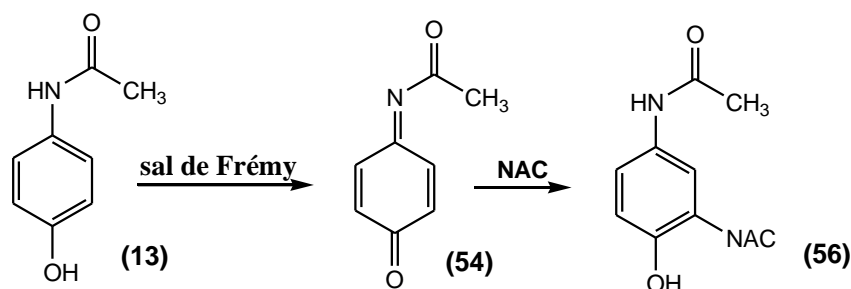


Figura 2.5 – Cromatograma obtido para o padrão do APAP em tampão BR pH 6 e o respectivo perfil de UV-Vis.

O APAP tem um t_r de 8.74 minutos (nas condições de eluição utilizados, ver procedimento experimental 4.1.3) e apresenta uma absorvância máxima de UV de 206.8 e 245.5 nm. Com estes dados prosseguiu-se com as reacções de oxidação do APAP.

Com o objectivo de formar um aducto padrão entre a NAC e o APAP, foi realizada uma reacção de oxidação do APAP com o sal de Frémy, uma vez que este agente oxidante simula a oxidação de um electrão, que ocorre nas oxidações metabólicas mediadas pelas isoenzimas do CYP.⁴⁵ Fez-se reagir o APAP com o sal de Frémy, resultando na formação da quinona-imina (NAPQI) à qual foi adicionada uma solução de NAC, de forma a obter o aducto NAC-APAP (Esquema 2.1).



Esquema 2.1 – Reacção de oxidação do APAP com o sal de Frémy, originando o NAPQI, que na presença de NAC origina o NAC-APAP.

Os produtos obtidos por reacção com o sal de Frémy foram analisados por HPLC-DAD, após 30 minutos de reacção. No excerto do cromatograma ilustrado na Figura 2.6 é possível observar a presença de dois sinais com tr de 8.74 min e 9.39 min. Esta reacção foi analisada posteriormente por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa de “tandem” com ionização de *electrospray* (LC-ESI-MS/MS), dando indicações de que o produto com tr = 8.74 min é o APAP, que não reagiu na totalidade, e o produto com tr = 9.39 min é o aducto NAC-APAP (56).

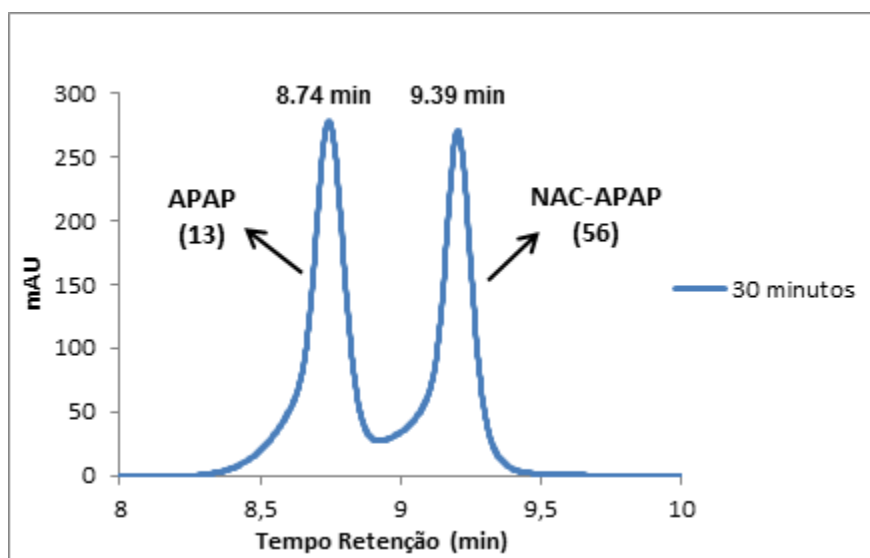


Figura 2.6 – Formação do aducto NAC-APAP (56) por oxidação com o sal de Frémy, após 30 minutos de reacção.

Tendo este padrão investigou-se se a TvL teria a capacidade em oxidar o APAP ao intermediário hepatotóxico, NAPQI (54), obtido pelas isoenzimas do CYP.⁷¹

As reacções foram iniciadas em placas de 96 poços (0.2 mL), aumentando-se posteriormente o volume para 2 mL e por fim para 10 mL. Estas foram efectuadas a partir de soluções stock, preparadas em DMSO, de forma a garantir a solubilidade dos fármacos. A percentagem de DMSO no meio reaccional utilizada não ultrapassou os 10%, de forma a não comprometer a actividade da enzima TvL. Relativamente à TvL, as soluções stock foram preparadas em tampão BR pH 6. Foram utilizadas diferentes concentrações de fármaco e de enzima. Os ensaios testados encontram-se apresentados na Tabela 2.4, os quais foram monitorizados por HPLC-DAD até se observar o consumo total do fármaco.

Tabela 2.4 – Condições experimentais testadas para o APAP na presença de TvL, realizadas em Tampão BR pH 6.

<i>Ensaio</i>	<i>[APAP] (mM)</i>	<i>[TvL] (U)</i>	<i>DMSO (%)</i>	<i>Tempo (h)</i>
1	1	43	4	3
2	2	40	5	4
3	10	4	7	24
4	10	400	7	0.50

Com este estudo foi possível concluir que quanto maior a quantidade de TvL usada no meio reaccional, mais rápida é a reacção de transformação do APAP. Apesar disso, prosseguiu-se com as reacções de oxidação do APAP, nas condições testadas para o ensaio 1 (Figura 2.7), uma vez que se utiliza uma menor quantidade de enzima e para além disso o tempo de reacção deste ensaio (3h) permite monitorizar a formação dos intermediários.

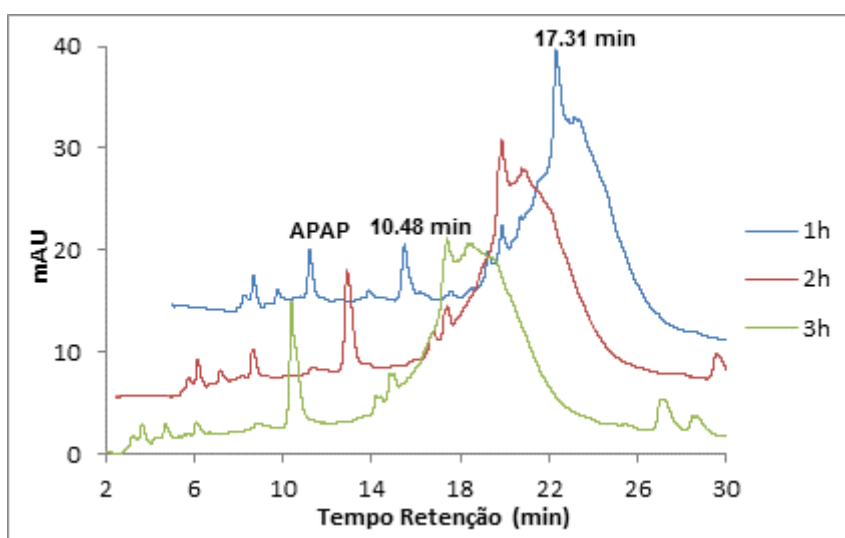


Figura 2.7 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos na reacção do APAP na presença de TvL, ensaio 1, até 3h de reacção.

A análise dos resultados da Figura 2.7 indica que o consumo do fármaco resulta na formação de produtos da reacção, com tempos de retenção de 10.48 min e 17.31 min. Esta mistura reaccional foi analisada por LC-ESI-MS/MS não se observando sinais significativos quer em modo positivo quer em modo negativo. Os produtos da reacção ($t_r = 10.48$ min e $t_r = 17.31$ min) não foram posteriormente identificados. Ainda assim, uma vez que se observa o consumo do APAP, fez-se reagir o APAP com bionucleófilos de enxofre, como a NAC e a GSH, com o objectivo de formarem os possíveis aductos NAC-APAP e GSH-APAP. Estes aductos podem ser formados pelo ataque à quinona-imina proveniente da oxidação do APAP. Foram realizados vários ensaios onde se testou a concentração do APAP, a concentração de TvL, a percentagem de DMSO no meio reaccional e ainda a Temperatura (Tabela 2.5).

Tabela 2.5 – Condições experimentais testadas para o APAP na presença de TvL e ainda de NAC como bionucleófilo, realizadas em Tampão BR pH 6.

<i>Ensaio</i>	<i>Concentrações (mM)</i>		<i>[TvL] (U)</i>	<i>DMSO (%)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Tempo (h)</i>
	<i>APAP</i>	<i>NAC</i>				
1	1	5	43	4	25	2
2	2	10	40	5	37	4
3	10	10	40	7	37	3
5	10	10	400	7	37	0.5
5	10	25	4	7	37	12
6	12.3	27.5	4	7	37	24

Verificou-se uma vez mais que ao utilizar 400 U de TvL, a reacção de oxidação é mais rápida. Contudo, de todos os ensaios efectuados, que envolveram a modificação de vários parâmetros experimentais como a concentração de APAP, de NAC e de TvL, aquele em que a mistura reaccional contendo 1 mM, 5 mM e 43 U de TvL, respectivamente originou um produto identificado por LC-MS, cujo espectro de massa é compatível com o aducto NAC-APAP (56), foi o ensaio 1.

A Figura 2.8 mostra o consumo do APAP e embora a formação do aducto NAC-APAP não esteja visível, a expansão do mesmo, 2h de reacção (Figura 2.9), mostra a formação do possível aducto. Uma vez que o aducto NAC-APAP tem um tempo de retenção muito próximo do APAP foi necessário avaliar a sua formação por LC-ESI-MS/MS por comparação com o padrão, obtido na reacção com o sal de Frémy.

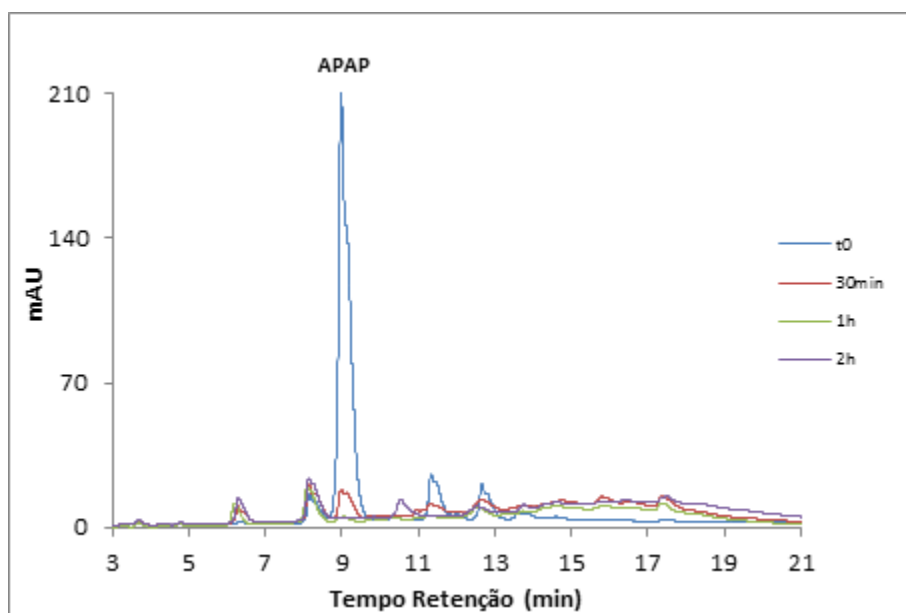


Figura 2.8 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos por HPLC-DAD da reacção do APAP com a NAC, ensaio 1, até 2h.

A indicação da presença do aducto NAC-APAP (56) foi obtida primeiro e confirmada depois pela respectiva análise por LC-ESI-MS/MS, utilizando o mesmo sistema eluente. Procedeu-se assim, ao *scale-up* da reacção do APAP com a NAC para 10 mL, usando as condições optimizadas, com o objectivo de isolar e caracterizar estruturalmente o aducto formado.

O aducto 56 (Figura 2.9) com um tempo de retenção de 9.39 min foi isolado por HPLC com coluna semi-preparativa. A partir do HPLC-DAD também foi possível retirar a informação acerca do seu perfil de UV-Vis, onde se verificou que o aducto 56 apresenta uma absorvância máxima de UV de 253.2 e 326 nm.

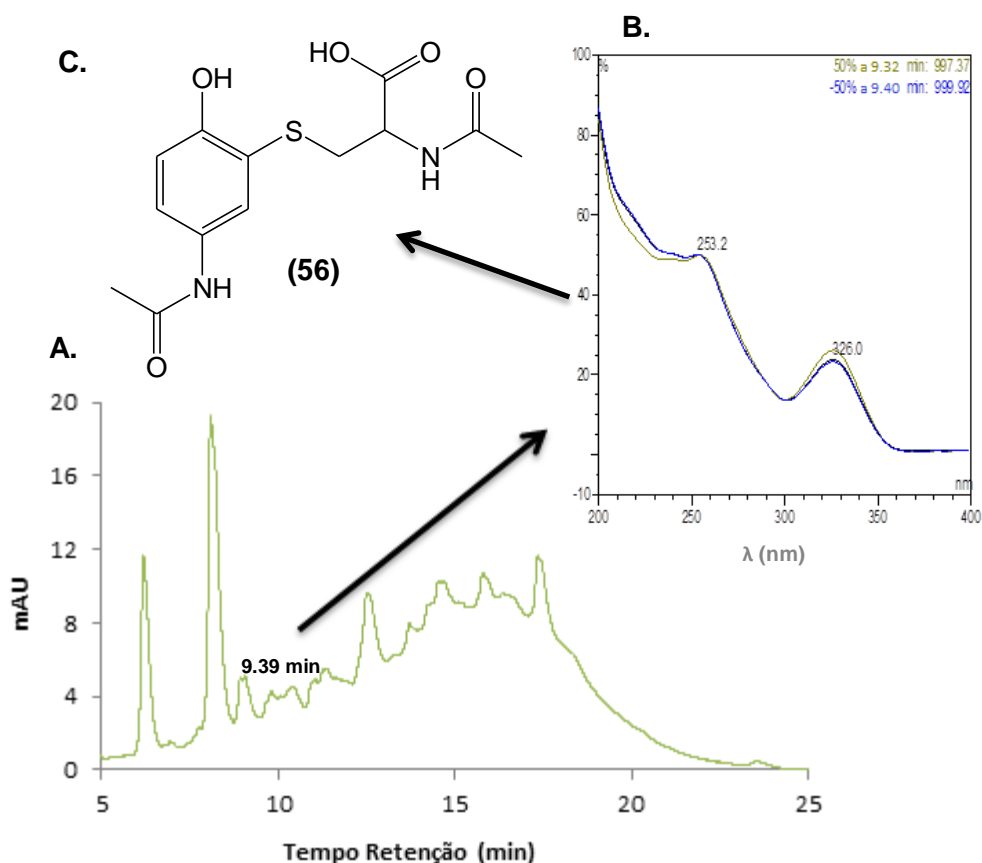


Figura 2.9 – Excerto do cromatograma obtido por HPLC-DAD da mistura reaccional (APAP, NAC e TvL), ao fim de 2h de reacção (A), Perfil de UV do aducto 56 (B) e Estrutura molecular do aducto NAC-APAP (C).

Foi realizado de forma semelhante o mesmo estudo para a GSH, com o objectivo de formar o aducto GSH-APAP, usando as condições experimentais apresentadas na Tabela 2.6.

Tabela 2.6 – Condições experimentais testadas para o APAP na presença de TvL e ainda de GSH como bionucleófilo, realizadas em Tampão BR pH 6.

Ensaio	Concentrações (mM)		[TvL] (U)	DMSO (%)	Temperatura (°C)	Tempo (h)
	Paracetamol	GSH				
1	1	5	43	4	25	2
2	2	10	40	7	37	4
3	10	50	4	7	37	24

A Figura 2.10 mostra o consumo do APAP e a conseqüente formação do aducto GSH-APAP.

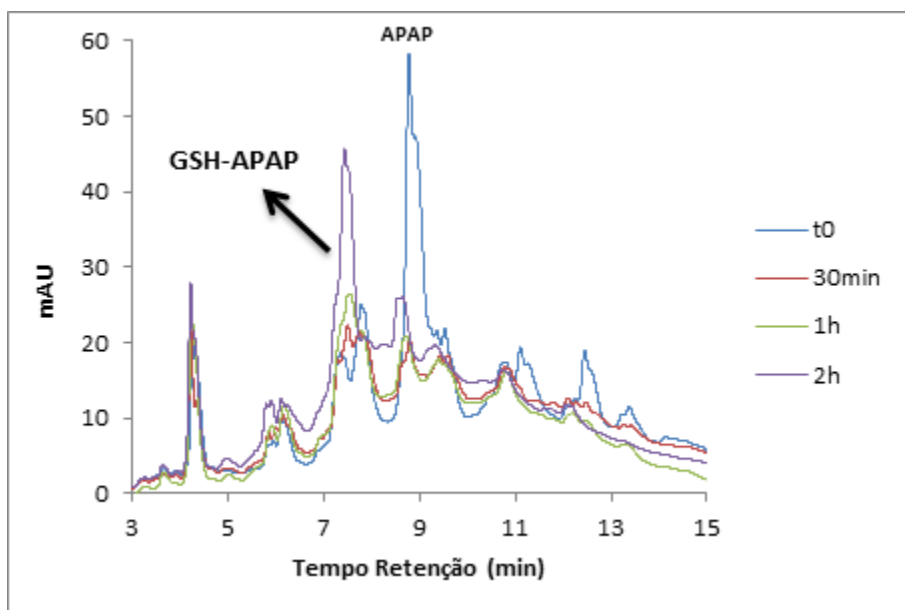


Figura 2.10 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos por HPLC-DAD da reacção do APAP com a GSH, ensaio 1, até 2h.

A indicação da presença do aducto GSH-APAP (55) foi efectuada com base nos resultados obtidos através do HPLC-DAD e pela respectiva análise por LC-ESI-MS/MS, com o mesmo sistema eluente. Procedeu-se assim, ao *scale-up* da reacção do APAP com a GSH para 10 mL, usando as condições optimizadas, com o objectivo de isolar e caracterizar estruturalmente o aducto.

O aducto 55 (Figura 2.11) com o tr de 7.84 min foi isolado por HPLC semi-preparativa. O perfil de UV-Vis foi retirado a partir do HPLC-DAD, que apresenta uma absorvância máxima de UV de 200, 214.6 e 288.9 nm.

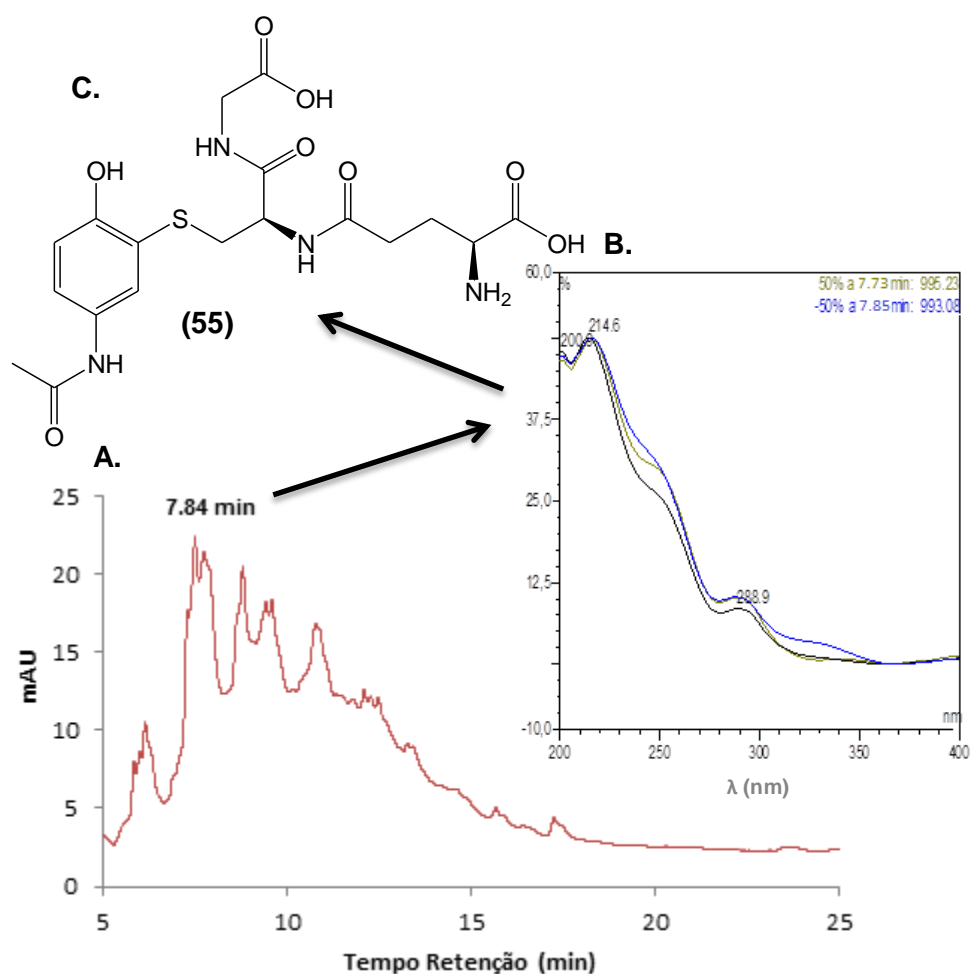


Figura 2.11 – Excerto do cromatograma obtido por HPLC-DAD da mistura reaccional (APAP, GSH e TvL), ao fim de 2h de reacção (A), Perfil de UV do aducto 55 (B) e Estrutura molecular do aducto GSH-APAP (C).

A análise por LC-ESI-MS/MS indicou a formação dos aductos NAC-APAP e GSH-APAP com um valor de m/z de 313 e 457, referente às moléculas protonadas, respectivamente. Os aductos foram formados por adição de Michael, através do átomo de enxofre do bionucleófilo à espécie reactiva quinona-imina (NAPQI), o que indica que a TvL consegue formar a quinona-imina a partir do APAP.

