

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



Avaliação da toxicidade do fármaco anti-
VIH Nevirapina: Formação de adutos do
tipo fármaco-proteína

Ana Lúcia Aguiar Godinho

Mestrado em Bioquímica Médica

2009

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



Avaliação da toxicidade do fármaco anti-VIH
Nevirapina: Formação de adutos do tipo
fármaco-proteína

Dissertação orientada pela Prof. Doutora Alexandra Antunes
e pela Prof. Doutora Lurdes Mira

Ana Lúcia Aguiar Godinho

Mestrado em Bioquímica Médica

2009

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer à Doutora Alexandra Antunes, orientadora desta dissertação, por me ter aceitado para ingressar neste trabalho, pela excelente orientação científica, transmissão de diversos e preciosos conhecimentos, e, ainda, pela amizade, incansável apoio e, especialmente, pela constante motivação e por acreditar em mim.

À Prof. Doutora Matilde Marques por me acolher na sua equipa, pelo incentivo científico e partilha de conhecimentos, e pelo constante apoio, disponibilidade e simpatia.

Ao Doutor José Gonçalo Justino por me ter dado a conhecer a existência deste projecto de dissertação de mestrado e ter proporcionado a minha integração no mesmo. Pela disponibilidade e amizade.

À Prof. Doutora Lurdes Mira por ter aceitado ser minha orientadora interna e pela disponibilidade.

Ao Doutor Kosntatine Luzyanin pela formação em Ressonância Magnética Nuclear e pela amizade.

À Doutora Conceição Oliveira pelas análises de Espectrometria de Massa, pela disponibilidade e simpatia.

A todos os colegas do grupo VII do Centro de Química Estrutural do IST, em especial, à Inês Martins, à Shrika Guirishchandra Harjivan e à Sara Sousa, pelo companheirismo, cumplicidade, partilha de conhecimentos, apoio e amizade.

A todos os colegas do grupo II do Centro de Química Estrutural do IST pelo seu excelente acolhimento, em especial, à Ana Sofia Ferreira pela partilha de conhecimentos, disponibilidade, apoio e amizade.

A todos os meus amigos que sempre me apoiaram independentemente de tudo o resto.

Aos meus pais e irmão, um agradecimento especial, pelo incansável apoio e por estarem sempre presentes.

Os ensaios LC-MS foram obtidos no LCLEM do NÓ IST da RNEM financiado pela FCT.

As experiências de RMN foram realizadas no NÓ IST da RNEM financiado pela FCT.

Resumo

A nevirapina é um fármaco usado no tratamento da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1, da classe dos inibidores do transcriptase reverso não análogos de nucleósidos, geralmente administrado concomitantemente com outros agentes antiretrovirais. É, também, eficaz na prevenção da transmissão vertical do vírus, de mãe para filho. No entanto, a nevirapina tem apresentado graves efeitos secundários como irritações cutâneas severas a curto prazo e hepatotoxicidade verificada a longo prazo, o que levanta preocupações acerca da sua administração crónica, principalmente em casos perinatais ou pediátricos. Apesar disso, a nevirapina é ainda, o antiretroviral mais utilizado em países em desenvolvimento.

Este trabalho teve como objectivo inicial a formação e caracterização de adutos de nevirapina, derivados do metabolito 12-hidroxi-NVP com aminoácidos específicos e com o tripéptido glutationo. Os adutos com aminoácidos foram, posteriormente utilizados como padrões para avaliar a modificação *in vitro* da albumina do soro humano na presença de um derivado electrófilo do metabolito 12-hidroxi-NVP.

Nos estudos de modificação dos aminoácidos, do glutationo e da albumina do soro humano foi utilizado um modelo sintético, o 12-mesiloxi-NVP, do electrófilo identificado *in vivo* – o 12-sulfoxi-NVP. Este derivado sintético foi utilizado por ser mais estável, de mais fácil preparação e por se espera que tenha uma reactividade semelhante ao metabolito 12-sulfoxi-NVP na presença de bionucleófilos. Estas reacções foram promovidas em tampão fosfatos pH 7,4, na presença de um excesso de aminoácido (triptofano, *N*-acetil-cisteína, lisina, arginina e histidina) e do glutationo. Os adutos obtidos foram isolados por HPLC semi-preparativo e caracterizados por Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massa. No ensaio de modificação da albumina do soro humano, a proteína foi incubada a 37°C em PBS na presença do modelo electrófilo 12-mesiloxi-NVP. Após a remoção de moléculas pequenas que não reagiram, por diálise, a proteína foi hidrolisada por vários métodos químicos e por um método enzimático que envolve os enzimas Pronase E e Leucina aminopeptidase. Os aminoácidos modificados foram identificados por LC-MS, por comparação (tendo em conta o tempo de retenção e espectro de massa) com os padrões anteriormente preparados. Foram apenas identificados adutos por hidrólise enzimática, nomeadamente, o aduto com o triptofano e com a histidina.

Os resultados obtidos sugerem que a formação de adutos do tipo nevirapina-proteína possa ser um factor importante na toxicidade deste fármaco, e poderão, eventualmente, ser utilizados como biomarcadores da toxicidade da nevirapina. Como continuação deste trabalho pretende-se usar os adutos preparados com aminoácidos e com o glutationo como padrões para

a detecção da sua formação *in vivo*, em modelos animais e em indivíduos sujeitos à terapia com a nevirapina.

Palavras-chave: Toxicologia, Nevirapina, Aduto fármaco-proteína, Aminoácidos, Glutationo, Albumina do soro humano

Abstract

Nevirapine is a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor used against the human immunodeficiency virus type 1 usually administered with other antiretroviral agents. It is particularly used to prevent HIV-1 vertical (mother-to-child) transmission during pregnancy. However, it has been shown that nevirapine has serious side effects such as severe skin rash and hepatotoxicity, raising concern about its chronic administration, especially in perinatal or pediatric cases. Nevertheless, nevirapine is still the most widely used antiretroviral in developing countries.

This work was aimed at the synthesis and characterization of nevirapine (NVP) and 12-hydroxy-NVP (a nevirapine metabolite) adducts with aminoacids and glutathione (GSH). The aminoacid adducts were subsequently used as standards to evaluate the in vitro modification of human serum albumin (HSA) in the presence of an electrophilic derivative of 12-hydroxy-NVP. 12-mesyloxy-NVP, a synthetic model of 12-sulfoxy-NVP, another identified NVP metabolite, was used as a model in the modification studies of aminoacids, GSH and HSA. This synthetic derivative was used due to its higher stability, easiness of preparation and because its reactivity is expectable to be similar to that of 12-sulfoxy-NVP in the presence of bionucleophiles. These reactions were promoted in phosphate buffer pH 7.4, in the presence of an excess of aminoacid (tryptophan, N-acetyl-cysteine, lysine, arginine and histidine) and GSH. The adducts obtained were isolated by semi-preparative HPLC and characterized by Nuclear Magnetic Resonance and Mass Spectrometry. HSA modifications were performed at 37°C in PBS in the presence of the electrophile 12-mesyloxy-NVP. After removal of unreacted small molecules by dialysis the protein was hydrolyzed by several chemical methods and by an enzymatic method based on the Pronase E and Leucine aminopeptidase enzymes. The modified aminoacids were identified by LC-MS through comparison of their retention time and mass spectra with those of previously prepared standards. Protein adducts at tryptophan and histidine residues were identified using enzymatic hydrolysis.

These results suggest that the formation of nevirapine-protein adducts can be an important factor in the toxicity of this drug, and may eventually be used as biomarkers to the toxicity of nevirapine. Further more it is intended to use the prepared adducts with aminoacids and glutathione as standards to detect their formation in vivo using animal models and in individuals undergoing therapy with nevirapine.

Keywords: Toxicology, Nevirapine, Protein adducts, Aminoacids, Glutathione, Human serum albumin.

Simbologias e Notações

2-OH-NVP	5,11-dihydro—2-hidroxi-4-metil-4 <i>H</i> -dipirido[3,2- <i>b</i> :2',3'- <i>e</i>]-[1,4]diazepina-6-ona, 2-hidroxi-NVP
3-OH-NVP	11-ciclopropil-5,11-di-hidro-3-hidroxi-4-metil-6 <i>H</i> -dipirido-[3,2- <i>b</i> :2',3'- <i>e</i>][1,4] diazepina-6-ona, 3-hidroxi-NVP
4-carboxi-NVP	Ácido 4-(11-ciclopropil-5,11-di-hidro-6 <i>H</i> -dipirido[3,2- <i>b</i> :2',3' <i>e</i>][1,4] diazepina-6-ona carboxílico
8-OH-NVP	11-ciclopropil-5,11-di-hidro-8-hidroxi-6 <i>H</i> -dipirido[3,2- <i>b</i> :2',3'- <i>e</i>][1,4] diazepina-6-ona, 8-hidroxi-NVP
12-MsO-NVP	11-ciclopropil-5,11-di-hidro-4-metil-(metanossulfoximetil)-6 <i>H</i> -dipirido[3,2- <i>b</i> :2',3'- <i>e</i>][1,4]diazepina-6-ona, 12-mesiloxi-NVP
12-OH-NVP	11-ciclopropil-5,11-di-hidro-4-(hidroximetil)-6 <i>H</i> -dipirido-[3,2- <i>b</i> :2',3'- <i>e</i>] diazepina-6-ona, 12-hidroxi-NVP
12-sulfoxi-NVP	11-ciclopropil-5,11-di-hidro-4-(sulfoximetil)-6 <i>H</i> -dipirido-[3,2- <i>b</i> :2',3'- <i>e</i>] diazepina-6-ona
AcOEt	Acetato de etilo
ALT	Alanina Aminotransferase
ARV	<i>AIDS-associated Retrovirus</i>
AST	Aspartato Aminotransferase
AZT	Zidovudina
°C	grau <i>Celsius</i>
c.c.f.	Cromatografia em camada fina
CDC	<i>Central of Diseases Control and Prevention</i>
cDNA	DNA complementar
¹³ C RMN	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
Cys	Cisteína
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EM	Espectrometria de Massa
Eq.	Equivalente
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>

Gly	Glicina
GSH	Glutathione
h	Hora
HAART	<i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>
His	Histidina
HSA	<i>Human Serum Albumin</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multi Bond Correlation</i>
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
¹ H RMN	Ressonância magnética nuclear de próton
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
HSQC-TOCSY	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation-Total Correlation Spectroscopy</i>
HTLV-III	<i>Human T-cell Lymphotropic Virus-type III</i>
I. r.	Intensidade relativa
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
LAP	Leucina Amino-peptidase
LAV	<i>Lymphadenopathy-Associated Virus</i>
LC-MS	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>
LDA	Di-isopropilamido de lítio
Lys	Lisina
m	Multiplete
[M] ⁺	Íon molecular
MALDI-TOF-MS	<i>Matrix-assisted laser desorption ionisation -- Time of flight – mass spectrometry</i>
min.	Minuto
mRNA	RNA mensageiro
MoOPH	complexo hexametilfosforamida(oxodiperoxido)(piridina)molibdénio
MsCl	Cloreto de mesilo
m/z	Razão massa/carga
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> (forma reduzida)
NNRTIs	<i>Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor</i>
NRTIs	<i>Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors</i>
NtRTIs	<i>Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors</i>
NVP	Nevirapina

OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i>
p.f.	Ponto de fusão
PIs	<i>Protease Inhibitors</i>
RNA	Ácido ribonucleico
s	Singuleto
sl	Singuleto largo
SIDA	Síndrome de Imunodeficiência humana
ssRNA	<i>Single-strand RNA</i>
ssRNA-RT	<i>Single-strand RNA-Reverse Transcriptase</i>
t	Tripleto
TFA	Ácido trifluoroacético
TFAA	Anidrido trifluoroacético
THF	Tetra-hidrofurano
t _R	Tempo de retenção
TR	Transcriptase reverso
Trp	Triptofano
UV	Ultravioleta
VIH-1	Vírus da imunodeficiência humana do tipo I
VIH-2	Vírus da imunodeficiência humana do tipo II
δ	Desvio químico em relação ao tetrametilsilano
η	Rendimento
v _{máx}	Frequência do máximo de absorção em infravermelho

Índice de Matérias

Capítulo I – Introdução

I.1. Os vírus e a terapia anti-viral	2
I.2. O VIH	3
I.3. A Terapêutica	5
I.4. A Nevirapina	9
I.4.1. Efeitos tóxicos e metabolismo da NVP	11
I.5. A formação de adutos do tipo fármaco-proteína	15
I.6. Objectivos	16

Capítulo II – Resultados e Discussão

II.1. Preparação e caracterização estrutural do modelo electrófilo 12-MsO-NVP	18
II.2. Formação e caracterização estrutural de adutos a partir de aminoácidos livres e do glutationo	24
II.2.1. Caracterização estrutural do aduto Nevirapina-Triptofano	27
II.2.2. Caracterização estrutural do aduto Nevirapina- Glutationo	31
II.2.3. Caracterização estrutural do aduto Nevirapina- Cisteína	34
II.2.4. Caracterização estrutural do aduto Nevirapina-Lisina	37
II.3. Modificação da Albumina do soro humana com 12-MsO-NVP	38
II.4. Conclusões e Perspectivas futuras	42

Capítulo III – Procedimento Experimental

III.1. Reagentes, Solventes e Materiais	44
III.2. Equipamento	44
III.3. Síntese do complexo hexametilfosforamida(oxodiperoxido)(piridina)molibdénio (MoOPH)	45
III.4. Preparação de compostos derivados da Nevirapina	44
III.4.1. 11-ciclopropil-5,11-di-hidro-4-(hidroximetil)-6H-dipirido-[3,2-b:2',3'-e]diazepina-6-ona (12-OH-NVP, 15)	46

III.4.2. 11-ciclopropil-5,11-di-hidro-4-(metanossulfoximetil)-6 <i>H</i> -dipirido-[3,2-b:2',3'-e] diazepina-6-ona (12-MsO-NVP, 18)	47
III.5. Método geral para a formação de adutos a partir de aminoácidos livres e do glutationo	47
III.5.1. Reacção com Triptofano	48
III.5.2. Reacção com <i>N</i> -Acetil-Cisteína	48
III.5.2.1. Desprotecção do aduto 27	49
III.5.3. Reacção com Histidina	49
III.5.4. Reacção com Lisina	49
III.5.5. Reacção com Arginina	50
III.5.6. Reacção com Glutationo	50
III.6. Modificação da Albumina do soro humano com 12-MsO-NVP	51
III.6.1. Método I	51
III.6.2. Método II	51
III.7. Hidrólise da HSA modificada com 12-MsO-NVP	51
III.7.1. Ensaio de hidrólise com HCl	51
III.7.1.1. Temperatura a 110°C	51
III.7.1.2. Com microondas	51
III.7.2. Ensaio de hidrólise com ácido trifluoroacético/HCl na presença de ácido tioglicólico	52
III.7.3. Ensaio de hidrólise com ácido mercapto-etanossulfónico	52
III.7.4. Ensaio de hidrólise enzimática	52
III.7.5. Ensaio de hidrazinólise	52
III.8. Ensaio em branco de hidrólise da HSA	53
III.8.1. Ensaio em branco para a hidrólise com HCl	53
III.8.1.1. Temperatura a 110°C	53
III.8.1.2. Com microondas	53
III.8.2. Ensaio em branco para a hidrólise com ácido trifluoroacético/HCl na presença de ácido tioglicólico	53
III.8.3. Ensaio em branco para a hidrólise com ácido mercapto-etanossulfónico	53
III.8.4. Ensaio em branco para a hidrólise enzimática	53
III.8.5. Ensaio em branco para a hidrazinólise	53
Capítulo IV – Bibliografia	55

Índice de Figuras

Figura I.1	Representação esquemática da estrutura e composição do VIH.	3
Figura I.2	Representação esquemática do ciclo viral do VIH.	4
Figura I.3	Diferentes locais de inibição do ciclo viral do VIH-1.	5
Figura I.4	Transcriptase Reversa do VIH-1.	6
Figura I.5	Estruturas moleculares do NRTI Zidovudina (1).	7
Figura I.6	Estruturas moleculares dos NNRTI's Nevirapina (2), Efavirenz (3) e Delavirdina (4).	8
Figura I.7	Estrutura da NVP (2).	9
Figura II.1	Espectro de ¹ H RMN (A) e HMBC (B) de 12-OH-NVP (15).	20
Figura II.2	Estrutura do 12-OH-NVP (15).	20
Figura II.3	Estrutura do 12-MsO-NVP (18).	22
Figura II.4	Espectros de ¹ H-RMN (da zona dos prótons aromáticos) do aduto 25 , adquiridos a temperaturas diferentes.	26
Figura II.5	Espectro de HMBC semi-selectivo (A) do aduto 12-(triptofano-2'-il)-nevirapina (25) (B).	27
Figura II.6	Espectro de HMBC do aduto 26	30
Figura II.7	Espectro de HSQC-TOCSY do aduto 26 , destacando-se as correlações observadas para os resíduos de Cys (a vermelho), de Gly (a verde) e da unidade de GSH.	31
Figura II.8	Espectro de ¹ H RMN (A) do aduto (27) (B).	33
Figura II.9	Representação esquemática da fragmentação (A), cromatograma iónico total (B) e espectro de massa (C) obtido por LC-MS (ESI) do aduto 28	34
Figura II.10	Cromatograma iónico total da mistura reaccional (A) obtido por LC-MS (ESI), cromatograma iónico extraído (m/z 411) (B) e espectro de massa do sinal a t _R = 16 min. (C) do aduto obtido com 22	36
Figura II.11	Cromatograma iónico total obtido por LC-MS (ESI) e espectro de massa do aduto de histidina (29) sintetizado (A). Cromatograma iónico total obtido por LC-MS (ESI) e espectro de massa do aduto de triptofano (25) sintetizado (B). Cromatograma iónico total obtido por LC-MS (ESI) do hidrolisado enzimático obtido após modificação da HSA com 18	38
Figura II.12	Estrutura do aduto sintético 12-(N ^α -histidina-N1'-il)-nevirapina (29). ...	39

Índice de Esquemas

Esquema I.1	Esquema reaccional para a obtenção da NVP.....	10
Esquema I.2	Desintoxicação vs. Activação.....	14
Esquema I.3	Vias metabólicas da NVP.....	14
Esquema II.1	Reacções realizadas para a síntese do modelo electrófilo 12-MsO-NVP (18).....	18

Índice de Tabelas

Tabela I.1	Biomacromoléculas usadas como biomarcadores, a sua biodisponibilidade e <i>turnovers</i>	16
Tabela II.1	Dados espectroscópicos obtidos para o metabolito 15	21
Tabela II.2	Dados espectroscópicos obtidos para o metabolito 18	22
Tabela II.3	Comparação entre os adutos obtidos das reacções entre a NVP (2) e os aminoácidos Triptofano (19), Cisteína (23) e o tripéptido Glutationo (24).....	25
Tabela II.4	Dados espectroscópicos obtidos para o aduto 12-(triptofano-2'-il)-nevirapina (25).....	28
Tabela II.5	Dados espectroscópicos obtidos para o aduto 12-(glutatio-no-S-il)-nevirapina (26).....	32
Tabela II.6	Dados espectroscópicos obtidos para o aduto 12-(<i>N</i> ^α -acetil-cisteína-S-il)-nevirapina (27).....	35

Capítulo I - Introdução

I.1. Os vírus e a terapia anti-viral

As infecções virais permanecem como uma das mais preocupantes causas de muitas doenças humanas e de uma alta taxa de mortalidade, sem esquecer que periodicamente novos agentes infecciosos são transmitidos aos humanos a partir de outras espécies, podendo estabelecer-se na população humana.

Apesar de ser possível controlar muitas das doenças infecciosas, como a varíola, a poliomielite ou a febre-amarela, assim como infecções virais mais comuns, principalmente das crianças, a varicela, o sarampo ou a rubéola, através de vacinas seguras e eficazes, existem muitas outras infecções virais que, actualmente, não podem ser prevenidas por vacinação, como o vírus da imunodeficiência humana (VIH), da hepatite C, da dengue ou da hepatite E [1], nem curadas.

A principal dificuldade em conseguir vacinas eficazes e seguras ou anti-virais de utilidade clínica prende-se com as próprias características gerais dos vírus, principalmente o seu carácter de parasita intracelular estrito; o uso do sistema metabólico celular do hospedeiro na sua propagação e a dificuldade na avaliação dos fármacos (os resultados *in vitro* não se observam necessariamente *in vivo*).

Assim sendo, e porque o nosso arsenal antiviral continua inadequado em demasiados aspectos, a procura de novos compostos antivirais e de novas estratégias de prevenção e tratamento antiviral continuam a ser essenciais e indispensáveis. Uma das estratégias utilizadas envolve o desenvolvimento de inibidores do ciclo de propagação viral. Para isso há que compreender os eventos que ocorrem durante a infecção viral a nível molecular, assim como a própria natureza dos vírus.

Os vírus podem-se definir como uma associação de ácido nucleico e proteínas e alternam de estados extracelular (virião) para intracelular, no qual depende do hospedeiro. Os vírus podem ser classificados conforme a sua morfologia, o seu genoma ou conforme o hospedeiro [2].

A propagação viral é de uma maneira geral semelhante para todos os vírus com algumas variantes conforme o ciclo de propagação viral, morfologia, genoma e hospedeiro. Genericamente as fases da propagação viral susceptíveis de serem alvo de agentes antivirais são a ligação à célula hospedeira, a entrada na célula, a replicação, a maturação e a libertação [2].

I.2. O VIH

O VIH é um retrovírus de ssRNA-RT (*single strand* RNA associado ao enzima transcriptase reverso), que pertence ao género *Lentivirinae*, um género de vírus lentos caracterizados por um longo período de incubação. Existem duas espécies de VIH, o VIH-1 e o VIH-2. Ambos os vírus têm o mesmo modo de transmissão e estão associados a infecções oportunistas e à Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA). No entanto, as pessoas infectadas com VIH-2 parecem desenvolver uma imunodeficiência mais lenta e suave no início, apesar de, à medida que a doença evolui, a infecção aumenta em menos tempo do que em pacientes com VIH-1 [3].

O VIH tem uma estrutura esférica com duas cópias do ssRNA, do TR, de proteases, ribonucleases e um integrase dentro da cápside composta por proteína viral p24. A cápside está envolta por uma matriz proteica composta pela proteína viral p17 que assegura a integridade do virião. Esta matriz é rodeada pelo envelope viral que é composto por uma membrana dupla fosfolipídica com glicoproteínas na superfície (gp41 e gp120), responsáveis pela ligação aos co-receptores da célula hospedeira (**Figura I.1**) [4, 5], o primeiro passo na infecção pelo VIH.

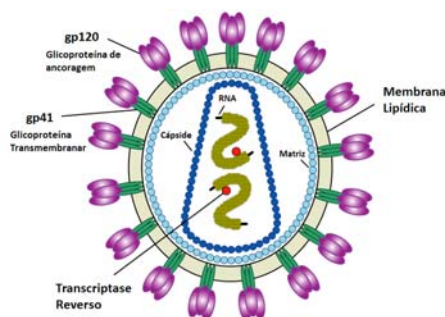


Figura I.1 | Representação esquemática da estrutura e composição do VIH. Adaptado de [6].

Após a ligação à célula hospedeira seguida da sua penetração o envelope viral funde-se com a membrana celular e a cápside é libertada para o meio intracelular [6]. O RNA viral e os vários enzimas presentes são injectados na célula transportados via microtúbulos para o núcleo. O RNA viral é transcrito pelo TR numa cadeia dupla de cDNA que é, depois, integrada no genoma da célula hospedeira. O processo de retrotranscrição reversa é extremamente propenso à ocorrência de erros, resultando numa elevada mutabilidade viral, que pode provocar resistência aos fármacos ou a invasão do sistema imunitário do organismo. A integração do DNA viral no genoma da célula hospedeira é realizado pela acção de um integrase. Sempre que ocorra replicação deste DNA e transcrição em mRNA, toda a maquinaria metabólica do hospedeiro é utilizada para produzir novas partículas virais em que as proteínas

traduzidas, que entretanto se associaram ao RNA viral, serão libertadas pela acção de proteases virais, durante os últimos passos da propagação do VIH, a maturação e o *assembly* de novos viriões de VIH-1 [8] (Figura I.2 [9]).