O sinal com m/z 313 correspondente à molécula protonada do aducto 56 deu origem à fragmentação apresentada na Figura 2.12. Pela análise ao espectro de MS/MS é possível observar a formação de 4 sinais maioritários, nomeadamente a m/z 295, que correspondente à perda de H_2O , a m/z 271 que está associado a um fragmento formado pela perda do grupo acetilo. O m/z 184, que corresponde à perda de um $C_5H_7O_3N$ e ainda a m/z 208 que representa o sinal maioritário e está associado novamente à perda de C_2H_2O .⁷⁹ Esta informação é complementada com as estruturas obtidas em cada fragmentação, apresentadas na Figura 2.13.

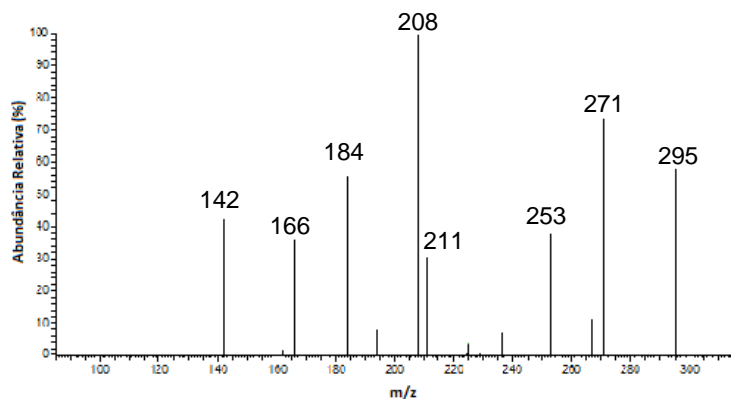


Figura 2.12 – Espectro de MS/MS obtido por LC-ESI(+)-MS do íon com m/z 313 correspondente à molécula protonada do aducto NAC-APAP.

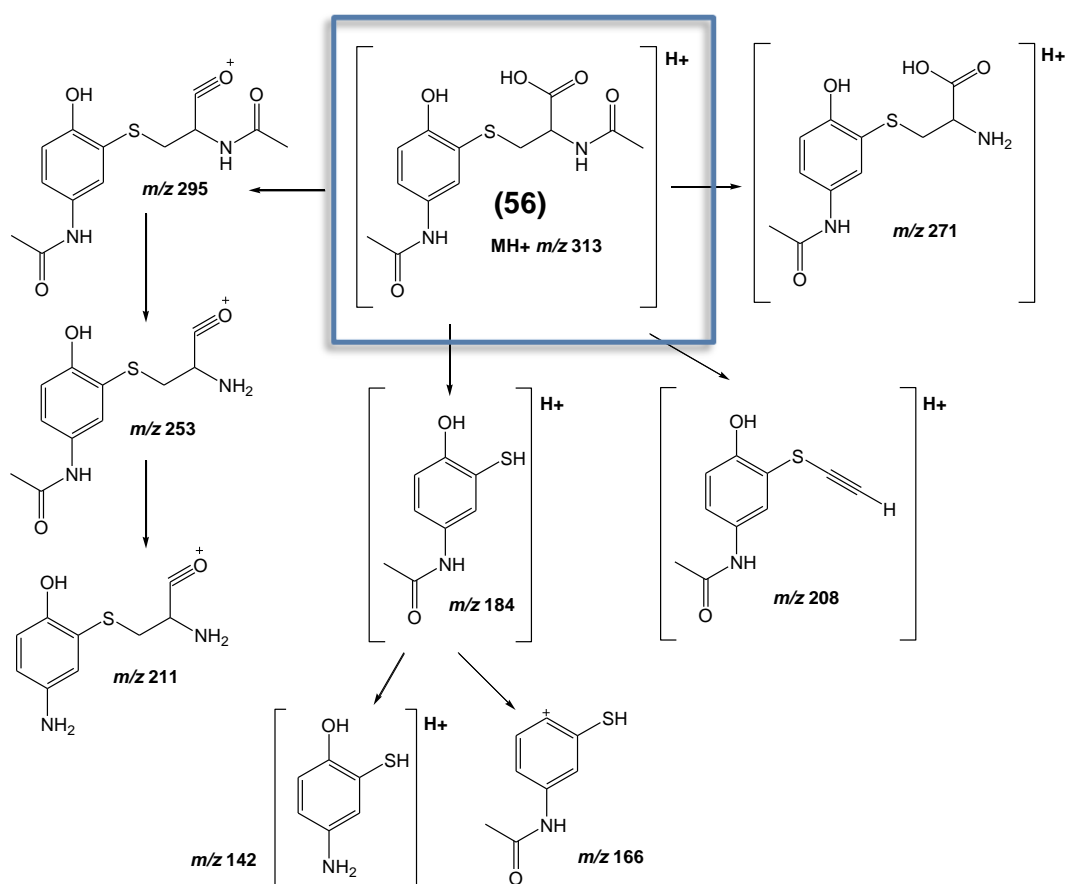


Figura 2.13 – Esquema da fragmentação por ESI (+)-MS/MS proposta para o aducto NAC-APAP a partir da molécula protonada a m/z 313.

No espectro de MS/MS do íon a m/z 457 correspondente à molécula protonada do aducto 55 é possível identificar os fragmentos com m/z 439, 382, 328, 311 e 253 formados pelas perdas de H_2O , do resíduo aminoacídico glicina, do glutamato, da perda de $-OH$ e ainda da saída do glutamato proveniente do fragmento 382, de acordo com o reportado na literatura.⁸⁰ Esta informação encontra-se apresentada no espectro

de MS/MS da Figura 2.14 e a respectiva proposta para a fragmentação no esquema da Figura 2.15.

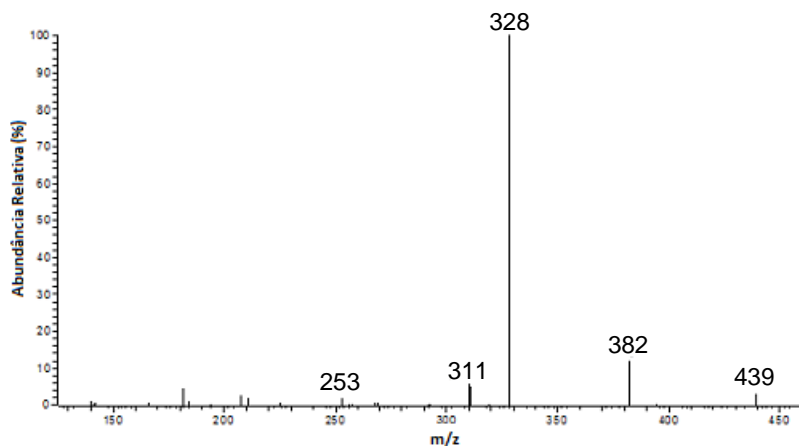


Figura 2.14 – Espectro de MS/MS obtido por LC-ESI(+)-MS do íão com m/z 457 correspondente à molécula protonada do aducto 55.

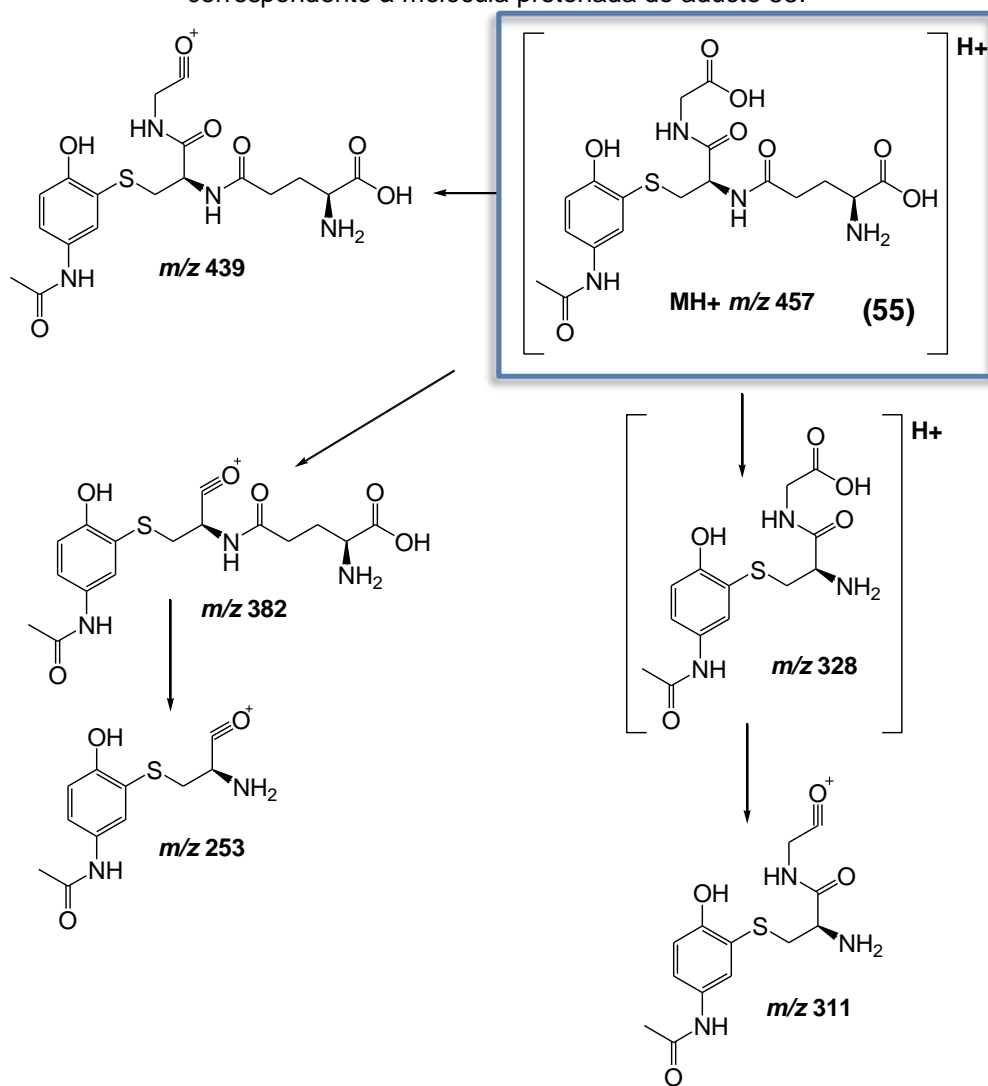
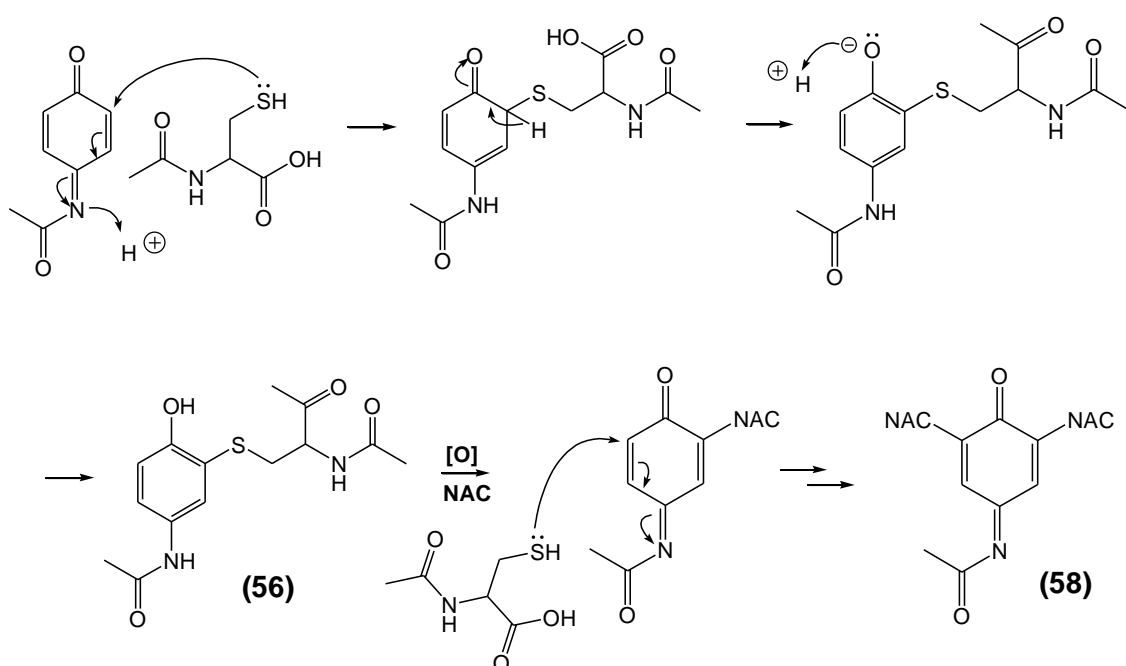


Figura 2.15 – Esquema da fragmentação por ESI(+)-MS/MS proposta para o aducto GSH-APAP a partir da molécula protonada a m/z 457.

Os aductos 55 e 56 podem ainda ser oxidados, por formação de outra quinona-imina que é uma espécie electrófila. Assim na presença de um excesso de bionucleófilo de enxofre, há a possibilidade de ocorrer um segundo ataque nucleófilo à quinona-imina, sendo adicionada uma segunda molécula de bionucleófilo à quinona-imina do aducto formada a partir dos aductos 55 e 56, Esquema 2.2. Os produtos formados foram designados por diNAC-APAP e diGSH-APAP (58 e 59, Figuras 2.16 e 2.17). A molécula diNAC-APAP (58) apresenta para a molécula protonada um ião com m/z 472, onde são visíveis na Figura 2.16 os sinais referentes à quebra da ligação C-S, enquanto que a diGSH-APAP apresenta para a molécula desprotonada um ião com m/z 760, que se encontra identificado na Figura 2.17.

O aducto 56 foi obtido através da reacção com o NAPQI, resultante da oxidação do paracetamol, por adição de Michael da NAC. O aducto 55 terá um mecanismo idêntico ao aducto 56, mas utilizando a GSH como bionucleófilo. No Esquema 2.2 encontra-se uma via para a obtenção do aducto 58 a partir do produto de oxidação do aducto 56.



Esquema 2.2 – Mecanismo proposto para a formação do aducto NAC-APAP (56) e do diNAC-APAP (58).

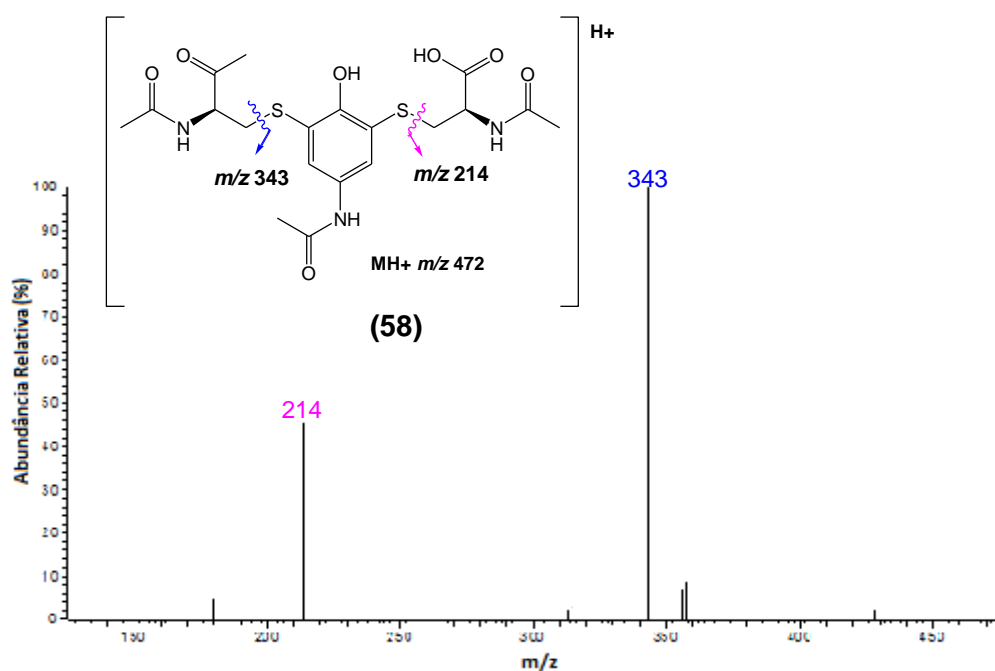


Figura 2.16 – Espectro de MS/MS obtido por LC-ESI(+)-MS do ião a m/z 472 correspondente à molécula protonada do diNAC-APAP (58).

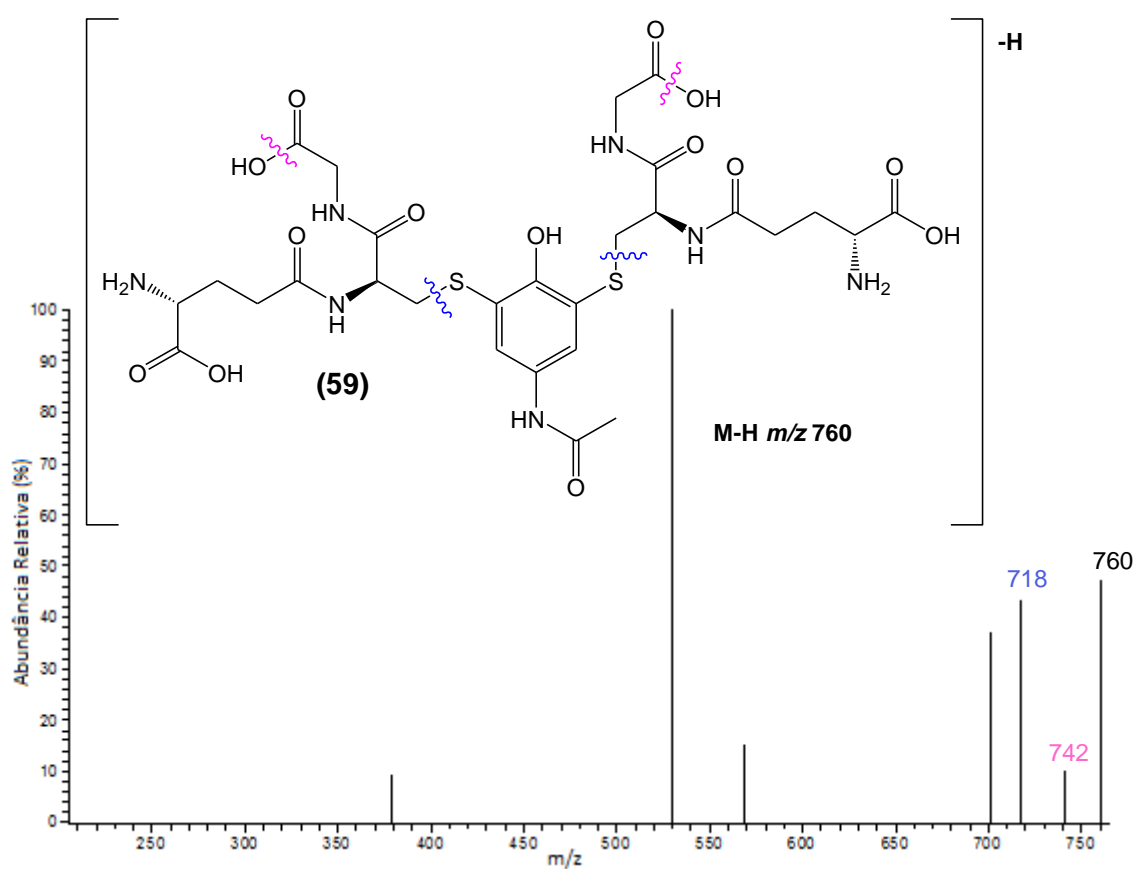


Figura 2.17 – Espectro de MS/MS obtido por LC-ESI(-)-MS do ião a m/z 760 correspondente à molécula desprotonada do diGSH-APAP (59).

2.3.2. Nevirapina e Trimetoprim

A NVP e o TMP foram submetidos aos mesmos estudos introdutórios realizados para o APAP, nomeadamente identificar o tr e obter informações acerca do perfil de UV-Vis destes fármacos. O sinal referente à NVP encontra-se na Figura 2.18 e o sinal referente ao TMP na Figura 2.19.

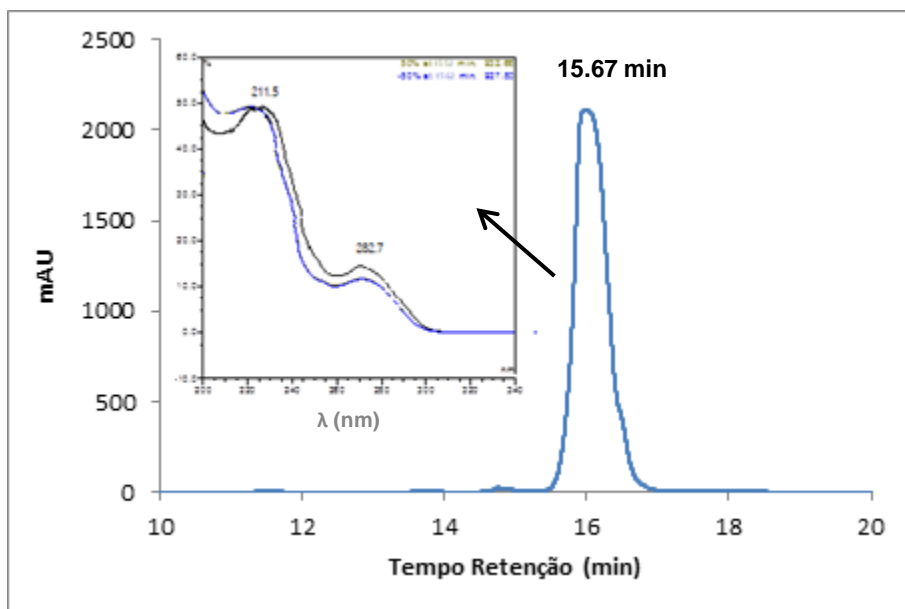


Figura 2.18 – Cromatograma obtido para o padrão da NVP em tampão BR pH 6 e o respectivo perfil de UV-Vis.

Os dados obtidos deram indicação de que a NVP tem um tr de 15.67 minutos e apresenta uma absorvância máxima de UV de 211.5 e 282.7 nm.

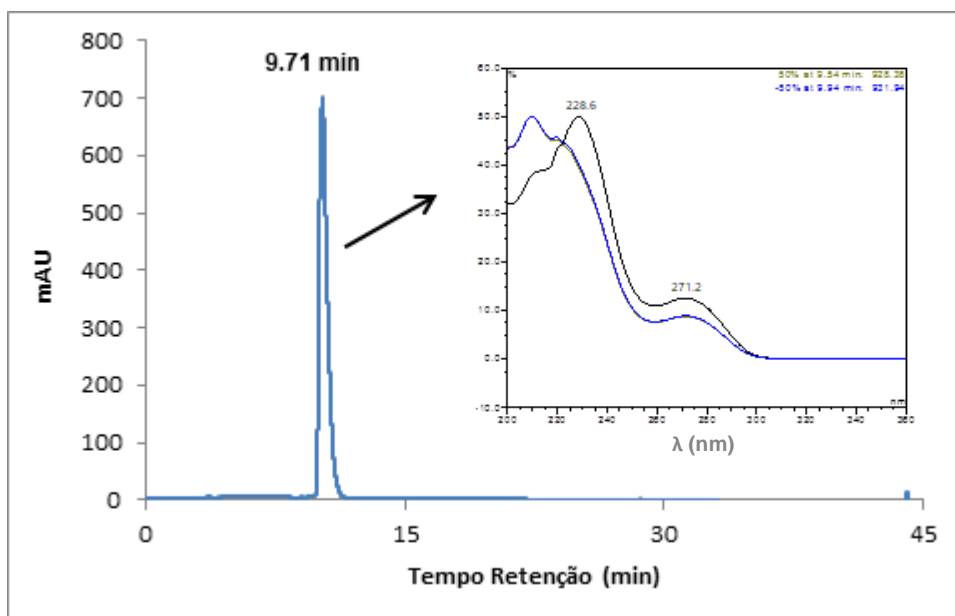
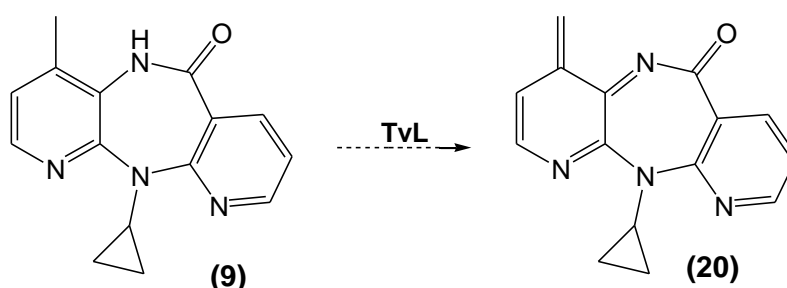


Figura 2.19 – Cromatograma obtido para o padrão do TMP em tampão BR pH 6 e o respectivo perfil de UV-Vis.

A partir dos dados apresentados verificou-se que o TMP tem um tr de 9.71 minutos e apresenta uma absorvância máxima de UV de 228.6 e 271.2 nm.

A NVP tem sido associada a várias respostas tóxicas pela formação de metabolitos reactivos. De forma semelhante ao APAP, a NVP poderá ser directamente metabolizada pelo CYP, resultando na espécie quinóide (20, Esquema 2.3). Esta espécie é electrófila, como tal poderá ligar-se covalentemente a proteínas formando aductos tóxicos.⁴⁵ Pretendia-se no estudo da NVP mimetizar a reacção do CYP utilizando a TvL como biocatalisador (Esquema 2.3).



Esquema 2.3 – Reacção de oxidação da NVP através da TvL, originando a quinona *methide*.

As reacções da NVP foram realizadas para um volume de 2 mL, com soluções stock de fármaco preparadas em DMSO, de forma a garantir a sua solubilidade. A percentagem de DMSO utilizada nestas reacções foi sempre 7 %, garantindo a solubilidade do fármaco e não comprometendo a actividade da enzima. Pretendia-se nas reacções de oxidação da NVP, mediadas pela TvL, avaliar a capacidade desta enzima em oxidar a NVP ao intermediário reactivo, quinona-imina *methide*, por ser associada a respostas tóxicas induzidas por este fármaco. A análise dos resultados foi efectuada por HPLC-DAD utilizando as condições experimentais apresentadas na Tabela 2.7.

Tabela 2.7 – Condições experimentais testadas para a NVP, a 37 °C, em tampão BR pH 6, com 7% de DMSO no meio reaccional.

<i>Ensaio</i>	<i>[NVP] (mM)</i>	<i>[TvL]</i>	<i>Tempo (h)</i>
1	10	4	3
2	10	400	96

No primeiro ensaio, o objectivo era observar o consumo do fármaco ao longo do tempo levando à formação da quinona-imina *methide*. Contudo nunca foi possível

observar o consumo total da NVP, observando-se uma oscilação do seu sinal que se deve à precipitação com o tempo do mesmo no meio reaccional usado (Figura 2.20).

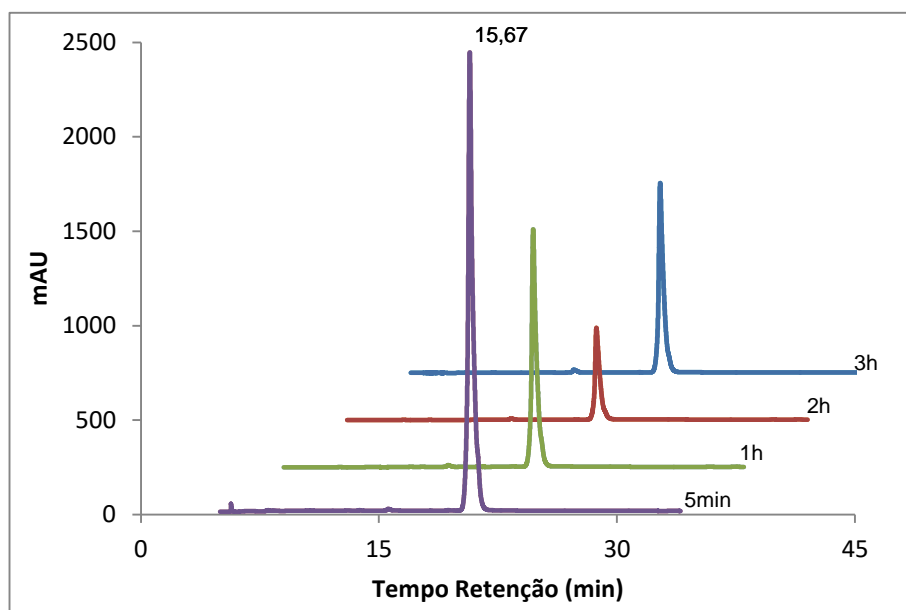


Figura 2.20 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos na reacção da NVP (10 mM) na presença de TvL (4 U).

No ensaio 2 (Tabela 2.7), utilizou-se 400 U de TvL e prolongou-se o tempo de reacção para 96 h, de forma a perceber se a NVP se consumia e formava a quinona-imina *methide* (Figura 2.21).

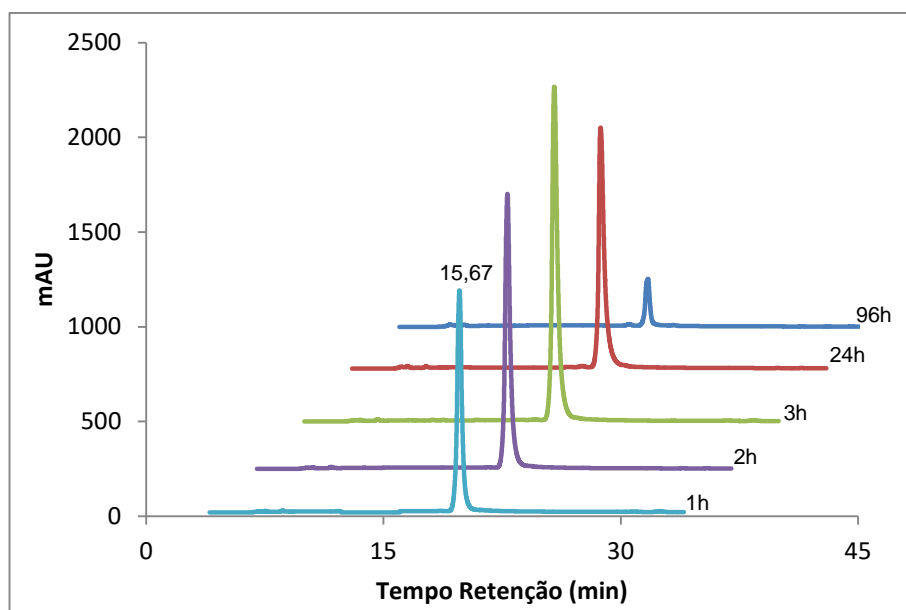
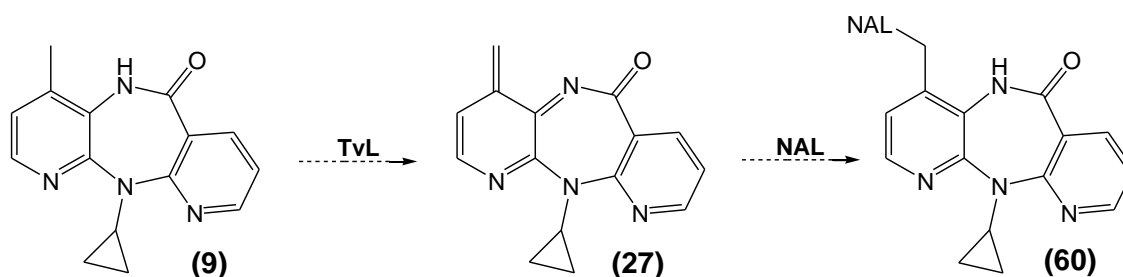


Figura 2.21 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos na reacção da NVP (10 mM) na presença de TvL (400 U).

Neste caso, verificou-se que ao utilizar 400 U de TvL a reacção não é mais rápida nem conduz ao consumo total do fármaco, observando-se de forma idêntica a oscilação do sinal da NVP, levando mais uma vez a crer que o desaparecimento da NVP se deve à precipitação e não à sua transformação.

Prosseguiram-se com as reacções da NVP mediadas na presença de bionucleófilos, NAC e *N*-acetil-lisina (NAL), para formarem possíveis aductos NAC-NVP e/ou NAL-NVP (60, Esquema 2.4).



Esquema 2.4 - Reacção de oxidação da NVP mediada pela TvL, originando a quinona *methide* (27), que na presença de NAL dá origem ao aducto NAL-NVP (60).

Foram realizados vários ensaios com a NVP, onde se testou duas concentrações de enzima, dois bionucleófilos e o tempo ao qual o bionucleófilo NAC é adicionado (Tabela 2.8).

Tabela 2.8 – Condições experimentais testadas para a NVP na presença de NAC e NAL como bionucleófilos, num volume de 2 mL, a 37 °C, em tampão BR pH 6, com 7% de DMSO no meio reaccional.

Ensaio	[NVP] (mM)	[TvL] (U)	Bionucleófilo			Tempo (h)
			Concentração (mM)	Tipo	Adição	
1	10	4	25	NAC	Directa	4
2	10	4	25	NAC	1h depois	24
3	10	400	30	NAL	Directa	96

Na Figura 2.22 encontra-se ilustrada a reacção da NVP mediada pela TvL, na presença de NAC, conforme o ensaio 1.

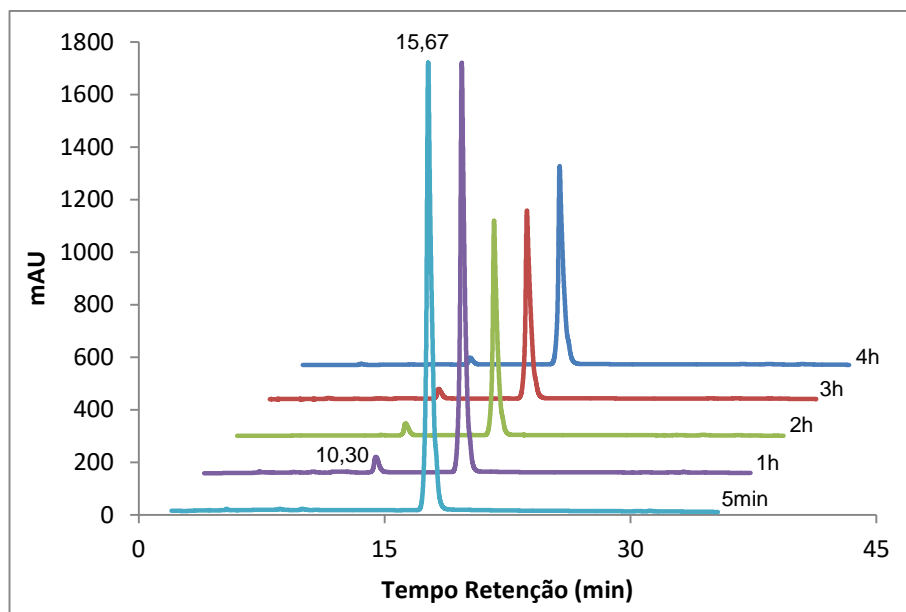


Figura 2.22 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos na reacção da NVP com a TvL, na presença de NAC, relativamente ao ensaio 1, até 4h de reacção.

Nesta reacção observou-se novamente a diminuição da intensidade do sinal da NVP com o tempo, o que se deve à sua precipitação no meio reaccional confirmada pela formação de um sólido ao longo do tempo. Para além disso também se observa a presença de um produto com tr 10.30 min. Este produto foi identificado em HPLC-DAD como sendo o sinal referente à NAC.

Em relação à reacção onde se estudou a adição da NAC, 1h depois do início da reacção, não foram observadas alterações no cromatograma obtido por HPLC-DAD. O tempo de reacção foi de 24h numa tentativa de encontrar a formação do aducto com a NAC. Numa segunda aproximação, alterou-se o bionucleófilo para a NAL e aumentou-se a concentração de TvL para 400 U (Figura 2.23).

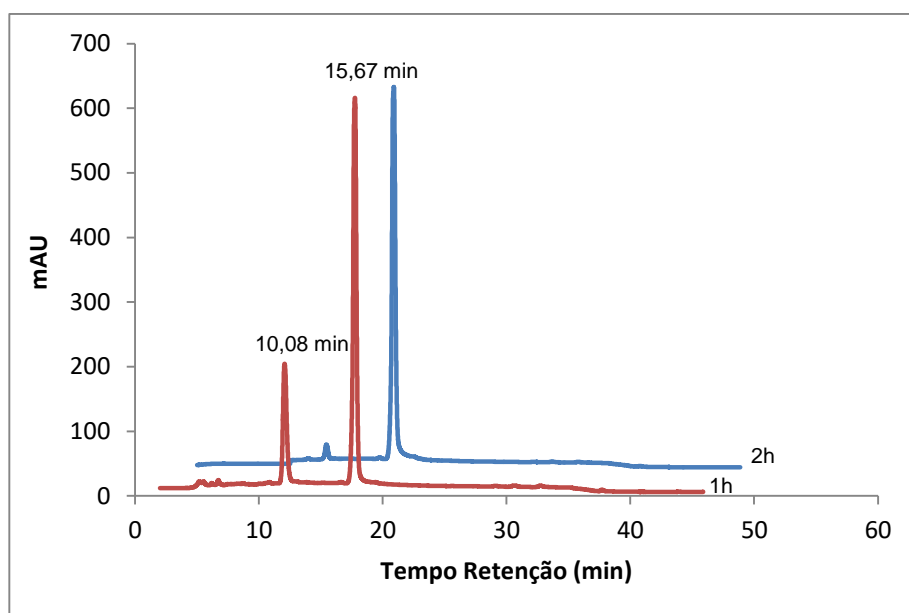


Figura 2.23 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos até 2h de reacção da NVP com a TvL, na presença de NAL, relativamente ao ensaio 3.

Ao utilizar a NAL como bionucleófilo também não foram encontradas evidências da formação do aducto NVP-NAL. Neste caso deu-se ênfase ao facto da NAL diminuir o seu sinal após 2h de reacção sem ter ocorrido consumo do fármaco. Dessa forma investigou-se o conteúdo do precipitado no HPLC-DAD (Figura 2.24).

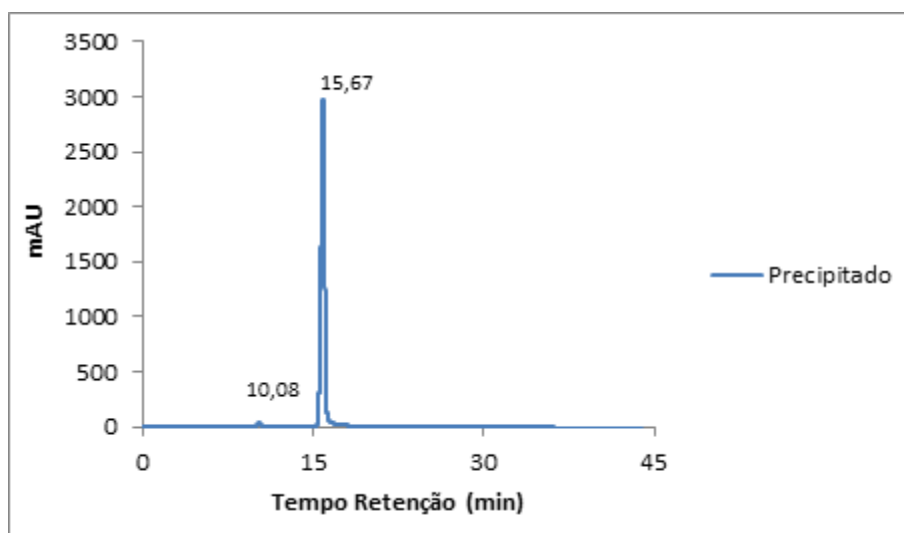
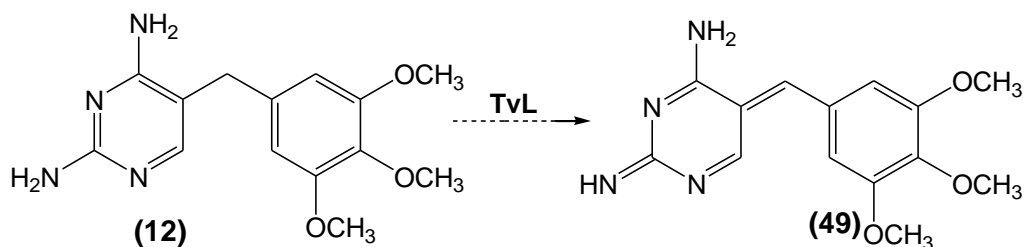


Figura 2.24 – Cromatograma obtido para o precipitado obtido na reacção da NVP com a TvL, na presença de NAL, após 2h de reacção.

A partir da análise realizada ao precipitado (Figura 2.24) foi possível observar que no precipitado encontra-se o fármaco em grande quantidade e ainda a NAL.

Assim concluiu-se que a diminuição de intensidade do sinal referente à NAL está relacionada com a sua precipitação.

No caso do Trimetoprim, o CYP transforma-o no metabolito reactivo quinona-imina *methide*. Como tal, pretendia-se obter por via enzimática a formação desse intermediário electrófilo através da oxidação do fármaco mediado pela TvL (Esquema 2.5).



Esquema 2.5 - Reacção de oxidação, mediada pela TvL, do TMP ao intermediário quinona-imina *methide* (49).

Foram utilizadas duas concentrações de enzima de forma a avaliar a sua capacidade sobre a oxidação deste fármaco. A análise dos resultados foi efectuada por HPLC-DAD utilizando as condições experimentais apresentadas na Tabela 2.9.

Tabela 2.9 – Condições experimentais testadas para o TMP, num volume de 2 mL, a 37 °C, em tampão BR pH 6, com 7% de DMSO no meio reaccional.

<i>Ensaio</i>	<i>[TMP] (mM)</i>	<i>[TvL]</i>	<i>Tempo (h)</i>
1	10	4	24
2	10	400	96

A reacção de oxidação do TMP mediada pela TvL com 4 U (Figura 2.25) mostra que após 24h de reacção apenas existe o sinal do material de partida, que oscila com o decorrer do tempo.

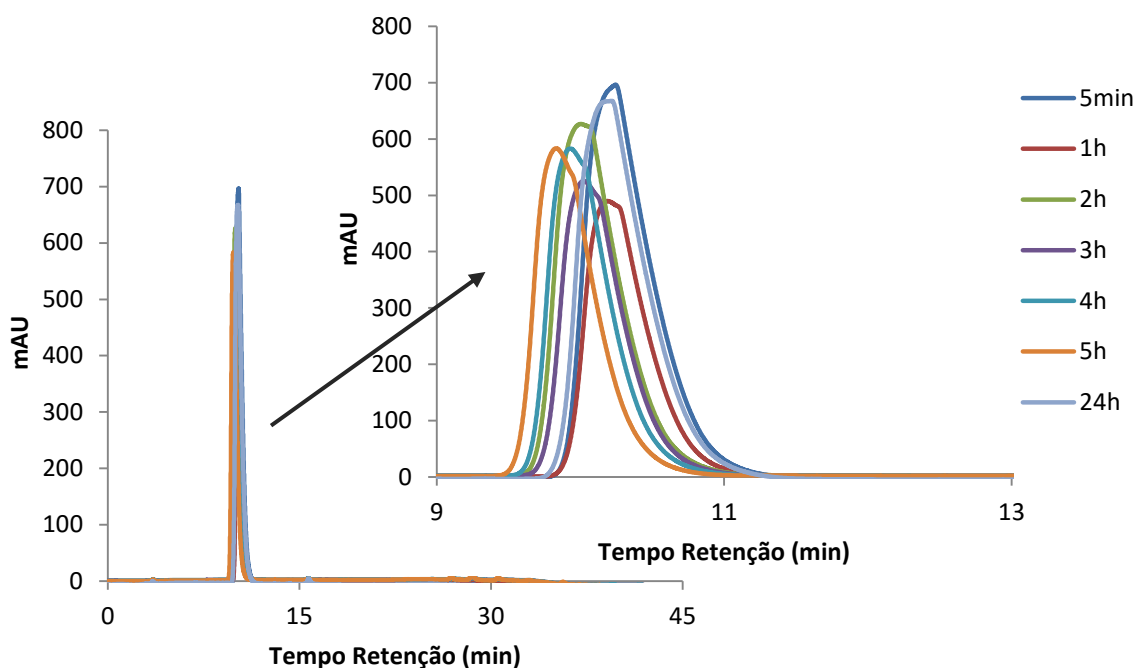


Figura 2.25 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos na reacção do TMP com a TvL, ensaio 1, até 24h de reacção.