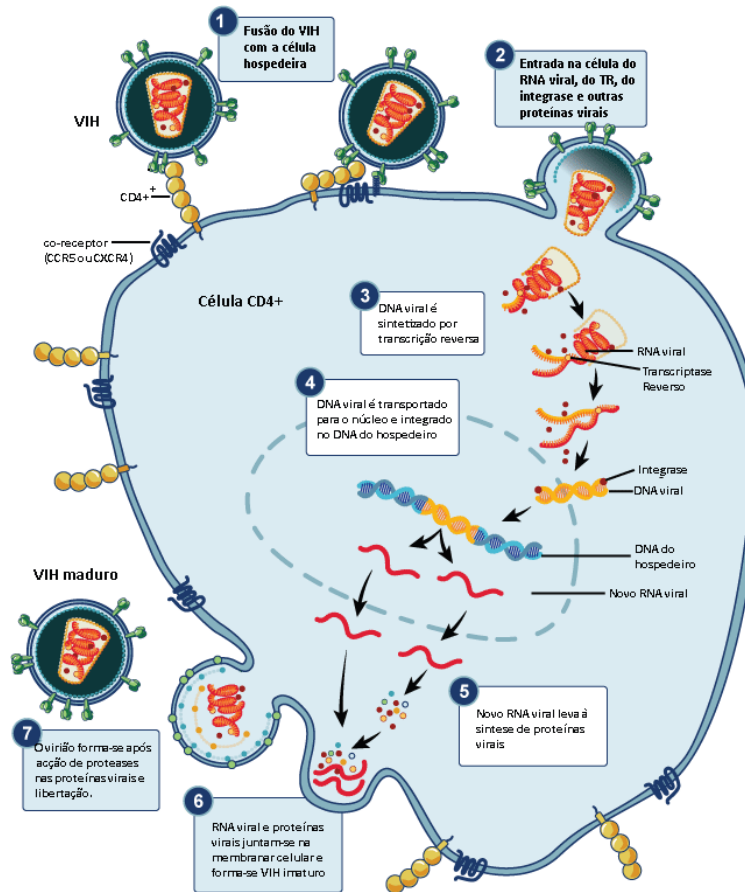


Figura I.2 | Representação esquemática do ciclo viral do VIH. Adaptado de [9].

Para a transmissão do VIH-1 foram identificadas três vias principais: a sexual; através do sangue ou derivados sanguíneos; e a transmissão vertical (de mãe para filho) [6].

Assim que o VIH-1 entra no sangue de um organismo vivo começa a deteriorar o sistema imunitário ao usar a agressiva resposta imunológica do corpo infectado para infectar, replicar-se e matar as células do sistema imunitário. O VIH-1 ataca especificamente as células T CD4+. Quando isso acontece, as células T CD4+ são activadas e levam ao despoletar da imunidade humoral e mediada por células, ou seja, são o arranque da imunidade adaptativa do organismo, a primeira linha de ataque, daí a sua regulação ser essencial [10]. A gradual destruição do sistema imunitário e eventual destruição de órgãos linfáticos e imunológicos pelo VIH-1 provoca a imunodeficiência que acaba por conduzir à SIDA. O mecanismo pelo qual o VIH-1 infecta as células do hospedeiro inclui quatro períodos principais: o período de incubação, fase assintomática que dura geralmente duas a quatro semanas; o período de

infecção aguda, de rápida replicação viral acompanhado de um decréscimo significativo das células T CD4+; o período de latência, de poucos ou nenhuns sintomas que pode durar desde duas semanas a vinte anos ou mais; e, por fim, a SIDA, o período final da infecção caracterizada por sintomas de várias doenças oportunistas (infecciosas e tumorais), que são a maior causa de morbidade e mortalidade entre os indivíduos infectados com VIH-1 [11].

A única forma de detectar uma infecção por VIH-1 é efectuar um teste para o vírus, dado que os sintomas e os períodos de latência variam de pessoa para pessoa e que é usual que alguns indivíduos não tenham sintomas durante muitos anos.

A CDC definiu a SIDA como o resultado da infecção por VIH quando a quantidade de células CD4+ não chega a 200/mm³ e/ou quando há desenvolvimento de determinadas doenças oportunistas [11,12]. A Organização Mundial de Saúde (OMS) considerou a SIDA como uma pandemia na população humana [13].

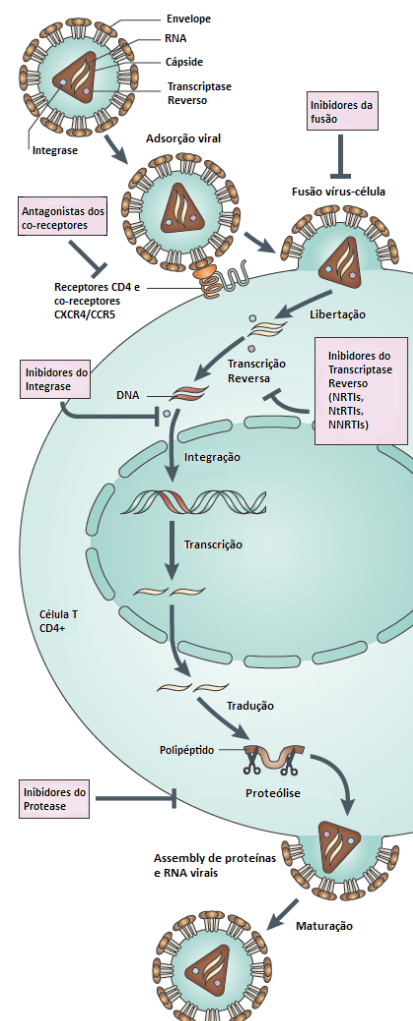
O desenvolvimento de novos tratamentos mais eficazes e seguros tem baixado substancialmente o número de mortes onde os fármacos estão disponíveis.

I.3. A Terapêutica

Actualmente não há vacina nem cura para a infecção por VIH ou para a SIDA. O único método conhecido de prevenção é evitar a exposição ao vírus. Desde a descoberta do VIH em 1984, e portanto do seu mecanismo de acção e ciclo de proliferação viral, que o tratamento se tem focado no desenvolvimento de fármacos que vão actuar neste, de modo a bloqueá-lo em diferentes passos e assim diminuir os seus níveis no sangue e a infecção de mais células [14,15] (**Figura I.3**).

Figura I.3 | Diferentes locais de inibição do ciclo viral do VIH-1.

Adaptado de [15].



O melhor tratamento que existe até hoje, surgido no final dos anos 90, é a terapia antiretroviral altamente activa ou HAART (do inglês *Highly Active Antiretroviral Therapy*). Este tratamento consiste num *cocktail* ou combinações de pelo menos três fármacos pertencendo a pelo menos duas classes diferentes de agentes antiretrovirais.

Estes fármacos antiretrovirais são classificados segundo o seu alvo entre os diferentes passos do ciclo viral do VIH. Existem cinco classes que incluem: os inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleósidos/nucleótidos ou NRTIs/NtRTIs (do inglês *Nucleoside/Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors*); os inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleósidos/nucleótidos ou NNRTIs (do inglês *Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor*); inibidores de protease ou PIs (do inglês *Protease Inhibitors*); inibidores da penetração viral; e inibidores do integrase. Geralmente a terapia HAART é composta por dois NRTIs e um PI ou um NNRTI.

Os NRTIs foram os primeiros fármacos anti-VIH descobertos. O seu alvo é o TR, que oferece dois locais de inibição: o local de ligação ao substrato e o centro alostérico (que difere do local de ligação ao substrato apesar de estarem próximos).

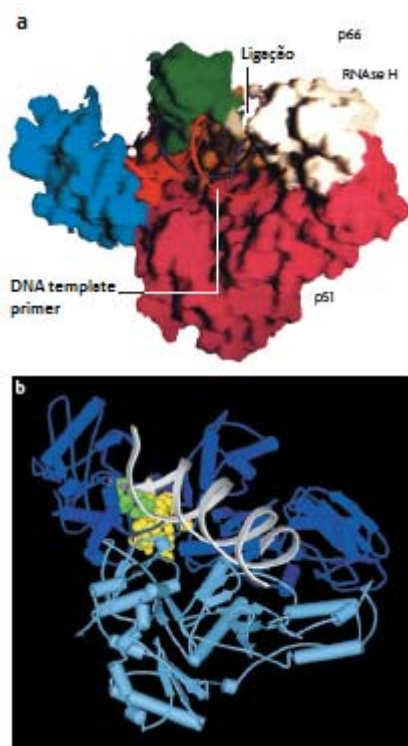


Figura 1.4 | Transcriptase Reversa do VIH-1. **a** | Estrutura tridimensional do Transcriptase Reversa do VIH-1. **b** | Complexo do Trancriptase Reversa com um *template primer* de DNA (cadeia a branco). O heterodímero do TR consiste na subunidade p66 (azul escuro) e p51 (azul claro). Os dois íões de magnésio no centro activo estão representados como bolas púrpuras. As cadeias laterais dos aminoácidos do centro activo estão representadas a verde como esferas *van der Waals*. Os resíduos de ligação dos NNRTI's ao centro alostérico estão representados a amarelo como esferas *van der Waals*. Adaptado de [15].

Os NRTIs são pró-fármacos e requerem três passos de fosforilação catalisados por cinases celulares para serem convertidos à sua forma activa. Os metabolitos activos vão actuar

como inibidores competitivos ou como substratos alternativos em relação aos nucleósidos levando à terminação da elongação da cadeia de DNA. Exemplo deste tipo de fármacos são a zidovudina (AZT, **1**, **Figura 1.5**), o primeiro fármaco anti-VIH aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) e o abacavir [15].

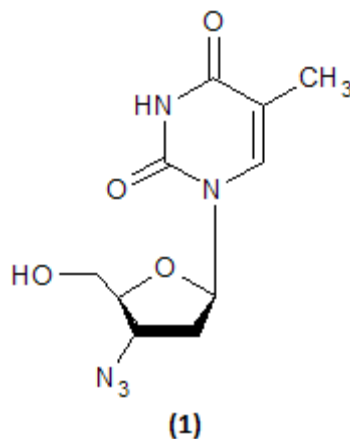


Figura 1.5 | Estruturas moleculares do NRTI Zidovudina (**1**).

Os NtRTIs têm um modo de acção semelhante aos análogos de nucleósidos mas a presença do grupo fosfonato implica apenas dois passos de fosforilação para a activação do fármaco. Assim são capazes de ultrapassar o passo de fosforilação do nucleósido que pode limitar a actividade do fármaco, para além de não estarem sujeitos à acção de esterases que normalmente convertem o nucleósido monofosforilado em nucleósido, algo que não acontece tão facilmente com o grupo fosfonato. Um exemplo deste tipo de fármaco é o tenofovir.

Os NNRTIs foram descobertos em 1990 e têm como alvo o centro alostérico do TR apenas da subespécie VIH-1, que fica exposto após a sua ligação ao substrato, e a que se ligam levando a uma alteração conformacional do enzima, inibindo, assim, a sua actividade. Daí estes fármacos não serem eficazes contra a subespécie VIH-2 pois esta tem um centro alostérico com conformação diferente. A sua ligação ao TR é directa e leva a uma inibição não competitiva da sua actividade [15,16]. Estes fármacos são muito importantes na terapêutica HAART em pacientes que vão tomar a primeira medicação devido à sua potência, segurança e fácil dosagem. No entanto, a relativa rápida ocorrência de resistências, resultantes de mutações no centro alostérico onde os NNRTIs se ligam, torna-se numa séria e recorrente limitação. Exemplos destes fármacos são a nevirapina (**2**), o efavirenze (**3**) e a delavirdina (**4**). Apesar de terem o mesmo mecanismo de acção estes compostos são muito diferentes estruturalmente e apresentam diferentes características farmacocinéticas (**Figura 1.6**). Todos são metabolizados pelo citocromo P450 (CYP450) pelo que têm um significado clínico relevante quanto à interacção com outros fármacos, principalmente antiretrovirais [16,17].

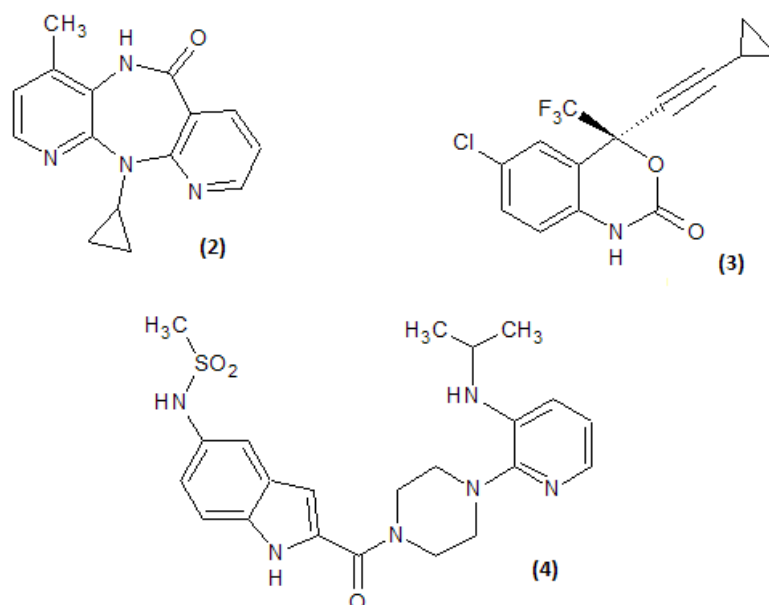


Figura I.6 | Estruturas moleculares dos NNRTI's Nevirapina (2), Efavirenz (3) e Delavirdina (4).

Os PIs, como o nome indica, têm com alvo o protease do VIH. Estes fármacos foram inicialmente introduzidos na terapia HAART, mas retirados mais tarde devido aos seus adversos efeitos secundários e problemas de dosagem. Mais tarde com o aparecimento dos NNRTIs foram substituídos por estes. No entanto, novos PIs, que ultrapassem estes problemas e que tenham actividade contra resistências virais, estão em desenvolvimento. Os PIs usados actualmente são considerados peptidomiméticos – contêm um grupo hidroxietileno que substitui a ligação peptídica duma das proteínas que a protease vai clivar em proteínas da cápside maduras e enzimas. Os PIs vão, então, competir com o substrato para o protease e acabam por se ligar a este inibindo a sua actividade enzimática. Exemplos destes fármacos são o saquinavir, o ritonavir ou o lopinavir.

Os inibidores da penetração viral podem interagir com a fusão da partícula viral com a membrana celular ou com a sua ligação aos co-receptores celulares.

Os inibidores da fusão do VIH são péptidos que correspondem a precursores glicoprotéicos do envelope do VIH-1. O enfuvirtide foi o primeiro inibidor de fusão a ser aprovado e por ser de natureza proteica é injectado subcutaneamente duas vezes por dia, geralmente combinado com o regime HAART [15].

Os antagonistas dos co-receptores celulares (as quimiocinas CCR5 e CXCR4) para o VIH, são pequenas moléculas que inibem a infecção da célula hospedeira com o vírus VIH-1. Exemplos deste tipo de fármacos são o mozobil, maraviroc e o vicriviroc.

Os inibidores do integrase inibem a reacção de transferência da cadeia de DNA no processo de integração, um passo crucial na manutenção estável do genoma viral, assim como

expressão e replicação viral eficaz. Estes fármacos têm demonstrado uma enorme potencialidade. Entre eles encontram-se o raltegravir e o elvitegravir.

Novas classes de fármacos anti-VIH começaram a surgir, de modo a ultrapassar as resistências criadas pelos fármacos já usados, e procuram actuar noutros locais do ciclo de vida do VIH. São eles, por exemplo, os inibidores da maturação do VIH [15].

I.4. A 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, **2**) foi o primeiro fármaco anti-VIH-1 da classe dos NNRTIs a ser aprovado. Com o nome comercial de *Viramune*[®] fabricado na farmacêutica Boehringer Ingelheim, foi aprovado pela FDA em 21 de Junho de 1996 para adultos e a 11 de Setembro de 1998 para crianças [18, 19]. Só em 1997 é que foi aprovado na Europa [19]. A NVP foi descoberta por Hargrave e colaboradores, também, na Boehringer Ingelheim [20].

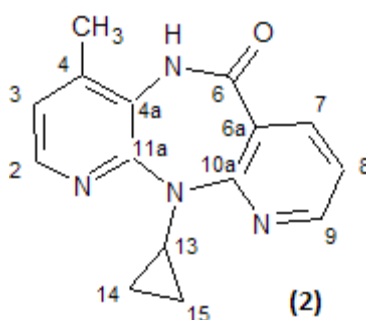
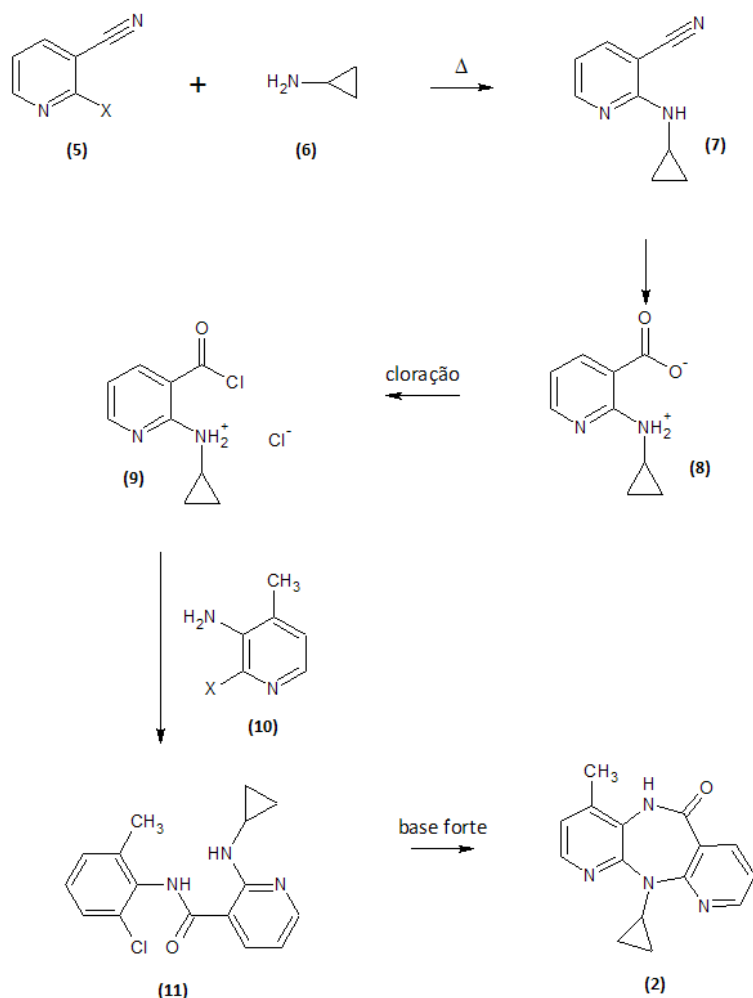


Figura I.7 | Estrutura da NVP (**2**).

A NVP (**2**) pode ser sintetizada de acordo com vários processos desenvolvidos desde a sua descoberta. Actualmente o melhor processo descrito para a síntese da NVP é o do **Esquema I.1** [21], que envolve a piridina **5** num primeiro passo de amidação por reacção com a ciclopropilamina **6**, sob aquecimento, seguida de hidrólise ácida ficando na forma zwitteriónica **8**. Este composto é isolado e clorado para dar **9**, a que é adicionada a piridina **10** levando à formação da amida **11** que com a adição de uma base forte promove a ciclização dando origem à NVP (**2**).



Esquema I.1 | Esquema reaccional para a obtenção da NVP. Adaptado de [21].

Sendo um NNRTI, a NVP está indicada para o tratamento da infecção apenas por VIH-1. No entanto, não deve ser administrada como monoterapia devido à alta, rápida e uniforme ocorrência de resistências resultantes de mutações no centro alostérico da TR, onde a NVP se liga. A NVP está, preferencialmente, indicada para a terapêutica HAART, isto é, deve ser tomada em combinação com, pelo menos, dois agentes antiretrovirais, de preferência com NRTIs. O único caso onde a NVP pode ser administrada sozinha, é a mulheres que estejam em trabalho de parto e que não estejam a ser tratadas com antiretrovirais, aos recém-nascidos, apenas uma dose oral durante as primeiras 24 horas de vida, de modo a prevenir a transmissão vertical [22] e, ainda, durante a amamentação com leite materno [23].

A acção da NVP depende de vários factores, entre eles, a farmacêutica, a farmacocinética, a farmacodinâmica e o metabolismo.

Na terapêutica HAART a NVP é administrada oralmente a 200 mg por dia durante os primeiros 14 dias de tratamento e depois a 400 mg por dia [24]. A fase farmacêutica inicia-se na boca e termina no local da absorção e transporte para o sangue.

A NVP é rápida e praticamente toda absorvida, tendo uma biodisponibilidade oral de > 90% (para uma dose de 50 mg) [25]. Uma experiência com a administração intravenosa da NVP, marcada radioativamente, a adultos saudáveis revelou que a NVP é amplamente distribuída por todos os tecidos humanos, incluindo o líquido encefaloraquidiano, o líquido amniótico, já que a NVP atravessa a placenta, e o leite materno [26].

A NVP é altamente lipofílica e não ionizável a pH fisiológico. Com uma percentagem de ligação a proteínas de transporte do plasma (por exemplo a albumina) de 50-60%, apresenta um tempo de meia-vida entre 25-30h sem sofrer alterações significativas com a ingestão de comida [16].

A NVP é um fármaco potente, que na terapia HAART em combinação com outros fármacos, como a zidovudina (1), tem demonstrado suprimir eficazmente a carga viral quando usado como primeira terapia. Como descrito acima, a NVP (2) inibe selectiva e não competitivamente a actividade enzimática do TR ao ligar-se ao seu centro alostérico, que é diferente do local de ligação ao substrato apesar de estarem perto, alterando a sua conformação tridimensional e impedindo a sua função de converter a cadeia de RNA em DNA viral diminuindo a replicação viral e, conseqüentemente, a carga viral no sangue e o número de células infectadas. A NVP (2) não compete com *templates* ou com nucleósidos trifosfatados e não inibe o TR do VIH-2 nem qualquer outro polimerase humano [27].

I.4.1. Efeitos tóxicos e metabolismo da NVP

Apesar da fácil síntese e formulação, da grande potencialidade como fármaco anti-VIH-1, da biodisponibilidade oral, boa distribuição e da elevada permanência no organismo com actividade, a NVP apresenta determinados efeitos secundários.

O efeito secundário mais comum associado à NVP (e genericamente aos NNRTIs) é irritação cutânea. As irritações cutâneas verificam-se, de uma maneira geral, dentro das primeiras seis semanas em mais de 35% de indivíduos em tratamento com NVP [19]. Geralmente estas irritações ocorrem com maior incidência em mulheres do que em homens, com maior número de células CD4+ [28]. Para além destas irritações cutâneas foram também observadas outras reacções cutâneas mais severas e fatais como o Síndrome de Stevens-Johnson, necrose epidermal tóxica e hipersensibilidade [19]. As irritações cutâneas têm sido descritas desde o início do uso da NVP (2) e de modo diminuir o risco, o fabricante (Boehringer Ingelheim) aconselha uma toma progressiva.