O facto de só existir no cromatograma o sinal do TMP significa que a TvL não oxidou o TMP à quinona-imina *methide*. Além disso, também se verificou que a intensidade deste sinal oscila com o tempo, o que significa que o fármaco precipita dada a sua insolubilidade no tampão BR pH 6, utilizado como solvente nestas reacções. Apesar disso, ainda se fez reagir o TMP com dois bionucleófilos (NAC e NAL), com o objectivo de se observar a formação do aducto NAC-TMP, (Esquema 1.10, Página 23) ou NAL-TMP.

Os ensaios testados encontram-se apresentados na Tabela 2.10, os quais foram monitorizados por HPLC-DAD com o objectivo de monitorizar o consumo do fármaco e a conseqüente formação dos aductos.

Tabela 2.10 – Condições experimentais testadas para o TMP na presença de NAC e NAL como bionucleófilos, num volume de 2 mL, a 37 °C, em tampão BR pH 6, com 7% de DMSO no meio reaccional.

Ensaio	[TMP] (mM)	[TvL] (U)	Bionucleófilo			Tempo (h)
			Concentração (mM)	Tipo	Adição	
1	10	4	25	NAC	Directa	24
2	10	4	25	NAC	1h depois	24
3	10	400	30	NAL	Directa	96

Para o TMP também se estudou a adição da NAC em tempos diferentes, isto é, adicionar a NAC ao mesmo tempo que o TMP e a TvL e adicionar a NAC 1h depois do início da reacção (Figura 2.26). Para ambos os casos a reacção foi de 24h, contudo o consumo do fármaco não foi observado.

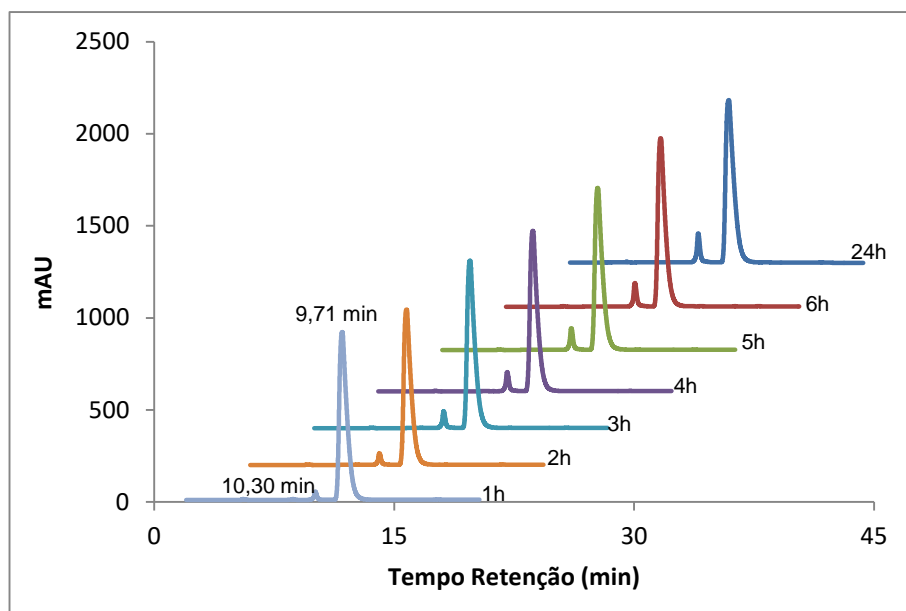


Figura 2.26 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos na reacção do TMP com a TvL, na presença de NAC, ensaio 1, até 24h de reacção.

Neste caso não se observou a oscilação da intensidade do sinal do TMP, contudo este não conduz à formação dos aductos com a NAC, uma vez que se observa tanto o sinal da NAC como o sinal do TMP que permanecem praticamente com a mesma intensidade após 24h de reacção. Isto significa uma vez mais que o TMP não foi oxidado por esta enzima. Como tal, fez-se aumentar a concentração de enzima para 400 U e também se alterou o bionucleófilo em estudo para a NAL, podendo estes factores estarem relacionados com a ausência dos aductos (Figura 2.27).

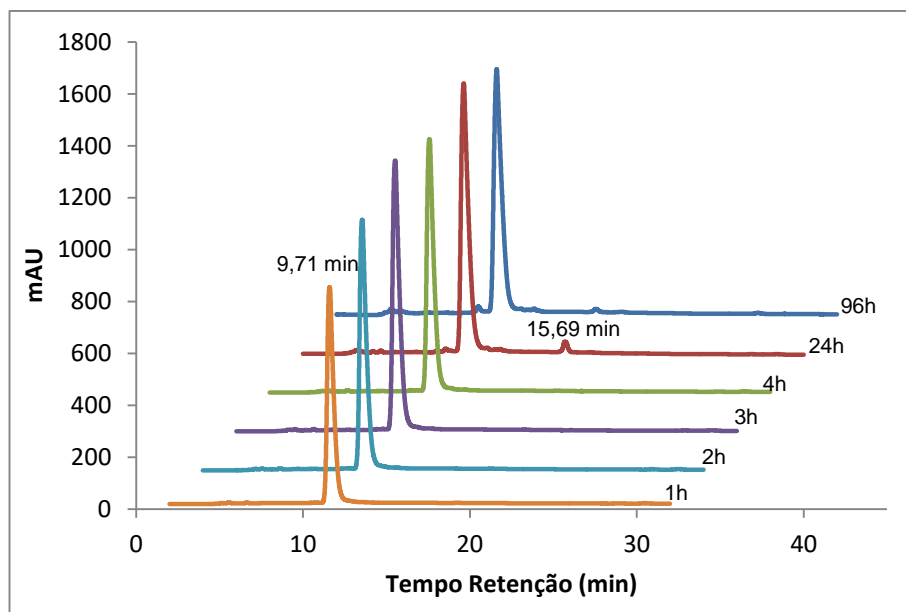


Figura 2.27 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos por HPLC da mistura reaccional com o TMP, nas condições apresentadas para o ensaio 3, até 96h.

O aumento da concentração de TvL e a alteração do bionucleófilo para NAL não provocaram grandes modificações na intensidade do sinal do TMP, contudo esta reacção promoveu a formação de um produto com tr 15.69 min, que dada a pequena percentagem formada não foi posteriormente analisada.

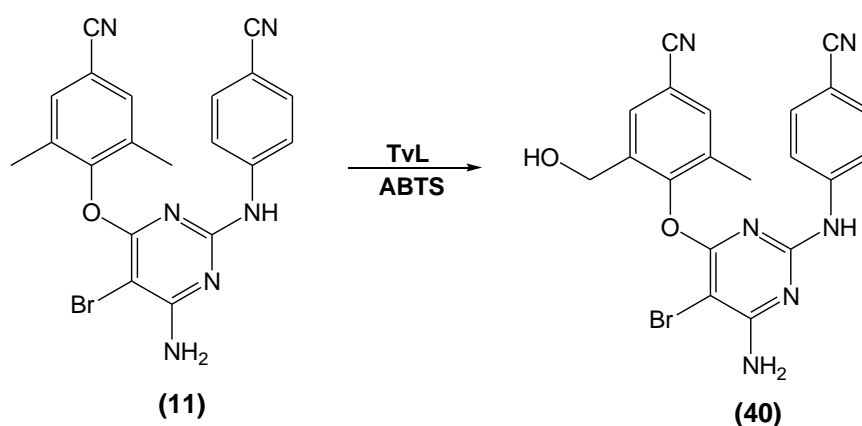
Muito embora não se tenha feito estudos de avaliação do comportamento redox dos fármacos, uma possibilidade para não ocorrer oxidação quer do TMP quer da NVP pode ser o potencial redox dos fármacos ser superior ao da enzima e como tal a TvL não ter a capacidade de realizar a reacção de oxidação. Outra explicação pode estar relacionada com a solubilidade dos fármacos no Tampão BR, dada a oscilação da intensidade do sinal do material de partida observada nos cromatogramas. A insolubilidade relativa dos fármacos na solução pode também contribuir para a dificuldade na sua oxidação.

2.4. Oxidação enzimática de fármacos a metabolitos hidróxi-benzílicos

2.4.1. Etravirina

No processo metabólico da ETV formam-se metabolitos hidróxi-benzílicos. Embora ainda não sejam conhecidos os mecanismos envolvidos na toxicidade deste fármaco, pensa-se que a hidroxilação nesta posição será o principal factor para a sua toxicidade. Os autores Chirivì *et al*⁸¹ relataram a oxidação de um alcalóide *ergot* na

posição C4 (benzílica), por utilização da enzima TvL, na presença de um mediador redox TEMPO. Assim sendo, testou-se a possibilidade de utilizar a TvL e o ABTS para a obtenção dos metabolitos de Fase I da ETV, uma vez que os resultados apresentados em 2.1 mostraram que o ABTS pode ser utilizado como mediador nas reacções de oxidação catalisadas pela TvL. No Esquema 2.6 encontra-se a estratégia usada para a formação do metabolito mono-hidroxilado envolvendo a oxidação da ETV com o sistema TvL/ABTS.



Esquema 2.6 – Reacção de oxidação da Etravirina com o sistema TvL/ABTS, originando o metabolito mono-hidroxilado (40).

Antes de serem iniciados os estudos enzimáticos, fez-se um pequeno estudo ao fármaco de forma a obter o seu tempo de retenção e o seu perfil de UV-Vis (Figura 2.28). Estes dados são importantes no sentido de avaliar, por exemplo, se o fármaco se consome nas reacções e promove a formação de produtos.

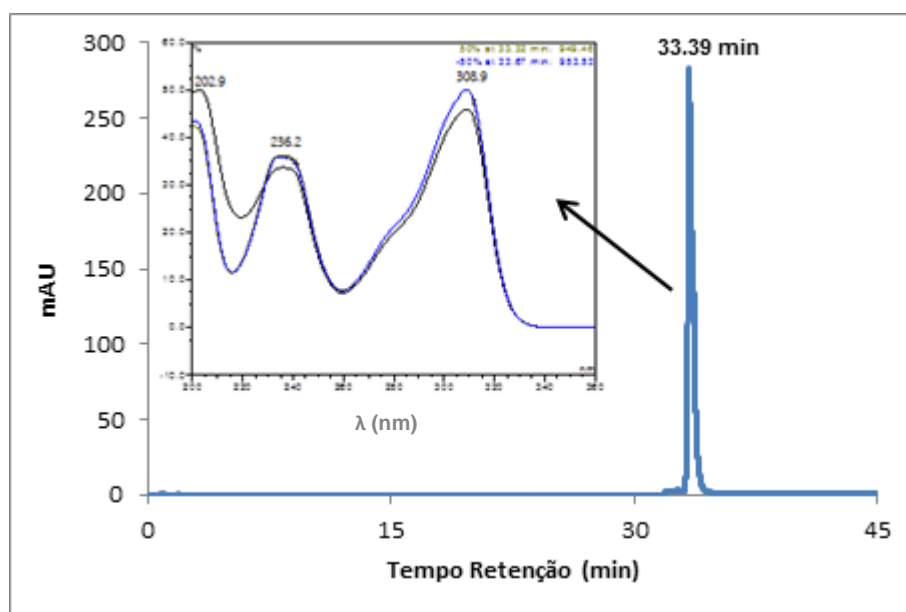


Figura 2.28 – Cromatograma obtido para o padrão da ETV em tampão BR pH 6 e o respectivo perfil de UV-Vis.

A ETV ($t_r = 33.39$ min) apresenta uma absorvância máxima de UV de 202.9, 236.2 e 308.9 nm. Com estes dados prosseguiu-se com as reacções enzimáticas deste fármaco, utilizando 5 mM de ETV, 2.5 mM de ABTS e 64 U de TvL. Os ensaios foram realizados numa placa de 96 poços, sendo monitorizados por HPLC-DAD até 24h. Na análise dos cromatogramas (Figura 2.29) destaca-se a formação de um produto P1 com t_r 13.60 min.

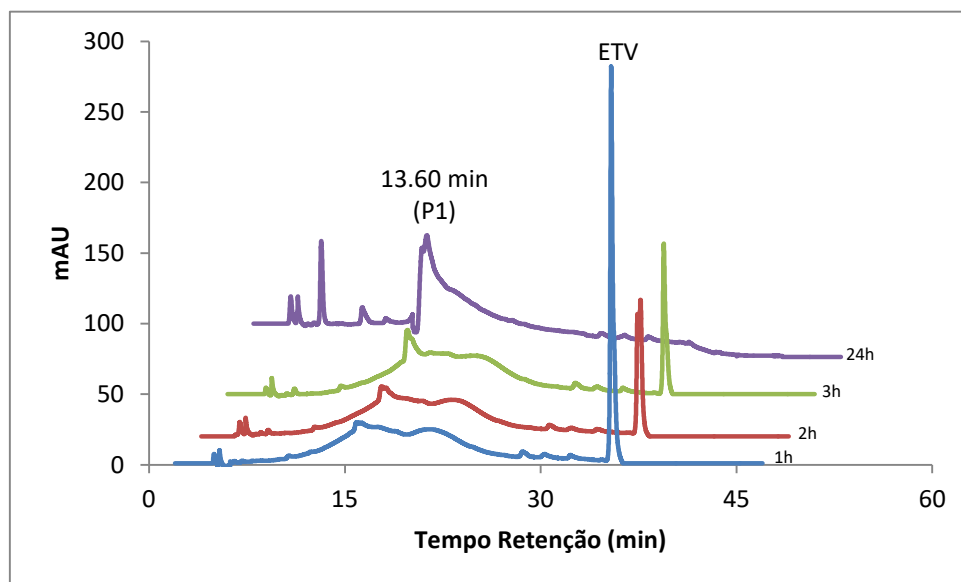


Figura 2.29 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos na reacção de oxidação da ETV com o sistema TvL/ABTS, na presença de TvL ($v = 0.2$ mL).

Nesta reacção foi possível observar o consumo total da ETV após 24h de reacção e a consequente formação do P1. Através da técnica de espectrometria de alta resolução, utilizando um aparelho de alta resolução Q-TOF e uma fonte de *electrospray* em modo positivo, identificou-se o P1 como o aldeído obtido a partir da oxidação do aducto mono-hidroxilado (40, Esquema 2.6). No entanto, apesar do aldeído ser o produto maioritário na reacção de oxidação da ETV com o sistema TvL/ABTS, foi também possível a detecção do produto monohidroxilado (40). Esta via enzimática foi comparada com os cromatogramas obtidos após incubações do fármaco na fracção S9 mix de fígado humano, realizadas em estudos anteriores⁸². Desta sobreposição (Figura 2.30) foi possível observar que havia um produto em comum, correspondente ao metabolito hidróxi-benzílico cuja molécula protonada apresenta um sinal no espectro de massa a m/z 451.0503.

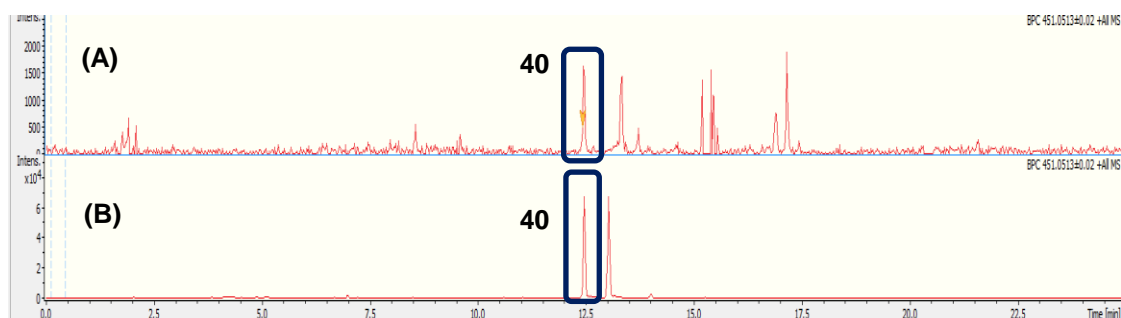


Figura 2.30 – Sobreposição dos cromatogramas iônicos extraídos a m/z 451.0503 obtidos em: **(A)** Reacção de oxidação da ETV com o sistema TvL/ABTS, na após 24 h de reacção; **(B)** Incubações da ETV na fracção S9 mix de fígado humano.

A molécula protonada do metabolito hidróxi-benzílico, apresenta no espectro de MS/MS (Figura 2.31) a formação de um fragmento maioritário, a m/z 353.1140, que correspondente à perda de Br e de OH, que provém do pico a m/z 433.0423 associado à perda do grupo hidroxilo. O ião precursor (a m/z 451.0503) apresenta um erro de 2.22 ppm, em relação ao valor calculado o que é considerado admissível na identificação inequívoca do mesmo. Todos os fragmentos obtidos apresentam erros inferiores a 2 ppm, o que corrobora a identificação a massa.

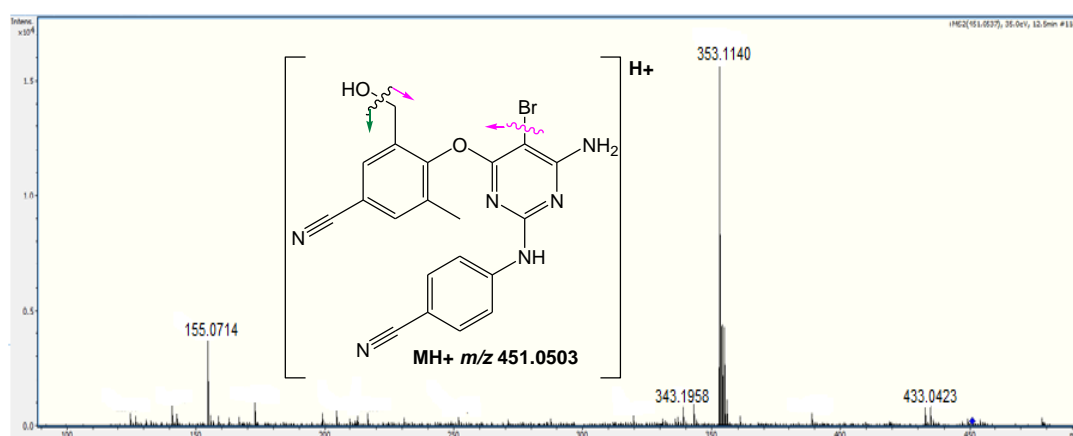


Figura 2.31 – Espectro de MS/MS obtido por ESI (+) do ião a m/z 451.0503 correspondente à molécula protonada do metabolito hidróxi-benzílico.

Na reacção de oxidação da ETV com a TvL o produto maioritário foi o produto de oxidação do metabolito monohidroxi-ETV, o aldeído (P1) cuja molécula protonada apresenta um sinal no espectro de MS/MS (Figura 2.32) a m/z 449.0340, que não se forma nas incubações do fármaco na fracção S9 mix do fígado humano.

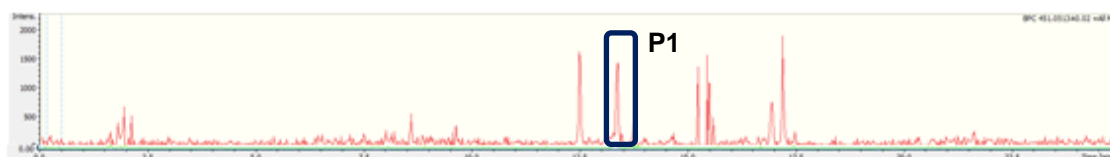


Figura 2.32– Cromatograma iônico extraído a m/z 449.0340 obtido na reacção de oxidação da ETV com o sistema TvL/ABTS, após 24 h de reacção.

O aldeído obtido na oxidação da ETV apresenta um valor de m/z de 449.0340 ± 3 ppm para a molécula protonada (Figura 2.33), cuja fragmentação por MS/MS deu origem à formação de dois fragmentos relevantes, nomeadamente a m/z 369.1098 que indica a perda do Br e a m/z 353.1140 que indica a perda do aldeído, como indicado na Figura 2.34. De referir que tanto o ião precursor como os respectivos fragmentos foram identificados com um erro inferior a 4 ppm.

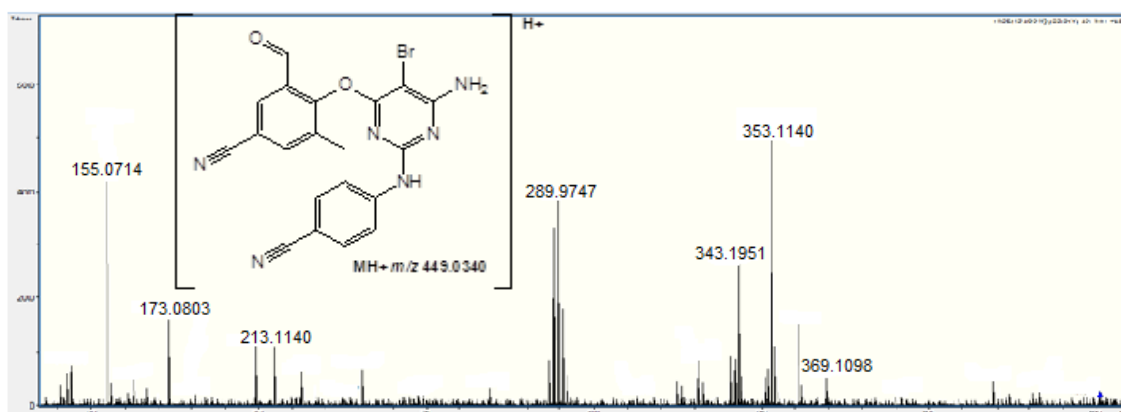


Figura 2.33 – Espectro de MS/MS obtido por ESI (+) do ião com m/z 449.0340 correspondente à molécula protonada do aldeído.

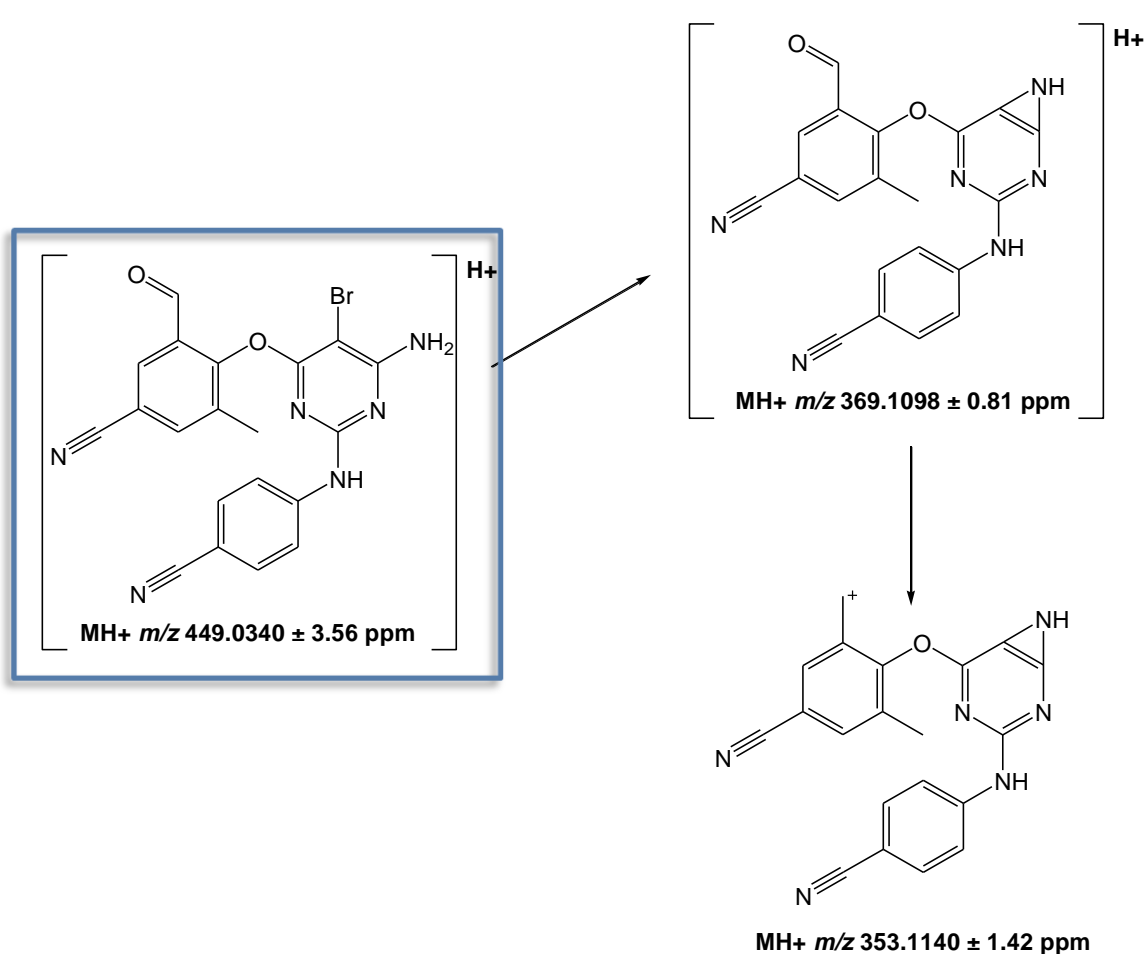


Figura 2.34 – Esquema da fragmentação proposta por ESI(+)-MS/MS para o aldeído a partir da molécula protonada a m/z 449.0340.

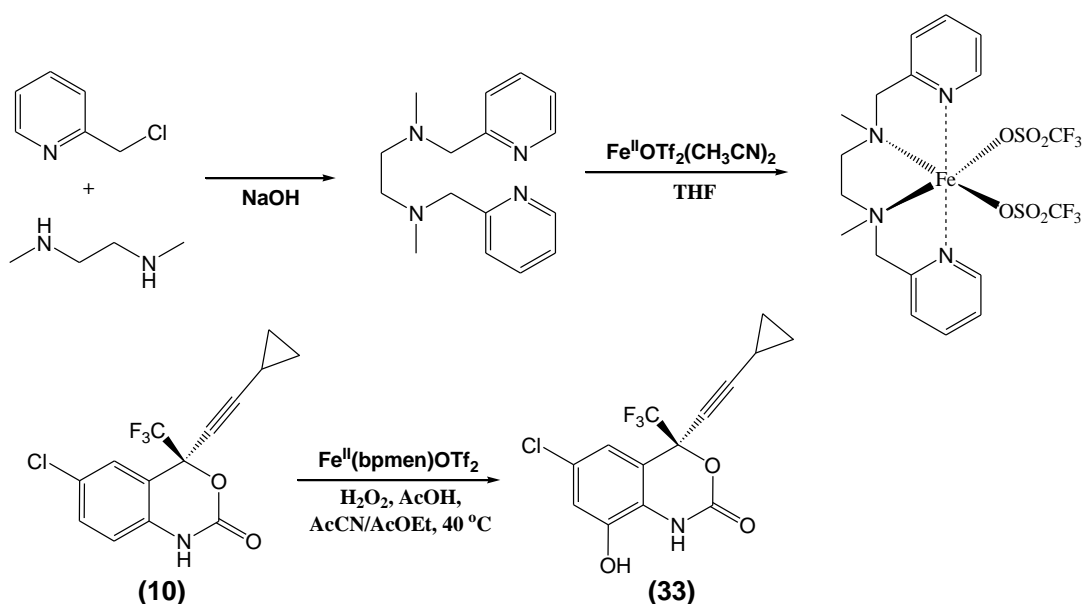
Com o objectivo de isolar os produtos desta reacção poder-se-á fazer um *scale-up*, nas mesmas condições de ETV, ABTS e TvL, visto que esta parece ser uma via possível de obter o derivado mono-hidroxi-ETV (40). Uma vez que não se encontra disponível na literatura nenhuma via sintética para a formação deste derivado.

2.5. Reações de oxidação enzimática de metabolitos de Fase I a derivados quinóides

2.5.1. Oxidação do 8-OH-EFV ((S)-6-cloro-4-(ciclopropiletinil)-8-hidróxi-4-(trifluormetilo)-1,4-dihidro-2H-3,1-benzoxazina-2-ona] pela TvL

A formação do metabolito 8-OH-EFV está associada a efeitos tóxicos evidenciados no EFV, nomeadamente hepatotoxicidade e neurotoxicidade. Por esse motivo foram realizados estudos com o 8-OH-EFV e a TvL, uma vez que o EFV não apresenta na sua estrutura molecular grupos susceptíveis de oxidação pela TvL. Para tal, foi necessário sintetizar este metabolito fenólico, uma vez não se encontrava disponível no laboratório.

A síntese do 8-OH-EFV (Esquema 2.7) requer dois passos prévios, a síntese do ligando (bpmen) e a síntese do complexo $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{bpmen})(\text{OTf})_2]$, que funciona como catalisador.



Esquema 2.7 – Via sintética para a obtenção do metabolito fenólico 8-OH-EFV (33).⁵⁷

A síntese do ligando bpmen foi efectuada, de acordo com o procedimento descrito na literatura⁸³, por reacção do cloro-hidrato de 2-(clorometil) piridina com a N,N-dimetiletano-1,2-diamina em meio básico, tendo-se obtido um óleo amarelo com um rendimento de 25 %. O bpmen foi caracterizado por ^1H -RMN tendo-se obtido os mesmos valores já reportados⁸⁴. O catalisador $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{bpmen})(\text{OTf})_2]$ foi obtido por reacção do bpmen com o $[\text{Fe}(\text{CH}_3\text{CN})_2(\text{OTf})_2]$ à temperatura ambiente, durante a noite. Uma vez que é um composto paramagnético impossibilitou a atribuição total dos sinais no espectro de ^1H -RMN, no entanto os sinais obtidos estão de acordo com os

anteriormente publicados⁸⁴. O $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{bpmen})\text{OTf}_2]$ foi posteriormente utilizado como catalisador na reacção com o EFV, na presença de peróxido de hidrogénio e ácido acético, de forma a obter o 8-OH-EFV, tendo-se obtido um sólido amarelo com um rendimento de 10 %, que estava puro como se pode comprovar pelo cromatograma apresentado na Figura 2.35, que apresenta um tr e um perfil de UV distinto do apresentado pelo material de partida, EFV (Figura 2.36). Esta reacção foi monitorizada por HPLC-DAD, comparando o tr do EFV e o padrão do 8-OH-EFV, na síntese do 8-OH-EFV.

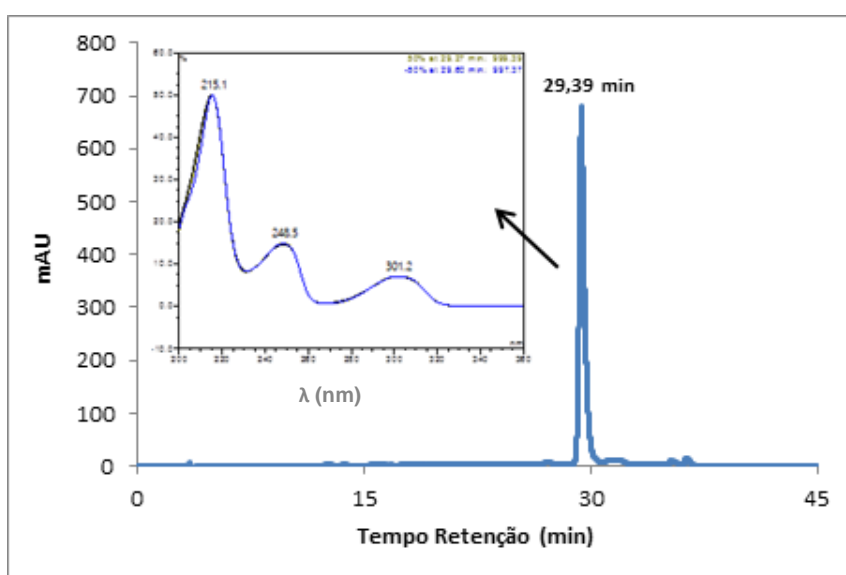


Figura 2.35 - Cromatograma obtido para o padrão do 8-OH-EFV em tampão BR pH 6 e o respectivo perfil de UV-Vis.

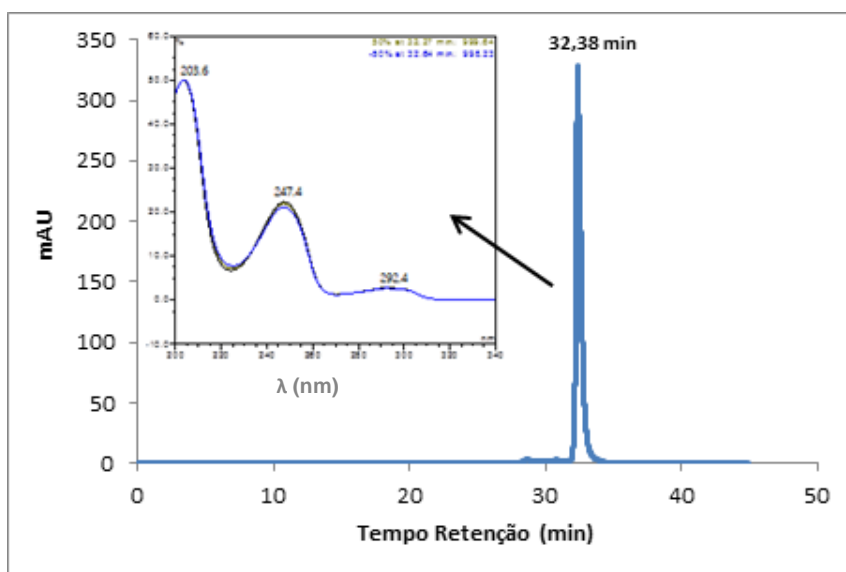


Figura 2.36 - Cromatograma obtido para o padrão do EFV em metanol e o respectivo perfil de UV-Vis.

O produto preparado foi depois utilizado nas reacções de oxidação com a TvL, que foram realizadas nas condições experimentais anteriormente optimizadas, com excepção da percentagem de DMSO que passou a ser 10%, dada a insolubilidade do metabolito. Começou-se por fazer reagir o 8-OH-EFV com a TvL, de forma a obter o intermediário quinona-imina, formado pelas vias metabólicas do CYP. No primeiro ensaio foi estudada a reacção de oxidação do 8-OH-EFV (1 mM) com a TvL (43 U) durante 24h, como mostrado na Figura 2.37.

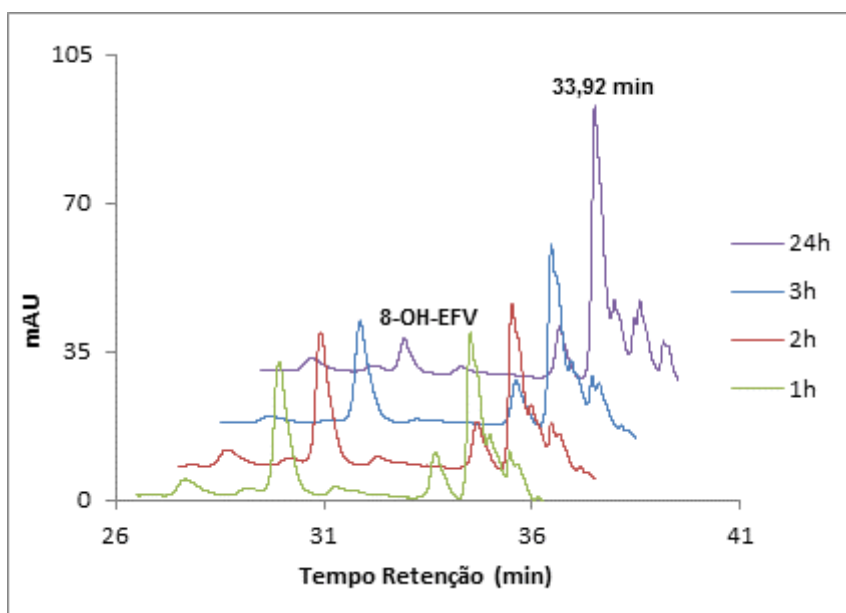


Figura 2.37 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos na reacção do 8-OH-EFV na presença de TvL, até 24h de reacção.

Os cromatogramas obtidos por HPLC-DAD indicam que o metabolito fenólico 8-OH-EFV se consumiu praticamente na sua totalidade após 24h de reacção resultando na formação de um produto com tr 33.92 minutos. Esta mistura reaccional foi analisada por LC-ESI-MS/MS não se observando sinais significativos quer em modo positivo quer em modo negativo. O produto da reacção (tr = 33.92 min) não foi posteriormente isolado e identificado. Ainda assim, uma vez que se observa o consumo do metabolito de Fase I, fez-se reagir o 8-OH-EFV com a NAC, na presença de TvL, proporcionando a reacção de Michael com a adição do bionucleófilo. A reacção foi monitorizada por HPLC-DAD utilizando como condições experimentais, 1 mM de 8-OH-EFV, 5 mM de NAC e 43 U de TvL (Figuras 2.38 e 2.39).

A monitorização da reacção até 3 horas (Figura 2.38) mostra que não houve consumo do metabolito 8-OH-EFV impossibilitando a formação do aducto com a NAC. No entanto, ao fim de 24 horas (Figura 2.39), observou-se o consumo do material de

partida, que resultou na formação de um produto com t_r 23.33 min. Mais uma vez a posterior análise por LC-ESI-MS/MS não indicou a formação de sinais relevantes, mais precisamente do aducto com a NAC. O isolamento posterior do produto final não foi efectuado.

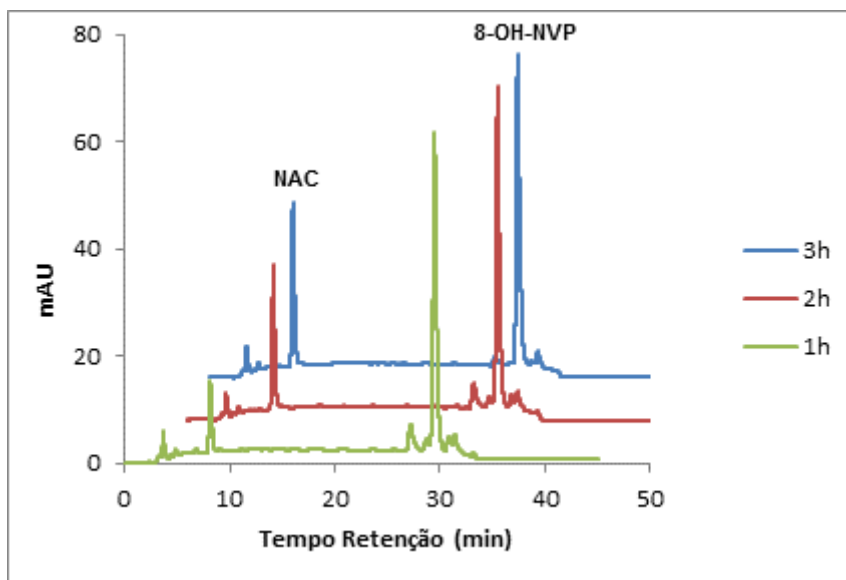


Figura 2.38 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos na reacção do 8-OH-EFV com a TvL, na presença da NAC como bio-nucleófilo até 3h de reacção.

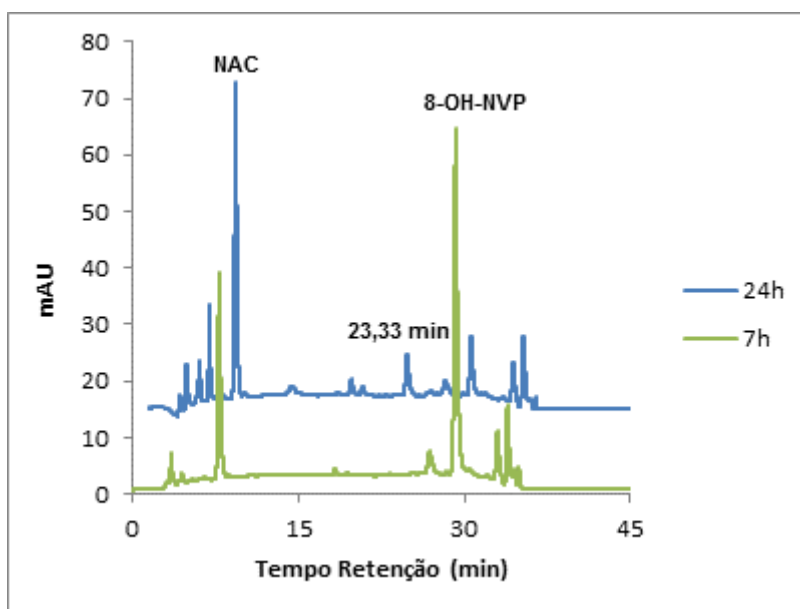
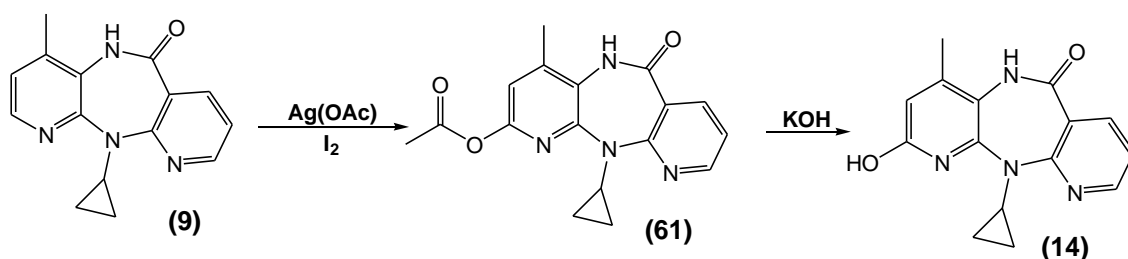


Figura 2.39 – Sobreposição dos cromatogramas obtidos na reacção do 8-OH-EFV com a TvL, na presença da NAC como bio-nucleófilo até 24h de reacção.

2.5.2. Oxidação do 2-OH-NVP (11-ciclopropil-2-hidróxi-4-metil-5,11-dihidro-6H-dipirido[3,2-b:2'3'-e][1,4]diazepina-6-ona) pela TvL

A oxidação directa do fármaco NVP pela TvL (ver 2.3.2) mostrou que este biocatalisador não é efectivo na transformação da NVP à quinona-imina *methide*, provavelmente devido à ausência de grupos facilmente oxidáveis pela enzima. Assim, optou-se pela oxidação do metabolito de Fase I, 2-OH-NVP. A síntese deste metabolito fenólico requer uma reacção de acetilação da NVP resultando o 2-acetóxi-nevirapina (61, Esquema 2.8), e posteriormente uma hidrólise a 2-hidróxi-nevirapina (2-OH-NVP, 14, Esquema 2.8).



Esquema 2.8 – Via sintética para a obtenção do metabolito fenólico 2-OH-NVP (14).

A síntese do 2-acetóxi-NVP foi efectuada, de acordo com o procedimento descrito na literatura ³², por reacção da NVP com o acetato de prata na presença de iodo, tendo-se obtido um óleo amarelo com um rendimento de 50 %. O metabolito fenólico foi obtido por precipitação, após hidrólise em meio básico do 2-acetóxi-NVP, formando um sólido amarelo com um rendimento de 21%.

Antes de se dar início às reacções enzimáticas fez-se um estudo preliminar ao 2-OH-NVP. O tempo de retenção e o perfil de UV-Vis são importantes para posterior comparar com as reacções em estudo (Figura 2.40).