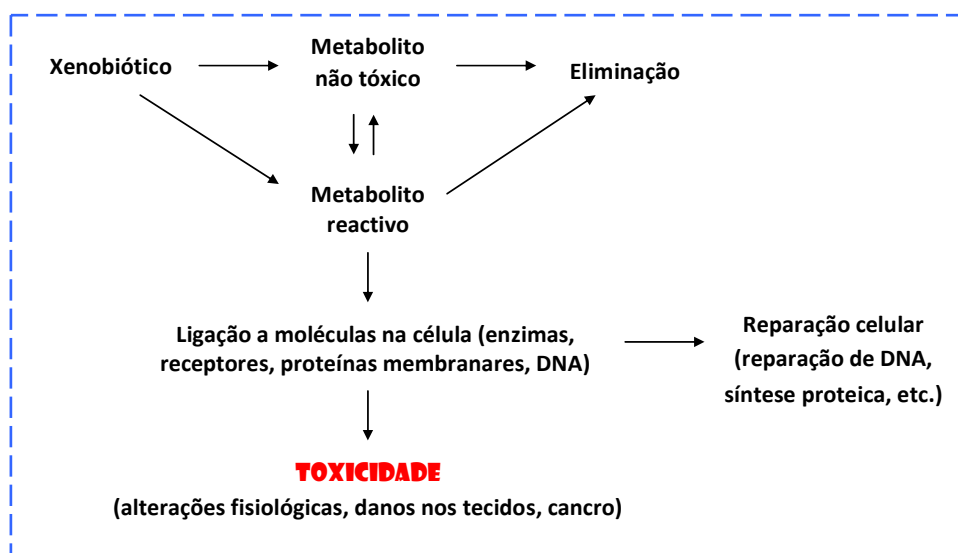
A NVP é também associada com hepatotoxicidade. Em 2000 a FDA publica um alerta avisando que a NVP (**2**) pode causar severos e irreversíveis danos no fígado que podem ser fatais [29]. Também, neste caso, estatísticas indicam maior incidência em mulheres e em indivíduos com maior número de células CD4+. Apesar de a hepatotoxicidade se verificar um pouco mais tarde desde o início do tratamento com NVP, até às 12 semanas, mas com tendência para se agravar com o tempo [30,31]. Por isso é indispensável um controlo rigoroso de alguns enzimas hepáticos (como os transaminases AST e ALT) indicadores da função hepática em todos os indivíduos que tomam NVP e caso haja o desenvolvimento de hepatite a toma de NVP deve ser permanentemente descontinuada [30,32]. Caso o indivíduo sofra de algum tipo de hepatite para além de ser VIH-1 positivo, a NVP não lhe deverá ser prescrita, já que o risco de hepatotoxicidade será ainda maior.

Estes efeitos secundários da NVP levaram as autoridades dos EUA a restringir a administração do fármaco a indivíduos com menor risco de os desenvolver, excluindo, assim mulheres com número de células CD4+ acima de 250 e homens com número de células CD4+ acima de 400 [19].

Em 2006 surge uma polémica notícia que dava conta do uso da NVP como parte do plano terapêutico financiado pelos EUA e aprovado pelo então presidente George W. Bush para a ajuda ao combate à SIDA em África, depois do alerta da FDA e deste fármaco ter sido descontinuado nos EUA. Para além deste facto, soube-se, também, que tinham sido feitos testes clínicos com a NVP no Uganda que reportaram casos de toxicidade e, pelo menos catorze mortes durante o estudo e que esta informação tinha sido censurada [33]. Esta controvérsia voltou a alertar para o uso de populações de países em desenvolvimento, especialmente em África, para testes clínicos de fármacos potencialmente tóxicos mas que por serem baratos são ainda utilizados.

Efectivamente, sabe-se que a NVP é ainda o NNRTI mais utilizado em países em desenvolvimento, nomeadamente no continente africano, o que levanta preocupações quanto à sua administração crónica especialmente a crianças.

A biotransformação dos xenobióticos, frequentemente, não resulta numa destoxicação, mas sim, numa activação, havendo um aumento da toxicidade relativamente ao composto inicial (**Esquema I.2**).



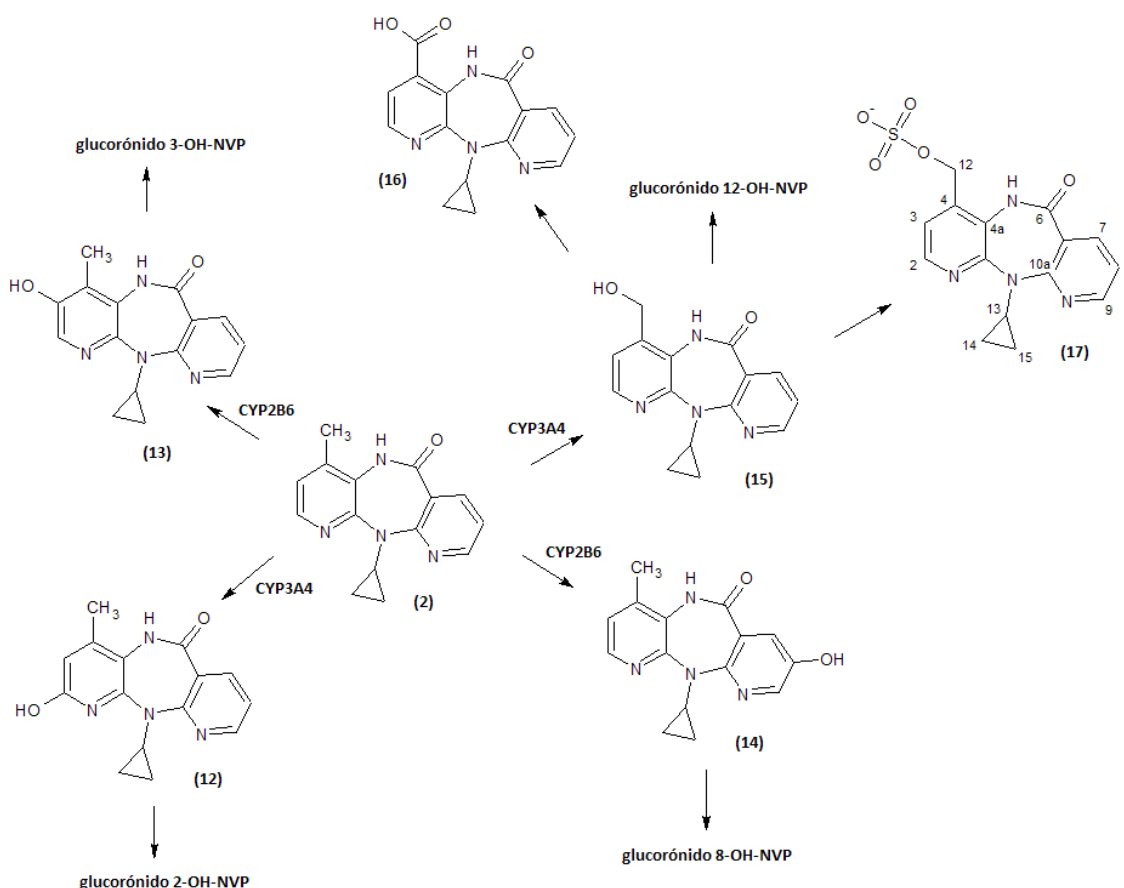
Esquema I.2 | Desintoxicação vs. Activação.

Segundo estudos *in vivo* em humanos a metabolização da NVP (**2**) ocorre principalmente via oxidação pelo CYP450 (EC 1.14.14.1), seguida de glucuronidação e excreção urinária [34]. Nesse estudo mostra-se que a NVP é oxidada numa das posições aromáticas 2- (**12**), 3- (**13**) ou 8-hidroxi-NVP (**14**) (2-, 3-, 8-OH-NVP) ou no grupo 4-metilo formando o 12-hidroxi-NVP (12-OH-NVP, **15**) que pode ser, por sua vez, oxidado a ácido carboxílico formando o 4-carboxi-NVP (**16**) (**Esquema I.3**). Noutro estudo *in vitro* com microsomas hepáticos mostrou-se que a NVP (**2**) é, principalmente, metabolizada pelo CYP3A4 e CYP2B6 [34]. Este estudo sugere que os metabolitos hidroxilados da NVP (**2**), 2- e 12-OH-NVP são exclusivamente formados pelo CYP3A4 e os 3- e 8-OH-NVP formados pelo CYP2B6, podendo o metabolito 8-OH-NVP ser, também, metabolizado pelo CYP3A4.

Sendo a NVP (**2**) um indutor dos isoenzimas CYP3A4 e CYP2B6, vai diminuir a concentração e, conseqüentemente, atenuar o efeito terapêutico de outros fármacos que sejam também metabolizados por estas enzimas da Fase I. Além disso, estudos revelam que a NVP pode, também, actuar como inibidor, pelo menos do isoenzima CYP3A4, apesar de tal só se ter verificado com concentrações muito elevadas comparadas com as doses terapêuticas [34]. O efeito indutor que a NVP exerce sobre os isoenzimas CYP3A4 e CYP2B6 pode dar-se da mesma maneira com outros fármacos, alterando a concentração de NVP no plasma, seja ele indutor ou inibidor.

Todos os grupos hidroxilo poderão sofrer conjugação, sendo a excreção urinária dos derivados glucorónicos a maior via de eliminação da NVP (**2**). O derivado 12-sulfoxi-NVP (**17**) foi recentemente detectado por LC-MS em extractos urinários de ratos tratados com 12-OH-

NVP (**15**) [28]. Por outro lado, à semelhança de outros fármacos [35], é concebível que os metabolitos fenólicos da NVP sofram reacções de oxidação a quinonas e semi-quinonas [36].



Esquema I.3 | Vias metabólicas da NVP. Adaptado de[26].

A activação dos xenobióticos poderá resultar na formação de metabolitos reactivos, normalmente derivados electrófilos, susceptíveis de estabelecer ligações com biomacromoléculas como proteínas ou DNA, formando adutos covalentes que poderão estar na génese de eventos (geno)tóxicos [37]. Para além disso, existem estudos que associam a bioactivação e a formação de adutos à toxicidade de fármacos [38], isto é, se todos os mecanismos de reparação celular falharem, a célula é conduzida à toxicidade (**Esquema I.2**).

Assim, todos os metabolitos da NVP (**2**) poderão, sob a acção de enzimas da fase II, dar origem a electrófilos capazes de reagir com bionucleófilos, levando à formação de adutos de proteínas ou DNA, que poderão estar na génese da toxicidade da NVP (**2**).

I.5. A formação de adutos do tipo fármaco-proteína

Tal como já foi referido, a maioria dos adutos descritos que resultam do metabolismo de xenobióticos, envolve a ligação entre o metabolito electrófilo e proteínas ou DNA. Estas biomoléculas são nucleofílicas e capazes de reagir e formar ligações covalentes com electrófilos disponíveis. O aduto fármaco-proteína pode-se definir, então, como um complexo proteico que se forma quando o fármaco ou, mais frequentemente, os seus metabolitos electrófilos se ligam covalentemente a uma proteína [37].

Antunes *et al.* desenvolveram um trabalho pioneiro no estudo da capacidade de formação de adutos de DNA derivados do metabolito 12-OH-NVP (**15**) onde a identificação de vários adutos com nucleósidos indicam que a metabolização do composto **15** poderá contribuir para a toxicidade da NVP [39]. Resultados recentes vieram consolidar esta hipótese. Estudos efectuados com ratos sugerem que o 12-OH-NVP (**15**) é o metabolito responsável pela irritação cutânea [28,40]. Para além disso, foi já identificado por LC-MS um aduto com o glutationo (GSH) em incubações contendo NVP e microsomas suplementados com NADPH e em indivíduos infectados com VIH [41], o que é uma clara evidência de que os metabolitos da NVP têm capacidade para reagir com bionucleófilos [42].

A monitorização destes adutos fármaco-proteína torna-se indispensável. Bons métodos de separação, identificação e quantificação ajudam na caracterização e compreensão dos mecanismos envolvidos na toxicidade. Mais do que isso, é indispensável a obtenção de biomarcadores. Os biomarcadores podem-se definir como características que são objectivamente medidas e avaliadas como um indicador de processos biológicos normais, processos patogénicos ou respostas farmacológicas a intervenções terapêuticas [43]. Os biomarcadores podem-se distinguir em dois tipos: os biomarcadores de exposição e os biomarcadores de efeito. Os primeiros têm ajudado na compreensão do metabolismo em diferentes espécies e os efeitos na estabilidade química e na reparação de DNA em diferentes tecidos. Os segundos são úteis na compreensão de mutações genéticas e cromossomais em resposta a diferentes doses (relação dose-toxicidade) [44].

A importância dos adutos covalentes e dos metabolitos é sublinhada pelo facto de serem considerados biomarcadores de exposição cuja monitorização possibilita a compreensão do metabolismo em diferentes espécies e os efeitos na estabilidade química e na reparação do DNA em diferentes tecidos.

O DNA e as proteínas são o exemplo mais citado de biomacromoléculas como biomarcadores, uma vez que apresentam características que as tornam bons biomarcadores: moléculas biologicamente activas *in vivo* capazes de formar adutos estáveis que permaneçam numa concentração significativa nos tecidos. Por outro lado, a formação de adutos depende,

também, da reactividade do xenobiótico ou intermediário electrofílico e do seu tempo de meia-vida *in vivo* [45]. Entre as proteínas descritas como bons biomarcadores estão a hemoglobina e a albumina (**Tabela I.1**) [46]. Ambas apresentam propriedades vantajosas nesta área: fácil acessibilidade; possibilidade de obtenção de grandes quantidades; cinéticas e *turnovers* conhecidos; levam à formação de adutos que não são removidos por sistemas de reparação celulares, quando comparados com adutos com o DNA, e que são quimicamente estáveis [45, 46].

Tabela I.1 | Biomacromoléculas usadas como biomarcadores, a sua biodisponibilidade e *turnovers*. Adaptado de [45].

Macromoléculas	Tipo de amostra	Quantidade presente no sangue	Turnover
Hemoglobina	Hemácias	150 mg/mL	Tempo de vida:
			Humanos 126 dias
			Ratos 60 dias
			Ratinhos 40 dias
Albumina do soro humana	Plasma sanguíneo	30-45 mg/mL	Tempo de meia-vida:
			Humanos 20 dias
			Ratos 2,5 dias
			Ratinhos 1,9 dias
DNA	Leucócitos	6 mg/mL	Cinética complexa

De uma maneira geral a espectrometria de massa, quando acoplada à técnica de cromatografia de HPLC, tem sido, por excelência, o método usado na detecção e quantificação de adutos de DNA e proteicos, e mais recentemente, o uso de técnicas imunológicas e de fluorescência [45, 47].

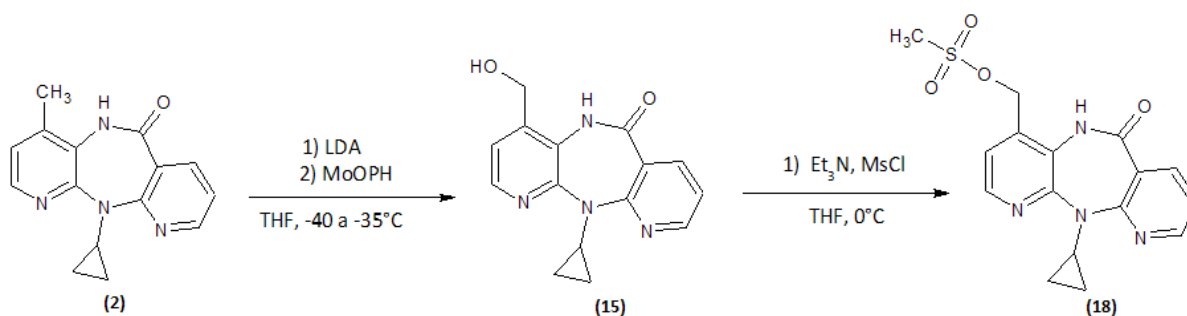
I.6. Objectivos

No presente trabalho pretendeu-se preparar e caracterizar adutos da NVP com aminoácidos específicos *in vitro*, derivados do metabolito 12-OH-NVP (**13**), que servirão, como padrões para investigar a formação dos mesmos com oligopéptidos e proteínas *in vitro*, e, posteriormente, monitorizar *in vivo* a biotransformação da NVP. Paralelamente pretendeu-se determinar quais os adutos que se formam maioritariamente *in vitro* com a albumina modificada com o derivado electrófilo da NVP.

Capítulo II – Resultados e Discussão

II.1. Preparação e caracterização estrutural do modelo electrófilo 12-MsO-NVP

Um dos objectivos deste trabalho foi a preparação e caracterização de adutos da NVP (**2**) com aminoácidos nucleófilos específicos *in vitro*, derivados do metabolito 12-OH-NVP (**15**), que servirão, como padrões para investigar a formação dos mesmos com proteínas *in vitro* e, posteriormente, monitorizar *in vivo* a biotransformação da NVP (**2**). Para isso, à semelhança do que já foi feito nos estudos de reactividade com DNA e bases de DNA [39] utilizou-se um modelo sintético do electrófilo 12-sulfoxi-NVP (**17**) identificado *in vivo* [28], o 12-mesiloxi-NVP (12-MsO-NVP, **18**). Este derivado sintético foi utilizado por ser muito estável, de fácil síntese e por se esperar que tenha uma reactividade semelhante ao do metabolito **17** na presença de bionucleófilos. A preparação do modelo electrófilo **18** foi efectuada em dois passos (**Esquema II.1**). O primeiro passo envolveu a oxidação de **2** na posição 12 para a síntese do metabolito **15**. No segundo passo o metabolito **15** foi convertido no derivado electrófilo **18** por mesilação.



Esquema II.1 | Reacções realizadas para a síntese do modelo electrófilo 12-MsO-NVP (**18**).

A oxidação da NVP (**2**) a 12-OH-NVP (**15**) foi efectuada segundo a adaptação dum método já descrito na literatura [48], envolvendo a adição de di-isopropilamido de lítio (LDA) para a formação do anião da NVP seguida da adição do agente oxidante complexo hexametilfosforamida(oxodiperoxido)(piridina)molibdénio (MoOPH). Com a adição de LDA há a formação *in situ* dos aniões nas posições 7 e 12 da NVP, sendo este último, termodinamicamente favorecido, pelo que a sua formação é conseguida com um controlo rigoroso da temperatura. De seguida o anião é directamente oxidado com MoOPH.

A formação do metabolito **15** foi realizada neste trabalho com a adição de 7,2 eq LDA à NVP dissolvida em THF a -40°C e adição de 2,0 eq de MoOPH. A mistura reaccional obtida foi purificada por cromatografia *short path*, tendo-se obtido um sólido esbranquiçado com um rendimento de 32%.

Os dados espectroscópicos do produto obtido encontram-se na **Tabela II.1** As análises dos espectros de IV, EM e RMN (¹H RMN, ¹³C RMN, DEPT, HSQC e HMBC) permitiram comprovar a formação do metabolito **15**:

- No espectro de IV observa-se a existência de uma banda a 3236 cm^{-1} concordante com a frequência de vibração da ligação O-H do grupo hidroxilo e N-H do grupo amida, e de uma banda a 1646 cm^{-1} concordante com a frequência de vibração da ligação C=O do grupo amida.
- No espectro de ^1H RMN observam-se os seguintes sinais: um singuleto a 9,72 ppm correspondente ao próton lábil da amida; sinais na zona de 8,51 a 7,19 ppm correspondentes aos cinco prótons aromáticos, evidenciando que a oxidação não ocorreu em posição aromática; um multipletto a 5,55 ppm correspondente ao próton lábil do grupo hidroxilo em posição “benzílico” destacando o acoplamento aos prótons do carbono da posição 12; dois duplos dupletos a 4,75 e 4,53 ppm correspondentes aos prótons do carbono da posição 12 (cada um destes duplos dupletos apresenta uma constante de acoplamento de 15 Hz, devido ao acoplamento geminal entre os dois prótons da posição C12 e uma constante de acoplamento de 5 Hz devido ao acoplamento com o grupo hidroxilo, evidenciando a natureza pró-quiral desta posição). A existência do anel ciclopropilo é evidenciada pela presença dos sinais entre 3,65 e 0,29 ppm (H13, 14 e 15), no espectro de ^1H RMN, e a 29,7 ppm (C13) e 9,2 e 8,9 ppm (C14 e C15) no espectro de ^{13}C RMN.
- No espectro de ^{13}C RMN observa-se o sinal de um carbono secundário a 59,3 ppm que apresenta correlação no espectro de HSQC com os dois duplos dupletos correspondentes aos sinais dos prótons do carbono da posição 12, sendo o desvio deste sinal compatível com a presença na molécula de um carbono secundário ligado a um átomo de oxigénio.
- O espectro de massa, obtido por impacto electrónico (EI), apresenta um ião molecular a m/z 282 compatível com a formação do produto hidroxilado. É possível observar um fragmento de m/z 263 que resulta da perda de uma molécula de água, a partir do ião molecular, sendo esta fragmentação característica de compostos hidroxilados [49].

A atribuição dos sinais dos espectros de ^1H RMN e ^{13}C RMN foi efectuada com base nas correlações observadas nas experiências de RMN bidimensionais heteronucleares – HSQC e HMBC, tal como já foi referido. No espectro de HSQC os prótons do carbono da posição 12 apresentam correlação com o sinal a 59,3 ppm. No espectro de HMBC os mesmos prótons apresentam correlação com dois carbonos quaternários – carbonos nas posições 4 e 4a, a 144,6 e 121,1 ppm, respectivamente – e ainda com o sinal do carbono terciário na posição 3 a 119,8 ppm. O próton do grupo hidroxilo apresenta no espectro de HMBC uma correlação, a duas ligações, com o carbono da posição 12 (59,3 ppm) e uma correlação a três ligações com o carbono na posição 4 (144,6 ppm). A atribuição dos restantes sinais foi feita de modo análogo ao descrito.

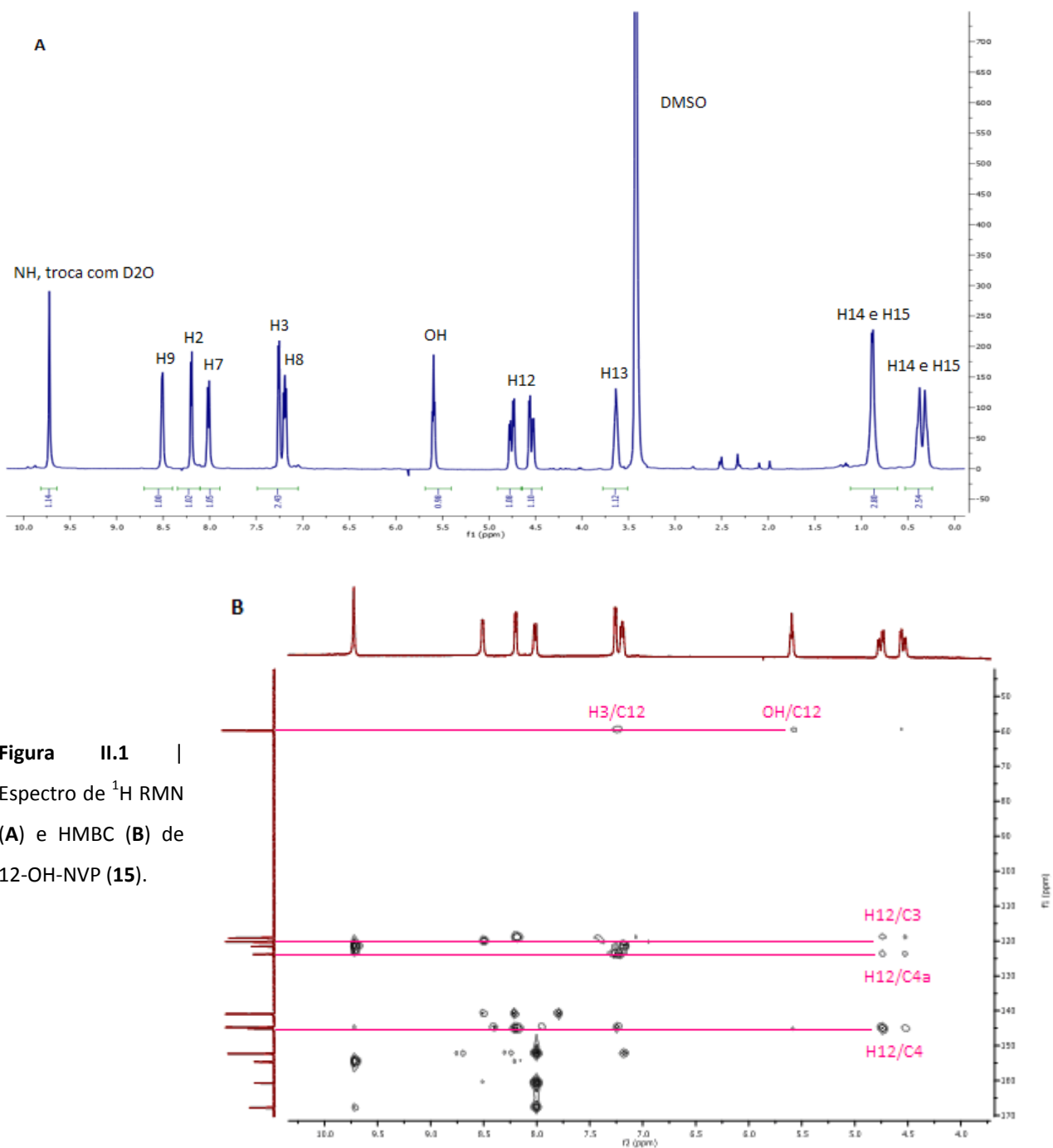


Figura II.1 | Espectro de ¹H RMN (A) e HMBC (B) de 12-OH-NVP (15).