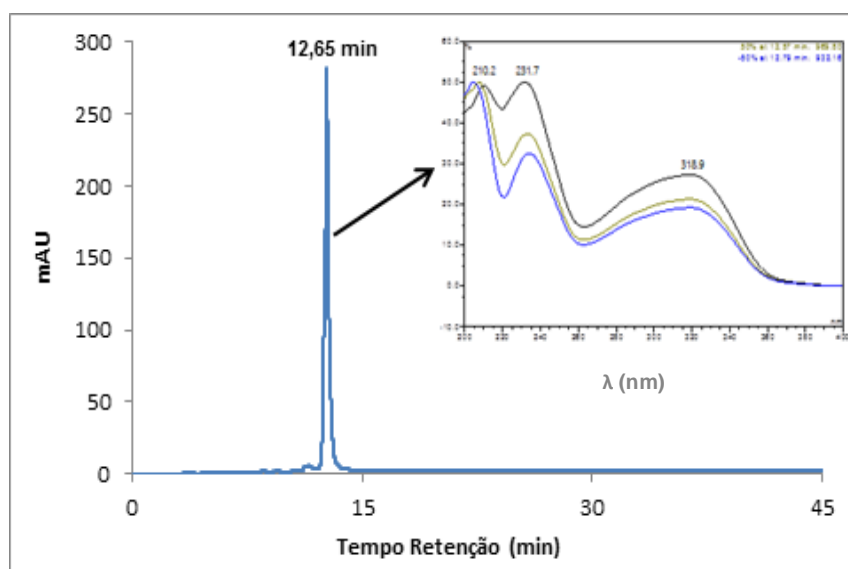
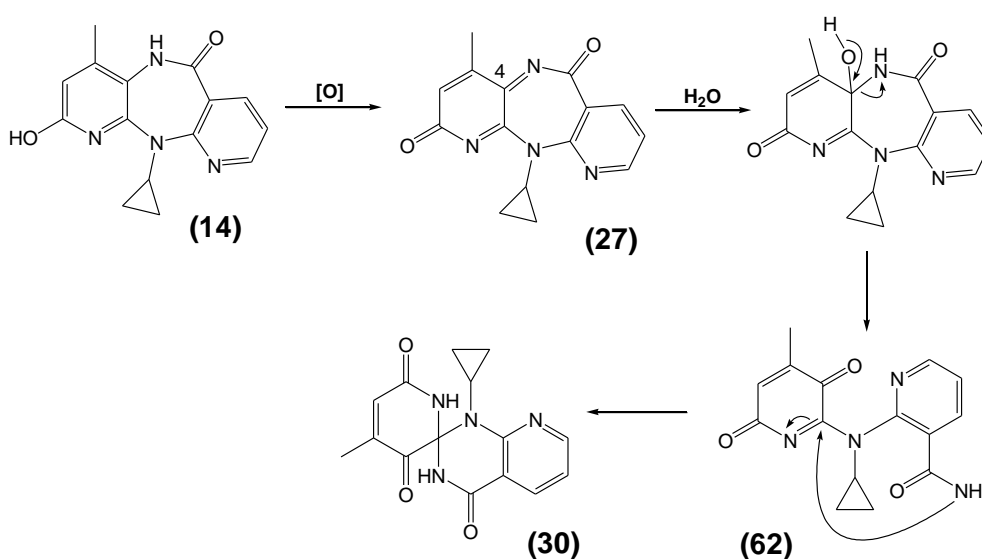


Figura 2.40 - Cromatograma obtido para o padrão do 2-OH-NVP em tampão BR pH 6 e o respectivo perfil de UV-Vis.

O 2-OH-NVP tem um tr de 12.65 minutos e apresenta uma absorvância máxima de UV de 210.2, 231.7 e 318.9 nm. Com estes dados prosseguiu-se com as reacções de oxidação deste metabolito fenólico.

Estudos anteriores³² indicaram que o 2-OH-NVP poderia ser oxidado à quinona-imina que reage com água, levando à formação do composto spiro (30, Esquema 2.9). Este composto é formado por ataque nucleófilo da água na posição C4 da quinona-imina, que conduz à abertura do anel formando o intermediário (62), que rapidamente fecha intramolecularmente originando o spiro 30, como se encontra apresentado no Esquema 2.9.



Esquema 2.9 – Mecanismo proposto para a formação do spiro (30), através do intermediário quinona-imina (27).³²

Num estudo preliminar, com o intuito de perceber se a TvL tinha capacidade em oxidar o 2-OH-NVP à quinona-imina, estudou-se a reacção de oxidação do metabolito 2-OH-NVP com a TvL, nas condições experimentais anteriormente optimizadas, nomeadamente 1 mM de 2-OH-NVP e 43 U de TvL.

No cromatograma apresentado na Figura 2.41 observou-se que o metabolito fenólico 2-OH-NVP ($t_r = 12.65$ min) se consome na sua totalidade ao fim de 3h de reacção, com a consequente formação de dois produtos, P2 ($t_r = 9.44$ min) e P3 ($t_r = 14,03$ min). Através da análise por LC-ESI-MS/MS foi possível identificar o P3 como o composto spiro (30) já conhecido,³³ onde o padrão de fragmentação foi idêntico com o descrito na literatura³³, e o P2 como um composto novo que apresenta o mesmo valor de m/z para a molécula protonada, quando analisado por LC-ESI(+)-MS/MS.

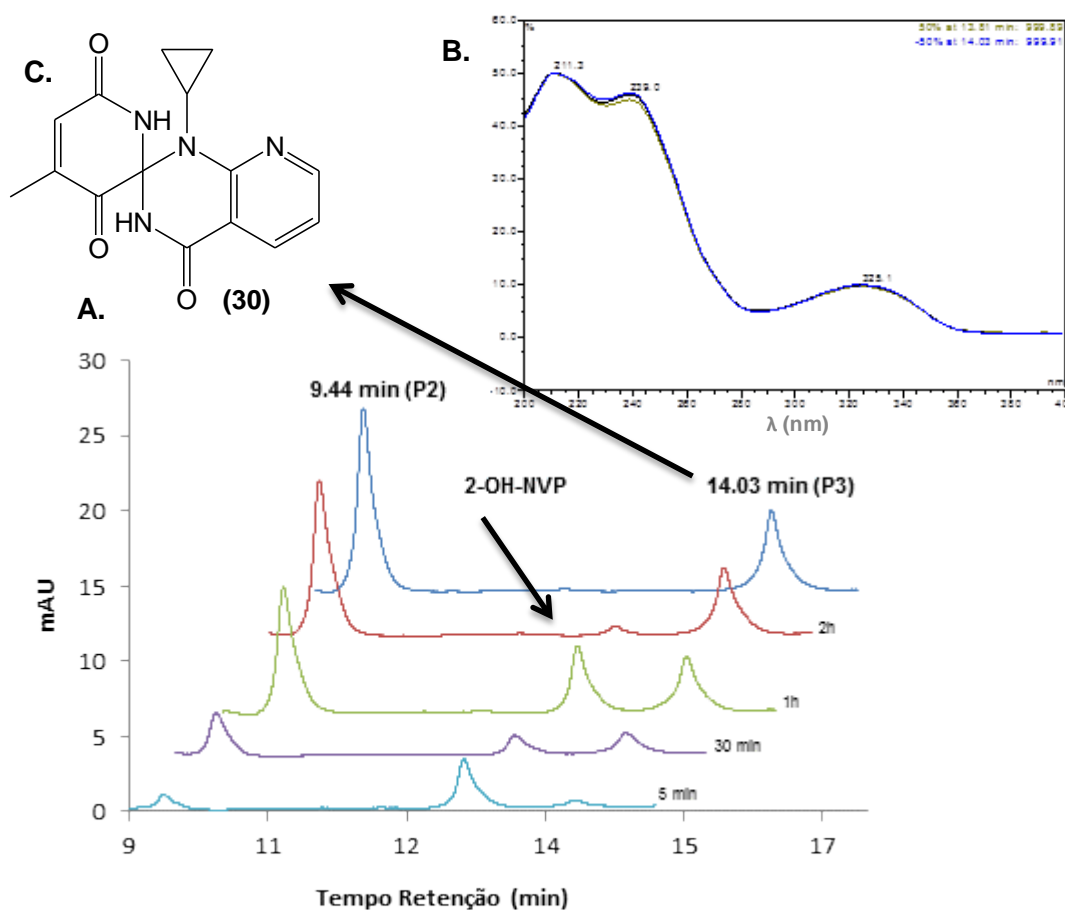


Figura 2.41 – Excerto do cromatograma obtido por HPLC da reacção do 2-OH-NVP com a TvL, até 3h de reacção (A), perfil de UV do spiro 30 (B) e a sua estrutura (C).

A Figura 2.42 mostra o espectro de MS/MS do composto spiro 30 e o padrão de fragmentação, que está de acordo com o descrito na literatura.³²

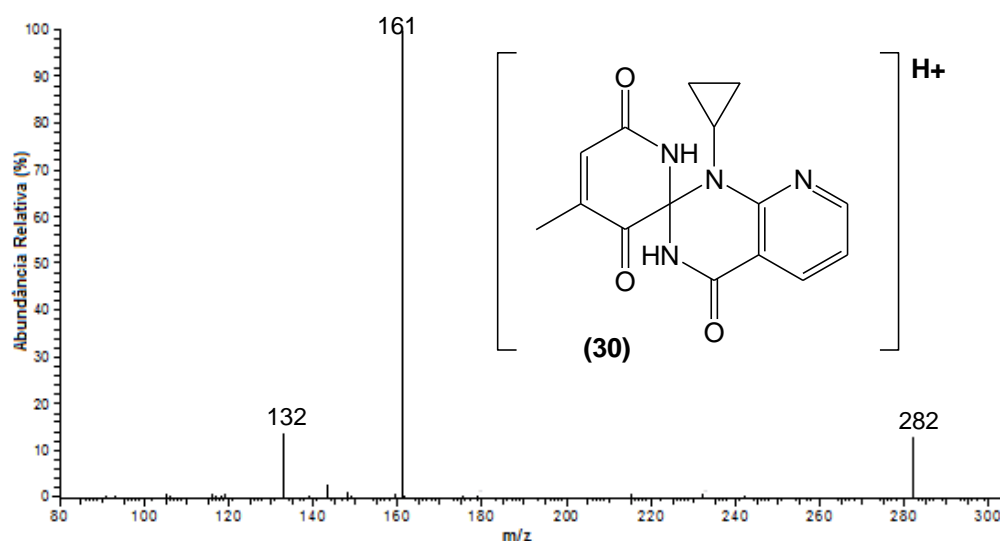


Figura 2.42 – Espectro de MS/MS obtido por LC-ESI (+)-MS do íon com m/z 299 correspondente à molécula protonada do spiro.

Pela análise ao espectro de MS/MS obtido para o composto P2 ($t_r = 9.44$ min), em que a molécula protonada apresenta o mesmo valor de m/z (299) que o spiro 30, foi possível identificá-lo como um precursor do spiro, estrutura 62, apresentada no Esquema 2.9. Este composto com um valor de m/z 299 deu origem ao espectro de MS/MS da Figura 2.43, cuja fragmentação se encontra na Figura 2.44.

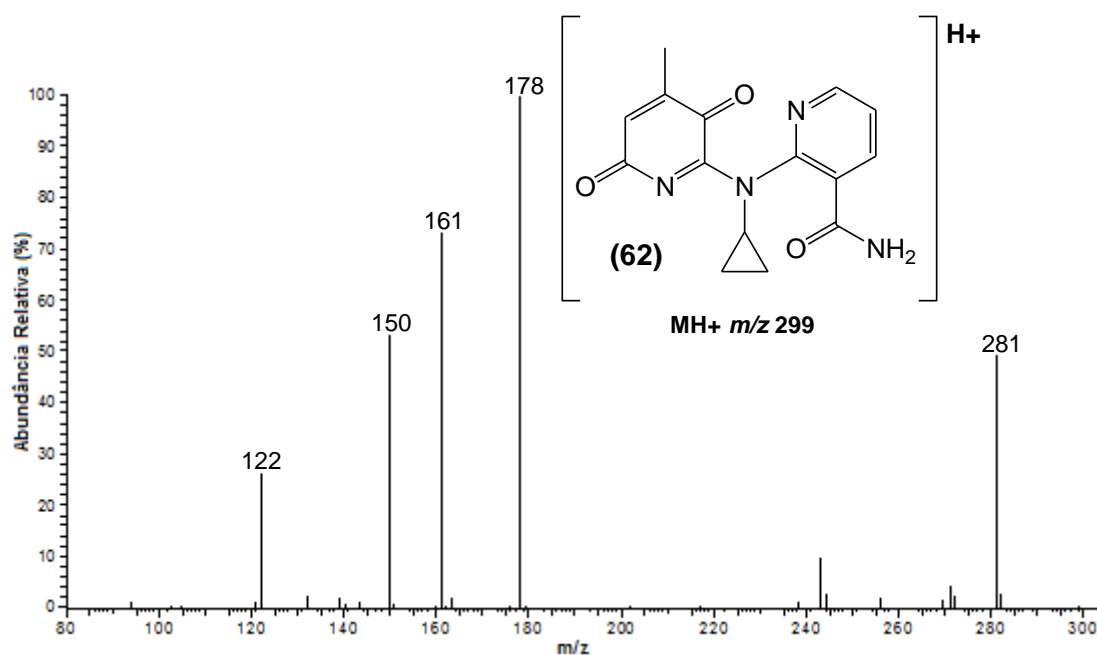


Figura 2.43 – Espectro de MS/MS obtido por ESI (+) do íon com m/z 299 correspondente à molécula protonada do composto 62.

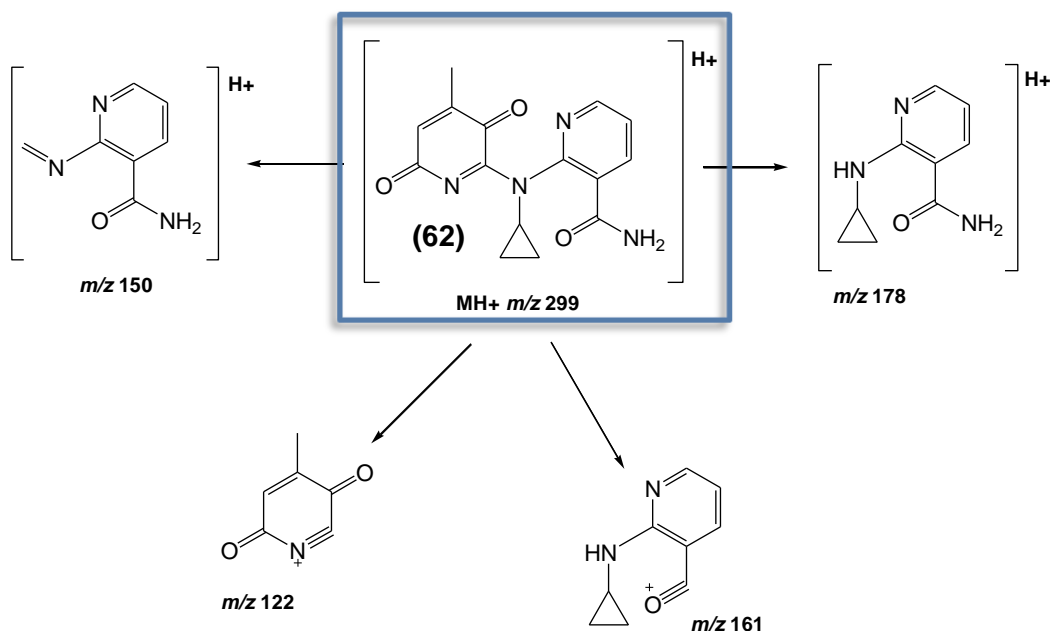


Figura 2.44 – Esquema da fragmentação por ESI(+)-MS/MS proposta para o composto 62 (P2) a partir da molécula protonada a m/z 299.

A formação dos compostos 30 e 62 indicam a formação da quinona-imina (27) por oxidação enzimática mediada pela TvL do 2-OH-NVP, o que indica que a TvL é selectiva neste tipo de reacções, uma vez que este metabolito fenólico (14) tanto pode originar a quinona como a quinona-imina (estruturas 26 e 27 do Esquema 1.6). Estudos anteriores³¹ mostraram que este metabolito fenólico forma o intermediário quinona-imina, derivado quinóide potencialmente tóxico, que não consegue ser excretado por conjugação com a GSH. Por essa razão, a formação de aductos com a NAC e a GSH não foi neste caso estudada. Por outro lado, este derivado quinóide forma aductos covalentes estáveis com a lisina, podendo estes ser aplicados como biomarcadores.⁸⁵ Assim, investigou-se a capacidade do 2-OH-NVP em formar a quinona-imina, através da sua oxidação mediada pela TvL, por reacção com a lisina.

Os ensaios estudados foram realizados para um volume de 0.2 mL, com as seguintes condições, 1 mM de 2-OH-NVP, 5 mM de lisina, 43 U de TvL, cujas reacções foram realizadas em tampão BR pH 6, à temperatura ambiente e com 4 % de DMSO. Na Figura 2.45, encontra-se o cromatograma iónico obtido por LC-ESI-MS/MS da reacção do 2-OH-NVP mediada pela TvL e na presença de lisina nas condições experimentais referidas anteriormente.

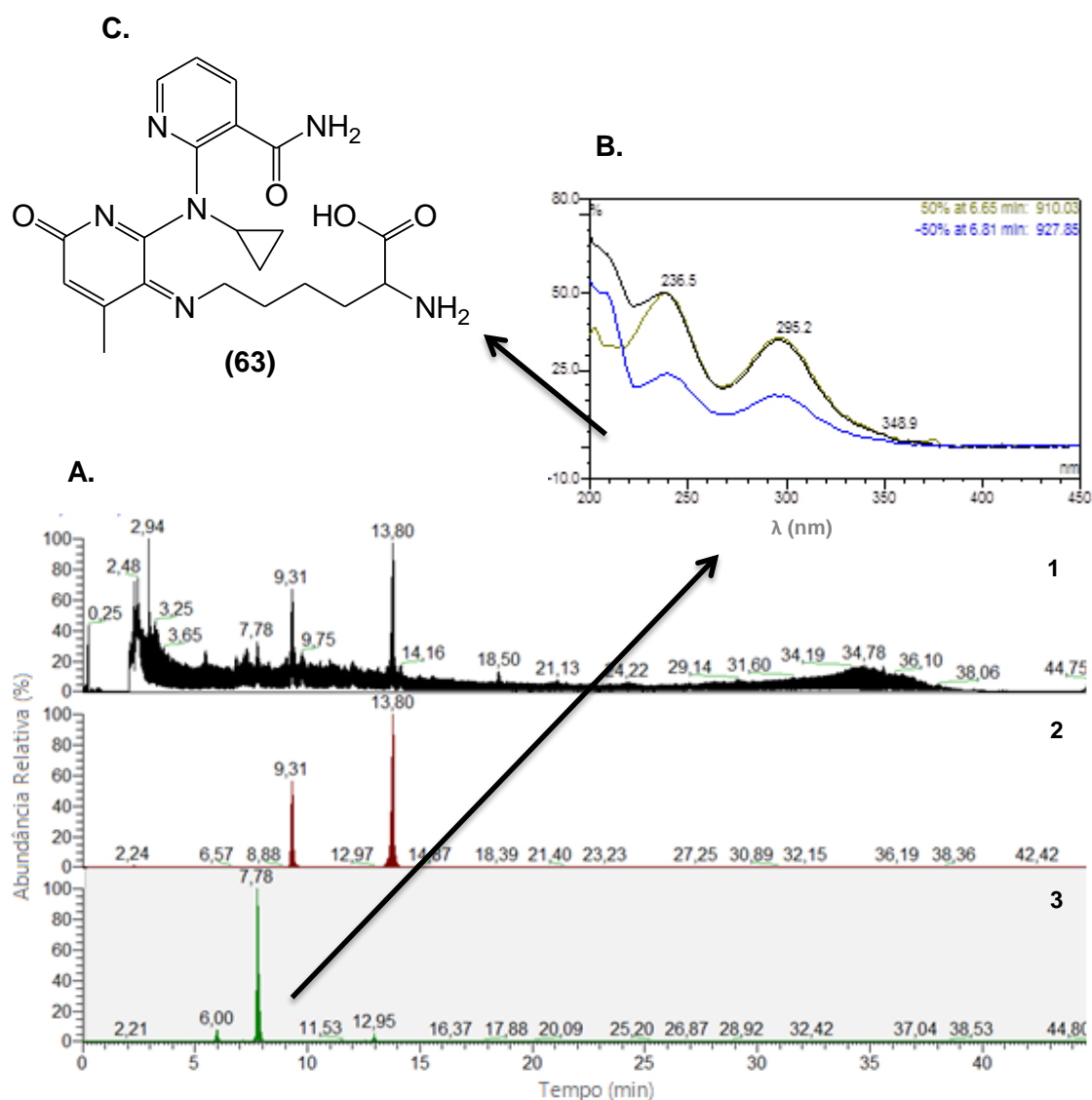
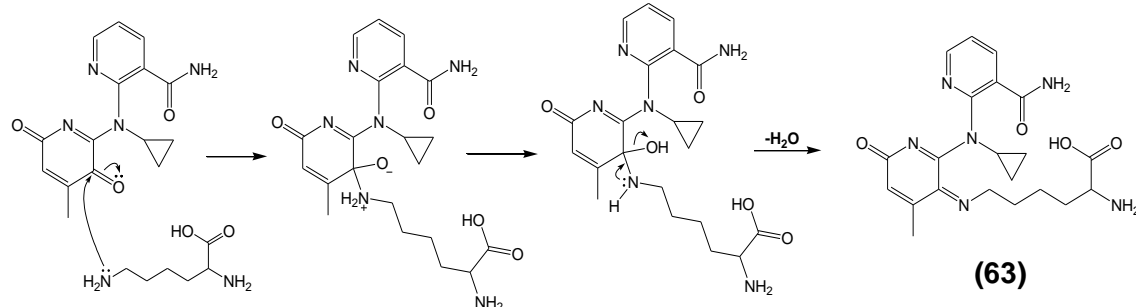


Figura 2.45 – Cromatograma iônico obtido por LC-ESI(+)-MS após 3h de reação de oxidação da 2-OH-NVP com a TvL na presença de lisina (A), **1** Full Scan; **2** Moléculas protonadas com m/z 299, nomeadamente o composto 62 e o composto spiro 30; **3** Molécula protonada com m/z 427 correspondente ao aducto (63); perfil de UV do aducto (B) e a sua estrutura molecular (C).

Ao utilizar a lisina como bionucleófilo formaram-se três produtos, o composto spiro (30), o precursor do spiro (62) e ainda um novo composto, com tr 7.78 min. Este composto quando analisado por LC-ESI(+)-MS apresentava um sinal a m/z 427, compatível com a formação de um aducto entre a lisina e o composto 62 por formação de uma base de *Schiff* (Esquema 2.10).



Esquema 2.10 – Mecanismo proposto para a formação do aducto formado entre a lisina e o composto 62, que é o produto de hidrólise da quinona-imina 27.

Este aducto (63) apresenta uma absorvância máxima de UV de 236.5, 295.2 e 348.9 nm (Figura 2.45). O espectro de MS/MS da molécula protonada do aducto 63 encontra-se representado na Figura 2.46, e a proposta de mecanismo de fragmentação na Figura 2.47.

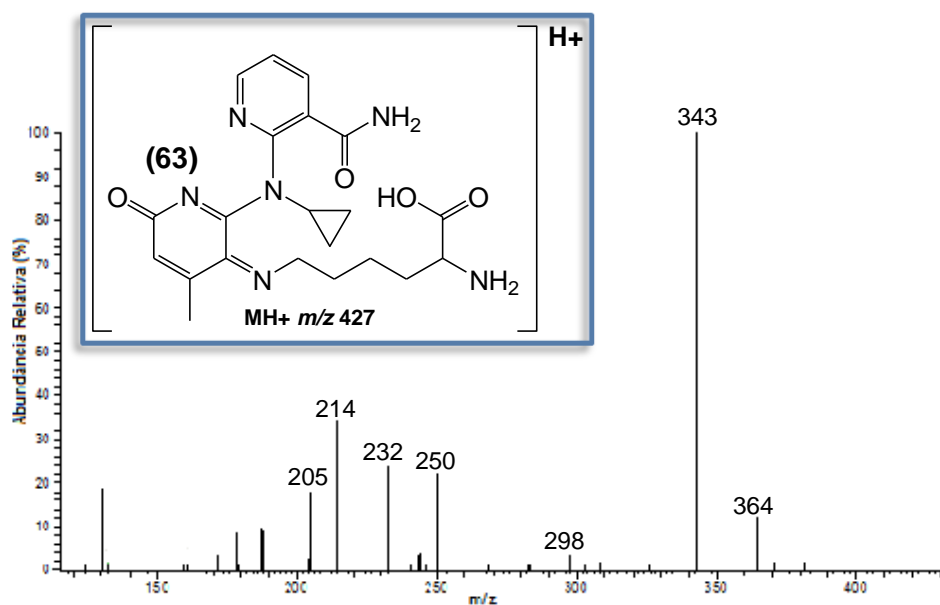


Figura 2.46 – Espectro de MS/MS obtido por LC-ESI (+)-MS do ião com m/z 427 correspondente à molécula protonada do aducto com a lisina (63).

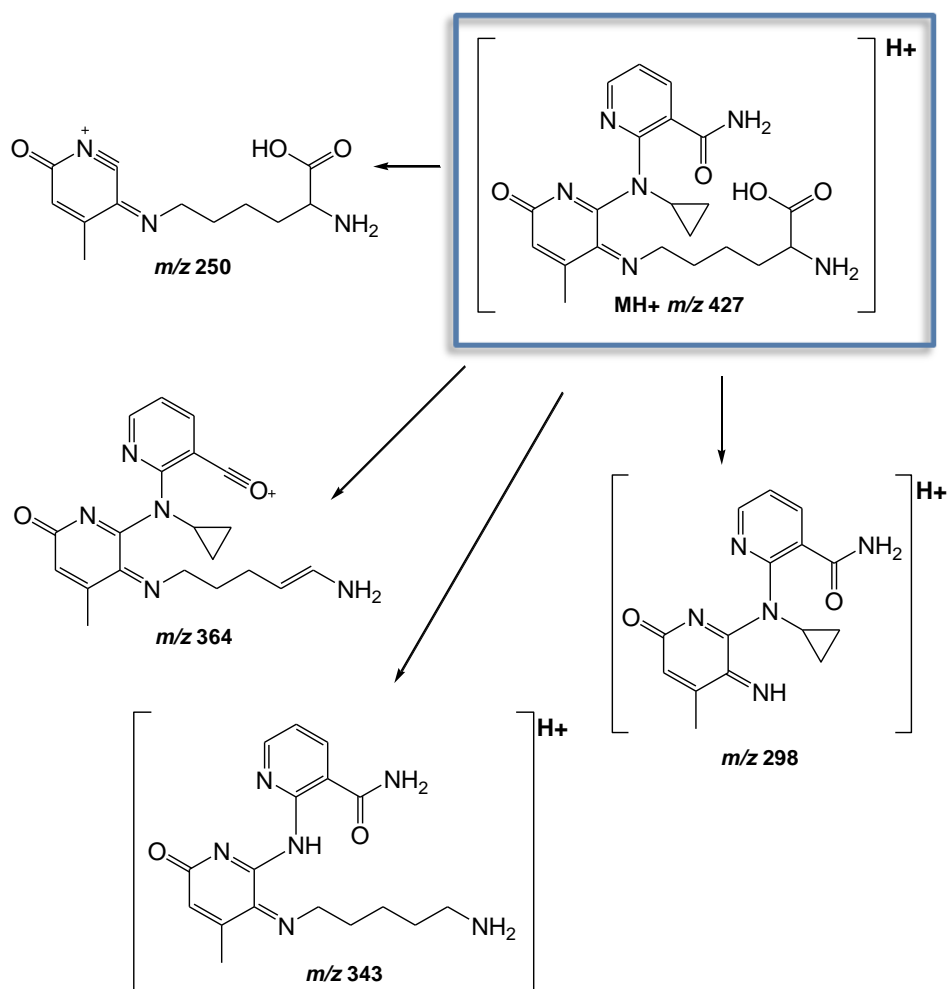
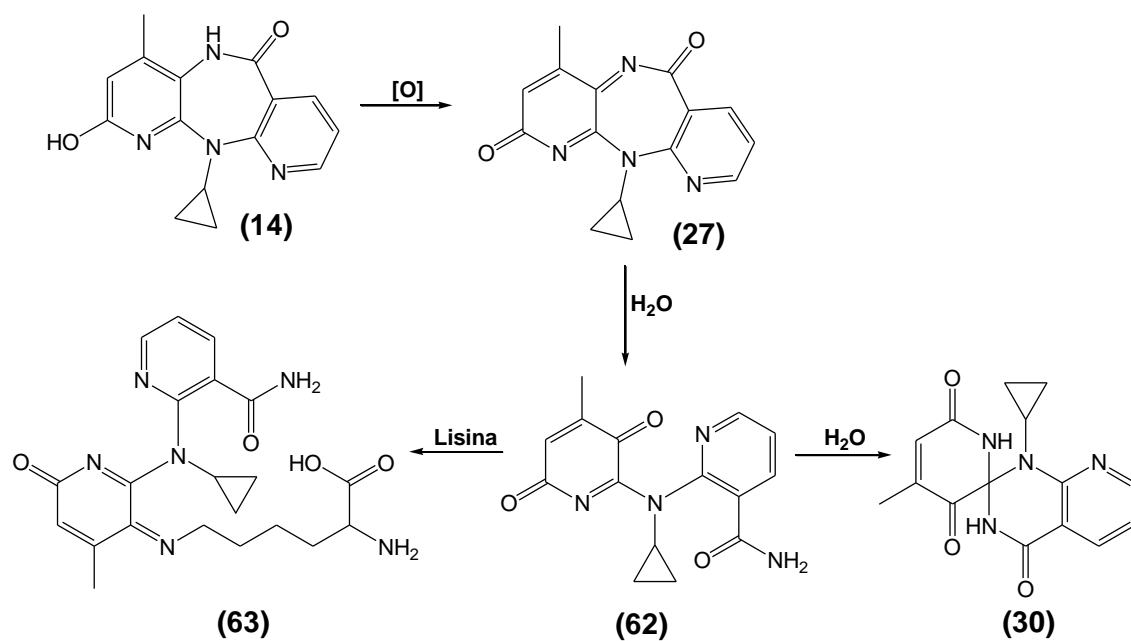


Figura 2.47 – Esquema da fragmentação por ESI(+)-MS/MS proposta para o aducto com a lisina a partir da molécula protonada a m/z 427.

Assim, verifica-se que o intermediário quinona-imina (27), proveniente da oxidação do 2-OH-NVP (14) origina em solução aquosa o composto 62, que por sua vez origina o composto spiro 30. Para além disso, o precursor do spiro também pode originar o aducto com a lisina (63), como apresentado no Esquema 2.11.



Esquema 2.11 – Esquema geral apresentando os produtos da hidrólise da quinona-imina e o aducto formado entre o composto 62 e a lisina.

3. Conclusões e Perspectivas de Trabalho Futuro

O principal objectivo deste trabalho foi a preparação de aductos fármaco-bionucleófilo envolvidos nos efeitos de toxicidade, provenientes da biotransformação e bioactivação de fármacos como a NVP, o TMP e o APAP. A via mais estudada foi a da formação de espécies electrófilas quinóides.

Estes fármacos formam intermediários electrófilos, como a quinona-imina que são conhecidas por sofrerem ataque nucleófilo dos grupos sulfidrilo existentes nas proteínas. Contudo a sua conjugação à GSH representa um processo de detoxificação destas espécies electrófilas. Assim, foram preparados aductos padrão, como potenciais biomarcadores de bioactivação/toxicidade para estudos toxicológicos.

No caso do APAP foram realizadas oxidações química (sal de Frémy) e enzimática (TvL), tendo-se obtido dois aductos (NAC-APAP e GSH-APAP), o que indica que a TvL consegue oxidar o APAP à quinona-imina, NAPQI, que por sua vez reage com estes bionucleófilos, neutralizando a sua toxicidade. Esta indicação da formação dos aductos foi conseguida através dos perfis de UV-Vis e por LC-ESI-MS/MS.

Para a NVP não foi possível a obtenção dos aductos NVP-bionucleófilo provenientes da quinona-imina, provavelmente porque a TvL não promoveu a oxidação da NVP. Como existem indicações de que o metabolito fenólico 2-OH-NVP, proveniente da biotransformação da NVP, forma espécies electrófilas, sintetizou-se o mesmo. Na reacção de oxidação do 2-OH-NVP com a TvL na presença de lisina foram obtidos os produtos de hidrólise da quinona-imina. Por outro lado, foi ainda possível identificar a presença de um aducto entre a lisina e um dos produtos de hidrólise da quinona-imina, formada a partir da oxidação do 2-OH-NVP mediada pela TvL, na presença de lisina.

Relativamente ao TMP apesar de existirem informações que este fármaco promove a formação da quinona-imina *methide*, não foi possível obter os aductos TMP-bionucleófilo, provavelmente devido ao potencial redox ser superior ao da enzima, o que impede a sua oxidação e consequentemente o ataque bionucleófilo.

A hidroxilação da ETV com a TvL na presença do mediador ABTS foi bem sucedida dando origem ao metabolito hidróxi-benzílico e ao respectivo aldeído, os quais foram caracterizados por espectrometria de massa de alta resolução. Este é um resultado bastante importante, uma vez que não existe qualquer método sintético para a preparação deste metabolito. Assim, uma abordagem possível para a preparação deste metabolito em quantidades apreciáveis seria proceder ao *scale-up* desta reacção, e posteriormente isolar quer o metabolito hidróxi-benzílico quer o aldeído.

Alternativamente poder-se-á estudar a possibilidade do sistema TvL/ABTS poder funcionar como oxidante em posições fenólicas.

Os resultados obtidos parecem comprovar que a TvL é capaz de mimetizar algumas das vias metabólicas catalisadas pelo CYP, sendo bastante útil em estudos de toxicidade, dado o baixo custo desta enzima.

4. Procedimento Experimental

4.1. Considerações gerais

4.1.1. Reagentes e Solventes

Os solventes utilizados apresentavam grau de pureza p.a. e foram fornecidos pela Aldrich, Fluka e Sigma Aldrich. A solução de enzima *Trametes versicolor* lacase utilizada por dissolução em tampão BR foi adquirida à Sigma Aldrich, com uma actividade de 13.6 U/mg. Os bionucleófilos (NAC, GSH, NAL e Lisina) foram adquiridos à Sigma Aldrich, com uma pureza entre os 98 e 100%. Relativamente aos fármacos utilizados, o APAP, a ETV e o TMP foram adquiridos à Sigma Aldrich, enquanto que a NVP foi adquirida à Cipla (Mumbai, Índia) e o EFV foram oferecido pelo Dr. F. A. Beland, Centro Nacional de Pesquisa Toxicológica, Jefferson, Arkansas, EUA. Os solventes usados foram sempre que necessário secos segundo métodos padronizados.⁸⁶

O tampão Britton-Robinson pH 6 foi preparado com 11.5 mL de ácido fosfórico, 6.18 g de ácido bórico e 5.71 mL de ácido acético em 1 L de água destilada e utilizou-se uma solução de NaOH 0.1 M para acertar o pH. O tampão fosfato 7.4 foi preparado a partir de 2.2 g de Na₂HPO₄ e 3.4 g de KH₂PO₄ para 250 mL de água destilada. Utilizou-se uma solução de NaOH 10 % para acertar o pH.

4.1.2. Cromatografia em camada fina

Para a realização das cromatografias de camada fina (TLC) foram usadas placas de sílica Gel 60 F₂₅₄ da Merck, com espessura de 0,2 mm. Depois da sua aplicação no sistema eluente apropriado foram observadas sobre uma luz ultravioleta a um comprimento de onda de 254 nm.

4.1.3. Cromatografia líquida de Alta Resolução (HPLC)

As análises em HPLC foram efectuadas num sistema *Ultimate 3000* da Dionex, equipado com uma bomba quaternária (LPG-3400A), um detector de fotódodos (DAD, *Ultimate 3000*). Para a monitorização das reacções em estudo foi utilizado um HPLC manual com uma coluna de fase reversa Luna C18 (2) (250 x 4,6 mm, 5µm) da Phenomenex, que operava com um fluxo de 1 mL/min.

No isolamento dos compostos de interesse obtidos, como por exemplo os aductos, foi utilizado um HPLC automático, com as mesmas características apresentadas para o HPLC manual e um sistema de injeção automático (Rheodyne Model 8125). Neste foi usado uma coluna preparativa Luna C18 (2) (250 x 10 mm, 5µm) da Phenomenex com um fluxo de 3 mL/min.

O programa de gradiente utilizado foi igual para ambos os HPLC e consistiu num gradiente linear de 5-70% de acetonitrilo em ácido fórmico aquoso 0,1% (v/v) até 30 min, seguido de 2 min de um gradiente linear com 100 % de acetonitrilo. Passados 8 min retoma às condições iniciais durante 5 min e por fim 7 min para equilibrar a coluna.

4.1.4. Espectrometria de Massa (MS)

Os espectros de massa foram obtidos usando um sistema Ultimate 3000RS nano ligado a um espectrómetro de massa de Ion Trap, com ionização por electrospray (ESI) da Thermo Scientific. Para o sistema de HPLC Ultimate nano 3000RS LC foi usada uma coluna Luna C18 (2) 100A (150 mm x 2mm x 5 µm) da Phenomenex. As amostras foram analisadas com um fluxo de 0.2 mL/min, utilizando um gradiente linear composto de solução de ácido fórmico a 0.1 % em água (fase móvel A) e 0.1 % de ácido fórmico em acetonitrilo (fase móvel B), com as seguintes condições: 5-70 % de fase móvel B, durante os primeiros 30 minutos, 70-100 % de fase móvel B durante 2 minutos, 100 % de fase móvel B durante 8 minutos, 100-5 % de fase móvel B durante 5 minutos e por fim 5 % de fase móvel B durante 7 minutos. A coluna e o mostrador foram mantidos a uma temperatura constante de 40 °C e 8 °C, respectivamente. O espectrómetro de massa foi operado em modo negativo e em modo positivo otimizados com as seguintes condições: taxa de fluxo de gás, 40 (unidades arbitrárias), taxa de fluxo de gás auxiliar, 10 (unidades arbitrárias); pulverizar tensão, 4.5 kV, tensão capilar, -18/16 V; tubo de lente de tensão, -125/63 V; temperatura do vaporizador, 185 °C; temperatura capilar, 300 °C. Os dados foram adquiridos utilizando o software Xcalibur™ da Thermo Scientific.

Relativamente à espectrometria de alta resolução, foi utilizado um espectrómetro de massa (Bruker) híbrido com um quadrupolo e tempo de voo (Q-TOF) Impact II. Para o sistema de HPLC Ultimate nano 3000RS LC da Thermo Scientific foi usada uma coluna HypersilGold C18 (150 mm x 2.1 mm x 1.9 µm). As amostras foram analisadas com um fluxo de 0.2 mL/min, utilizando um gradiente de eluição de ácido fórmico a 0.1 % em água (Fase móvel A) e 0.1 % de ácido fórmico em acetonitrilo (Fase móvel B), com as seguintes condições: 5 % de Fase móvel B, durante 2.4

minutos, 5-25 % de Fase móvel B durante 2.1 minutos, 25-70 % de Fase móvel B durante 4.1 minutos, 70-100 % de Fase móvel B durante 3 minutos, 100% de Fase móvel B durante 3 minutos, 100-5 % de Fase móvel B durante 2 minutos e por fim 5 % de Fase móvel B durante 6 minutos. A coluna e o mostrador foram mantidos a uma temperatura constante de 40 °C e 8 °C, respectivamente. Os espectros de massa de alta resolução foram obtidos com uma fonte de ionização de ESI em modo negativo otimizado com as seguintes configurações: placa de offset, 500 V, tensão capilar, 2.5 kV; nebulizador, 40 psi; gás seco, 8 L/min; temperatura de aquecimento, 200 °C. Os dados foram adquiridos utilizando o software Compass® da Bruker.

4.1.5. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de próton (¹H-RMN) foram adquiridos nos espectrômetros Bruker 300 MHz e 500 MHz, com o *software* Topsis 2.3. Os desvios químicos (δ) são expressos em partes por milhão (ppm), as constantes de acoplamento (*J*) em Hertz (Hz) e as multiplicidades são expressas segundo a nomenclatura (s –singleto, d – duplete, t – tripleto, dt –duplo de tripleto, dq – duplo de quadruplete, m –multiplete). As amostras caracterizadas por RMN foram preparadas ao ar e à temperatura ambiente, utilizando como solventes deuterados o CD₃OD, DMSO-*d*₆, CD₂Cl₂ e CD₃CN.

4.1.6. Espectroscopia de Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

Os espectros de Ultravioleta-Visível foram registados num espectrofotómetro Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis, numa gama de comprimentos de onda compreendida entre os 280 e os 700 nm.

4.2. Ensaios de enzimáticos com o ABTS

4.2.1. Ensaios preliminares de oxidação do ABTS pela TvL na presença de bionucleófilos

Adicionou-se o ABTS 1 mM, dissolvido em tampão BR pH 4, a uma solução de TvL de actividade catalítica 0.4 U e posteriormente foram adicionados em concentrações variáveis os bionucleófilos (NAC e GSH), previamente dissolvidos em tampão BR pH 4. Em todos os ensaios, a variação de cor observada foi analisada por espectrofotometria de UV/Visível ao comprimento de onda de 420 nm.

4.3. Reacções de oxidação enzimática do bionucleófilo NAC

Para a NAC foram realizados dois ensaios, com uma solução de bionucleófilo (20 mM) em tampão BR pH 6, na presença e ausência da enzima (20 U). Estas reacções foram realizadas a 37 °C, num volume total de 5 mL e decorreram até 16h. Evaporou-se o solvente em vácuo até se obter um sólido que foi posteriormente dissolvido em CD₃OD e analisadas por RMN de 500 MHz.

4.4. Ensaio enzimáticos dos fármacos

4.4.1. Reacções de oxidação enzimática dos fármacos APAP, NVP e TMP

À solução tampão BR pH6 contendo TvL com actividade catalítica variável (4, 40, 400 U) foi adicionada o volume adequado de solução *stock* de fármaco em DMSO de modo a que a percentagem de DMSO não ultrapasse os 10 %. A concentração de fármaco no meio reaccional variou consoante os ensaios realizados (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Condições experimentais testadas para os diferentes Fármacos, na ausência de bionucleófilo.

<i>Fármaco</i>	<i>Concentração stock (mM)</i>	<i>Concentração meio reaccional (mM)</i>	<i>[TvL] (U)</i>	<i>DMSO (%)</i>
APAP	24.2	1	43	4
	40	2	40	5
	150	10	4	7
	150	10	400	7
NVP	150	10	4	7
	150	10	400	7
TMP	150	10	4	7
	150	10	400	7

4.4.2. Reacção de bioactivação dos metabolitos reactivos com os bionucleófilos

A uma solução de fármaco, com concentração variável (Tabela 4.1), dissolvida em DMSO adicionou-se o bionucleófilo em tampão BR pH 6 e a TvL (4 U, 40 U) preparada em tampão BR pH 6, com excepção da TvL 400 U, onde se pesou a enzima directamente para a reacção. Perfez-se o volume com tampão BR pH 6. No final da reacção adicionou-se a mesma proporção de volume de acetonitrilo.

As concentrações de bionucleófilo estudadas encontram-se na Tabela 4.2 para o APAP e na Tabela 4.3 para a NVP e TMP. Nestes últimos, também foi estudado a adição de a NAC após 1h de reacção.

Tabela 4.2– Condições experimentais testadas para a reacção do APAP com a TvL e os bionucleófilos.

<i>Bionucleófilo</i>	<i>Concentração stock (mM)</i>	<i>Concentração meio reaccional (mM)</i>	<i>[TvL] (U)</i>
NAC	24.2	5	43
	40	10	40
	150	10	4
	150	10	400
	150	25	4
	150	27.5 ^a	4
GSH	24.2	5	43
	40	10	40
	130	50	4

^a Neste caso a concentração de APAP no meio reaccional foi de 12.3 mM

Tabela 4.3– Condições experimentais testadas para a reacção da NVP e do TMP com a TvL e os bionucleófilos.

<i>Bionucleófilo</i>	<i>Concentração stock (mM)</i>	<i>Concentração meio reaccional (mM)</i>	<i>Adição</i>	<i>[TvL] (U)</i>
NAC	150	25	Directa	4
	150	25	1h depois	4
NAL	----	30	Directa	400

No caso da NAL não foi preparada nenhuma solução stock, pesou-se o bionucleófilo directamente para a reacção.

4.5. Oxidações químicas dos fármacos

4.5.1. Procedimento geral para as reacções de oxidação do APAP com sal de Frémy

A uma solução de APAP (1 mg, 15.1 µmol) em acetonitrilo, adicionou-se 2 eq. de sal de Frémy (3.54 mg, 13.2 µmol) dissolvido em tampão fosfato (pH 7.4, 100 mM), tendo a mistura sido mantida a 37 °C durante 5 minutos. Extraíu-se com diclorometano

(2 vezes) e a fase orgânica foi evaporada em azoto gasoso, obtendo-se um sólido laranja escuro.

4.5.2. Reacção da NAPQI (54) com o bionucleófilo NAC

A uma solução do sólido laranja obtido em 4.5.1 em acetonitrilo adicionou-se uma solução de 4 eq. (4.3 mg, 26.5 μ mol) de NAC em tampão Fosfato (pH 7.4, 100 mM), observando-se uma alteração de cor de laranja intenso para incolor. A mistura resultante foi incubada a 37 °C com agitação durante 30 minutos e posteriormente analisada por HPLC-DAD nas condições experimentais descritas em 4.1.3.