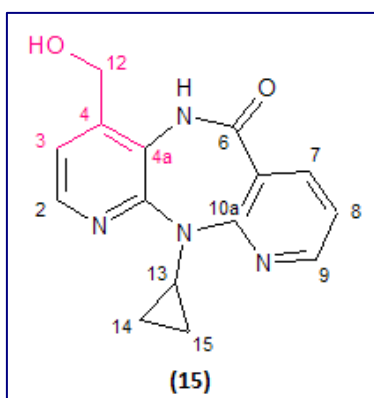


Figura II.2 | Estrutura do 12-OH-NVP (15).

Tabela II.1 | Dados espectroscópicos obtidos para o metabolito **15**.

IV (KBr)	¹ H RMN (DMSO-d ₆)	¹³ C RMN (DMSO-d ₆)	EM (EI)
$\nu_{\text{máx}} / \text{cm}^{-1}$	δ / ppm J / Hz	δ / ppm	m/z (i. r. / %)
		167,3 (C6)	
3263 O-H	9,72 (1H, s, troca com D ₂ O NH)	160,3 (C10a)	
1646 C=O	8,51 (1H, dd, J=4,8 e 1,9 H9)	154,1 (C11a)	
	8,19 (1H, d, J=4,8 H2)	151,8 (C9)	
	8,01 (1H, dd, J=7,7 e 1,9 H7)	144,6 (C4)	282 [M] ⁺ (73)
	7,25 (1H, d, J=4,8 H3)	144,3 (C2)	281 [M-H] ⁺ (42)
	7,19 (1H, dd, J=7,7 e 4,8 H8)	140,5 (C7)	263 [M-H ₂ O] ⁺ (30)
	5,55 (1H, m, OH)	123,4 (C4a)	251 [M-OH- CH ₂ (ciclopropilo)] ⁺
	4,75 (1H, dd, J=15,2 e 5,7 H12)	121,1 (C6a)	(100)
	4,53 (1H, dd, J=15,2 e 4,9 H12)	119,8 (C3)	
	3,65-3,61 (1H, m, H13)	118,7 (C8)	
	0,88 (2H, d, J=6,0 H14 ou H15)	59,3 (C12)	
	0,41-0,29 (2H, m, H14 ou H15)	29,7 (C13)	
		9,2 (C14+C15)	
		8,9 (C14+C15)	

A formação do electrófilo 12-MsO-NVP (**18**) a partir do metabolito 12-OH-NVP (**15**) foi conseguida através de uma reacção que, envolvendo a utilização de 1,1 eq. de cloreto de metanossulfonilo (MsCl) na presença de uma quantidade equimolar de trietilamina (Et₃N), levou à formação do composto **18** com um rendimento de 83%.

Os dados espectroscópicos do produto obtido encontram-se na **Tabela II.2**. Os compostos **15** e **18** são semelhantes estruturalmente excepto no grupo substituinte do carbono da posição 12, única diferença que os permitiu distinguir através de análises espectroscópicas de IV e RMN (¹H, ¹³C RMN, DEPT, HSQC e HMBC) e por EM:

- No espectro de IV observa-se o aparecimento de duas bandas a 1359 e 1177 cm⁻¹ correspondentes à frequência de vibração das ligações S=O do grupo metanossulfonilo. Observou-se também a ausência da banda correspondente à frequência de vibração da ligação O-H.
- Embora os espectros dos compostos **15** e **18** tenham sido adquiridos em solventes diferentes é notório um desvio para campo mais baixo dos sinais de ¹H RMN (de 4,75 e 4,53 ppm para 5,46 a 5,39 ppm) e ¹³C RMN (de 59,3 para 66,0 ppm) correspondentes

aos prótons e carbono da posição 12 do composto **18** quando comparado com os correspondentes ao composto **15**, devido ao efeito desblindante do grupo metanossulfonilo.

- A presença do grupo metanossulfonilo é comprovada pela existência no espectro de ^1H RMN de um singuleto a 2,78 ppm correspondente aos três prótons do grupo metilo, que no espectro de HSQC apresenta uma correlação com o sinal de um carbono primário a 38,0 ppm.
- No espectro de massa, obtido por impacto electrónico (EI), observa-se o ião molecular a m/z 360 compatível com o produto mesilado. Apresenta, ainda, dois picos a m/z 281 e m/z 265, correspondentes à perda dos radicais metanossulfonilo e metanossulfoxilo a partir do ião molecular, respectivamente.

A atribuição dos restantes sinais de ^1H RMN e ^{13}C RMN foi feita de modo análogo ao descrito para o composto anterior, tendo como base as correlações observadas no espectro de HSQC e HMBC.

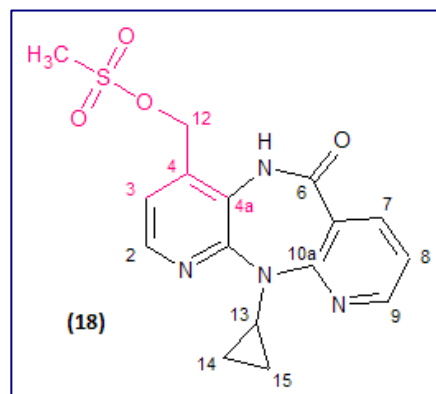


Figura II.3 | Estrutura do 12-MsO-NVP (**18**).

Tabela II.2 | Dados espectroscópicos obtidos para o metabolito **18**.

IV (KBr) $\nu_{\text{máx}} / \text{cm}^{-1}$	^1H RMN (DMSO- d_6) δ / ppm J / Hz	^{13}C RMN (DMSO- d_6) δ / ppm	EM (EI) m/z (I. r./%)
		168,2 (C6)	
		159,2 (C10a)	
	8,94 (1H, s, NH)	154,0 (C11a)	360 [M] ⁺ (10)
3191 N-H	8,56 (1H, dd, $J=4,6$ e $1,6$ H9)	151,2 (C9)	345 [M-CH ₃] ⁺ (3)
1665 C=O	8,33 (1H, d, $J=4,8$ H2)	144,4 (C2)	331 [M-H-CO] ⁺ (56)
1359 S=O	8,15 (1H, dd, $J=7,6$ e $1,5$ H7)	141,8 (C7)	281 [M-CH ₃ SO ₂] ⁺ (85)
1177 S=O	7,15 (1H, d, $J=4,9$ H3)	136,0 (C4)	265 [M-CH ₃ SO ₃] ⁺ (44)
	7,10 (1H, dd, $J=7,6$ e $4,8$ H8)	124,0 (C4a)	249 [M-CH ₃ SO ₃ - CH ₂ (ciclopropilo)- 2H(ciclopropilo)] ⁺ (100)
	5,46-5,39 (2H, m, H12)	120,5 (C6a)	
	3,75-3,70 (1H, m, H13)	119,9 (C3)	
	2,78 (3H, s, CH ₃)	119,4 (C8)	
	1,00-0,95 (2H, m, H14 ou H15)	66,0 (C12)	
	0,52-0,44 (2H, m, H14 ou H15)	38,0 (CH ₃)	
		29,9 (C13)	
		9,3 (C14+C15)	
		9,1 (C14+C15)	

II.2. Formação e caracterização estrutural de adutos a partir de aminoácidos livres e do glutationo

Para a formação dos adutos entre o modelo electrófilo 12-MsO-NVP (**18**) e o aminoácido nucleófilo é necessário, de acordo com a definição de aduto [37], o estabelecimento de uma ligação covalente entre as duas unidades. Os aminoácidos usados neste estudo de reactividade são aminoácidos com grupos nucleófilos na sua cadeia lateral, podendo assim, reagir com o 12-MsO-NVP (**18**). Os aminoácidos escolhidos foram o triptofano (Trp, **19**), a histidina (His, **20**), a arginina (Arg, **21**), a lisina (Lys, **22**) e a cisteína (Cys, **23**). Foi também testada a reactividade do modelo electrófilo **18** em relação ao tripéptido endógeno glutationo (GSH, **24**).

Anteriormente a este trabalho foram realizadas reacções de formação de adutos com alguns aminoácidos, passando por uma primeira fase de optimização das condições reaccionais [50]. As condições experimentais testadas envolveram a utilização de diferentes solventes e a variação do número de equivalentes de aminoácido utilizado. Os sistemas de solventes utilizados foram: o THF; tampão fosfatos pH 7,4/THF; água/THF; DMF; tampão fosfatos pH 7,4/DMF; água/DMF. Quanto à quantidade de aminoácido foram testados 1,0 eq, 2,0 eq, 4,0 eq e 10 eq. Os resultados obtidos revelam que o meio reaccional mais adequado é a mistura tampão fosfatos pH 7,4/ THF usando um excesso de 4,0 eq de aminoácido. Estas foram, também, as condições utilizadas neste trabalho nos ensaios de modificação dos aminoácidos e do GSH que decorreram à temperatura ambiente durante um intervalo de tempo variável (duas horas a quatro dias). Para cada caso os adutos foram isolados por HPLC semi-preparativo e, sempre que possível, foram totalmente caracterizados por RMN (^1H RMN, ^{13}C RMN, DEPT, HSQC e HMBC) e EM. No entanto, apenas foi possível caracterizar os adutos obtidos das reacções com o triptofano, cisteína e com o glutationo, devido aos restantes adutos terem sido isolados em quantidades muito baixas ($\leq 0,1$ mg).

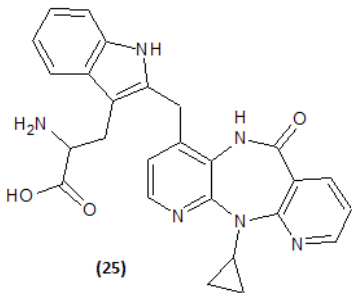
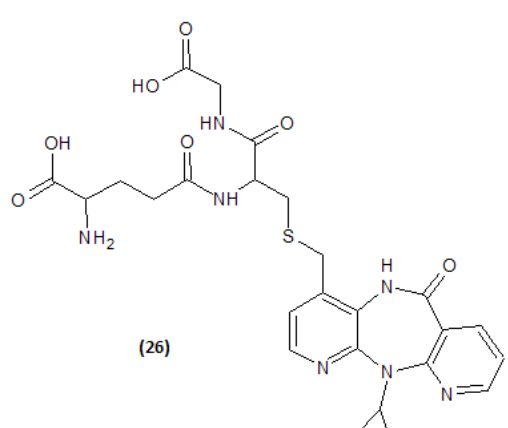
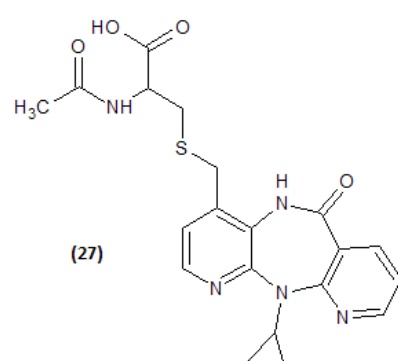
A reacção entre os compostos **18** e o **19** levou à formação de quatro produtos mas apenas o maioritário se conseguiu caracterizar completamente, dado que não se obteve quantidade suficiente dos restantes produtos para possibilitar a sua caracterização estrutural completa. O aduto maioritário foi obtido com um rendimento relativamente elevado (7%) após um tempo de reacção de 4 dias. A reacção entre os compostos **18** e **23** levou à formação de um aduto ao fim de 24h de reacção com um rendimento de 16%. A reacção entre os compostos **18** e **24** levou à formação de um aduto ao fim de 3h de reacção com um rendimento de 11%. Os rendimentos obtidos para estas reacções seguem a ordem Cys > GSH > Trp (**Tabela II.3**). Os rendimentos das reacções com a cisteína e com o glutationo estão muito próximos, o que se explica, tendo em conta, que o tripéptido glutationo possui um resíduo de cisteína na sua sequência. A cisteína possui na sua cadeia lateral um átomo de enxofre, que é

um nucleófilo mais forte do que os grupos presentes na cadeia lateral do triptofano, explicando a diferença nos rendimentos obtidos. Para todos os casos é necessário referir que os rendimentos obtidos não são só reflexo da reactividade de cada aminoácido/péptido mas, também, do processo de purificação onde é possível terem ocorrido perdas de produto. Sempre que possível caracterizados apresentavam sistematicamente o carbono da posição 12 da NVP como o átomo de ligação com o aminoácido/péptido. Esta evidência foi determinada através dos espectros de ^1H RMN de todos os adutos obtidos, onde se observa, para além de todos os protões da NVP, a ressonância dos dois protões do carbono C12 como um multiplete ou como um conjunto de dois dupletos, onde cada um corresponde a um dos protões, apresentando clara evidência do carácter não equivalente destes dois protões.

Em todos os casos a posição de ligação do aminoácido foi determinada tendo como base as correlações a três ligações observadas no espectro de HMBC entre os protões da posição C12 e os carbonos do aminoácido.

Para as reacções com a His, a Arg e a Lys, a quantidade de suposto aduto isolado não foi a suficiente para uma análise por RMN. Com a Lys, optou-se por analisar a mistura reaccional por LC-EM.

Tabela II.3 | Comparação entre os adutos obtidos das reacções entre a NVP (**2**) e os aminoácidos Triptofano (**19**), Cisteína (**23**) e o tripéptido Glutationo (**24**).

Aminoácido	Nome e estrutura do aduto	Tempo de reacção	Átomo de ligação	η / %
Triptofano	 <p>(25)</p> <p>12-(triptofano-2'-il)-nevirapina (25)</p>	4 dias	Átomo de carbono da posição 2' do Trp – átomo do carbono da posição 12 da NVP (2)	7
Glutationo	 <p>(26)</p> <p>12-(glutathione-S-il)-nevirapina (28)</p>	3h	Átomo de enxofre da Cys – átomo de carbono da posição 12 da NVP (2)	11
N-acetil-cisteína	 <p>(27)</p> <p>12-(N^α-acetil-cisteína-S-il)-nevirapina (27)</p>	24h	Átomo de enxofre da Cys – átomo de carbono da posição 12 da NVP (2)	16

II.2.1. Caracterização estrutural do aduto Nevirapina-Triptofano

O triptofano é um dos três aminoácidos aromáticos, sendo os outros dois a tirosina e a fenilalanina. Devido a esta característica a detecção e separação dos adutos por HPLC foi facilitada. Apesar da presença da NVP (**2**) que por possuir grupos aromáticos, absorve radiação UV, o aduto formado apresenta um espectro de absorção característico com um máximo de absorvência a 282 nm, compatível com a presença do aminoácido triptofano que absorve a 280 nm [51].

O produto maioritário obtido foi identificado como 12-(triptofano-2'-il)-nevirapina (**25**) com base nos resultados obtidos por RMN e EM.

- A primeira evidência para a formação deste aduto foi obtida por EM onde o espectro obtido por *electrospray*, apresenta a molécula protonada a m/z 469, compatível com a presença do aduto **25** (Tabela II.4).
- Os espectros de ^1H e ^{13}C RMN confirmam a presença das unidades de NVP (**2**) e do aminoácido triptofano (Tabela II.4). Nestes espectros os sinais aparecem duplicados o que sugere a presença de rotâmeros. Para testar esta hipótese adquiriram-se espectros de ^1H RMN a várias temperaturas (25 a 70°C) (Figura II.4). Com o aumento da temperatura observa-se a coalescência dos sinais duplicados, comprovando a hipótese inicial.

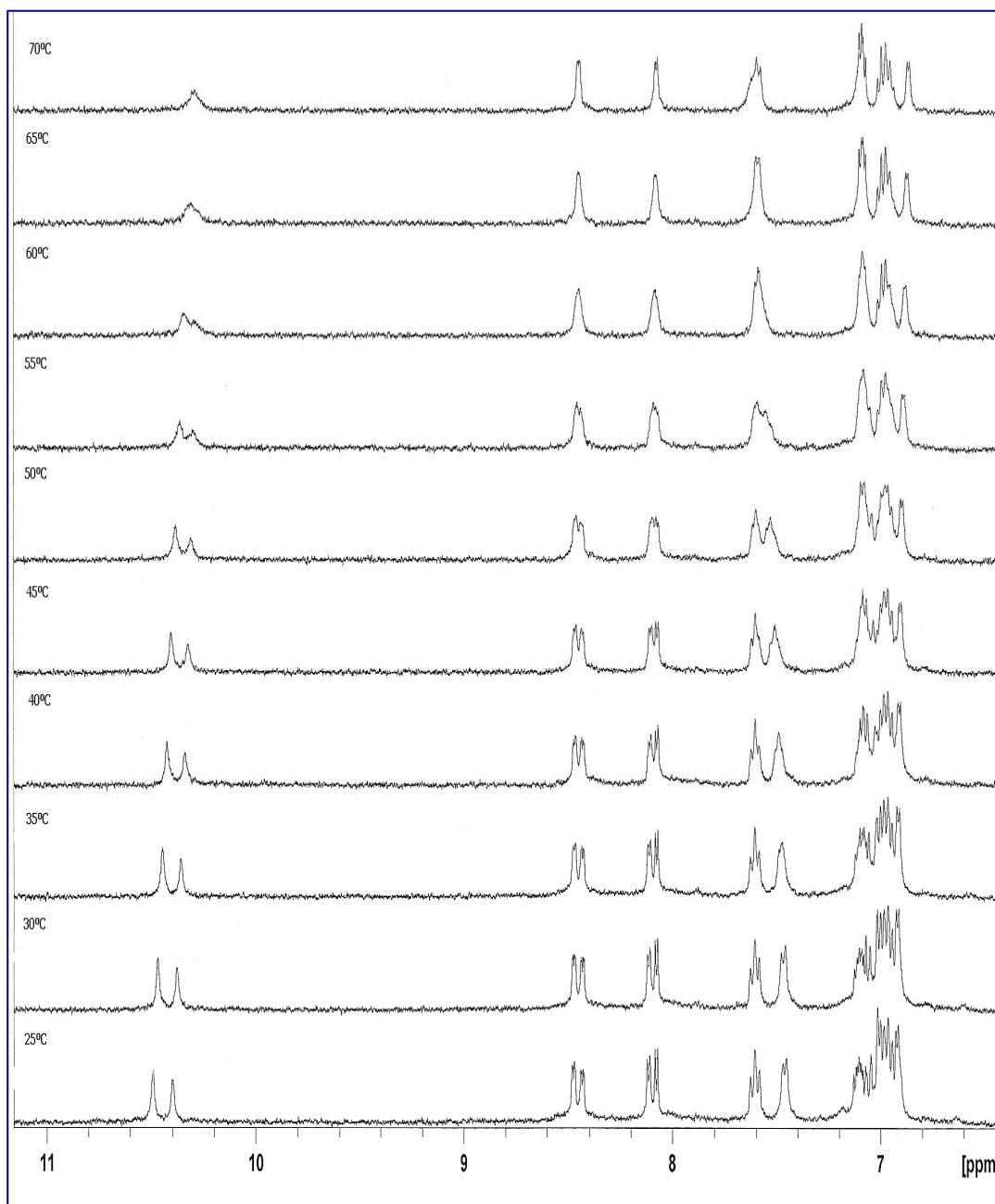


Figura II.4 | Espectros de ¹H-RMN (da zona dos prótons aromáticos) do aduto **25**, adquiridos a temperaturas diferentes.

O aduto **25** possui a ligação covalente formada entre o carbono da posição 2 do anel índole da unidade de triptofano e o carbono da posição 12 da unidade de NVP (**2**). Este não era o produto que se esperaria obter mas, sim, um onde a ligação covalente ocorresse na posição N^{1'} do triptofano já que esta é a posição mais nucleófila. No entanto, o sinal correspondente ao carbono da posição 12 aparece numa zona relativamente blindada (28,2 e 28,0 ppm) não compatível com um desvio químico de uma ligação C-N (~50-40 ppm) [39]. A ligação nesta posição é ainda comprovada pela existência no espectro de HMBC de correlações entre os prótons correspondentes ao carbono C12 da unidade de NVPe dois carbonos quaternários do anel índole do triptofano, os C2 e C2' (133,8; 133,3 ppm) e os C3 e C3' (109,1 e 108,2 ppm) dos dois rotâmeros. Estas correlações são apenas possíveis se a ligação entre o Trp e o modelo electrófilo **18** se tenha estabelecido através da ligação NVP C12 – índole C2. Na **Figura II.5** mostram-se claramente as correlações referidas. A atribuição dos restantes sinais da molécula foi efectuada de modo análogo ao descrito para os compostos anteriores.

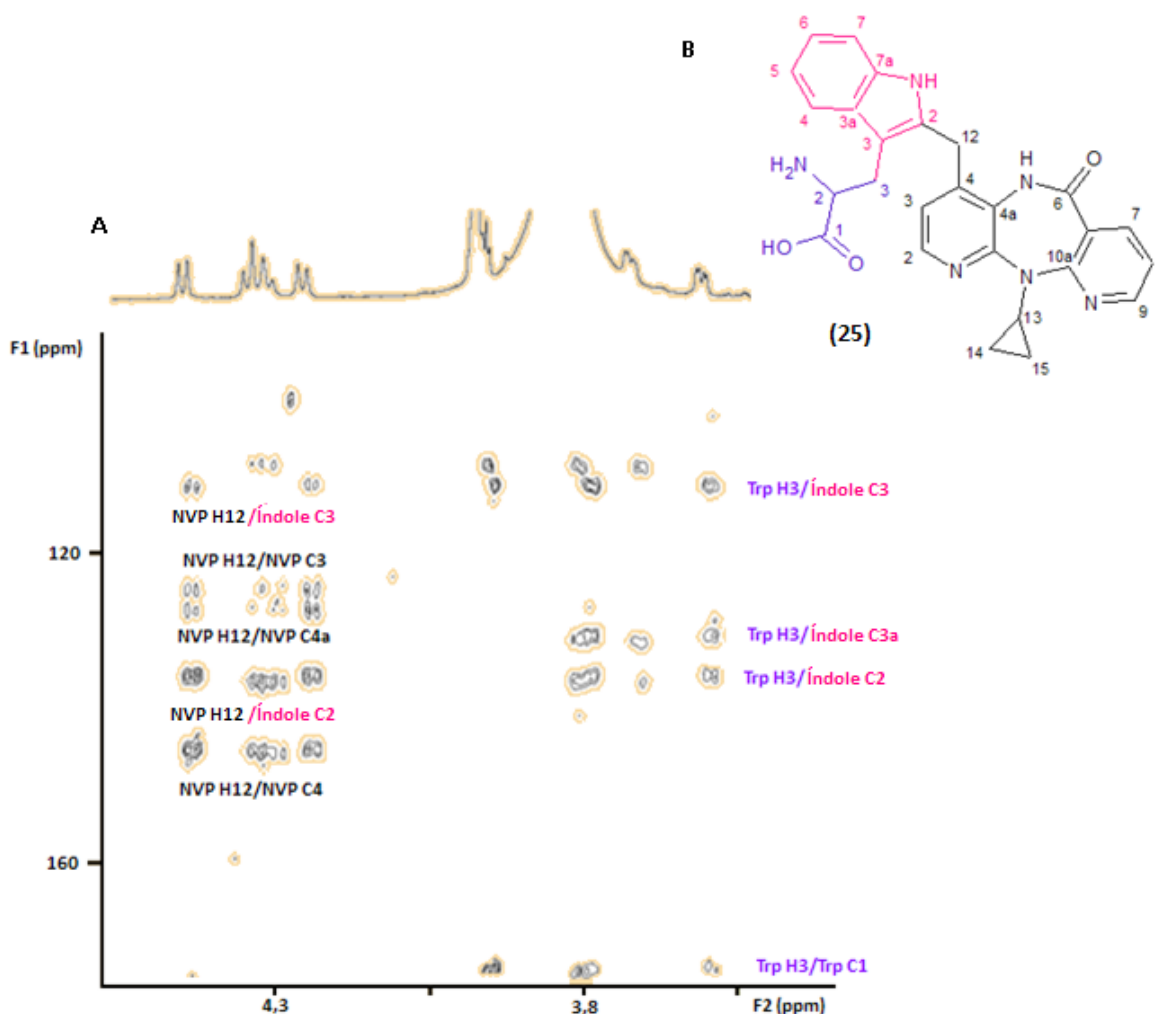
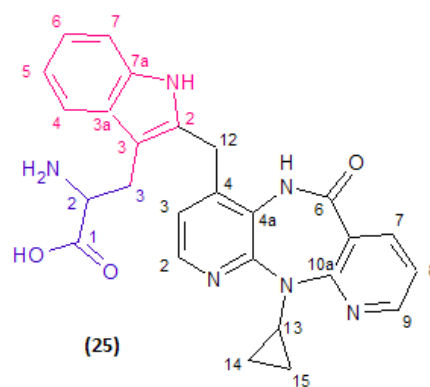


Figura II.5 | Espectro de HMBC semi-selectivo (A) do aduto 12-(triptofano-2'-il)-nevirapina (**25**) (B).

Tabela II.4 | Dados espectroscópicos obtidos para o aduto 12-(triptofano-2'-il)-nevirapina (**25**).

¹ H RMN (DMSO-d ₆) δ (ppm) J (Hz)	¹³ C RMN (DMSO) δ (ppm)	EM (ESI) m/z
	172,7 (C=O, Trp-C1)	
	172,1 (C=O, Trp-C1')	
	167,5 (C=O, NVP-C6)	
	167,1 (NVP-C6')	
	160,3 (NVP-C10a)	
	160,2 (NVP-C10a')	
	155,3 (NVP-C11a)	469 [MH] ⁺
	155,0 (NVP-C11a')	276 [MH ₂ +2CH ₃ CN] ²⁺
	151,5 (NVP-C9)	255,6 [MH ₂ +CH ₃ CN] ²⁺
	151,3 (NVP-C9')	
10,51 (1H, s, índole-NH)	144,2 (NVP-C2)	
10,42 (1H, s, índoleNH')	143,9 (NVP-C2')	
8,48 (1H, dd, J=4,7 e 1,9 NVP-H9)	143,1 (NVP-C4)	
8,44 (1H, dd, J=4,8 e 2,0 NVP-H9')	142,8 (NVP-C4')	
8,11 (1H, d, J=4,9 NVP-H2)	140,9 (NVP-C7)	
8,08 (1H, d, J=4,9 NVP-H2')	140,1 (NVP-C7')	
7,63-7,59 (2H, m, índole-H7 e H7')	136,1 (Trp-C7a)	
7,49-7,47 (2H, m, NVP-H7 e H7')	133,8 (índole-C2)	
7,13-6,88 (10H, m, NVP-H3 e H3', NVP-H8 e H8', índole-H4 e H4', índole-H5 e H5', índole-H6 e H6')	133,3 (índole-C2')	
4,57-4,14 (4H, m, NVP-H12 e H12')	128,4 (índole-C3a)	
3,63-3,50 (4H, m, NVP-H13 e H13', Trp-H2 e H2')	128,0 (índole-C3a')	
3,33 (parcialmente encoberto pelo sinal da água, Trp-H3a e H3a')	124,7 (NVP-C4a)	
3,09 (1H, dd, J=15,0 e 6,0 Trp-H3b)	124,5 (NVP-C4a')	
2,86 (1H, dd, J=14,7 e 5,6 Trp-H3b')	121,4; 120,9; 119,5; 119,4; 118,8; 118,6; 118,3; 118,2 (NVP-C3/C6a/C8, índole-C4/C5/C6, 2 isómeros)	
0,89-0,83 (4H, m, NVP-H14 e H14' ou H15 e H15')	111,0 (índole-C7)	
0,37-0,33 (4H, m, NVP-H14 e H14' ou H15 e H15')	110,9 (índole-C7')	
	109,1 (índole-C3)	
	108,2 (índole-C3')	
	55,3 (Trp-C2)	
	29,5 (NVP-C13)	
	28,2 (NVP-C12)	
	28,0 (NVP-C12')	
	26,9 (Trp-C3)	
	26,5 (Trp-C3')	
	9,0 (NVP-C14 + C15, 2 isómeros)	
	8,8 (NVP-C14 + C15, 2 isómeros)	



II.2.2. Caracterização estrutural do aduto Nevirapina-Glutationo

O glutationo (**24**) é um tripéptido que possui uma ligação peptídica invulgar entre o terminal amina do resíduo de cisteína e a cadeia lateral do glutamato e apresenta um papel importante na defesa do organismo, principalmente como antioxidante [51].

- A primeira evidência da formação de um aduto foi obtida por EM (**Tabela II.5**). O espectro de massa apresenta a molécula protonada a m/z 572 consistente com o aduto aduto 12-(glutationo-S-il)-nevirapina (**26**) entre a NVP (**2**) e o GSH (**24**).
- Com os resultados de RMN (^1H e ^{13}C RMN, DEPT, HSQC, HMBC e HSQC-TOCSY) foi possível confirmar a presença das unidades de NVP (**2**) e do glutationo. Também no caso do aduto (**26**) se encontram evidências da coexistência de dois rotâmeros devido à duplicação de sinais nos espectros de ^1H RMN e ^{13}C RMN. Por exemplo, o espectro de ^1H RMN apresenta dois conjuntos de dois dupletos correspondentes ao carbono da posição 12 da NVP (**2**) (cada duplete a integrar para um protão) com um desvio químico (4,21/4,17 e 3,78/3,74 ppm, respectivamente). Estes dupletos apresentam no espectro de HSQC correlação com os carbonos a 33,4 e 33,0 ppm, respectivamente, consistente com a ligação ao átomo de enxofre, cujo desvio é ≈ 30 ppm [49].

No espectro de HMBC (**Figura II.6**) confirma-se a formação de aduto devido à existência de correlações entre o sinal dos protões do carbono na posição 12 da unidade de NVP (**2**) e o sinal correspondente ao carbono secundário da posição 12 (33,4 e 33,0 ppm) do GSH, indicando que a posição de ligação ao tripéptido é entre o átomo de enxofre da cadeia lateral do resíduo de cisteína do GSH e o carbono da posição 12 da NVP (**2**). O espectro de HSQC-TOCSY (**Figura II.7**) permitiu, de uma forma muito simples, identificar os sinais de ^1H RMN e ^{13}C RMN, correspondentes a cada um dos aminoácidos da unidade do glutationo. A atribuição dos restantes sinais da molécula foi feita de modo análogo ao descrito para os compostos anteriores, tendo como base as correlações observadas nos espectros de HMBC e HSQC.

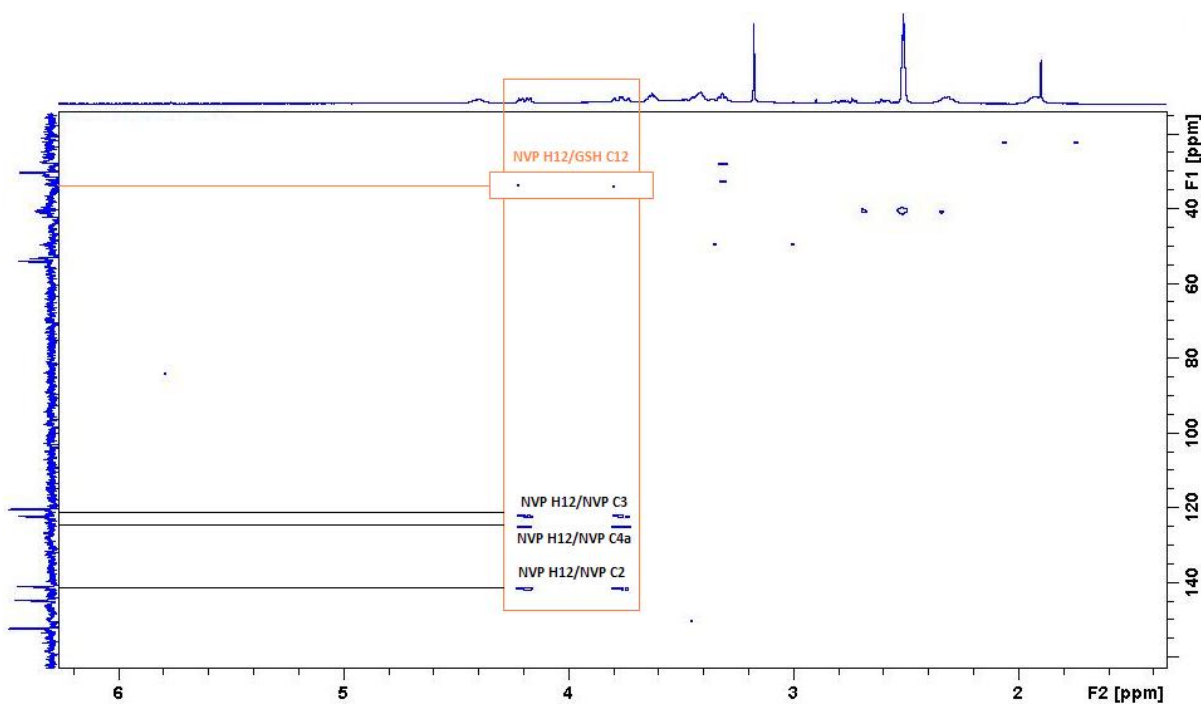


Figura II.6 | Espectro de HMBC do aduto 26.

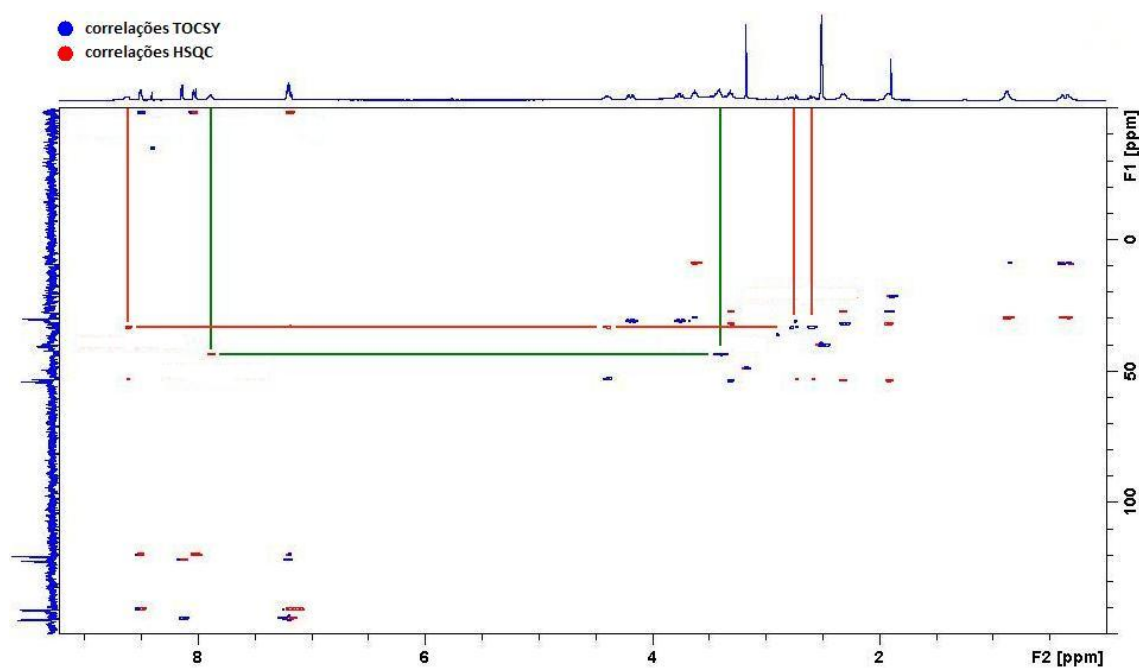
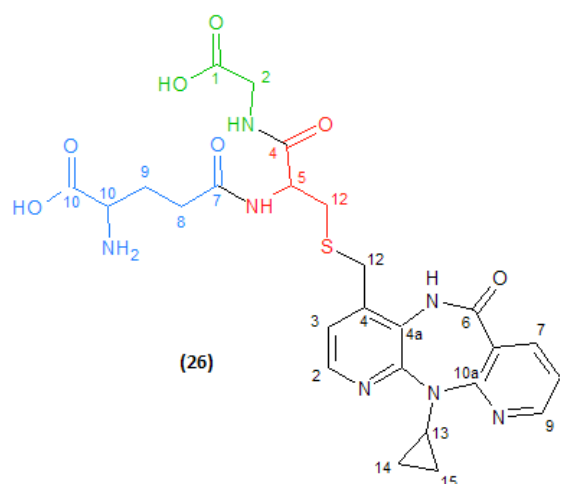


Figura II.7 | Espectro de HSQC-TOCSY do aduto 26, destacando-se as correlações observadas para os resíduos de Cys (a vermelho), de Gly (a verde) e da unidade de GSH.

Tabela II.5 | Dados espectroscópicos obtidos para o aduto 12-(glutationo-S-il)-nevirapina (26).

^1H RMN (DMSO- d_6) δ (ppm) J (Hz)	^{13}C RMN (DMSO) δ (ppm)	EM (ESI) m/z
	171,9 (GSH- $\underline{\text{C}}_{10}$)	
	171,8 (GSH- $\underline{\text{C}}_{10}'$)	
	171,0 (GSH- $\underline{\text{C}}_1$ e $\underline{\text{C}}_1'$)	
	170,4 (GSH- $\underline{\text{C}}_4$ e $\underline{\text{C}}_4'$)	
8,63 (2H, sl, GSH-NH e NH')	170,3 (GSH- $\underline{\text{C}}_7$ e $\underline{\text{C}}_7'$)	
8,50 (2H, d, $J=4,4$ NVP-H9 e H9')	167,1 ($\underline{\text{C}}=\text{O}$, NVP- $\underline{\text{C}}_6$ e $\underline{\text{C}}_6'$)	572 [MH] ⁺
8,14 (2H, d, $J=4,8$ NVP-H2 e H2')	159,8 (NVP- $\underline{\text{C}}_{10a}$ e $\underline{\text{C}}_{10a}'$)	443 [MH-piroglutamato] ⁺
8,04-8,02 (2H, m, NVP-H7 e H7')	154,5 (NVP- $\underline{\text{C}}_{11a}$ e $\underline{\text{C}}_{11a}'$)	307 [GSH] ⁺
7,90 (2H, s, GSH-NH e NH')	151,3 (NVP- $\underline{\text{C}}_9$ e $\underline{\text{C}}_9'$)	287 [MH ₂] ²⁺
7,22-7,18 (4H, m, NVP-H3 e H3', NVP-H8 e H8')	143,7 (NVP- $\underline{\text{C}}_2$ e $\underline{\text{C}}_2'$)	
4,44-4,36 (2H, m, GSH-H5 e H5')	140,7 (NVP- $\underline{\text{C}}_4$ e $\underline{\text{C}}_4'$)	
4,21 (1H, d, $J=6,0$ NVP-H12a)	140,0 (NVP- $\underline{\text{C}}_7$ e $\underline{\text{C}}_7'$)	
4,17 (1H, d, $J=5,6$ NVP-H12a')	124,2 (NVP- $\underline{\text{C}}_{4a}$ e $\underline{\text{C}}_{4a}'$)	
3,78 (1H, d, $J=10,4$ NVP-H12b)	121,3 (NVP- $\underline{\text{C}}_3$ e $\underline{\text{C}}_3'$)	
3,74 (1H, d, $J=10,4$ NVP-H12b')	120,6 (NVP- $\underline{\text{C}}_{6a}$ e $\underline{\text{C}}_{6a}'$)	
3,65-3,60 (2H, m, NVP-H13 e H13')	119,4 (NVP- $\underline{\text{C}}_8$ e $\underline{\text{C}}_8'$)	
3,49-3,41 (4H, m, GSH-H2 e H2')	53,1 (GSH- $\underline{\text{C}}_{10}$ e $\underline{\text{C}}_{10}'$)	
3,31 (2H, t, $J=6,2$ GSH-H10 e H10')	52,3 (GSH- $\underline{\text{C}}_5$ e $\underline{\text{C}}_5'$)	
2,81-2,72 (2H, m, GSH-H12)	41,4 (GSH- $\underline{\text{C}}_2$ e $\underline{\text{C}}_2'$)	
2,61-2,57 (2H, m, GSH-H12')	33,4 (GSH- $\underline{\text{C}}_{12}$)	
2,32-2,29 (4H, m, GSH-H8 e H8')	33,0 (GSH- $\underline{\text{C}}_{12}'$)	
1,93 (4H, s, GSH-H9 e H9')	31,4 (GSH- $\underline{\text{C}}_8$ e $\underline{\text{C}}_8'$)	
0,89-0,87 (4H, m, NVP-H14 e H14' ou H15 e H15')	30,7 (NVP- $\underline{\text{C}}_{12a}$)	
0,41-0,31 (4H, m, NVP-H14 e H14' ou H15 e H15')	30,5 (NVP- $\underline{\text{C}}_{12a}'$)	
	29,3 (NVP- $\underline{\text{C}}_{13}$ e $\underline{\text{C}}_{13}'$)	
	26,8 (GSH- $\underline{\text{C}}_9$ e $\underline{\text{C}}_9'$)	
	8,7 (NVP- $\underline{\text{C}}_{14}$ + $\underline{\text{C}}_{15}$, 2 isómeros)	
	8,4 (NVP- $\underline{\text{C}}_{14}$ + $\underline{\text{C}}_{15}$, 2 isómeros)	



II.2.3. Caracterização estrutural do aduto Nevirapina-Cisteína

A cisteína é um aminoácido que contém um grupo tiol na sua cadeia lateral o que lhe confere uma certa polaridade e que se oxida facilmente com o mesmo grupo tiol de outra cisteína formando uma ligação covalente – a ligação persulfureto [51]. Apesar disso, este aminoácido é muitas vezes referido como um biomarcador por excelência devido ao pKa da sua cadeia lateral (pKa 7,9-8,5) ser semelhante ao pH fisiológico (pH 7,4) e, portanto, o grupo tiol se encontrar na forma de base livre –SH contendo poder nucleófilo [37]. A cisteína revelou-se ser difícil de dissolver em tampão fosfatos pH 7,4 e, por isso, foi utilizada a cisteína protegida com um grupo acetilo ligado ao terminal amino (*N*-acetil-cisteína).

- A primeira evidência da formação do aduto 12-(*N*^α-acetil-cisteína-S-il)-nevirapina (**27**) obteve-se por EM (**Tabela II.6**). O espectro obtido por ESI, apresenta a molécula protonada a *m/z* 428, consistente com a formação de um aduto NVP – *N*-acetil-cisteína. Foi, ainda, possível observar um fragmento a *m/z* 386 correspondente à perda do grupo acetilo a partir da molécula protonada.
- Os resultados de RMN (¹H RMN, ¹³C RMN, DEPT, HSQC e HMBC) confirmam a presença das unidades de NVP (**2**) e do aminoácido **23** (**Tabela II.6** e **Figura II.8**). O multipletto correspondente aos prótons da posição 12 da NVP (4,21-3,91 ppm), apresenta no espectro de HMBC apenas correlações com os carbonos das posições C3 (120,0 ppm), C4 (140,3 e 140,1 ppm) e C4a (125,7 e 125,6 ppm) da unidade de **2**. Pelo que neste caso, não foi possível estabelecer a posição de ligação ao aminoácido com base nas correlações observadas no espectro de HMBC. Mas uma vez, que os desvios correspondentes ao carbono da posição C12 do aduto **27** (32,5 e 32,3 ppm) são consistentes com a ligação ao átomo de enxofre, e embora os espectros tenham sido adquiridos em solventes diferentes, os desvios destes sinais são muito semelhantes aos observados para o aduto **26** (30,7 e 30,5 ppm), poder-se-á dizer que também neste caso a ligação foi estabelecida através do átomo de enxofre.

O espectro de ¹³C RMN apresenta alguns sinais duplicados, o que sugere a presença de rotâmeros. Por exemplo o carbono da posição 12 apresenta dois sinais, a 32,5 e 32,3 ppm.

A atribuição dos restantes sinais da molécula foi feita de modo análogo ao descrito para o composto anterior.

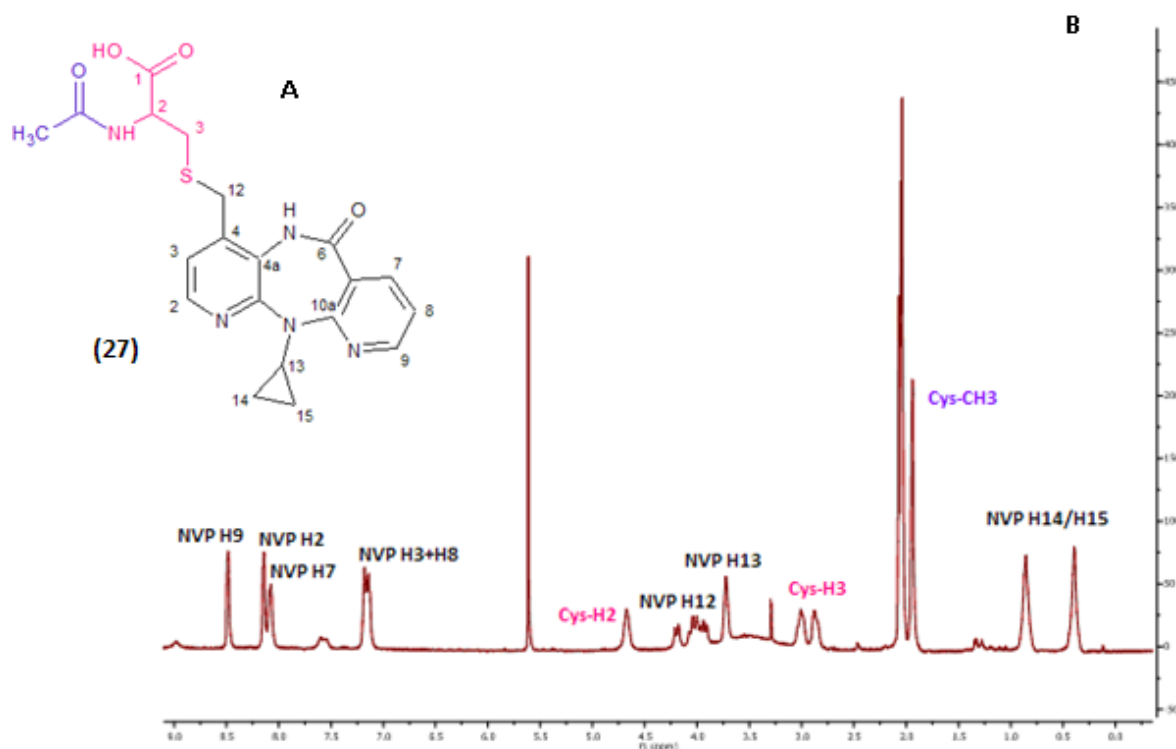


Figura II.8 | Espectro de ^1H RMN (A) do aduto **27** (B).