4.6. Oxidação enzimática de fármacos a metabolitos hidróxi-benzílicos

4.6.1. Etravirina

A uma solução de ETV (5 mM, 40 μ L) em DMSO foi adicionada uma solução de ABTS (2.5 mM, 10 μ L) em Tampão BR pH 4 e uma solução de TvL (64 U, 62.7 μ L) em Tampão BR pH 4, perfazendo o volume utilizando tampão BR pH 4. A reacção foi realizada à temperatura ambiente ($v = 0.2$ mL) e realizada a 37 °C ($v = 2$ mL). A mistura reaccional foi analisada por HPLC-DAD, LC-ESI (+) e por HRMS/MS.

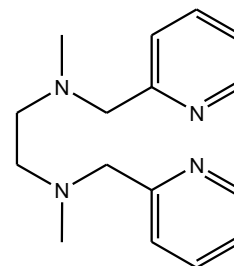
4.7. Síntese dos metabolitos de Fase I

4.7.1. Síntese do 8-OH-EFV (33)

4.7.1.1. Preparação do ligando bpmen

A uma solução de *N,N'*-dimetiletano-1,2-diamina (1,2 mL, 11 mmol) em água destilada foi adicionada uma solução de cloro-hidrato de 2-(clorometil) piridina (3,61 g, 22 mmol) também dissolvido em água destilada. Foram ainda adicionados à mistura 1.76 g (44 mmol) de NaOH. A reacção ficou sob agitação a 70 °C durante 1h, levando a um escurecimento da mesma. Posto isso, realizaram-se duas extracções com tolueno, lavando posteriormente a fracção orgânica com uma solução saturada de NaCl e secando a mesma com sulfato de magnésio anidro obtendo-se no final um óleo amarelo representativo do ligando *N,N'*-bis-(2-piridilmetil)-1,2-diaminoetano, bpmen.

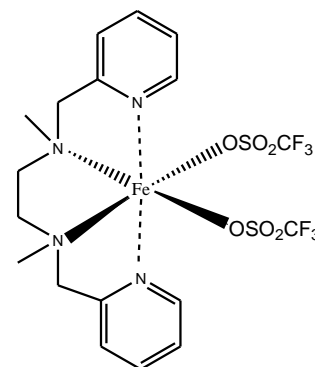
bpmen: óleo amarelo; rendimento: 0.72 g (2.7 mmol, 25%); $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 8.53, 7.62, 7.42, 7.18, 3.68, 2.64, 2.26.



4.7.1.2. Preparação do $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{bpmen})(\text{OTf}_2)]$

A síntese do catalisador foi realizada na linha de azoto, à temperatura ambiente e sob agitação durante a noite, sendo a mistura reaccional constituída pelo ligando bpmen (0.72 g, 2.7 mmol) dissolvido em tetrahydrofurano (THF) anidro e pelo complexo de (bisacetonitrilo) bistriflato de Fe (II) também dissolvido em THF anidro. Após a mistura a solução ficou com uma tonalidade verde escura que se transformou numa solução amarela com precipitado. À solução amarela foi adicionado pentano e diclorometano anidros e esta foi posteriormente filtrada com azoto com cânula, obtendo-se um sólido que foi recristalizado em diclorometano/pentano anidro obtendo-se um sólido amarelo cristalino.

$[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{bpmen})(\text{OTf}_2)]$: cristais amarelos; rendimento: 127 mg (0.2 mmol, 8%); $^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CD_2Cl_2): solução amarela clara, δ (ppm) = 169.4, 74.7, 54.8, 53.6, 24.8, 15.9, as ressonâncias 123.5, 94.4 e 15.6 não foram detectadas.



4.7.1.3. Preparação do 8-OH-EFV (33)

A uma solução de efavirenz (100 mg, 0.317 mmol) e $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{bpmen})(\text{OTf}_2)]$ (10% mmol, 20 mg, 0.0317 mmol) em 1:1 de acetato de etilo/acetonitrilo foi adicionado ácido acético glacial (90 μL , 1.6 mmol) e uma solução de peróxido de hidrogénio (35 wt%, 38 μL , 0.43 mmol). Esta mistura reaccional foi colocada em agitação, a 37°C durante 3 dias e depois saturada com uma solução aquosa de bissulfito de sódio. De seguida, foram realizadas 3 extracções com acetato de etilo, e a fase orgânica extraída com uma solução saturada de bicarbonato de sódio, seca com sulfato de magnésio anidro e por fim evaporado em vácuo, obtendo-se um óleo castanho-escuro. Isolou-se o 8-

OH-EFV por cromatografia em placa preparativa, onde se efectuaram duas eluições, uma com diclorometano e outra com o sistema eluente diclorometano:metanol (5%). O composto final foi obtido com um rendimento de 10 %, apresentando os dados espectroscópicos similares aos reportados na literatura.⁵⁶

4.7.2. Síntese do 2-OH-NVP (14)

4.7.2.1. Preparação do 2-acetóxi-NVP (61)

Num balão de 250 mL foi adicionada a NVP (250 mg, 0.94 mmol) dissolvida em 100 mL de diclorometano, de seguida o acetato de prata (862 mg, 5.16 mmol) e por fim o iodo (975 mg, 7.68 mmol). Esta mistura reaccional foi deixada em agitação a 105 °C durante 2 minutos, observando-se a formação de um precipitado amarelo numa solução roxa, o qual foi colocado sobre um filtro compactado com sílica gel K60. O iodo e alguma NVP residual foram removidos através de sucessivas lavagens com diclorometano e para recolher o produto amarelo formado, o 2-acetóxi-NVP, usou-se uma mistura de diclorometano/acetato de etilo (1:1). A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio anidro e o solvente evaporado obtendo-se um óleo amarelo, com um rendimento de 50 %.

4.7.2.2. Preparação do 2-OH-NVP (14)

Para a reacção de hidrólise dissolveu-se o óleo amarelo, obtido em 4.7.2.1, em 10 mL de metanol e adicionou-se uma solução de hidróxido de potássio 10% (v/v) e deixou-se a mistura reaccional a agitar durante 2h até se observar que já não existia 2-acetóxi-NVP por reagir. A reacção foi seguida por TLC usando o sistema eluente acetato de etilo/diclorometano (1:1). Posto isso, evaporou-se o metanol e neutralizou-se a mistura com HCl (1M) causando a precipitação do produto. Após filtração, o produto foi obtido sobre a forma de um sólido amarelo (55.9 mg, 0.2 mmol), com um rendimento de 21 %. O composto obtido apresentava os dados espectroscópicos similares aos reportados na literatura.³³

4.8. Ensaios enzimáticos com os metabolitos de Fase I

4.8.1. Procedimento geral para as reacções de oxidação enzimática para o 2-OH-NVP

A uma solução de 24.2 mM de 2-OH-NVP (8.4 μ L, 1 mM) em DMSO, adicionou-se uma solução de TvL com 108.8 U (79 μ L, 43 U) em tampão BR pH 6 e fez-se o volume com Tampão BR pH 6. As reacções executadas a $v = 0.2$ mL foram realizadas à temperatura ambiente, sendo posteriormente efectuado um *scale-up* para $v = 10$ mL, onde a temperatura foi de 37 °C (fisiológica). A reacção foi parada com a adição de igual proporção em volume de acetonitrilo e foi posteriormente concentrada num concentrador plus até cerca de 1 mL.

As reacções com o 2-OH-NVP e o 8-OH-EFV foram analisadas por HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS.

4.8.2. Procedimento geral para as reacções de oxidação enzimática para o 8-OH-EFV

A uma solução de 10 mM de 8-OH-EFV (20 μ L, 1 mM) em DMSO, adicionou-se uma solução de TvL com 108.8 U (79 μ L, 43 U) em tampão BR pH 6 e fez-se o volume com Tampão BR pH 6. Esta reacção foi executada à temperatura ambiente, para um volume de 0.2 mL.

4.8.3. Procedimento geral para as reacções de oxidação enzimática do 2-OH-NVP na presença de bionucleófilo

A uma solução de 24.2 mM de 2-OH-NVP (8.4 μ L, 1 mM) em DMSO adicionou-se uma solução 24.2 mM de NAL e lisina (41.4 μ L, 5 mM) e uma solução de TvL com 108.8 U (79 μ L, 43 U). Para obter um volume final de 0.2 mL juntou-se Tampão BR a pH 6. Fez-se um *scale-up* desta reacção, onde a temperatura passou a ser a fisiológica, 37 °C, e foi adicionada a mesma proporção de acetonitrilo com o objectivo de parar a reacção. Esta foi concentrada num concentrador plus até cerca de 1 mL.

As reacções com o 2-OH-NVP e o 8-OH-EFV na presença de bionucleófilos foram analisadas por HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS.

4.8.4. Procedimento geral para as reacções de oxidação enzimática do 8-OH-EFV na presença de bionucleófilo

Relativamente ao metabolito 8-OH-EFV de concentração *stock* de 10 mM em DMSO, foi adicionado à placa de 96 poços (20 μ L, 1 mM), seguido de uma adição de adicionou-se uma solução de NAC de 24.2 mM (41.4 μ L, 5 mM) e uma solução de TvL com 108.8 U (79 μ L, 43 U). Para obter um volume final de 0.2 mL juntou-se Tampão BR a pH 6.

5. Referências Bibliográficas

- ¹ Quintas A., Halpern M. J., Freire A. P., *Bioquímica – Organização Molecular da Vida*, LIDEL – Edições Técnicas, Lisboa, 2008
- ² Cabral, J.M.S., Aires-Barros, M. R., Gama, M., *Engenharia Enzimática*, LIDEL – Edições Técnicas, Lisboa, 2003, pp 249
- ³ Hudlicky T., Reed J. W., *Chem. Soc. Rev.*, 2009, 38, 3117-3132
- ⁴ http://www.sobiologia.com.br/conteudos/quimica_vida/quimica11.php, acessado em 25/07/2016
- ⁵ Riva S., *Trends Biotechnol.*, 2006, 24 (5), 219-226
- ⁶ Hautphenne C., Penninckx M., Debaste F., *Environ. Technol. Innov.*, 2016, 5, 250-266
- ⁷ Koschorreck K., Richter S. M., Swierczek A., Beifuss U., Schmid R. D., Urlacher V. B., *Arch. Biochem. Biophys.*, 2008, 474, 213-219
- ⁸ Mogharabi M., Faramarzi M. A., *Adv. Synth. Catal.*, 2014, 356, 897-927
- ⁹ Polak J., Wilkolazka A. J., *Process Biochem.*, 2012, 47, 1295-1307
- ¹⁰ Mikolasch A., Schauer F., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, 82, 605-624
- ¹¹ Morozova O. V., Shumakovich G. P., Gorbacheva M. A., Shleev S. V., Yaropolov A. I., *Bioch. (Mosc.)*, 2007, 72 (10), 1136-1150
- ¹² Couto, S. R., Toca-Herrera, J. L., *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.*, 2006, 1 (4), 115-120
- ¹³ Viswanath B., Rajesh B., Janardhan A., Kumar A. P., Narasimha G., *Enzyme Res.*, 2014, 1-14
- ¹⁴ Margot J., Bennati-Granier C., Maillard J., Blánquez P., Barry D. A., Holliger C., *AMB Express*, 2013, 63 (3), 1-14
- ¹⁵ Rodríguez-Delgado M. M., Alemán-Nava G. S., Rodríguez-Delgado J. M., Dieck-Assad G., Martínez-Chapa S. O., Barceló D., Parra R., *TrAC*, 2015, 74, 21-45
- ¹⁶ Kumar V. V., Cabana H., *Bioresource Technol.*, 2016, 200, 81-89
- ¹⁷ Aktas N., Çiçek H, Unal A. T., Kibarer G., Kolankaya N., Tanyolaç, A., *Bioresource Technol.*, 2001, 80, 29-36
- ¹⁸ Brijwani K., Rigdon A., Vadlani. P. V., *Enzyme Res.*, 2010, 1-10
- ¹⁹ Witayakran S., Ragaukas A. J., *Adv. Synth. Catal.*, 2009, 351, 1187-1209
- ²⁰ Trubitsina L. I., Tishchenko S. V., Gabdulkhakov A. G., Lisov A. V., Zakharova M. V., Leontievsky A. A., *Biochimie*, 2015, 112, 151-159
- ²¹ Piontek K., Antorini M., Choinowski T., *J. Biol. Chem.*, 2002, 40 (277), 37663-37669
- ²² Claus H., *Micron*, 2004, 35, 93-96
- ²³ Rulíšek L., Ryde U., *Coordin. Chem. Rev.*, 2013, 257, 445-458

- ²⁴ Stoilova I., Krastanov A., Stanchev V., *Adv.Biosci. Biotechnol.*, 2010, 1, 208-215
- ²⁵ Cantarella G., Galli C., Gentili P., *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 2003, 22, 135-144
- ²⁶ Cañas A. I., Camarero S., *Biotechnol Adv.*, 2010, 28, 694-705
- ²⁷ Pereira D. G., *Quim. Nova*, 2007, 1, 171-177
- ²⁸ Barreiro E. J., Silva J. F. M., *Quim. Nova*, 1996, 19 (6), 640-650
- ²⁹ Kalgutkar A. S., Role of bioactivation in idiosyncratic drug toxicity: structure-toxicity relationships: Elfarra A. A., *Advances in Bioactivation Research*, Vol. 8, Springer, Nova Iorque, 2008, pp 27-55
- ³⁰ Park B. K., Lavery H., Srivastava A., Antoine D. J., Naisbitt D., Williams D. P., *Chem.-Biol. Interact.*, 2011, 192, 30-36
- ³¹ Pereira S. A., Wanke R., Marques M. M., Monteiro E. C., Antunes A. M. M., *Adv. Mol. Toxicol.*, ELSEVIER, 2012, vol 6
- ³² Antunes A. M. M., Novais D. A., Silva J. L. F., Santos P. P., Oliveira M. C., Beland F. A., Marques M. M., *Org. Biomol. Chem.*, 2011, 9, 7822-7835
- ³³ Antunes A. M. M., Sidarus M., Novais D. A., Harjivan S. G., Santos P. P., Silva J. L. F., Beland F. A., Marques M. M., *Molecules*, 2012, 17, 2616-2627
- ³⁴ Kelly G. S., *Altern. Med. Rev.*, 1998, 3 (2), 114-127
- ³⁵ Schmitt B., Vicenzi M., Garrel C., Denis F. M., *Redox Biology*, 2015, 6, 198–205
- ³⁶ Güngör N., Özyük M., Güçlü K., Çekiç S. D., Apak R., *Talanta*, 2011, 83, 1650-1658
- ³⁷ Andrade K. Q., Moura F. A., Santos J. M., Araújo O. R. P., Santos J. C. F. Goulart M. O. F., *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, 16, 30269-30308
- ³⁸ Rushworth G. F., Megson I. L., *Pharmacol. Ther.*, 2014, 141, 150-159
- ³⁹ Williams D., *Bionalysis*, 2010, 2 (4), 693-697
- ⁴⁰ Cai Z., Wang F., Li E., Sun J., Fang H., Xi J., Ju L., *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2015, 8 (7), 8655-8662
- ⁴¹ Smietana M., Clayette P., Mialocq P., Vasseur J-J., Oiry J., *Bioorg. Chem.*, 2008, 36, 133-140
- ⁴² Usach I., Melis V., Peris J-E., *J. Int. AIDS Soc.*, 2013, 16, 1-14
- ⁴³ Marinho A. T., Dias C. G., Pinheiro P. F., Lemos A. R., Antunes A. M. M., Marques M. M., Monteiro E. C., Miranda J. P., Pereira S. A., *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2016, 82, 147-153
- ⁴⁴ Pinheiro P. F., Marinho A. T., Antunes A. M. M., Marques M. M., Pereira S. A., Miranda J. P., *Chem.-Biol. Interact.*, 2015, 233, 115-121
- ⁴⁵ Harjivan S. G., Pinheiro P. F., Martins I. L., Godinho A. L., Wanke R., Santos P. P., Pereira S. A., Beland F. A., Marques M. M., Antunes A. M. M., *Toxicol. Res.*, 2015, 4, 1565-1577

- ⁴⁶ 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
- ⁴⁷ Riska P., Lamson M., Macgregor T., Sabo J., Hattox S., Pav J., Keirns J., *Drug Metab. Dispos.*, 1999, 27 (8), 895-901
- ⁴⁸ Erickson D. A., Mather G., Trager W. F., Levy R. H., Keirns J. J., *Drug Metab. Dispos.*, 1999, 27 (12), 1488-1495
- ⁴⁹ Dalwadi D. A., Kim S., Amdani S. M., Chen Z., Huang R-Q., Schetz J. A., *Pharmacol. Res.*, 2016, 110, 10-24
- ⁵⁰ Harjivan S. G., Wanke R., Silva J. L. F., Marques M. M., Antunes A. M. M., *Eur. J. Med. Chem.*, 2014, 74, 7-11
- ⁵¹ Bumpus N. N., *Toxicol. Appl. Pharm.*, 2011, 257, 227-234
- ⁵² Bastos M. M., Costa C. C. P., Bezerra T. C., Silva F. C., Boechat N., *Eur. J. Med. Chem.*, 2016, 108, 455-465
- ⁵³ Jiang H-Y., Zhang M-N., Chen H-J., Yang Y., Deng M., Ruan B., *Int. J. Infect. Dis.*, 2014, 25, 130-135
- ⁵⁴ Blas-García A., Apostolova N., Ballesteros D., Monleón D., Morales J. M., Rocha M., Victor V. M., Esplugues J. V., *Hepatology*, 2010, 52 (1), 115-125
- ⁵⁵ Tovar-y-Romo, L. B., Bumpus N. N., Pomerantz D., Avery L. B., Sacktor N., McArthur J. C., Haughey N. J., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2012, 343, 696-703
- ⁵⁶ Wanke R., Novais D. A., Harjivan S. G., Marques M. M., Antunes A. M. M., *Org. Biomol. Chem.*, 2012, 10, 4554-4561
- ⁵⁷ Kakuda T. N., Schöller-Gyüre M., Hoetelmans R. M. W., *Antivir. Ther.*, 2010, 15, 817-829
- ⁵⁸ Schöller-Gyüre M., Kakuda T. N., Raof A., Smedt G., Hoetelmans R. M. W., *Clin. Pharmacokinet*, 2009, 48 (9), 561-574
- ⁵⁹ Lyseng-Williamson K. A., Croxtall J. D., *Drugs Ther Perspect*, 2014, 30, 1-9
- ⁶⁰ Croxtall J. D., *Drugs*, 2012, 72 (6), 847-869
- ⁶¹ Sangurdekar D. P., Zhang Z., Khodursky A. B., *Biomed Central*, 2011, 12 (583), 1-14
- ⁶² Liu Z-Y., Wu Y., Sun Z-L., Wan L., *Biomed. Chromatogr.*, 2012, 26, 1101-1108
- ⁶³ Lai W. G., Zahid N., Uetrecht J. P., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1999, 291, 292-299
- ⁶⁴ Lovatt P., *Nurse Prescribing*, 2010, 8 (7), 330-332
- ⁶⁵ Damsten M. C., Vlieger J. S. B., Niessen W. M. A., Irth H., Vermeulen N. P. E., Commandeur J. N. M., *Chem. Res. Toxicol.*, 2008, 21, 2181-2187
- ⁶⁶ Klopčič I., Poberžnik M., Mavri J., Dolenc M. S., *Chem.-Biol. Interact.*, 2015, 242, 407-414

- ⁶⁷ Ghanem C. I., Pérez M. J., Manautou J. E., Mottino A. D., *Pharmacol. Res.*, 2016, 109, 119-131
- ⁶⁸ Bennett S., *Nurse Prescribing*, 2013, 11 (1), 28-33
- ⁶⁹ Bozimowski G., *AANA J. Course*, 2015, 83 (6), 425-433
- ⁷⁰ Pacifici G. M., Allegaert K., *Curr. Ther. Res.*, 2015, 77, 24-30
- ⁷¹ Khayyat A., Tobwala S., Hart M., Ercal N., *Toxicol. Lett.*, 2016, 241, 133-142
- ⁷² Trettin A., Batkai S., Thum T., Jordan J., Tsikas D., *J. Chromatogr. B*, 2014, 963, 99-105
- ⁷³ Bessems J. G. M., Vermeulen N. P. E., *Crit. Rev. Toxicol.*, 2001 (1), 31, 55-138
- ⁷⁴ Alkharfy K. M., Frye R. F., *J. Chromatogr. B*, 2001, 753, 303-308
- ⁷⁵ Siemionow K., Teul J., Dragowski P., Palka J., Milyk W., *Adv. Med. Sci.*, 2016 (2), 61, 325-330
- ⁷⁶ Bektur N. E., Sahin E., Bayucu C., Unver G., *Toxicol. Ind. Health*, 2016, 32 (4), 589-600
- ⁷⁷ Terneus M. V., Kiningham K. K., Carpenter A. B., Sullivan S. B., Valentovic M. A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2007, 320 (1), 99-107
- ⁷⁸ Morozova O. V., Shumakovich G. P., Shleev S. V., Yaropolov Y. I., *Appl. Biochem. Micro+*, 2007, 43 (5), 523-535
- ⁷⁹ Damsten M. C., Commandeur J. N. M., Fidder A., Hulst A. G., Touw D., Noort D., Vermeulen N. P. E., *Drug Metab. Dispos.*, 2007, 35 (8), 1408-1417
- ⁸⁰ Mutlib A. E., Shockcor J., Espina R., Graciani N., Du A., Gan L-S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2000, 294 (2), 735-745
- ⁸¹ Chirivì C., Fontana G., Monti D., Ottolina G., Riva S., Danieli B., *Chem.-Eur. J.*, 2012, 18, 10355-10361
- ⁸² Antunes A. M. M., Godinho A. L. A., resultados não publicados
- ⁸³ Britovsek G. J. P., England J., White A. J. P., *Inorg. Chem.*, 2005, 44 (22), 8125-8134
- ⁸⁴ Toflund H., Pedersen E., Yde-Andersen S., *Acta Chem. Scand. A*, 1984, 38 (9), 693-697
- ⁸⁵ Boysen G., Georgieva N. I., Upton P. B., Walker V. E., Swenberg J. A., *Chem.-Biol. Interact.*, 2007, 166, 84-92
- ⁸⁶ Perrin, D. D. Armarego, W. L. F. Perrin, D. R. *Purification of Laboratory Chemicals*, 3^a ed., Pergamon Press: Oxford, UK, 1988, pp 1-391