Para se obter um aduto com a estrutura biológica encontrada *in vivo* efectuou-se a desprotecção do aduto retirando o grupo acetilo ligado ao grupo amino da posição α do aminoácido cisteína. Esta reacção foi promovida com a adição de ácido trifluoroacético (TFA) a 60°C [ref]. A reacção foi monitorizada por HPLC, onde foi visível, nas condições cromatográficas utilizadas (Capítulo III, secção III.5.2.1.), a diminuição do sinal de $t_R = 17$ min com aparecimento de dois sinais a $t_R = 10$ e 12 min. Embora se tenham isolado os dois produtos da reacção por HPLC semi-preparativo, não foi possível obter uma análise por RMN devido à pouca quantidade de produto isolado. No entanto, o produto a $t_R = 12$ min. identificou-se como sendo o aduto 12-(cisteína-S-il)-nevirapina (**28**) com base na análise por LC-MS (ESI). O espectro de massa (Figura II.9 (B e C)) apresenta a molécula protonada a m/z 386 compatível com a presença do aduto **28** e fragmentos moleculares a m/z 369, 342, 299 e 265, compatíveis com a perda de grupo NH_3 , CO_2 , $\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}_2$ e do $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$, respectivamente, obtidos a partir da molécula protonada (Figura II.9 (A)).

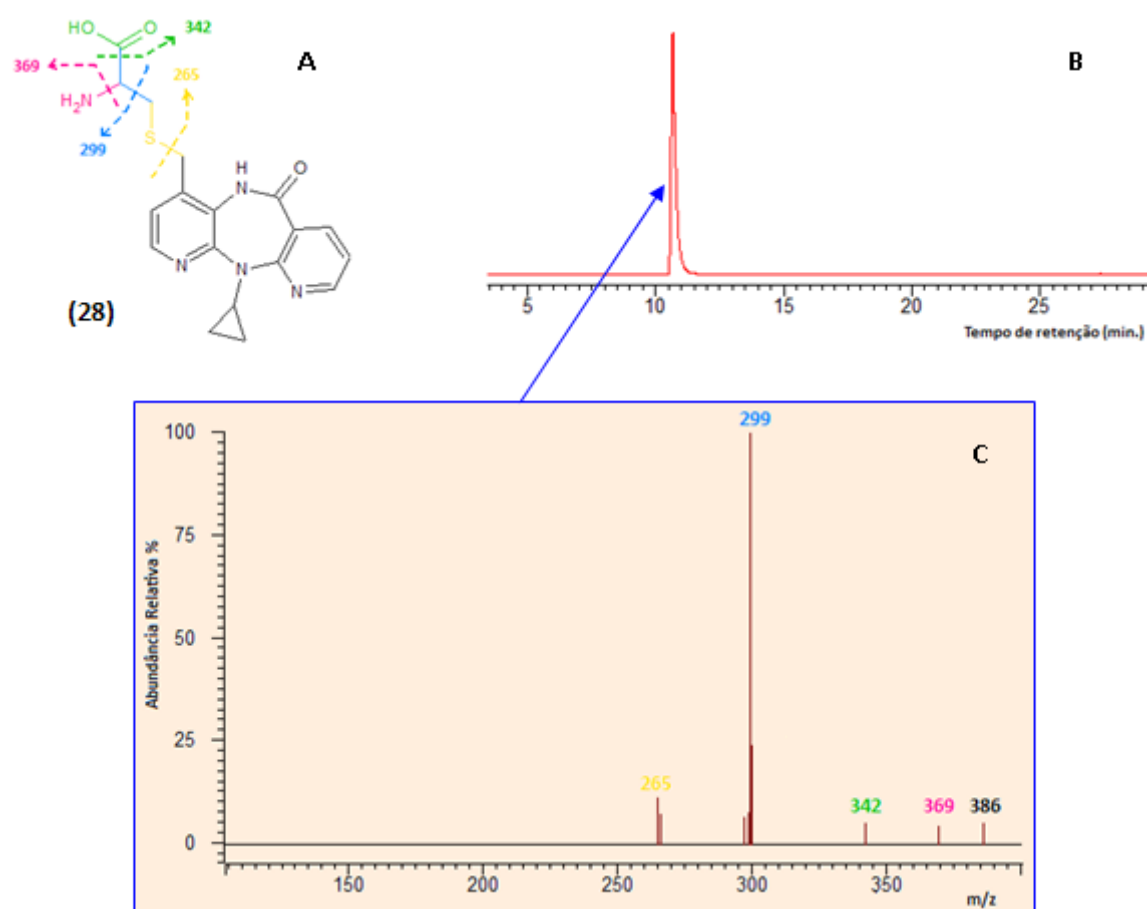
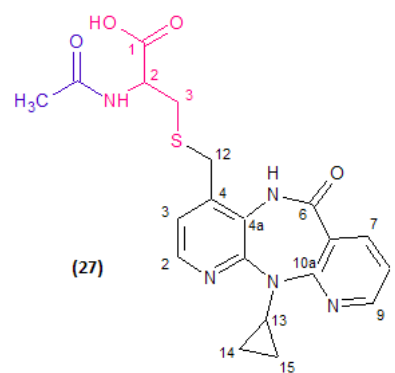


Figura II.9 | Representação esquemática da fragmentação (A), cromatograma iônico total (B) e espectro de massa (C) obtido por LC-MS (ESI) do aduto **28**.

Tabela II.6 | Dados espectroscópicos obtidos para o aduto 12-(*N*^α-acetil-cisteína-S-il)-nevirapina (**27**).

¹ H RMN (Acetona-d ₆) δ (ppm) <i>J</i> (Hz)	¹³ C RMN (Acetona) δ (ppm)	EM (ESI) m/z
	172,0 (Cys-C1)	
	170,4 (C=O, N-Ac-Cys)	
	167,0 (C=O, NVP-C6)	428 [MH] ⁺
	161,2 (NVP-C10a)	386 [MH ₂ -COCH ₃] ⁺
8,49 (1H, d, <i>J</i> =3,9 NVP-H9)	155,7 (NVP-C11a)	369 [MH-NH ₃] ⁺
8,15 (1H, d, <i>J</i> =3,6 NVP-H2)	152,5 (NVP-C9)	342 [MH-CO ₂] ⁺
8,08 (1H, d, <i>J</i> =6,2 NVP-H7)	144,9 (NVP-C2)	299 [MH-C ₃ H ₅ NO ₂] ⁺
7,18-7,13 (2H, m, NVP-H3 e NVP-H8)	141,0 (NVP-C7)	265 [MH-C ₃ H ₇ NO ₂ S] ⁺
	140,3 e 140,1 (NVP-C4)	
4,68 (1H, s, Cys-H2)	125,7 e 125,6 (NVP-C4a)	
4,21-3,91 (2H, m, NVP-H12)	122,4 (NVP-C8)	
3,73 (1H, sl, NVP-H13)	121,5 (NVP-C6a)	
3,01-2,88 (2H, m, Cys-H3)	120,0 (NVP-C3)	
1,94 (3H, s, N-Ac-Cys-CH ₃)	52,9 (Cys-C2)	
0,86 (2H, m, NVP-H14 ou -H15)	34,5 e 34,4 (Cys-C3)	
0,39 (2H, m, NVP-H14 ou -H15)	32,5 e 32,3 (NVP-C12)	
	c. a. 29,9 e 29,8 (NVP-C13)	
	22,7 (N-Ac-Cys-CH ₃)	
	9,4 (NVP-C14 + C15)	
	9,1 (NVP-C14 + C15)	



II.2.4. Caracterização estrutural do aduto Nevirapina-Lisina

A reacção entre o modelo electrófilo **18** e o aminoácido lisina (**22**) levou à formação de dois produtos. Inicialmente tentou-se isolar estes produtos para se proceder à sua caracterização estrutural por RMN, mas, como foram isolados em quantidades muito baixas (<0,1 mg) não foi possível esta abordagem. Assim, optou-se por realizar uma análise por LC-MS (ESI) da mistura reaccional (**Figura II.10**). Foi identificado um aduto, a $t_R = 16$ min. cujo espectro de massa apresenta a molécula protonada a m/z 411 compatível com o aduto entre a NVP (**2**) e o aminoácido lisina. Como não foi possível a análise por RMN deste aduto, pelo que não se sabe qual o local onde se formou a ligação covalente entre as duas moléculas. No entanto, pode-se dizer que era expectável que tal acontecesse entre o carbono da posição 12 da NVP (**2**) e o grupol amino da cadeia lateral da Lys, dado que este é o local mais nucleófilo.

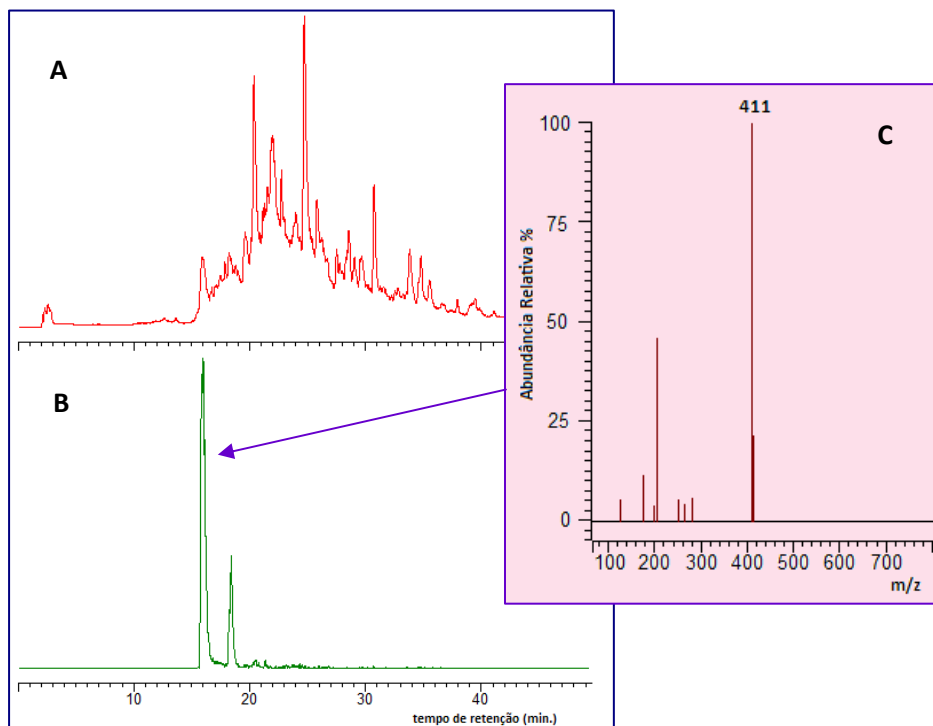


Figura II.10 | Cromatograma iónico total da mistura reaccional (A) obtido por LC-MS (ESI), cromatograma iónico extraído (m/z 411) (B) e espectro de massa do sinal a $t_R = 16$ min. (C) do aduto obtido com **22**.

II.3. Modificação da Albumina do soro humana com 12-MsO-NVP

Paralelamente à preparação de padrões de adutos entre a NVP (**2**) e aminoácidos, pretendeu-se determinar quais os adutos que se formam maioritariamente *in vitro* com a albumina do soro humana (HSA) modificada com o modelo electrófilo **18**.

Para a modificação da HSA com o composto **18** seguiram-se dois procedimentos experimentais diferentes: num procedimento incubou-se a HSA a 37°C na presença de 1,0 eq de **18** durante três dias (método I); no segundo procedimento após 20h da primeira adição de **18** adicionou-se mais 1,0 eq seguida de incubação a 37°C por mais 72h (método II). Em ambos os casos, após o período de incubação, a solução foi dialisada contra água desionizada em membranas com limite de exclusão de 15kDa, para a remoção dos componentes de baixo peso molecular que não reagiram. Após a diálise ambas as soluções foram submetidas a diferentes condições de hidrólise. Para todos os métodos de hidrólise foram realizados ensaios em branco nas mesmas condições experimentais mas com HSA não modificada.

O primeiro método de hidrólise utilizado foi a hidrólise ácida, um dos métodos clássicos para o isolamento de adutos em proteínas, que leva à hidrólise total das proteínas por adição de HCl 6M a 110°C durante 22h seguida de purificação dos adutos por métodos cromatográficos [45,47]. Dado que a análise por LC-MS da mistura reaccional obtida por este

método, não revelou a presença de adutos, pensou-se que as condições reaccionais poderiam ter sido demasiado agressivas, pelo que se tentou diminuir o tempo de reacção para 4h. Embora este método tenha sido utilizado com sucesso na hidrólise de adutos de HSA [52], neste caso revelou ser desadequado, uma vez que a análise por LC-MS, também não permitiu a identificação de qualquer aduto. Recentemente surgiram vários métodos que envolvem o uso de microondas, na hidrólise ácida de proteínas com HCl 6M [53], o que permite tornar o método ainda menos agressivo ao reduzir significativamente o tempo de reacção. A hidrólise com HCl 6 M foi assistida por irradiação de microondas a 800 W durante 1,5 min, no entanto, também não foram identificados adutos por análise de LC-MS.

As condições de hidrólise ácida em proteínas com HCl 6M, levam à destruição de alguns aminoácidos, nomeadamente do triptofano, cisteína e histidina [54,55]. Para ultrapassar este problema testaram-se outros métodos de hidrólise ácida descritos como adequados ao isolamento de adutos com estes aminoácidos.

Existem na literatura exemplos de técnicas que tiram partido das capacidades hidrolíticas do HCl 6M mas prevenindo a destruição de certos aminoácidos com a adição de reagentes que os protegem [55,56]. Exemplo disso é a hidrólise com HCl 6M em ácido trifluoroacético (TFA) na presença de ácido tioglicólico a 166°C durante 25 min sob atmosfera de azoto. Para além deste método, testou-se, ainda, um método de hidrólise ácida que envolve a adição de ácido mercapto-etanossulfónico 3M a 110°C [57]. Ambos os métodos estão descritos como eficazes na hidrólise de adutos envolvendo o Trp e a Cys, mas em qualquer dos casos, a análise por LC-MS não revelou a formação de adutos.

O método químico que envolve a hidrazinólise está descrito na literatura como sendo eficaz na separação de adutos com aminoácidos sensíveis a condições ácidas, principalmente, aminoácidos que se encontram na zona hidrofóbica da proteína [45]. Existe uma aplicação deste método descrita na literatura para a obtenção de adutos com o aminoácido histidina na HSA e na hemoglobina [58]. A hidrólise foi efectuada na presença de hidrato de hidrazina, a 100°C durante 15h, seguida de derivatização com anidrido trifluoroacético na presença de trietilamina. No entanto, não se conseguiram identificar adutos por LC-MS (ESI).

Paralelamente aos métodos químicos foi testado outro método de hidrólise total da HSA modificada. Foi utilizada a hidrólise enzimática com Pronase E e Leucina Aminopeptidase (LAP) com incubação a 37°C durante 20h [47]. O pronase E (EC 3.4.24.31) é nome dado ao conjunto de, pelo menos, dez enzimas proteolíticas produzidos pela bactéria *Streptomyces griseus*, que lhe conferem um largo espectro de especificidade, útil quando se pretende uma hidrólise completa [59]. O enzima LAP (EC 3.4.11.1) hidrolisa sequencialmente o terminal amino dos resíduos de aminoácidos numa cadeia polipeptídica complementando, assim, a

acção hidrolítica do pronase E e garantindo a hidrólise total da HSA modificada [59]. Para os ensaios de hidrólise enzimática conseguiram-se identificar alguns adutos a partir da análise LC-MS das soluções de HSA modificada. A identificação teve como base a comparação dos tempos de retenção e dos espectros de massa obtidos na mistura reaccional com os obtidos para os padrões sintetizados.

Foram identificados dois adutos, de modificação da HSA, por análise LC-MS das misturas reaccionais obtidas segundo os dois métodos (**Figura II.11**).

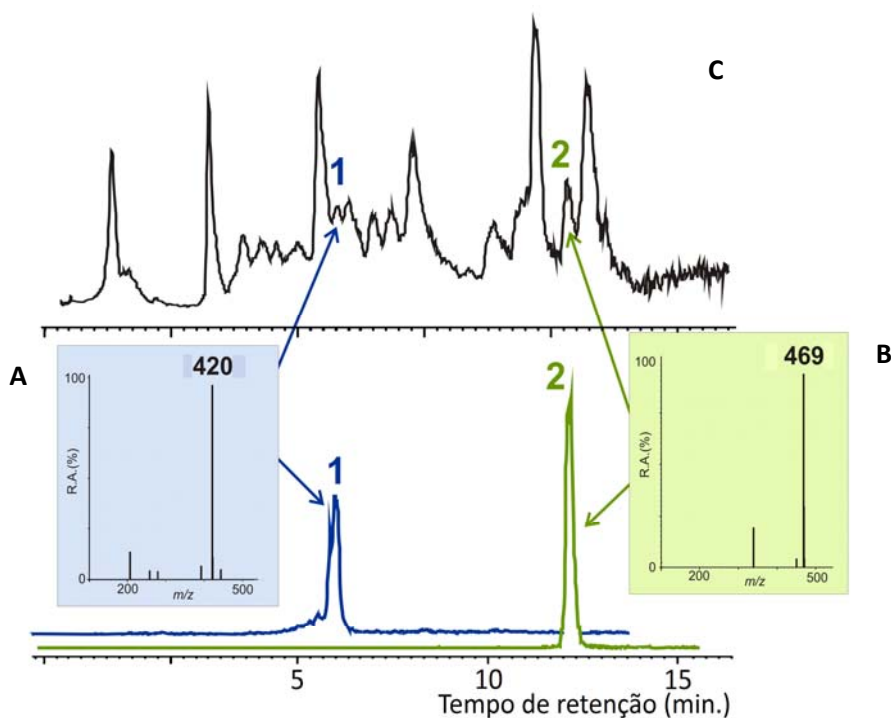


Figura II.11 | Cromatograma iónico total obtido por LC-MS (ESI) e espectro de massa do aduto de histidina (**29**) sintetizado (**A**). Cromatograma iónico total obtido por LC-MS (ESI) e espectro de massa do aduto de triptofano (**25**) sintetizado (**B**). Cromatograma iónico total obtido por LC-MS (ESI) do hidrolisado enzimático obtido após modificação da HSA com **18**.

A mistura reaccional foi analisada por LC-MS (ESI). Os resultados obtidos foram comparados, em termos de tempo de retenção e espectro de massa, com os obtidos na análise dos vários padrões sintetizados (nas mesmas condições cromatográficas). Foi, assim, possível identificar nos hidrolisados enzimáticos obtidos pelos dois métodos de modificação da HSA, os adutos 12-(triptofano-2'-il)-nevirapina (**25**) e 12-(N^α-histidina-N1'-il)-nevirapina (**29**). Este último foi preparado em trabalhos anteriores de modificação deste aminoácido (**Figura II.12**) [50].

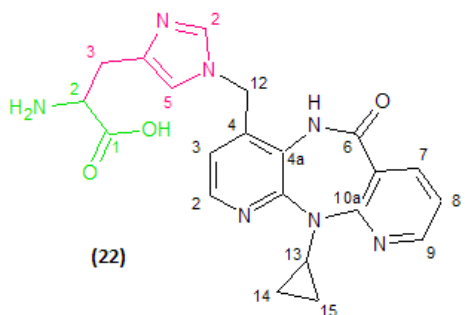


Figura II.12 | Estrutura do aduto sintético 12-(N^α-histidina-N1'-il)-nevirapina (29).

Este resultado é curioso, já que apenas existe um resíduo de triptofano na sequência da proteína HSA. Não se observaram diferenças significativas entre os dois métodos de modificação da HSA.

Em comparação com os métodos de hidrólise descritos anteriormente a hidrólise enzimática revelou-se mais eficaz, resultado que se esperava obter, já que a actividade dos enzimas utilizados é específica e selectiva para a ligação peptídica. Os enzimas não quebram as ligações covalentes estabelecidas entre as duas unidades dos adutos supostamente formados, o que provavelmente ocorreu nas hidrólises ácidas efectuadas e explica a não detecção da formação de adutos.

Paralelamente à hidrólise total das soluções de HSA modificada, foi efectuada uma análise por MALDI-TOF-MS, que envolve a digestão enzimática da HSA modificada com um enzima de restrição, o tripsina, levando à obtenção de péptidos, que depois são analisados por MALDI-TOF-MS e identificados segundo a sua razão m/z por comparação com uma base de dados. A identificação dos adutos é efectuada quando se detecta um incremento de massa (equivalente à NVP) no péptido, que é depois novamente hidrolisado até se conseguir determinar qual o aminoácido que está envolvido no aduto. Esta técnica, permite, então, determinar que tipo de aminoácido está alterado, assim como, o local que ocupa na sequência proteica. Esta análise encontra-se ainda a decorrer pelo que, ainda, não existem resultados conclusivos.

II.4. Conclusões e Perspectivas futuras

Foram identificados por LC-MS, por comparação com padrões, os adutos 12-(triptofano-2'-il)-nevirapina (**25**) e 12-(N^α-histidina-N1'-il)-nevirapina (**29**), nos ensaios de modificação da HSA com o modelo electrófilo 12-MsO-NVP (**18**). Estes resultados sugerem que, a formação de adutos do tipo NVP-proteína, a partir dos derivados metabólicos da NVP (**2**), poderá estar na origem dos mecanismos de toxicidade deste fármaco. Por outro lado, a grande afinidade ao triptofano demonstrado poderá indicar que este aduto poderá funcionar como um bom biomarcador da toxicidade da NVP.

A modificação dos aminoácidos **19** e **23**, e do tripéptido **24** levou à formação de adutos com rendimentos razoáveis. Os padrões sintetizados, foram caracterizados por RMN e EM e serão ainda utilizados para a identificação e/ou quantificação destes compostos *in vivo*, em modelos animais e em indivíduos infectados com VIH-1 sujeitos à terapia com a NVP (**2**).

Capítulo III – Procedimento Experimental

III.1. Reagentes, Solventes e Materiais

A Nevirapina usada foi fornecida pela Cipla (Mumbai, Índia) e todos os outros reagentes usados foram fornecidos pela Aldrich, Fluka e Sigma.

Os solventes usados foram sempre que necessário purificados e secos segundo métodos padronizados [59]. O tampão fosfatos pH 7,4 50 mM foi preparado com 2,2 g de Na_2HPO_4 e 3,4 g de KH_2PO_4 para 250 mL e utilizou-se uma solução de NaOH 10% para acertar o pH. A solução de *Phosphate Buffer Saline* (PBS) usada foi preparada de novo sempre que necessária 1:10 por diluição a partir de uma solução PBS contendo 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na_2HPO_4 e 2,7 g de KH_2PO_4 para 100 mL. Não foi necessário o acerto de pH, quando se efectuava a diluição, o pH 7,4 era obtido.

A solução enzimática de Pronase E (E.C. 3.4.24.31) 0,53 mg/mL foi preparada, em PBS, apenas quando necessário, a partir de uma solução aquosa *stock* 10 mg/mL. Esta solução *stock* foi preparada a partir do produto comercial da Fluka (5,05 U/mg em pó liofilizado).

A solução aquosa de Leucina aminopeptidase (E.C. 3.4.11.1, LAP) 0,13 mg/mL foi preparada a partir da solução comercial a 5,9 mg/mL da Sigma (24 U/mg em suspensão em 3,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 10 mM MgCl_2).

Para a realização de cromatografias em camada fina (c.c.f.) foram utilizadas placas de Sílica Gel 60 F₂₅₄ da Merck com 0,2 mm de espessura e a detecção dos compostos foi feita por irradiação de raios ultravioleta (UV) a 254 nm. O eluente usado foi sempre $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ (1:1).

A cromatografia *short-path* foi realizada com Sílica Gel 60H da Merck com granulometria 90% <55 μm . O eluente usado é referido, para cada caso, assim como a proporção volumétrica dos solventes usados para os eluentes mistos.

As cromatografias *Sep-pack* foram efectuadas com colunas C₁₈-SPE da Varian.

A celite 545 Coarse da Fluka foi usada para dispersar os produtos que incluem este passo na descrição da sua purificação.

III.2. Equipamento

O microondas que foi usado é da marca Wirlpool, modelo VT251/WH.

O aparelho de Infra-vermelhos (IV) usado foi o Jasco FT/IR-4100 (tipo A). As frequências apresentadas correspondem apenas aos sinais mais intensos ou a bandas características. Os resultados obtidos são apresentados da seguinte forma: suporte para a amostra (pastilha de brometo de potássio (KBr) em todos os casos), frequência do máximo da absorção ($\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$) e atribuição ao grupo de átomos e ligação envolvidos.

O aparelho de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC de *High Pressure Liquid Chromatography*) usado é composto por uma bomba quaternária *Ultimate 3000* da Dionex e por um detector UV-Visível *Ultimate 3000 Photodiode Array* da Dionex. O injetor usado foi o *Rheodyne 8125*. A coluna analítica usada foi a Phenomenex Luna 5 μm C18 (2) 250 x 4,60 mm com um fluxo de 1 mL/min. A coluna semi-preparativa usada foi a Phenomenex Luna 5 μm C18 (2) 100 (A) 250 x 10,00 mm com um fluxo de 3 mL/min. Quando não especificado, o gradiente linear usado para HPLC analítico foi de 30 min de 5-70% de acetonitrilo em acetato de amónio 100 mM pH 5,7 (ou ácido fórmico 0,1%) seguido de 2 min até 100% de acetonitrilo.

O aparelho de espectrometria de massa usado foi o ThermoFinnigan TSQ Quantum Ultra LC/MS ou o espectrómetro de massa Varian 500-MS LC Ion Trap, com ionização por impacto electrónico (EI) e por *electrospray* (ESI). Para a análise de LC-MS foi usada uma coluna Luna C18 100A (50 mm x 2,0 mm; da Phenomenex) de 3 μm . A fase móvel foi passada com um fluxo de 0,2 mL/min, usando um gradiente de 30 min de 5-70% de acetonitrilo em ácido fórmico 0,1% (v/v) seguido de 2 min até 100% de acetonitrilo, ao fim de 8 min retoma as condições iniciais em 5 min seguida de rotina de 7 min para equilibrar a coluna. Os resultados obtidos serão referidos pela ordem seguinte: razão massa/carga (m/z), atribuição do ião ou fragmento molecular, intensidade do pico relativa à do pico base (%).

Os aparelhos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) usados foram o modelo Avance Plus II 300 (300 MHz), 400 (400 MHz), 500 (500 MHz) e 600 (600 MHz). Os solventes e condições usadas em cada experiência encontram-se indicados caso a caso. Os desvios são expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento em Hertz (Hz). Os resultados obtidos são apresentados da seguinte forma: **Núcleo estudado** (solvente): desvio químico (δ , ppm) [intensidade relativa (nH, como número de prótons), multiplicidade (s-singuleto; d-duplete; t-triplete; dd-duplo duplete; m-multiplete), constante de acoplamento (J , Hz) e atribuição na molécula.

III.3. Síntese do complexo hexametilfosforamida(oxodiperóxido)(piridina) molibdénio (MoOPH) [60]

A 30 g de MoO_3 foi adicionado H_2O_2 (150 mL) sob agitação. Após um período exotérmico inicial de aproximadamente 30 min., a mistura reaccional foi aquecida de modo a manter a temperatura interna entre 35-40°C durante 3,5 h. Obteve-se um sólido branco suspenso numa solução amarela. A solução foi arrefecida e depois filtrada em vácuo usando

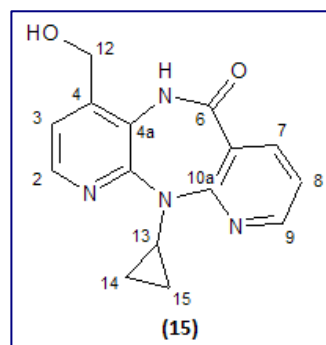
aproximadamente 1 cm de celite. O filtrado amarelo obtido foi arrefecido até 10°C sob agitação num banho de gelo e adicionado hexametilfosforamida (HMPA) (36 mL) gota a gota durante 8 min. Obteve-se um precipitado de cristais amarelos. Após mais 15 min de reacção o precipitado foi filtrado sob vácuo. Os cristais obtidos foram transferidos para um erlenmeyer a que se adicionou uma quantidade mínima de metanol (25 mL) de modo a dissolver os cristais a 40°C sob agitação. A solução saturada foi colocada no congelador durante a noite. Obtiveram-se cristais amarelos que foram filtrados em vácuo e lavados com metanol gelado (30 mL). O sólido obtido de $\text{MoO}_5 \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{HMPA}$, com um rendimento de 14% (23,8 g) foi desidratado, protegido da luz, num excicador com pentóxido de fósforo sob vácuo durante dois dias até peso constante. Obteve-se um sólido amarelo de $\text{MoO}_5 \cdot \text{HMPA}$ (22,0 g), que foi dissolvido em THF anidro (100 mL) sob agitação numa atmosfera de azoto. A 20°C foi adicionada piridina (5 mL) gota a gota durante 10 min. Formou-se um precipitado amarelo que foi filtrado em vácuo e lavado com THF anidro e éter etílico anidro. Os cristais obtidos foram transferidos para um frasco escuro e desidratados num excicador com óxido de fósforo sob vácuo durante 2,5 h. Obteve-se o produto sólido $\text{MoO}_5 \cdot \text{Py} \cdot \text{HMPA}$ com um rendimento de 56% (19,0 g).

III.4. Preparação de compostos derivados da Nevirapina

III.4.1. 11-ciclopropil-5,11-di-hidro-4-(hidroximetil)-6H-dipirido-[3,2-b:2',3'-e] diazepina-6-ona (12-OH-NVP, 15)

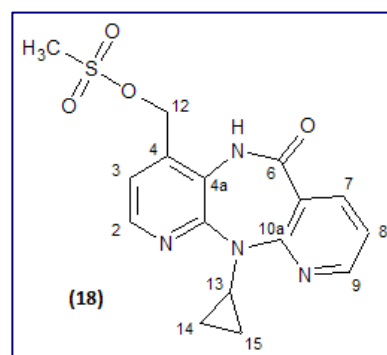
A uma suspensão de **2** (1,0 eq; 3 g; 11,3 mmol) em THF anidro (120 mL) sob atmosfera de azoto e num banho de gelo, sob agitação magnética, foi adicionada uma solução de diisopropilamido de lítio (LDA) 1,8 M em THF, heptano e etilbenzeno (1,9 eq; 7 mL; 53,0 mmol) gota a gota. Esta mistura foi arrefecida a -40°C para a adição lenta de mais LDA (5,3 eq; 20 mL; 151 mmol). Obteve-se uma solução de cor vermelho escuro. A mistura reaccional permaneceu assim durante 5 min, ao fim dos quais se adicionou MoOPH (2,0 eq; 6 g, 14,9 mmol) de uma só vez. A mistura reaccional obtida foi mantida entre -40°C e -30°C durante 2 h, após o que se adicionou uma solução saturada de cloreto de amónio (100 mL), seguida de extracção com acetato de etilo (5 x 100 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio anidro e o solvente destilado a pressão reduzida. O produto sólido obtido foi disperso em celite e purificado por cromatografia *short path* com a seguinte ordem de eluição: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcoEt}$ (8:2), (7:3), (6:4), (1:1), AcoEt, MeOH 10% em AcoEt, MeOH. Tendo-se obtido um produto sólido esbranquiçado com um rendimento de 32% (1,117 g). **IV (KBr)** $\nu_{\text{máx}}$: 3263 (O-H), 1646 (C=O). $^1\text{H RMN}$ (DMSO- d_6) δ : 9,72 (1H, s, troca com D_2O NH), 8,51 (1H, dd, $J=4,8$ e 1,9 H9), 8,19 (1H, d, $J=4,8$ H2), 8,01 (1H, dd, $J=7,7$ e 1,9 H7), 7,25 (1H, d, $J=4,8$ H3), 7,19 (1H, dd, $J=7,7$ e 4,8 H8), 5,55 (1H, m, OH), 4,75 (1H, dd, $J=15,2$ e 5,7 H12), 4,53 (1H, dd, $J=15,2$ e 4,9

H₁₂), 3,65-3,61 (1H, m, H₁₃), 0,88 (2H, d, *J*=6,0 H₁₄ ou H₁₅), 0,41-0,29 (2H, m, H₁₄ ou H₁₅). ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ: 167,3 (C₆), 160,3 (C_{10a}), 154,1 (C_{11a}), 151,8 (C₉), 144,6 (C₄), 144,3 (C₂), 140,5 (C₇), 123,4 (C_{4a}), 121,1 (C_{6a}), 119,8 (C₃), 118,7 (C₈), 59,3 (C₁₂), 29,7 (C₁₃), 9,2 (C₁₄+C₁₅), 8,9 (C₁₄+C₁₅). (EM) (EI) *m/z*: 282 [M]⁺ (73%), 281 [M-H]⁺ (42%), 263 [M-H₂O]⁺ (30%), 251 [M-OH-CH₂(ciclopropilo)]⁺ (100%).



III.4.2. 11-ciclopropil-5,11-di-hidro-4-(metanossulfoximetil)-6H-dipirido-[3,2-b:2',3'-e]diazepina-6-ona (12-MsO-NVP, 18)

A uma solução de **15** (1,0 eq; 200 mg; 0,71 mmol) em THF anidro (16 mL), sob atmosfera de azoto, num banho de gelo e com agitação magnética, foi adicionada trietilamina (1,1 eq; 110 μL; 0,78 mmol) e de seguida cloreto de metanossulfonilo (1,1 eq; 60 μL; 0,78 mmol). A mistura reaccional foi mantida a 0°C durante 2h30min, após o que se adicionou água destilada (50 mL). O produto foi extraído com diclorometano (3 x 15 mL). A fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio anidro e o solvente destilado a pressão reduzida. Tendo-se obtido um produto sólido de cor amarelo com um rendimento de 83% (272 mg). **IV (KBr)** *v*_{máx}: 3191 (N-H), 1665 (C=O), 1359 (S=O), 1177 (S=O). ¹H RMN (DMSO-d₆) δ: 8,94 (1H, s, NH), 8,56 (1H, dd, *J*=4,6 e 1,6 H₉), 8,33 (1H, d, *J*=4,8 H₂), 8,15 (1H, dd, *J*=7,6 e 1,5 H₇), 7,15 (1H, d, *J*=4,9 H₃), 7,10 (1H, dd, *J*=7,6 e 4,8 H₈), 5,46-5,39 (2H, m, H₁₂), 3,75-3,70 (1H, m, H₁₃), 2,78 (3H, s, CH₃), 1,00-0,95 (2H, m, H₁₄ ou H₁₅), 0,52-0,44 (2H, m, H₁₄ ou H₁₅). ¹³C RMN (DMSO-d₆) δ: 168,2 (C₆), 159,2 (C_{10a}), 154,0 (C_{11a}), 151,2 (C₉), 144,4 (C₂), 141,8 (C₇), 136,0 (C₄), 124,0 (C_{4a}), 120,5 (C_{6a}), 119,9 (C₃), 119,4 (C₈), 66,0 (C₁₂), 38,0 (CH₃), 29,9 (C₁₃), 9,3 (C₁₄+C₁₅), 9,1 (C₁₄+C₁₅). (EM) (EI) *m/z*: 360 [M]⁺ (10%), 345 [M-CH₃]⁺ (3%), 331 [M-H-CO]⁺ (85), 281 [M-CH₃SO₂]⁺ (85%), 265 [M-CH₃SO₃]⁺ (44%), 249 [M-CH₃SO₃-CH₂(ciclopropilo)-2H(ciclopropilo)]⁺ (100%).



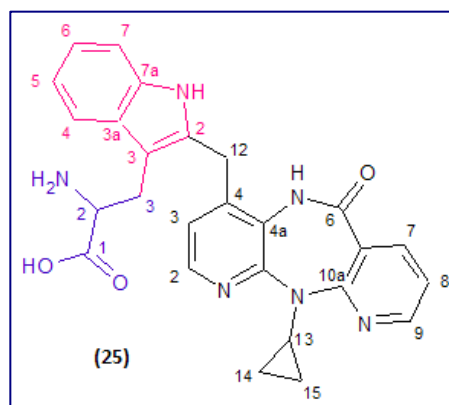
III.5. Método geral para a formação de adutos a partir de aminoácidos livres e do glutationo

Uma solução de **18** (1,0 eq; 32 mg; 88,8 μmol) em THF (0,8 mL) foi adicionada a uma solução de cada um dos aminoácidos ou do glutationo (4,0 eq; 355 μmol) em tampão fosfatos

pH 7,4 (4 mL). A mistura reaccional ficou sob agitação à temperatura ambiente durante um intervalo de tempo variável (2h-4 dias).

III.5.1. Reacção com Triptofano

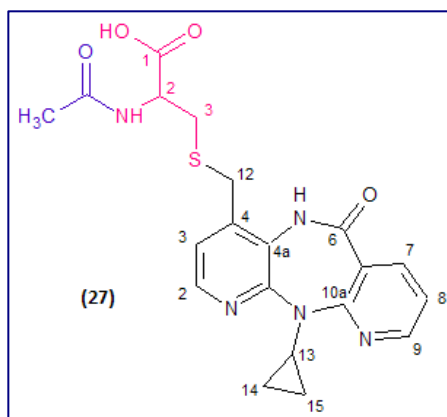
Na reacção efectuada de acordo com o método geral (descrito em III.5.) na presença de uma solução de triptofano (72,6 mg) com a duração de 4 dias, após purificação por HPLC semi-preparativo utilizando um gradiente linear de 14 min a 20-30% de acetonitrilo em acetato de amónio 50 mM, seguido de um gradiente linear de 2 min até 100% de acetonitrilo, obteve-se o aduto 12-(triptofano-2'-il)-nevirapina (**25**) com rendimento de 7% (3,7 mg) a $t_R=13$ min. ^1H RMN (DMSO-d_6) δ : 10,51 (1H, s, índole-NH), 10,42 (1H, s, índole-NH'), 8,48 (1H, dd, $J=4,7$ e $1,9$ NVP-H $\underline{9}$), 8,44 (1H, dd, $J=4,8$ e $2,0$ NVP-H $\underline{9}'$), 8,11 (1H, d, $J=4,9$ NVP-H $\underline{2}$), 8,08 (1H, d, $J=4,9$ NVP-H $\underline{2}'$), 7,63-7,59 (2H, m, índole-H $\underline{7}$ e H $\underline{7}'$), 7,49-7,47 (2H, m, NVP-H $\underline{7}$ e H $\underline{7}'$), 7,13-6,88 (10H, m, NVP-H $\underline{3}$ e H $\underline{3}'$, NVP-H $\underline{8}$ e H $\underline{8}'$, índole-H $\underline{4}$ e H $\underline{4}'$, índole-H $\underline{5}$ e H $\underline{5}'$, índole-H $\underline{6}$ e H $\underline{6}'$), 4,57-4,14 (4H, m, NVP-H $\underline{12}$ e H $\underline{12}'$), 3,63-3,50 (4H, m, NVP-H $\underline{13}$ e H $\underline{13}'$, Trp-H $\underline{2}$ e H $\underline{2}'$), 3,33 (parcialmente encoberto pelo sinal da água, Trp-H $\underline{3a}$ e H $\underline{3a}'$), 3,09 (1H, dd, $J=15,0$ e $6,0$ Trp-H $\underline{3b}$), 2,86 (1H, dd, $J=14,7$ e $5,6$ Trp-H $\underline{3b}'$), 0,89-0,83 (4H, m, NVP-H $\underline{14}$ e H $\underline{14}'$ ou H $\underline{15}$ e H $\underline{15}'$), 0,37-0,33 (4H, m, NVP-H $\underline{14}$ e H $\underline{14}'$ ou H $\underline{15}$ e H $\underline{15}'$). ^{13}C RMN (DMSO-d_6) δ : 172,7 ($\text{C}=\text{O}$, Trp-C $\underline{1}$), 172,1 (Trp-C $\underline{1}'$), 167,5 ($\text{C}=\text{O}$, NVP-C $\underline{6}$), 167,1 (NVP-C $\underline{6}'$), 160,3 (NVP-C $\underline{10a}$), 160,2 (NVP-C $\underline{10a}'$), 155,3 (NVP-C $\underline{11a}$), 155,0 (NVP-C $\underline{11a}'$), 151,5 (NVP-C $\underline{9}$), 151,3 (NVP-C $\underline{9}'$), 144,2 (NVP-C $\underline{2}$), 143,9 (NVP-C $\underline{2}'$), 143,1 (NVP-C $\underline{4}$), 142,8 (NVP-C $\underline{4}'$), 140,9 (NVP-C $\underline{7}$), 140,1 (NVP-C $\underline{7}'$), 136,1 (Trp-C $\underline{7a}$), 133,8 (índole-C $\underline{2}$), 133,3 (índole-C $\underline{2}'$), 128,4 (índole-C $\underline{3a}$), 128,0 (índole-C $\underline{3a}'$), 124,7 (NVP-C $\underline{4a}$), 124,5 (NVP-C $\underline{4a}'$), 121,4, 120,9, 119,5, 119,4, 118,8, 118,6, 118,3, 118,2 (NVP-C $\underline{3}/\text{C}6a/\text{C}8$, índole-C $\underline{4}/\text{C}5/\text{C}6$, 2 isómeros), 111,0 (índole-C $\underline{7}$), 110,9 (índole-C $\underline{7}'$), 109,1 (índole-C $\underline{3}$), 108,2 (índole-C $\underline{3}'$), 55,3 (Trp-C $\underline{2}$), 29,5 (NVP-C $\underline{13}$), 28,2 (NVP-C $\underline{12}$), 28,0 (NVP-C $\underline{12}'$), 26,9 (Trp-C $\underline{3}$), 26,5 (Trp-C $\underline{3}'$), 9,0 (NVP-C $\underline{14}$ + C $\underline{15}$, 2 isómeros), 8,8 (NVP-C $\underline{14}$ + C $\underline{15}$, 2 isómeros). EM (ESI) m/z : 469 $[\text{MH}]^+$, 276 $[\text{MH}_2+2\text{CH}_3\text{CN}]^{2+}$, 255,6 $[\text{MH}_2+\text{CH}_3\text{CN}]^{2+}$.



III.5.2. Reacção com N-Acetil-Cisteína

Na reacção efectuada de acordo com o método geral (descrito em III.4.) na presença de uma solução de N-acetil-cisteína (58 mg) com a duração de 24h, após purificação por HPLC semi-preparativo (com acetonitrilo em ácido fórmico 0,1%) foi obtido o aduto 12-(N $^{\alpha}$ -acetil-cisteína-S-il)-nevirapina (**27**) com um rendimento de 16% (7,3 mg) a $t_R = 16$ min. ^1H RMN

(Acetona-d₆) δ : 8,49 (1H, d, $J=3,9$ NVP-H₉), 8,15 (1H, d, $J=3,6$ NVP-H₂), 8,08 (1H, d, $J=6,2$ NVP-H₇), 7,18-7,13 (2H, m, NVP-H₃ e NVP-H₈), 4,68 (1H, s, Cys-H₂), 4,21-3,91 (2H, m, NVP-H₁₂), 3,73 (1H, sl, NVP-H₁₃), 3,01-2,88 (2H, m, Cys-H₃), 1,94 (3H, s, N-Ac-Cys-CH₃), 0,86 (2H, m, NVP-H₁₄ ou -H₁₅), 0,39 (2H, m, NVP-H₁₄ ou -H₁₅). ¹³C RMN (**Acetona-d₆**) δ : 172,0 (Cys-C₁), 170,4 (C=O, N-Ac-Cys), 167,0 (C=O, NVP-C₆), 161,2 (NVP-C_{10a}), 155,7 (NVP-C_{11a}), 152,5 (NVP-C₉), 144,9 (NVP-C₂), 141,0 (NVP-C₇), 140,3 e 140,1 (NVP-C₄), 125,7 e 125,6 (NVP-C_{4a}), 122,4 (NVP-C₈), 121,5 (NVP-C_{6a}), 120,0 (NVP-C₃), 52,9 (Cys-C₂), 34,5 e 34,4 (Cys-C₃), 32,5 e 32,3 (NVP-C₁₂), c.a. 29,9 e 29,8 (NVP-C₁₃), 22,7 (N-Ac-Cys-CH₃), 9,4 (NVP-C₁₄ + C₁₅), 9,1 (NVP-C₁₄ + C₁₅). **EM (ESI)** m/z: 428 [MH]⁺, 386 [MH₂-COCH₃]⁺, 369 [MH-NH₃]⁺, 342 [MH-CO₂]⁺, 299 [MH-C₃H₅NO₂]⁺, 265 [MH-C₃H₇NO₂S]⁺.



III.5.2.1. Desprotecção do aduto 27

Parte da quantidade de aduto obtido (4 mg) foi dissolvida em ácido trifluoroacético (970 μ L) a 60°C com agitação durante 5 dias. A reacção foi monitorizada por HPLC e quando se obteve quantidade significativa de aduto desprotegido, foi neutralizada com NaOH 10 M e os 3 adutos obtidos, isolados por HPLC semi-preparativo a $t_R = 10, 12$ (com acetonitrilo em ácido fórmico 0,1%) e analisados por LC-MS (ESI).

III.5.3. Reacção com Histidina

Na reacção efectuada de acordo com o método geral (descrito em III.4.) na presença de uma solução de histidina (55,1 mg) com a duração de 21h, após purificação por HPLC semi-preparativo usando um gradiente linear de 20 min a 5-15% de acetonitrilo em acetato de amónio 50 mM, seguido de 10 min de 15-40% e de mais 5 min até 100% de acetonitrilo, obtiveram-se quatro produtos de 0,1 mg cada ($t_R = 6, 9, 20$ e 21 min). Devido à pouca quantidade de produto obtido não foi possível a sua caracterização estrutural adequada por RMN.

III.5.4. Reacção com Lisina

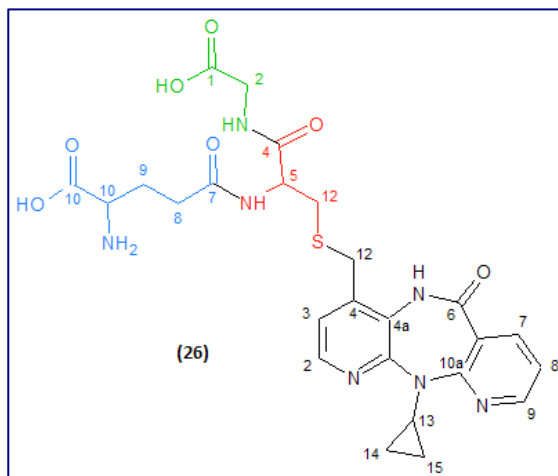
Na reacção efectuada de acordo com o método geral (descrito em III.4.) na presença de uma solução de lisina (51,9 mg) com a duração de 3 dias, após purificação por HPLC semi-preparativo, obtiveram-se dois produtos ($t_R = 9$ e 16 min). Apenas o produto a $t_R = 16$ min foi posteriormente analisado por LC-MS (ESI).

III.5.5. Reacção com Arginina

Na reacção efectuada de acordo com o método geral (descrito em III.4.) na presença de uma solução de arginina (61 mg) com a duração de 2h, após purificação por HPLC semi-preparativo utilizando um gradiente linear de 15 min a 5-15% de acetonitrilo em acetato de amónio, seguido de 5 min de 15-30% e de mais 2 min até 100% de acetonitrilo, obtiveram-se dois produtos ($t_R = 14$ e 18 min). Estes produtos foram analisados por RMN mas não foi possível a sua caracterização estrutural.

III.5.6. Reacção com Glutationo

Na reacção efectuada de acordo com o método geral (descrito em III.4.) na presença de uma solução de glutationo (109 mg) com a duração de 3h, após purificação por HPLC semi-preparativo (com acetonitrilo em ácido fórmico 0,1%), isolou-se o aduto 12-(glutathiono-S-il)-nevirapina (**26**) com um rendimento de 11% (9 mg), $t_R = 14$ min. $^1\text{H RMN (DMSO-}d_6)$ δ : 8,63 (2H, sl, GSH-NH e NH'), 8,50 (2H, d, $J=4,4$ NVP-H9 e H9'), 8,14 (2H, d, $J=4,8$ NVP-H2 e H2'), 8,04-8,02 (2H, m, NVP-H7 e H7'), 7,90 (2H, s, GSH-NH e NH'), 7,22-7,18 (4H, m, NVP-H3 e H3', NVP-H8 e H8'), 4,44-4,36 (2H, m, GSH-H5 e H5'), 4,21 (1H, d, $J=6,0$ NVP-H12a), 4,17 (1H, d, $J=5,6$ NVP-H12a'), 3,78 (1H, d, $J=10,4$ NVP-H12b), 3,74 (1H, d, $J=10,4$ NVP-H12b'), 3,65-3,60 (2H, m, NVP-H13 e H13'), 3,49-3,41 (4H, m, GSH-H2 e H2'), 3,31 (2H, t, $J=6,2$ GSH-H10 e H10'), 2,81-2,72 (2H, m, GSH-H12), 2,61-2,57 (2H, m, GSH-H12'), 2,32-2,29 (4H, m, GSH-H8 e H8'), 1,93 (4H, s, GSH-H9 e H9'), 0,89-0,87 (4H, m, NVP-H14 e H14' ou H15 e H15'), 0,41-0,31 (2H, m, NVP-H14 e H14' ou H15 e H15'). $^{13}\text{C RMN (DMSO-}d_6)$ δ : 171,9 (GSH-C10), 171,8 (GSH-C10'), 171,0 (GSH-C1 e C1'), 170,4 (GSH-C4 e C4'), 170,3 (GSH-C7 e C7'), 167,1 (C=O, NVP-C6 e C6'), 159,8 (NVP-C10a e C10a'), 154,5 (NVP-C11a e C11a'), 151,3 (NVP-C9 e C9'), 143,7 (NVP-C2 e C2'), 140,7 (NVP-C4 e C4'), 140,0 (NVP-C7 e C7'), 124,2 (NVP-C4a e C4a'), 121,3 (NVP-C3 e C3'), 120,6 (NVP-C6a e C6a'), 119,4 (NVP-C8 e C8'), 53,1 (GSH-C10 e C10'), 52,3 (GSH-C5 e C5'), 41,4 (GSH-C2 e C2'), 33,4 (GSH-C12'), 33,0 (GSH-C12'), 31,4 (GSH-C8 e C8'), 30,7 (NVP-C12), 30,5 (NVP-C12'), 29,3 (NVP-C13 e C13'), 26,8 (GSH-C9 e C9'), 8,7 (NVP-C14 + C15, 2 isómeros), 8,4 (NVP-C14 + C15, 2 isómeros). **EM (ESI) m/z**: 572 $[\text{MH}]^+$, 443 $[\text{MH-piroglutamato}]^+$, 307 $[\text{GSH}]^+$, 287 $[\text{MH}_2]^{2+}$.



III.6. Modificação da Albumina do soro humano com 12-MsO-NVP

III.6.1. Método I

A uma solução de HSA (10 mg; 0,15 μmol) em PBS (10 mL) foi adicionada uma solução de **18** (1,0 eq; 5 mg; 13,9 μmol) em THF (0,5 mL). A mistura reaccional foi incubada a 37°C com agitação durante 3 dias. A solução límpida foi dialisada contra 2 L de água desionizada durante 32 h. A solução obtida foi dividida em várias alíquotas de 2 mL que foram evaporadas até à secura e posteriormente hidrolisadas (hidrólises ácidas, enzimática e hidrazinólise).

III.6.2. Método II

A uma solução de HSA (10 mg; 0,15 μmol) em PBS (10 mL) foi adicionada uma solução de **18** (1,0 eq; 5 mg; 13,9 μmol) em THF (0,5 mL). A mistura reaccional ficou a incubar a 37°C com agitação durante 20h. Após o que se adicionou **18** (1,0 eq; 5 mg; 13,9 μmol) em THF (0,5 mL). A mistura reaccional ficou a incubar a 37°C com agitação durante 3 dias. A solução límpida obtida foi dialisada contra 2 L de água desionizada durante 24 h. A solução obtida foi dividida em várias alíquotas de 2 mL que foram evaporadas até à secura e posteriormente hidrolisadas (hidrólise ácida, enzimática e hidrazinólise).

III.7. Hidrólise da HSA modificada com 12-MsO-NVP

III.7.1. Ensaio de hidrólise com HCl

III.7.1.1. Temperatura a 110°C

A HSA modificada (1,2 mg e 0,6 mg) segundo os métodos I e II (descritos em III.5.1. e III.5.2., respectivamente) foi submetida a condições de hidrólise na presença de HCl 6M (0,6 mL e 0,4 mL, respectivamente) sob agitação a 110°C durante 22h ou 4h. Ao fim desse tempo, as soluções obtidas foram arrefecidas e neutralizadas com NaOH 10 M. As soluções foram analisadas por LC-MS (ESI).

III.7.1.2. Com microondas

A HSA modificada (0,020 mg e 0,020 mg) segundo os métodos I e II (descritos em III.5.1. e III.5.2., respectivamente) foi submetida a condições de hidrólise na presença de H₂O (10 μL em ambos os casos) e de HCl 6M (10 μL em ambos os casos) sob irradiação a 800 W durante 1,5 min. Ao fim desse tempo, as soluções obtidas foram arrefecidas e neutralizadas com NaOH 1 M. As soluções foram analisadas por LC-MS (ESI).

III.7.2. Ensaio de hidrólise com ácido trifluoroacético/HCl na presença de ácido tioglicólico

A HSA modificada (0,1 mg e 0,1 mg) segundo os métodos I e II (descritos em III.5.1. e III.5.2., respectivamente) foi submetida a condições de hidrólise, sob atmosfera de azoto, na presença de TFA/HCl 6M (1:2, v/v) (200 µL) com 5% (v/v) de ácido tioglicólico a 166°C durante 25 min. Ao fim desse tempo foi arrefecida e neutralizada com NaOH 1 M. As soluções foram analisadas por LC-MS (ESI).

III.7.3. Ensaio de hidrólise com ácido mercapto-etanossulfónico

A HSA modificada (1,2 mg e 0,9 mg) segundo os métodos I e II (descritos em III.5.1. e III.5.2., respectivamente) foi submetida a condições de hidrólise, na presença de ácido mercapto-etanossulfónico 3M (1 mL). As soluções ficaram em agitação a 110°C durante 24h ou 72h. Ao fim desse tempo foi arrefecida e neutralizada com NaOH 1 M. As soluções foram analisadas por LC-MS (ESI).

III.7.4. Ensaio de hidrólise enzimática

A HSA modificada (0,8 mg e 1,2 mg) segundo os métodos I e II (descritos em III.5.1. e III.5.2., respectivamente) em PBS (286 µL e 429 µL, respectivamente) foi submetida a condições de hidrólise na presença de uma solução de pronase E 0,53 mg/mL (15 µL e 23 µL, respectivamente) e de uma solução de LAP 0,13 mg/mL (6 µL e 9 µL, respectivamente). As soluções foram gentilmente agitadas e incubadas a 37°C durante 20h. As soluções foram analisadas por LC-MS (ESI).

III.7.5. Ensaio de hidrazinólise

A HSA modificada (1,4 mg e 1,0 mg) segundo os métodos I e II (descritos em III.5.1. e III.5.2., respectivamente) foi submetida a condições de hidrólise na presença de hidrato de hidrazina (14 µL e 10 µL, respectivamente) sob agitação a 100°C durante 15h. As soluções foram arrefecidas e neutralizadas com HCl 1M e depois analisadas por LC-MS (ESI).

Para uma melhor detecção dos produtos obtidos foi realizada uma derivatização da amostra com 5 mL de Et₃N e com 5 mL de TFAA em 0,2 mL de 1,4-dioxano. A mistura reaccional ficou em agitação à temperatura ambiente. Ao fim de 2h foi adicionado 0,2 mL de NaOH 1M e ao fim de 30 min adicionou-se 0,5 mL de H₂O e fez-se uma extracção com CH₂Cl₂ (2 x 1 mL). A solução foi concentrada sob corrente de N₂ e posteriormente analisada por LC-MS (ESI).

III.8. Ensaio em branco de hidrólise da HSA

Para cada um dos tipos de hidrólises efectuadas à HSA modificada pelos métodos I e II (descritos em III.5.1. e III.5.2., respectivamente) foi feito um ensaio em branco.

III.8.1. Ensaio em branco para a hidrólise com HCl

III.8.1.1. Temperatura a 110°C

Foi realizado um ensaio em branco com HSA (1 mg; $1,49 \times 10^{-8}$ mol) a que foi adicionado HCl 6M (0,5 mL). A mistura reaccional ficou em agitação a 110°C durante 22h ou 4h. Ao fim desse tempo foi arrefecida e neutralizada com NaOH 10 M.

III.8.1.2. Com microondas

Foi realizado um ensaio em branco com HSA (0,4 mg; $5,97 \times 10^{-9}$ mol) a que foi adicionado H₂O (10 µL) e HCl 6M (10 µL). A mistura reaccional foi irradiada a 800 W durante 1,5 min. Ao fim desse tempo foi arrefecida e neutralizada com NaOH 10 M.

III.8.2. Ensaio em branco para a hidrólise com ácido trifluoroacético/HCl na presença de ácido tioglicólico

Foi realizado um ensaio em branco com HSA (0,4 mg; $5,97 \times 10^{-9}$ mol), sob atmosfera de azoto, na presença de TFA/HCl 6M (1:2, v/v) (200 µL) com 5% (v/v) de ácido tioglicólico a 166°C durante 25 min. Ao fim desse tempo foi arrefecida e neutralizada com NaOH 1 M.

III.8.3. Ensaio em branco para a hidrólise com ácido mercapto-etanossulfónico

Foi realizado um ensaio em branco com HSA (1 mg; $1,49 \times 10^{-8}$ mol) a que foi adicionado ácido mercapto-etanossulfónico 3M (1 mL). A mistura reaccional ficou em agitação a 110°C durante 24h ou 72h. Ao fim desse tempo foi arrefecida e neutralizada com NaOH 10 M.

III.8.4. Ensaio em branco para a hidrólise enzimática

Foi realizado um ensaio em branco com HSA 1 mg/mL em PBS a que foram adicionadas as soluções de enzimas pronase E (19 µL) e LAP (8 µL).

III.8.5. Ensaio em branco para a hidrazinólise

Foi realizado um ensaio em branco com HSA (1 mg; $1,49 \times 10^{-8}$ mol) a que foi adicionado hidrato de hidrazina (10 µL). A mistura reaccional ficou em agitação a 100°C durante 15h e foi posteriormente arrefecida e neutralizada com HCl 1M .

Para uma melhor detecção dos produtos obtidos foi realizada uma derivatização da amostra com 5 mL de Et₃N e com 5 mL de TFAA em 0,2 mL de 1,4-dioxano. A mistura reaccional ficou em agitação à temperatura ambiente. Ao fim de 2h foi adicionado 0,2 mL de NaOH 1M e ao fim de 30 min adicionou-se 0,5 mL de H₂O e fez-se uma extracção com CH₂Cl₂ (2 x 1 mL). A solução foi concentrada sob corrente de N₂ e posteriormente analisada por LC-MS (ESI).

Capítulo IV – Bibliografía

- [1] Magden, J., Kääriäinen, L., Ahola, T. (2005) Inhibitors of virus replication: recent developments and prospects *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**, 612-621.
- [2] Staley, J. T., Gunsalus, R. P., Lory, S., Perry, J. J. *Microbial Life*, 2nd edition, Sinauer Associates, 2007, Capítulo 14.
- [3] <http://www.cdc.gov/hiv/resources/factsheets/PDF/hiv2.pdf> acessado em 10.09.2009.
- [4] Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M., Kim, P. S. (1997) Core Structure of gp41 from the HIV Envelope Glycoprotein *Cell* **89**, 263–273.
- [5] <http://www3.niaid.nih.gov/news/newsreleases/1998/hivprotein.htm> acessado em 10.09.2009.
- [6] <http://en.wikipedia.org/wiki/HIV> acessado em 10.09.2009.
- [7] Chan, D., Kim, P. (1998) HIV entry and its inhibition *Cell* **93**, 681–684.
- [8] Gelderblom, H. R (1997) *Fine structure of HIV and SIV in HIV Sequence Compendium* Los Alamos, New Mexico: Los Alamos National Laboratory. pp. 31–44.
- [9] <http://www3.niaid.nih.gov/topics/HIVAIDS/Understanding/Biology/hivReplicationCycle.htm> acessado em 10.09.2009.
- [10] Kuby, J. *Immunology*, 5th edition, Freeman, New York. 2003 Capítulo 2, pp. 36, 37 e 38.
- [11] <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5710a2.htm> acessado em 13.09.2009.
- [12] <http://aidsinfo.nih.gov/Glossary/GlossaryDataCenterPage.aspx?acr=no&fromLetter=TermsLink&oldWordID=1634> acessado em 11.09.2009.
- [13] Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) and World Health Organization (WHO) 2007 Overview of the global AIDS epidemic Report on the global AIDS epidemic.

- [14] Hirsch, M. S., Kaplan, J. C. (1987) Treatment of Human Immunodeficiency Virus Infections *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **31**, 839-843.
- [15] De Clercq, E. (2007) The design of drugs for HIV and HCV *Nature Reviews/Drug Discovery* **6**, 1001-1018.
- [16] Warnke, D., Barreto, J., Temesgen, Z. (2007) Antiretroviral Drugs *Journal of Clinical Pharmacology* **27**, 1570-1579.
- [17] Ma, Q., Okusanya, O. O., Smith, P. F., DiCenzo, R., Slish, J. C., Catanzaro, L. M., Forrest, A., Morse, G. D. (2005) Pharmacokinetic drug interactions with non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors *Expert Opin Drug Metab. Toxicol.* **1**, 473-485.
- [18] De Clercq, E. (2008) Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV *International Journal of Antimicrobial Agents* **33**, 307-320.
- [19] <http://en.wikipedia.org/wiki/Nevirapine> acedido em 20.09.2009.
- [20] Merluzzi KD, Hargrave K, Labadia M, Grozinger K, Skoog M, Wu JC, Shih CK, Eckner K, Hattox S, Adams J, Rosenthal AS, Faanes R, Eckner RJ, Koup RA and Sullivan JL (1990) Inhibition of HIV-1 replication by a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor *Science* **250**, 1411–1413.
- [21] Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals Inc. US patent 6680383 (2004).
- [22] <http://www.boehringer-ingelheim.com/corporate/products/prodprescaids.htm> acedido em 20.09.2009.
- [23] Horvath, T., Madi, B. C., Iuppa, I. M., Kennedy, G. E., Rutherford, G., Read, J. S. (2009) Interventions for preventing late postnatal mother-to-child transmission of HIV *Cochrane Database of Systematic Reviews* **1**.
- [24] De Clercq, E. (2004) Antiviral drugs in current clinical use *Journal of Clinical Virology* **30**, 115-133.

- [25] Lamson, M. J., Sabo, J. P., MacGregor, T. R., Pav, J. W., Rowland, L., Hawi, A., Cappola, M., Robinson, P. (1999) Single dose pharmacokinetics and bioavailability of nevirapine in healthy volunteers *Biopharm. & Drug Dispos* **20**, 285-291.
- [26] Riska, P., Lamson, M., MacGregor, T., Sabo, J., Hattox, S., Pav, J., Keirns, J. (1999) Disposition and biotransformation of antiretroviral drug nevirapine in humans *Drug Metab. And Dispos.* **27**, 895-900.
- [27] <http://www.rxlist.com/viramune-drug.htm> acedido em 08.09.2009.
- [28] Chen, J., Mannargudi, B. M., Xu, L., Uetrecht, J. (2008) Demonstration of the Metabolic Pathway Responsible for Nevirapine-Induced Skin Rash *Chem. Res. Toxicol.* **21**, 1862-1870.
- [29] <http://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/SafetyAlertsforHumanMedicalProducts/ucm175766.htm> acedido em 26.09.2009.
- [30] Baylor, M. S., Johann-Liang, R. (2004) Hepatotoxicity associated with nevirapine use *J. Acquir. Immune Defic. Syndr* **35**, 538 e 539.
- [31] Martínez, E., Blanco, J. L., Arnaiz, J. A., Pérez-Cuevas, J. B., Mocroft, A., Cruceta, A., Marcos, M. A., Milinkovic, A., García-Viejo, M. A., Mallolas, J., Carné, X., Phillips, A., Gatell, J. M. (2001) Hepatotoxicity in HIV-1-infected patients receiving nevirapine-containing antiretroviral therapy *AIDS* **15**, 1261-1268.
- [32] Sulkowski, M. S., Thomas, D. L., Mehta, S. H., Chaisson, R. E., Moore, R. D. (2002) Hepatotoxicity associated with nevirapine or efavirenz-containing antiretroviral therapy: role of hepatitis C and B infections *Hepatology* **35**, 182-189.
- [33] <http://www.gnn.tv/articles/article.php?id=1011> acedido em 27.09.2009.
- [34] Erickson, D. A., Mather, G., Trager, W. F., Levy, R. H., Keirns, J. J. (1999) Characterization of the *in vitro* biotransformation of the HIV-1 reverse transcriptase

- inhibitor nevirapine by human hepatic cytochromes P-450 *Drug Metab. and Dispos.* **27**, 1488-1495.
- [35] Silverman, R. B. *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, 2nd edition, Elsevier Academic Press, London, United Kingdom, 2004, pp 1-617.
- [36] Bolton, J. L., Trush, M. A., Penning, T. M., Dryhurst, G., and Monks, T. J. (2000) Role of quinones in toxicology *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 135–160.
- [37] Yang, X., Hu, Z., Chan, S. Y., Zhou, S. (2006) Monitoring drug-protein interaction *Clínica Chimica Acta* **365**, 9-29.
- [38] Cuttle, L., Munns, A. J., Hogg, N. A., Scott, J. R., Hooper, W. D., Dickinson, R. G., Gillam, E. M. J. (2000) Phenytoin metabolism by human cytochrome P450: involvement of P450 3A and 2C forms in secondary metabolism and drug-protein adduct formation *Drug Metabolism and Disposition* **28**, 945-950.
- [39] Antunes, A. M. M., Duarte, M. P., Santos, P. P., Costa, G. G., Heinze, T. M., Beland, F. A., Marques, M. M. (2008) Synthesis and Characterization of DNA Adducts from the HIV Reverse Transcriptase Inhibitor Nevirapine *Chem. Res. Toxicol.* **21**, 1443-1456.
- [40] Popovic, M., Caswell, J. L., Mannarguti, B., Shenton, J. M., Uetrecht, J. P. (2006) Study of the Sequence of Events Involved in Nevirapine-Induced Skin Rash in Brown Norway Rats *Chem. Res. Toxicol.* **19**, 1205-1214.
- [41] Srivastava A., Maggs J.L., Pirmohamed M., Park B.K., and Williams D.P. (2008) Metabolic activation of nevirapine in human and rat systems *J. Clin. Pharmacol.* **65**, 1001-1002.
- [42] Wen, B., Chen, Y., Fitch, W. L. (2009) Metabolic Activation of Nevirapine in Human Liver Microsomes: Dehydrogenation and Inactivation of Cytochrome P450 3A4 *American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* In press.
- [43] Bakhtiar, R. (2008) Biomarkers in drug discovery and development *J. of Pharm. And Toxic. Methods* **57**, 85-91.

- [44] Swenberg, J A., Fryar-Tita, E., Jeong, Y., Boysen, G., Starr, T., Walker, V. E., Albertini, R. J. (2008) Biomarkers in Toxicology and Risk Assessment: Informing Critical Dose-Response Relationships *Chem. Res. Toxicol.* **21**, 253-265.
- [45] Törnqvist, M., Fred, C., Haglund, J., Helleberg, H., Paulsson, B., Rydberg, P. (2002) Protein adducts: quantitative and qualitative aspects of their formation, analysis and applications *J. Chromatogr. B* **778**, 279-308.
- [46] Waidyanatha, S., Rappaport, S. M. (2008) Hemoglobin and albumin adducts of naphthalene-1,2-oxide, 1,2-naphthoquinone and 1,4-naphthoquinone in Swiss Webster mice *Chemico-Biological Interactions* **172**, 105-114.
- [47] Baxter, J. H., Lia, C., Phillips, R. R., Dowlati, L., Chio, J. J., Luebbers, S. T., Dimler, S. R., Johns, P. W. (2007) Direct determination of methionine sulfoxide in milk proteins by enzyme hydrolysis/high-performance liquid chromatography *J. Chromatogr. A* **1157**, 10-16.
- [48] Patel, U. R., Proudfoot, J. R. (1992) The synthesis of 11-cyclopropyl-5,11-dihydro-4-(hydroxymethyl)-6H-dipyrido[3,2-b:2',3'-e][1,4]diazepin-6-one, a putative metabolite of the HIV-1 reverse transcriptase inhibitor nevirapine *J. Org. Chem.* **57**, 4023-4025.
- [49] Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemile, D. J. *Spectrometric Identification of Organic Compounds* 7th edition, John Wiley & Sons, Inc., Nova York, 2005, pp. 1-72.
- [50] Martins, I. *Avaliação da toxicidade da droga anti-HIV Nevirapina: síntese e caracterização de adutos com aminoácidos* Relatório de projecto de Química Orgânica.
- [51] Nelson, D. L., Cox, M. M. *Lenhinger Principles of Biochemistry* 3rd edition, Worth pp. 78, 79 e 80.
- [52] Yike, I., Distler, A. M., Ziady, A. G., Dearborn, D. G. (2006) Mycotoxin adducts on human Serum Albumin: Biomarkers of exposure to *Stachybotrys chartarum* *Enviro Health Perspect* **8**, 1221-1226.

- [53] Guo, N., Higgins, T. N. (2009) MALDI-TOF MS/microwave-assisted acid hydrolysis identification of HbG Coughatta *Clinical Biochemistry* **42**, 99-107.
- [54] Fountoulakis, M., Lahm H. (1998) Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins *Journal of Chromatography A* **826**, 109–134.
- [55] Molnár-Perl, I. (1997) Tryptophan analysis in peptides and proteins, mainly by liquid chromatography *Journal of Chromatography A* **763**, 1-10.
- [56] Yokote, Y., Arai, K. M., Akahane, K. (1986) Recovery of Tryptophan from 25-Minute Acid Hydrolysates of Protein *Analytical Biochemistry* **152**, 245-249.
- [57] Penke, B., Ferenczi, R., Kovács K. (1974) A New Acid Hydrolysis Method for Determining Tryptophan in Peptides and Proteins *Analytical Biochemistry* **60**, 45-50.
- [58] Helleberg, H., Törnqvist, M. (2000) A new approach for measuring protein adducts from benzo[*a*]pyrene diolepoxide by high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**, 1644 –1653.
- [59] Walker, J. M., Sweeney, P. J. *The Protein Protocols Handbook* Chapter 76 Production of Protein Hydrolysates Using Enzymes Humana Press Inc. Totowa, NJ
- [60] Perrin, D. D., Armarego, W. L. F., Perrin, D. R. *Purification of Laboratory Chemicals* 2nd Edition Pergamon Press 1980 Oxford pp. 445 e 446.
- [61] a) Vedejs, E., Larsen, S. (1990) *Organic Syntheses* **7**, 277; b) Vedejs, E., Larsen, S. (1986) *Organic Syntheses* **64**, 127.